

**Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

② PATENTSCHRIFT A5

⑪

633 535

②1 Gesuchsnummer: 4153/77

③3 Inhaber:  
Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, Tokyo (JP)

②2 Anmeldungsdatum: 01.04.1977

②2 Erfinder:  
Hiroyuki Nagano, Iwatsuki-shi/Saitama (JP)  
Takashi Mori, Tama-shi/Tokyo (JP)  
Sakae Takaku, Ageo-shi/Saitama (JP)  
Isao Matsunaga, Nerima-ku/Tokyo (JP)  
Tatsuo Kujirai, Ohmiya-shi/Saitama (JP)  
Toshichika Ogasawara, Nakano-ku/Tokyo (JP)  
Shigeru Sugano, Musashino-shi/Tokyo (JP)  
Minoru Shindo, Nerima-ku/Tokyo (JP)

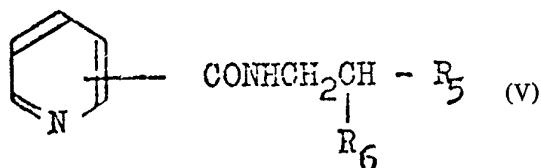
②4 Patent erteilt: 15.12.1982

④5 Patentschrift  
veröffentlicht: 15.12.1982

⑦4 Vertreter:  
E. Blum & Co., Zürich

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Pyridin-Derivaten.

⑤7 Es werden Pyridin-Derivate der Formel



worin

R<sub>5</sub> Wasserstoff, Niederalkyl, Hydroxyl oder eine Gruppierung -ONO<sub>2</sub> und

R<sub>6</sub> Hydroxyl, eine Gruppierung -CH<sub>2</sub>OH, -ONO<sub>2</sub> oder -CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub> bedeuten,

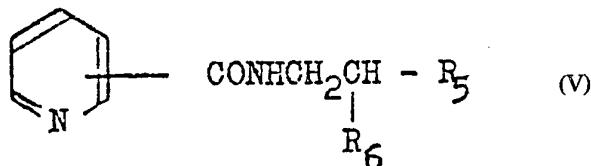
beziehungsweise Salze dieser Verbindungen hergestellt.

Diese Verbindungen werden erhalten, indem man Nicotinsäure oder ein reaktionsfähiges Derivat davon mit einem entsprechenden Amin oder einem reaktiven Derivat des Amins umsetzt.

Die erhaltenen Verbindungen können zur Behandlung von Kreislaufkrankheiten verwendet werden.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der folgenden Formel V



in welcher

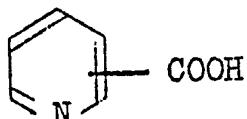
$\text{R}_5$  ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe, eine Hydroxygruppe oder eine Gruppierung der Formel  $-\text{ONO}_2$  ist, und

$\text{R}_6$  eine Hydroxygruppe, eine Gruppierung der Formel

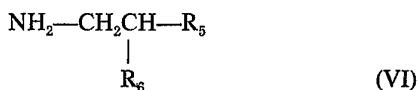
$-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{ONO}_2$  oder  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$

ist,

bzw. ein Salz dieser Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Säure der Formel II



oder ein reaktives Derivat dieser Säure mit einem Amin der Formel VI



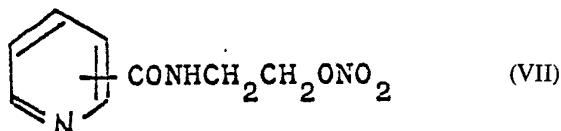
worin

$\text{R}_5$  und  $\text{R}_6$  die oben angegebene Bedeutung besitzen, oder einem reaktiven Derivat dieses Amins umsetzt, und die erhaltenen Verbindungen der Formel V in freier Form oder in Form von deren Salzen isoliert.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel V herstellt, in welcher  $\text{R}_5$  ein Wasserstoffatom, ein niederer Alkylrest oder ein Rest der Formel  $-\text{ONO}_2$  ist, und  $\text{R}_6$  eine Gruppierung der Formel  $-\text{NO}_2$  oder  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$  bedeutet.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel V herstellt, in welcher  $\text{R}_5$  ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe oder eine Hydroxygruppe ist, und  $\text{R}_6$  eine Hydroxygruppe oder eine Gruppierung der Formel  $-\text{CH}_2\text{OOH}$  bedeutet, und diese Verbindung mit einem nitrierenden Mittel umsetzt, wobei man eine Verbindung der Formel V erhält, in welcher  $\text{R}_5$  ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe oder eine Gruppierung der Formel  $-\text{ONO}_2$  ist, und  $\text{R}_6$  eine Gruppierung der Formel  $-\text{NO}_2$  oder  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$  bedeutet, und die erhaltene Verbindung der Formel V in freier Form oder in Form von deren Salz isoliert.

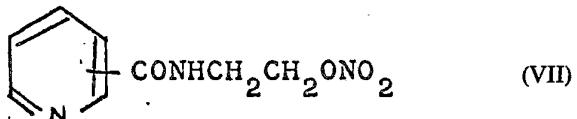
4. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die hergestellte Verbindung der Formel V die folgende Formel VII



aufweist oder ein Salz dieser Verbindung ist.

5. Verfahren nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man den Salpetersäureester des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides herstellt.

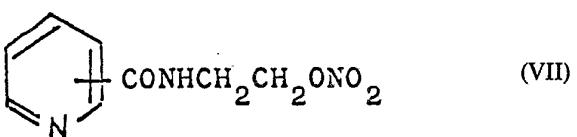
6. Verfahren nach Patentanspruch 1 zur Herstellung einer Verbindung der Formel VII



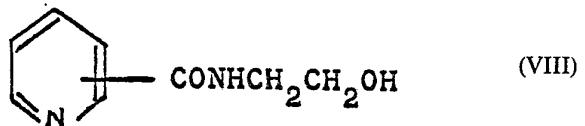
und deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Säure der Formel II oder ein reaktives Derivat dieser Carbonsäure mit dem Salpetersäureester des Monoäthanolamides oder einem reaktiven Derivat dieses Amides umsetzt.

7. Verfahren nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Verbindung der Formel VII den Salpetersäureester des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides herstellt.

8. Verfahren nach Patentanspruch 1 zur Herstellung einer Verbindung der folgenden Formel VII



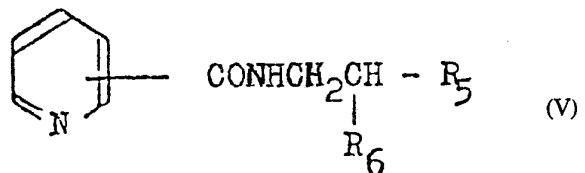
(II) bzw. von Salzen dieser Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass man eine erhaltene Verbindung der Formel VIII



mit einem nitrierenden Mittel umsetzt.

9. Verfahren nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hergestellte Verbindung der Formel VII der Salpetersäureester des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides ist.

40 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Pyridin-Derivaten der allgemeinen Formel V



50 in welcher

$\text{R}_5$  ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe, eine Hydroxylgruppe oder eine Gruppierung der Formel  $-\text{ONO}_2$  ist, und

$\text{R}_6$  eine Hydroxylgruppe, eine Gruppierung der Formel

$-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{ONO}_2$  oder  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$

ist, beziehungsweise von Salzen dieser Verbindungen.

60 Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbaren Verbindungen der Formel V können in pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Kreislaufkrankheiten verwendet werden.

Einige Nikotinsäure-Derivate oder Nikotinsäureamid-Deivate wurden bereits in der Literatur beschrieben und es sei in diesem Zusammenhang auf die japanische Patent-Beschreibung Nr. 1624/1976, sowie die U.S.A.-Patentschriften Nr. 3 092 634 und 3 168 438 hingewiesen und ferner auf die

Veröffentlichung in «Mie Medical Journal», Band 16(3), Seiten 207-211, (1967).

In der erwähnten japanischen Patent-Beschreibung wird gesagt, dass Nikotinsäureester-Derivate hergestellt werden können, indem man 1-Nicotinyl-glycerin oder 1-Nicotinyl-2,3-isopropyliden-glycerin mit rauchender Salpetersäure umsetzt, wobei man das 1-Nicotinyl-glycerin-2,3-dinitrat erhält. Diese Verbindung wird dann in die Dioxan-Additionsverbindung umgewandelt, welche eine Wirkung als Mittel zur Erweiterung der Herzkrankgefässe, also eine corona-vasodilatorische Wirksamkeit, besitzt.

In den U.S.A.-Patentschriften Nr. 3 092 634 u. 3 168 438 werden die Bis-salpetersäureester des N,N-Bis-( $\beta$ -hydroxy-äthyl)nicotinamides beschrieben, welches eine corona-vasodilatorische Wirksamkeit besitzt, wobei die Herstellung des erwünschten Produktes so erfolgt, dass man die Salpetersäureester von Diäthanolamin mit Nikotinsäurechlorid umsetzt.

Diejenigen Verbindungen, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, haben jedoch nur eine kurzzeitige Wirksamkeit und einen nachteiligen Einfluss auf den Blutdruck und die Funktion des Herzens, so dass diese Verbindungen nicht geeignet sind, um als Arzneimittel zur Anregung des Kreislaufsystems zu dienen, beispielsweise als Stimulanz für das Kreislaufsystem im Fall einer ischämischen Herzkrankheit, also einer Herzkrankheit mit Blutleere in einzelnen Organteilen infolge von mangelnder Blutzufuhr.

Ziel der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung eines neuen Mittels, das zur Bekämpfung der erwähnten Krankheitsarten eingesetzt werden kann.

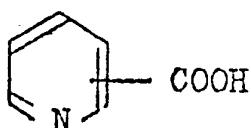
In der Veröffentlichung im «Mie Medical Journal», Band 16(3), Seiten 207-211, (1967), wird das 2-Nicotinamido-äthanol erwähnt. Diese Verbindung wird jedoch nur als Testverbindung für ihre Antitumor-Eigenschaften erwähnt, und in der genannten Veröffentlichung wird ferner gesagt, dass die genannte Verbindung keine bemerkenswerte pharmakologische Wirksamkeit besitzt.

Bei der Entwicklung der genannten neuen Verbindungen wurde lange Zeit getestet, bis schliesslich die Verbindungen der Formel V erhalten werden konnten, die sich als geeignete Verbindungen zur Behandlung von Krankheiten des Kreislaufsystems herausgestellt haben.

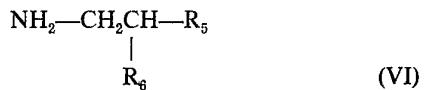
Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren herstellbaren Verbindungen der Formel V und die Salze der Verbindungen der Formel V können in pharmazeutischen Zusammensetzungen als Wirkstoffe verwendet werden.

Die Verbindungen der Formel V und deren Salze sind neu, und sie besitzen verbesserte Wirksamkeit bei der Behandlung von Krankheiten des Kreislaufsystems. Die genannten Verbindungen und deren Salze haben eine corona-vasodilatorische Wirksamkeit, eine blutdrucksenkende Wirksamkeit (Antihypertensions-Eigenschaften), der Koagulation entgegenwirkende Eigenschaften (anticoagulative Eigenschaften), und antiarrhythmische Eigenschaften. Ferner wirken die Verbindungen der Formel V blutgefäßweiternd auf die peripheren Blutgefäße (periphere Vasodilatation), und zwar einschliesslich einer cerebralen Gefässerweiterung und einer Nierengefässerweiterung (renale Vasodilatation).

Das erfindungsgemäss Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Säure der Formel II



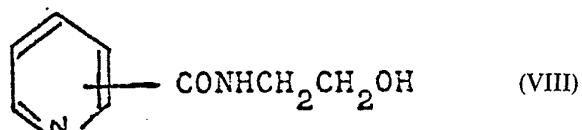
oder ein reaktives Derivat dieser Säure mit einem Amin der Formel VI



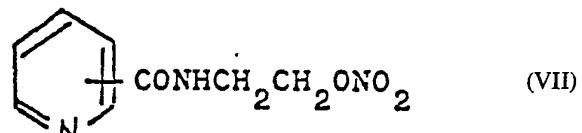
worin

$\text{R}_5$  und  $\text{R}_6$  die oben angegebene Bedeutung besitzen, oder einem reaktiven Derivat dieses Amins umgesetzt, und die erhaltenen Verbindungen der Formel V in freier Form oder in Form von deren Salzen isoliert.

Erfindungsgemäss erhaltene Verbindungen der Formel VIII



können mit einem nitrierenden Mittel umgesetzt werden, wo bei man Verbindungen der folgenden Formel



erhält.

Als Beispiele für funktionelle Derivate der Säuren der Formel II seien genannt: Säurehalogenide, Säureanhydride, aktive Säureamide, aktive Ester und ähnliche. Die aktiven Derivate, die im allgemeinen eingesetzt werden, sind Säurechloride, Säureazide, Säureanhydride, beispielsweise die Anhydrid-Derivate aus 2 Molen der Verbindung der Formel II oder die Anhydride aus einem Mol der Verbindung der Formel II mit einem Mol einer anderen Säure, wie zum Beispiel Dialkylphosphorsäure, Phenylphosphorsäure, Diphenylphosphorsäure, Benzylphosphorsäure, halogenierte Phosphorsäuren, Dialkylphosphorsäure, Schwefel enthaltende Säuren, wie schwefelige Säure, Thioschwefelsäure und Schwefelsäure, Alkylcarbonsäuren, Fettsäuren, wie zum Beispiel Pivalinsäure, Pentansäure, Isopentansäure, 2-Äthylbutansäure, Trichloressigsäure, aromatische Carbonsäuren wie zum Beispiel Benzoësäure. Als Beispiele für reaktive Amide der Säuren der Formel II seien die Amide mit Imidazol, mit in der 4-Stellung substituiertem Imidazol, mit Dimethylpyrazol, mit Triazol oder Tetrazol genannt. Als Beispiele für aktive Ester der Säuren der Formel II seien die Cyanomethylester, die 4-Nitrophenyl-ester, 2,4-Dinitrophenyl-ester, Trichlorphenyl-ester, Pentachlorphenyl-ester, Methansulfonylphenyl-ester, Phenylazophenyl-ester, Phenylthio-ester, 4-Nitrophe-nylthio-ester, p-Cresylthio-ester, Carboxymethylthio-ester, Pyranyl-ester, Pyridyl-ester, 8-Chinolylthio-ester sowie Ester mit N,N-Dimethylhydroxylamin, 1-Hydroxyl-2-(1H)-pyridon, N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid genannt.

Die als Ausgangsmaterial verwendeten Amine der Formel VI können in einer an der Aminogruppe aktivierten Form eingesetzt werden, wobei diese Aktivierung beispielsweise durch Verwendung von Phosphortrichlorid, durch Äthyl-chlorophosphit, Methyl-chlorophosphit oder ähnliche Verbindungen erfolgen kann.

Wenn man bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens die Verbindungen der Formel V nach dem oben beschriebenen Verfahren herstellt, dann kann dieses Verfahren so ausgeführt werden, dass man beispielsweise ein reaktives Derivat der Carbonsäure der Formel II mit einem Amin kondensiert, wobei diese Kondensationsreaktion bei einer Temperatur im Bereich von  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $+50^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wird, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich

von 0-10°C und im allgemeinen wird für die Umsetzung eine Reaktionszeit von  $\frac{1}{2}$  bis 4 Stunden benötigt. Bei der Umsetzung können Lösungsmittel anwesend sein, wie zum Beispiel Wasser, Benzol, Toluol, Tetrahydrofuran, Diäthyläther, Dioxan, Dimethylformamid, Chloroform, Methylenchlorid, Essigsäurenitril, Aceton, Tetrachlorkohlenstoff, Essigsäureäthylester und ähnliche. Ferner kann für die Kondensationsreaktion ein Beschleunigungsmittel verwendet werden, wie zum Beispiel eine anorganische basische Substanz, beispielsweise ein Hydroxyd, ein Carbonat oder ein Acetat der Alkalimetalle oder der Erdalkalimetalle, und als Beispiel für derartige Verbindungen seien Natriumacetat, Natriumcarbonat, Kaliumacetat, Kaliumcarbonat, Natriumhydroxyd, Calciumacetat und Calciumcarbonat genannt. Ferner kann jedoch die Umsetzung auch in Anwesenheit eines Amins als Beschleunigungsmittel durchgeführt werden, und als Beispiele für derartige Amine seien Pyridin, Triäthylamin, Dimethylanilin, Picolin und ähnliche Amine genannt.

Die Kondensationsreaktion der Säuren der Formel II mit den Aminen der Formel VI kann auch durchgeführt werden, indem man ein Amin der Formel VI verwendet, das an der Aminogruppe aktiviert wurde, beispielsweise mit Phosphor-trichlorid, Äthyl-chlorophosphit, Methyl-chlorophosphit oder ähnlichem. In diesem Fall wird die Reaktion im allgemeinen bei Zimmertemperatur bis zur Rückflusstemperatur eines gegebenenfalls anwesenden Lösungsmittels durchgeführt, und man wendet im allgemeinen Umsetzungszeiten im Bereich von  $\frac{1}{2}$  Std. bis 3 Stunden an. Das Lösungsmittel, das zur Durchführung dieser Umsetzung verwendet werden kann, ist vorzugsweise ein neutrales Lösungsmittel, wie zum Beispiel Benzol, Toluol, Xylol, Dioxan oder Tetrahydrofuran oder auch ein basisches Lösungsmittel, wie zum Beispiel Pyridin, Triäthylamin, Dimethylamin, Dimethylanilin oder Picolin. Falls man z.B. ein neutrales Lösungsmittel verwendet, ist es vorzuziehen eine Aminoverbindung zuzusetzen wie zum Beispiel Pyridin, Triäthylamin, Dimethylanilin, Picolin oder eine ähnliche derartige Verbindung.

Gemäß einer anderen Ausführungsart des erfindungsgemäßen Verfahrens können die Verbindungen der Formel II mit den Verbindungen der Formel VI in einem inertem Lösungsmittel in Anwesenheit eines die Bildung einer Amidbindung beschleunigenden Mittels, wie zum Beispiel einer Imidverbindung, eines Imines, eines Phosphates oder Phosphites, durchgeführt werden. Als zu diesem Zweck verwendbare Imidverbindungen seien N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-Cyclohexyl-N'-morpholino-äthylcarbodiimid, N,N'-Diäthyl-carbodiimid oder ähnliche Verbindungen genannt. Als Beispiele für verwendbare Iminverbindungen seien Diphenylketen-N-cyclohexylimin, Pentamethylketen-N-cyclohexylimin oder ähnliche Verbindungen genannt. Beispiele für einsetzbare Phosphate oder Phosphite sind Triäthylphosphit, Äthyl-polyphosphat, Isopropyl-polyphosphat oder ähnliche Verbindungen. In diesem Fall wird die Reaktion im allgemeinen bei Zimmertemperatur bis zu einer Temperatur, die bei der Rückflusstemperatur des gegebenenfalls anwesenden Lösungsmittels liegt, durchgeführt, und man lässt im allgemeinen die Reaktion während 1-5 Stunden ablaufen. Als Beispiel für ein inertes Lösungsmittel, das zu diesem Zweck verwendet werden kann, seien Benzol, Toluol, Tetrahydrofuran, Chloroform, Dioxan, Essigsäurenitril und Dimethylformamid genannt.

Bei der weiter oben beschriebenen Zusatzreaktion kann man erfindungsgemäß erhaltene Verbindungen der Formel VIII mit einem nitratierenden Mittel, beispielsweise in einem inertem Lösungsmittel, umsetzen, und zwar vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von -5°C bis Zimmertemperatur. Die Umsetzung dauert im allgemeinen 1 bis 3 Stunden.

Als nitratierendes Mittel, das auch in der Folge nitrierendes Mittel genannt wird, wird im allgemeinen zur Durchführung dieser Reaktion rauchende Salpetersäure, Nitrylchlorid ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) oder ähnliches verwendet.

5 Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen der Formeln V und VII können in Form von Additionssalzen mit organischen Säuren oder anorganischen Säuren isoliert werden, beispielsweise in Form der Hydrochloride, der Nitraten, der Oxalate, der Paratoluolsulfonate, der Salze der 10 Apfelsäure (Maleate) oder in ähnlicher Form.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pyridin-Derivate können in üblicher Weise unter Erzeugung von pharmazeutischen Verabreichungsformen formuliert werden. Beispielsweise können sie zur Herstellung von 15 Tabletten, Granulaten, Pulvern, Kapseln, Suspensionen und für die parenterale Injektion geeigneten Präparaten, sowie zur Herstellung von Suppositorien oder ähnlichen Verabreichungsformen verwendet werden. Wenn man Tabletten, Pulver, Pillen, Granulate oder Kapseln, die mit Pulvern oder 20 Granulaten gefüllt sind, herstellen will, dann können die genannten Verbindungen mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterialien oder Verdünnungsmitteln vermischt werden, wie zum Beispiel mit Lactose, Stärke, Mannit, Kaolin, kristalliner Cellulose, Kalk, Calciumcarbonat, Magnesiumstearat oder ähnlichen Verbindungen. Wenn man weiche Kapseln herstellen will, die mit einem flüssigen Präparat gefüllt sind, dann können die neuen Verbindungen in einem geeigneten flüssigen Verbindungsmittel, beispielsweise einem Öl, gelöst oder dispergiert werden. Die 25 erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen können auch in Gummiarabikum oder einer wässrigen Saccharoselösung suspendiert werden und der pH-Wert entsprechend eingestellt werden. Ferner ist es möglich, die genannten Verbindungen oder deren Salze mit Mannit zu vermischen und ein 30 zur parenteralen Injektion geeignetes Präparat herzustellen.

Die erfindungsgemäß hergestellten Pyridin-Derivate können in beliebiger Form in einer pharmazeutischen Zusammensetzung anwesend sein, und zwar in einer Menge, die ausreichend ist, damit die gewünschte Wirkung bei der Behandlung oder Verhütung von Kreislaufkrankheiten erzielt wird, wobei jedoch die Dosis nicht so gross sein soll, dass irgendwelche nachteilige Wirkungen bei der Verabreichung des Mittels auftreten. Eine Dosierungseinheit, beispielsweise 40 in Form einer Tablette oder Kapsel, wird im allgemeinen 5-20 mg des aktiven Bestandteiles enthalten, wenn die fragile Verbindung oral verabreicht werden soll. Wenn jedoch die Verbindung parenteral injiziert werden soll, dann kann eine Einheitsdosierung in einer zur Injektion geeigneten Phiole, beispielsweise 1-10 mg der Verbindung der Formel I oder 45 deren Salzes enthalten.

Für den Fachmann ist es klar, dass die tatsächliche Dosierung natürlich variieren wird, und zwar beispielsweise in Abhängigkeit von dem Zustand des einzelnen Patienten, und 50 deshalb soll sie für jeden einzelnen Fall bei Verwendung festgelegt werden. Bezogen auf die aktive Verbindung ist es jedoch im allgemeinen sicher und günstig, wenn Dosierungseinheiten an aktiver Verbindung im Bereich von 10-100 mg, vorzugsweise 10-60 mg pro Tag an einen Erwachsenen verabreicht werden, wenn die Verabreichung oral erfolgt, und üblicherweise werden 1-100 mg, und vorzugsweise 1-50 mg pro Tag an einen Erwachsenen verabreicht, wenn die Verabreichung parenteral erfolgt.

In Fig. 1 wird der Pronzentsatz des Ansteigens des Blutflusses in den Corona-Gefäßen angegeben, wenn eine nach 55 dem Verfahren gemäß Beispiel (1) hergestellte Verbindung und wenn Nitroglycerin intravenös nach dem Versuch 1 verabreicht wird. Dabei betreffen in Fig. 1 die strichlierten Fel-

der Nitroglycerin, während die unausgefüllten Felder die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren hergestellte Verbindung veranschaulichen. Ferner ist in Fig. 1 auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Körpergewicht des lebenden Tieres aufgetragen, und auf der Ordinate die Prozente der maximalen Änderung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen für jede verabreichte Menge.

In Fig. 2 ist die Dauer des Anstieges des Blutflusses in den Corona-Gefäßen veranschaulicht, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung, bzw. wenn Nitroglycerin intravenös nach dem Versuch 1 verabreicht wird. Dabei ist auf der Abszisse wieder die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Lebendgewicht aufgetragen, und auf der Ordinate die Zeitdauer in Minuten. Auch in diesem Fall veranschaulichen die strichlierten Felder Nitroglycerin, während die unausgefüllten Felder die erfundungsgemäss hergestellte Verbindung betreffen.

In Fig. 3 ist die Änderung der Spannung in der linken Herzkammer, also die Änderung der linken Ventrikulartension, veranschaulicht, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung, bzw. Nitroglycerin intravenös nach dem im Beispiel 1 beschriebenen Verfahren verabreicht wird. In diesem Fall ist wiederum auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Körpergewicht aufgetragen, und auf der Ordinate der Prozentsatz der Änderung in Prozent. Auch in diesem Fall bedeuten die schraffierten Felder Nitroglycerin, während die unausgefüllten Felder für die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung stehen.

In Fig. 4 ist die Änderung der Geschwindigkeit des Herzschlages veranschaulicht, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung, bzw. wenn Nitroglycerin nach dem in Versuch 1 angegebenen Verfahren intravenös verabreicht wird. Auch in diesem Fall ist wiederum auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Lebendkörpergewicht angegeben, und auf der Ordinate der Prozentsatz der Änderung.

In den Figuren 5, 6 und 7 wird die Änderung des Elektrokardiogrammes angeführt, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung intravenös verabreicht wird. Dabei ist in den Figuren 5-7 jeweils auf der Ordinate der Prozentsatz der Änderung angegeben, und auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Körpergewicht der Verbindung. In Fig. 5 ist die Änderung bezüglich des PP-Intervall, in Fig. 6 die Änderung bezüglich des PQ-Intervall und in Fig. 7 die Änderung bezüglich des QTc-Intervall angegeben.

In Fig. 8 ist die Änderung des systemischen Blutdruckes angegeben, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung, bzw. wenn Nitroglycerin intravenös verabreicht wird, und zwar nach dem Versuch 1. Auch in diesem Fall ist auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Lebendkörpergewicht angegeben, und auf der Ordinate der Prozentsatz der Änderung. Auch in diesem Fall betreffen die schraffierten Felder Nitroglycerin, und die unausgefüllten Felder die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung.

In den Figuren 9 und 10 wird die Änderung des systemischen Blutdruckes veranschaulicht, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung intravenös nach dem Versuch 1 verabreicht wird. Dabei ist sowohl in Fig. 9 als auch in Fig. 10 auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Lebendkörpergewicht aufgetragen. In Fig. 9 ist auf der Ordinate der maximale Prozentsatz der Änderung aufgetragen, und in Fig. 10 ist auf der Ordinate die Dauer in Minuten aufgetragen.

Die Figuren 11 und 12 veranschaulichen die Änderung im Blutfluss in der Aorta, wenn die nach dem Verfahren ge-

mäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung intravenös verabreicht wird. Dabei ist wieder in den Figuren 11 und 12 auf der Abszisse die Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro Kilogramm Lebendkörpergewicht aufgetragen, und in Fig. 11 ist auf der Ordinate der maximale Prozentsatz der Änderung angegeben, während in Fig. 12 auf der Ordinate die Dauer in Minuten aufgetragen ist.

In Fig. 13 wird eine Testkarte veranschaulicht, die die Wirkung der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung auf die Blutplättchen-Coagulation veranschaulicht, und zwar auf die Blutplättchen-Coagulation die durch Adenosin-Diphosphat nach dem in Versuch 7 beschriebenen Verfahren hervorgerufen wird. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten aufgetragen.

In Fig. 14 ist eine Testkarte veranschaulicht, die den Einfluss von nach dem erfundungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen auf die Blutplättchen-Coagulation veranschaulicht, wobei die Blutplättchen-Coagulation durch Collagen nach dem in Versuch 7 beschriebenen Verfahren verursacht wurde.

### Versuch 1

Die akute Toxizität, ausgedrückt in  $\text{LD}_{50}$ , der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 2 hergestellten Verbindung wurde bestimmt, indem man einen SD-Stamm an männlichen und weiblichen, 4 Wochen alten Ratten verwendete, und an diese wurde oral, bzw. intravenös die fragliche Verbindung verabreicht. Der Wert der  $\text{LD}_{50}$  sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Ratten lag im Bereich von 1,200 bis 1,300 mg/kg Körpergewicht für die orale Verabreichung, und im Bereich von 800-1,000 mg/kg Körpergewicht für die intravenöse Verabreichung.

### Versuch 2

Erwachsene Bastard-Hunde, die durch intravenöse Verabreichung von 30-40 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium anästhesiert worden waren, wurden der Thoracotomie unter Sauerstoffbeatmung unter Verwendung eines Respirators nach Bird unterworfen, und dann wurden die verschiedenen physikalischen Erscheinungen in der folgenden Weise bestimmt:

1) Bestimmung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen, abgekürzt als CBF:

Ein elektromagnetischer Strömungsmesser wurde an den Circumflex-Zweig oder am Beginn eines vorhergehenden absteigenden Zweiges der linken Corona-Arterie befestigt.

2) Corona-Perfusionsdruck, abgekürzt als CBP:

Der feine Katheter, der mit einem Druck-Übertragungssystem verbunden war, wurde in die distale Seite in den Circumflex-Zweig der linken Corona-Arterie des Versuchstieres eingeführt.

3) Bestimmung des Aorta-Blutflusses, abgekürzt als AoBF:

Ein elektromagnetischer Strömungsmesser wurde am Beginn der Aorta befestigt.

4) Bestimmung der linken Herzkamerspannung (Ventriculartension), die mit LVT abgekürzt wird:

Ein Dehnungsmeser wurde auf die Vorderwand der linken Ventricel aufgenäht.

5) Bestimmung des systemischen Blutdruckes, abgekürzt als SBP:

Ein Katheter, der mit einem Druck-Übertragungssystem verbunden war, wurde in die rechte Femoral-Arterie einge führt.

6) Bestimmung der Geschwindigkeit des Herzschlages, abgekürzt als HR:

Der Herzschlag wurde mit einem Cardiotachometer bestimmt, wobei man den Pulsdruck als Auslöseimpuls verwendete.

7) Bestimmung des Elektrokardiogrammes, abgekürzt als ECG:

Ein Elektrokardiogramm wurde aufgezeichnet, unter Anwendung eines einpolaren Leiters in der Cardialoberfläche, unter Verwendung von unterschiedlichen Elektroden-Paaren auf einem Teil der Vorderwand der linken Ventricel.

Zusätzlich zu den Tests 1-7, die oben beschrieben wurden, wurden noch einige getestete Tiere bezüglich des Blutflusses in den Nieren, abgekürzt als RBF, untersucht, und auch bezüglich des femoralen Blutflusses, abgekürzt als FBF. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, indem man einen elektromagnetischen Strömungsmesser an die linke Nierenarterie und die linke Femoralarterie anschloss.

Die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Testverbindung wurde in physiologischer Kochsalzlösung oder in destilliertem Wasser aufgelöst und intravenös oder oral oder sublingual verabreicht. Das Nitroglycerin wurde immer in der genau gleichen Weise verabreicht, wie die aktive Verbindung, und zwar erfolgte die Verabreichung des Nitroglycerines an einen Hund zu Vergleichszwecken, um einen Vergleich mit der nach dem Beispiel 1 hergestellten Verbindung zu erzielen.

*Beschreibung der Ergebnisse:*

(I) *Intravenöse Verabreichung*

a) Änderung im Corona-Blutfluss:

Der diastolische Corona-Fluss begann 10 bis 20 Sekunden nach der intravenösen Verabreichung der Testverbindung bei einer Dosierung von 10 µg der Verbindung pro Kilogramm Körpergewicht anzusteigen. Der systolische Corona-Blutfluss begann bei einer Dosierung von 250 µg/kg Körpergewicht oder noch höheren Dosierung anzusteigen, und zwar begleitet mit einem vorübergehenden Abfall gerade nach der Verabreichung. Der mittlere Corona-Fluss zeigte einen dauernden Anstieg nach der Verabreichung der Testverbindung.

Das ansteigende Ausmass des Corona-Flusses wird in den Figuren 1 und 2 veranschaulicht, und zwar in Fig. 1 anhand der maximalen prozentualen Änderung, und in Fig. 2 anhand der Dauer der Veränderung, und zwar jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Werten vor der Verabreichung.

Die Verabreichung der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung verursachte schon bei einem Dosierungsniveau von nur 10 µg/kg Körpergewicht, intravenös gegeben, einen wesentlichen Anstieg im Corona-Blutfluss, und bei einem Dosierungsniveau im Bereich von 500 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung war der Anstieg so bedeutend, dass er als reaktive Hyperämie zu erkennen war. Im zuletzt genannten Fall belief sich die Dauer des Anstieges des Corona-Flusses auf nahezu 3 Stunden. Die Wirksamkeit der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung war besser als diejenige von Nitroglycerin, insbesondere bezüglich der Dauer der Wirkung.

b) Änderung in der linken Ventricularspannung

Wie aus der Fig. 3 zu ersehen ist, nahm die linke Ventricularspannung nach einer intravenösen Verabreichung der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung in einer Dosierung von 50 µg/kg Körpergewicht oder einer noch höheren Dosierung leicht ab. Diese Abnahme war fast gleich derjenigen, die mit Nitroglycerin in den getesteten Dosierungsbereichen hervorgerufen wurde. Jedoch betrug die maximale prozentuelle Abnahme 33 % oder sogar noch

weniger bei einem Dosierungsniveau von 500 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung.

c) Änderung in der Geschwindigkeit des Herzschlages

- 5 Wie aus Fig. 4 zu ersehen ist, veränderte sich die Geschwindigkeit des Herzschlages beinahe nicht, wenn die Verabreichung der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung in einer Dosierung von bis zu 20 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung erfolgte. Im Gegensatz dazu riefen Dosierungen im Bereich von 50 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung oder höhere Dosierungen, eine leicht von der Dosierung abhängige Abnahme hervor, bis 17 % bei einem Dosierungsniveau von 500 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung erreicht waren. Im Gegensatz dazu verursachte die Verabreichung von Nitroglycerin in einem Dosierungsniveau von mehr als 10 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung ein Ansteigen der Herzgeschwindigkeit.

d) Änderung im Elektrokardiogramm

- 20 Wie aus den Figuren 5 und 7 zu ersehen ist, waren die PP und QTc-Intervalle verlängert, und zwar in Abhängigkeit von der Dosierung bei intravenöser Verabreichung der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung in einer Dosierung von mehr als 50 µg/kg Körpergewicht. 25 Im Gegensatz dazu zeigte das PQ-Intervall beinahe überhaupt keine Veränderung, wenn man die Verbindung in einer Dosierung bis zu 1000 µg/kg Körpergewicht intravenös verabreichte.

30 e) Veränderung im systemischen Blutdruck

- Wie aus den Figuren 8, 9 und 10 zu ersehen ist, trat beim systemischen Blutdruck ein bedeutendes, von der Dosierung abhängiges Abfallen auf, wenn man die getestete Verbindung intravenös in einer Dosierung von 50 µg/kg Körpergewicht oder einer höheren Dosierung verabreichte. Die Wirkung der Verbindung auf den Blutdruck war nicht stärker als diejenige des Nitroglycerins, jedoch war die Wirkungsdauer länger als diejenige, die mit Nitroglycerin erzielt wurde.

40 f) Veränderung im Blutfluss in der Aorta

- Wie aus den Figuren 11 und 12 zu ersehen ist, wies der Blutfluss in der Aorta einen leichten, von der Dosierung abhängigen Anstieg auf, wenn eine intravenöse Verabreichung der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung in einem Dosierungsniveau von 10 µg/kg Körpergewicht oder höheren Dosierungen erfolgte. Der prozentuelle Anstieg bei einem Dosierungsniveau von 500 µg/kg Körpergewicht bei intravenöser Verabreichung erreichte ein Maximum von 40 %, aber die Dauer war nicht so lang im Vergleich mit dem Ausmass des Anstieges beim coronaren Blutfluss.

50 g) Änderung im Blutfluss in der Niere (renaler Blutfluss) oder im femoralen Blutfluss

- Der renale Blutfluss und femorale Blutfluss waren bei einer intravenösen Verabreichung der Verbindung, die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellt wurde, in einem Dosierungsniveau von 100 bis 250 µg/kg Körpergewicht erhöht, und zwar trotz eines Abfalles des systemischen Blutdruckes bei der angegebenen Dosierung. Jedoch war der Anstieg in dem renalen Blutfluss und im femoralen Blutfluss geringer als derjenige im coronaren Blutfluss, und zwar sowohl bezüglich des Ausmasses als auch bezüglich der Dauer.

Aus den oben angegebenen Testergebnissen sieht man, dass die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen einen stärkeren Einfluss auf den coronaren Blutfluss ausübten, und zwar wesentlich stärker als Nitroglycerin, und ferner sieht man, dass sie einen Abfall im Blut-

druck, eine Abnahme bezüglich der Geschwindigkeit des Herzschlages und eine Verminderung der Kardialspannung bewirkten, welche nicht übermäßig hoch waren, selbst bei hohen Dosierungsniveaus.

Ausserdem zeigt die Tatsache, dass die erfindungsgemäss hergestellten Verbindungen die Durchführung einer Anregung des Herzens nicht stören, wie dies daraus zu ersehen ist, dass kein verlängertes PQ-Intervall des Elektrokardiogrammes festzustellen war, an, dass die erfindungsgemäss hergestellten Verbindungen sehr wertvolle Medikamente zur Behandlung von ischämischen Herzkrankheiten darstellen, also zu: Behandlung von solchen Herzkrankheiten, die zu einer Blutleere in Organen führen.

Die beschriebenen Verbindungen könnten auch als blutdrucksenkende Mittel oder als peripheren Gefässen erweiternde Mittel, also als periphere Vasodilatatoren Verwendung finden, weil sie eine lang andauernde und milde blutdrucksenkende Wirkung aufweisen und eine gefässerweiternde Wirkung auf die femoralen Blutgefässen und Nierenblutgefässen ausüben. Ausserdem haben sie einen sehr wünschenswerten Einfluss auf ein ischämisches Herz.

#### (II) Orale und sublinguale Verabreichung

Die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 2 hergestellte Verbindung wurde sublingual an Hunde in Form von einer Tablette verabreicht, die 1-10 mg der Verbindung enthielt. Etwa 2 Minuten nach der Verabreichung stieg der Coronafluss deutlich an. Die Verbindung zeigte in einem Dosierungsniveau von 10 mg fast keine Veränderung im systemischen Blutdruck, in der Kardialspannung und in dem Blutfluss durch die Aorta. Im Gegensatz dazu zeigte die sublinguale Verabreichung einer Tablette, die das Hydrochlorid der aktiven Verbindung enthielt, überhaupt keinen wesentlichen Anstieg im coronaren Fluss. Wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 oder Beispiel 2 hergestellte Verbindung entweder in freier Form oder in Form des Hydrochlorides intraduodenal verabreicht wird, und zwar in einem Dosierungsniveau von 50 µg/kg Körpergewicht oder einer höheren Dosierung, dann wird ein deutlicher lang anhaltender Anstieg im coronaren Fluss beobachtet.

Nach den Testresultaten sieht man, dass die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Produkte in verschiedenen Präparationen verwendet werden können, beispielsweise in solchen die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, oder in Form von Kapseln, Tabletten, Granulaten oder als Pulver für die orale Verabreichung oder für die sublinguale Verabreichung. Im Gegensatz dazu wird Nitroglycerin durch die Wände des Magen-Darmkanals nicht absorbiert und kann daher nur sublingual verabreicht werden.

#### Versuch 3

Erwachsene Bastard-Hunde, die durch eine intravenöse Verabreichung von 30-40 µg/kg Körpergewicht an Pentobarbital-Natrium anästhetisiert worden waren, wurden der Thoracotomie unter Sauerstoffbeatmung, unter Verwendung eines Respirators nach Bird unterworfen. Ein Katheter wurde über einen nahen Weg in einen Zweig eines Ursprungs der linken Corona-Arterie eingeführt, und es wurde ein Kontrastmittel, wie zum Beispiel «Conlaxin H» oder «Angioconrei», über diesen Katheter injiziert. Die morphologische Veränderung in der linken Corona-Arterie wurde gefilmt, indem man einen 35 mm Kinofilm vor und nach der Injektion der Verbindung verwendete. Aus der Analyse sieht man, dass die Corona-Arterie durch die intravenöse Verabreichung der erfindungsgemäss erhaltenen Verbindung in einem Dosierungsniveau von 100 µg/kg Körpergewicht oder bei höherer Dosierung wesentlich erweitert war.

#### Versuch 4

Dasselbe Präparat, wie es beim Versuch Nr. 2 verwendet wurde, wurde angewandt, indem man erwachsene Bastard-Hunde verwendete, die durch eine intravenöse Verabreichung von Pentobarbital-Natrium anästhetisiert wurden. Der linke vordere absteigende Zweig oder der Circumflex-Zweig der Corona-Arterie wurden mechanisch strikturiert, also mechanisch eingeengt oder mechanisch verschlossen, also mechanisch okkludiert, und zwar an der distalen Seite desjenigen Teiles, an dem der elektromagnetische Durchlassmesser angebracht wurde. Dies wurde vorgenommen, um ein experimentell hervorgerufenes Phänomen der Kardial-Ischemie hervorzurufen, und um dann die Wirksamkeit der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung gegenüber diesem Phänomen beobachten zu können.

Wenn die Absperzung unvollständig war, dann wurde der Coronafluss leicht verstärkt, wenn die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung intravenös in einer Dosierung von 100 µg/kg Körpergewicht oder einer niedrigen Dosierung verabreicht wurde, während eine leichte Abnahme des Coronaflusses auftrat, wenn die Verabreichung in einer Dosierung von mehr als 250 µg/kg Körpergewicht erfolgte. Nach der Verabreichung der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung war die ST-Elevation des Elektrokardiogrammes in dem kardial-ischemischen Teil wesentlich verbessert, und gleichzeitig konnte auch eine Erholung der Ventricularspannung in einem ischämischen Teil beobachtet werden. Bei vollständigem Abschluss verbesserte die erfindungsgemäss hergestellte Verbindung nicht die ST-Elevation oder die Ventricularspannung im Mittelpunkt des ischämischen Teiles, aber die Verbesserung in den umgebenden Teilen des ischämischen Teiles konnte festgestellt werden.

In gleicher Weise wurde der Coronafluss erhöht, und die ST-Elevation des Elektrokardiogrammes und die Reduktion der Ventricularspannung verbessert, wenn eine Tablette, die 10 mg der freien Form der nach dem Beispiel 2 hergestellten Verbindung enthielt, sublingual verabreicht wurde.

#### Versuch 5

(I) Ein Papillar-Muskel, der aus einem Meerschweinchen isoliert wurde, wurde in ein Organbad eingebracht, das mit einer oxygenisierten Tyrode-Lösung (Ca: 1,8 mM K: 2,7 mM) bei 30°C gefüllt war. Ein Ende des Muskels wurde an dem Organbad befestigt, und das andere Ende wurde mittels eines Fadens mit einem Messgerät zur Feststellung der Zugfestigkeit, also einem Tensiometer, befestigt. Es wurde der Einfluss der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung auf die Kraft der Muskelkontraktion beobachtet, indem man den Muskel mit Hilfe einer Silber-Silberchlorid-Elektrode elektrisch stimuliert (20 V, 5 msec, 1 Hz). Die antagonistische Wirksamkeit der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen gegen Calciumionen und Isoproterenol wurden ebenfalls untersucht.

Aus diesen Testresultaten sieht man, dass die Kontraktion des Papillar-Muskels, die durch die elektrische Stimulation induziert war, durch die Anwendung der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung gehemmt wurde, und zwar bei einem Konzentrationsbereich von mehr als 1 µg/ml. Ferner zeigte es sich, dass Calciumionen einen antagonistischen Einfluss auf diese hemmende Wirkung ausübten. Wenn andererseits Isoproterenol in einem Konzentrationsbereich von 0,08 µg/ml angewandt wurde, dann zeigte der Papillar-Muskel eine sehr starke Anregung, wobei er zwei oder mehr irreguläre Kontraktionen bei einer einzigen elektrischen Stimulierung ausübte. Unter diesen Bedingungen hemmte die Zugabe der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung zu der Lösung in einem

Konzentrationsbereich von mehr als 2 µg/ml diese überaus starke, bzw. zu starke Anregung des Muskels.

(II) Ein Spiralstreifen, der aus der Corona-Arterie eines Hundes isoliert wurde, wurde in das Organbad eingebracht, das mit einer von Calciumionen freien Locke-Lösung gefüllt war. Ein Ende des Streifens wurde an dem Organbad befestigt, und das andere Ende mit einem Messgerät zur Prüfung der Zugfestigkeit, also einem Tensiometer, verbunden. Der Einfluss der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung auf die Kontraktion des Streifens, die durch eine Polarisation der Lösung durch Zugabe von 43 mM an Kaliumionen oder 1 mM an Calciumionen hervorgerufen wurde, wurde untersucht.

Die dabei erzielten Versuchsergebnisse zeigten, dass die Kontraktion, die durch die Depolarisation durch K<sup>+</sup>-Ionen hervorgerufen wurde, gehemmt wurde, indem man die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung zusetzte, und diese hemmende Wirkung wurde vermindert, wenn man Calciumionen zusetzte.

(III) Der Einfluss der Calciumionen auf die Erhöhung des Corona-Flusses wurde untersucht, indem man einen Hund untersuchte, der mit Pentobarbital-Natrium nach dem gleichen Arbeitsverfahren anästhetisiert wurde, das im Versuch Nr. 2, unter I beschrieben ist. Das Ansteigen des Corona-Flusses, das durch die Verabreichung der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung induziert wurde, wurde durch eine grössere Dosierung an Calciumionen gehemmt.

(IV) Die Taenia coli, nämlich der bandartige muskuläre Längsstreifen in der Dickdarmwand eines Meerschweinchens wurde in dem Organbad suspendiert, das mit der Tyrode-Lösung gefüllt war, und der Einfluss der nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellten Verbindung auf die spontane Kontraktion und die Kontraktion, die durch Depolarisation mit Hilfe von Kaliumionen induziert war, wurden untersucht.

Die erzielten Testresultate zeigten, dass die spontane Kontraktion und die durch die Kaliumionen-Depolarisation induzierte Kontraktion gehemmt wurden, wenn man die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung in einem Konzentrationsbereich von 2 µg/ml anwandte, und eine derartige hemmende Wirkung wurde vermindert, wenn man Calciumionen zusetzte.

Die Analyse der Testresultate zeigt an, dass die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung eine antagonistische Wirksamkeit gegenüber Calciumionen aufweist, so dass die hemmende Wirkung gegenüber der Kardial-Kontraktion, die dilatierende Wirkung gegenüber glatten Muskeln der Hunde-Corona-Arterie und die hemmende Wirkung der Kontraktion der Taenia coli des Meerschweinchens, die durch die Anwendung der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen induziert wurden, durch die Zugabe von Calciumionen antagonistisch beeinflusst wurden. Es stellte sich ausserdem noch heraus, dass die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen eine antiarrhythmische Wirkung besitzen, denn diese Verbindungen hemmten die zu starke Anregung des Papillar-Muskels, die durch die Verabreichung von Isoproterenol hervorgerufen wurde.

#### Versuch 6

Der Blutfluss wurde nicht ausreichend gemacht, indem man experimentell die Corona-Arterie eines Hundes belastete, beispielsweise indem man die Corona-Arterie während eines bestimmten Zeitraumes einengte, und dann beliess man die

Arterie unter diesen Bedingungen. Entsprechend dieser Behandlung wiederholte sich periodisch ihr peripherer Blutdruck und peripherer Blutfluss und spontane Schwankungen in der Grössenordnung von Zeiträumen von Minuten waren mit einer ST-Elevation im Elektrokardiogramm begleitet. Dieses Phänomen war sehr ähnlich derjenigen Erscheinungen, die bei verschiedenen Formen der Angina pectoris im klinischen Fall auftreten. Es zeigte sich, dass die periodische Schwankung oder periodische Fluctuation durch den periodischen Spasmus in der eingeengten Corona-Arterie hervorgerufen wird. Die Wirksamkeit der nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen bei einer derartigen Variante eines Modellfalles der Angina pectoris wurde untersucht.

Die erzielten Testergebnisse zeigen, dass die periodischen Schwankungen in dem coronaren Blutdruck, also dem Blutdruck der Herzkranzgefäss, und auch in dem Blutfluss der Herzkranzgefäss durch die intravenöse Verabreichung der nach dem Beispiel 1 hergestellten Verbindung bei einem Dosierungsniveau von 250 µg/kg Körpergewicht oder einer höheren Dosierung gehemmt wurde. Dies heisst, dass die periodischen Schwankungen im Blutfluss offensichtlich verminder werden, und dass nur leichte Schwankungen zurückbleiben. Die effektive Dauer der hemmenden Wirkung reichte von 25 bis 40 Minuten.

Wie oben gesagt wurde, nimmt man an dass die nach dem erfundungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen wirksam sind, um die beschriebene Variante der Angina pectoris zu behandeln.

30

#### Versuch 7

Nach dem weiter unten erläuterten Arbeitsverfahren wurde die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung untersucht, und zwar bezüglich der Eigenschaft ob sie der Coagulation von Blutplättchen entgegenwirkt, also anticoagulative Eigenschaften gegenüber Blutplättchen aufweist, und dementsprechend eine der Embolie entgegenwirkende Wirksamkeit, also eine antiembolische Wirksamkeit besitzt.

##### 1. Herstellung der Testlösung

1-1 Zubereitung eines an Blutplättchen reichen Plasmas (PRP-Lösung).

Ein Kaninchenblut, das 38% Natriumcitrat enthält (Blut zu wässriger Natriumcitratlösung = 9:1) wurde mit 1000 Umdrehungen/Minute während 10 Minuten zentrifugiert, und die darüberstehende Flüssigkeit wurde als PRP-Lösung verwendet.

1-2 Bereitstellung einer Adenosin-Diphosphat-Lösung (ADP-Lösung).

Adenosin-Diphosphat, hergestellt von Sigma Chemical Co., Ltd. wurde in einer physiologischen Kochsalzlösung in einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst.

1-3 Bereitstellung einer Kollagen-Suspension

50 mg Kollagen, das aus Rindersehnen erhalten wurde (hergestellt von Sigma Chemical Co., Ltd.), wurden in 5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung suspendiert und homogenisiert, indem man einen Glashomogenisator während 5 Minuten verwendete. Anschliessend zentrifugierte man mit 500 Umdrehungen/Minute während 5 Minuten, und die darüberstehende Flüssigkeit wurde als Kollagen-Suspension verwendet.

1-4 Bereitung der Testlösung

Die nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 hergestellte Verbindung wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, wobei man die Testlösung erhielt.

## 2. Methode der Bestimmung

Die Bestimmung wurde durchgeführt, indem man ein Gerät zur Bestimmung der Coagulation, nämlich ein Aggregometer verwendete, und zwar das Aggregometer, Evans Electroselenium Ltd., Modell 169.

0,5 ml der PRP-Lösung und 0,025 ml der Testlösung, bzw. 0,025 ml einer physiologischen Kochsalzlösung bei der Durchführung des Vergleichsversuches, wurden jeweils in 2 Cuvetten eingefüllt und dann bebrütete man 2 Minuten lang bei 37°C. Außerdem wurde nachdem 0,025 ml der ADP-Lösung oder 0,025 ml der Kollagen-Suspension jeder der Cuvetten zugesetzt worden waren, der Einfluss der Testverbindung auf die Blutplättchen-Aggregation, die durch das ADP oder das Kollagen hervorgerufen wird, bestimmt.

Wie aus den Figuren 13 und 14 zu ersehen ist, war die anfängliche Geschwindigkeit der durch das ADP induzierten Aggregation bei der Testverbindung gleich wie beim Vergleichsversuch, jedoch beschleunigte die Testverbindung die Wiederauflösung der Aggregate der Plättchen, also die Dissoziation. Andererseits verzögerte die getestete Verbindung das Einsetzen der durch das Kollagen induzierten Aggregation und führte ferner dazu, dass das maximale Ausmass der Aggregation in diesem Fall geringer war als beim Vergleichsversuch. Aus diesen Ergebnissen ist der hemmende Einfluss der nach dem erfundungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindung auf die Blutplättchen-Aggregation bestätigt, so dass die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren hergestellte Verbindung auch als anticoagulierendes Mittel Verwendung finden kann.

## Versuch 8

Nach dem gleichen Verfahren, das im Versuch 2, unter Punkt 5 beschrieben ist, wurde die Veränderung des systemischen Blutdruckes bestimmt, wenn die zu testende Verbindung intravenös verabreicht wurde. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

TABELLE

| Getestete Verbindung      | Dosierung in µg/kg Körpergewicht | Prozent Änderung von SBP (in %) | Dauer (in Minuten) |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Verbindung von Beispiel 1 | 50                               | 16                              | 22                 |
| Verbindung von Beispiel 8 | 50                               | 20                              | 17                 |
| Nitroglycerin             | 50                               | 45                              | 8                  |

## Beispiel 1

Zu einer Mischung aus 5 g Natriumbicarbonat, sowie 15 ml Wasser und 1,69 g des Salpetersäure-Esters des Monoäthanolamintrates und 20 ml Chloroform gab man langsam 2,5 g an Nikotinsäurechlorid-Hydrochlorid (Nicotinylchlorid-hydrochlorid) während 10-30 Minuten unter Rühren bei einer Temperatur von 0-5°C zu. Das Rühren wurde dann während 30 Minuten fortgesetzt, und anschliessend wurde die Chloroformschicht abgetrennt. Es blieb eine wässrige Schicht zurück, die mit Chloroform extrahiert wurde, und der Extrakt wurde mit der abgetrennten Chloroformschicht vereinigt. Die organische Schicht wurde mit einer wässrigen Lösung von Kaliumcarbonat gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter verminderterem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde dann in einer Mischung aus Äther plus Isopropanol im Mischungsverhältnis 1:1 gelöst, und man liess Chlorwasserstoffgas in die Lö-

sung unter Kühlung einperlen, wobei man 2,35 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamid-Hydrochlorides erhielt. Beim Umkristallisieren aus Äthanol erhielt man farblose, nadelförmige Kristalle, die einen Schmelzpunkt von 132°C aufwiesen.

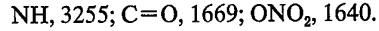
Das Ergebnis der Elementaranalyse war wie folgt für:



berechnet: C 38,80 H 4,07 N 16,96

gefunden: C 38,89 H 4,02 N 16,72

10 Das Infrarot-Spektrum war wie folgt ( $\text{cm}^{-1}$ ):



## Beispiel 2

15 Zu einer Lösung von 1,69 g des Salpetersäure-Esters von Monoäthanolamin in 20 ml Pyridin gab man langsam 2,5 g an Nikotinsäurechlorid-Hydrochlorid während 10-30 Minuten unter Rühren bei 5°C zu. Nachdem man weitere 30 Minuten lang gerührt hatte, wurde die Reaktionsmischung zur 20 Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst, und die erhaltene Lösung mit einer wässrigen Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde dann abgetrennt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter verminderterem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde unter Verwendung von Silicagel (Wakogel C-200; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) chromatographiert und mit einer Mischung aus Benzol plus Äthanol im Verhältnis 5:1 eluiert. Das erhaltene Eluat wurde zur 25 Trockene eingedampft, wobei man eine halbfeste Masse erhielt, die aus Diäthyläther umkristallisiert wurde, und 1,97 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamides lieferte.

30 Beim Umkristallisieren der Kristalle aus einer Mischung von Diäthyläther plus Äthanol erhielt man farblose Nadeln, die einen Schmelzpunkt von 92-93°C aufwiesen.

## Beispiel 3

Eine Lösung von 10 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamid-Hydrochlorides in Wasser wurde 40 unter Verwendung einer wässrigen Lösung von Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die Lösung wurde dann mit Chloroform extrahiert, und der Extrakt über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter verminderterem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus Diäthyläther umkristallisiert, wobei man 7,0 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamides erhielt. Beim 45 Umkristallisieren aus einer Mischung von Isopropanol und Diäthyläther erhielt man farblose Nadeln, die einen Schmelzpunkt von 93°C aufwiesen.

50 Das Infrarotspektrum lieferte die folgenden Ergebnisse:  
 $\text{NH}, 3250; \text{ONO}_2, 1630.$

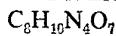
## Beispiel 4

Zu einer Mischung von 1,69 g des Salpetersäure-Esters des Monoäthanolamintrates in 5 ml Wasser, sowie von 55 3,8 ml an 35%iger Natriumcarbonatlösung und 17 ml Tetrahydrofuran gab man abwechselnd 3 g an Isonikotinsäurechlorid-Hydrochlorid (Isonicotinyl-chlorid-Hydrochlorid) und 11,2 ml an 35%iger Kaliumcarbonatlösung während 60 eines Zeitraumes von 30 Minuten unter Rühren bei einer Temperatur von 0-5°C zu. Die Reaktionsmischung wurde weitere 15 Minuten lang gerührt, und dann die organische Schicht abgetrennt. Die wässrige Schicht wurde mit Tetrahydrofuran extrahiert, und der Extrakt mit der vorher abgetrennten organischen Schicht vereinigt. Die vereinigten organischen Schichten wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels unter Vakuum und dem Umkristallisieren des Rück-

standes erhielt man den Salpetersäure-Ester des N-(2-Hydroxyäthyl)-isonicotinamides.

Dieses Produkt wurde in Diäethyläther aufgelöst und man setzte tropfenweise eine Mischung aus Diäethyläther und rauchender Salpetersäure unter Kühlung zu, wobei man 1,5 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)-isonicotinamid-Nitrates erhielt. Beim Umkristallisieren aus Isopropanol erhielt man Kristalle, die einen Zersetzungsschmelzpunkt von 105°C aufwiesen.

Die Elementaranalyse ergab die folgenden Werte für:



berechnet: C 35,04 H 3,68 N 20,43

gefunden: C 35,00 H 3,59 N 20,38

Das Infrarot-Spektrum lieferte die folgenden Ergebnisse:

IR (cm<sup>-1</sup>):

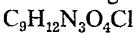
NH, 3280; C=O, 1671; ONO<sub>2</sub>, 1625.

### Beispiel 5

Es wurde eine Mischung aus 1,83 g des Salpetersäure-Esters des Isopropanolamin-Nitrates in 5 ml Wasser, sowie 3,8 ml einer 35%igen wässrigen Kaliumcarbonatlösung und 17 ml Tetrahydrofuran hergestellt, und zu dieser Mischung gab man abwechselnd 3 g Nikotinsäurechlorid-Hydrochlorid und 11,2 ml einer 35%igen Kaliumcarbonatlösung während 30 Minuten unter Röhren bei einer Temperatur von 0-5°C zu. Die Reaktionsmischung wurde während weiteren 15 Minuten gerührt, und dann trennte man die organische Schicht ab. Die wässrige Schicht wurde mit Tetrahydrofuran extrahiert und dieser Extrakt anschliessend mit der vorher abgetrennten organischen Schicht vereinigt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck abgedampft, und man kristallisierte den Rückstand um, wobei man den Salpetersäure-Ester des N-(2-Hydroxypropyl)-nicotinamides erhielt.

Dieses Produkt wurde in Aceton aufgelöst, und dann perlte man Chlorwasserstoffgas in die Lösung ein, wobei man 1,5 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxypropyl)-nicotinamid-Hydrochlorides in Form von farblosen Kristallen erhielt, die einen Zersetzungsschmelzpunkt von 161°C aufwiesen.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse waren wie folgt für:



berechnet: C 41,31 H 4,62 N 16,06

gefunden: C 41,38 H 4,60 N 16,11

Das Infrarot-Spektrum lieferte die folgenden Werte:

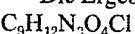
IR (cm<sup>-1</sup>):

NH, 3230; C=O, 1672; ONO<sub>2</sub>, 1620.

### Beispiel 6

Nach einem Arbeitsverfahren, das ähnlich demjenigen des Beispiele 4 ist, wurde das Nikotinsäurechlorid-Hydrochlorid mit dem Salpetersäure-Ester des Propanolamin-Nitrates umgesetzt, wobei man den Salpetersäure-Ester des N-(3-Hydroxypropyl)-nicotinamid-Hydrochlorides erhielt. Die Ausbeute betrug 75% der Theorie, und das Produkt wies einen Zersetzungsschmelzpunkt von 127°C auf.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse waren wie folgt für:



berechnet: C 41,31 H 4,62 N 16,06

gefunden: C 41,40 H 4,53 N 16,15

Das Infrarot-Spektrum lieferte die folgenden Werte:

IR (cm<sup>-1</sup>):

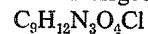
NH, 3235; C=O, 1672; ONO<sub>2</sub>, 1617.

### Beispiel 7

Nach einem Arbeitsverfahren, das ähnlich demjenigen ist, das im Beispiel 4 beschrieben ist, wurde das Isonikotinsäurechlorid-Hydrochlorid mit dem Salpetersäure-Ester des

Propanolamin-Nitrates umgesetzt, und man erhielt dabei den Salpetersäure-Ester des N-(3-Hydroxypropyl)-isonicotinamid-Hydrochlorides. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 72% der Theorie, und es besass einen Zersetzungsschmelzpunkt von 125°C.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse waren wie folgt für:



berechnet: C 41,31 H 4,62 N 16,06

gefunden: C 41,40 H 4,58 N 16,01

10 Das Infrarot-Spektrum lieferte die folgenden Werte:

IR (cm<sup>-1</sup>):

NH, 3230; C=O, 1672; ONO<sub>2</sub>, 1615.

### Beispiel 8

15 Nach einem Arbeitsverfahren, das ähnlich demjenigen ist, das im Beispiel 4 beschrieben wird, wurde das Picolinylchlorid-Hydrochlorid mit dem Salpetersäure-Ester des Monoäthanolamin-Salpetersäuresalzes umgesetzt, wobei man den Salpetersäure-Ester des N-(2-Hydroxyäthyl)-picolinamides erhielt. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 78% der Theorie, und der Schmelzpunkt lag bei 55-56°C.

20 Die Elementaranalyse ergab die folgenden Werte für:



berechnet: C 45,50 H 4,29 N 19,89

25 gefunden: C 45,25 H 4,10 N 19,17

Das Infrarot-Spektrum lieferte die folgenden Werte:

IR (cm<sup>-1</sup>):

NH, 3362; C=O, 1665; ONO<sub>2</sub>, 1620.

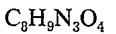
### Beispiel 9

Nach einem Arbeitsverfahren, das ähnlich demjenigen ist, das im Beispiel 4 beschrieben ist, wurde das Nikotinsäurechlorid-Hydrochlorid mit dem 2,3-Hydroxypropylamin umgesetzt, wobei man den Di-salpetersäure-ester des N-(2,3-Dihydroxypropyl)-nicotinamides in Form eines blassgelben Öles erhielt.

### Beispiel 10

40 1,145 g des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamid-Nitrates wurden allmählich zu 3 ml rauchender Salpetersäure zugesetzt, die auf eine Temperatur von -10 bis -6°C unter Röhren abgekühlt worden war. Sobald alles Material zugesetzt war, rührte man noch eine Stunde lang bei einer Temperatur von 0 bis 5°C und setzte dann Diäethyläther der Lösung zu, wobei 1,15 g des Salpetersäure-Esters des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamid-salpetersäuresalzes in Form von farblosen Kristallen ausfielen. Die Kristalle wurden in einer wässrigen Natriumcarbonatlösung gelöst, und man setzte Essigsäureäthylester zu der Lösung zu. Die Schicht des Essigsäureäthylesters wurde dann abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und unter verminderter Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus Diäethyläther umkristallisiert, wobei man den Salpetersäure-Ester des N-(2-Hydroxyäthyl)-nicotinamides erhielt. Beim Umkristallisieren dieses Produktes aus Diäethyläther erhielt man farblose Kristalle, die einen Schmelzpunkt von 90-92°C aufwiesen.

55 Die Elementaranalyse lieferte die folgenden Werte für:



berechnet: C 45,50 H 4,29 N 19,89

gefunden: C 45,37 H 4,09 N 19,71

### Beispiel 11

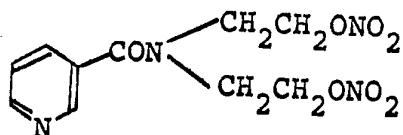
Nach einem Arbeitsverfahren, das ähnlich demjenigen ist, das im Beispiel 10 beschrieben ist, wurde das N-(2-Hydroxyäthyl)-isonicotinamid-Nitrat mit rauchender Salpetersäure umgesetzt, wobei man den Salpetersäure-Ester des N-(2-Hydroxyäthyl)-isonicotinamid-Nitrates erhielt. Die Ausbeute betrug 76% der Theorie, und das Produkt wies einen Zersetzungsschmelzpunkt von 105°C auf.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse waren wie folgt für:  
 $C_8H_{10}N_4O_7$

berechnet: C 35,04 H 3,68 N 20,43  
 gefunden: C 35,11 H 3,57 N 20,34

Von den erfindungsgemäss hergestellten Verbindungen ist der Salpetersäureester des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides die am meisten bevorzugte Verbindung, weil diese Verbindung eine hervorragende pharmakologische Wirksamkeit besitzt.

Anhand der folgenden Vergleichstests wird die pharmakologische Aktivität des Salpetersäureesters des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides mit derjenigen des Disalpetersäureesters des Dioxidiäthylamides der Nicotinsäure verglichen, welches auch als Dinitrooxydiäthylamid-nicotinat bezeichnet werden kann, verglichen. Diese zuletzt genannte Verbindung weist die folgende Formel



auf, und sie ist in dem Beispiel 8 der USA-Patentschrift Nr. 3 036 074 beschrieben.

#### Durchführung des Versuches:

Der Versuch wurde so durchgeführt, wie dies im Versuch Nr. 2, Punkt 1, 5 und 6 beschrieben ist, wobei jedoch diesmal keine Bastard-Hunde sondern Beagle-Hunde verwendet wurden. Die Hunde waren durch intravenöse Verabreichung von 30 bis 40 mg pro kg Körpergewicht Pentobarbital-natrium anästhesiert worden, und diese anästhetisierten Tiere wurden als Testtiere verwendet. Die Änderung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen, abgekürzt als «CBF», der systemische Blutdruck, abgekürzt als «SBP», und die Geschwindigkeit des Herzschlages wurden bestimmt nachdem man an die Tiere, die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung, also den Salpetersäureester des N-(2-Hydroxyäthyl)nicotinamides, und die in der Literatur beschriebene Vergleichsverbindung der oben angegebenen Formel verabreichte. Ausserdem wurde in Übereinstimmung mit demjenigen, was in den vorangegangenen Versuchen 4 und 6 beschrieben ist, der Einfluss beider Verbindungen auf die Veränderung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen unter mechanischer Einengung oder mechanischem Verschluss dieser Gefäße, also unter mechanischer Strukturierung bestimmt, wobei die Corona-Arterie eingeengt wurde, und ferner wurde auch der Einfluss der beiden Verbindungen auf Phänomene untersucht, die sehr ähnlich denjenigen Erscheinungen sind, die bei verschiedenen Formen der Angina pectoris im klinischen Falle auftreten (s. den Versuch 6).

Bei den Versuchen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

#### a) Veränderung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen

Es wurde die Steigerung des Blutflusses in den Corona-Gefäßen und die Dauer dieser Steigerung dieses Blutflusses in den Corona-Gefäßen bestimmt, die durch Verabreichung der erfindungsgemässen Verbindung, bzw. der Vergleichsverbindung erreicht wurde. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in der anliegenden Fig. 1' beschrieben, wobei in dieser Figur die Kurve mit den als Kreisen dargestellten Messpunkten die Vergleichsverbindung darstellt, und die Kurve mit den als schwarz ausfüllten Kreisen dargestellten Messpunkten die Ergebnisse für die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung darstellt. Dabei sind die aufgetrage-

nen Punkte Mittelwerte, und oberhalb und unterhalb dieser Punkte ist die jeweilige Standardabweichung dargestellt. In der Fig. 1' ist auf der Ordinate die Steigerung des Blutflusses durch die Corona-Gefäße in Prozent angegeben, und auf der Abszisse die Dosierung der fraglichen Verbindungen in  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht des Hundes angegeben.

In Fig. 2' ist wieder die Kurve mit den als ausgefüllte Kreise dargestellten Messpunkten diejenige, welche bei Verwendung der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindungen gemessen wurde, während die Kurve mit den unausgefüllten Kreisen diejenige für die Verbindung zu Vergleichszwecken ist. Auch in Fig. 2' ist auf der Abszisse die verabreichte Menge in  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht aufgetragen. Auf der Ordinate ist in Fig. 2' die Dauer des Anstieges des Blutflusses in den Corona-Gefäßen in Minuten angegeben.

Wie man aus Fig. 1' sieht, zeigt die nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Verbindung selbst bei einer Dosierung von nur 20  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht einen bedeutenden Anstieg im Coronafluss. Ausserdem sieht man aus Fig. 1', dass die Wirksamkeit der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung bezüglich einer Steigerung des Blutflusses durch die Corona-Gefäße bei jeder der unterschiedlichen Dosierungen wesentlich besser war als die entsprechende Wirksamkeit der Verbindung zu Vergleichszwecken.

Aus Fig. 2' sieht man ferner, dass bei einer intravenösen Verabreichung der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung in einer Dosierung von 100  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht eine Dauer der Wirksamkeit während eines Zeitraumes von mehr als 20 Minuten erzielt wurde, während die Dauer der Wirksamkeit, die bei der intravenösen Verabreichung der Verbindung der Vergleichssubstanz sehr kurz war. Dementsprechend ist der Unterschied in der Wirksamkeit zwischen der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung und der bereits bekannten Verbindung überaus deutlich.

#### b) Veränderung des systemischen Blutdruckes

Die bei diesem Versuch erzielten Ergebnisse sind in der Fig. 3' dargestellt. In dieser Fig. 3' ist wieder diejenige Kurve in der die Messpunkte durch schwarz ausfüllte Kreise veranschaulicht werden, die Kurve die mit Hilfe der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung bestimmt wurde, während die Kurve der Vergleichsverbindung Messpunkte aufweist, die durch unausgefüllte Kreise veranschaulicht sind. Auch hier sind die Messpunkte der Mittelwerte aus unterschiedlichen Bestimmungen und die Standardabweichung ist durch die oberhalb, bzw. unterhalb der Messpunkte liegenden Striche angegeben.

Auch in Fig. 3' ist die verabreichte Dosis, angegeben in  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht, auf der Abszisse aufgetragen, während auf der Ordinate die Prozentabnahme des systemischen Blutdruckes angegeben ist.

Wie man aus dieser Fig. 3' sieht, ist das Ausmass der Abnahme des systemischen Blutdruckes, das durch die Verabreichung der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung hervorgerufen wurde, geringer als die Blutdrucksenkung, die durch die Verabreichung der Verbindung zum Vergleichszweck hervorgerufen wurde.

#### c) Veränderung in der Geschwindigkeit des Herzschlages

Die bei diesem Versuch erzielten Ergebnisse sind in der Fig. 4' veranschaulicht. Auch in diesem Fall ist die Kurve in der die Messpunkte mit ausfüllten Kreisen angegeben sind, diejenige die mit Hilfe der nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Verbindung erzielt wurde, während die Messkurve, in der die Messpunkte durch unausgefüllte

Kreise veranschaulicht sind, diejenige ist die mit der Vergleichsverbindung erhalten wurde. Auch in diesem Fall sind die Messpunkte Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen, und die Abweichung der einzelnen Bestimmungen vom Mittelwert ist durch die parallelen Striche oberhalb bzw. unterhalb des Mittelwertes veranschaulicht. Auch in diesem Fall ist auf der Abszisse die verabreichte Dosierung in  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht angegeben, während auf der Ordinate die prozentuelle Änderung der Geschwindigkeit des Herzschlages aufgetragen ist.

Wie man aus dieser Fig. 4' sieht, wird durch die Verabreichung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindung fast keine Veränderung in der Geschwindigkeit des Herzschlages hervorgerufen, während durch die Verabreichung der in der Literatur beschriebenen Vergleichsverbindung eine wesentliche Steigerung der Herzschlaggeschwindigkeit hervorgerufen wurde.

d) *Veränderung des Blutflusses in den Corona-Gefässen bei einer mechanischen Einengung oder Abschnürung der Corona-Arterie*

Die bei diesem Versuch erzielten Ergebnisse sind in der Fig. 5' veranschaulicht. In dieser Fig. 5' sind zwei Diagramme dargestellt, wobei in beiden Fällen auf der Ordinate die prozentuelle Gesamtveränderung im Blutfluss angegeben ist, während auf der Ordinate jeweils die Prozente MCBP angeführt sind. Dabei veranschaulichen sowohl im linken Diagramm als auch im rechten Diagramm die Messpunkte die mit einem ausgefüllten Kreis eingezeichnet sind diejenigen, die bei Verabreichung einer Dosis von 50  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindung, bzw. der Vergleichsverbindung erhalten wurden, während diejenigen Messpunkte, die mit einem X eingezeichnet sind, eine Dosierung von 150  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten, bzw. der Vergleichsverbindung, bedeuten. Das linke Diagramm betrifft die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Verbindung und das rechte Diagramm die Vergleichsverbindung. Wie man aus dieser Fig. 5' sieht, wurde eine Steigerung des Corona-Blutflusses erzielt, indem man die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Verbindung intravenös verabreichte, während im Gegensatz dazu

eine Abnahme des Corona-Blutflusses festgestellt wurde, wenn die Verbindung zu Vergleichszwecken verabreicht wurde.

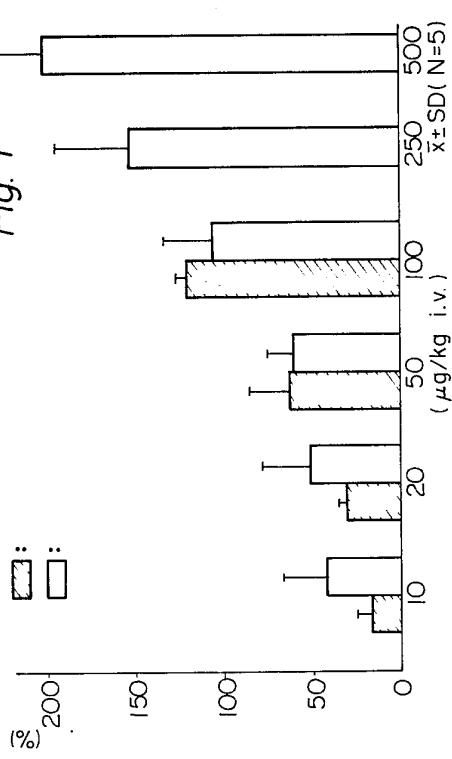
e) *Einflüsse der Verbindungen auf verschiedene Formen der Angina pectoris*

Bei der intravenösen Verabreichung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindung in einer Dosierung von mehr als 150  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht wurde ein hemmender Einfluss auf die abnormale Veränderung im Elektrokardiogramm festgestellt, und zwar auf die ST-Elevation. Ferner hatte diese Dosierungsmenge einen Einfluss auf die periodische Fluctuation im coronaren Blutstrom. Im Gegensatz dazu führte die intravenöse Verabreichung der Vergleichsverbindung selbst bei einer Dosierung von 300  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht zu keiner derartigen hemmenden Wirkung.

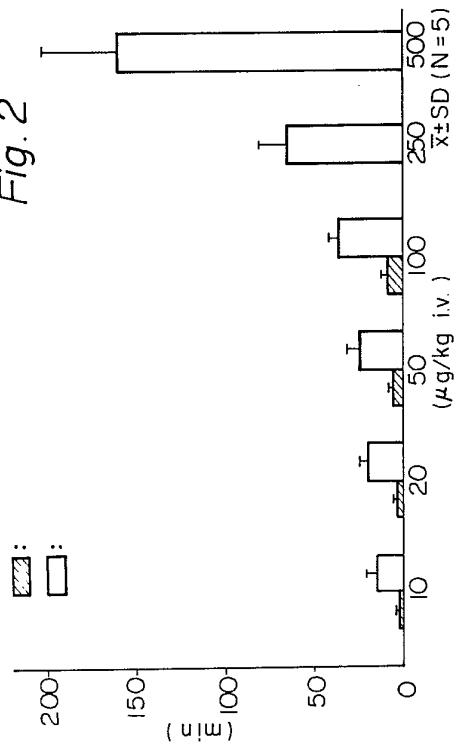
*Diskussion der Versuchsergebnisse*

Im allgemeinen sind diejenigen pharmakologischen Wirkungen die benötigt werden, wenn ein Mittel als Mittel zur Bekämpfung von Angina pectoris eingesetzt wird, eine Erhöhung des coronaren Blutflusses während langer Zeiträume, ohne dass eine wesentliche Änderung der Geschwindigkeit des Herzschlages oder eine Änderung des Blutdruckes auftritt. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen sollen zur Bekämpfung von Angina pectoris eingesetzt werden, und dementsprechend sieht man aus den Ergebnissen der Tests A, B und C die oben beschrieben wurden, dass die bevorzugte nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Verbindung wesentlich bessere Eigenschaften bezüglich der Bekämpfung von Angina pectoris besitzt, als die in der genannten USA-Patentschrift bereits beschriebene Verbindung.

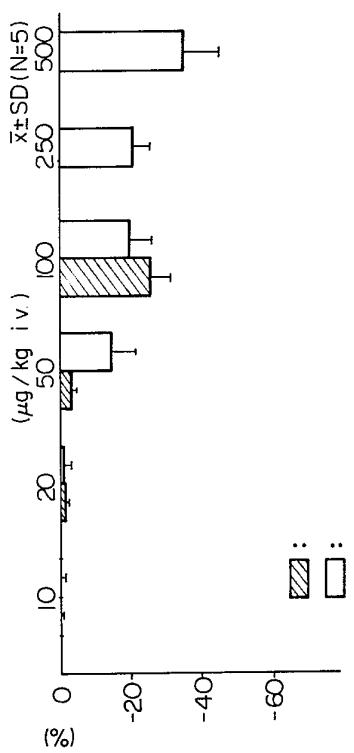
Wenn man ferner bei den Tests pathologische Modelle verwendet, und zwar insbesondere Tests durchführt, die verschiedene Formen der Angina pectoris durch eine Einengung der Corona-Arterie simulieren, dann zeigten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen hervorragend gute Wirksamkeiten, während im Gegensatz dazu keine wesentliche Wirksamkeit festgestellt werden konnte wenn die in der USA-Patentschrift beschriebene Vergleichsverbindung eingesetzt wurde.



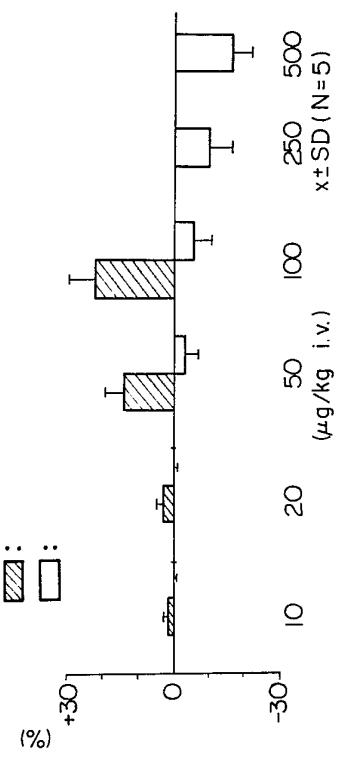
*Fig. 2*



*Fig. 3*



*Fig. 4*



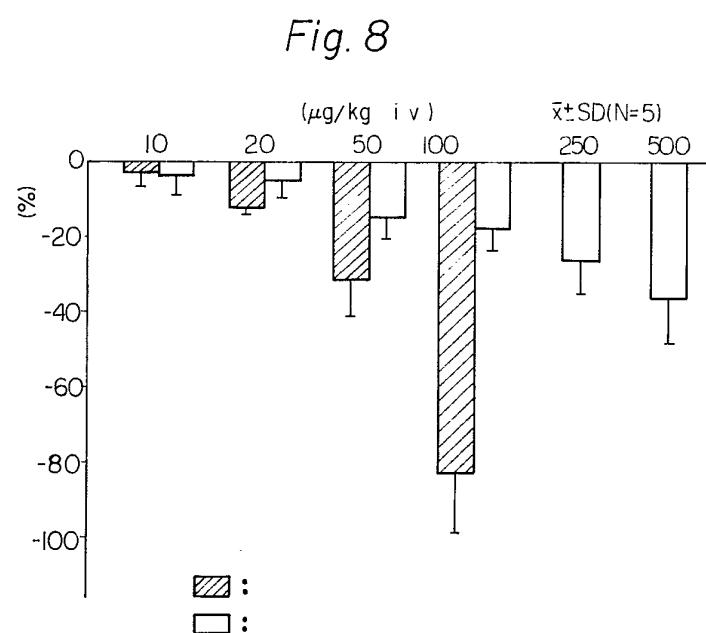
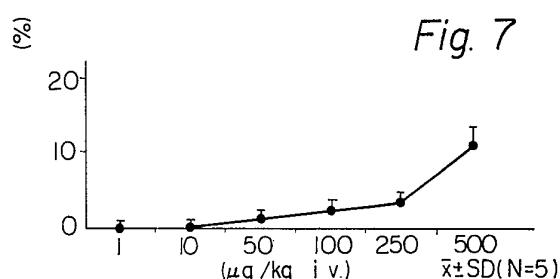
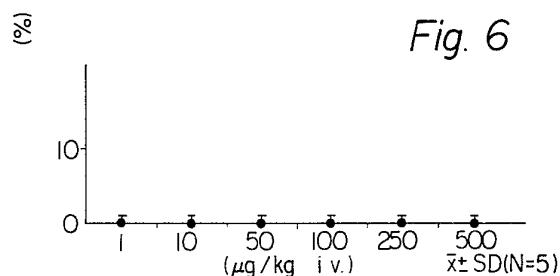
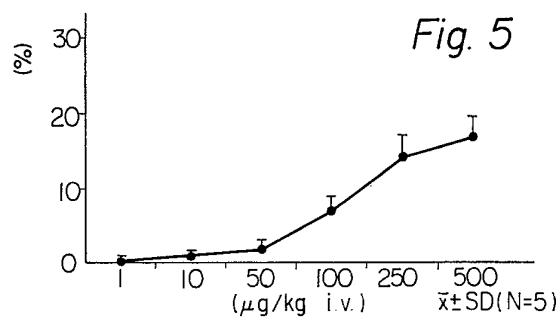


Fig. 9

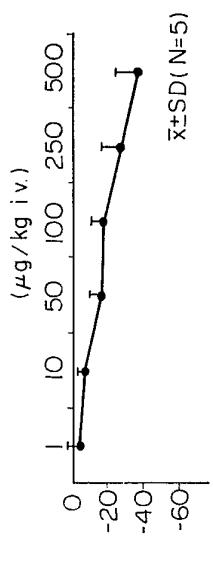


Fig. 11

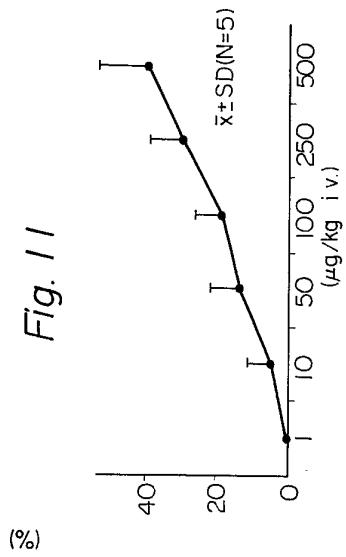


Fig. 10

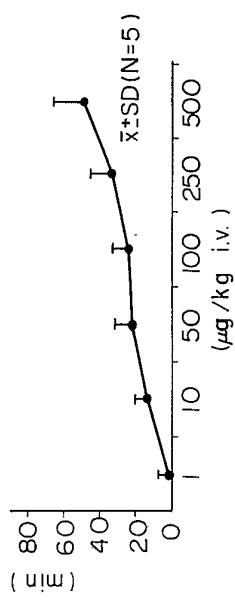
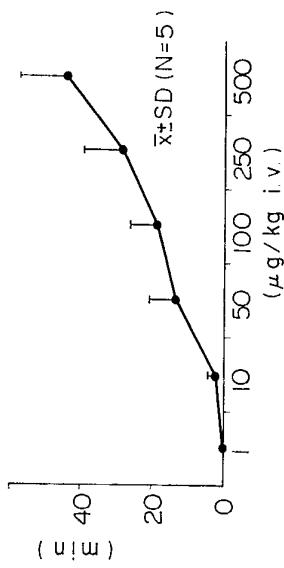
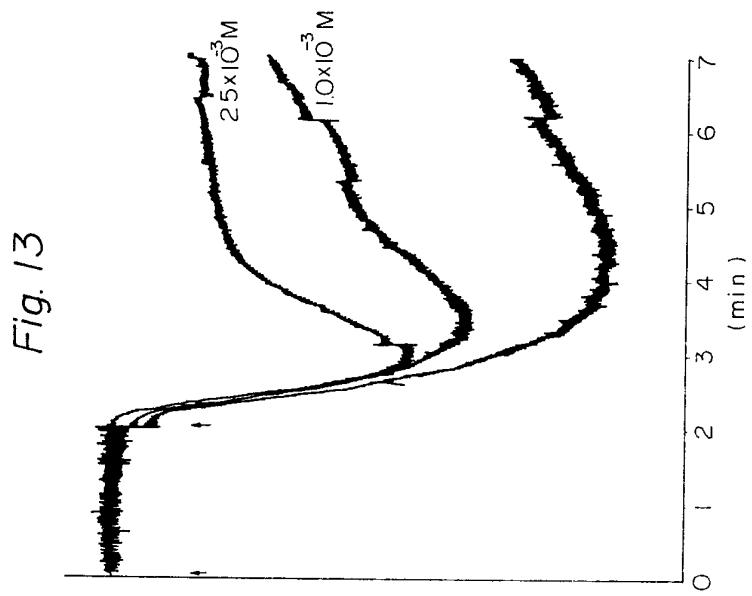
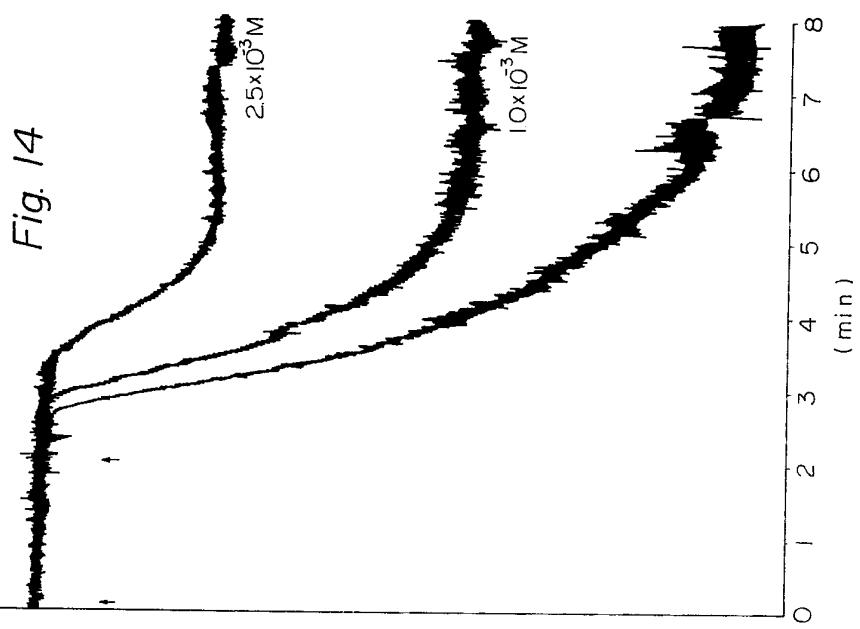


Fig. 12





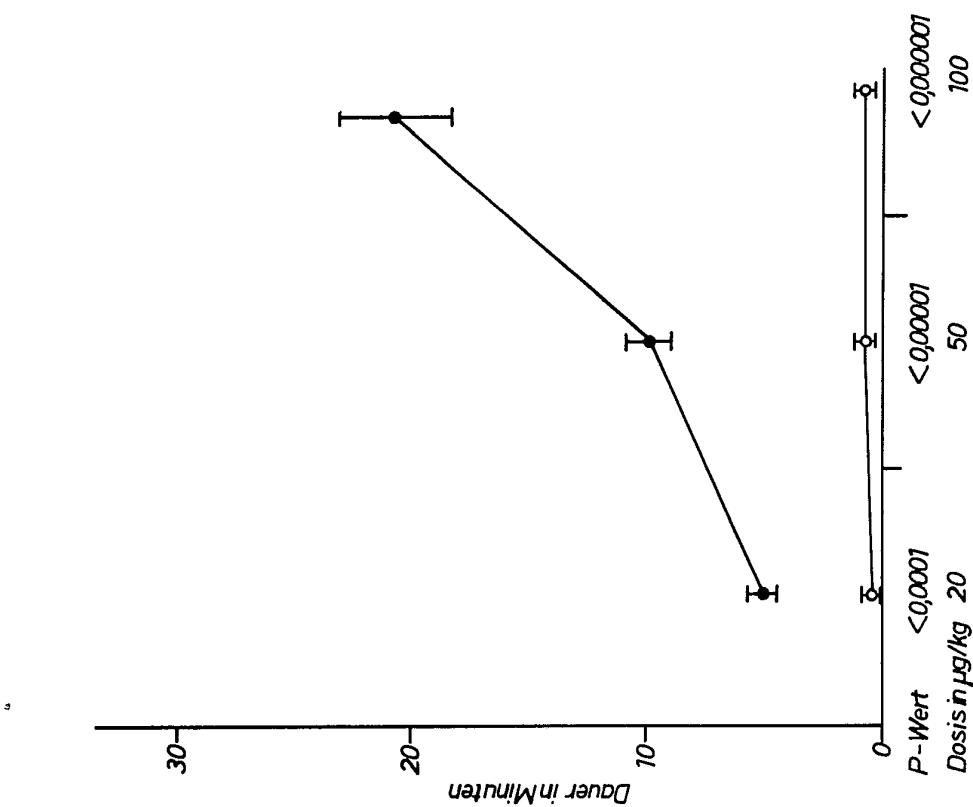


Fig. 2'

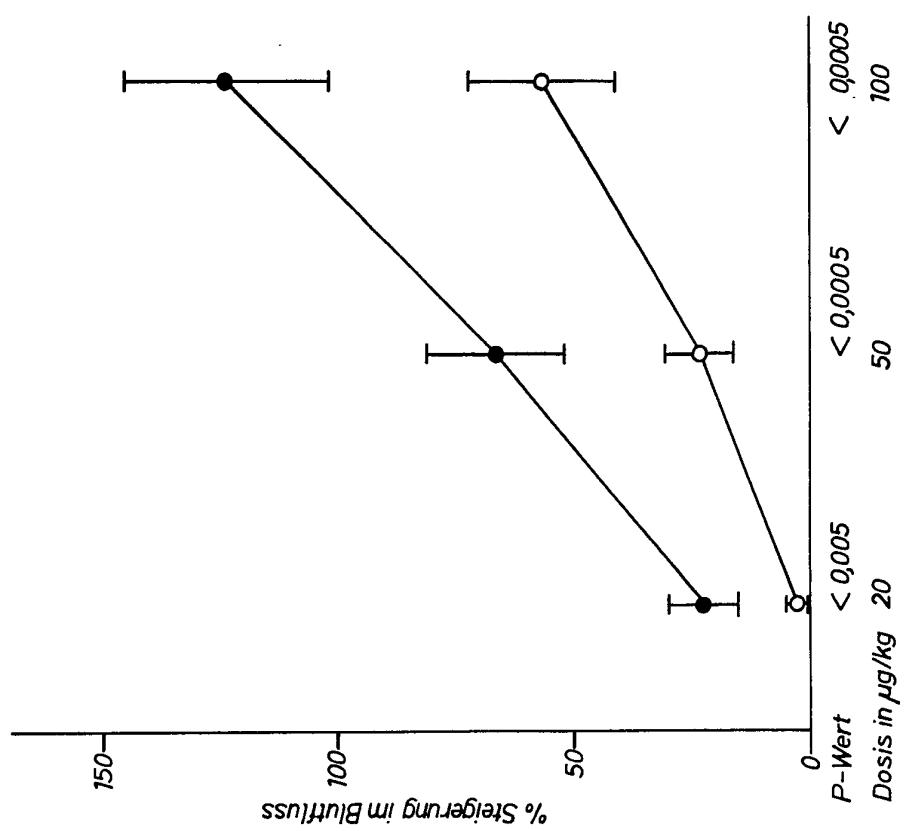


Fig. 1'

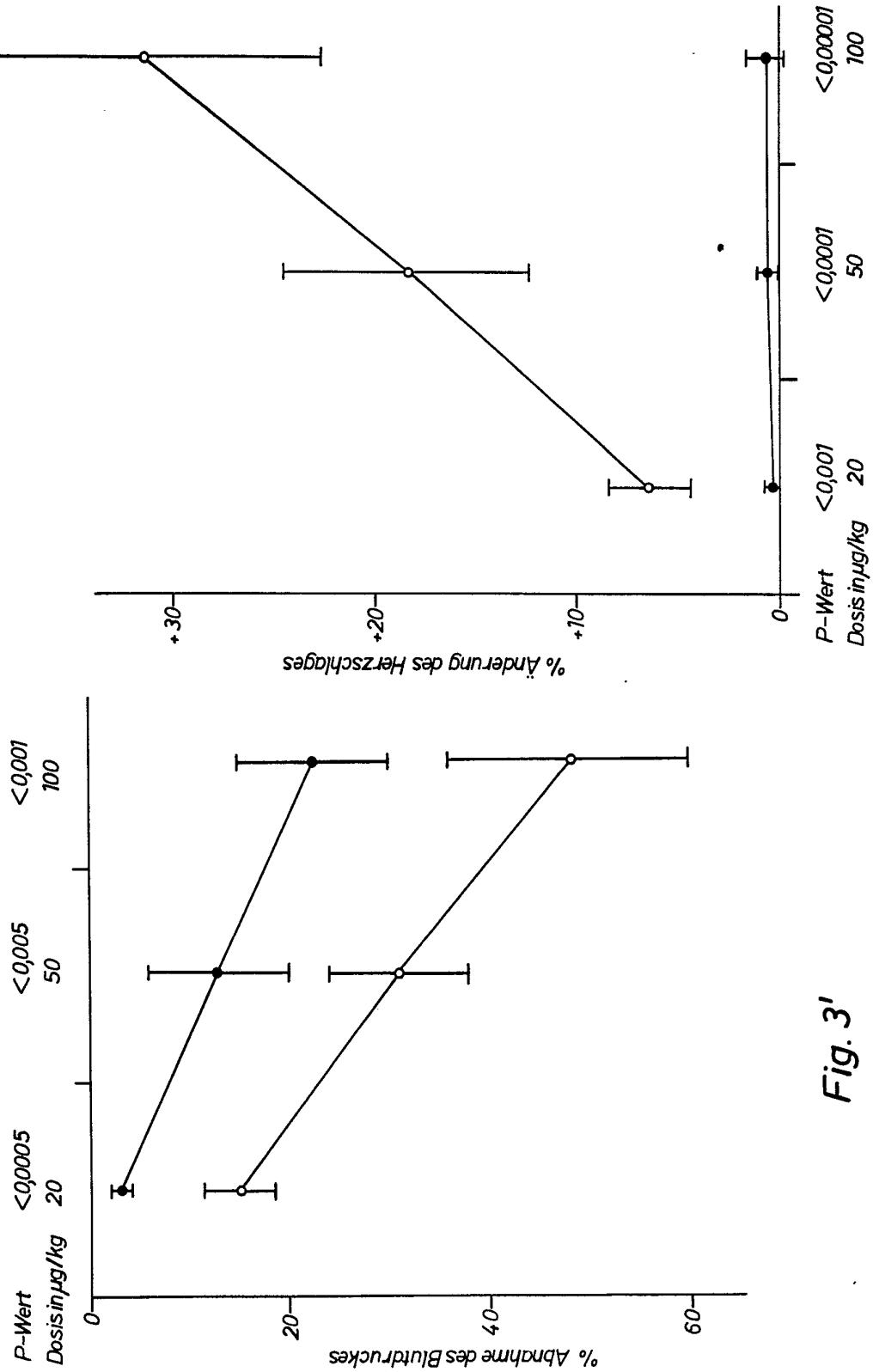


Fig. 3'

Fig. 4'

