

Die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptoraffiniteit van 'n reeks 3,4-dihidropirimidoon-analoë



Authors:

Runako M. Katsidzira¹
Mietha M. van der Walt²
Jacobus J. Bergh¹
Gisella Terre'Blanche^{1,2} 

Affiliations:

¹Pharmaceutical Chemistry,
North-West University,
South Africa

²Centre of Excellence for
Pharmaceutical Sciences,
North-West University,
South Africa

Corresponding author:

Gisella Terre'Blanche,
gisella.terreblanche@nwu.
ac.za

Dates:

Received: 10 March 2016

Accepted: 01 Aug. 2016

Published: 28 Feb. 2017

How to cite this article:

Katsidzira, R.M., Van der
Walt, M.M., Bergh, J.J. &
Terre'Blanche, G., 2017, 'Die
adenosien A_1 - en A_{2A} -
reseptoraffiniteit van 'n reeks
3,4-dihidropirimidoon-
analoë', *Suid-Afrikaanse
Tydskrif vir Natuurwetenskap
en Tegnologie*, 36(1), a1381.
[https://doi.org/10.4102/
satnt.v36i1.1381](https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1381)

Copyright:

© 2017. The Authors.
Licensee: AOSIS. This work
is licensed under the
Creative Commons
Attribution License.

Read online:



Scan this QR
code with your
smart phone or
mobile device
to read online.

Parkinson se siekte is 'n komplekse neurodegeneratiewe siektetoestand. Huidige behandeling van dié siekte is slegs op simptome verligting gemik, sonder dat die siekteverloop vertraag of gestop word. Sedert die ontdekking dat adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore potensieë geneesmiddelteikens vir die behandeling van Parkinson se siekte is, het verskeie navorsingsgroepe gepoog om adenosienantagoniste te identifiseer. Benewens die bevinding dat adenosien A_{2A} -reseptorantagoniste die motoriese simptome verminder wat met Parkinson se siekte gepaardgaan, is hulle potensieel ook neurobeskermend. Dit is dus moontlik dat verdere neurodegenerasie met sulke middels voorkom kan word. Verder kan die antagonisme van adenosien A_1 -reseptore die kognitiewe defekte, wat met Parkinson se siekte geassosieer word, moontlik verlig. Dualistiese antagonisme van adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore kan dus van groot waarde wees, aangesien dit die moontlikheid bied om beide die motoriese sowel as die kognitiewe verswakking van Parkinson se siekte te behandel. Dit is vasgestel dat 'n reeks 1,4-dihidropiridinderivate affiniteit vir die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore besit en gegrond op hierdie bevinding, is die struktureelverwante 3,4-dihidropirimidoon-analoë as adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptorantagoniste in hierdie studie ondersoek. Oor die algemeen is gevind dat die 3,4-dihidropirimidoon-analoë swak adenosien A_{2A} -reseptoraffiniteit besit, maar dat hul affiniteit vir die adenosien A_1 -reseptor meer belowende resultate opgelewer het, met dissosiasiekonstante-waardes in die lae mikromolêre gebied. Die *p*-bromofeniel-gesubstitueerde dihidropirimidoon (6b) het die beste adenosien A_1 -reseptoraffiniteit getoon met 'n K_i -waarde van 7.39 μ M. Gevolglik kan dié 3,4-dihidropirimidoon-analoë as leidraadverbinding gebruik word vir die ontwikkeling van nuwe adenosien A_1 -reseptorantagoniste, alhoewel verdere strukturele veranderinge nodig is om die adenosien A_{2A} -affiniteit te verbeter ten einde 'n kliniese lewensvatbare kandidaat vir die behandeling van Parkinson se siekte te verkry.

The adenosine A_1 and A_{2A} receptor affinity of a series of 3,4-dihydropyrimidone derivatives.

Parkinson's disease is a complex neurodegenerative condition with current treatment only focussed on symptomatic therapy that does not slow or stop the progression of the disease. Since the discovery that adenosine A_1 and A_{2A} receptors are potential drug targets for the therapy of Parkinson's disease, various research groups have attempted to identify adenosine antagonists. So the possibility exists that the administration of an adenosine A_{2A} receptor antagonist may prevent further neurodegeneration. Furthermore, the antagonism of adenosine A_1 receptors has the potential of treating Parkinson's disease-associated cognitive deficits. Therefore, dual antagonism of adenosine A_1 and A_{2A} receptors would be of great benefit since this would potentially treat both the motor as well as the cognitive impairment associated with Parkinson's disease. Based on the observation that a series of 1,4-dihydropyrimidine derivatives possess adenosine A_1 and A_{2A} receptor affinity, the current study investigated the potential of the structurally related 3,4-dihydropyrimidone analogues as adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonists. Overall, the 3,4-dihydropyrimidone analogues were found to possess weak affinity for the adenosine A_{2A} receptor, but more promising adenosine A_1 receptor affinity was found, ranging in the low micromolar range. Among the investigated compounds, the *p*-bromophenyl substituted dihydropyrimidone (6b) possesses the best adenosine A_1 receptor affinity with a K_i value of 7.39 μ M. In conclusion, this 3,4-dihydropyrimidone derivative can be used as a lead for the design of novel adenosine A_1 receptor antagonists, although further structural modifications are required to enhance the adenosine A_{2A} receptor affinity before a clinically viable candidate will be available as potential treatment of Parkinson's disease.

Inleiding

Parkinson se siekte is 'n progressiewe, neurodegeneratiewe siekte, wat patologieë deur 'n merkbare verlies van dopaminergiese neurone van die nigrostriatale senuweebaar gekarakteriseer word (Alexander 2004) en klinies as 'n bewegingsiekte, wat motoriese funksies affekteer, gekenmerk word (Przedborski 2005). Benewens motoriese simptome word Parkinson se siekte ook deur niemotoriese simptome, soos kognitiewe defekte gekenmerk (Chaudhuri et al. 2011).

Die behandeling vir Parkinson se siekte is tans op dopamienvervanging met levodopa (L-dopa), 'n voorloper van dopamien, en dopamienagonis-geneesmiddels gefokus. Alhoewel hierdie strategie effektief is om die vroeë stadiums van die siekte te beheer, word langtermynbehandeling geassosieer met geneesmiddelverwante komplikasies soos verlies van geneesmiddel-effektiwiteit, die aanvang van diskinesie en die voorkoms van psigose en depressie. Benewens die behandeling van motoriese simptome, bied dopamienvervangingsterapie nie verligting van niemotoriese simptome, soos kognitiewe wanfunksie nie (Chaudhuri et al. 2011). Die tekortkominge van dopamienvervangingsterapie het die soeke na alternatiewe geneesmiddellekens aangewakker. 'n Geneesmiddel wat beide die motoriese en niemotoriese simptome verlig en ook neurobeskermende eienskappe toon, sou die ideale behandeling bied.

Adenosienreseptore speel 'n belangrike rol in verskeie siektetoestande. In die geval van Parkinson se siekte is die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptorsubtypes as belowende geneesmiddellekens geïdentifiseer. Antagonisme van die adenosien A_{2A} -reseptor kan moontlik van terapeutiese waarde wees as 'n simptomele motoriese behandelingstrategie (Moro et al. 2006). Hierbenewens kan adenosien A_{2A} -antagoniste ook neurobeskermend wees deur die progressie van Parkinson se siekte te vertraag, beskerming te bied teen die onderliggende neurodegeneratiewe prosesse en die ontwikkeling van diskinesie te voorkom, wat normaalweg met L-dopa-gebruik op die lang termyn gepaardgaan (Ikeda et al. 2002; Kalda et al. 2006). Na aanleiding van laasgenoemde, bied adenosien A_{2A} -antagoniste 'n belowende geneesmiddelbehandeling wat saam met dopamienvervangingsterapie gebruik kan word.

Bewyse uit epidemiologiese studies dui op 'n beduidende verwantskap tussen die inname van koffie en 'n verlaagde risiko van Parkinson se siekte binne verskeie bevolkingsgroepe (Gale & Martyn 2003). Boonop is daar opgemerk dat pasiënte met Parkinson se siekte, wat gereeld koffie drink, minder kenmerkende simptome toon, gemeet teenoor diene met Parkinson se siekte wat nie koffie drink nie (Ross et al. 2000; Ascherio et al. 2001). Kafeïen kom natuurlik voor in koffie en word geklassifiseer as 'n nieselektiewe antagonist van die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore (Ferre et al. 2008). Die kognitiewe effekte van kafeïen kan merendeels toegeskryf word aan sy vermoë om adenosien A_1 -reseptore in die hippokampus en prefrontale korteks van die brein te antagoniseer (Ribeiro & Sebastião 2010). Hierdie breinareas word normaalweg met kognitiewe funksies geassosieer (Maemoto et al. 2004). Adenosien A_1 -antagoniste depolariseer neurone wat

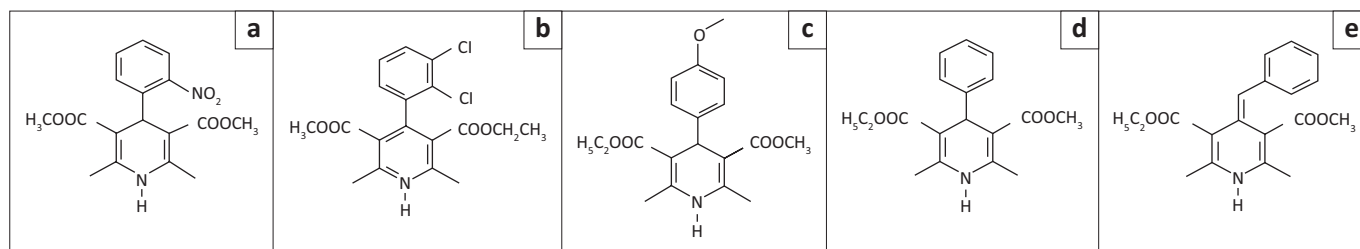
postsinapties voorkom en verhoog die presinaptiese vrystelling van 'n aantal neurotransmitters soos asetielcholin, glutamaat, serotonien en norepinefrien. Om dié rede kan adenosien A_1 -antagoniste gebruik word by die behandeling van kognitiewe defekte soos waargeneem in die geval van Parkinson se siekte en Alzheimer se siekte. Die motoriese effekte wat deur kafeïen uitgeoefen word, kan nie slegs aan adenosien A_{2A} -antagonisme toegeskryf word nie en die rol van adenosien A_1 -reseptore in dié verband moet nie buite rekening gelaat word nie (Jacobson et al. 1993). Navorsing het ook aangetoon dat die dualistiese antagonisme van adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore tot 'n sinergistiese motoriese effek lei (Nikodijevic et al. 1991). Afgesien van die verligting van motoriese effekte kan gelyktydige blokkering van adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore ook verligting vir niemotoriese simptome (kognitief) bied, via adenosien A_1 -antagonisme en neurobeskerming deur adenosien A_{2A} -antagonisme.

1,4-Dihidropiridienderivate (1,4-DHP) is as aktiewe L-tipe kalsiumkanaalremmers en -aktiveerders ontwikkel. Party van hierdie kalsiumkanaalblokkeerders word vir die behandeling van hipertensie en koronêre hartsiektes gebruik (Borchard 1994). Strukturele veranderinge aan 1,4-DHP het tot aktiwiteit van hierdie verbindings vir ander geneesmiddellekens gelei, byvoorbeeld binding aan α_{1A} -adrenergiese reseptore en plaatjiegeaktiveerde faktorreseptore (Wetzel et al. 1995; Sunkel et al. 1990). Daarbenewens besit verskeie dihidropiridienderivate ook affiniteit vir adenosien A_1 -reseptore in die rotbrein (Fredholm, Hu & Lindgren 1986; Hu et al. 1987). Nifedipien (Figuur 1a) en felodipien (Figuur 1b) is twee dihidropiridien-kalsiumkanaalantagoniste met dissosiasiekonstante-waardes (K_i -waardes) van 4.2 μM en 8.7 μM respektiewelik vir die adenosien A_1 -reseptor (Hu et al. 1987). Verskeie dihidropiridienderivate is voorheen deur Van Rhee en medewerkers (1996) gesintetiseer en daar is gevind dat hierdie verbindings affiniteit toon vir die adenosien A_1 -, A_{2A} - en A_3 -reseptore in rotbreine. Laasgenoemde studie het aangetoon dat die *para*-gesubstitueerde metoksiederivaat (Figuur 1c) die beste adenosien A_1 -affiniteit besit ($A_1K_i = 2.75 \mu\text{M}$), dat die ongesubstitueerde 4-feniëlverbinding (Figuur 1d) die hoogste adenosien A_{2A} -affiniteit besit ($A_{2A}K_i = 2.74 \mu\text{M}$) en dat die 4-trans-steriëlderivaat (Figuur 1e) 'n ideale leidraadverbinding vir adenosien A_3 -affiniteit is ($A_3K_i = 0.67 \mu\text{M}$) (Figuur 1). Na aanleiding van die bevindinge dat 1,4-DHP affiniteit vir adenosienreseptore toon, het die huidige studie 'n reeks struktureelverwante 3,4-dihidropirimidoon-analoë as potensieële adenosien A_1 en A_{2A} antagoniste ondersoek (Figuur 2).

Materiaal en metodes

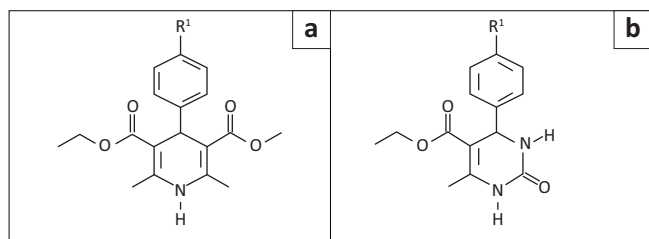
Chemie

'n Biginelli-teenpotsintese is gebruik om die teikenstrukture (6a-i) onder oplosmiddelvrye kondisies te berei (Kadre et al. 2012). In kort, 'n mengsel van β -diketoon (10 mmol), aldehid (10 mmol), urea (10 mmol) en tetra-butiel-ammoniumbromied (TBAB; 0.05 g, 1.5 M) is vir 'n geskikte tyd by 80–100 °C onder reflux gekook. Die reaksie is deur middel van dunlaag-chromatografie gemoniteer. Nadat die reaksie volledig



Bron: Aangepas vanaf Katzdzira, R.M., 2014, 'Affinity of dihydropyrimidone analogues for adenosine A_1 and A_{2A} receptors', MSc. dissertation, Dept. of Pharmaceutical Chemistry, North-West University, bl. 3, 4.

FIGUUR 1: Die chemiese strukture van nifedipien (a), felodipien (b) en die 1,4-dihidropiridien-analoë (c), (d) en (e).



Bron: Aangepas vanaf Katzdzira, R.M., 2014, 'Affinity of dihydropyrimidone analogues for adenosine A_1 and A_{2A} receptors', MSc. dissertation, Dept. of Pharmaceutical Chemistry, North-West University, bl. 4.

FIGUUR 2: Die strukturele verwantskap tussen (a) die 1,4-dihidropiridien-analoë en (b) die 3,4-dihidropirimidoon-analoë.

verloop het, is die produk gefiltreer en gewas met water (3 mL x 10 mL) om van die TBAB ontslae te raak. Daarna is die produk vanuit etanol gerekristalliseer om die gewenste 3,4-dihidropirimidoon-analoë, met 'n goeie opbrengs, te verkry, (Figuur 3). Elke gesintetiseerde teikenverbinding se struktuur is deur ^1H KMR, ^{13}C KMR en massaspektrometrie geverifieer. Die strukture is ook bevestig deur die KMR-data met ooreenstemmende literatuurdata te vergelyk (Kadre et al. 2012; Heravi, Derikvand & Bamoharram 2005; Kalita & Phukan 2007; Ma et al. 2000).

Biologiese evaluering

Die affiniteit van die 3,4-dihidropirimidoon-analoë (6a-i) vir die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptorsubtypes is bepaal deur gebruik te maak van 'n radioligandbindingsprotokol wat voorheen in die literatuur beskryf is (Van der Walt et al. 2015). Die verplasing van 1,3- ^3H -dipropiel-8-siklopentielxantien (^3H]-DPCPX), vanuit rot-volbreinmembrane en N- ^3H]-etiadenosien-5'-uronamied (^3H]-NECA), vanuit striatale rotmembrane, is gemeet om onderskeidelik die adenosien A_1 - en A_{2A} -bindingsaffiniteit te bepaal. Die resultate word as K_i -waardes weergegee wat uitgedruk word as die gemiddeld $\pm$ standaardafwyking (SD) en is in Tabel 1 gedokumenteer.

Funksionele karakterisering van verbinding 6b en twee verwysingsverbindinge, DPCPX en CPA, is deur middel van 'n GTP-verskuiwingstoets gedoen. Die GTP-verskuiwingstoets is in triplikaat met kortikale rotmembrane uitgevoer, soos voorheen beskryf (Van der Walt & Terre'Blanche 2015). Die affiniteit is met 0.4 nM ^3H]-DPCPX, as radioligand, in die afwesigheid en teenwoordigheid van 0.1 mM guanosientrifosfaat (GTP) bepaal. 'n Opsomming van die resultate word in Tabel 2 gegee.

Resultate en bespreking

Chemie

Al die kommersieel beskikbare chemikalieë is vanaf Sigma-Aldrich aangeskaf en is sonder verdere suiwering gebruik. Smeltpunte is met 'n Buchi M-545-smeltpuntapparaat bepaal. Kernmagnetieseresonansspektrometrie (KMR): Die proton (^1H) en koolstof- (^{13}C) KMR-spektra is met 'n Bruker Avance III 600-spektrometer bepaal. Die chemiese verskuiwings is in dele per miljoen (δ) weergegee, met tetrametielilaan (TMS) as interne standaard. Koppelingskonstantes (J waarde) word in hertz (Hz) aangetoon. Spinkoppeling word soos volg aangedui: s (singulet), d (doeblet), t (triplet), q (kwartet) of m (multiplet). Hoëresolusie-massaspektrometrie (HRMS) is met 'n Bruker micrOTOF-Q II-massaspektrometer by atmosferiese druk, met chemiese ionisasie (APCI) bepaal.

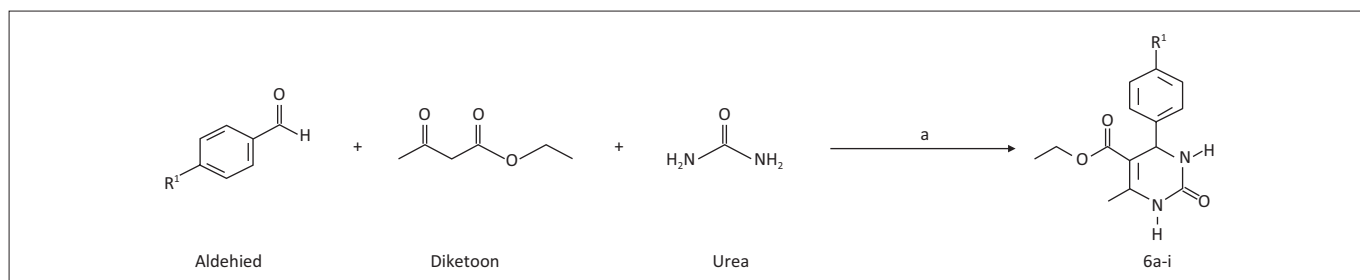
Verbindings

6a: Opbrengs 87%: smeltpunt 205.8 °C – 206.6 °C (etanol). ^1H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.24 (s, 3H), 3.97 (q, 2H, J = 7.15 Hz), 5.13 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.22-7.31 (m, 5H), 7.74 (s, 1H), 9.19 (s, 1H). ^{13}C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 14.1, 17.8, 54.0, 59.2, 99.3, 126.3, 127.3, 128.4, 144.9, 148.4, 152.2, 165.3; APCI-HRMS m/z : bereken vir $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$, 261.1234, gevind (MH^+) 261.1229.

6b: Opbrengs 90%: smeltpunt 222.9 °C – 223.2 °C (etanol). ^1H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.23 (s, 3H), 3.97 (q, 2H, J = 7.15), 5.11 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.17 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.52 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.77 (s, 1H), 9.24 (s, 1H). ^{13}C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 14.1, 17.8, 53.5, 59.3, 98.7, 120.3, 128.6, 131.3, 144.2, 148.8, 151.9, 165.2; APCI-HRMS m/z : bereken vir $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}_3$, 339.0339, gevind (MH^+) 339.0299.

6c: Opbrengs 95%: smeltpunt 215.1 °C – 216.2 °C (etanol). ^1H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.23 (s, 3H), 3.96 (q, 2H, J = 7.15 Hz), 5.13 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.23 (d, 2H, J = 8.28 Hz), 7.38 (d, 2H, J = 8.28 Hz), 7.76 (s, 1H), 9.23 (s, 1H). ^{13}C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 14.1, 17.9, 53.5, 59.4, 98.9, 128.3, 128.5, 131.9, 143.8, 148.8, 152.0, 165.3; APCI-HRMS m/z : bereken vir $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_3$, 295.0844, gevind (MH^+) 295.0836.

6d: Opbrengs 94%: smeltpunt 205.3 °C – 206.4 °C (etanol). ^1H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO- d_6) δ 1.09 (t, 3H, J = 7.15), 2.23 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.96 (q, 2H, J = 7.15), 5.08 (d, 1H,



Bron: Aangepas vanaf Katzdzira, R.M., 2014, 'Affinity of dihydropyrimidone analogues for adenosine A₁ and A_{2A} receptors', MSc. dissertation, Dept. of Pharmaceutical Chemistry, North-West University, bl. 32.

FIGUUR 3: Die sinteseroete om die gewenste 3,4-dihydropirimidoon-analoë (6a-i) te berei. Reagense en eksperimentele kondisies: a, TBAB refluks teen 80°C – 100°C.

TABEL 1: Die dissosiasiekonstante-waardes (K_i -waardes), aan rot-adenosien A₁- en A_{2A}-reseptore, vir die teikenverbindings (6a-i) en verwysingstandaarde (DPCPX en CPA).

Verbinding	R ¹	$K_i \pm SD (\mu M)^{\dagger}$		SI§
		A ₁ ‡ [³ H]DPCPX	A _{2A} ‡ [³ H]NECA	
6a	H	10.09 ± 0.17	94.72 ± 30.20	9.4
6b	Br	7.39 ± 2.94	197.4 ± 63.75	26.7
6c	Cl	15.68 ± 4.70	104.5 ± 22.26	6.7
6d	OCH ₃	8.53 ± 2.42	geen affiniteit	-
6e	CH ₃	18.6 ± 1.12	geen affiniteit	-
6f	NO ₂	74.97 ± 20.49	geen affiniteit	-
6g	OH	136.5 ± 11.95	geen affiniteit	-
6h	F	11.21 ± 1.83	28.71 ± 1.88	2.6
6i	CF ₃	41.74 ± 0.22	geen affiniteit	-
CPA	-	0.0128 ± 0.0001 (0.0079)¶	0.331 ± 0.084 (0.46)¶	26
DPCPX	-	0.0006 ± 0.0002 (0.0003)††	0.530 ± 0.235 (0.340)††	884

†, Alle K_i -waardes word uitgedruk as die gemiddeld ± standaardafwyking (SD) van duplikaateksperimente; ‡, Rotreseptore is gebruik (A₁: rotvolbreinmembrane; A_{2A}: striatale rotmembrane); §, Selektiwiteitsindeks (SI) vir die A₁-reseptor-isoform is deur die verhouding van K_i (A_{2A})/ K_i (A₁) bereken; ¶, Literatuur K_i -waardes met [³H]PD116,948 en [³H]NECA vir A₁ en A_{2A}, respektiewelik bepaal (Bruns et al. 1987); ††, Literatuur K_i -waardes met [³H]PIA en [³H]NECA vir A₁ en A_{2A}, respektiewelik bepaal (Lohse et al. 1987).

Bron: Aangepas vanaf Katzdzira, R.M., 2014, 'Affinity of dihydropyrimidone analogues for adenosine A₁ and A_{2A} receptors', MSc. dissertation, Dept. of Pharmaceutical Chemistry, North-West University, bl. 58.

TABEL 2: Die affiniteite (K_i -waardes met rot-adenosien A₁-reseptore in die afwesigheid en teenwoordigheid van GTP) en GTP-verskuiwings van verbinding 6b, CPA (A₁-agonis) en DPCPX (A₁-antagonis).

Verbinding	$K_i \pm SEM (\mu M)^{\dagger}$		
	- GTP	+ GTP (0.1 mM)	GTP‡ verskuiwing
6b	5.385 ± 0.688	8.334 ± 0.258	1.55
CPA (A ₁ -agonis)	0.0044 ± 0.0011 (0.0059)§	0.0631 ± 0.0032 (0.0352)§	14.34 (6)§ (32)¶
DPCPX (A ₁ -antagonis)	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	1 (1)††

†, Alle K_i -waardes word as die gemiddeld ± standaardafwyking van gemiddeldes (SEM) na tripliikaat- eksperimente uitgedruk. Verplasing van [³H]DPCPX (finale konsentrasie 0.4 nM; K_d = 0.28 nM); ‡, GTP-verskuiwings word bereken deur die K_i -waarde wat in die teenwoordigheid van GTP bepaal is, te deel deur die K_i -waarde wat in die afwesigheid van GTP bepaal is; §, Literatuur K_i -waardes bepaal met [³H]DPCPX (Bruns et al. 1987); ¶, Literatuur GTP-verskuiwing gedokumenteer as 32 verkry met [³H]DPCPX as radioligand (Lohse et al. 1987); ††, Literatuur GTP-verskuiwing gedokumenteer as 1 verkry met [³H]DPCPX as radioligand (Ongini et al. 1999).

J = 3.39 Hz), 6.86 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.13 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.66 (s, 1H), 9.14 (s, 1H). ¹³C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.1, 17.8, 53.3, 55.1, 59.2, 99.6, 113.7, 127.4, 137.1, 148.0, 152.2, 158.5, 165.4; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₅H₁₉N₂O₄, 291.1339, gevind (MH⁺) 291.1331.

6e: Opbrengs 93%: smeltpunt 216.3 °C – 216.9 °C (etanol). ¹H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.22 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 3.96 (q, 2H, J = 7.15 Hz), 5.09 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.10 (s, 4H), 7.68 (s, 1H), 9.14 (s, 1H). ¹³C

KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.2, 17.8, 20.7, 53.7, 59.3, 99.5, 126.2, 129.0, 136.5, 142.0, 148.2, 152.3, 165.4; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₅H₁₉N₂O₃, 275.1390, gevind (MH⁺) 275.1381.

6f: Opbrengs 92%: smeltpunt 206.9 °C – 209.6 °C (etanol). ¹H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.25 (s, 3H), 3.97 (q, 2H, J = 7.15 Hz), 5.26 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.49 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.89 (s, 1H), 8.21 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 9.35 (s, 1H). ¹³C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.1, 17.9, 53.7, 59.4, 98.2, 123.9, 127.7, 146.7, 149.4, 151.8, 152.0, 165.1; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₄H₁₆N₃O₅, 306.1084, gevind (MH⁺) 306.1078.

6g: Opbrengs 90%: smeltpunt 232.7 °C – 234.2 °C (etanol). ¹H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 1.08 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.21 (s, 3H), 3.96 (q, 2H, J = 7.15), 5.02 (d, 1H, J = 3.01 Hz), 6.67 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.0 (d, 2H, J = 8.66 Hz), 7.61 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 9.36 (s, 1H). ¹³C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.2, 17.8, 53.5, 59.2, 99.8, 115.1, 127.5, 135.5, 147.8, 152.3, 156.6, 165.5; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₄H₁₇N₂O₄, 277.1183, gevind (MH⁺) 277.1172.

6h: Opbrengs 91%: smeltpunt 182.2 °C – 183.2 °C (etanol). ¹H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 1.07 (t, 3H, J = 7.15 Hz), 2.24 (s, 3H), 3.95 – 3.98 (m, 2H), 5.13 (d, 1H, J = 3.01 Hz), 7.14 (t, 2H), 7.24 – 7.26 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 9.22 (s, 1H). ¹³C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.1, 17.8, 53.3, 59.2, 99.1, 115.1, 115.2, 128.2, 128.3, 141.1, 148.5, 152.0, 160.5, 162.1, 165.3; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₄H₁₆FN₂O₃, 279.1139, gevind (MH⁺) 279.1129.

6i: Opbrengs 92%: smeltpunt 179.0 °C – 180.9 °C (etanol). ¹H KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 1.07 (t, 3H, J = 7.15), 2.25 (s, 3H), 3.96–3.99 (m, 2H), 5.22 (d, 1H, J = 3.39 Hz), 7.44 (d, 2H, J = 8.28 Hz), 7.70 (d, 2H, J = 8.28 Hz), 7.84 (s, 1H), 9.30 (s, 1H). ¹³C KMR (Bruker Avance III 600, DMSO-d₆) δ 14.1, 17.9, 53.8, 59.4, 98.6, 123.4, 125.2, 125.5, 127.2, 127.9, 128.1, 149.1, 149.3, 151.9, 165.2, 165.2; APCI-HRMS m/z : bereken vir C₁₅H₁₆F₃N₂O₃, 329.1108, gevind (MH⁺) 329.1090.

Adenosien A₁- en A_{2A}-reseptoraaffiniteit

Oor die algemeen is gevind dat die teikenverbindings (6a-i) beter affiniteit vir die adenosien A₁-subtipe as vir die

adenosien A_{2A} -subtipe getoon het (Tabel 1). Ses van die 3,4-dihidropirimidoon-analoë het K_i -waardes kleiner as 20 μM getoon. Die orde van adenosien A_1 -affiniteit was soos volg: 6b>6d>6a>6h>6c>6e>6i>6f>6g. Verbindings 6b (4-Br) en 6d (4- OCH_3) het onderskeidelik K_i -waardes van 7.39 μM en 8.53 μM getoon en het as die twee verbindings met die beste A_1 -affiniteit na vore getree. Soos reeds genoem, het die studie deur Van Rhee en medewerkers (1996) die 1,4-DHP-derivaat (Figuur 1c) ($A_1K_i = 2.75 \mu\text{M}$), as die verbinding met beste adenosien A_1 -reseptoraffiniteit geïdentifiseer. Deur die 3,4-dihidropirimidoon-analoog (6d, $A_1K_i = 8.53 \mu\text{M}$) te vergelyk met verbinding (Figuur 1c) ($A_1K_i = 2.75 \mu\text{M}$), waar beide 'n 4- OCH_3 -substitusie op die fenielring bevat, is slegs 'n tweevoudige verlaging in adenosien A_1 -affiniteit waargeneem.

Van die nege gesintetiseerde 3,4-dihidropirimidoon-analoë, het slegs vier verbindings affiniteit vir die adenosien A_{2A} -reseptor getoon. Verbinding 6h, met 'n 4-F substitusie op die fenielring, is as die verbinding met die beste adenosien A_{2A} -reseptoraffiniteit geïdentifiseer ($A_{2A}K_i = 28.71 \mu\text{M}$) onder die teikenverbindings (6a-i). Naas 6h, het verbinding 6a, met 'n ongesubstitueerde fenielring, die tweede hoogste affiniteit vir die adenosien A_{2A} -subtipe ($A_{2A}K_i = 94.72 \mu\text{M}$) getoon. Die 3,4-dihidropirimidoon-analoog 6a het 'n 10-voudige verlaging getoon in adenosien A_{2A} -affiniteit in vergelyking met die 1,4-DHP-derivaat 4 ($A_{2A}K_i = 2.74 \mu\text{M}$).

Dit is verwag dat die 3,4-dihidropirimidoon-analoë 6d en 6h 'n hoër affiniteit as die dihidropiridinderivate (1,4-DHP-analoë) (Figuur 1c en d), vir die adenosien A_1 - en A_{2A} -reseptore sou toon. Hierdie verhoging is verwag aangesien 'n ondersoek van 'n reeks piridien- en pirimidienderivate, deur Gillespie en medewerkers (2009), getoon het dat 'n vermeerdering van stikstofatome in die heterosikliese ring (van piridien na pirimidien) 'n verhoging van adenosien A_1 - en A_{2A} -affiniteit teweegbring. Die resultate van laasgenoemde studie het ook aangedui dat die teenwoordigheid van twee stikstofatome in die ring (pirimidienderivate) optimale adenosien A_1 - en A_{2A} -affiniteit bewerkstellig. In teenstelling met hierdie verwagting, het die 3,4-dihidropirimidoon-analoë, wat twee stikstofatome in die heterosikliese ring bevat, nie 'n verhoging in adenosien A_1 - of A_{2A} -reseptoraffiniteit getoon teenoor die

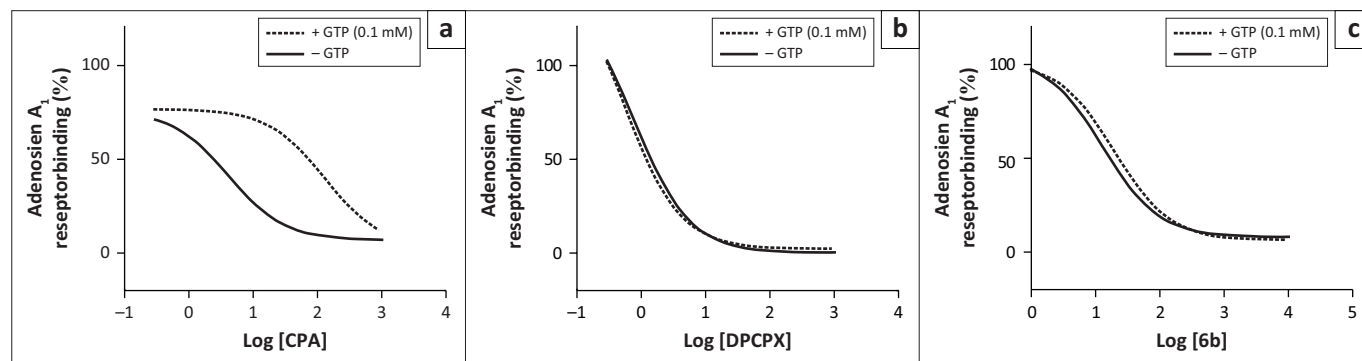
dihidropiridien-analoë wat slegs een stikstof in die heterosikliese ring bevat nie.

Die verlaging in adenosien A_{2A} -affiniteit kan toegeskryf word aan die afwesigheid van 'n aromatiese, heterosikliese ring. Die aminosuur, Phe-168, speel 'n belangrike rol in die adenosien A_{2A} -reseptorbindingsetel, waar dit gewoonlik aromatiese π - π -stapelingsinteraksies met die aromatiese heterosikliese ringstelsels van bekende agoniste en antagonistiese vorm (Jaakola et al. 2010). Aangesien die dihidropirimidoonring, in die teikenverbindings (6a-i), nie aromaties is nie, is die vorming van aromatiese π - π -stapelingsinteraksies met Phe-168 hoogs onwaarskynlik. Die 3,4-dihidropirimidoon-analoë se adenosien A_{2A} -affiniteit kan moontlik verhoog word deur die dihidropirimidoonring te vervang met 'n planêre aromatiese pirimidienring wat π - π -stapelingsinteraksies met Phe-168 kan ondergaan. 'n Soortgelyke tendens is ook waargeneem waar 'n planêre konformasie deur nie-xantienderivate verbeterde adenosien A_1 -affiniteit opgelewer het, maar geen verbetering in adenosien A_{2A} -affiniteit bewerkstellig het nie (Siddiqi et al. 1996).

Verdere studies deur Jiang en medewerkers (1996) het ook aangedui dat piridinderivate, wat 'n meer planêre konformasie besit, affiniteit verloor vir die adenosien A_3 -subtipe, maar dat affiniteit vir die adenosien A_1 -reseptor verhoog. Om hierdie rede kan verdere studies die 3,4-dihidropirimidoon-analoë (6a-i), wat 'n meer nieplanêre konformasie besit, moontlik ondersoek vir adenosien A_3 -affiniteit.

Funksionele karakterisering van verbinding 6b

'n GTP-verskuiwing van ongeveer 1 dui op die teenwoordigheid van 'n antagonis en 'n groter GTP-verskuiwing is 'n indikasie van 'n agonis. 'n Vol agonis besit 'n groter berekende GTP-verskuiwing as 'n gedeeltelike agonis (Gütshow et al. 2012). Vir die verwysingsverbindings, DPCPX en CPA, is 'n berekende GTP-verskuiwing van 1 en 14 respektiewelik verkry soos verwag van 'n antagonis en agonis, (Tabel 2, Figuur 4). Die verbinding met die hoogste affiniteit (6b), is ook getoets om te bepaal of die



FIGUUR 4: (a) Die bindingskurwe vir CPA, 'n adenosien A_1 -agonis, met 'n berekende GTP-verskuiwing van ongeveer 14; (b) Die bindingskurwe vir DPCPX, 'n adenosien A_1 -antagonis, met 'n berekende GTP-verskuiwing van ongeveer 1; (c) Die bindingskurwe vir 6b met 'n berekende GTP-verskuiwing van ongeveer 1 wat daarop dui dat 6b optree as 'n adenosien A_1 -reseptor antagonis.

verbinding as 'n adenosien A_1 -agonis of -antagonis optree. Die resultate het getoon dat verbinding 6b as 'n antagonis optree, aangesien die berekende GTP-verskuiwing ongeveer 1 was. Hieruit kan afgelei word dat die gesintetiseerde 3,4-dihidropirimidoon-analoë moontlik as adenosien A_1 -antagoniste optree.

Slot

Oor die algemeen is gevind dat die 3,4-dihidropirimidoon-analoë meer selektief is vir die adenosien A_1 -reseptor as vir die adenosien A_{2A} -reseptor. Die resultate het ook daarop gedui dat die 3,4-dihidropirimidoon-analoë moontlik as adenosien A_1 -reseptorantagoniste optree. Onder die teikenverbindings (6a-i) is gevind dat 6b ($A_1K_i = 7.39 \mu\text{M}$) en 6d ($A_1K_i = 8.53 \mu\text{M}$) se adenosien A_1 -affiniteit van dieselfde orde is as dié van die leidraadverbinding, felodipien (Figuur 1b) ($A_1K_i = 8.7 \mu\text{M}$). Alhoewel die dihidropirimidoonderivate (6a-i) oor die algemeen swakker affiniteit getoon het in vergelyking met vorige gepubliseerde dihidropiridinderivate, is die adenosien A_1 -affiniteit van 6b en 6d onderskeidelik steeds ongeveer sewe en ses keer beter as die eerste generasie xantienderivaat, kafeïen ($A_1K_i = 55 \mu\text{M}$) (Daly et al. 1985). Verder het verbindings 6a, 6c, 6e en 6h ook 'n verbeterde adenosien A_1 -affiniteit in vergelyking met kafeïen getoon. Verbinding 6h ($A_{2A}K_i = 28.71 \mu\text{M}$) is as die beste adenosien A_{2A} -reseptorantagonis geïdentifiseer. Hierdie verbinding se adenosien A_{2A} -affiniteit was ook beter as dié van kafeïen ($A_{2A}K_i = 50 \mu\text{M}$) (Daly et al. 1985).

Daar kan dus tot die gevolgtrekking gekom word dat die 3,4-dihidropirimidoon-kernstruktuur as leidraadverbinding vir die ontwikkeling van nuwe adenosien A_1 - en A_{2A} -antagoniste gebruik kan word, alhoewel verdere strukturele veranderinge nodig is om die affiniteit te verbeter ten einde 'n kliniese, lewensvatbare kandidaat vir die behandeling van Parkinson se siekte te verkry.

Erkenning

Ons bedank graag vir dr. Arina Lourens vir haar waardevolle bydrae. Die KMR- en MS-data is deur mn. A. Joubert en dr. J. Jordaan onderskeidelik, van die SASOL Sentrum vir Chemie, Noordwes-Universiteit opgeneem. Hierdie studie is gedeeltelik deur die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, asook deur die Mediese Navorsingsraad (MRC) van Suid-Afrika en die Nasionale Navorsingstigting (NNS) gefinansier. Die beursohouers erken hiermee dat die opinies, resultate en gevolgtrekkings of aanbevelings wat gemaak is in die artikel, slegs dié van die outeurs weerspieël en dat die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, MRC asook die NNS, nie vir die inhoud verantwoordelik gehou kan word nie.

Mededingende belange

Die outeurs verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verhouding het wat hulle op 'n voordelige of nadelige wyse in die skryf van die artikel beïnvloed het nie.

Outeursbydraes

G.T. was die projekteier. Die sintese van die toetsverbindings is deur R.M.K. uitgevoer, terwyl M.M.v.d.W. dié verbindings biologies vir adenosienaffiniteit geëvalueer het en die funksionele karakterisering van 6b uitgevoer het. Die interpretasie van die ^1H KMR-, ^{13}C KMR- en massaspektrometrie (MS) is deur R.M.K. en G.T. gedoen, terwyl G.T., J.J.B. en M.M.v.d.W. die biologiese resultate geïnterpreteer het. G.T., J.J.B. en M.M.v.d.W. het die artikel geskryf.

Literatuurverwysings

- Alexander, G.E., 2004, 'Biology of Parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder', *Dialogues in Clinical Neuroscience* 6(3), 259–280.
- Ascherio, A., Zhang, S.M., Hernan, M.A., Kawachi, I., Colditz, G.A., Speizer, F.E. et al., 2001, 'To sip or not to sip: The potential health risks and benefits of coffee drinking', *Annals of Neurology* 50, 56–53.
- Borchard, U., 1994, 'Calcium antagonists in comparison: View of the pharmacologist', *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 24, S85–S91.
- Bruns, R., Fergus, J.H., Badger, E.W., Bristol, J.A., Santay, L.A., Hartman, et al., 1987, 'Binding of the A_1 Selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to the rat brain membrane', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 335, 59–63.
- Chaudhuri, K.R., Odin, P., Antonini, A. & Martinez-Martin, P., 2011, 'Parkinson's disease: The non-motor issues', *Parkinsonism & Related Disorders* 17(10), 717–723.
- Daly, J.W., Padgett, W., Shamim, M.T., Butts-Lamb, P. & Waters, J., 1985, '1,3-Dialkyl-8-(p-sulphophenyl)xanthines: Potent water-soluble antagonists for A_1 - and A_2 -adenosine receptors', *Journal of Medicinal Chemistry* 28, 487492.
- Ferre, S., Ciruela, F., Borycz, J., Solinas, M., Quarta, D., Antoniou, K., et al., 2008, 'Adenosine A_1 - A_{2A} receptor heteromers: New targets for caffeine in the brain', *Frontiers in Bioscience* 13, 2391–2399.
- Fredholm, B.B., Hu, P.S. & Lindgren, E., 1986, 'The dihydropyridine calcium-channel agonist BayK 8644 inhibits the presynaptic effects of R-phenylisopropyl adenosine in the rat hippocampus', *Acta Physiologica Scandinavica*, 128, 659–60.
- Gale, C. & Martyn, C., 2003, 'Tobacco, coffee and Parkinson's disease', *British Medical Journal* 326, 561–562.
- Gillespie, R.J., Bamford, S.J., Clay, A., Gaur, S., Haymes, T., Jackson, P.S., et al., 2009, 'Antagonists of the human A_{2A} receptor. Part 6. Further optimization of pyrimidine-4-carboxamides', *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 6590–6605.
- Gütschow, M., Schlenk, M., Gab, J., Paskaleva, M., Wessam Alnouri, M., Scolari, S., et al., 2012, 'Benzothiazinones: A novel class of adenosine receptor antagonists structurally unrelated to xanthine and adenine derivatives', *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 3331–3341.
- Heravi, M.M., Derikvand, F. & Bamoharram, F.F., 2005, 'A catalytic method for synthesis of Biginelli-type 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one using 12-tungstophosphoric acid', *Journal of Molecular Catalysis A* 242(1–2), 173–175.
- Hu, P.S., Lindgren, E., Jacobson, K.S. & Fredholm, B.B., 1987, 'Interaction of dihydropyridine calcium channel agonists with adenosine receptors', *Pharmacology & Toxicology* 61, 121–125.
- Ikeda, K., Kurokawa, M., Aoyama, S. & Kuwana, Y., 2002, 'Neuroprotection by adenosine A_{2A} receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry* 80, 262–270.
- Jaakola, V.P., Lane, J.R., Lin, J.Y., Katritch, V., Ijzerman, A.P. & Stevens, R.C., 2010, 'Ligand binding and subtype selectivity of the human A_{2A} adenosine receptor: Identification and characterization of essential amino acid residues', *The Journal of Biological Chemistry* 285, 13032–13044.
- Jacobson, K.A., Nikodijevic, O., Padgett, W.L., Gallo-Rodriguez, C., Maillard, M. & Daly, J.W., 1993, '8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A_2 -adenosine antagonist in vitro and in vivo', *FEBS Letters* 323, 141–144.
- Jiang, J., Van Rhee, A.M., Melman, N., Ji, X. & Jacobson, K.A., 1996, '6-Phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives as potent and selective A_1 adenosine receptor antagonists', *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 4667–4675.
- Kadre, T., Jetti, S.R., Bhatwara, A., Paliwal, P. & Jain, S., 2012, 'Green protocol for the synthesis of 3, 4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones using TBAB as a catalyst and solvent free condition under microwave irradiation', *Archives of Applied Science Research* 4, 988–993.
- Kalda, A., Yu, I., Oztas, E. & Chen, J.F., 2006, 'Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease', *Journal of the Neurological Sciences* 248, 9–15.
- Kalita, H.R. & Phukan, P., 2007, 'CuI as reusable catalyst for the Biginelli reaction', *Catalysis Communications* 8, 179–182.
- Lohse, M.J., Kolts, K.N., Lindenborn-Fotinos, J., Reddington, M., Schwabe, U. & Olsson, R.A., 1987, '8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) – A selective high affinity antagonist radioligand for A_1 adenosine receptors', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 336, 204–210.

- Ma, Y., Qian, C., Wang, L. & Yang, M., 2000, 'Lanthanide triflate catalyzed Biginelli reaction. One-pot synthesis of dihydropyrimidinones under solvent-free conditions', *The Journal of Organic Chemistry* 65(12), 3864–8.
- Maemoto, T., Tada, M., Mihara, T., Ueyama, N., Matsuoka, H., Harada, K., *et al.*, 2004, 'Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A_1 receptors', *Journal of Pharmacological Sciences* 96, 42–52.
- Moro, S., Gao, Z.G., Jacobson, K.A. & Spalluto, G., 2006, 'Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists', *Medicinal Research Reviews* 26, 131–159.
- Nikodijević, O., Sarges, R., Daly, J.W. & Jacobson, K.A., 1991, 'Behavioral effects of A_1 - and A_2 -selective adenosine agonists and antagonists: Evidence for synergism and antagonism', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 259, 286–294.
- Ongini, E., Dionisotti, S., Gessi, S., Irenius, E. & Fredholm, B.B., 1999, 'Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359, 7–10.
- Przedborski, S., 2005, 'Pathogenesis and nigral cell death in Parkinson's disease', *Parkinsonism and Related Disorders* 11, S3–S7.
- Ribeiro, J.A. & Sebastião, A.M., 2010, 'Caffeine and adenosine', *Journal of Alzheimer's Disease* 20, S3–S15.
- Ross, G.W., Abbott, R.D., Petrovitch, H., Morens, D.M., Grandinetti, A., Tung, K.H., *et al.*, 2000, 'Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease', *Journal of the American Medical Association* 283, 2674–2679.
- Siddiqi, S.M., Ji, X.D., Melman, N., Olah, M.E., Jain, R., Evans, P., *et al.*, 1996, 'Survey of non-xanthine derivatives as adenosine receptor ligands', *Nucleosides and Nucleotides* 15, 693–718.
- Sunkel, C.E., De Casa-Juana, M.F., Santos, L., Gomez, M.M., Villarroja, M., Gonzalez-Morales, M.A., *et al.*, 1990, '4-Alkyl-1,4-dihydropyridines derivatives as specific PAFacether antagonists', *Journal of Medicinal Chemistry* 33, 3205–3210.
- Van der Walt, M.M. & Terre'Blanche, G., 2015, '1,3,7-Triethyl-substituted xanthines – possess nanomolar affinity for the adenosine A_1 receptor', *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 23(20), 6641–6649.
- Van der Walt, M.M., Terre'Blanche, G., Petzer, A. & Petzer, J.P., 2015, 'The adenosine receptor affinities and monoamine oxidase B inhibitory properties of sulfanylpthalimide analogues', *Bioorganic Chemistry* 59, 117–123.
- Van Rhee, A.M., Jiang, J.L., Melman, N., Olah, M.E., Stiles, G.L. & Jacobson, K.A., 1996, 'Interaction of 1,4-dihydropyridine and pyridine derivatives with adenosine receptors: A selectivity for A_3 receptors', *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 2980–2989.
- Wetzel, J.M., Miao, S.W., Forray, C., Borden, L.A., Branchek, T.A. & Gluchowski, C., 1995, 'Discovery of alpha 1 α -adrenergic receptor antagonists based on the L-type Ca^{2+} channel antagonist nifedipine', *Journal of Medicinal Chemistry* 38, 1579–1581.