



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 84404

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 41/00

A61P 43/00

C07D 473/06 (2006.01)

G01N 33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ІШЕМІЧНОГО РЕПЕРFUЗІЙНОГО УШКОДЖЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ АНТАГО-
НІСТІВ РЕЦЕПТОРА АДЕНОЗИНУ

1

(21) a200500247

(22) 12.06.2003

(24) 27.10.2008

(86) РСТ/US03/18695, 12.06.2003

(31) 60/388,680

(32) 12.06.2002

(33) US

(46) 27.10.2008, Бюл.№ 20, 2008 р.

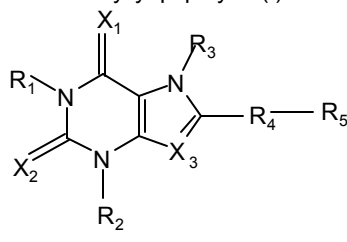
(72) СМІТС ГЛЕНН ДЖ., ДЗІН КСІАОВЕЙ, ГРОСС
ГАРРЕТ ДЖ., АУХАМПАХ ДЖОН(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК., ДЗЕ ЕМСІДАБЛ-
Ю РІСЕРЧ ФАУНДЕЙШН, ІНК.

(56) WO 01/34604 A2

US 6,117,878 A

US 5,573,772 A

(57) 1. Спосіб запобігання, обмеження або лікування ушкодження, викликаного реперфузією після ішемії, у ссавця, що включає в себе ідентифікацію ссавця, у якого спостерігався випадок ішемії або якому загрожує ішемія, і введення ссавцеві терапевтично ефективної або профілактично ефективної кількості антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину протягом десяти днів до або після випадку ішемії; де антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину являє собою сполуку формули (I)



(I)

або її фармацевтично прийнятну сіль, або її N-оксид, де кожний з R_1 , R_2 і R_3 незалежно означає а)водень;

2

b) C_{1-6} -алкіл, C_{2-6} -алкеніл або C_{2-6} -алкініл, де вказаний алкіл, алкеніл або алкініл або не заміщений, або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із гідроксильної, алкоксильної, аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, циклоалкільної, арильної, гетероциклільної, аралкільної, гетероцикліалкільної, ациламіно-, алкіламінокарбонільної, алкілсульфоніламіно- і алкіламіноссульфонільної групи;

c) заміщену або незаміщену арильну групу; або

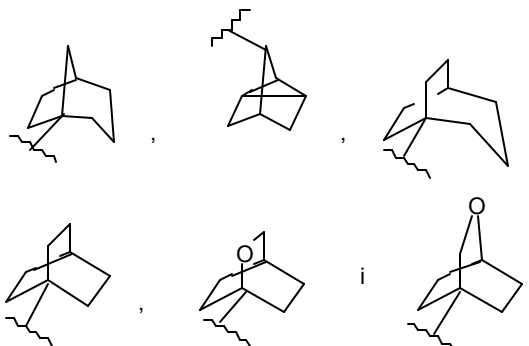
d) заміщену або незаміщену гетероциклільну групу;

R_4 означає простий зв'язок, -O-, $-(CH_2)_{1-3}$ -, $-O(CH_2)_{1-2}$ -, $-CH_2OCH_2$ -, $-(CH_2)_{1-2}O$ -, $-CH=CHCH_2$ -, $-CH=CH-$ або $-CH_2CH=CH-$;

R_5 означає

(a) фенільну групу або

(b) біциклічну або трициклічну групу, вибрану з групи, що складається із



де фенільна, біциклічна або трициклічна група або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , які вибрані з групи, що складається із (a) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу; де кожна із вказаних алкільної, алкенільної або алкінільної груп або не заміщена, або заміщена одним

(13) C2

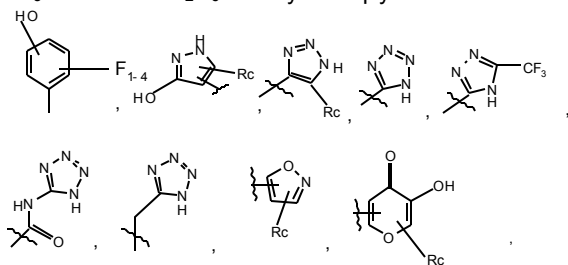
(11) 84404

(19) UA

або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідразинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероциклілкарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксиміно-, фосфонової, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної аралкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбонілаалкіламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної і аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксиміно-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи;

R_b вибраний з групи, що складається із $-\text{COOH}$, $-\text{C}(\text{CF}_3)_2\text{OH}$, $-\text{CONHNHSO}_2\text{CF}_3$, $-\text{CONHOR}_c$, $-\text{CONHSO}_2\text{R}_c$, $-\text{CONHSO}_2\text{NHR}_c$, $-\text{C}(\text{OH})\text{R}_c\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{NHCOCF}_3$, $-\text{NHCONHSO}_2\text{R}_c$, $-\text{NHPO}_3\text{H}_2$, $-\text{NHSO}_2\text{R}_c$, $-\text{NHSO}_2\text{NHCOR}_c$, $-\text{OPC}_3\text{H}_2$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{PO}(\text{OH})\text{R}_c$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NHR}_c$, $-\text{SO}_3\text{NHCOR}_c$, $-\text{SO}_3\text{NHCONHCO}_2\text{R}_c$ і наступних груп:



R_c вибраний з групи, що складається із водню, $-\text{C}_{1-4}$ -алкілу, $-\text{C}_{1-4}$ -алкіл- CO_2H і фенілу, де групи $-\text{C}_{1-4}$ -алкілу, $-\text{C}_{1-4}$ -алкіл- CO_2H і фенілу або не заміщені, або заміщені одним-трьома замісниками, вибраними з групи, що складається із галогену, $-\text{OH}$, $-\text{OMe}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, незаміщеного бензилу і бензилу, заміщеного одним-трьома замісниками, вибраними з групи, що складається із галогену, $-\text{OH}$, $-\text{OMe}$, $-\text{NH}_2$ і $-\text{NO}_2$;

X_1 і X_2 незалежно вибрані з групи, що складається із O і S; і

X_3 означає N або CR_d , де R_d вибраний з групи, що складається із

- водню;
- C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу, де вказаний алкіл, алкеніл або алкініл або не заміщений, або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із гідроксильної, алкоксильної, аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, циклоалкільної, арильної, гетероциклільної, аралкільної, гетероциклілалкільної, ациламіно-, алкіламінокарбонільної, алкілсульфоніламіно- і алкіламіносудфонільної групи;
- заміщеної або незаміщеної арильної групи; і
- заміщеної або незаміщеної гетероциклільної групи.

2. Спосіб за п. 1, де R_1 означає C_{1-6} -алкіл.

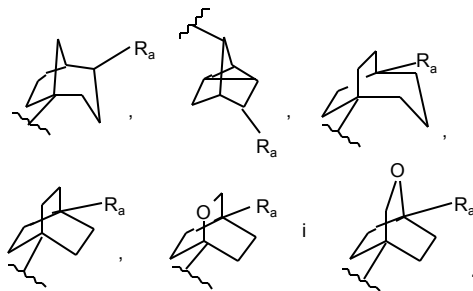
3. Спосіб за п. 1, де R_2 означає C_{1-6} -алкіл.

4. Спосіб за п. 1, де R_3 означає водень.

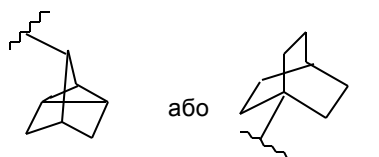
5. Спосіб за п. 1, де R_4 означає простий зв'язок.

6. Спосіб за п. 1, де R_5 означає феніл, заміщений групою R_a .

7. Спосіб за п. 1, де R_5 означає заміщену біциклічну або трициклічну групу, вибрану з групи, що складається із



8. Спосіб за п. 1, де R_5 означає



де вказаний R_5 або не заміщений, або заміщений однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

a) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу; де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідразинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідро-

кси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероциклікарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксиміно-, фосфонової, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно, заміщеної або незаміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбоніалкіламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксиміно-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

9. Спосіб за п. 1, де R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідразинілкарбонільної,

(аміно)(R_b)ацилоксикарбонільної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероциклікарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксиміно-, фосфонової, заміщеної аралкіламіно-, заміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміще-

ної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбоніалкіламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксиміно-, фосфатної, заміщеної аралкіламіно-, заміщеної гетероциклільної, заміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

10. Спосіб за п. 1, де R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклільної групи; і

(b) алкоксикарбоніалкіламіно-, ціано- і гідроксильної групи.

11. Спосіб за п. 1, де X_1 означає O.

12. Спосіб за п. 1, де X_2 означає O.

13. Спосіб за п. 1, де X_3 означає N.

14. Спосіб за п. 1, де кожний з R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл;

R_3 означає водень;

R_4 означає простий зв'язок;

кожний з X_1 і X_2 означає O; а

X_3 означає N.

15. Спосіб за п. 14, де R_5 означає феніл, заміщений групою R_a .

16. Спосіб за п. 15, де R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, R_b - і R_b -алкоксильної групи; і

(b) алкоксикарбоніалкіламіно-, R_b -алкоксильної, ціано-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної і гідроксильної групи.

17. Спосіб за п. 16, де R_a означає ціаногрупу.

18. Спосіб за п. 14, де R_5 означає групу

кілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксиміно-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної, заміщеної або незаміщеної гетероцикліалсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

22. Спосіб за п. 21, де R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної, R_b - і R_b -алкоксильної групи; і

b) алкоксикарбоніалкіламіно-, R_b -алкоксильної, ціано-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної і гідроксильної групи.

23. Спосіб за п. 21, де R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-4} -алкілу або C_{2-4} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної і R_b -групи; і

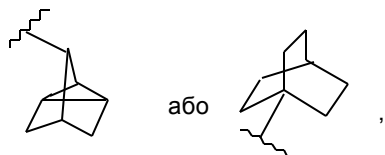
(b) R_b -алкоксильної і заміщеної гетероцикліальної групи.

24. Спосіб за п. 1, де кожний з R_1 і R_2 означає пропіл;

R_3 означає водень;

R_4 означає простий зв'язок;

R_5 означає феніл, заміщений групою R_a , групами



де вказана біциклічна або трициклічна група необов'язково заміщена групою R_a ;

R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, R_b - і R_b -алкоксильної і заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної групи; і

(b) алкоксикарбоніалкіламіно-, ціано- і гідроксильної групи;

кожний з X_1 і X_2 означає O; і

X_3 означає N.

25. Спосіб за п. 1, де сполука формули (I) являє собою 3-[4-(2,6-діоксо-1,3-дипропіл-2,3,6,7-

тетрагідро-1H-пурин-8-іл)біцикло[2.2.2]окт-1-іл]пропіонову кислоту.

26. Спосіб за п. 1, де випадок ішемії вибраний з групи, що складається із гострого коронарного синдрому, інсульту, трансплантації органів, ішемії нирки, шоку і хірургії по пересадці органів.

27. Спосіб за п. 26, де гострий коронарний синдром являє собою інфаркт міокарда.

28. Спосіб за п. 1, де антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом двох днів до або після випадку ішемії.

29. Спосіб за п. 28, де антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом двох днів після випадку ішемії.

30. Спосіб за п. 1, де ссавцем є людина.

31. Спосіб за п. 1, де сполука формули (I) виявляє спорідненість з A_{2b} -рецептором аденозину, яка щонайменше у 10 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або з A_3 -рецептором аденозину.

32. Спосіб за п. 31, де сполука формули (I) додатково виявляє спорідненість з A_1 -рецептором аденозину, яка щонайменше у 10 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або з A_3 -рецептором аденозину.

33. Спосіб за п. 1, де сполука формули (I) має значення K_d для A_{2b} -рецептора аденозину, яке становить менше 500нМ.

34. Спосіб за п. 1, де сполука формули (I) має значення K_d для A_{2b} -рецептора аденозину, яке становить менше 200нМ.

35. Спосіб лікування захворювання або розладу, опосередкованого активацією A_{2b} -рецептора аденозину, що включає в себе введення ссавцеві, у разі необхідності, ефективною кількістю сполуки формули (I) за п. 1.

36. Спосіб обмеження некрозу тканин, викликаного випадком ішемії, що включає в себе ідентифікацію ссавця, у якого спостерігався випадок ішемії або якому загрожує ішемія, і введення ссавцеві терапевтично ефективною або профілактично ефективною кількістю антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину протягом десяти днів до або після випадку ішемії; де антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину являє собою сполуку формули (I) за п. 1.

37. Спосіб обмеження розміру інфаркту після інфаркту міокарда, що включає в себе ідентифікацію ссавця, у якого спостерігався інфаркт міокарда або якому загрожує інфаркт міокарда, і введення ссавцеві терапевтично ефективною або профілактично ефективною кількістю антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину протягом десяти днів до або після інфаркту міокарда; де антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину являє собою сполуку формули (I) за п. 1.

Даний винахід відноситься до кардіології, медичної хімії і фармакології. Винахід, зокрема, відноситься до антагоністів A_{2b} -рецептора аденозину, а також до запобігання або лікування ураження, викликаного реперфузією після ішемії.

Зупинка потоку крові і припинення надходження кисню до тканини викликає стан, відомий як ішемія. Значне скорочення надходження кисню викликає стан, відомий як гіпоксія. Як ішемія, так і гіпоксія при тривалій дії можуть призвести до втрати функції тканини і навіть до смерті клітин. Існує безліч станів, як природних, так і ятрогенних, які викликають ішемію і гіпоксію, включаючи, без їх обмеження, оклюзію судин, тромбоз коронарних артерій, тромбоз судин мозку, розрив аневризми, загальний крововилив, роздроблення, сепсис, сильні опіки шкіри, хірургічні методи лікування оклюзії судин (такі як ішемія хребта при хірургії з приводу аневризми торакоабдомінального відділу аорти), серцево-легеневе шунтування, трансплантацію органів, серцево-судинний колапс (раптова смерть серця) і ядуху.

Звичайне лікування ішемії і гіпоксії полягає у відновленні кровообігу і подачі кисню до нормальних рівнів або шляхом збільшення загальної оксигенації, або усуненням причини блокади судин. Відновлення кровообігу призводить до кращих результатів у порівнянні з ситуаціями, в яких ішемія або гіпоксія зберігаються протягом більш тривалих періодів часу. Проте, добре відомо, що відновлення кровообігу і надходження кисню може призвести до додаткової смерті клітин і втрати функції незалежно від ураження, викликаного ішемією або гіпоксією. Вказане додаткове ураження, викликане відновленням кровообігу і надходження кисню, відоме як ушкодження при реперфузії. Парадоксальне ураження тканин, що викликається ушкодженням при реперфузії, виявляється схожим на гостре запалення, яке є результатом приєднання запальних клітин до тканин після відновлення "перфузії, активування вказаних запальних клітин і подальшого генерування вільних радикалів [Granger et al., *Ann. Rev. Physiol.*, 57, 311-332 (1995)]. Генерування вільних радикалів та інших цитотоксичних біомолекул всередині тканин після відновлення перфузії може призводити до смерті клітин або внаслідок некрозу, або внаслідок розвитку апоптозу.

Аденозин є внутрішньоклітинним і позаклітинним месенджером, який генерується усіма клітинами організму. Він також генерується позаклітинно під час ферментативного перетворення. Тканини у стані ішемії і гіпоксії генерують підвищені кількості аденозину за рахунок руйнування аденозинтрифосфату (АТФ) під час поглинання енергії. Вказані рецептори аденозину поділяють на чотири відомих субтипи (зокрема, A_1 , A_{2a} , A_{2b} , і A_3) за їх відносною спорідненістю з різними лігандами рецептора аденозину і за аналізом послідовності генів, що кодують вказані рецептори. Активування кожного із вказаних субтипів викликає унікальні та іноді прямо протилежні ефекти.

Відомо, що три з чотирьох субтипів рецептора аденозину впливають на функцію запальних клітин при ушкодженні, викликаному реперфузією. Було

показано, що активування A_{2a} -рецепторів аденозину стримує вивільнення вільних радикалів кисню активованими нейтрофілами, знижує здатність нейтрофілів приєднуватись до ендотелію судин і стримує вивільнення TNF і LTB_4 нейтрофілами [див., зокрема, Cronstein et al., *J. Immunology*, 148, pp.2201-2206 (1992); Thiel et al. (1995) *J. Lab. Clin. Med.*, 126, pp.275-282; Krump et al., *J. Exp. Med.*, 186, pp.1401-6(1997)].

У протилежність протизапальним ефектам, які виникають під час активування A_{2a} -рецептора аденозину, було показано, що активування A_1 -рецепторів прискорює хемотаксис і фагоцитоз активованими нейтрофілами [див., зокрема, Cronstein et al., (1992), вказано вище; Salmon et al., *J. Immunology* 145, pp.2235-2240 (1990)] і прискорює диференціювання моноцитів у багатоядерні гігантські клітини [Merrill et al., *Arth. Rheum.*, 40, pp.1308-1315 (1997)]. Більше того, активування рецепторів A_1 на клітинах ендотелію судин прискорює запалення і ураження тканин в моделі ушкодження серця при реперфузії [Becker et al., *Pharm. Pharmacol. Letters*, 2, pp.8-11 (1992); Schwartz et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 25, pp.927-938 (1993); Zahler et al., *Cardiovascular Res.*, 28, pp.1366-1372 (1994); і Foman et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292(3), pp.929-38 (2000)].

Активування A_{2b} -рецептора може також призвести до прозапальної активності, такої як збільшення продукції IL-6 [Sitaraman et al., *J. Clin. Invest.*, 107, pp.861-9 (2001)], і дегрануляції тучних клітин, що є ознакою локального запалення [Linden et al., *Life Sci.*, 62, pp.1519-24 (1998); і Auchampach et al., *Mol. Pharmacol.*, 52, 846-60 (1997)]. Крім того, активування рецепторів A_{2b} у клітинах судин гладких м'язів призводить до втрати клітин за рахунок прямого стимулювання апоптозу [Peyot et al., *Circ. Res.*, 86, pp.76-85 (2000)].

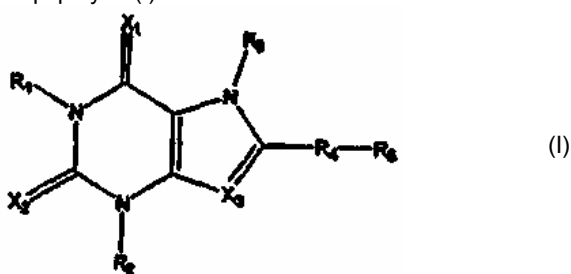
Сучасні методи лікування ушкодження, викликаного реперфузією після ішемії, адекватно лікують ураження при ішемії лише шляхом відновлення кровопостачання і оксигенації. Однак ураження, що є наслідком ушкодження, викликаного реперфузією, звичайно не повністю виліковується. Дослідницькі методи лікування при ішемії-реперфузії включають в себе використання аденозину і аналогів аденозину, а також інгібіторів насоса натрій-кальцієвого обміну у ішемічних міоцитів. Проте, вказані терапії не є досить адекватними. Наприклад, використання аденозину або аналогів аденозину обтяжується небажаними ефектами активності речовини, яка знижує рівень обміну речовин, і брадикардією. Крім того, інгібування насоса натрій-кальцієвого обміну у ішемічних міоцитів виявляється недостатнім, оскільки воно не запобігає і не виліковує запальний стан або не знижує пряме стимулювання апоптозу. Таким чином, зберігається потреба у нових фармацевтично прийнятних сполуках і композиціях для запобігання, обмеження або лікування ушкодження, викликаного реперфузією після ішемії.

Автори даного винаходу вирішили вказану вище проблему, виявивши, що антагоністи A_{2b} -рецептора аденозину здатні запобігати, обмежувати або лікувати ушкодження, викликане репер-

фузією після ішемії. Винахід відноситься до способу запобігання, обмеження або лікування ушкодження, викликаного реперфузією після ішемії, у ссавця, в якого спостерігався випадок ішемії або якому загрожує ішемія, з використанням антагоністів A_{2b} -рецептора аденозину. Сполуки, застосовні у способах згідно з винаходом, виявляють свою благотворну дію за рахунок специфічного інгібування або блокування A_{2b} -рецептора аденозину.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу способи за винаходом включають в себе введення пацієнту терапевтично ефективної або профілактично ефективної кількості A_{2b} -рецептора аденозину протягом десяти днів до або після виникнення випадку ішемії.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антагоністом рецептора A_{2b} аденозину є сполука формули (I)



або її фармацевтично прийнятної солі або її N-оксиду, де кожний з R_1 , R_2 і R_3 незалежно означає

a) водень;

b) C_{1-6} -алкіл, C_{2-6} -алкеніл або C_{2-6} -алкініл, де вказаний алкіл, алкеніл або алкініл або не заміщений, або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із гідроксильної, алкоксильної, аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, циклоалкільної, арильної, гетероциклільної, аралкільної, гетероциклілакільної, ациламіно-, алкіламінокарбонільної, алкілсульфоніламіно- і алкіламіноссульфонільної групи;

c) заміщену або незаміщену арильну групу; або

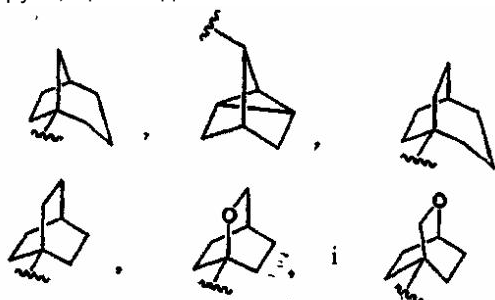
d) заміщену або незаміщену гетероциклічну групу;

R_4 означає простий зв'язок, $-O-$, $-(CH_2)_{1-3}-$, $-O(CH_2)_{1-2}-$, $-CH_2OCH_2-$, $-(CH_2)_{1-2}O-$, $-CH=CHCH_2-$, $-CH=CH-$ або $-CH_2CH=CH-$;

R_5 означає

(a) фенільну групу або

(b) біциклічну або трициклічну групу, вибрану з групи, що складається із



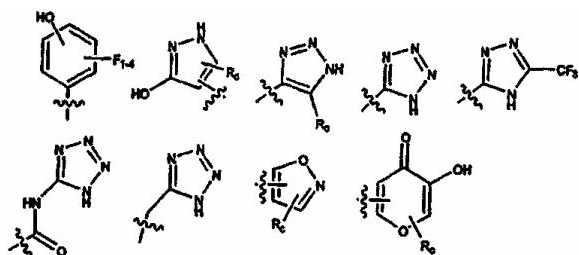
де фенільна, біциклічна або трициклічна група або не заміщена, або заміщена однією або декіль-

кома групами R_3 , які вибрані з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідразинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероциклілакіламіно-, гетероциклілкарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксимино-, фосфонової, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної арилкарбоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбонілакіламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероциклілакілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероциклілакіламіно-, гідроксильної, оксимино-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксидіаціламіно- і тіокарбамоїльної групи;

R_b вибраний з групи, що складається із $-COOH$, $-C(CF_3)_2OH$, $-CONHNHOSO_2CF_3$, $-CONHOR_c$, $-CONHSO_2R_c$, $-CONHSO_2NHR_c$, $-C(OH)R_cPO_3H_2$, $-NHCOCF_3$, $-NHCONHSO_2R_c$, $-NHPO_3H_2$, $-NHSO_2R_c$, $-NHSO_2NHCOR_c$, $-OPO_3H_2$, $-OSO_3H$, $-PO(OH)R_c$, $-PO_3H_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NHR_c$, $-SO_3NHCOR_c$, $-SO_3NHCONHCO_2R_c$ і наступних груп:



R_C вибраний з групи, що складається із водню, -C₁₋₄-алкілу, -C₁₋₄-алкіл-CO₂H і фенілу, де групи -C₁₋₄-алкіл, -C₁₋₄-алкіл-CO₂H і феніл або не заміщені, або заміщені одним-трьома замісниками, вибраними з групи, що складається із галогену, -OH, -OMe, -NH₂, -NO₂, незаміщеного бензилу і бензилу, заміщеного одним-трьома замісниками, вибраними з групи, що складається із галогену, -OH, -OMe, -NH₂ і -NO₂;

X_1 і X_2 незалежно вибрані з групи, що складається із O або S; і

X_3 означає N або CR_d, де R_d вибраний з групи, що складається із

а) водню;

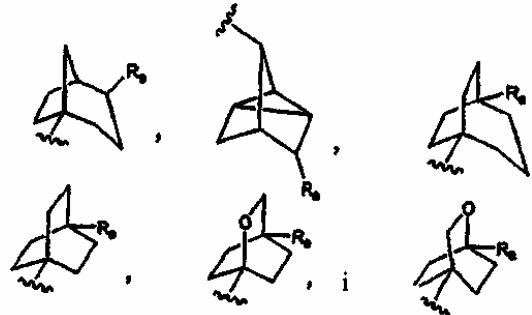
б) C₁₋₆-алкілу, C₂₋₆-алкенілу або C₂₋₆-алкінілу, де вказаний алкіл, алкеніл або алкініл або не заміщений, або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із гідроксильної, алкоксильної, аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, циклоалкільної, арильної, гетероциклільної, аралкільної, гетероцикліалкільної, ациламіно-, алкіламінокарбонільної, алкілсульфоніламіно- і алкіламіносульфонільної групи;

с) заміщеної або незаміщеної арильної групи; і

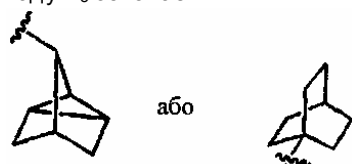
д) заміщеної або незаміщеної гетероциклільної групи.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу R_1 означає C₁₋₆-алкіл. У деяких варіантах здійснення винаходу R_2 означає C₁₋₆-алкіл. У деяких варіантах здійснення винаходу R_3 означає водень. У деяких варіантах здійснення винаходу R_4 означає простий зв'язок.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу R_5 означає феніл. В інших варіантах здійснення винаходу R_5 означає заміщену біциклічну або трициклічну групу, вибрану з групи, що складається із



Нарешті, в інших варіантах здійснення винаходу R_5 означає



де вказаний R_5 або не заміщений, або заміщений однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

а) C₁₋₆-алкілу, C₂₋₆-алкенілу або C₂₋₆-алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідрозинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонові, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонові, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероциклікарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксиміно-, фосфонові, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбоніламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксиміно-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу R_3 вибраний з групи, що складається із

а) C₁₋₆-алкілу, C₂₋₆-алкенілу або C₂₋₆-алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідрозинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алко-

кисильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероцикліалкарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксимино-, фосфонової, заміщеної аралкіламіно-, заміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної гетероцикліальної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбоніламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероцикліальної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероцикліалкарбонільної, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероцикліалкіламіно-, гідроксильної, оксимино-, фосфатної, заміщеної аралкіламіно-, заміщеної гетероцикліальної, заміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіациламіно- і тіокарбамоїльної групи.

В інших варіантах здійснення даного винаходу R_3 вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної і заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної групи; і

(b) алкоксикарбоніламіно-, ціано- і гідроксильної групи.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу X_1 означає O. У деяких варіантах здійснення винаходу X_2 означає O. У деяких варіантах здійснення винаходу X_3 означає N.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; а X_3 означає N. В інших варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 незалежно означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; а R_5 означає феніл, заміщений групою R_a .

У інших варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає феніл,

заміщений групою R_a , а R_a вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної, R_b - і R_b -алкоксильної групи; і

(b) алкоксикарбоніламіно-, R_b -алкоксильної, ціано-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної і гідроксильної групи.

Нарешті, в інших варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає феніл, заміщений групою R_a , а R_a означає ціаногрупу.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає групу



де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідрозинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонової, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, діалкілфосфонової, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероцикліалкіламіно-, гетероцикліалкарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксимино-, фосфонової, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліальної, тіокарбамоїльної і трифторметильної групи; і

(b) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбоніламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероцикліалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-,

арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероциклілакіламіно-, гідроксильної, оксимино-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

У іншому варіанті здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає групу



де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

(а) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, R_b - і R_b -алкоксильної групи; і

(б) алкоксикарбонілакіламіно-, R_b -алкоксильної, ціано-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної і гідроксильної групи.

У іншому варіанті здійснення винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає групу



де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із C_{2-5} -алкілу, який заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно- і діалкіламіногрупи.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; і R_5 означає групу



де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

(а) C_{1-6} -алкілу, C_{2-6} -алкенілу або C_{2-6} -алкінілу, де кожна вказана алкільна, алкенільна або алкінільна група або не заміщена, або заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, (аміно)(R_b)ацилгідрозинілкарбонільної, (аміно)(R_b)ацилоксикарбоксильної, (гідрокси)(карбоалкокси)алкілкарбамоїльної, ацилокси-, альдегідної, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкіламіноалкіламіно-, діалкіламіноалкіламіно-, алкілфосфонові, алкілсульфоніламіно-, карбамоїльної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкіламіно-, ціано-, ціаноалкілкарбамоїльної, циклоалкіламіно-, діалкілфосфонові, галогеналкілсульфоніламіно-, гетероциклілакіламіно-, гетероциклілкарбамоїльної, гідроксильної, гідроксіалкілсульфоніламіно-, оксимино-, фосфонові, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної арилкарбоксіалкоксикарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероарилсульфоніламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, тіокарбамоїльної і триформетильної групи; і

(б) (алкоксикарбоніл)аралкілкарбамоїльної, альдегідної, алкенокси-, алкенілсульфоніламіно-, алкоксильної, алкоксикарбонільної, алкілкарбамоїльної, алкоксикарбоніламіно-, алкоксикарбонілакіламіно-, алкілсульфоніламіно-, алкілсульфонілокси-, аміно-, аміноалкіларалкілкарбамоїльної, аміноалкілкарбамоїльної, аміноалкілгетероциклілакілкарбамоїльної, аміноциклоалкілалкілциклоалкілкарбамоїльної, аміноциклоалкілкарбамоїльної, аралкоксикарбоніламіно-, арилгетероциклільної, арилокси-, арилсульфоніламіно-, арилсульфонілокси-, карбамоїльної, карбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної, R_b -алкілтіо-, R_b -алкіл(алкіл)аміно-, R_b -алкіл(алкіл)карбамоїльної, R_b -алкіламіно-, R_b -алкілкарбамоїльної, R_b -алкілсульфонільної, R_b -алкілсульфоніламіно-, R_b -алкілтіо-, R_b -гетероциклілкарбонільної, аміноалкіламінокарбонільної, діалкіламіноалкіламіно-, алкіламіноалкіламіно-, ціано-, циклоалкіламіно-, діалкіламіноалкілкарбамоїльної групи, галогену, гетероциклілакіламіно-, гідроксильної, оксимино-, фосфатної, заміщеної або незаміщеної аралкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклілсульфоніламіно-, сульфоксіяциламіно- і тіокарбамоїльної групи.

У інших варіантах здійснення даного винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; R_5 означає групу



і де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

(а) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-,

заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної, R_b - і R_b -алкоксильної групи; і

(b) алкоксикарбоніламіно-, R_b -алкоксильної, ціано-, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної і гідроксильної групи.

Нарешті, в іншому варіанті здійснення винаходу кожний із R_1 і R_2 означає C_{2-4} -алкіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; кожний із X_1 і X_2 означає O; X_3 означає N; R_5 означає групу

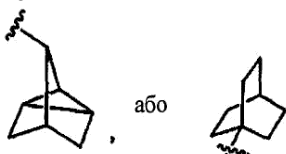


і де вказана група R_5 або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a , вибраними з групи, що складається із

(a) C_{1-4} -алкілу або C_{2-4} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, заміщеної або незаміщеної гетероциклільної і R_b -групи; і

(b) R_b -алкоксильної і заміщеної гетероциклільної групи.

У деяких варіантах здійснення винаходу кожний із R_1 і R_2 означає пропіл; R_3 означає водень; R_4 означає простий зв'язок; R_5 означає феніл, заміщений однією або декількома групами R_a , групами



де вказана біциклічна або трициклічна група або не заміщена, або заміщена однією або декількома групами R_a ; і де R_a , вибраний з групи, що складається із

(a) C_{1-6} -алкілу або C_{2-6} -алкенілу, кожний з яких не заміщений або заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з групи, що складається із аміно-, моноалкіламіно-, діалкіламіно-, заміщеної або незаміщеної гетероцикліламінокарбонільної, R_b -, R_b -алкоксильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклільної групи; і

(b) алкоксикарбоніламіно-, ціано- і гідроксильної групи; кожний із X_1 і X_2 означає O; а X_3 означає N.

У переважному варіанті здійснення винаходу сполука формули (I), яку застосовують у способі згідно з винаходом, являє собою 3-[4-(2,6-діоксо-1,3-дипропіл-2,3,6,7-тетрагідро-1H-пурин-8-іл)біцикло[2.2.2]окт-1-іл]пропіонову кислоту.

У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять людині.

У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину, який застосовують у способі згідно з винаходом, складають із фармацевтично підходящим носієм у вигляді фармацевтично прийнятної композиції.

Винахід застосовується при лікуванні пацієнтів, у яких спостерігався випадок ішемії або яким загрожує ішемія. Приклади випадків ішемії вклю-

чають в себе гострий коронарний синдром (включаючи інфаркт міокарда), інсульт, трансплантацію органів, ішемію нирки, шок і хірургію по пересадці органів.

У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб згідно з винаходом включає в себе введення антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину протягом двох днів до або після випадку ішемії. В іншому варіанті здійснення винаходу спосіб включає в себе введення антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину протягом двох днів після випадку ішемії.

У деяких варіантах здійснення винаходу сполука, застосовна у способах згідно з винаходом, виявляє спорідненість з A_{2b} -рецептором аденозину, яка щонайменше у 10 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або A_3 -рецептором аденозину. У інших варіантах здійснення даного винаходу сполука, застосовна у способах згідно з винаходом, додатково виявляє спорідненість з A_1 -рецептором аденозину, яка щонайменше у 10 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або A_3 -рецептором аденозину.

У деяких варіантах здійснення винаходу сполука, застосовна у способах згідно з винаходом, має значення K_i для A_{2b} -рецептора аденозину, яке складає менше 500нМ. В інших варіантах здійснення винаходу сполука, застосовна у способі згідно з винаходом, має значення K_i для A_{2b} -рецептора аденозину, яке складає менше 200нМ.

У деяких варіантах його здійснення, винахід відноситься до способу лікування захворювання або розладу, опосередкованого активуванням A_{2b} -рецептора аденозину, який включає в себе введення потребуючому цього ссавцеві ефективної кількості сполуки формули (I), як вказано вище.

У деяких варіантах його здійснення, винахід відноситься до способу обмеження некрозу тканин, викликаного випадком ішемії у ссавця, у якого спостерігався випадок ішемії або якому загрожує ішемія, з використанням антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину.

У деяких варіантах його здійснення, винахід відноситься до способу обмеження розміру інфаркту після інфаркту міокарда у ссавця, у якого спостерігався інфаркт міокарда або якому загрожує інфаркт міокарда, з використанням антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину.

На Фіг.1 наведені дані про розмір інфаркту міокарда за методикою I (див. приклад 2). На діаграмі A показаний розмір ділянки ризику у чотирьох експериментальних групах, виражений у вигляді відсотка від [величини] лівого шлуночка. На діаграмі B показаний розмір інфаркту у вигляді відсотка від ділянки ризику. На діаграмі C показаний розмір інфаркту, виражений у вигляді відсотка від лівого шлуночка. На діаграмі D наведений графік розміру інфаркту, виражений у вигляді відсотка від ділянки ризику, і трансмуральний колатеральний потік крові, виміряний через 30хв. після оклюзії коронарної артерії.

На Фіг.2 наведений розмір інфаркту міокарда за методикою II (див. приклад 3). На діаграмі A показаний розмір ділянки ризику у чотирьох експериментальних групах, виражений у вигляді відсот-

ка від лівого шлуночка. Для порівняння включена також контрольна група за методикою I. На діаграмі В показаний розмір інфаркту у вигляді відсотка від ділянки ризику. На діаграмі С показаний розмір інфаркту, виражений у вигляді відсотка від лівого шлуночка. На діаграмі D наведений графік розміру інфаркту, виражений у вигляді відсотка від ділянки ризику, і трансмуральний колатеральний потік крові, виміряний через 30хв. після оклюзії коронарної артерії.

На Фіг.3 наведені дані про розмір інфаркту міокарда за методикою III (див. приклад 4). На діаграмі А показаний розмір ділянки ризику у чотирьох експериментальних групах, виражений у вигляді відсотка від лівого шлуночка. На діаграмі В показаний розмір інфаркту у вигляді відсотка від ділянки ризику. На діаграмі С показаний розмір інфаркту, виражений у вигляді відсотка від лівого шлуночка. На діаграмі D наведений графік розміру інфаркту, виражений у вигляді відсотка від ділянки ризику, і трансмуральний колатеральний потік крові, виміряний через 30хв. після оклюзії коронарної артерії.

На Фіг.4 показане конкурентне зв'язування BG9928 із рекомбінантними A_1 -рецепторами аденозину людини. Мембрани (50мкг мембранного білка), одержані з клітин HEK 293, що стійко експресують A_1 -рецептори аденозину людини, 0,92нМ радіоліганду [3 H]-DPCPX і різні концентрації BG9928 інкубують у 0,1мл буфера HE плюс 2 одиниці/мл аденозіндеамінази протягом 2,5 годин при температурі 21°C у трьох повторних експериментах. Неспецифічне зв'язування вимірюють у присутності 10мкМ NECA. Аналізи по зв'язуванню припиняють шляхом фільтрації (N=1).

На Фіг.5 показане конкурентне зв'язування BG9928 із рекомбінантними A_{2a} -рецепторами аденозину людини. Мембрани (50мкг мембранного білка), одержані з клітин HEK 293, що стійко експресують A_{2a} -рецептори аденозину людини, 1,16нМ радіоліганду [3 H]-ZM241385 і різні концентрації BG9928 інкубують у 0,1мл буфера HE плюс 2 одиниці/мл аденозіндеамінази протягом 2,5 годин при температурі 21°C у трьох повторних експериментах. Неспецифічне зв'язування вимірюють у присутності 10мкМ XAC. Аналізи по зв'язуванню припиняють шляхом фільтрації (N=1).

На Фіг.6 показане конкурентне зв'язування BG9928 із рекомбінантними A_{2b} -рецепторами аденозину людини. Мембрани (40-70мкг мембранного білка), одержані з клітин HEK 293, що стійко експресують рекомбінантні A_{2b} -рецептори аденозину людини, 30-40нМ радіоліганду [3 H]-ZM241385 і різні концентрації BG9928 інкубують у 0,1мл буфера HE плюс 2 одиниці/мл аденозіндеамінази протягом 2,5 годин при температурі 21°C у трьох повторних експериментах. Неспецифічне зв'язування вимірюють у присутності 10мкМ NECA. Аналізи по зв'язуванню припиняють шляхом фільтрації (N=3).

На Фіг.7 показане одностайове зв'язування BG9928 із рекомбінантними A_3 -рецепторами аденозину людини. Мембрани, одержані з клітин HEK 293, що стійко експресують рекомбінантні A_3 -рецептори аденозину людини (50мкг мембранного

білка), і 0,12нМ радіоліганду [125 I]-AB-MECA, або окремо, або разом з 10мкМ IB-MECA або з 10мкМ BG9928 інкубують у 0,1мл буфера HE плюс 2 одиниці/мл аденозіндеамінази протягом 2,5 години при температурі 21°C у трьох повторних експериментах. Аналізи по зв'язуванню припиняють шляхом фільтрації (N=2).

На Фіг.8 наведений FLIPR-аналіз BG9928 із рекомбінантними A_1 -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються клітинами CHO-K1. Під час проведення FLIPR-аналізу вимірюють реакцію у відповідь клітин CHO-K1, що експресують рекомбінантні A_1 -рецептори аденозину людини, на зростаючі концентрації агоніста (CPA) (верхній графік) і визначають значення IC_{50} (концентрація, при якій величина реакції у відповідь становить 50%), а потім значення K_b для антагоніста BG9928 при фіксованих концентраціях агоніста (200нМ CPA) за допомогою нуль-методу (нижній графік).

На Фіг.9 наведений FLIPR-аналіз BG9928 із рекомбінантними A_{2b} -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються клітинами HEK-293. Під час проведення FLIPR-аналізу вимірюють реакцію у відповідь клітин HEK-293, що стійко експресують рекомбінантні A_{2b} -рецептори аденозину людини, на зростаючі концентрації агоніста (NECA) (верхній графік) і визначають значення IC_{50} (концентрація, при якій одержують величину реакції у відповідь, що складає 50%), а потім значення K_b для антагоніста BG9928 при фіксованих концентраціях агоніста (5мкМ NECA) за допомогою нуль-методу (нижній графік).

На Фіг.10 наведений FLIPR-аналіз BG9928 із рекомбінантними A_{2b} -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються клітинами HEK-293. Під час проведення FLIPR-аналізу визначають фракцію контрольної реакції у відповідь, що спостерігається з 10, 100 і 300нМ BG9928 у клітинах HEK-293, що експресують A_{2b} -рецептори аденозину щура, у присутності зростаючих концентрацій агоніста (NECA) (верхній графік). На нижньому графіку наведені результати аналізу за Шилдом даних, наведених на верхньому графіку.

Якщо не вказане інше, усі технічні і наукові терміни, що використовуються у тексті даного опису, мають те ж значення, що і прийняті фахівцями у тій галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Хоча при здійсненні або проведенні випробувань даного винаходу можуть використовуватися способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні тим, які вказані у тексті даного опису, нижче наводяться підхожі матеріали і способи. Усі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, згадані у тексті даного опису, цілком включені до даного опису як посилання. Далі, матеріали, способи і приклади є лише ілюстративними і не обмежують даний винахід.

За текстом даного опису слід розуміти, що термін "містить" або такі його варіації, як "що містить" означає включення вказаного числа або груп чисел, але не виключення будь-якого числа або груп чисел.

За текстом даного опису, "алкільна група" означає насичену аліфатичну вуглеводневу групу. Алкільна група може мати прямий ланцюг або бути

розгалуженою і може містити у ланцюгу, наприклад, від 1 до 6 атомів вуглецю. Приклади алкільних груп з прямим ланцюгом включають в себе, без обмеження ними, етил і бутил. Приклади розгалужених алкільних груп включають в себе, не обмежуючись ними, ізопропіл і трет-бутил. Алкільна група може необов'язково бути заміщена одним або декількома замісниками, такими як алкоксильна, аміно-, нітро-, карбоксильна, карбоалкокси-, ціаногрупа, галоген, гідроксильна, меркапильна, тригалогенметильна, сульфоксильна або карбамоільна група.

За текстом даного опису, "алкенільна група" означає аліфатичну вуглецеву групу, яка має щонайменше один подвійний зв'язок. Алкенільна група може мати прямий ланцюг або бути розгалуженою і може містити у ланцюгу, наприклад, від 3 до 6 атомів вуглецю і 1 або 2 подвійні зв'язки. Приклади алкенільних груп включають в себе, не обмежуючись ними, аліл та ізопропеніл. Алкенільна група може необов'язково бути заміщена одним або декількома замісниками, такими як алкоксильна, аміно-, нітро-, карбоксильна, карбоалкокси-, ціаногрупа, галоген, гідроксильна, меркапильна, тригалогенметильна, сульфоксильна або карбамоільна група.

За текстом даного опису, "алкінільна група" означає аліфатичну вуглецеву групу, яка має щонайменше один потрійний зв'язок. Алкінільна група може мати прямий ланцюг або бути розгалуженою і може містити у ланцюгу, наприклад, від 3 до 6 атомів вуглецю і від 1 і до 2 потрійних зв'язків. Приклади алкінільних груп включають в себе, не обмежуючись ними, пропаргіл і бутиніл. Алкінільна група може необов'язково бути заміщена одним або декількома замісниками, такими як алкоксильна, аміно-, нітро-, карбоксильна, карбоалкокси-, ціаногрупа, галоген, гідроксильна, меркапильна, тригалогенметильна, сульфоксильна або карбамоільна група.

За текстом даного опису, "арильна група" означає фенільну або нафтильну групу або їх похідні. "Заміщена арильна група" означає арильну групу, яка заміщена одним або декількома замісниками, такими як алкільна, алкоксильна, аміно-, нітро-, карбоксильна, карбоалкокси-, ціано-, алкіламіно-, діалкіламіногрупа, галоген, гідроксильна, гідроксіалкільна, меркапильна, алкілмеркапильна, тригалогеналкільна, карбоксіалкільна, сульфоксильна або карбамоільна група.

За текстом даного опису, "аралкільна група" означає алкільну групу, яка заміщена арильною групою. Прикладом аралкільної групи є бензил.

За текстом даного опису, "циклоалкільна група" означає аліфатичну кільцеву групу, що містить, наприклад, від 3 до 8 атомів вуглецю. Приклади циклоалкільних груп включають в себе циклопропіл і циклогексил.

За текстом даного опису, "ацильна група" означає групу алкіл-C(=O)- з прямим або розгалуженим ланцюгом або формільну групу. Приклади ацильних груп включають в себе алканойльні групи (зокрема, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю в алкільній групі). Прикладами ацильних груп є аце-

тил і півалоїл. Ацильні групи можуть бути заміщені або не заміщені.

За текстом даного опису, "карбамоільна група" означає групу зі структурою H_2N-CO_2- . Терміни "алкілкарбамоільна група" і "діалкілкарбамоільна група" відносяться до карбамоїльних груп, у яких азот має одну або дві алкільні групи, приєднані, відповідно, замість атомів водню. Аналогічно, терміни "арилкарбамоїльна група" і "арилалкілкарбамоїльна група" містять арильну групу замість одного з атомів водню і, в останньому випадку, - алкільну групу замість другого атома водню.

За текстом даного опису, "карбоксильна група" означає групу $-COOH$.

За текстом даного опису, "алкоксильна група" означає групу алкіл-O-, в якій значення "алкіл" вказане вище.

За текстом даного опису, "алкоксіалкільна група" означає описану вище алкільну групу, при цьому атом водню заміщений описаною вище алкоксильною групою.

За текстом даного опису, "галоген" означає фтор, хлор, бром або йод.

За текстом даного опису, "гетероциклільна група" означає 5-10-членну циклічну структуру, в якій один або декілька атомів у кільці є елементом, відмінним від вуглецю, зокрема, N, O, S. Гетероциклільна група може бути ароматичною або неароматичною, зокрема, може бути насиченою або може бути частково або повністю ненасиченою. Ароматична гетероциклільна група може також називатися "гетероарильною групою". Приклади гетероциклільних груп включають в себе піридил, імідазоліл, фураніл, тієніл, тіазоліл, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, морфолініл, тіоморфолініл, індоліл, індолініл, ізоіндолініл, піперидиніл, піримідиніл, піперазиніл, ізоксазоліл, ізоксазолідиніл, тетразоліл і бензімідазоліл.

За текстом даного опису, "заміщена гетероциклільна група" означає гетероциклільну групу, в якій один або декілька атомів водню заміщені такими замісниками, як алкоксильна, алкіламіно-, діалкіламіно-, карбалкоксильна, карбамоїльна, карбоксильна, ціаногрупа, галоген, тригалогенметильна, гідроксильна, карбонільна, тіокарбонільна, гідроксіалкільна або нітрогрупа.

За текстом даного опису, "гідроксіалкільна група" означає алкільну групу, заміщену гідроксильною групою.

За текстом даного опису, "сульфамойльна група" має структуру $-S(O)_2NH_2$. "Алкілсульфамойльна група" і "діалкілсульфамойльна група" відносяться до сульфамойльної групи, в якій азот має одну або дві алкільні групи, приєднані, відповідно, замість атомів водню. Аналогічно, терміни "арилсульфамойльна група" і "арилалкілсульфамойльна група" містять арильну групу замість одного з атомів водню і, в останньому випадку, - алкільну групу замість другого атома водню.

За текстом даного опису, "антагоніст" означає молекулу, яка зв'язується із рецептором без активування рецептора. Він конкурує із ендogenousним лігандом за вказане місце зв'язування і, таким чином, знижує здатність ендogenousного ліганду стимулювати рецептор.

За текстом даного опису, "селективний антагоніст" означає антагоніст, який зв'язується зі специфічним субтипом рецептора аденозину з більшою спорідненістю, ніж з іншими субтипами. Термін "селективний антагоніст A_{2b} " у тексті даного опису означає антагоніст, що має високу спорідненість з A_{2b} -рецепторами, який (а) показує наномольну спорідненість зв'язування із субтипом A_{2b} -рецептора і (б) має щонайменше у 10 разів, більш переважно, у 50 разів і, найбільш переважно, у 100 разів більшу спорідненість із субтипом A_{2b} , ніж із субтипами A_{2a} і A_3 -рецептора. Селективний антагоніст A_{2b} необов'язково може мати спорідненість із субтипом A_1 -рецептора і (а) показувати наномольну спорідненість зв'язування із субтипом A_1 -рецептора і (б) мати щонайменше у 10 разів, більш переважно, у 50 разів і, найбільш переважно, у 100 разів більшу спорідненість із субтипом A_1 , ніж із субтипами A_{2a} і A_3 -рецептора.

За текстом даного опису, "інфаркт" означає локалізований некроз, який є наслідком припинення кровопостачання тканини (наприклад, міокарда).

За текстом даного опису, "ішемія" означає неадекватне кровопостачання (кровообіг) локальної ділянки (наприклад, органа або тканини) внаслідок блокади кровоносної судини у вказаній ділянці. Ішемія включає в себе повне припинення потоку крові і доставки кисню до тканини, а також гіпоксію, при цьому спостерігається значне зниження доставки кисню до тканини.

За текстом даного опису, "реперфузія" означає відновлення потоку крові до органа або тканини.

За текстом даного опису, "ушкодження, викликане реперфузією після ішемії", означає ушкодження тканини, викликане ішемією, з подальшою реперфузією.

За текстом даного опису, "фармацевтично прийнятний" означає кількість, ефективну для лікування або запобігання стану, який характеризується підвищеною концентрацією аденозину і/або підвищеною чутливістю до аденозину.

За текстом даного опису, "пацієнт" означає тварина, включаючи ссавця (наприклад, людину).

За текстом даного опису, "фармацевтично прийнятний носій або допоміжний агент" означає нетоксичний носій або допоміжний агент, який можна вводити тварині разом зі сполукою згідно з винаходом і який не руйнує фармакологічну активність сполуки згідно з винаходом.

Солі з фармацевтично прийнятними аніонами включають в себе солі наступних кислот: метансульфонові, хлористоводневі, бромистоводневі, сірчаної, фосфорної, азотної, бензойної, лимонної, винної, фумарові, малеїнові кислоти, кислоти $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, де n дорівнює 0-4, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, де значення n вказане вище.

У тому випадку, коли використовують пари розчинників, відношення розчинників, що застосовуються, дають в об'єм на об'єм (об./об.).

У тому випадку, коли наводять величину розчинності твердої речовини у розчиннику, що використовується, то відношення твердої речовини до розчинника вказують у масі на об'єм (мас./об.).

Крім того, у тексті даного опису використовують наступні скорочення:

BCA відноситься до біцинхонінової кислоти.

BG9928 відноситься до 3-[4-(2,6-діоксо-1,3-дипропіл-2,3,6,7-тетрагідро-1H-пурин-8-іл)біцикло[2.2.2]окт-1-іл]пропіонової кислоти.

$(\text{Ca}^{2+})_i$ відноситься до внутрішньоклітинного кальцію.

CCD відноситься до приладу із зарядовим зв'язком.

CRA відноситься до М6-циклопентиладенозину.

CPM відноситься до кількості одиночних імпульсів за хвилину.

DPM відноситься до кількості розпадів за хвилину.

DR відноситься до відношення концентрацій, тобто до концентрації агоніста, що дає певну реакцію у відповідь (звичайно, але не обов'язково, 50%-ву від максимальної реакцію) у присутності антагоніста, діленої на концентрацію, що дає ту ж саму реакцію у відповідь за відсутності антагоніста.

EDTA відноситься до етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТК).

FLIPR відноситься до флуоресцентного планшет-рідери.

^3H -BG9928 відноситься до BG9928, міченого тритієм.

^3H -DPCPX відноситься до міченого тритієм 8-циклопентил-1,3-дипропілксантину, який є конкурентним субстратом для A_1 - і A_{2b} -рецепторів аденозину.

^3H -ZM241385 відноситься до міченого тритієм 4-(2-[7-аміно-2-(фурил)(1,2,4)триазоло(2,3-а)(1,3,5)триазин-5-іламіноетил]фенолу, який є конкурентним субстратом для A_{2a} -рецепторів аденозину.

[I] відноситься до концентрації вільного радіоліганду.

^{125}I AB-MECA відноситься до N6-(4-амінобензил)-9-(5-метилкарбоніл)- β -D-рибофуранозил)аденіну, міченого атомами ^{125}I .

IB-MECA відноситься до 1-деокси-1-[6-[(3-йодфеніл)метил]аміно]-9H-пурин-9-іл]-N-метил- β N6-(4-амінобензил)-9-(5-(метилкарбоніл)- β -D-рибофурануранаміду.

IC_{50} відноситься до концентрації агента, який на 50% інгібує активність, що вимірюється.

K_b відноситься до константи дисоціації антагоніста.

K_d відноситься до константи дисоціації ліків, що несуть радіоактивну мітку, яку визначають за аналізом насичення.

K_i відноситься до константи інгібування ліків; означає концентрацію конкуруючого ліганду у конкурентному аналізі, який зайняв би 50% рецепторів, якби не був присутнім радіоліганд.

AB-MECA відноситься до N6-(4-амінобензил)-9-(5-метилкарбоніл)- β -D-рибофуранозил)аденіну.

N відноситься до кількості спостережень.

NECA відноситься до 5'-N-етилкарбоксамідоаденозину.

pA_2 відноситься до величини логарифма ефективності антагоніста; означає від'ємний логарифм

концентрації антагоніста, яка викликає 2-кратний зсув кривої концентрація-реакція у відповідь для агоніста.

PMSF відноситься до фенілметилсульфонілфториду.

RFU відноситься до відносних флуоресцентних одиниць.

^3H -R-PIA відноситься до $[\text{^3H}]$ -R-N⁶-фенілізопропіладенозину (він є радіолігандом для A₂-рецепторів аденозину).

Графік Шилда відноситься до графіка залежності логарифма (відношення концентрацій -1), тобто $\log(\text{DR-I})$, від логарифма (концентрація антагоніста). Відрізок, який відтинається на осі логарифма концентрації, відповідає значенню pA_2 , а кут нахилу вказує на тип антагонізму.

SD відноситься до стандартного відхилення.

SEM відноситься до стандартної помилки при визначенні середнього значення.

XAC відноситься до ксантинамінового конгенера.

Загалом, у даному винаході наводяться високоефективні і високоселективні антагоністи A_{2b}-рецептора аденозину. У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки згідно з винаходом необов'язково можуть бути селективними антагоністами A₁-рецептора аденозину.

Синтез сполук-антагоністів аденозину

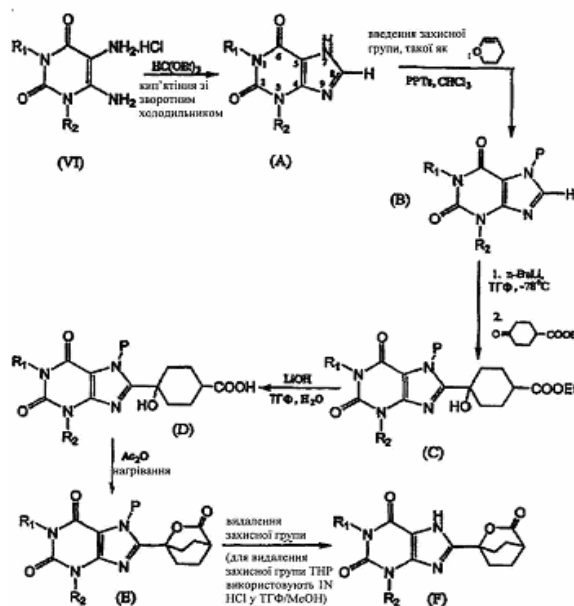
Сполуки, застосовні згідно з винаходом, можуть бути одержані звичайними способами, відомими із даної галузі. Наприклад, синтез сполук формули I наведений [у міжнародних публікаціях №№ WO 01/34604 і WO 01/34610].

У даному описі наводяться два загальних способи. У кожному з них застосовують загальну вихідну сполуку, 1,3-дизаміщений 5,6-діаміноурацил (сполука(VI)), як показано на приведених нижче схемах. 1,3-дизаміщені 5,6-діаміноурацили можуть бути одержані обробкою відповідної симетрично або несиметрично заміщеної сечовини ціаноцтовою кислотою з подальшим нітрузуванням і відно-

вленням (див., зокрема, [J. Org. Chem. 16, 1879, 1951; Can. J. Chem. 46, 3413, 1968]; включені до опису як посилання). Несиметрично заміщені ксантини доступні за методом Мюллера ([J. Med. Chem. 36, 3341, 1993]; включена до опису як посилання). У вказаному способі 6-аміноурацил специфічно алкілюють по N3 урацилу в умовах методу Форбрюгена. Як альтернатива, незаміщені положення N1 або N3 можна функціоналізувати (наприклад, алкілюванням) на останній стадії синтезу.

Відповідно до першого загального способу, 1,3-дизаміщений 5,6-діаміноурацил (сполука(VI)) можна спочатку піддати реакції закриття циклу з одержанням проміжного ксантину, який не містить замісника у положенні 8. Вказану проміжну сполуку, у свою чергу, можна ввести у реакцію поєднання з сполукою-попередником, що містить фрагмент Z-R₃, і одержати необхідні 8-заміщені ксантини. Як вказано на приведеній нижче схемі 1, вихідна сполука 1,3-дизаміщений 5,6-діаміноурацил (тобто сполука (VI)) спочатку взаємодіє із HC(OEt)₃ і зазнає закриття циклу з утворенням проміжного ксантину, що не має замісника у положенні 8 (тобто сполуки (A)). Вказану проміжну сполуку, після того як проводять захист її аміногрупи (зокрема, за допомогою THP або BOM у положенні N7), потім піддають реакції поєднання у присутності сильної основи (наприклад, н-бутиллітію (nBuLi) або діізопропіламиду літію (LDA)) зі сполукою-попередником, що містить фрагмент Z-R₃ (зокрема, альдегідом або кетоном), і одержують спирт (тобто сполуку (C)). Гідроксильну групу спирту можна потім ввести у реакцію і перетворити спирт в амін, меркаптан, простий ефір, лактон (тобто у сполуку (E)) або іншу функціоналізовану сполуку, використовуючи методи, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. Далі захисну групу біля N7 видаляють і одержують продукт без захисної групи (тобто сполуку (F)), який можна піддати подальшій функціоналізації і одержати сполуку згідно з винаходом.

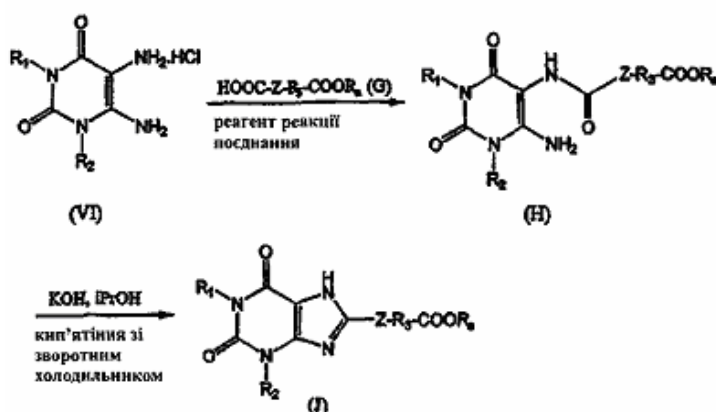
Схема 1



Відповідно до другого загального способу, сполуки згідно з винаходом можуть бути одержані взаємодією вихідної сполуки, 1,3-дизаміщеного 5,6-діаміноурацила, зі сполукою-попередником, що містить фрагмент $Z-R_3$ (зокрема, з альдегідами або карбоновими кислотами, або хлорангідрідами карбонових кислот), з утворенням як проміжна сполука 6-амідзаміщеного урацила, який, у свою чергу, зазнає реакції закриття циклу з утворенням необхідної ксантинової сполуки. Як показано на схемі 2 нижче, вихідну сполуку, 1,3-дизаміщений 5,6-діаміноурацил (тобто сполуку (VI)), спочатку вводять у реакцію поєднання із дикарбоксил/складний ефір-заміщеною сполукою-попередником, що містить фрагмент $Z-R_3$, $HOOC-Z-R_3-COOR_a$ (тобто сполука (G); R_a означає H, C_{1-5} -алкіл, або бензильне або фенільне кільце, необов'язково заміщене 1-3 замісниками, вибраними з групи, що складається із галогену, гідроксильної групи або групи C_{1-3} -алкокси), і одержують 6-

амідзаміщену урацилову проміжну сполуку (тобто сполуку (H)) за реакціями, добре відомими фахівцям у даній галузі техніки (зокрема, за допомогою агентів реакції поєднання, таких як гексафторфосфат бензотриазол-1-ілокситрис(диметиламіно)фосфонію (BOP), гексафторфосфат O-бензотриазол-1-іл-N,N,N',N'-тетраметилуронію (HBTU) або гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронію (HATU)). Приклади сполуки (G) включають в себе монометильовий ефір біцикло[3.2.1]октан-1,5-дикарбонової кислоти і моноетильовий ефір біцикло[2.2.2]октан-1,4-дикарбонової кислоти. Урацилова проміжна сполука потім зазнає реакції закриття циклу у присутності основи (зокрема, KOH в ізопропіловому спирті), з утворенням ксантинової сполуки (тобто сполуки (J)), яку можна піддати подальшій функціоналізації і одержати різні сполуки згідно з винаходом.

Схема 2



Необхідні альдегіди, кетони, карбонові кислоти і хлорангідріди карбонових кислот комерційно доступні (зокрема, від компанії Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, Wis.) або ж можуть бути легко одержані з комерційно доступних речовин за допомогою добре відомих синтетичних способів. Подібні синтетичні способи включають в себе, не обмежуючись ними, окислення, відновлення, гідроліз, алкілювання та одержання гомологічних похідних за методом Віттіга. Як посилання, що відносяться до одержання біциклоалканових карбонових кислот згідно з винаходом (зокрема, сполуки (III)), яка є прикладом сполуки (G), [див., наприклад, Aust. J. Chem. 38, 1705, 1985; Aust. J. Chem. 39, 2061, 1986; J. Am. Chem. Soc. 75, 637, 1953; J. Am. Chem. Soc. 86, 5183, 1964; J. Am. Chem. Soc. 102, 6862, 1980; J. Org. Chem. 46, 4795, 1981; and J. Org. Chem. 60, 6873, 1995].

Існує безліч способів подальшої функціоналізації сполуки (J), яка містить карбоксильну або складноефірну групу, приєднану до фрагмента R_3 . Наприклад, сполуку (J) можна перетворити у відповідне похідне акрилової кислоти. Один спосіб полягає у тому, щоб спочатку гідролізувати складноефірну групу сполуки (J) (при умові, що R_a не є H) і одержати відповідну карбонову кислоту, відно-

вити карбонову кислоту у відповідний спирт, окислити спирт у відповідний альдегід, а потім провести реакцію Уодсворта-Хорнера-Еммонса або реакцію Віттіга з утворенням відповідних похідних акрилової кислоти. Сполуку (J) можна також безпосередньо перетворити у відповідний спирт. Відомі різні варіації для прямого перетворення сполуки (J) у відповідний альдегід. Наступна варіація полягає у перетворенні сполуки (J), що містить складноефірну групу, у відповідну карбонову кислоту, а потім безпосередньо в альдегід. Як альтернатива, можна функціоналізувати сполуку-попередника, що містить фрагмент $Z-R_3$, до проведення реакції поєднання із 1,3-дизаміщеним 8-незаміщеним ксантином за схемою 1 або із 1,3-дизаміщеним 5,6-діаміноурацилом за схемою 2. Крім того, сполуки згідно з винаходом можуть бути одержані на твердому носії (наприклад, на смоли Wang).

Синтез 3-[4-(2,6-діоксо-1,3-дипропіл-2,3,6,7-тетрагідро-1H-пурин-8-іл)біцикло[2.2.2]окт-1-іл]пропіонової кислоти (BG9928) наведений [у міжнародній публікації WO 01/34610].

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки можуть бути у формі ахіральної сполуки, оптично активної сполуки, чистого діастереомеру,

суміші діастереомерів, проліків або їх фармацевтично прийнятної солі.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу сполуки формули I виявляють спорідненість з A_{2b} -рецептором аденозину, яка щонайменше у 10 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або A_3 -рецептором аденозину. У інших варіантах здійснення винаходу сполуки формули I виявляють спорідненість з A_{2b} -рецептором аденозину, яка щонайменше у 50 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або A_3 -рецептором аденозину. Нарешті, в інших варіантах здійснення винаходу сполуки формули I виявляють спорідненість з A_{2b} -рецептором аденозину, яка щонайменше у 100 разів більша, ніж спорідненість з A_{2a} -рецептором аденозину або A_3 -рецептором аденозину. У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки формули I не обов'язково виявляють спорідненість з A_1 -рецептором аденозину.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу сполуки формули I показують величину K_i для A_{2b} -рецептора аденозину, яка складає менше 500нМ. В інших варіантах здійснення даного винаходу сполуки формули I показують величину K_i для A_{2b} -рецептора аденозину, яка складає менше 200нМ. Нарешті, в інших варіантах здійснення даного винаходу сполуки формули I показують величину K_i для A_{2b} -рецептора аденозину, яка складає менше 10нМ.

Одержання антитіл проти A_{2b} -рецептора аденозину

Винахід також охоплює застосування антитіл проти A_{2b} -рецептора аденозину як антагоністи рецептора. Вказані антитіла блокують місця зв'язування ліганду (зокрема, аденозину) на A_{2b} -рецепторі аденозину або перешкоджають зв'язуванню ліганду (зокрема, аденозину) з рецептором.

A_{2b} -рецептор аденозину можна застосовувати для виявлення поліклональних або моноклональних антитіл, які зв'язуються із A_{2b} -рецептором аденозину, за допомогою різних методик, відомих фахівцям. Альтернативно, можуть бути синтезовані пептиди, що відповідають специфічним ділянкам A_{2b} -рецептора аденозину, і вказані пептиди використовують для одержання імунологічних реагентів за допомогою добре відомих методів.

A_{2b} -рецептор аденозину людини був клонований, і була ідентифікована ДНК-послідовність, що кодує рецептор, а також білкова послідовність рецептора [Rivkee et al., Mol. Endocrinol., 6, pp.1598-1604 (1992); Pierce et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, pp.86-93 (1992); Reppert et al., Патент США №5516894].

Антитіла проти A_{2b} -рецептора аденозину згідно з винаходом являють собою молекули імуноглобуліну або їх частини, які мають імунологічну реактивність по відношенню до A_{2b} -рецептора аденозину згідно з винаходом. Більш переважно, антитіла, що застосовуються у способах згідно з винаходом, імунологічно реактивні по відношенню до ділянки зв'язування ліганду A_{2b} -рецептора аденозину.

Антитіла проти A_{2b} -рецептора аденозину можуть бути одержані внаслідок імунізації підхожого

хазяїна. Такі антитіла можуть бути поліклональними або моноклональними. Переважно, вони є моноклональними. Одержання поліклональних і моноклональних антитіл добре відоме із галузі техніки. Огляд способів, що застосовуються при здійсненні даного винаходу, [див., наприклад, у Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Yelton D.E. et al (1981); Ann. Rev. of Biochem., 50, pp.657-80, and Ausubel et al. (1989); Current Protocols in Molecular Biology (New York: John Wiley & Sons)], такі огляди оновлюються щорічно. Визначення імунореактивності по відношенню до A_{2b} -рецептора аденозину може бути проведене будь-ким з декількох способів, добре відомих із галузі техніки, у тому числі, наприклад, шляхом імуноблотинга і методом ELISA.

Моноклональні антитіла з афінністю $10^{-8}M^{-1}$ або переважно, від 10^{-9} до $10^{-10}M^{-1}$ або більшою афінністю звичайно одержують стандартними методами, наведеними, зокрема, у [Harlow and Lane (1988)], див. вище. Коротко, вибирають підхожу тварину і використовують потрібну методику імунізації. Коли мине відповідний період часу січуть селезінки вказаних тварин, і клітини окремих селезінок у вибраних умовах селекції зливають, як правило, з іморталізованими клітинами мієломи. Потім клітини клонально розділяють, і рідину над осадком кожного клону перевіряють на продукцію відповідного антитіла, специфічного для необхідної ділянки антигену.

Інші підхожі методи включають *in vitro* вплив лімфоцитів на антигенний A_{2b} -рецептор аденозину або, як альтернатива, на вибір бібліотеки антитіл у фагових або схожих векторах. [Див. Huse et al., Science, 246, pp.1275-81 (1989)]. Антитіла, застосовні згідно з винаходом, можуть використовуватися з модифікацією або без модифікації. Антигени (у даному випадку A_{2b} -рецептор аденозину) та антитіла можуть бути помічені за допомогою сполуки, як ковалентно, так і нековалентно, з речовиною, яка здатна генерувати сигнал, що виявляється. Із галузі техніки відома безліч способів включення мітки або кон'югування, які можуть бути застосовані при здійсненні даного винаходу. Підхожі мітки включають в себе радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні агенти, хемілюмінесцентні агенти, магнітні частки і т.п. Патенти; в яких описане застосування вказаних міток, включають в себе [Патенти США №№3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 і 4366241]. Крім того, можуть бути одержані рекомбінантні імуноглобуліни [див. Патент США №4816567].

Антитіло згідно з винаходом може бути гібридною молекулою, утвореною послідовностями імуноглобуліну від різних видів (зокрема, миші або людини) або з порцій послідовностей легкого і важкого ланцюгів імуноглобуліну від одних і тих же видів. Антитіло може бути антитілом з одним ланцюгом або гуманізованим антитілом. Воно може бути молекулою, яка має множинну специфічність зв'язування, такою як біфункціональне антитіло, одержане з використанням однієї з декількох відомих фахівцям методик, які включають в себе одержання гібридних гібридів, дисульфідний обмін,

хімічну зшивку, введення пептидних лінкерів між двома моноклональними антитілами, введення двох наборів легких і важких ланцюгів імуноглобуліну у відповідну клітинну лінію і т.д.

Антитіла згідно з винаходом можуть бути також моноклональними антитілами людини, які, наприклад, продукуються імуорталізованими клітинами людини, мишами SCID-hu або іншими відмінними від людини тваринами, здатними продукувати "людські" антитіла, або експресуються клонованими генами імуноглобуліну людини. Одержання гуманізованих антитіл описане у [Патентах США №№5777085 та 5789554].

Таким чином, фахівець у даній галузі, ознайомлений з описом даного винаходу, має у своєму розпорядженні різні методи, які можуть бути застосовані, з метою зміни біологічних властивостей антитіл згідно з винаходом, включаючи методи, які збільшують або зменшують стабільність або період напіврозпаду, імуногенність, токсичність, афінність або вихід даних молекул антитіл, або з метою якої-небудь іншої їх зміни, яка може зробити їх ще більш підходящими для конкретного застосування.

Застосування антагоністів A_{2b} -рецептора аденозину

Способи і композиції згідно з винаходом можуть застосовуватися для запобігання, обмеження або лікування наслідків у людини, в якій спостерігався випадок ішемії або якій загрожує ішемія. Випадок ішемії може бути, наприклад, гострим коронарним синдромом (включаючи інфаркт міокарда), інсультом, трансплантацією органів, ішемією нирки, шоком і хірургією по пересадці органів. У деяких випадках здійснення винаходу випадком ішемії є інфаркт міокарда.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом 10 днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення даного винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом 5 днів до або після випадку ішемії. Нарешті, в інших варіантах здійснення даного винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом 2 днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення даного винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом 2 днів після випадку ішемії.

У даному винаході пропонуються також способи лікування захворювання або розладу, опосередкованого активацією A_{2b} -рецептора аденозину, шляхом введення потребуючому цього ссавцеві фармацевтично ефективної або профілактично ефективної кількості антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину згідно з винаходом.

Ішемія часто призводить до некрозу уражених тканин. У даному винаході пропонуються також способи обмеження некрозу тканин, викликаного ішемією, які включають в себе ідентифікацію ссавця, у якого спостерігався випадок ішемії або якому загрожує ішемія, і введення йому терапевтично ефективної або профілактично ефективної кількості антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину згідно з винаходом. У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять

протягом десяти днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом п'яти днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом двох днів до або після випадку ішемії.

Інфаркт міокарда являє собою розвиток некрозу міокарда, викликаного дисбалансом між надходженням кисню і потребою міокарда, і призводить до некрозу міокарда. Інфаркти міокарда часто викликаються розривом бляшок, який супроводжується розвитком тромбозу у коронарній артерії, що призводить до гострого скорочення кровопостачання частини міокарда. Це може призвести до часткової або повної закупорки судини і до подальшої ішемії міокарда. Повна закупорка коронарної судини протягом декількох годин (наприклад, 4-6 годин) призводить до необоротного некрозу міокарда. Проте, відновлення перфузії протягом вказаного періоду може врятувати міокард і знизити поширення хвороби і смертність. Таким чином, у даному винаході пропонується також спосіб обмеження розміру інфаркту внаслідок інфаркту міокарда шляхом ідентифікації ссавця, у якого спостерігався інфаркт міокарда або якому загрожує інфаркт міокарда, і введення йому терапевтично ефективної або профілактично ефективної кількості антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину згідно з винаходом. У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом десяти днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом п'яти днів до або після випадку ішемії. В інших варіантах здійснення винаходу антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину вводять протягом двох днів до або після випадку ішемії.

Фармацевтичні композиції

Антагоністи A_{2b} -рецептора аденозину можуть бути складені у вигляді фармацевтичних композицій для введення тваринам, включаючи людину. Вказані фармацевтичні композиції переважно включають в себе кількість антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину, ефективну для лікування, обмеження або запобігання ушкодженню, викликаному реперфузією після ішемії, і фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтично прийнятні носії, застосовні у вказаних фармацевтичних композиціях, включають в себе, зокрема, іонообмінні сполуки, оксид алюмінію, стеарат алюмінію, лецитин, сироваткові білки, такі як сироватковий альбумін людини, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінову кислоту, сорбат калію, суміші неповних гліцеридів насичених рослинних жирних кислот, воду, солі або електроліти, такі як сульфат протаміну, динатрійгідрофосфат, калійгідрофосфат, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний діоксид кремнію, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, речовини на основі целюлози, поліетиленгліколь, натрієве похідне карбоксиметилцелюлози, поліакрилати, віск, блок-співполімери поліетилену і поліоксипропілену, поліетиленгліколь і ланолін.

Композиції згідно з винаходом можуть бути введені парентерально, перорально, шляхом інгаляції спрею, місцево, ректально, інтраназально, трансбукально, вагінально або за допомогою імплантованого резервуара. Термін "парентерально" у тексті даного опису включає в себе підшкірні, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньосуглобні, внутрішньосиновіальні, внутрішньогрудні, внутрішньооболонкові, внутрішньопечінкові, всередину ураженого місця, внутрішньочерепні методи ін'єкції або вливання. Переважно, композиції вводять перорально, внутрішньочеревинно або внутрішньовенно.

Стерильні форми композицій згідно з винаходом, які вводять шляхом ін'єкцій, можуть являти собою водні або масляні суспензії. Вказані суспензії можуть бути складені відповідно до методик, відомих із галузі техніки, з використанням підходящих диспергуючих або змочувальних агентів і суспендуючих агентів. Стерильні препарати для ін'єкцій можуть також являти собою стерильні розчини або суспензії для ін'єкцій у нетоксичному розріджувачі або розчиннику, прийнятному для парентерального введення, наприклад, у вигляді розчину у 1,3-бутандіолі. Прийнятними носіями і розчинниками, які можна використовувати, є вода, розчин Рінгера та ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як розчинник або суспендуюче середовище звичайно застосовують стерильні нелеткі масла. Для цієї мети може бути використане будь-яке м'яке нелетке масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. У препаратах для ін'єкцій застосовні жирні кислоти, такі як олеїнова кислота і її гліцеридні похідні, і природні фармацевтично прийнятні масла, такі як оливкова олія або касторова олія, зокрема, їх поліоксетиловані похідні. Вказані розчини або суспензії у маслі можуть також містити розріджувач або диспергуючий агент на основі спирту з довгим ланцюгом, такий як карбоксиметилцелюлоза або аналогічні диспергуючі агенти, які звичайно використовують у складах фармацевтично прийнятних дозованих форм, включаючи емульсії і суспензії. Для одержання складів можуть також застосовуватися інші поверхнево-активні речовини, що звичайно використовуються, такі як Tweens, Spans та інші звичайно застосовні емульгуювальні агенти або речовини, що збільшують біодоступність, які звичайно застосовуються при виготовленні фармацевтично прийнятних твердих, рідких та інших дозованих форм.

Парентеральні склади можуть являти собою одноразові дози у вигляді болюсів, болюси для вливання або ударні дози болюсів з подальшим введенням підтримуючої дози. Вказані композиції можуть бути введені один раз в день або "у міру необхідності".

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можна вводити перорально у вигляді будь-якої перорально прийнятної дозованої форми, включаючи капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. У разі таблеток для перорального використання, носії, що звичайно застосовуються, включають в себе лактозу і кукурудзяний крохмаль. Як правило, також додають лубриканти, такі як стеарат магнію. Для перорального використан-

ня у вигляді капсул, застосовні розріджувачі включають в себе лактозу і висушений кукурудзяний крохмаль. У тому випадку, коли для перорального застосування необхідні водні суспензії, активний інгредієнт змішують з емульгуювальними або суспендуючими агентами. Якщо необхідно, можуть бути також додані певні підсолоджувальні, ароматизуючі або фарбувальні агенти.

Альтернативно, фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть бути введені у формі супозиторіїв для ректального використання. Вказані супозиторії можуть бути приготовлені змішуванням агента з підходящим неподразним наповнювачем, який є твердим при кімнатній температурі, але рідким при температурі у прямій кишці, а тому плавиться у прямій кишці, вивільняючи ліки. Вказані речовини включають в себе масло какао, бджолиний віск і поліетиленгліколі.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть також бути введені у вигляді внутрішньоназальних аерозолів або інгаляцій. Вказані композиції одержують відповідно до методик, добре відомих із галузі виготовлення фармацевтичних сумішей, і вони можуть бути приготовлені у вигляді розчинів у фізіологічному розчині, з використанням бензилового спирту або інших підходящих консервантів, прискорювачів адсорбції для підвищення біодоступності, вуглеводнів, що містять фтор, і/або інших звичайних солюбілізуювальних або диспергуючих агентів.

Кількість антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину, яка може бути змішана із речовиною носіїв для одержання разової дозованої форми, буде варіювати в залежності від пацієнта, що підлягає лікуванню, і конкретного способу введення. Композиції можуть бути складені таким чином, що пацієнту, який одержує вказані композиції, вводиться доза антагоніста A_{2b} -рецептора аденозину в інтервалі 0,01-100 мг на кг маси тіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу доза становить 0,1-10 мг на кг маси тіла. Композиції можуть бути введені у вигляді однократної дози, у вигляді декількох доз або шляхом вливання протягом встановленого періоду часу.

Конкретне дозування і схеми лікування конкретного пацієнта будуть залежати від різноманітних чинників, включаючи конкретний антагоніст A_{2b} -рецептора аденозину, вік пацієнта, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать та дієту, а також час введення, швидкість виведення з організму, комбінацію ліків і тяжкість конкретного захворювання, лікування якого проводять. Оцінка вказаних чинників медичним персоналом є звичайною практикою у даній галузі техніки. Кількість антагоніста буде також залежати від індивідуального пацієнта, лікування якого проводять, способу введення, типу суміші, характеристик сполуки, що застосовується, тяжкості захворювання і бажаного ефекту. Кількість антагоністів може бути визначена виходячи із фармакологічних і фармакокінетичних принципів, добре відомих із галузі техніки.

Відповідно до деяких варіантів його здійснення, у даному винаході пропонується спосіб запобігання, обмеження або лікування ушкодження, викликаного реперфузією після ішемії, який включає

стадію введення пацієнту однієї із вищезазначених фармацевтичних композицій.

Для того щоб викладений у даному описі винахід був більш зрозумілим, далі наводяться наступні приклади. Слід розуміти, що вказані приклади подані лише для ілюстрації, і їх не треба розглядати як ті, що яким-небудь чином обмежують даний винахід.

Приклади

1. Тваринна модель і загальні методики

Дослідження проводять на анестезованих барбіталом собаках з розкритою грудною кліткою, оснащених приладами для вимірювання швидкості скорочення серця, кров'яного тиску, тиску у лівому шлуночку і регіонального потоку крові у міокарді (радіоактивні мікросфери). Механічний блокатор розміщують поруч із проксимальною частиною лівої передньої низхідної коронарної артерії, щоб викликати ішемію і реперфузію. Після закінчення експериментів визначають розмір інфаркту за допомогою гістохімічного фарбування (патентований блакитний барвник і трифенілтетразолій) і виражають у вигляді відсотка розміру ділянки ризику або у вигляді відсотка від усього лівого шлуночка.

2. Експериментальна методика проведення попереднього лікування

Відповідно до методики попереднього лікування (див. Фіг.1, методика I) у собак протягом 60хв. викликають оклюзію коронарної артерії, а потім проводять реперфузію протягом 3 годин, після чого серця видаляють, і оцінюють розмір інфаркту. Чотирьом групам собак, вибраним випадковим чином, призначають носій, CPX (8-циклопентил-1,3-дипропіл-3,7-дигідропурин-2,6-діон), BG 9719 (8-(2S-5,6-екзо-епокси-ендо-норборн-2-іл)-1,3-дипропіл-3,7-дигідропурин-2,6-діон) або BG 9928 (3-[4-(2,6-діоксо-1,3-дипропіл-2,3,6,7-тетрагідротетрагідропурин-8-іл)біцикло[2.2.2]окт-1-іл]пропіонова кислота) за десять хвилин до оклюзії. Всі антагоністи вводять у дозі 1мг/кг у вигляді внутрішньовен-

них болюсів з подальшим вливанням у кількості 10мг/кг/хв. безпосередньо перед відновленням перфузії (всього 70хв.).

Не спостерігається значної різниці між вказаними чотирма групами за загальною гемодинамікою (швидкість скорочення серця і кров'яний тиск), максимальною величиною dP/dt лівого шлуночка або регіональним потоком крові (див. таблиці 1, 4 і 5), що вказує на те, що антагоністи не впливають на гемодинамічні змінні. Не спостерігається також відмінностей у частині лівого шлуночка, яка зазнала ішемії під час закупорки коронарної артерії (розмір ділянки ризику; Фіг.1A). Однак розмір інфаркту, виражений або у вигляді відсотка від ділянки ризику (Фіг.1B), або у вигляді відсотка від лівого шлуночка (Фіг.1C), значно менший у двох групах собак, яких лікували за допомогою CPX (51%-ве зниження) або BG 9928 (49%-ве зниження). Розмір інфаркту у групі собак, яких лікували за допомогою BG 9928, аналогічний розміру інфаркту у контрольній групі. Коли розмір інфаркту, виражений у вигляді відсотка від ділянки ризику, наносять на графік залежності від трансмурального колатерального потоку крові (Фіг.1D), то спостерігається зворотна залежність, яку можна встановити за допомогою лінійного регресійного аналізу. У групах собак, яких лікували за допомогою CPX і BG 9928, це співвідношення, зсувається вниз, у порівнянні з контрольною групою, вказуючи на те, що розмір інфаркту був менший у вказаних двох групах при будь-якій даній величині колатерального потоку крові. Співвідношення між розміром інфаркту і колатеральним потоком крові аналогічне контрольній групі і групі, яку лікували за допомогою BG 9719. Таким чином, лікування за допомогою CPX і BG 9928 (але не лікування за допомогою BG 9719) перед оклюзією призводить до значного зменшення розміру інфаркту, яке не пов'язане зі змінами загальної гемодинаміки або колатерального потоку крові.

Таблиця 1

Гемодинамічні змінні за методикою I (Попереднє лікування)

	Базова лінія	Оклюзія 30хв.	Оклюзія 60хв.	Реперфузія 1год.	Реперфузія 2год.	Реперфузія 3год.
Носій						
HR (удари/хв)	155±3	153±2	154±3	154±3	152±2	152±5
MBP (мм рт.ст.)	107±5	105±5	102±5	104±5	110±6	109±6
LVdP/dt (мм рт.ст/сек.)	1663±89	1650±121	1813±119	1650±76	1538±87	1513±75
CPX						
HR	150±2	153±4	152±4	150±5	153±5	151±5
MBP	90±4	94±7	98±8	97±5	102±6	105±6
LVdp/dt	1650±106	1481±146	1631±92	1506±77	1538±74	1538±135
BG 9719						
HR	155±2	161±4	159±4	157±5	160±4	161±4
MBP	104±6	109±5	103±5	106±3	114±4	112±5
LVdp/dt	1838±141	1931±125	1819±205	1706±102	1781±125	1725±113

Продовження таблиці 1

BG9928						
HR	152±2	150±2	151±4	153±4	153±4	154±4
MBP	87±6	92±5	95±5	87±3	97±5	99±4
LVdp/dt	1518±154	1631±115	1650±136	1463±62	1463±141	1463±84

HR, швидкість скорочення серця; MBP, середній артеріальний кров'яний тиск; LVdP/dt, максимальне значення dP/dt у лівому шлуночку.

3. Експериментальна методика preconditionування

Відповідно до методики preconditionування (див. Фіг.2, методика II), у всіх собак викликають оклюзію коронарної артерії протягом 60хв. з подальшою реперфузією протягом трьох годин. Preconditionування проводять у вигляді циклів, викликаючи оклюзію протягом 5 хвилин з подальшою 5-хвилинною реперфузією, за 10хв. до 60-хвилинної оклюзії. Чотирьом групам собак, вибраним випадковим чином, призначають носій, CPX, BG 9719 або BG 9928, за десять хвилин до першої preconditionування оклюзії. Антагоністи вводять у дозі 1мг/кг у вигляді внутрішньовенних болюсів з подальшим вливанням у кількості 10мкг/кг/хв, яке продовжують до повного відновлення від наслідків тривалої оклюзії (всього 115хв.).

Аналогічно групі з попереднім лікуванням, не спостерігається значних відмінностей у загальній гемодинаміці, регіональному потоці крові у міокарді або розмірі ділянки ризику між чотирма групами за методикою preconditionування (див. таблицю 2, 4 і 5, Фіг.2А). Preconditionування чотирма циклами 5-хвилинна оклюзія/5-хвилинна реперфузія перед 60-хвилинною оклюзією викликає значне змен-

шення розміру інфаркту (~65%-ве зниження), у порівнянні з контрольною групою, що не зазнавала preconditionування за методикою I (Фіг.2В і 2С). Середній розмір інфаркту (виражений як відсоток або від ділянки ризику, або від лівого шлуночка) у групах собак, яких лікували антагоністами A_{2b}-рецептора аденозину, також значно менший, у порівнянні з контрольною групою, що не зазнавала preconditionування, і аналогічний або трохи менший, ніж у контрольній групі, що зазнавала preconditionування (Фіг.2В і 2С). Preconditionування зсуває відношення між розміром інфаркту і колатеральним потоком крові вниз, у порівнянні з контрольною групою, що не зазнавала preconditionування (Фіг.2Б). Це відношення ще більше зсунуто вниз у групах собак, яких лікували з використанням CPX або BG9928, але не з використанням BG9719. Одержані результати показують, що лікування з використанням CPX, BG9719 або BG9928 не блокує захисні впливи ішемічного preconditionування, які виникають завдяки численним циклам оклюзії/реперфузії. Результати також показують, що лікування з використанням CPX або BG9928 (але не BG9719) доповнює захисний вплив ішемічного preconditionування.

Таблиця 2

Гемодинамічні змінні за методикою II (Preconditionування)

	Базова лінія	Оклюзія 30хв.	Оклюзія 60хв.	Реперфузія 1год.	Реперфузія 2год.	Реперфузія 3год.
Носій						
HR (удари/хв.)	155±4	153±4	152±4	144±3	144±3	146±2
MBP (мм рт.ст.)	103±6	101±6	104±6	107±6	108±4	106±5
LVdP/dt(мм рт.ст/сек.)	1606±196	1625±142	1550±124	1394±94	1356±75	1281±60
CPX						
HR	151±1	150±3	148±3	150±5	151±4	152±4
MBP	87±6	88±4	96±8	91±5	100±5	100±6
LVdp/dt	1369±140	1294±130	1388±113	1181±82	1256±89	1313±105
BG 9719						
HR	156±3	152±4	152±5	155±7	156±6	156±6
MBP	105±7	103±5	103±5	97±6	99±6	101±5
LVdp/dt	1693±121	1671±111	1736±130	1500±164	1457±153	1479±155
BG 9928						
HR	149±1	149±2	150±1	149±1	148±1	148±1
MBP	86±2	84±3	84±3	80±5	87±5	86±3
LVdp/dt	1300±50	1400±74	1375±72	1100±50	1125±64	1175±72

HR, швидкість скорочення серця; MBP, середній артеріальний кров'яний тиск; LVdP/dt, максимальне значення dP/dt у лівому шлуночку.

4. Експериментальна методика реперфузії

За методикою реперфузії (див. Фіг.3, методика III) у собак викликають протягом 60хв. оклюзію коронарної артерії з подальшою реперфузією протягом трьох годин. Чотирьом групам собак, вибраним випадковим чином, призначають носій, CPX, BG 9719 або BG 9928 за десять хвилин до усунення оклюзії. Антагоністи вводять у дозі 1мг/кг у вигляді внутрішньовенних болюсів з подальшим вливанням у кількості 10мкг/кг/хв протягом 1 години.

Не спостерігається значних відмінностей у гемодинамічних змінних, регіональному потоці крові у міокарді або розмірі ділянки ризику між чотирма групами за цією експериментальною методикою (див. таблиці 3-5 і Фіг.3А). Розмір інфаркту, виражений у вигляді відсотка від ділянки ризику, значно

знижується при введенні CPX або BG 9928 на ранніх стадіях реперфузії (Фіг.3В). Проте, введення BG 9719 не виявляє захисну дію. Відношення між розміром інфаркту і колатеральним потоком крові зсувається вниз у двох групах собак, яких лікували з використанням CPX або BG 9928, у порівнянні з контрольною групою (Фіг.3С). Зменшення розміру інфаркту, яке виявляють CPX і BG 9928, у даній методиці менше за величиною (42% і 44%, відповідно), у порівнянні з методикою I, коли їх вводять перед ішемією, і значне зменшення розміру інфаркту не спостерігається, коли дані виражають у вигляді відсотка від усього лівого шлуночка (Фіг.30), цілком імовірно, внаслідок малої кількості вивчених тварин. Одержані дані показують, що CPX і BG 9928 (але не BG 9719) знижують розмір інфаркту при їх введенні під час ішемії.

Таблиця 3

Гемодинамічні змінні за методикою III (Реперфузія)

	Базова лінія	Оклюзія 30хв.	Оклюзія 60хв.	Реперфузія 1год	Реперфузія 2год	Реперфузія 3год
Носій						
HR (удари/хв.)	155±3	153±2	154±3	154±3	152±2	152±5
MBP (мм рт.ст.)	107±5	105±5	102±5	104±5	110±6	109±6
LVdP/dt (мм рт.ст/сек.)	1663±89	1650±121	1813±119	1650±76	1538±87	1513±75
CPX						
HR	150±2	149±1	151±1	152±3	151±4	156±4
MBP	102±4	99±7	105±6	108±5	112±4	114±4
LVdp/dt	1556±85	1531±159	1688±105	1688±97	1650±57	1631±72
BG 9719						
HR	150±3	154±3	153±4	154±5	155±6	151±4
MBP	102±5	95±7	101±5	101±3	103±3	97±5
LVdp/dt	1519±125	1400±149	1569±165	1500±102	1425±85	1350±90
BG 9928						
HR	151±1	151±3	150±2	147±2	148±2	150±3
MBP	90±6	90±5	96±4	88±5	92±5	95±4
LVdp/dt	1594±106	1638±132	1744±69	1406±49	1463±74	1463±79

HR, швидкість скорочення серця; MBP, середній артеріальний кров'яний тиск; LVdP/dt, максимальне значення dP/dt у лівому шлуночку.

Таблиця 4

Дані по регіональному потоку крові у міокарді (мл/хв./г) за методиками I, II і III у неішемічній ділянці (ділянка, яка омивається лівою згинаючою коронарною артерією)

	Методика I		Методика II		Методика III	
	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.
іосій						
epi	0,65±0,06	0,53±0,05	0,66±0,06	0,69±0,10	0,65±0,06	0,53±0,05
mid	0,75±0,09	0,60±0,05	0,62±0,07	0,57±0,09	0,75±0,09	0,60±0,05
endo	0,76±0,09	0,69±0,09	0,61±0,10	0,59±0,11	0,76±0,09	0,69±0,09
trans	0,72±0,07	0,61±0,05	0,63±0,07	0,62±0,05	0,72±0,07	0,61±0,05
CPX						
epi	0,60±0,08	0,66±0,07	0,97±0,20	0,85±0,12	0,69±0,05	0,96±0,12
mid	0,66±0,08	0,64±0,07	0,78±0,12	0,76±0,12	0,67±0,07	0,94±0,12
endo	0,54±0,04	0,61±0,06	0,73±0,22	0,81±0,12	0,71±0,07	1,02±0,12
trans	0,60±0,06	0,64±0,06	0,83±0,20	0,81±0,13	0,69±0,06	0,97±0,11

Продовження таблиці 4

BG 9719						
epi	0,70±0,08	0,64±0,09	0,91±0,22	0,83±0,13	0,60±0,08	0,46±0,03
mid	0,77±0,06	0,64±0,07	0,92±0,14	0,87±0,11	0,66±0,06	0,50±0,02
endo	0,77±0,06	0,67±0,08	0,86±0,16	0,88±0,20	0,63±0,06	0,59±0,06
trans	0,75±0,07	0,65±0,08	0,90±0,13	0,86±0,12	0,63±0,05	0,52±0,03
BG 9928						
epi	0,87±0,08	0,73±0,07	0,48±0,14	0,45±0,06	0,83±0,07	0,84±0,10
mid	0,80±0,07	0,71±0,07	0,49±0,14	0,47±0,12	0,87±0,06	0,89±0,08
endo	0,80±0,11	0,79±0,06	0,51±0,12	0,56±0,14	0,85±0,06	0,88±0,08
trans	0,82±0,06	0,74±0,06	0,49±0,13	0,50±0,13	0,85±0,05	0,87±0,08

epi - епікард; mid - міокард; endo - ендокард; trans - трансмуральний

Таблиця 5

Дані по регіональному потоку крові у міокарді (мл/хв./г) за методиками I, II і III у ділянці ішемії-реперфузії (ділянка, яка омивається лівою згинаючою коронарною артерією)

	Методика I		Методика II		Методика III	
	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.	Оклюзія 30хв.	Реперфузія 3год.
Носій						
epi	0,08±0,01	0,47±0,10	0,10±0,04	0,48±0,12	0,08±0,01	0,47±0,10
mid	0,06±0,01	0,50±0,08	0,06±0,02	0,35±0,04	0,06±0,01	0,50±0,08
endo	0,05±0,01	1,01±0,16	0,07±0,02	1,06±0,13	0,05±0,01	1,01±0,16
trans	0,06±0,01	0,66±0,10	0,08±0,02	0,63±0,04	0,06±0,01	0,66±0,10
CPX						
epi	0,15±0,04	0,48±0,07	0,07±0,03	0,62±0,12	0,10±0,01	0,50±0,04
mid	0,08±0,02	0,49±0,04	0,05±0,01	0,54±0,11	0,07±0,01	0,40±0,04
endo	0,05±0,01	0,90±0,16	0,04±0,01	0,68±0,12	0,04±0,01	0,93±0,05
trans	0,09±0,02	0,62±0,06	0,06±0,02	0,61±0,10	0,07±0,01	0,61±0,05
BG 9719						
epi	0,11±0,03	0,44±0,10	0,14±0,04	0,63±0,12	0,00±0,03	0,31±0,04
mid	0,06±0,02	0,31±0,04	0,08±0,02	0,43±0,04	0,07±0,03	0,33±0,05
endo	0,05±0,01	0,77±0,19	0,06±0,01	0,64±0,10	0,04±0,01	0,72±0,13
trans	0,09±0,02	0,51±0,10	0,09±0,02	0,56±0,10	0,09±0,03	0,45±0,06
BG 9928						
epi	0,14±0,05	0,48±0,11	0,12±0,04	0,45±0,13	0,10±0,02	0,66±0,12
mid	0,09±0,03	0,39±0,05	0,06±0,01	0,31±0,10	0,08±0,02	0,67±0,15
endo	0,05±0,01	0,73±0,12	0,03±0,01	0,72±0,30	0,05±0,01	1,20±0,15
trans	0,09±0,03	0,54±0,06	0,07±0,01	0,49±0,14	0,08±0,02	0,84±0,12

epi - епікард; mid - міокард; endo - ендокард; trans - трансмуральний

Таблиця 6

Константи дисоціації антагоністів для рекомбінантних A₁-, A_{2a}- і A₃-рецепторів аденозину собаки, визначені за аналізом зв'язування радіоліганду

Сполука	A ₁	A _{2a}	A ₃
CPX	18,1±4,4	162±22	1960±420
BG 9719	35,8±4,0	2820±268	19070±540
BG 9928	28,9±4,1	4307±1230	37670±9030

K_i значення (нМ±SEM; n=3) одержані з експериментів по конкурентному зв'язуванню з мембранами із трансфікованих клітин HEK 293 з використанням ³H-CPX, ³H-ZM 241385 і ³R-PIA як радіоліганд для A₁-, A_{2a}- і A₃-рецепторів, відповідно.

5. Приготування мембран

Мембрани HEK 293 (ембріональна нирка людини), що експресують A_{2b}-рецептори аденозину людини, куплені у компанії Receptor Biology; HEK 293 клітини мембран, що експресують A_{2a}-рецептори людини, куплені у компанії Perkin Elmer (Boston, MA); CHO-K1 клітини мембран, що експресують A₁-рецептори аденозину людини, куплені у компанії Receptor Biology.

пресують A₁-рецептори людини, і НЕК 293 клітини мембран, що експресують A₃-рецептори людини, одержують із відповідних стійко трансфікованих клітин, приготованих у клініці.

6. Аналіз зв'язування радіоліганду

Мембрани (40-70мкг мембранного білка), радіоліганди і різні концентрації конкуруючих лігандів інкубують у трьох повторних експериментах у 0,1мл буфера HE плюс 2одиниці/мл аденозиндеамінази протягом 2,5 годин при температурі 21°C. Під час проведення аналізу конкурентного зв'язування використовують наступні радіоліганди: [³H]-8-циклопентил-1,3-дипропілксантин ([³H]-DPCPX) (NEN, Boston, MA) для A₁- і A_{2b}-рецепторів аденозину, [³H]-4-(2-[7-аміно-2-(фурил)(1,2,4)триазол(2,3-а)(1,3,5)триазин-5-іламіноетил)фенол ([³H]-ZM241385) для A_{2a}-рецепторів аденозину (Tocris, Bristol, UK) і мічений [¹²⁵I] N6-(4-амінобензил)-9-(5-

метилкарбоніл)-β-D-рибофуранозил)аденін ([¹²⁵I]-AB-MECA) або [³H]-R-N⁶-фенілізопропіладенозин ([³H]-R-PIA) для A₃-рецепторів аденозину (обидва від компанії NEN, Boston, MA). Неспецифічне зв'язування вимірюють у присутності 10мкМ 5'-N-етилкарбоксамідоаденозину (NECA, від компанії RBI-Sigma, Natick, MA) для A₁- і A_{2b}-рецепторів, або 10мкМ ксантинамінового конгенера (ХАС, від компанії RBI-Sigma, Natick, MA) для A_{2a}-рецепторів. Аналіз на зв'язування припиняють фільтруванням через фільтр Whatman GF/C із скловолокна за допомогою харвестера клітин BRANDEL (Gaithersburg, MD). Фільтри тричі промивають 3-4мл охолодженого льодом буферного розчину Tris-HCl, pH7,4, і 5мМ розчином хлориду магнію (MgCl₂) при температурі 4°C, а потім проводять підрахунок за допомогою лічильника β-часток Wallac (Perkin Elmer, Бостон, Массачусетс).

Таблиця 7

Значення K_i (нМ) або відсоток (%) інгібування у присутності 10мкМ антагоніста в аналізах конкурентного зв'язування радіо ліганду

Зразки	Значення K _i (нМ) або відсоток (%) інгібування у присутності 10мкМ антагоніста в аналізах конкурентного зв'язування радіо ліганду			
	Рецептор аденозину			
	A ₁	A _{2a}	A _{2b}	A ₃
BG9928	12,2	4059	88,53±21,03 ^a	30% ^b
DPCPX	5,3	156 ^c	56	262
BG9719	10,3	9152	853±270 ^a	40,6%

a: N=3

b: відсоток інгібування при 10мкМ BG 9928.

c: Див. [J. Linden, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 41, pp.775-787 (2001)].

У конкурентному аналізі на зв'язування з рекомбінантними A₁-рецепторами аденозину і [³H]-DPCPX як радіоліганд значення K_i для BG9928, DPCPX і BG9719 складають 12,2нМ, 5,3нМ і 10,3нМ, відповідно (див. таблицю 7, Фіг.4). У конкурентному аналізі на зв'язування з рекомбінантними A_{2a}-рецепторами аденозину і [³H]-ZM241385 як радіоліганд значення K_i для BG9928, DPCPX і BG9719 складають 4059нМ, 156нМ і 9152нМ, відповідно (див. таблицю 7, Фіг.5). У конкурентному аналізі на зв'язування з рекомбінантними A_{2b}-рецепторами аденозину і [³H]-ZM241385 як радіоліганд значення K_i для BG9928, DPCPX і BG9719 складають 88,53±21,03нМ (N=3), 56нМ і 853±270нМ (N=3), відповідно (див. таблицю 7, Фіг.6).

Аналізи на односайтове зв'язування проводять для визначення впливу 10мкМ BG9928 на зв'язування [¹²⁵I]-AB-MECA з мембранами рекомбінантного A₃-рецептора аденозину людини. В односайтовому аналізі на зв'язування з рекомбінантними A₃-рецепторами аденозину людини 10мкМ BG9928 викликають 30%-ве інгібування зв'язування [³H]-ZM241385 (Фіг.7).

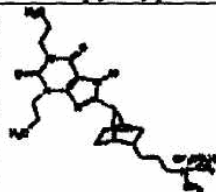
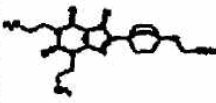
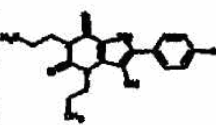
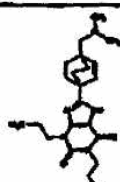
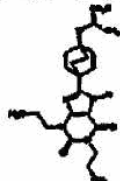
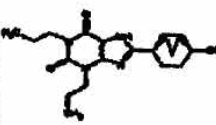
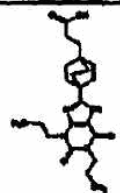
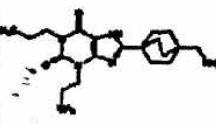
7. Аналіз зв'язування радіоліганду

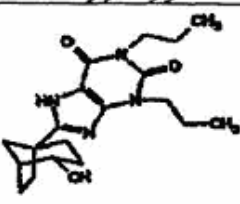
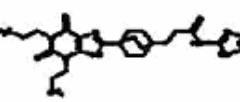
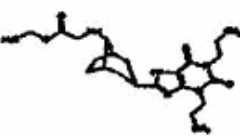
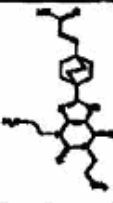
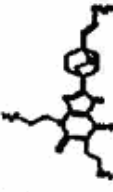
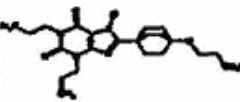
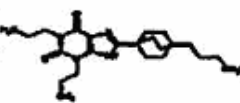
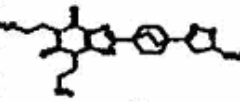
Мембрани (50мкг мембранного білка), радіоліганди і різні концентрації конкуруючих лігандів інкубують у трьох повторних експериментах у 0,1мл

буфера HE плюс 2одиниці/мл аденозиндеамінази протягом 2,5 годин при температурі 21°C. Під час проведення аналізу конкурентного зв'язування для A_{2b}-рецепторів аденозину використовують [³H]-8-циклопентил-1,3-дипропілксантин ([³H]-DPCPX, 30-40нМ) (NEN, Boston, MA). Неспецифічне зв'язування вимірюють у присутності 10мкМ 5'-N-етилкарбоксамідоаденозину (NECA, від компанії RBI-Sigma, Natick, MA). Аналіз на зв'язування припиняють фільтруванням через фільтр Whatman GF/C із скловолокна за допомогою харвестера клітин BRANDEL (Gaithersburg, MD). Фільтри тричі промивають 3-4мл охолодженого льодом буферного розчину Tris-HCl, pH7,4, і 5мМ розчином хлориду магнію (MgCl₂) при температурі 4°C, а потім проводять підрахунок за допомогою лічильника β-часток Wallac (Perkin Elmer, Boston, MA).

Дані по конкурентному зв'язуванню відповідають односайтовій моделі зв'язування, і їх наносять на графік за допомогою програми Prism GraphPad. Для розрахунку значень K_i із величин IC₅₀ використовують рівняння Ченга-Прусоффа K_i=IC₅₀/(1+[I]/K_D), де K_i означає константу спорідненості для конкуруючого ліганду, [I] означає концентрацію вільного радіоліганду, а K_D означає константу спорідненості для радіоліганду (Cheng and Prusoff 1973). Значення K_i декількох сполук згідно з винаходом наведені у таблиці 8.

Таблиця 8
Величини K_i (нМ) в аналізі конкурентного зв'язування радіоліганду

Сполука №	Структура	Аналіз	K_i (нМ)
1		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	14,6
2		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	15,2
3		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	27
4		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	39
5		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	45,1
6		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	47
7		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	51,4
8		АДЕНОЗИН А2В (HEK293)	55,2

Сполука №	Структура	Аналіз	Ki (нМ)
9		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	76,9
10		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	85,6
11		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	93
12		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	100
13		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	117
14		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	125
15		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	127
16		АДЕНОЗИН А2В (НЕК293)	131

Сполука №	Структура	Аналіз	Ki (нМ)
17		АДЕНОЗИН A2B (HEK293)	150,62
18		АДЕНОЗИН A2B (HEK293)	168

8. Функціональний аналіз з використанням флуоресцентного планшет-рідери (FLIPR)

Аналіз з використанням флуоресцентного планшет-рідери (FLIPR), з метою визначення кальцію, проводять з клітинами HEK 293, які стійко експресують A_{2b} -рецептори аденозину людини і щура, і клітинами CHO-K1, які стійко експресують рекомбінантні A_1 -рецептори аденозину людини. Клітини висівають у 96-ямкові планшети з культурою, у яких стінки ямок мають чорний колір, а дно є прозорим, і вирощують до утворення на 80-90% конфлюентного моношару. Не видаляючи середовище, додають рівні об'єми барвника (із набору для аналізу кальцію, придбаного у компанії Molecular Devices). Планшети з клітинами інкубують протягом 1 години при температурі 37°C, а потім переносять у прилад FLIPR (Molecular Devices).

Для аналізу рекомбінантних A_1 -рецепторів аденозину, CHO-K1 клітини інкубують зі зростаючими дозами агоніста (N6-циклопентиладенозин, CPA), для визначення концентрації агоніста, яка викликає 50%-ву від максимальної реакцію у відповідь. Цю концентрацію агоніста (200нМ CPA) потім інкубують зі зростаючими концентраціями (від 10^{-12} до 10^{-5} М) антагоніста, BG9928. Для аналізу рекомбінантних A_{2b} -рецепторів аденозину людини і щура, HEK 293 клітини інкубують зі зростаючими дозами агоніста (5'-N-етилкарбоксамідоаденозин, NECA), для визначення концентрації агоніста, яка викликає 50%-ву від максимальної реакцію у відповідь. Цю концентрацію агоніста (5мкМ NECA для A_{2b} -рецепторів людини) або різні концентрації (для A_{2b} -рецепторів щура) потім інкубують зі зростаючими концентраціями антагоніста, BG9928 (від 10^{-12} М до 5×10^{-6} М для A_{2b} -рецепторів людини і 10, 100 або 300нМ для A_{2b} -рецепторів щура).

FLIPR об'єднує аргонний лазер як джерело випромінювання, 96-ямковий пристрій для піпетування і систему детектування, в якій використовують CCD (прилад із зарядовим зв'язком) відеокamera. Проводять моніторинг флуоресцентного випромінювання від 96 ямок одночасно на довжині хвилі збудження і довжині хвилі випускання 488 і 520нм, відповідно. Флуоресцентні дані одержують з інтервалами 1 сек до і після одночасного швидкого додавання сполук у 96-ямкові планшети. Результати виражають у відносних флуоресцентних одиницях (RFU).

Функціональні FLIPR-аналізи проводять з BG9928 з використанням рекомбінантних A_1 -рецепторів аденозину людини, які стійко експресуються у CHO-K1 клітинах. Константа дисоціації антагоніста (K_B) для BG9928 і BG9719 відповідно до нуля-методології становить 0,60нМ і 0,46нМ, відповідно, на рекомбінантному A_1 -рецепторі аденозину людини (див. таблицю 9 і Фіг.8).

Функціональні FLIPR-аналізи проводять з BG9928 з використанням рекомбінантних A_{2b} -рецепторів аденозину людини, які стійко експресуються у HEK 293 клітинах. Значення K_B антагоніста для BG9928, BG9719 і DPCPX, відповідно до нуля-методології, становлять 3,36нМ, 182нМ і 23,6нМ, відповідно, на рекомбінантних A_{2b} -рецепторах аденозину людини (див. таблицю 9 і Фіг.9).

Функціональні FLIPR-аналізи проводять з BG9928 з використанням рекомбінантних A_{2b} -рецепторів аденозину щура, які стійко експресуються у HEK 293 клітинах. Значення K_B антагоніста для BG9928, відповідно до нуля-методології, становить 257нМ, а значення pA_2 , відповідно до аналізу Шилда, становить 6,59 (див. таблицю 9 і Фіг.10).

Таблиця 9

Сумарні дані по величинах K_D (нМ) для антагоністів
у функціональних FLIPR-аналізах (субтипи рецептора людини)

Зразки	Величини K_D (нМ) для антагоністів у функціональних FLIPR-аналізах Рецептор аденозину			
	A_1	A_{2a}	A_{2b}	A_3
BG9928	0,60	ND	3,36	ND
BG9719	0,46	ND	182	ND
DPCPX	ND	ND	23,6	ND

ND: не визначали

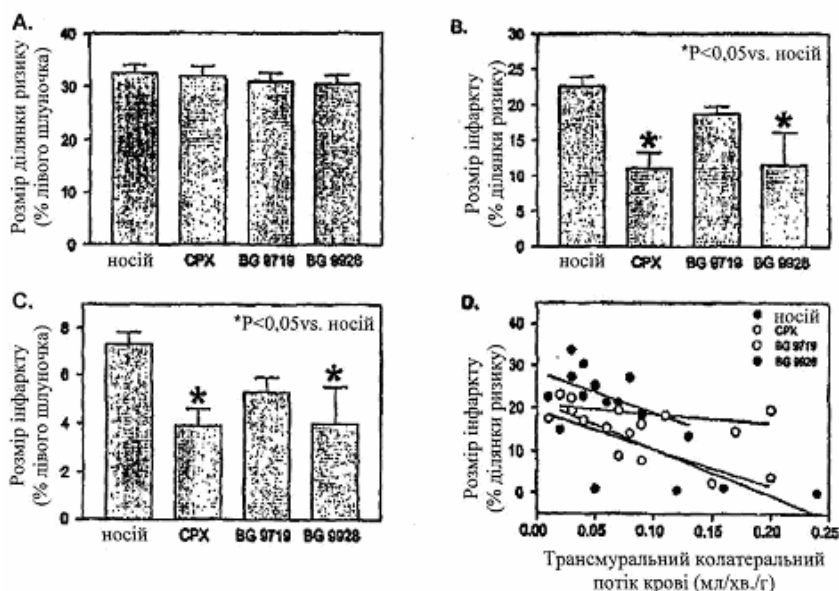
9. Аналіз даних

Дані представлені як середнє значення \pm стандартна помилка визначення середнього значення (SEM) або стандартне відхилення (SD). Дані по насиченню аналізують за допомогою нелінійних методів найменших квадратів Марквардта і наносять на графік з використанням програми Prism GraphPad. Дані по конкурентному зв'язуванню відповідають моделі односайтового зв'язування, і їх наносять на графік з використанням програми Prism GraphPad. Для розрахунку значень K_i із величин IC_{50} використовують рівняння Ченга-Прусоффа $K_i = IC_{50} / (1 + [I]/K_D)$, де K_i означає константу спорідненості для конкуруючого ліганду, $[I]$ означає концентрацію вільного радіоліганду, а K_D

означає константу спорідненості для радіоліганду (Cheng and Prusoff 1973).

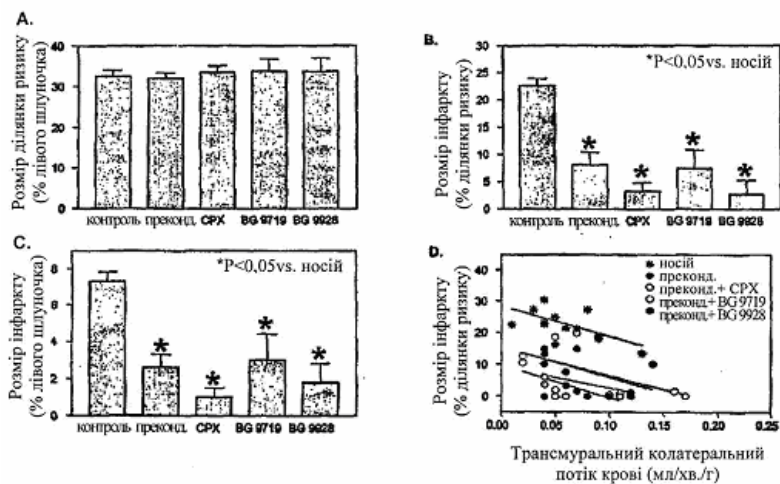
Під час проведення функціональних FLIPR-аналізів криві концентрація агоніста-реакція у відповідь відповідають логістичному рівнянню при використанні нелінійної програми регресії у Prism GraphPad. Величини констант дисоціації (K_D) оцінюють за нуль-методом, розробленим Лазарено і Робертсом (1987). Аналіз Шилда проводять для оцінки ефективності сполук як антагоністи (pA_2). Значення pA_2 відповідають від'ємному логарифму концентрації антагоніста, яка може викликати 2-кратний зсув на кривій концентрація-реакція у відповідь, де реакцію у відповідь визначають як 50%-ву величину від максимального значення реакції у відповідь.

Методика I (Попереднє лікування)



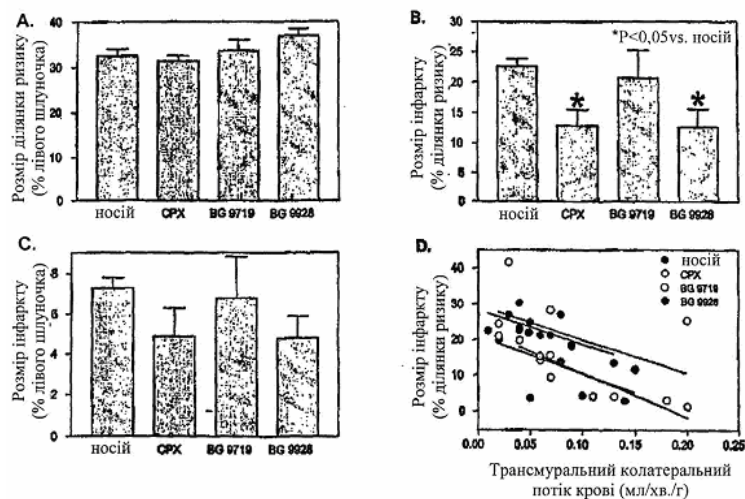
Фіг. 1

Методика II
(Прекондиціювання)



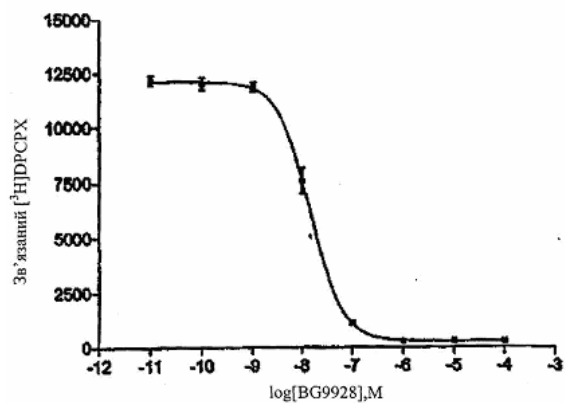
Фіг. 2

Методика III
(Реперфузія)



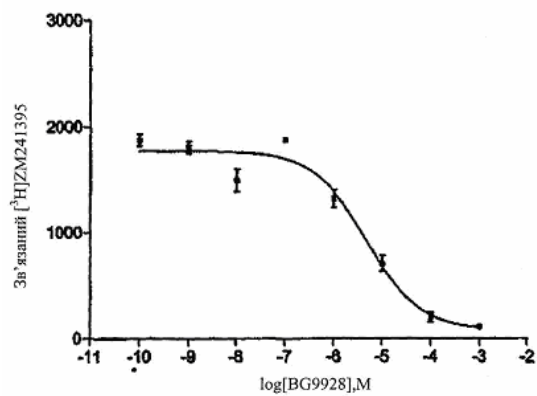
Фіг. 3

Конкурентне зв'язування BG9928 рекомбінантними
A₁-рецепторами аденозину людини



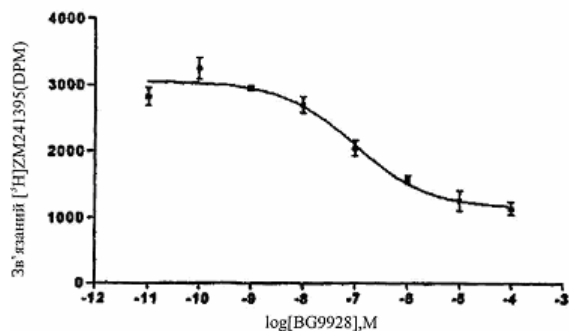
Фіг. 4

Конкурентне зв'язування BG9928 рекомбінантними
A_{2A}-рецепторами аденозину людини



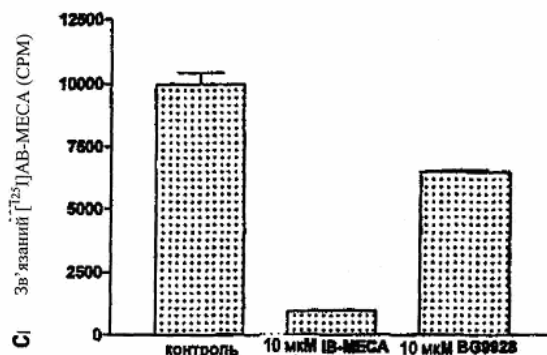
Фіг. 5

Конкурентне зв'язування BG9928 рекомбінантними A_{2B} -рецепторами аденозину людини



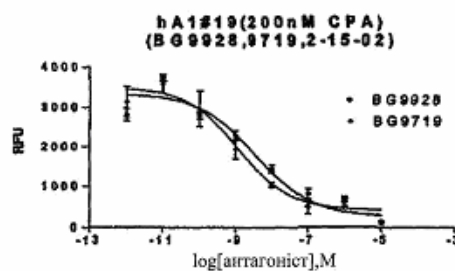
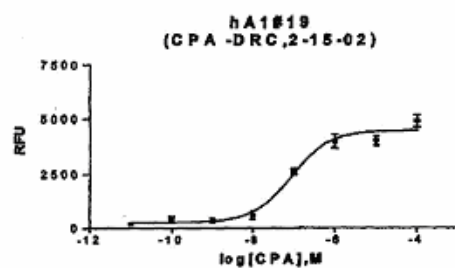
Фиг. 6

Односайтове зв'язування BG9928 рекомбінантними A_3 -рецепторами аденозину людини



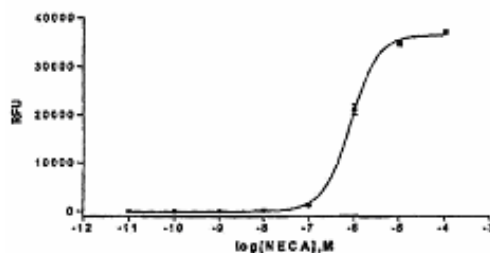
Фиг. 7

FLIPR-аналіз BG9928 з рекомбінантними A_1 -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються в CHO-K1 клітинах

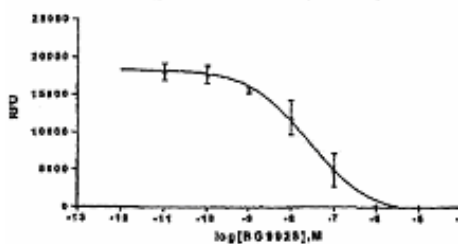


Фиг. 8

FLIPR-аналіз BG9928 з рекомбінантними A_{2B} -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються в HEK-293 клітинах
FLIPR-аналізи з A_{2B} -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються в HEK 293 клітинах

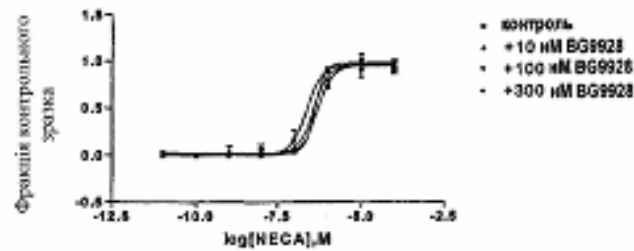


FLIPR-аналізи з A_{2B} -рецепторами аденозину людини, що стійко експресуються в HEK 293 клітинах
(@ 5 мкМ NECA, 2-5-02)

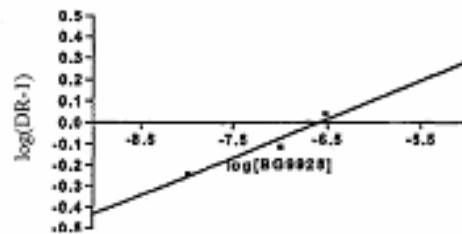


Фиг. 9

FLIPR-аналіз BG9928 з рекомбінантними A_{2B} -рецепторами аденозину шуга, що стійко експресуються в HEK-293 клітинах



Аналіз Шилда рекомбінантних A_{2B} -рецепторів аденозину шуга за допомогою функціонального FLIPR-аналізу



Фиг. 10

В описі до патенту на винахід графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка Т. Чепелева

Підписне

Тираж 28 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601