



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **330011**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

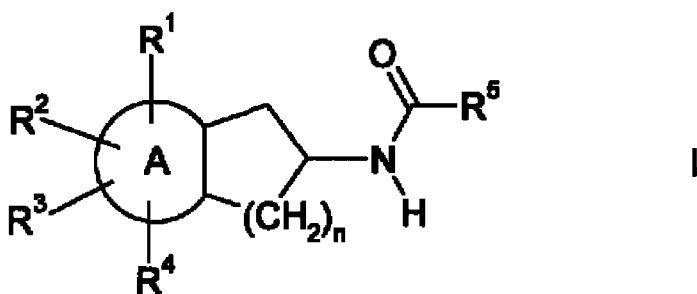
C07D 221/04 (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
A61K 31/4436 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
m/fer

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20050830	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.07.24 PCT/EP2003/08103
(22)	Inng.dag	2005.02.16	(85)	Videreføringsdag	2005.02.16
(24)	Løpedag	2003.07.24	(30)	Prioritet	2002.08.07, EP, 02017586
(41)	Alm.tilgj	2005.02.16			
(45)	Meddelt	2011.02.07			
(73)	Innehaver	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Brüningstrasse 50, DE-65926 FRANKFURT AM MAIN, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Hartmut Strobel, Erlenweg 22, DE-65835 LIEDERBACH, Tyskland			
		Paulus Wohlfart, Bertolt-Brecht-Ring 16 C, DE-64625 BENSHEIM, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Acylerte heteroarylkondenserte sykloalkenylaminer og deres anvendelse for fremstilling av farmasøytiske midler,samt farmasøytisk preparat inneholdende minst en slik forbindelse
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen
(57)	Sammendrag	

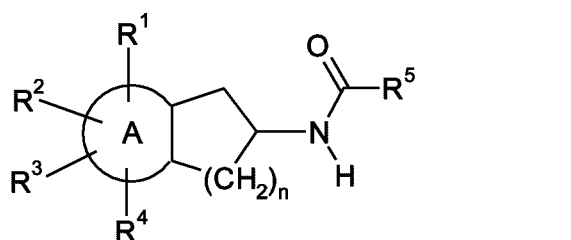
Det er beskrevet acylerte, heteroarylkondenserte sykloalkenylaminer av formel 1



hvor A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ og n har betydningene angitt i kravene. Forbindelsene av formel I er verdifulle farmakologisk aktive forbindelser som er nyttige ved behandling av forskjellige sykdomstilstander innbefattende kardiovaskulære lidelser, så som aterosklerose, trombose, koronar arteriesykdom, hypertensjon og hjerteinsuffisiens. De oppregulerer ekspresjonen av enzymet endotelisk nitrogenoksid(NO)-syntase og kan anvendes ved lidelser hvori en forøkt ekspresjon av nevnte en2ym eller et forøkt NO- nivå eller normaliseringen av et redusert NO-nivå er ønsket. Det er videre beskrevet fremgangsmåter for fremstilling av forbindelsene av formel I, deres anvendelse, spesielt som aktive bestanddeler i farmasøytiske midler, og farmasøytiske preparater omfattende disse.

1

Foreliggende oppfinnelse vedrører acylerte, heteroaryl-kondenserte sykloalkenylaminer av formel I



5 hvori A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ og n har betydningene angitt nedenfor. Forbindelsene av formel I er verdifulle farmasøytisk aktive forbindelser som er nyttige ved behandlingen av forskjellige sykdomstilstander innbefattende kardiovaskulære lidelser, så som aterosklerose, trombose, koronar arteriesykdom, hypertensjon og hjertesvikt. De oppregulerer ekspresjonen av enzymet endotelisk nitrogenoksid(NO)-syntase og kan
10 anvendes ved lidelser hvori en forøkt ekspresjon av nevnte enzym eller et forøkt NO-nivå eller normaliseringen av et redusert NO-nivå er ønsket. Oppfinnelsen vedrører videre anvendelse av forbindelser av formel I, for fremstilling av farmasøytiske midler, samt farmasøytiske preparater inneholdende minst én slik forbindelse.

15 Endotelisk NO-syntase (eNOS, NOS-III) tilhører en gruppe av tre isoenzymer som produserer nitrogenoksid (NO) ved oksidasjon av arginin. Endotelisk frigitt NO er av sentral betydning i en rekke kardiovaskulære mekanismer. Det har en vasodilaterende effekt og inhiberer aggregeringen av plater, adhesjonen av leukocytter til endotelium og proliferasjonen av intimale glattmuskelceller.

20

Endotelisk NO-syntase er gjenstand for fysiologisk og patofysiologisk regulering både på det transkripsjonsmessige og det etter-transkripsjonsmessige nivået. Enzym som allerede er til stede i endotelium, kan undergå kalsiumavhengig og kalsiumuavhengig aktivering ved fosforylering av spesifikke aminosyrer, men også ved direkte inter-
25 aksjoner med spesifikke proteiner. Stimulatorer av denne vanligvis transiente NO-frigivelsen er ekstracellulært arginin, 17β-østrogen og den mekaniske stimulus som utøves på luminaloverflaten av endotelium ved blodstrømmen (skjærbelastning). Sist nevnte fører i tillegg til regulering av eNOS ved transkripsjonsnivået. Følgelig var for eksempel Sessa et al. [Circ. Research 74 (1994) 349] i stand til, ved hjelp av trening og
30 økningen i skjærbelastningen assosiert med dette, å oppnå en markert økning i eNOS.

Om regulering av det post-transkripsjonelle nivået er relevant *in vivo*, er ikke entydig bevist. Følgelig etterfølges for eksempel administrasjon av en høy arginindose bare av

en transient forbedring i den endoteliumavhengige vasorelakseringen i pasienter med koronar hjertesykdom.

På den annen side er signifikansen av oppreguleringen av eNOS-proteinet vitenskapelig akseptert. Følgelig finnes det funn som viser at de beskyttende egenskapene av HMG-CoA-reduktaseinhibitoren simvastatin kan tilskrives, ved siden av den lipidnedsettende effekten, også delvis en økning i eNOS-ekspresjonen *in vivo* [Endres et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8880]. Det er i tillegg kjent at enkeltpunktmutasjoner i det 5'-flankerende området av eNOS-genet ("eNOS promoter"), og reduksjonen i raten av eNOS-gentranskripsjon forbundet med dette, i den japanske populasjonen er assosisert med forøkning i faren for koronare spasmer [Nakayama et al., Circulation 99 (1999), 2864].

Den nåværende antagelsen er derfor at de transkripsjonelle og post-transkripsjonelle mekanismene for eNOS-regulering er alvorlig forstyrret i et stort antall lidelser, spesielt i kardiovaskulære lidelser. Selv i meget tidlige trinn av en lang rekke kardiovaskulære lidelser er det mulig at en dysfunksjon av denne typen i endotelium som forer blodkarene, kan føre til et underskudd på bioaktivt NO, hvilket manifesterer seg etter som sykdommen utvikler seg i form av målbare, patofysiologiske og morfologiske endringer. Følgelig er kritiske trinn i tidlig aterogenese å akselerere opp en reduksjon i endotelisk NO-frigivelse, så som for eksempel oksidasjonen av lavdensitets lipoproteiner, rekruttering og avsetning av monocytter i intima av karene, og proliferasjonen av intermalceller. En følge av aterogenese er dannelsen av plakk på innsiden av blodkar, som i sin tur, ved en reduksjon i skjærbelastningen, kan føre til en ytterligere reduksjon i endotelisk NO-frigivelse og en ytterligere forverring i patologien. Siden endotelisk NO også er en vasodilator, fører også en reduksjon derav ofte til hypertensjon, som, som en ytterligere risikofaktor, kan forårsake ytterligere organskade.

Siktemålet for en terapeutisk tilnærmelse til behandlingen av disse lidelsene må følgelig være å avbryte den hendelseskjeden ved å øke den endoteliske NO-ekspresjonen. Genoverføringsforsøk som *in vitro* fører til overekspresjon av NO-syntase i tidligere ødelagte kar, er i realiteten i stand til å motvirke de omtalte prosessene og er følgelig et tegn på korrektheten av denne tilnærmelsen [Varenne et al., Hum. Gene Ther. 11 (2000), 1329].

Noen forbindelser med lav molekylvekt som, i cellekulturer, kan føre til en direkte effekt på eNOS-transkripsjon og ekspresjon, er beskrevet i litteraturen. Statiner som

allerede er nevnt, er imidlertid de eneste stoffene for hvilke det har vært mulig frem til i dag å vise en slik økning i eNOS *in vivo* som en bivirkning. Men på bakgrunn av det kjente området av bivirkninger for denne stoffklassen, er det uklart i hvilken grad denne effekten er til stede i en toksikologisk uproblematisk dose.

5

Liao et al. beskriver i WO 99/47153 og WO 00/03746 anvendelsen av rhoGTPase-inhibitorer og midler som påvirker organiseringen av aktincyttskjelettet for å øke eNOS i endotelceller og for behandling av forskjellige lidelser, så som for eksempel slag eller pulmonar hypertensjon uten imidlertid å indikere en spesifikk måte for å oppnå dette.

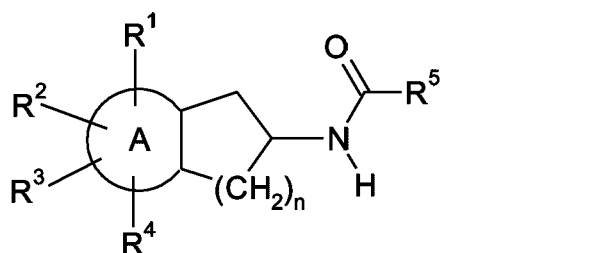
10

WO 02/064146, WO 02/064545, WO 02/064565 og WO 02/064546 beskriver acylerte, benzokondenserte sykloalkenylaminer som oppregulerer eNOS-ekspresjon i endotelceller og er nyttige, farmasøytisk aktive bestanddeler for behandlingen av forskjellige sykdommer, men det er et pågående behov for ytterligere eNOS-ekspresjonsfremmere med en fordelaktig egenskapsprofil. Foreliggende oppfinnelse oppfyller dette behovet ved å tilveieringe forbindelsene av formel I og anvendelse av disse.

Visse acylerte sykloalkenylaminer kondensert til en imidazolring som binder til histamin H₃-reseptoren og er nyttige for eksempel for behandling av overvekt, er beskrevet i WO 01/68652. JP 08/325234 beskriver sykloalkenylaminer kondensert til en imidazolring som bærer en 2-alkoksy-4-amino-5-halogenbenzoylsubstituent på amino-gruppen og er 5-HT-4-reseptoragonister nyttige for eksempel for behandlingen av schizofreni. EP 1072263 beskriver nociceptinantagonister som er nyttige for analgesi som omfatter visse acylaminosubstituerte 5,6,7,8-tetrahydrokinolinderivater. N-(2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxykinazolin-6-yl)-3,4-diklorbenzamid er beskrevet av Koehler et al. i J. Am. Chem. Soc. 80, 5779 (1958).

En gjenstand for foreliggende oppfinnelse er acylerte, heteroarylkondenserte sykloalkenylaminer av formel I

30



i en hvilken som helst av de stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I:

ringen A som omfatter de to karbonatomene som er felles for ringen A og sykloalkenyl-
 5 ringen i formel I, er en pyridin- eller tiofenring;

R^1 og R^4 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl, og halogen;

10 R^2 og R^3 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl og halogen;

hvor, dersom A er en pyridinring, 3 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen, og
 15 dersom A er en tiofenring, er 2 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen;

R^5 er en gruppe Ar eller en gruppe Hetar som begge er usubstituerte eller bærer én eller flere like eller forskjellige substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen; -CN;
 20 NH_2 ; usubstituert og minst monosubstituert C_1 - C_{10} -alkyl, C_1 - C_{10} -alkoksy, hvis substituenten er valgt fra gruppen C_1 - C_8 -alkoksy; fenyl; CF_3 ; fenyl- C_1 - C_4 -alkyl; pyridyl- C_1 - C_4 -alkyl; C_1 - C_6 -alkylsulfonylamino og morfolinyl; hvor alle fenylholdige og pyridylholdige grupper, som eventuelt er til stede i nevnte substituenten av nevnte gruppe Ar eller nevnte gruppe Hetar, kan være substituert med én eller flere
 25 substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen og C_1 - C_3 -alkyl;

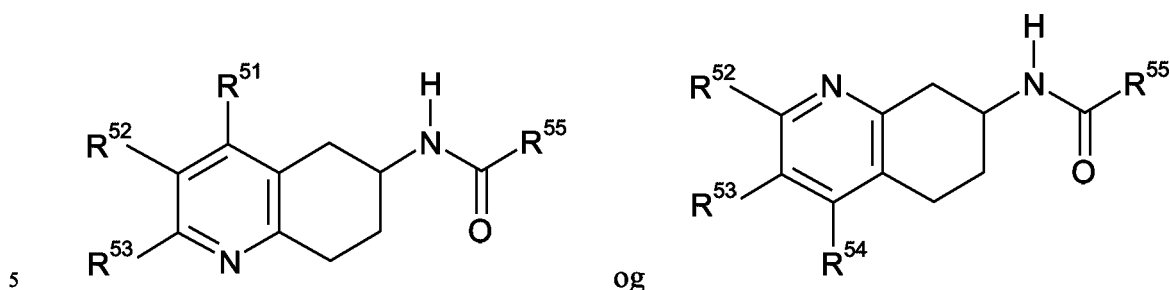
gruppen Hetar er pyridyl, benzimidazolyl, benzodioksolyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyrrololyl eller tiazolyl;
 30

gruppen Ar er fenyl;

35 n er 1, 2 eller 3;

under den forutsetning at

forbindelsene av formelene



er utelukket, hvori R^{51} , R^{52} , R^{53} og R^{54} er valgt fra hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl og halogen, og R^{55} er usubstituert eller substituert fenyl eller pyrrolyl;

- 10 og forbindelsen N-(2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroksykinazolin-6-yl)-3,4-diklorbenzamid er utelukket.

Dersom grupper eller substituenten i forbindelsene av formel I, så som for eksempel alkyl og så videre, kan være til stede flere ganger, kan de alle uavhengig av hverandre ha betydningene angitt og kan følgelig, i hvert individuelt tilfelle, være identiske eller
 15 forskjellige fra hverandre. Når en gruppe i forbindelsene av formelen I kan være minst monosubstituert, eller når den bærer én eller flere substituenten, kan den for eksempel være substituert med én, to, tre, fire eller fem substituenten. Når en gruppe er substituert med to eller flere substituenten, kan substituentene være like eller forskjellige fra
 20 hverandre.

Halogen er fluor, klor, brom eller jod, fortrinnsvis fluor eller klor.

Foreliggende oppfinnelse omfatter alle stereoisomere former av forbindelsene av formel
 25 I. Asymmetrisentre som er til stede i forbindelsene av formel I, kan alle uavhengig av hverandre ha S-konfigurasjon eller R-konfigurasjon. Oppfinnelsen omfatter alle mulige enantiomerer og diastereomerer og blandinger av to eller flere stereoisomerer, for eksempel blandinger av enantiomerer og/eller diastereomerer, i alle forhold. Følgelig kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse som kan eksistere som enantiomerer,
 30 være til stede i enantiomerisk ren form, både som levorotatoriske og som dekstrorotatoriske antipoder, i form av racemater og i form av blandinger av de to enantiomerene i alle forhold. I tilfellet med en cis/transisomeri omfatter oppfinnelsen både cisformen og

transformen, så vel som blandinger av disse formene i alle forhold. All disse formene er en gjenstand for foreliggende oppfinnelse. Fremstillingen av individuelle stereoisomerer kan utføres, om ønsket, ved separasjon av en blanding ved vanlige fremgangsmåter, for eksempel kromatografi eller krystallisasjon, ved anvendelse av stereokjemiske, uni-
 5 forme utgangsmaterialer for syntesen eller ved stereoselektiv syntese. Eventuelt kan en derivatisering utføres før en separasjon av stereoisomerer. Separasjonen av en blanding av stereoisomerer kan utføres i trinnet for forbindelsene av formelen I eller ved trinnet for et mellomprodukt under syntesen eller ved trinnet for en utgangsforbindelse. Foreliggende oppfinnelse omfatter også alle tautomere former av forbindelsene av formel I.

10

I tilfellet forbindelsene av formel I inneholder én eller flere sure eller basiske grupper, omfatter oppfinnelsen også deres tilsvarende farmasøytisk eller toksikologisk akseptable salter, spesielt deres farmasøytisk anvendbare salter. Følgelig kan forbindelsene av formelen I som inneholder sure grupper, være til stede på disse gruppene og kan an-
 15 vendes i henhold til oppfinnelsen, for eksempel som alkalimetallsalter, jordalkalimetallsalter eller som ammoniumsalter. Eksempler på slike salter omfatter natriumsalter, kaliumsalter, kalsiumsalter, magnesiumsalter eller salter med ammoniakk eller organiske aminer, så som for eksempel etylamin, etanolamin, trietanolamin eller aminosyrer. Forbindelser av formel I som inneholder én eller flere basiske grupper, det vil si grupper
 20 som kan protoneres, kan være til stede og kan anvendes i henhold til oppfinnelsen i form av deres addisjonssalter med uorganiske eller organiske syrer. Eksempler på egnede syrer omfatter hydrogenklorid, hydrogenbromid, fosforsyre, svovelsyre, salpetersyre, metansulfonsyre, p-toluensulfonsyre, naftalendisulfonsyrer, oksalsyre, eddiksyrer, vinsyre, melkesyre, salisylsyre, benzosyre, maursyre, propionsyre, pivalinsyre,
 25 dietyllediksyre, malonsyre, ravsyre, pimelinsyre, fumarsyre, maleinsyre, eplesyre, sulfaminsyre, fenylpropionsyre, glukonsyre, askorbinsyre, isonikotinsyre, sitronsyre, adipinsyre og andre syrer som er kjente for fagmannen. Dersom forbindelsene av formel I samtidig inneholder sure og basiske grupper i molekylet, omfatter oppfinnelsen også, i tillegg til de nevnte saltformene, indre salter eller betainer (dobbelationer). Saltene av
 30 forbindelsene av formel I kan oppnås ved vanlige fremgangsmåter som er kjente for fagmannen, for eksempel ved å bringe forbindelsen av formel I i kontakt med en organisk eller uorganisk syre eller base i et oppløsningsmiddel eller fortynningsmiddel, eller ved anionbytting eller kationbytting fra annet salt. Foreliggende oppfinnelse omfatter også alle salter av forbindelsene av formel I som, på grunn av lav fysiologisk kompa-
 35 tibilitet, ikke er direkte egnede for anvendelse i farmasøytiske midler, men som for eksempel kan anvendes som mellomprodukter for kjemiske reaksjoner eller for fremstillingen av farmasøytisk akseptable salter.

Forbindelsene med formel I, for også foreligge for eksempel i form av hydrater og addukter med alkoholer, aktive metabolitter av forbindelsene av formel I, og også som derivater av forbindelsene av formelen I som inneholder fysiologisk godtakbare og avspaltbare grupper, for eksempel estere, amider og forbindelser hvori N-H-gruppen angitt i formel I, er erstattet med en N-alkylgruppe, så som N-metyl, eller med en N-acylgruppe, så som N-acetyl eller N-argininyl, innbefattende farmasøytisk akseptable salter dannet på funksjonelle grupper til stede i N-acylgruppen.

I en foretrukket utførelsesform er ringen A i formel I en pyridinring.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform er ringen A i formel I en tiofenring.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform er tallet n i formel I 1.

15

I en ytterligere foretrukket utførelsesform er tallet n i formel I 3.

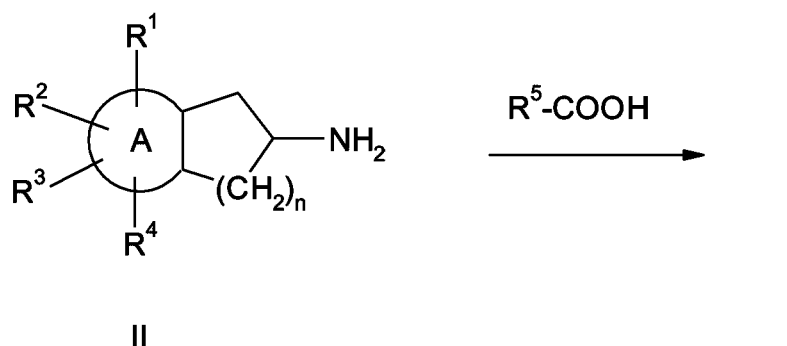
I en ytterligere foretrukket utførelsesform er restene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 i formel I hydrogen.

20

Eksempler på foretrukne forbindelser er fremstilt i eksempeldelen.

En forbindelse av formel I eller et salt derav kan for eksempel fremstilles ved en fremgangsmåte som omfatter acylering av et heteroaryl-kondensert sykloalkenylamin av formel II med en karboksylsyre av formelen R^5 -COOH eller et derivat derav.

25



Egnede derivater av karboksylsyrene av formelen R^5 -COOH er for eksempel karboksylsyreklorider, estere omfattende C_1 - C_4 -alkylestere, så som metylestere eller etylestere, eventuelt substituerte aylestere, så som fenylestere eller nitrofenylestere, eller aktiverte

30

estere, eller anhydrider eller blandede anhydrider. I forbindelsene av formelen II og karboksylsyrene av formelen R^5 -COOH og deres derivater, har ringen A, antallet n og gruppene R^1 , R^2 , R^3 , R^4 og R^5 betydningene angitt ovenfor med hensyn til forbindelsene av formel I, ellers kan funksjonelle grupper være til stede i beskyttet form eller i form av et forstadium. Når for eksempel en forbindelse av formel I skal fremstilles som inneholder en karboksylsyregruppe eller en aminogruppe, kan det være hensiktsmessig at disse gruppene i acyleringsreaksjonen er til stede i beskyttet form, for eksempel som en ester, så som en tert-butylester eller benzylester, istedenfor den frie karboksylsyregruppen, eller som en acylert aminogruppe, så som en tert-butoksykarbonylamino-
 10 gruppe eller benzyloksykarbonylaminogruppe istedenfor den frie aminogruppen, og først etter acyleringen frigjøres de ønskede sluttgruppene ved avbeskyttelse. Egnede beskyttelsesgruppestrategier som kan anvendes ved syntesen av forbindelsene av formel I, er kjente for fagmannen. Et eksempel på en forstadiegruppe av en funksjonell gruppe er nitrogruppen som kan omdannes til en aminogruppe ved reduksjon, for eksempel ved
 15 katalytisk hydrogenering etter acyleringsreaksjonen.

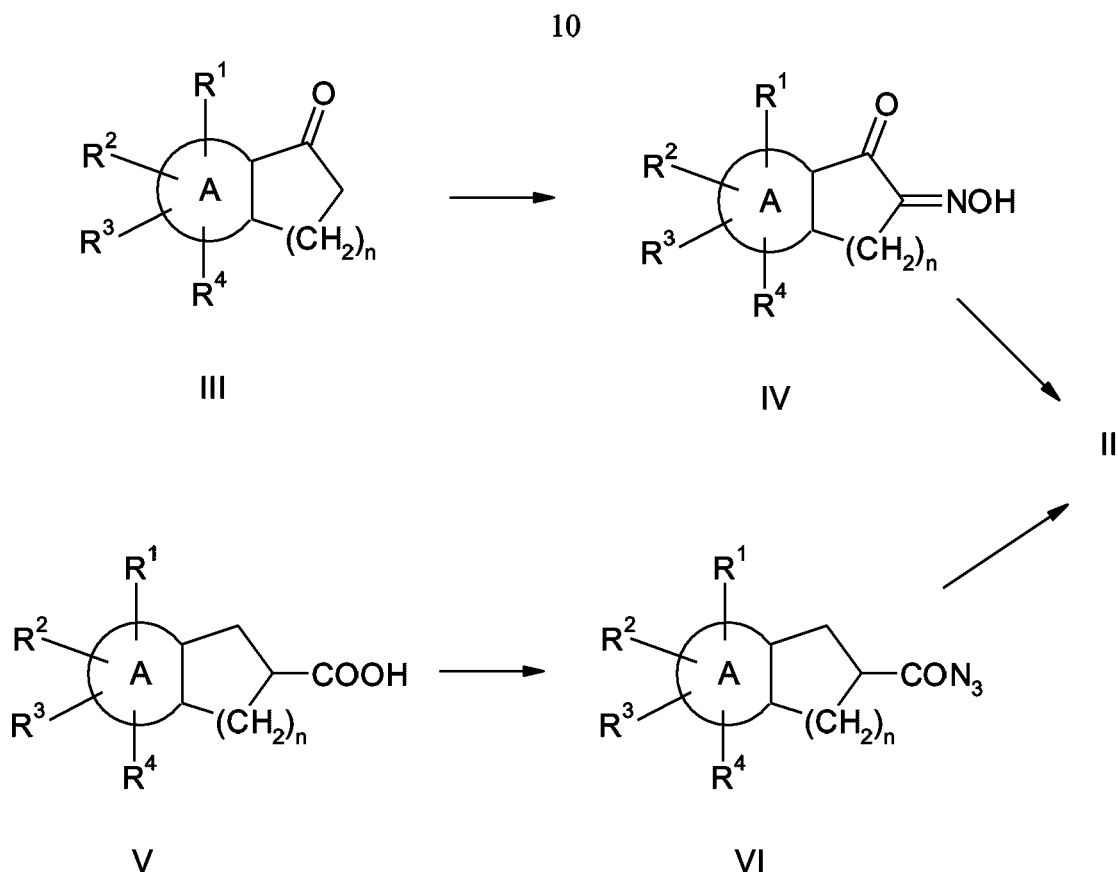
Acyleringsreaksjonen kan utføres under standard betingelser som er kjente for fagmannen. I mange tilfeller utføres reaksjonen fordelaktig i et inert oppløsningsmiddel eller fortynningsmiddel, for eksempel et hydrokarbon eller et klorert hydrokarbon, så
 20 som toluen, 1,2-dikloretan eller metylenklorid, en eter, så som tetrahydrofuran, dioksan eller 1,2-dimetoksyetan, en alkohol, så som metanol, etanol eller isopropanol, et amid, så som N,N-dimetylformamid eller N-metylpyrrolidon, acetonitril, vann, eller ellers en blanding av to eller flere oppløsningsmidler eller fortynningsmidler. Avhengig av det individuelle tilfellet kan det være fordelaktig å utføre reaksjonen i nærvær av en base,
 25 for eksempel en uorganisk base, så som natriumhydroksid, natriumkarbonat eller natriumhydrogenkarbonat, eller en organiske base, så som trietylamin, etyldiisopropylamin, N-etylmorfolin eller pyridin, og/eller i nærvær av en acyleringkatalysator, så som 4-dimetylaminopyridin.

Dersom en karboksylsyre av formel R^5 -COOH skal anvendes i acyleringen av en forbindelse av formel II, er det ofte fordelaktig å aktivere syren eller et salt derav med et kondensasjonsmiddel eller koblingsmiddel, for eksempel et middel som de som vanligvis anvendes innenfor peptidkjemi for dannelsen av amidbindinger. Eksempler på egnede koblingsmidler er karbodiimider, så som disykloheksylkarbodiimid eller diisopropylkarbodiimid, TOTU, det vil si O-((cyano(etoksykarbonyl)metylen)amino)-N,N,N',N'-
 35 tetrametyluroniumtetrafluorborat, HATU, det vil si O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorfosfat, klormaurisyreestere som etylkloroformat eller iso-

butylkloroformat, tosyklorid, propylfosfonsyreanhydrid eller karbonyldiimidazol. Avhengig av det individuelle tilfellet kan den egnede reaksjonstemperaturen ligge innenfor et vidt område. Når det for eksempel i acyleringsreaksjonen anvendes en karboksylsyre i nærvær av et koblingsmiddel eller et karboksylsyreklorid, kan reaksjonen ofte utføres ved romtemperatur.

Etter acyleringsreaksjonen, ved siden av den ovenfor nevnte avbeskyttelsen av beskyttede grupper eller omdanningen av en forstadiegruppe til den ønskede sluttgruppen, kan det eventuelt utføres ytterligere funksjonaliseringer eller modifikasjoner av de oppnådde forbindelsene, og egnede funksjonelle grupper kan for eksempel forestres, amideres, transforestres, hydrolyseres, alkyles, sulfonyleres, acyles, oksideres, omdannes til et salt eller underkastes andre reaksjoner.

Utgangsforbindelsene for fremstilling av forbindelsene av formel I er kommersielt tilgjengelige eller kan fremstilles i henhold til eller analogt med litteraturkjente fremgangsmåter. Fremgangsmåter for fremstillingen av forbindelsene av formel II omfatter for eksempel omdanningen av et keton av formel III til et oksim av formel IV og omdanningen av sist nevnte til en forbindelse av formel II og omdanningen av en karboksylsyre av formel V til et karboksylsyreazid av formel VI og omdanningen av sist nevnte til en forbindelse av formel II. De nevnte omdanningene kan utføres under standard betingelser som er kjente for fagmannen. For eksempel kan et keton av formel III omdannes til et oksim av formel IV ved behandling med et organisk nitritt, så som isoamylnitritt i nærvær av saltsyre og reduksjonen av oksimgruppen for å gi aminogruppen og reduksjonen av C=O-gruppen i benzyrisk stilling for å gi CH₂-gruppen, kan oppnås samtidig ved katalytisk hydrogenering i nærvær av for eksempel palladium. En karboksylsyre av formel V kan omdannes til et karboksylsyreazid av formel VI ved omsetning med, for eksempel, difenylfosforylazid og sist nevnte kan gjøres til gjenstand for en Curtius-omordning.



- Utgangsforbindelsene av formlene III og V kan oppnås som beskrevet for eksempel i JP 2-255664, EP 853083; US 6258829; US 6278027; CA 2151443; GB 2280438;
- 5 Schenone et al., J. Heterocycl. Chem. 19 (1982), 1355; Bianchi et al., J. Chem. Res., Synop., (1981), 6; Muraro et al., Bull. Soc. Chim. Fr., Pt. 2, (1973) 335; Muraro et al., C. R. Acad. Sci., Ser. C, 273 (1971), 1362; MacDowell et al., J. Org. Chem. 32 (1967), 1226; Ravina et al., J. Med. Chem. 42 (1999), 2774; Nayyar et al., J. Org. Chem. 62 (1997), 982; Binder et al., Monatsh. Chem. 129 (1998), 887; Westerwelle et al., Chem.
- 10 Ber. 124 (1991), 571; Huang et al., Synth. Commun. 28 (1998), 1197; Reimann et al., Pharmazie 50 (1995), 589; Caprathe et al., J. Med. Chem. 34 (1991), 2736; Hoffman et al., J. Org. Chem. 49 (1984), 193; Schroeder et al., Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 14 (1979), 309; Ruangsiyanand et al., Chem. Ber. 103 (1970), 2403; Dammertz et al., Arch. Pharm. 310 (1977), 172; Hicks et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, (1984),
- 15 2297; Jones et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, (1973) 968; US 5 753 662 eller WO 94/04531, eller ved å anvendes fremgangsmåter som er analoge de som er beskrevet i disse referansene.

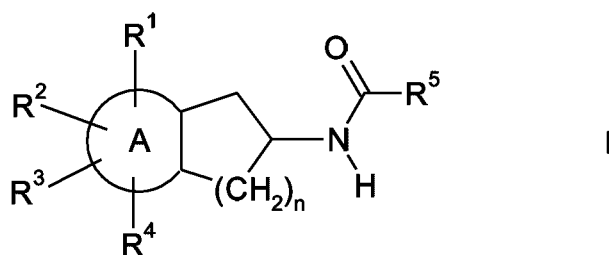
Alle reaksjoner for syntesen av forbindelsene av formelen I er vel kjente per se for fagmannen og kan utføres under standardbetingelser i henhold til, eller analogt, fremgangsmåter beskrevet i literaturen, for eksempel i Houben-Weyl, "Methoden der Organischen

20

Chemie" (Methods of Organic Chemistry), Thieme-Verlag, Stuttgart, eller "Organic Reactions", John Wiley & Sons, New York. Avhengig av omstendighetene ved det individuelle tilfellet, for å unngå bireaksjoner under syntesen av en forbindelse av formelen I, kan det som nevnt ovenfor, i et hvilket som helst reaksjonstrinn være nødvendig eller fordelaktig å temporært blokkere funksjonelle grupper ved å innføre beskyttende grupper og avbeskytte dem i et senere trinn av syntesen, eller innføre funksjonelle grupper i form av forstadiegrupper som i et senere reaksjonstrinn omdannes til de ønskede funksjonelle gruppene. Slike syntesestrategier og beskyttelsesgrupper av forstadiegrupper som er egnede i et individuelt tilfelle, er kjente for fagmannen. Om ønsket kan forbindelsene av formel I renses ved vanlige rensefremgangsmåter, for eksempel ved rekrySTALLISASJON eller kromatografi.

Forbindelsene av formelen I er nyttige, farmasøytisk aktive forbindelser som oppregulerer ekspresjonen av endotelisk NO-syntase og som kan anvendes som medikamenter for behandling av forskjellige sykdommer. I forbindelse med foreliggende oppfinnelse forstås behandling å omfatte både terapi, innbefattende forbedring eller helbredelse, av sykdomssymptomer og forebyggelse eller profylakse av sykdomssymptomer, så som for eksempel forebyggelse av tilsynekomsten av astmatiske sykdomssymptomer eller forebyggelse av myokardialt infarkt eller av myokardialt reinfarkt i relevante pasienter. Disse sykdommene eller sykdomssymptomene kan være akutte eller kroniske. Sykdommer som kan behandles med forbindelsene av formelen I, omfatter for eksempel kardiovaskulære sykdommer, som stabil og ustabil angina pectoris, koronar hjertesykdom, Prinzmetallangina (spasme), akutt koronart syndrom, hjertesvikt, myokardialt infarkt, slag, trombose, perifer arterieokklusiv sykdom (PAOD), endotelisk dysfunksjon, aterosklerose, restenose, endotel skade etter PTCA, hypertensjon omfattende essensiell hypertensjon, pulmonar hypertensjon og sekundær hypertensjon (renovaskulær hypertensjon, kronisk glomerulonefritt), erektil dysfunksjon og ventrikulær arytmi. Videre nedsetter forbindelsene av formelen I den kardiovaskulære faren for postmenopausale kvinner og for kvinner som tar kontraseptiver. Forbindelser av formel I kan i tillegg anvendes ved behandling, det vil si terapi og forebyggelse av diabetes og diabeteskomplikasjoner (nefropati, retinopati), angiogenese, astma bronkiale, kronisk nyresvikt, cirrhose i leveren, osteoporose, begrenset hukommelsesytelse eller en begrenset læringsevne. Foretrukne indikasjoner er stabil angina pectoris, koronar hjertesykdom, hypertensjon, endotelisk dysfunksjon, aterosklerose og diabetiske komplikasjoner.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en forbindelse av formel I



5 i hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I:

ringen A som omfatter de to karbonatomene som er felles for ringen A og sykloalkenyl-
ringen i formel I, er en pyridin- eller tiofenring;

10

R^1 og R^4 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl, og
halogen;

R^2 og R^3 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl og
15 halogen;

hvor, dersom A er en pyridinring, 3 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er til stede og er
bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen, og
dersom A er en tiofenring, er 2 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 til stede og er bundet til
20 karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen;

R^5 er en gruppe Ar eller en gruppe Hetar som begge er usubstituerte eller bærer én eller
flere like eller forskjellige substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen; -CN;
 NH_2 ; usubstituert og minst monosubstituert C_1 - C_{10} -alkyl, C_1 - C_{10} -alkoksy, hvis substi-
25 tuenter er valgt fra gruppen C_1 - C_8 -alkoksy; fenyl; CF_3 ; fenyl- C_1 - C_4 -alkyl; pyridyl- C_1 -
 C_4 -alkyl; C_1 - C_6 -alkylsulfonilamino og morfolinyl; hvor alle fenylholdige og
pyridylholdige grupper, som eventuelt er til stede i nevnte substituenten av nevnte
gruppe Ar eller nevnte gruppe Hetar, kan være substituert med én eller flere
substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen og C_1 - C_3 -alkyl;

30

gruppen Hetar erpyridyl, benzimidazolyl, benzodioksolyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyrrolyl
eller iazolyl;

gruppen Ar er fenyl;

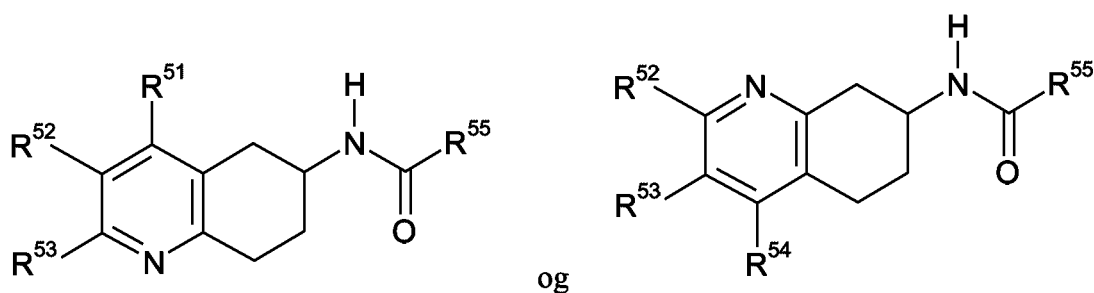
5

n er 1, 2 eller 3;

under den forutsetning at

10

forbindelsene av formlene



15 er utelukket, hvori R^{51} , R^{52} , R^{53} og R^{54} er valgt fra hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl og halogen, og R^{55} er usubstituert eller substituert fenyl eller pyrrolyl;

for fremstilling av et medikament for stimulering av ekspresjonen av endotelisk NO-syntase.

20

Forbindelsene av formelen I kan anvendes i kombinasjon med andre farmasøytisk aktive forbindelser, fortrinnsvis med forbindelser som er i stand til å fremme effekten av forbindelsene av formelen I. Eksempler på slike andre forbindelser omfatter statiner; ACE-inhibitorer; AT1-antagonister; argininaseinhibitorer; PDE V-inhibitorer; kalsium-
25 antagonist; alfa-blokkere; beta-blokkere; tiamazol (metimazol) og analoge forbindelser; arginin; tetrahydrobiopterin; vitaminer, spesielt vitamin C og vitamin B6; niacin.

Forbindelsene av formelen I og deres farmasøytisk akseptable salter, eventuelt i kombinasjon med andre farmasøytisk aktive forbindelser, kan administreres til dyr, fortrinnsvis til pattedyr, og spesielt til mennesker, som farmasøytiske midler i seg selv, i
30 blandinger med andre eller i form av farmasøytiske preparater. En ytterligere gjenstand for foreliggende oppfinnelse er derfor også en forbindelse av formel I som definert

ovenfor og/eller dens farmasøytisk akseptable salter for anvendelse som et farmasøytisk middel. Videre kan en forbindelse av formel I og/eller dens farmasøytisk akseptable salter anvendes som transkripsjonsstimulerende middel eller oppregulerende middel av endotelisk NO-syntase, for eksempel i lidelser hvori en forøkt ekspresjon av nevnte
 5 enzym eller et forøkt NO-nivå eller normaliseringen av et redusert NO-nivå i en pasient er ønsket, og spesielt anvendes ved behandling, det vil si terapi og forebyggelse, av de ovenfor nevnte syndromene.

Videre er en gjenstand for foreliggende oppfinnelse farmasøytiske preparater (eller
 10 farmasøytiske sammensetninger) som omfatter en effektiv dose av minst én forbindelse av formelen I og/eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav som definert ovenfor, og en farmasøytisk akseptabel bærer, det vil si ett eller flere farmasøytisk akseptable bærer-
 stoffer eller vehikler og/eller additiver eller hjelpestoffer.

15 De farmasøytiske midlene ifølge oppfinnelsen kan administreres oralt, for eksempel i form av piller, tabletter, lakktabletter, sukkerbelagte tabletter, korn, harde og myke gelatinkapsler, vandige, alkoholiske eller oljeformige oppløsninger, siruper, emulsjoner eller suspensjoner, eller rektalt, for eksempel i form av suppositorier. Administrering kan også utføres parenteralt, for eksempel subkutan, intramuskulært eller intravenøst, i
 20 form av oppløsninger for injeksjon eller infusjon. Andre egnede administrasjonsformer er for eksempel perkutan eller topisk administrering, for eksempel i form av salver, tinkturer, sprayer eller transdermale, terapeutiske systemer, eller inhalativ administra-
 sjon i form av nesesprayer eller aerosolblandinger eller for eksempel mikrokapsler, implantater eller staver. Den foretrukne administrasjonsformen avhenger blant annet av
 25 sykdommen som skal behandles og dens grad.

Mengden av en forbindelse av formel I og/eller dens farmasøytisk akseptable salter i de farmasøytiske preparatene varierer normalt fra 0,2 til 800 mg, fortrinnsvis fra 0,5 til 500 mg, spesielt fra 1 til 200 mg pr. dose, men avhengig av typen av det farmasøytiske
 30 preparatet kan den også være høyere. De farmasøytiske preparatene omfatter vanligvis fra 0,5 til 90 vekt% av forbindelsene av formel I og/eller deres farmasøytisk akseptable salter. Fremstillingen av de farmasøytiske preparatene kan utføres på i og for seg kjent måte. For dette formålet bringes én eller flere forbindelser av formel I og/eller deres farmasøytisk akseptable salter, sammen med ett eller flere, faste eller flytende
 35 farmasøytiske bærerstoffer og/eller additiver (eller hjelpestoffer) og om ønsket, i kombinasjon med andre farmasøytisk aktive forbindelser som har terapeutisk eller

profylaktisk virkning, til en egnet administrasjonsform eller doseringsform som deretter kan anvendes som farmasøytisk middel innenfor human- eller veterinærmedisin.

For fremstillingen av piller, tabletter, sukkerbelagte tabletter og hardgelatinkapsler er det mulig å anvende for eksempel laktose, stivelse, for eksempel maisstivelse, eller stivelsesderivater, talk, stearinsyre eller dens salter og så videre. Mykgelatinkapsler og suppositorier kan for eksempel omfatte fett, vokser, halvfast og flytende polyoler, naturlige og herdede oljer og så videre. Egnede bærerstoffer eller vehikler for fremstillingen av oppløsninger, for eksempel av oppløsninger for injeksjon, eller av emulsjoner eller siruper er for eksempel vann, fysiologisk natriumkloridoppløsning, alkoholer så som etanol, glyserol, polyoler, sukrose, invert sukker, glukose, mannitol, vegetabiliske oljer og så videre. Det er også mulig å lyofilisere forbindelsene av formel I og deres farmasøytisk akseptable salter og å anvende de resulterende lyofilisatene for eksempel for fremstilling av preparater for injeksjon eller infusjon. Egnede bærere for mikrokapsler, implantater eller staver er for eksempel kopolymerer av glykolsyre og melkesyre.

Ved siden av forbindelsen eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen og bærerstoffer kan de farmasøytiske preparatene også inneholde additiver, så som for eksempel fyllstoffer, sprengmidler, bindemidler, smøremidler, fuktemidler, stabilisatorer, emulgeringsmidler, dispersjonsmidler, konserveringsmidler, søtningsmidler, fargestoffer, sprengstoffer, aromatiseringsmidler, fortykningsmidler, fortynningsmidler, bufferstoffer, oppløsningsmidler, oppløseliggjørende midler, midler for å oppnå en depoteffekt, salter for å endre det osmotiske trykk, beleggingsmidler og antioksidanter.

Doseringen av forbindelsen av formel I som administreres og/eller av et farmasøytisk akseptabelt salt derav, avhenger av det individuelle tilfellet og blir som vanlig tilpasset de individuelle forholdene for å oppnå en optimal effekt. Følgelig avhenger det av naturen og graden av lidelsen som skal behandles, og også av kjønn, alder, vekt og individuell respons hos mennesket eller dyret som skal behandles, av virkningsgraden og virkningsvarigheten av forbindelsene som anvendes, av om det anvendes for terapi av en akutt eller kronisk sykdom eller om det anvendes profylaktisk, eller av om andre aktive forbindelser administreres i tillegg til forbindelsene av formel I. Generelt er en daglig dose på fra 0,01 til 100 mg/kg, fortrinnsvis fra 0,1 til 10 mg/kg, spesielt fra 0,3 til 5 mg/kg (i hvert tilfelle mg pr. kg kroppsvekt), egent for administrasjon til et voksent menneske med vekt ca. 75 kg for å oppnå de ønskede resultatene. Den daglige dosen kan administreres i en enkeltdose eller, spesielt når større mengder administreres,

oppdeles i flere, for eksempel to, tre eller fire, individuelle doser. I noen tilfeller kan det, avhengig av den individuelle responsen, være nødvendig å avvike oppad eller nedad fra den gitte daglige dosen.

- 5 Forbindelsene av formel I kan også anvendes for andre formål enn de som er nevnt i det foregående. Eksempler omfatter diagnostiske formål, så som anvendelse ved undersøkelsen av celle- eller vevsprøver, anvendelsen som biokjemiske verktøy og anvendelsen som mellomprodukter for fremstillingen av ytterligere forbindelser, for eksempel farmasøytisk aktive forbindelser.

10

Eksempler

HPLC-betingelser

HPLC-metode a

- 15 Kolonne: Daicel Chiralpak AD, 250 x 4,6 mm, 10 µm; elueringsmiddel: acetonitril/iso-propanol (120/5) + 0,1 % dietylamin; strømningsrate: 1,0 ml/min.

HPLC-metode b

- 20 Kolonne: Merck Purospher, 55 x 2 mm, 5 µm; elueringsmiddel A: vann + 0,05 % tri-fluoreddiksyre, elueringsmiddel B: acetonitril; gradient: fra 95 % elueringsmiddel A/5 % elueringsmiddel B til 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B på 4 min, 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B på 1,5 min; strømningsrate: 0,5 ml/min.

HPLC-metode c

- 25 Kolonne: YMC J'Sphere ODS H80, 33 x 2 mm, 3 µm; elueringsmiddel A: vann + 0,05 % trifluoreddiksyre, elueringsmiddel B: acetonitril; gradient: fra 90 % elueringsmiddel A/10 % elueringsmiddel B til 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B på 2,5 min, 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B på 0,8 min; strømningsrate: 1,0 ml/min.

30

HPLC-metode d

Kolonne: Daicel Chiralpak AD, 250 x 4,6 mm, 10 µm; elueringsmiddel: n-heptan/iso-propanol (10/1); strømningsrate: 1,0 ml/min.

HPLC-metode e

35 Kolonne: Merck Purospher, 55 x 2 mm, 3 µm; elueringsmiddel A: vann + 0,1 % maur-syre, elueringsmiddel B: acetonitril + 0,08 % maursyre; gradient: fra 95 % eluerings-

middel A/5 % elueringsmiddel B til 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B på 5 min, 5 % elueringsmiddel A/95 % elueringsmiddel B i 2 min; strømningsrate: 0,45 ml/min.

- 5 HPLC-retensjonstider (RT) er angitt i minutter.

Generelle fremgangsmåter for acylering av heteroaryl-kondenserte sykloalkenyl-aminer

Generell acyleringsfremgangsmåte A: 2,5 mmol av det respektive aminet ble blandet
 10 med 550 mg trietylamin og 5 ml dioksan eller tetrahydrofuran, og 2,5 mmol av det respektive karboksylsyrekloridet ble tilsatt. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter helt på en mettet natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Blandingen ble ekstrahert med etylacetat og den organiske oppløsningen tørket og konsentrert. Resten ble rensset ved preparativ HPLC (RP18; acetonitril/vann + trifluoreddiksyre) eller
 15 ved silikagelflashkromatografi (metylenklorid eller metylenklorid/metanol).

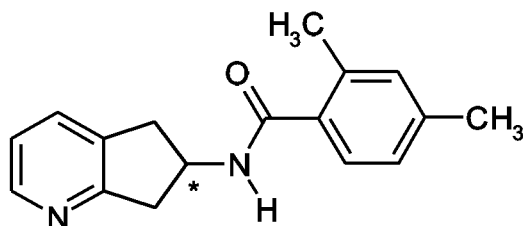
Generell acyleringsfremgangsmåte B: Til 0,4 mmol av den respektive karboksylsyren oppløst i 5 ml tetrahydrofuran ble det tilsatt 144 mg (0,44 mmol) O-((cyano(etoksykarbonyl)metylen)amino)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumtetrafluorborat (TOTU) i 1 ml
 20 dimetylformamid og 114 mg (0,88 mmol) etyldiisopropylamin. Etter omrøring ved romtemperatur i 30 min ble det tilsatt 0,37 mmol av det respektive aminet og blandingen ble omrørt i 12 timer. Reaksjonsblandingen ble helt på en mettet natriumhydrogenkarbonatoppløsning, ekstrahert med etylacetat og den organiske oppløsningen ble tørket og konsentrert. Resten ble rensset ved preparativ HPLC (RP18, aceto-
 25 nitril/vann + trifluoreddiksyre) eller ved silikagelflashkromatografi (metylenklorid eller metylenklorid/metanol).

Generell acyleringsfremgangsmåte C: 0,4 mmol av det respektive aminet og 75 µl (0,44 mmol) etyldiisopropylamin ble oppløst i 1 ml dimetylformamid og oppløsningen
 30 ble avkjølt til 0 °C. Deretter ble det tilsatt en oppløsning av 54 mg (0,44 mmol) 4-dimetylaminopyridin i 0,5 ml dimetylformamid, 0,44 mmol av den respektive karboksylsyren og en oppløsning av 59 mg (0,44 mmol) 1-hydroksybenzotriazol i 0,5 ml dimetylformamid og blandingen ble omrørt ved 0 °C i 20 min. Deretter ble det tilsatt en oppløsning av 68 mg (0,44 mmol) N-(3-dimetylaminopropyl)-N'-etylkarbodiimid i 0,5 ml
 35 dimetylformamid og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 12 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert og filteret ble rensset to ganger med 10 ml etylacetat. Opp-løsningen ble vasket med 20 ml av en 5 % natriumhydrogenkarbonatoppløsning og

20 ml av en 5 % natriumkloridoppløsning, og den organiske fasen ble separert, tørket over Chromabond XTR og inndampet til tørrhet. Om ønsket ble produktet rensset ved preparativ HPLC (RP 18, acetonitril/vann + 0,01 % trifluoreddiksyre).

5 Eksempel 1

N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-2,4-dimetylbenzamid (enantiomer 1)



10 a) 7-benzyliden-6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin

15 g (0,125 mol) 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin, 20,1 g (0,19 mol) nydestillert benzaldehyd og 24,5 g (0,24 mol) eddiksyreanhydrid ble oppvarmet under tilbakeløp i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble inndampet, restoljen oppløst i metylenklorid, oppløsningen ble ekstrahert med 1 N NaOH-oppløsning, og den organiske fase ble
15 tørket og inndampet. Resten ble destillert under redusert trykk for å gi 19,3 g (75 %) av forbindelsen i overskriften.

Kokepunkt (0,013 mbar): 150 °C. Smeltepunkt: 72 °C.

20 b) 5,6-dihydro-[1]pyrindin-7-on

19,3 g (0,09 mol) av forbindelsen fra trinn a ble oppløst i 250 ml tørr metanol, avkjølt til -35 °C og ozonbehandlet i 3 timer. 10,56 g (0,17 mol) dimetylsulfid ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble tillatt og oppvarmes til romtemperatur over natten. Inndamping og etterfølgende destillasjon av restoljen under redusert trykk ga 6,6 g av forbindelsen i
25 overskriften.

Kokepunkt (0,003 mbar): 150 °C.

c) 5H-[1]pyrindin-6,7-dion 6-oxsim

30 6,6 g (49,6 mmol) av forbindelsen fra trinn b og 6,97 g (59,5 mmol) av isoamylnitritt ble oppløst i 150 ml metanol oppvarmet til 45 °C og behandlet dråpevis med 8 ml konsentrert saltsyre. Etter omrøring ved 45 °C i 3 timer ble blandingen avkjølt til 0 °C og det utfelte produktet ble samlet ved avsugning. Utbytte: 7,3 g (91 %).

DC: $R_f = 0,2$ [silikagel, metylenklorid/metanol (95/5)].

d) N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid

- 5 18 g (0,11 mol) av forbindelsen fra trinn c ble oppløst i 500 ml eddiksyre og 500 ml eddiksyreanhydrid og hydrogenert i 20 timer ved et trykk på 2 bar over 5 g palladium på bariumsulfat. Reaksjonsblandingen ble filtrert og inndampet. Resten ble oppløst i 1 000 ml etanol, behandlet med 10,8 ml perklorisyre og hydrogenert i 10 timer ved 50 °C og et trykk på 3,5 bar over 5 g palladium på trekull (10 %). Den resulterende
10 blandingen ble inndampet, resten ble opptatt i fortynnet NaOH-oppløsning og ekstrahert med etylacetat. Inndamping av de kombinerte, organiske fasene og etterfølgende kromatografi av resten, ga racemisk N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid.

DC: $R_f = 0,28$ [silikagel, metylenklorid/metanol (9/1)].

15

- Det racemiske acetamidet ble separert i enantiomerene ved kromatografi på en chiral fase (Chiralpak AD; elueringsmiddel: acetonitril/isopropanol (120/5) + 0,1 % dietylamin). Utbyttet av enantiomer 1 av N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid var 1,89 g, utbyttet av enantiomer 2 av N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid var
20 1,53 g.

Enantiomer 1

HPLC: $RT = 6,40$ min (metode a).

25 Enantiomer 2

HPLC: $RT = 8,16$ min (metode a).

e) 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-ylamin (enantiomer 1 og enantiomer 2)

- De separerte enantiomerene av N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid ble hydrolysert ved oppvarming med 20 ml 6N HCl i en forseglet beholder til 150 °C i 4 timer.
30 Inndamping, behandling med et overskudd av 1 N NaOH-oppløsning, ekstraksjon med etylacetat og tørking og inndamping av ekstraktene ga de to enantiomerene 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-ylaminene i et utbytte henholdsvis 0,7 g og 0,8 g.

35 Enantiomer 1

MS: $m/e = 135$ ($M+H$)⁺. HPLC: $RT = 0,13$ (metode c).

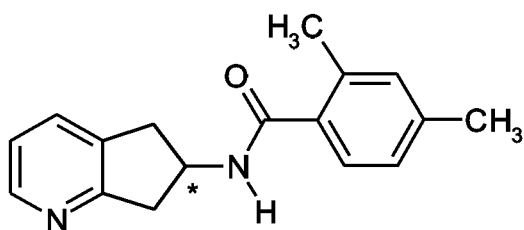
Enantiomer 2

MS: $m/e = 135 (M+H)^+$. HPLC: RT = 0,13 (metode c).

f) N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-2,4-dimetylbenzamid (enantiomer 1)

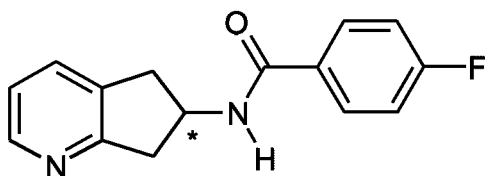
- 5 Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt dihydro-5H-[1]pyrindin-6-ylamin fra trinn e) i henhold til generell acyleringsmetode A.

MS: $m/e = 267 (M+H)^+$. HPLC: RT = 1,12 min (metode c).

10 **Eksempel 2****N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-2,4-dimetylbenzamid (enantiomer 2)**

- 15 Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-ylamin fra eksempel 1, trinn e), i henhold til generell acyleringsmetode A.

MS: $m/e = 267 (M+H)^+$. HPLC: RT = 1,12 min (metode c).

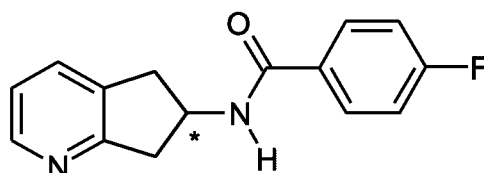
20 **Eksempel 3****N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-4-fluorbenzamid (enantiomer 1)**

- 25 Forbindelsen i overskriften ble fremstilt i henhold til generell acyleringsmetode A, ved utgangspunkt fra racemisk 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-ylamin som var fremstilt fra racemisk N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)acetamid fra eksempel 1, trinn d, ved hydrolyse analogt det som er beskrevet i eksempel 1, trinn e, og separasjon av racemisk N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-4-fluorbenzamid ved preparativ kromatografi på
30 en chiral fase [Chiralpak AD; elueringsmiddel: heptan/isopropanol (10/1)].

MS: $m/e = 257 (M+H)^+$, HPLC: RT = 15,66 min (metode d).

Eksempel 4

- 5 **N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-4-fluorbenzamid (enantiomer 2)**

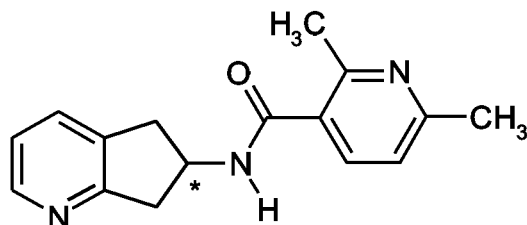


- 10 Forbindelsen i overskriften ble fremstilt som beskrevet i eksempel 3 ved separasjon av N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-4-fluorbenzamid.

MS: $m/e = 257 (M+H)^+$. HPLC: RT = 14,96 min (metode d).

Eksempel 5

- 15 **N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-2,6-dimetylnikotinamid (enantiomer 1)**

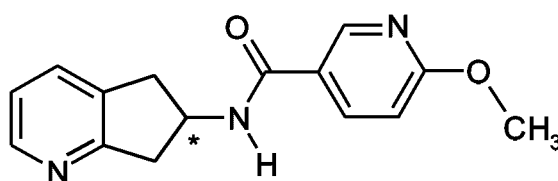


- 20 Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode A.

MS: $m/e = 268 (M+H)^+$. HPLC: RT = 0,15 min (metode c).

Eksempel 6

- 25 **N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-6-metoksynikotinamid (enantiomer 1)**



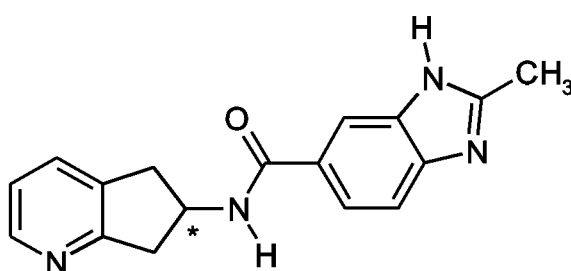
Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode A.

5 MS: $m/e = 270 (M+H)^+$. HPLC: RT = 0,43 min (metode c).

Eksempel 7

2-metyl-3H-benzimidazol-5-karboksylysyre(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)amid (enantiomer 1)

10



Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode A.

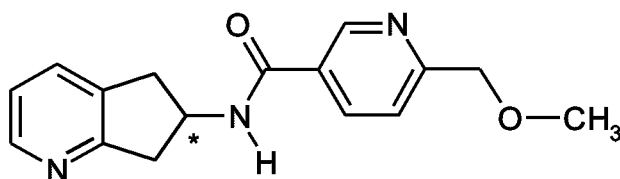
15

MS: $m/e = 293 (M+H)^+$. HPLC: RT = 0,17 min (metode c).

Eksempel 8

N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-6-metoksymetylnikotinamid (enantiomer 1)

20



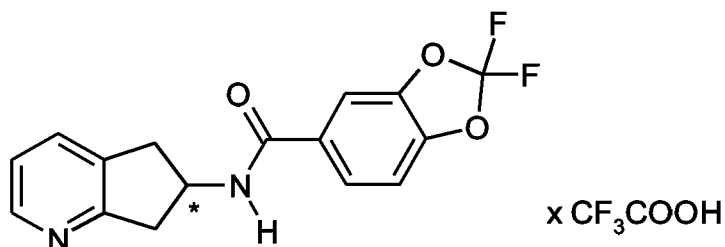
Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode B.

25

MS: $m/e = 284 (M+H)^+$. HPLC: RT = 1,77 min (metode b).

Eksempel 9

2,2-difluorbenzo[1,3]dioksol-5-karboksylsyre(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)-amid (enantiomer 1), trifluoreddiksyresalt



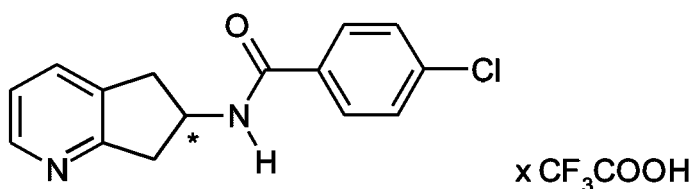
5

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode B.

10 MS: $m/e = 319 (M+H)^+$. HPLC: $RT = 1,60$ min (metode c).

Eksempel 10

4-klor-N-(6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl)benzamid (enantiomer 1), trifluoreddiksyresalt



15

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra chiralt 6,7-dihydro-5H-[1]pyrindin-6-yl-amin fra eksempel 1, trinn e, i henhold til generell acyleringsmetode A.

20

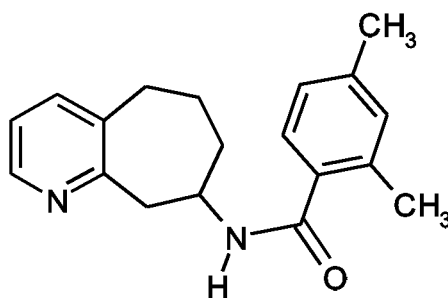
MS: $m/e = 273 (M+H)^+$. DC: $R_f = 0,29$ [silikagel, metylenklorid/metanol (95/5)].

Eksempel 11

2,4-dimetyl-N-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin-8-yl)benzamid

25

24



a) 9-benzyliden-6,7,8,9-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra 6,7,8,9-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin analogt eksempel 1, trinn a. Råmaterialet ble renset ved silikagelkromatografi ved anvendelse av metylenklorid som elueringsmiddel.

MS: $m/e = 236 (M+H)^+$. DC: $R_f = 0,47$ (silikagel, n-heptan/etylacetat (3/2)).

b) 5,6,7,8-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin-9-on

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra forbindelsen fra trinn analogt det som er beskrevet i eksempel 1, trinn b. Råmaterialet ble renset ved silikagelkromatografi ved anvendelse av metylenklorid/metanol (98/2) som elueringsmiddel.

MS: $m/e = 162 (M+H)^+$. DC: $R_f = 0,72$ (silikagel, metylenklorid/metanol (98/2)).

c) 6,7-dihydro-5H-syklohepta[b]pyridin-8,9-dion-8-oxsim

6,7 g (41,6 mmol) av forbindelsen fra trinn b ble oppløst i 300 ml dietyler og behandlet med 10 ml av en mettet oppløsning av hydrogenklorid i dietyler. Til den resulterende oppslemmingen ble det tilsatt 5,38 g (45,8 mmol) isoamylnitritt i 500 ml tetrahydrofuran og nok en gang 10 ml av en mettet oppløsning av hydrogenklorid i dietyler. Blandingen ble tilbakeløpsbehandlet i 3 timer, avkjølt i et isbad og det utfelte produktet ble isolert ved avsugning. Utbytte 7,9 g (100 %).

MS: $m/e = 191 (M+H)^+$. $R_f = 0,20$ (silikagel, metylenklorid/metanol (98/2)).

d) 6,7,8,9-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin-8-ylamin

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra forbindelsen fra trinn c analogt det som er beskrevet i eksempel 1, trinnene d og e. Råmaterialet ble renset ved silikagelkromatografi ved anvendelse av metylenklorid/metanol (98/2) som elueringsmiddel.

MS: $m/e = 163 (M+H)^+$. $R_f = 0,09$ (silikagel, metylenklorid/metanol (7/3)).

e) **2,4-dimetyl-N-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-syklohepta[b]pyridin-8-yl)benzamid**

Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra forbindelsen fra trinn d i henhold til generell acyleringsmetode A.

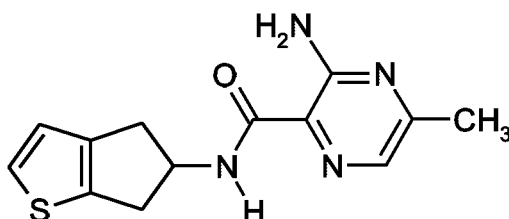
5

MS: $m/e = 295 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,68 min (metode b).

Eksempel 12

3-amino-5-metylpyrazin-2-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid

10



a) **5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-ylaminhydroklorid**

15 2,289 g (13,61 mmol) 5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-karboksytsyre (US-A-5753662) ble oppløst i 25 ml acetonitril, det ble tilsatt 4,120 g (14,97 mmol) difenylfosforylazid og 1,515 g (14,97 mmol) trietylamin, og blanding ble omrørt ved romtemperatur i 2,5 timer. Deretter ble det tilsatt 11,51 ml (168,4 mmol) allylalkohol og reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved 50 °C over natten. Oppløsningsmidlet ble av-

20 dampet og resten ble opptatt i etylacetat og ekstrahert med en 10 % natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Den organiske fasen ble separert, tørket og inndampet til tørrhet. Resten ble opptatt i 200 ml metylenklorid og tilsatt til en blanding av 2,60 ml (16,32 mmol) trietylsilan, 320 µl (2,312 mmol) trietylamin og 153 mg palladiumacetat. Etter omrøring ved romtemperatur i 3 timer ble oppløsningsmidlet avdampet, resten ble

25 opptatt i etylacetat og ekstrahert med en 10 % natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Den organiske fasen ble separert og ekstrahert med fortynnet saltsyre. De kombinerte saltsyrefasene ble frysetørket for å gi 1,44 g av forbindelsen i overskriften som ble anvendt i acyleringstrinnet uten ytterligere rensing.

30 b) **3-amino-5-metylpyrazin-2-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]-tiofen-5-yl)amid**

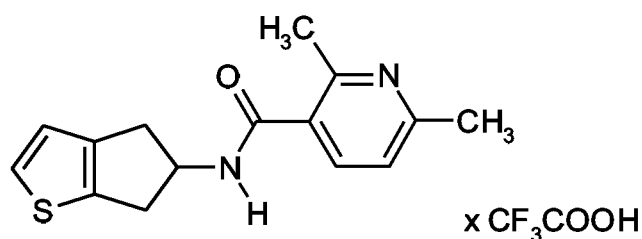
Forbindelsen i overskriften ble fremstilt fra 5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-ylaminhydroklorid fra trinn a) i henhold til generell acyleringsmetode C.

MS: $m/e = 275 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,62 min (metode e).

De følgende eksemplene 13 til 31 ble fremstilt fra 5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-ylaminhydroklorid fra eksempel 12, trinn a) i henhold til generell acyleringsmetode C.

Eksempel 13

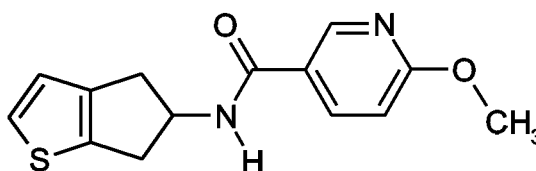
N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-2,6-dimetylnikotinamid, trifluoreddiksyresalt



MS: $m/e = 273 (M+H)^+$. HPLC: RT = 1,80 min (metode e).

Eksempel 14

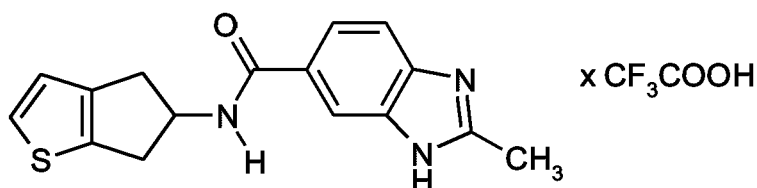
N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-6-metoksynikotinamid



MS: $m/e = 275 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,30 min (metode e).

Eksempel 15

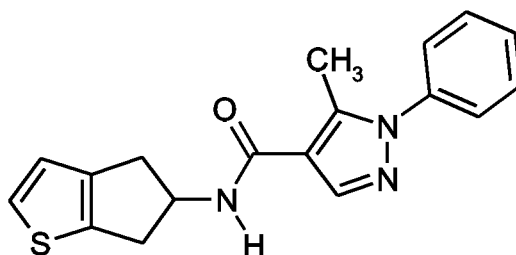
2-metyl-3H-benzimidazol-5-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid, trifluoreddiksyresalt



MS: $m/e = 298 (M+H)^+$. HPLC: $RT = 1,93 \text{ min}$ (metode e).

Eksempel 16

5 **5-metyl-1-fenyl-1H-pyrazol-4-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid**

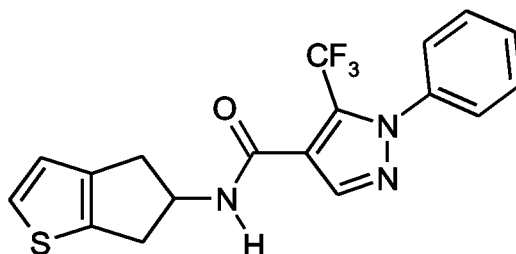


MS: $m/e = 324 (M+H)^+$. HPLC: $RT = 3,67 \text{ min}$ (metode e).

10

Eksempel 17

1-fenyl-5-trifluormetyl-1H-pyrazol-4-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid

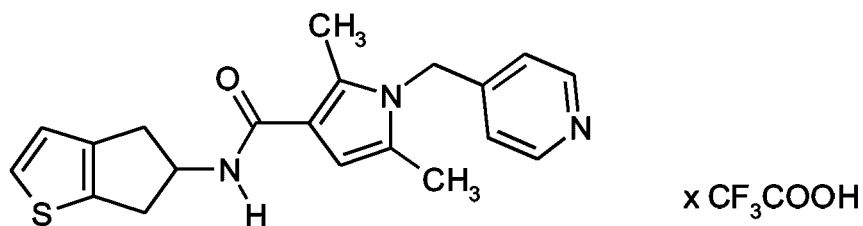


15

MS: $m/e = 378 (M+H)^+$. HPLC: $RT = 4,02 \text{ min}$ (metode e).

Eksempel 18

20 **2,5-dimetyl-1-pyridin-4-ylmetyl-1H-pyrrol-3-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid, trifluoreddiksyresalt**



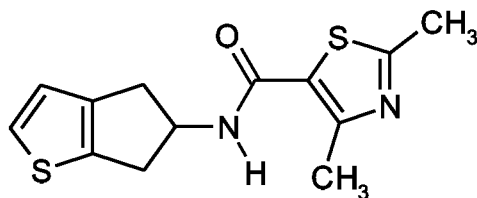
28

MS: $m/e = 352 (M+H)^+$. HPLC: RT = 2,37 min (metode e).

Eksempel 19

2,4-dimetyltiazol-5-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid

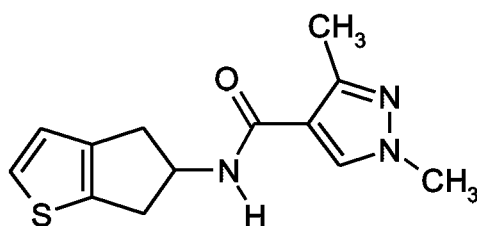
5



MS: $m/e = 279 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,12 min (metode e).

10 Eksempel 20

1,3-dimetyl-1H-pyrazol-4-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid

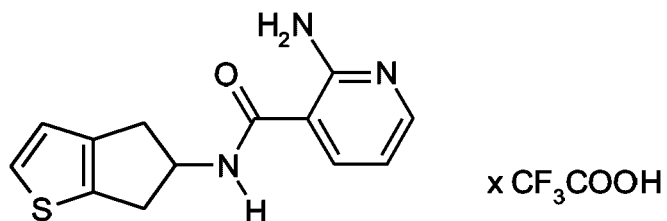


15 MS: $m/e = 262 (M+H)^+$. HPLC: RT = 2,79 min (metode e).

Eksempel 21

2-amino-N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)nikotinamid, trifluor-eddiksyresalt

20

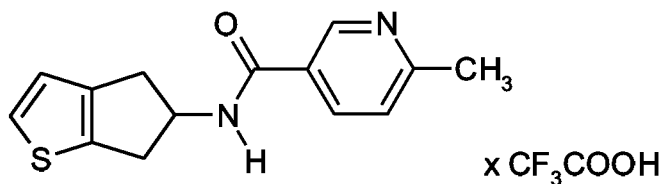


MS: $m/e = 260 (M+H)^+$. HPLC: RT = 1,85 min (metode e).

25

Eksempel 22

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-6-metylnikotinamid, trifluor-eddiksyresalt

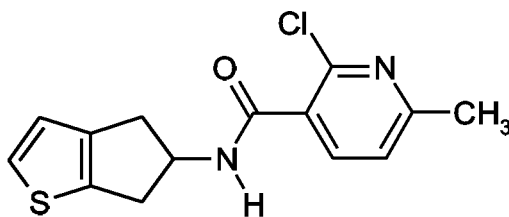


5

MS: $m/e = 259 (M+H)^+$. HPLC: RT = 2,17 min (metode e).

Eksempel 23

10 **2-klor-N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-6-metylnikotinamid**

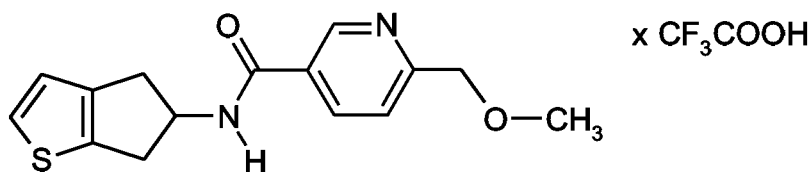


MS: $m/e = 293 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,20 min (metode e).

15

Eksempel 24

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-6-metoksymetylnikotinamid, tri-fluoreddiksyresalt



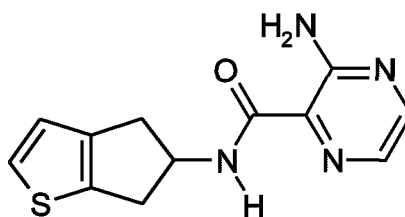
20

MS: $m/e = 289 (M+H)^+$. HPLC: RT = 2,84 min (metode e).

Eksempel 25

25 **3-aminopirazin-2-karboksytsyre(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)amid**

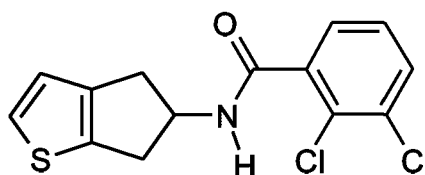
30



MS: $m/e = 261 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,42 min (metode e).

5 Eksempel 26

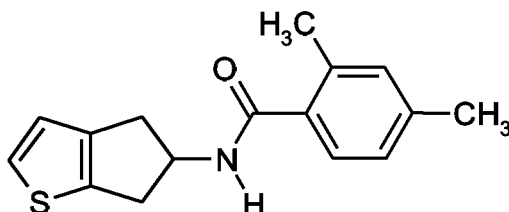
2,3-diklor-N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)benzamid



10 MS: $m/e = 312 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,90 min (metode e).

Eksempel 27

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-2,4-dimetylbenzamid

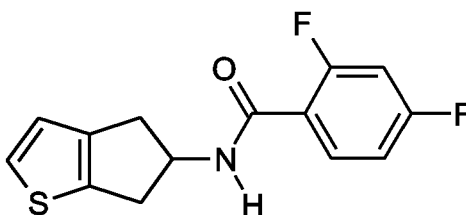


15

MS: $m/e = 272 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,87 min (metode e).

Eksempel 28

20 **N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-2,4-difluorbenzamid**



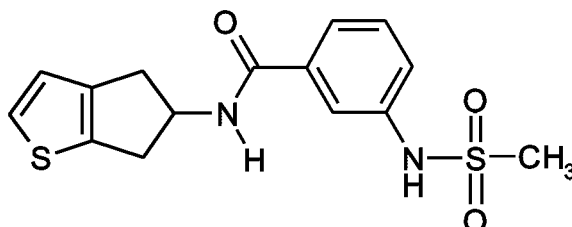
31

MS: $m/e = 280 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,79 min (metode e).

Eksempel 29

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-3-metylsulfonylaminobenzamid

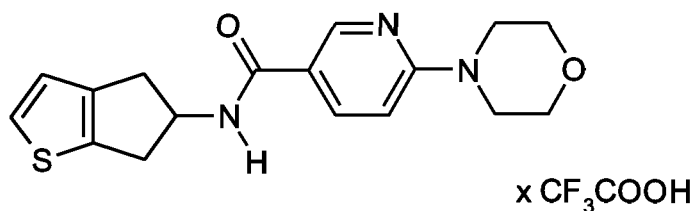
5



MS: $m/e = 337 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,12 min (metode e).

10 Eksempel 30

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-6-(morfolin-4-yl)nikotinamid, tri-fluoreddiksyresalt



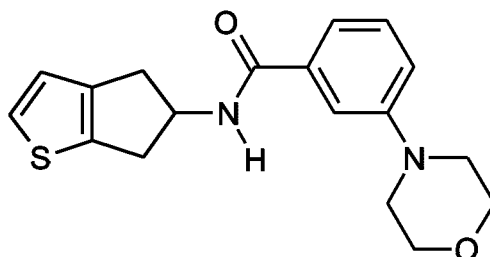
15

MS: $m/e = 330 (M+H)^+$. HPLC: RT = 2,73 min (metode e).

Eksempel 31

N-(5,6-dihydro-4H-syklopenta[b]tiofen-5-yl)-3-(morfolin-4-yl)benzamid

20



MS: $m/e = 329 (M+H)^+$. HPLC: RT = 3,43 min (metode e).

25

Bestemmelse av aktivering av eNOS-transkripsjon

Aktivering av eNOS-transkripsjon ble bestemt som beskrevet i detalj i Li et al., "Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene", Mol. Pharmacol. 53 (1998), 630.

5

Kort uttrykt ble et 3,5 kB langt fragment 5' av startkodonet av eNOS-genet klonet, sekvensert og klonet i ildflueluciferaseekspresjonsplasmider for å overvåke aktivering av eNOS-promoter ved reporterogenaktivitet. En human, endotel cellelinje stabilt transfektert og som uttrykker denne promoter-reporterkonstruksjonen, ble anvendt for testing av forbindelser. Celler ble inkubert i 18 timer med forbindelser.

10

Alle forbindelser ble oppløst i sterilt dimetylsulfoksid (DMSO). En sluttkonsentrasjon på 0,5 % DMSO i fullstendig medium ble tillatt. Induksjon av reporterogenekspresjon i disse cellene ble målt ved å anvende et standard luciferaseanalyzesystem (Promega, Cat. No E150) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Luciferaseinduksjon i celler inkubert med forbindelser ble sammenlignet med de inkubert med oppløsningsmiddel alene. Forholdet mellom begge aktiviteter (transkripsjonsinduksjonsforhold, TIR) ble avsatt som en funksjon av forbindelseskonsentrasjon. Typisk startet TIR-verdier ved lave konsentrasjoner ved et forhold på 1, hvilket indikerer ingen forbindelseseffekt, og strakk seg opp til en maksimal TIR-verdi TIR(maks) som indikerte økningen av eNOS-transkripsjonen. EC₅₀-verdier for transkripsjonsinduksjonsforhold som en funksjon av forbindelseskonsentrasjon, ble bestemt grafisk.

15

20

Effekten av forbindelser på eNOS-transkripsjon ble bekreftet i en andre analyse basert på eNOS-proteindeteksjon. Primære, humane navlesnorveneendotelceller (HUVEC) ble isolert og dyrket i henhold til standard fremgangsmåter. Sammenflytende celler ble inkubert med forbindelser i 18 timer og effekten på eNOS-proteinekspresjon ble bestemt ved hjelp av en kvantitativ Western-blotting fremgangsmåte. Etter forbindelsesinkubering ble HUVEC lysert i iskald lyseringsbuffer inneholdende 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 % SDS og proteaseinhibitorer. Lysatet ble underkastet en standard denaturerende polyakrylamidgelelektroforese og blottet til nitrocellulosemembraner. Ved anvendelse av et spesifikt, primært, monoklonalt antistoff (Transduction Laboratories, UK) og alkalisk fosfatasemerke, sekundært antistoff (Jackson Labs), ble et spesifikt eNOS-proteinbånd visualisert og kvantifisert ved en kjemifluorescensdeteksjonsmetode.

30

35

Resultatene er vist i tabellen nedenfor.

Forbindelse fra eksempel nr.	EC ₅₀ (μM)
1	0,079
2	1,1
3	14
4	3,4
5	3,3
6	12
7	23
8	30
9	0,93
10	0,80
11	0,064
12	11
13	0,62
14	2,4
15	3,1
16	0,20
17	0,35
18	3,3
19	20
20	9,8
21	4,8
22	1,6
23	0,80
24	125
25	18
26	1,5
27	< 0,1
28	0,76
29	2,3
30	11
31	3,3

Effekten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også undersøkes i følgende dyre-modeller (dyreforsøk ble utført i henhold til den tyske dyrebeskyttelsesloven og retningslinjene for anvendelsen av forsøksdyr som i Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Institutes of Health).

5

Dyr og behandlinger (forsøk A-C)

Mus med ApoE- og eNOS-underskudd (C57BL/6J bakgrunn, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me) ble anvendt. Alle dyr var 10 til 12 uker gamle og veide 22 til 28 g. Tre dager før kirurgi ble musene delt i 4 grupper (apoE-kontroll, n = 10 til 12; apoE med forsøksforbindelser, n = 10 til 12; eNOS-kontroll, n = 10 til 12; eNOS med forsøksforbindelser, n = 10 til 12) og mottok enten et standard gnagerfôr (inneholdende 4 % fett og 0,001 % kolesterol; i det følgende betegnet som placebogruppe) eller et standard gnagerfôr + forsøksforbindelse (10 eller 30 mg/kg/d p.o.).

A. Antihypertensiv effekt i ApoE "knockout" mus

Blodtrykk ble bestemt i bevisste mus ved å anvende et datamaskinstyrt hale-mansjett-system (Visitech Systems, Apex, Nc). Etter behandling av mus med ApoE-underskudd og mus med eNOS-underskudd med forsøksforbindelsene ble blodtrykket sammenlignet med resultatene oppnådd med placebogruppen.

20

B. Inhibering av neointima-dannelse og aterogenese (femoral arteriemansjett)

Etter 3 dagers behandling av mus med ApoE-underskudd med den respektive forbindelsen (10 mg/kg/dag presset i fôr), ble dyrene bedøvd med en intraperitoneal injeksjon av pentobarbital (60 mg/kg), etterfulgt av en intramuskulær injeksjon av xylazin (2 mg/kg) og en mansjett plasseres rundt femoralarterien som beskrevet i Moroi et al. (J. Clin. Invest. 101 (1998), 1225). Kort uttrykt ble den venstre femoralarterien skåret fri. En ikke-okklusiv 2,0 mm polyetylenmansjett fremstilt av PE-50-rør (innerdiameter 0,56 mm, ytterdiameter 0,965 mm, Becton Dickinson, Mountain View, Ca), plasseres rundt arterien og bindes på plass med to 7-0 suturer. Den høyre femoralarterien isoleres fra det omgivende vevet, men det plasseres ingen mansjett. Behandlingen med den respektive forbindelsen fortsetter i 14 dager etter kirurgi. Deretter avlives dyrene. Aorta tas for bestemmelse av vaskulær eNOS-ekspresjon ved kvantitativ western-blotting. Begge femoralarterier høstes, fikseres i formalin og innstøpes i parafin. 20 tverrsnitt (10 µm) kuttes fra delen med mansjett av venstre femoralarterie og fra det tilsvarende segmentet av høyre arterie. Seksjoner underkastes standard hematoksylin- og eosinfarging. Morfometriske analyser utføres ved å anvende et bildeanalysedatamaskin-program (LeicaQWin, Leica Imaging Systems, Cambridge, GB). For hvert tverrsnitt

35

bestemmes arealet av lumen, neointima og media. For dette formålet defineres neointima som arealet mellom lumen og det indre elastiske lamina og media defineres som arealet mellom det indre og eksterne, elastiske lamina. Forholdet mellom arealet av neointima og arealet av media, uttrykkes som neointima/mediaforholdet. Resultatene oppnådd i forbindelsesgruppen sammenlignes med de oppnådd i placebogruppen.

C. Forebyggelse av aterosklerotisk plakkdannelse ved kronisk behandling

Mus med ApoE-underskudd behandles i 16 uker med den respektive forbindelsen presset i fôr og avlives deretter. Aortaer fjernes fra hver mus, fikseres i formalin og innstøpes i parafin. Plakkdannelse måles ved hjelp av lipidlesjonsdannelse i aortaer (fra aortisk bue til diafragma) og analyseres ved oljerød O-farging. For å kvantifisere effekten av den respektive forbindelsen på vaskulær eNOS-ekspresjon, anvendes femoralarteriene i dette forsøket. Resultatene oppnådd i forbindelsesgruppen sammenlignes med de oppnådd i placebogruppen.

D. Forbedring av koronarfunksjon i døde mus med ApoE-underskudd

Gamle villtype C57BL/6J-hannmus (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) og mus med apoE-underskudd (C57BL/6J-bakgrunn, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me), 6 måneder gamle og med vekt 28 til 36 g, anvendes i forsøkene. Mus deles i tre grupper (C57BL/6, n = 8; apoE-kontroll, n = 8; apoE med respektiv forbindelse, n = 8) og mottar i 8 uker enten en standard gnagerdiett (inneholdende 4 % fett og 0,001 % kolesterol) eller en standard gnagerdiett + respektiv forbindelse (30 mg/kg/d p.o.). Mus bedøves med natriumpentobarbiton (100 mg/kg i.p.) og hjertene skjæres raskt ut og plasseres i iskald perfusjonsbuffer. Aorta kanyleres og forbindes til et perfusjonsapparat (Hugo Sachs Electronics, Freiburg, Tyskland) som startes umiddelbart ved et konstant perfusjonstrykk på 60 mm Hg. Dyrene perfunderes på en tilbakevirkende (retrograde) måte med modifisert Krebs bikarbonatbuffer, ekvilibrert med 95 % O₂ og 5 % CO₂ og holdt ved 37,5 °C.

Et skrånet, lite rør (PE 50) føres gjennom en pulmonar vene inn i den venstre ventrikelen og trekkes gjennom ventrikulærveggen, forankres i apex ved hjelp av en riflet ende og forbindes til et tupp-mikromanometer (Millar 1,4 French). Det venstre atrium kanyleres gjennom den samme pulmonarvenen og hjertet kobles til arbeidsmodus med et konstant forbelastningstrykk på 10 mm Hg og et etterbelastningstrykk på 60 mm Hg. Aortisk utstrømning og arteriell innstrømning måles kontinuerlig ved å anvende ultralydstrømningsprober (HSE/Transonic Systems Inc.). Koronar strøm regnes som forskjellen mellom atriell strøm og aortisk strøm. Alle hemodynamiske data digitaliseres

ved en prøvetagningsrate på 100 Hz og registreres med en PC ved anvendelse av spesialisert software (HEM, Notocord).

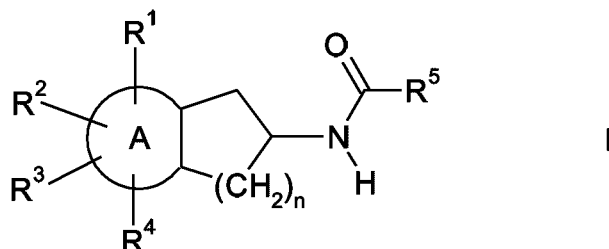
- 5 Hjerter tillates å stabilisere i 30 min. Alle funksjonelle, hemodynamiske data måles under stasjonær tilstand og under volum- og trykkbelastning. Venstre ventrikulære funksjonskurver konstrueres ved varierende forbelastningstrykk. For opptak av forbelastningskurver innstilles etterbelastning ved 60 mm Hg og forbelastning justeres i 5 mm Hg trinn over et område på 5 til 25 mm Hg. Hjerter tillates å stabilisere ved basislinjebetingelser mellom trykk- og volumbelastning.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d formel I

5



i en hvilken som helst av de stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I:

10

ringen A som omfatter de to karbonatomene som er felles for ringen A og sykloalkenylringen i formel I, er en pyridin- eller tiofenring;

15 R¹ og R⁴ er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C₁-C₄-alkyl, og halogen;

R² og R³ er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C₁-C₄-alkyl og halogen;

20 hvor, dersom A er en pyridinring, 3 av gruppene R¹, R², R³ og R⁴ er til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen, og dersom A er en tiofenring, er 2 av gruppene R¹, R², R³ og R⁴ til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen;

25 R⁵ er en gruppe Ar eller en gruppe Hetar som begge er usubstituerte eller bærer én eller flere like eller forskjellige substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen; -CN; NH₂; usubstituert og minst monosubstituert C₁-C₁₀-alkyl, C₁-C₁₀-alkoksy, hvis substituenten er valgt fra gruppen C₁-C₈-alkoksy; fenyl; CF₃; fenyl- C₁-C₄-alkyl; pyridyl- C₁-C₄-alkyl; C₁-C₆-alkylsulfonylamino og morfolinyl; hvor alle fenylholdige og
30 pyridylholdige grupper, som eventuelt er til stede i nevnte substituenten av nevnte gruppe Ar eller nevnte gruppe Hetar, kan være substituert med én eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen og C₁-C₃-alkyl;

gruppen Heta er pyridyl, benzimidazolyl, benzodioksolyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyrrolyl eller tiazolyl;

5

gruppen Ar er fenyl;

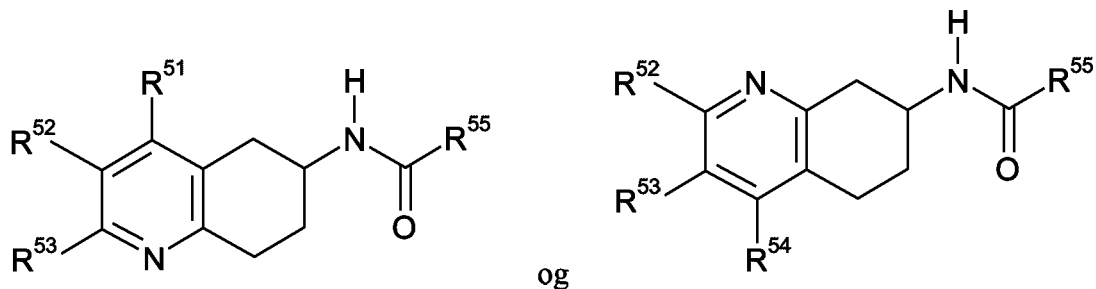
n er 1, 2 eller 3;

10

under den forutsetning at

forbindelsene av formelene

15



er utelukket, hvori R^{51} , R^{52} , R^{53} og R^{54} er valgt fra hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl og halogen, og R^{55} er usubstituert eller substituert fenyl eller pyrrolyl;

20

og forbindelsen N-(2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroksykinazolin-6-yl)-3,4-diklorbenzamid er utelukket.

2.

25 Forbindelse av formel I ifølge krav 1, i hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I ringen A er en pyridinring.

3.

30 Forbindelse av formel I ifølge krav 1, i hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I ringen A er en tiofenring.

4.

Forbindelse av formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 3, i en hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et
5 farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I tallet n er 1.

5.

Forbindelse av formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 3, i en hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et
10 farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I tallet n er 3.

6.

Forbindelse av formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 5, i en hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et
15 farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I restene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er H..

7.

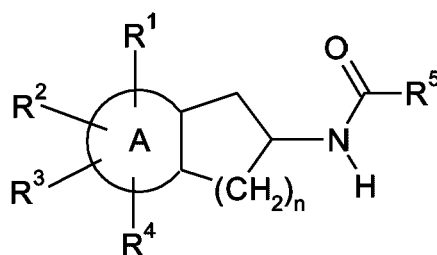
Forbindelse av formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 6, i en hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et
20 farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse som farmasøytisk middel.

8.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effektiv dose av minst én forbindelse av formel I som definert i ett eller flere av
25 kravene 1 til 6, i hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, og/eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav og en farmasøytisk akseptabel bærer.

9.

30 Anvendelse av en forbindelse av formel I



I

i hvilken som helst av dens stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori i formel I:

ringen A som omfatter de to karbonatomene som er felles for ringen A og sykloalkenyl-
 5 ringen i formel I, er en pyridin- eller tiofenring;

R^1 og R^4 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl, og halogen;

10 R^2 og R^3 er uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av H; C_1 - C_4 -alkyl og halogen;

hvor, dersom A er en pyridinring, 3 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen, og
 15 dersom A er en tiofenring, er 2 av gruppene R^1 , R^2 , R^3 og R^4 til stede og er bundet til karbonatomene i ringen A som ikke er delt med sykloalkenylringen;

R^5 er en gruppe Ar eller en gruppe Hetar som begge er usubstituerte eller bærer én eller flere like eller forskjellige substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen; -CN;
 20 NH_2 ; usubstituert og minst monosubstituert C_1 - C_{10} -alkyl, C_1 - C_{10} -alkoksy, hvis substituenten er valgt fra gruppen C_1 - C_8 -alkoksy; fenyl; CF_3 ; fenyl- C_1 - C_4 -alkyl; pyridyl- C_1 - C_4 -alkyl; C_1 - C_6 -alkylsulfonilamino og morfolinyl; hvor alle fenylholdige og pyridylholdige grupper, som eventuelt er til stede i nevnte substituenten av nevnte gruppe Ar eller nevnte gruppe Hetar, kan være substituert med én eller flere
 25 substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen og C_1 - C_3 -alkyl;

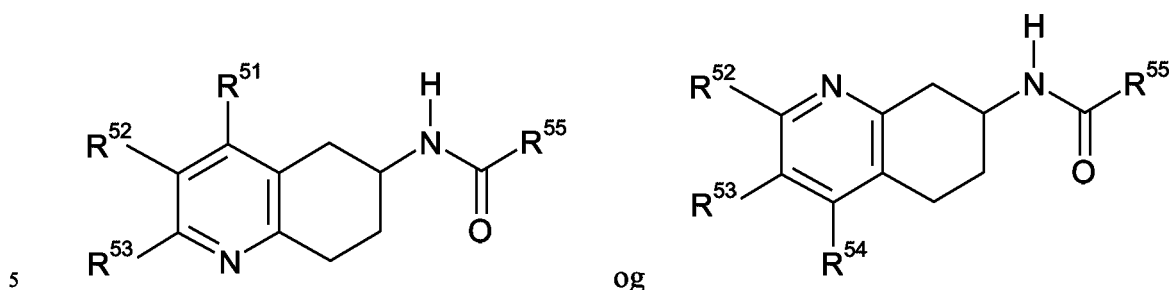
gruppen Hetar er pyridyl, benzimidazolyl, benzodioksolyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyrrolyl eller iazolyl;
 30

gruppen Ar er fenyl;

35 n er 1, 2 eller 3;

under den forutsetning at

forbindelsene av formlene



er utelukket, hvori R^{51} , R^{52} , R^{53} og R^{54} er valgt fra hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl og halogen, og R^{55} er usubstituert eller substituert fenyl eller pyrrolyl;

- 10 for fremstilling av et medikament for stimulering av ekspresjonen av endotelisk NO-syntase.

10.

- Anvendelse av en forbindelse av formel I ifølge krav 9, i hvilken som helst av dens
- 15 stereoisomere former eller en blanding derav i et hvilket som helst forhold, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et medikament for behandling av kardiovaskulære sykdommer, stabil eller ustabil angina pectoris, koronar hjertesykdom, Prinzmetallangina, akutt koronart syndrom, hjertesvikt, myokardialt infarkt, slag, trombose, perifer arterieokklusiv sykdom (PAOD), endotelisk dysfunksjon, aterosklerose,
- 20 restenose, endotel skade etter PTCA, hypertensjon, essensiell hypertensjon, pulmonar hypertensjon, sekundær hypertensjon, renovaskulær hypertensjon, kronisk glomerulonefritt, erektil dysfunksjon, ventrikulær arytmi, diabetes, diabeteskomplikasjoner, nefropati, retinopati, angiogenese, astma bronkiale, kronisk nyresvikt, cirrhose i leveren, osteoporose, begrenset hukommelsesytelse eller en begrenset læringsevne, eller for å
- 25 nedsette den kardiovaskulære faren for postmenopausale kvinner eller for kvinner som inntar kontraseptiver.