



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **330010**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 213/30 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

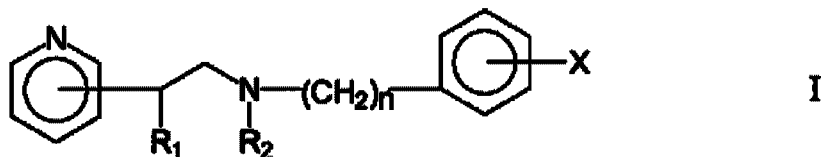
C07B 55/00 (2006.01)

C07D 213/38 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20050833	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.07.09 PCT/SI2003/00021
(22)	Inng.dag	2005.02.16	(85)	Videreføringsdag	2005.02.16
(24)	Løpedag	2003.07.09	(30)	Prioritet	2002.07.17, SI, 200200177 2002.11.28, SI, 200200287
(41)	Alm.tilgj	2005.04.18			
(45)	Meddelt	2011.02.07			
(73)	Innehaver	Lek Pharmaceuticals d d, Verovskova 57, SI-1526 LJUBLJANA, Slovenia Breda Rode, Groharjeva 12, SI-1241 KEMNIK, Slovenia Damjana Rozman, Pot v Cezelja 16, SI-1231 LJUBLJANA, Slovenia Klementina Fon Tacer, Vrazov trg 2, SI-1000 LJUBLJANA, Slovenia Darko Kocjan, Maroltova 3, SI-1000 LJUBLJANA, Slovenia Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Nye derivater av pyridyletanol (fenyl-etyl) aminer som inhibitorer av kolesterolbiosyntese, fremgangsmåter for deres fremstilling, anvendelse av forbindelsene og farmasøytiske preparater som inneholder dem			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Nye derivater av pyridyletanol(fenyletyl)aminer av formel I



er beskrevet, hvor n er et helt tall fra 1 til 4, R₁ er et hydrogenatom, hydroksylgruppe eller lavere C₁₋₆ alkoksygruppe, R₂ er et hydrogenatom eller en rettkjedet eller forgrenet lavere C_i-alkylgruppe, X er hydrogen, fluor, klor, brom, hydroksylgruppe, trifluormetylgruppe, 3,4-di-Cl, 2,4- di-C1 eller lavere C₁₋₆ alkoksygruppe, Enantiomerene, diastereomerene eller racematene derav eller de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav, som er ligander av sigma-reseptorene for inhibering av kolesterolbiosyntese og således er egnet for behandlingen av hyperkolesterolemi og hyperlipemi hos mennesker. Den største senkingen av kolesterol ble observert med l-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4- diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanol i form av dihydrobromidsaltet (signatur BK-35 . 2HBr).

Foreliggende oppfinnelse tilhører området aktive substanser fra gruppen av hydrosykliske forbindelser, og den angår derivater av pyridyletanol(fenyletyl)amin, fremgangsmåter for deres fremstilling, anvendelse av disse forbindelsene og farmasøytiske preparater som inneholder dem. De nye derivatene av

5 pyridyletanol(fenyletyl)amin ifølge oppfinnelsen er reseptorer av sigmaligander, inhibitorer av kolesterolbiosyntese ved sterol- $\Delta 7,8$ -isomerasenivået og er egnet for behandling av hyperkolesterolemi, og hyperlipemi hos mennesker.

Teknisk problem

- 10 Det er konstant behov for nye aktive substanser som inhiberer kolesterolbiosyntese, effektive antihyperkolesterolemiske og antihyperlipemiske midler som vil gi en mer målrettet virkning i terapien og med færre bivirkninger sammenlignet med de aktive substansene som er kjent i den tidligere teknikk.

15 Tidligere teknikk

- Siden høyt blodkolesterolnivå er en erkjent risikofaktor med hensyn til begynnelsen av aterosklerose har tallrike undersøkelser vært rettet mot utviklingen av et legemiddel som ville forårsake reduserte nivåer av blodkolesterol i pattedyr og som således ville være meget effektivt i behandlingen av hyperkolesterolemi og hyperlipemi. Det er fastslått at
- 20 nedsettelse av kolesterolbiosyntese med inhibitorer av kolesterolbiosyntese er én av behandlingsmåtene.

- Det er kjent flere inhibitorer av kolesterolbiosyntese ved inhiberingsnivået til 3-hydroksy-3-metylglutaryl-koenzym A-reduktase (HMG-CoA-reduktase), som beskrevet for
- 25 eksempel i US-patent 4.231.938 (lovastatin), US-patent 4.444,784 (simvastatin), US-patent 4.346.227 (pravastatininnatrium) eller US-patent 5.273.995 (atorvastatin) som allerede er benyttet i terapien og er de anerkjente kommersielle preparatene Mevacor[®], Sinvacor[®], Lipitor[®]. Disse HMG-CoA-reduktaseinhibitorer, også kjent ved det felles navnet statiner, senker blodkolesterolnivåene i betydelig grad.

30

Derivater av pyridinetanolamin som er nyttige i behandlingen av fedme og/eller diabetes, spesielt i tykke, voksne individer, er kjent fra US-patent 4.800.206.

- Det er kjent at sigmaligander bindes til sigmaresseptorer som er strukturhomologer av
- 35 sterol- $\Delta 8,7$ -isomerase ((F. F. Moebius et al, Brit. J. Pharmacol. (1997), 121, 1-6) og tilhører de siste delene av kolesterolbiosyntese. Det er imidlertid ingen aktive substanser

eller legemidler kjent innen den aktuelle medisin som vil inhibere kolesterolbiosyntese ved sterol- $\Delta 8,7$ -isomerasenivået.

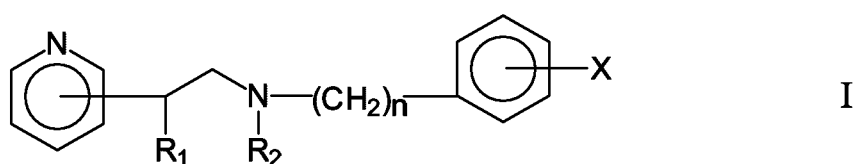
Problemløsningsbeskrivelse inkludert eksempler

- 5 Målet med foreliggende oppfinnelse er å finne nye aktive substanser som i signifikant grad vil senke nivået av blodkolesterol i pattedyrene ved inhibering av kolesterolbiosyntese i de siste delene av dets biosyntesereaksjonsvei, dvs. ved sterol- $\Delta 8,7$ -isomerasenivået, og således ha en mer selektiv inhiberende virkning enn virkningen av kjente statiner som inhiberer HMG-CoA-reduktase i den tidlige delen av kolesterolbiosyntesereaksjonsveien.

Anvendelsen av de nye forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse vil sørge for en mer målrettet terapeutisk virkning med færre bivirkninger sammenlignet med de aktive substansene som allerede er godkjent i terapien.

- 15 Problemet er løst ved foreliggende oppfinnelse som angår nye pyridyletanol(fenyletyl)-aminderivater, fremgangsmåtene for deres fremstilling, farmasøytiske preparater som inneholder dem og anvendelsen av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse for fremstilling av farmasøytiske preparater for behandling av hyperkolesterolemi og
- 20 hyperlipemi.

Nye pyridyletanol(fenyletyl)aminer ifølge oppfinnelsen er forbindelser av den generelle formel I



- 25 hvor
- n er et helt tall fra 1 til 4,
- R_1 er en hydroksylgruppe,
- R_2 er en rettkjedet eller forgrenet lavere C_{1-6} alkylgruppe,
- X er hydrogen, fluor, klor, brom, hydroksylgruppe, trifluormetylgruppe, 3,4-di-Cl, 2,4-
- 30 di-Cl eller lavere C_{1-6} alkoksygruppe,
- og enantiomerer, diastereoisomerer eller racemater derav eller de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav.

Betegnelsen lavere alkylgruppe betyr rettkjedet eller forgrenet lavere alkylgruppe med 1 til 6, fortrinnsvis 1 til 4, karbonatomer (C_{1-6} alkyl), slik som metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl og isobutylgruppe. Betegnelsen lavere alkoksygruppe betyr alkoksygruppe med 1 til 6, fortrinnsvis 1 til 4, karbonatomer (C_{1-6} alkoksy), slik som metoksy, etoksy, propoksy, isopropoksy, butoksy og isobutoksygruppe.

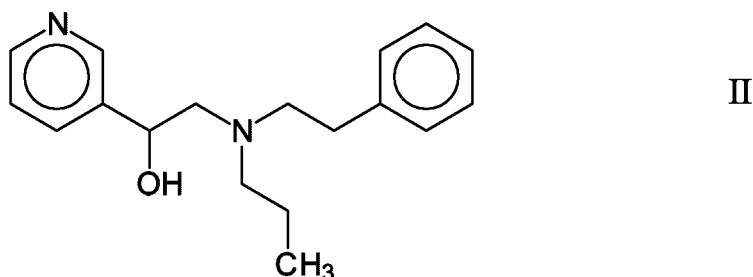
Forbindelsene av formel I danner salter med syrer og disse saltene utgjør også en del av oppfinnelsen. Eksempler på slike salter er saltene med fysiologisk kompatible mineral-syrer slik som for eksempel saltsyre, hydrobromsyre, fosforsyre; eller med organiske syrer slik som for eksempel metansulfonsyre, sitronsyre, oksalsyre, maleinsyre, benzen-sulfonsyre og andre.

Nye forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder minst ett asymmetrisk karbonatom og kan derfor eksistere som optisk aktive enantiomerer, som diastereomerer eller som rasemater.

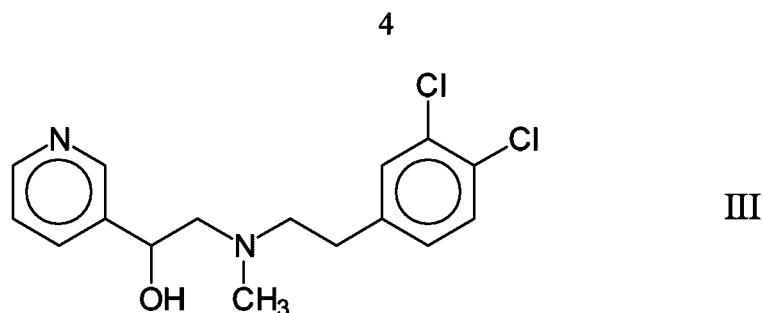
Forbindelsene av formel I hvor $n = 2$ og hvor R_1 er en hydroksylgruppe, R_2 er en metyl-, -etyl, n-propyl-, isopropyl-, n-butyl- eller isobutylgruppe og X er et hydrogenatom eller fenyl disubstituert med 2 kloratomer i posisjonene 3 og 4 eller i posisjonene 2 og 4 er derfor foretrukne forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Av forbindelsene som er nevnt ovenfor, er følgende foretrukket:

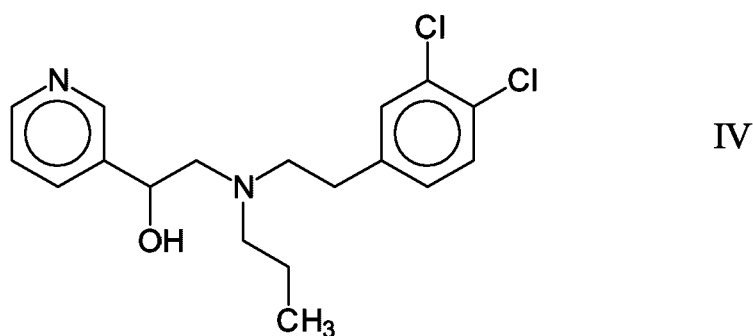
1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-fenyletyl)-N-propylamino)etanol og et dihydrobromidsalt av formel II derav (signatur BK-31 i beskrivelser og figurer)



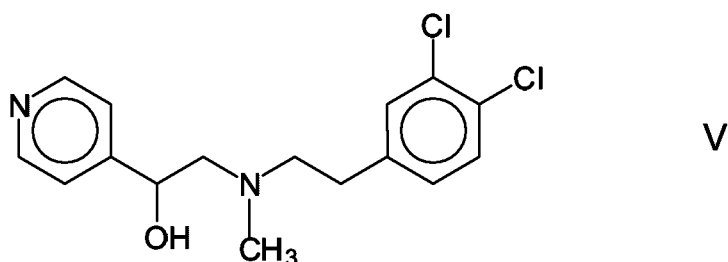
1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanol og et dihydrobromidsalt av formel III derav (signatur BK-33 i beskrivelser og figurer)



1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanol og et dihydrobromidsalt av formel IV derav (signatur BK-35 i beskrivelser og figurer)



5 og 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanol og et dihydrobromidsalt av formel V (signatur BK-38 i beskrivelser og figurer)

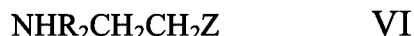


Av de ovennevnte forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er den spesielt foretrukne forbindelsen 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanol og et dihydrobromidsalt (BK-35.2HBr) derav som en inhibitor av kolesterolbiosyntese, og passer således for behandlingen av hyperkolesterolemi og hyperlipemi.

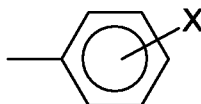
Forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles i henhold til fremgangsmåten definert i krav 11. Fremgangsmåten kan utføres på to forskjellige måter som er vist i følgende reaksjonsskjema som variant (a) og variant (b):

Variant a):

Alkylering av sekundære aminer av formel VI



hvor R_2 er som nevnt ovenfor og Z er en gruppe



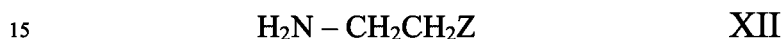
5 hvor X er som definert ovenfor,

med pyridyloksiran (pyridyletylenoksid) av formel VII



10 til de ønskede tittel-pyridyletanol(fenyletyl)aminene av formel I og, om ønsket, om-
dannelse av disse til de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav.

Sekundære aminer av formel VI kan fremstilles ved alkylering av primære aminer av formel XII

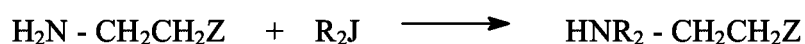


med alkylodider av formel XIII



ifølge følgende reaksjonsskjema:

20



hvor substituenten R_2 og Z er som definert ovenfor.

25 Primære aminer av formel XII og alkylodider av formel XIII er kjente og kommersielt tilgjengelige kjemikalier.

2-, 3- eller 4-substituert pyridyloksiran av formel VII, i fremgangsmåten for alkylering av sekundære aminer av formel VI, blir fremstilt *in situ* ved omdannelse av 2-, 3- eller
30 4-substituert bromacetylpyridinhydrobromid med kompleksdannede metallhydrid, slik som natriumborhydrid i et inert oppløsningsmiddel, slik som lavere alifatisk alkanol, for eksempel etanol, ved en temperatur omkring romtemperatur.

2-, 3- eller 4-substituert bromacetylpyridinhydrobromid fremstilles ved omdannelse av det opprinnelige 2-, 3- eller 4-substituerte acetylpyridin, som er kjente og kommersielt tilgjengelige kjemikalier for bromering med brom og hydrobromsyre.

5

Alkyleringstrinnet av sekundære aminer av formel VI med pyridyloksiran av formel VII utføres ved en temperatur fra ca. romtemperatur til tilbakeløpstemperatur for reaksjonsblanding, i et inert oppløsningsmiddel slik som lavere alifatisk alkanol, for eksempel etanol. De urene pyridyletanol(fenyletyl)aminene av formel I som dannes blir isolert og
10 renses ved bruk av vanlige prosedyrer kjent innen den tidligere teknikk, fortrinnsvis ved kolonnekromatografi.

Variant (b):

15 Alkylering av primære aminer av formel VIII



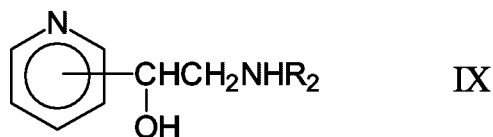
hvor R_2 er som definert ovenfor,

20

med pyridyloksiran av formel VII



til mellomproduktforbindelser av formel IX



25

hvor R_2 er som definert ovenfor,

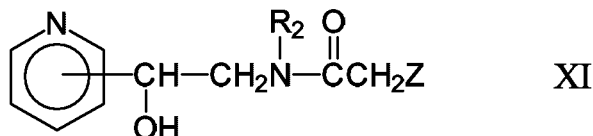
og kondensering med derivatene av fenyleddiksyre av formel X

30



hvor Z er som definert ovenfor,

til nye mellomproduktforbindelser av formel XI



5

hvor substituenten R_2 og Z er som definert ovenfor,

og redusering av disse til de ønskede tittel-pyridyletanol(fenyletyl)aminene av formel I, og, om ønsket, omdannelse av disse til fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter derav.

10

Primære alifatiske aminer av formel VIII, slik som metylamin eller n-propylamin, er kjente og kommersielt tilgjengelige kjemikalier som alkyleres med pyridyloksiran av formel VII i et inert oppløsningsmiddel, slik som lavere alifatisk alkanol, for eksempel etanol, til mellomproduktforbindelser av formel IX. Disse mellomproduktforbindelsene kondenseres med derivatene av fenyleddiksyre av formel X, hvor en substituent Z er som definert ovenfor, i et inert oppløsningsmiddel og ved en temperatur på omkring romtemperatur. Kondensasjonsmidler som er kjente innen teknikken kan anvendes som et kondensasjonsmiddel, slik som dicykloheksylkarbodiimid (DCC), i et inert oppløsningsmiddel, for eksempel metylenklorid (diklormetan).

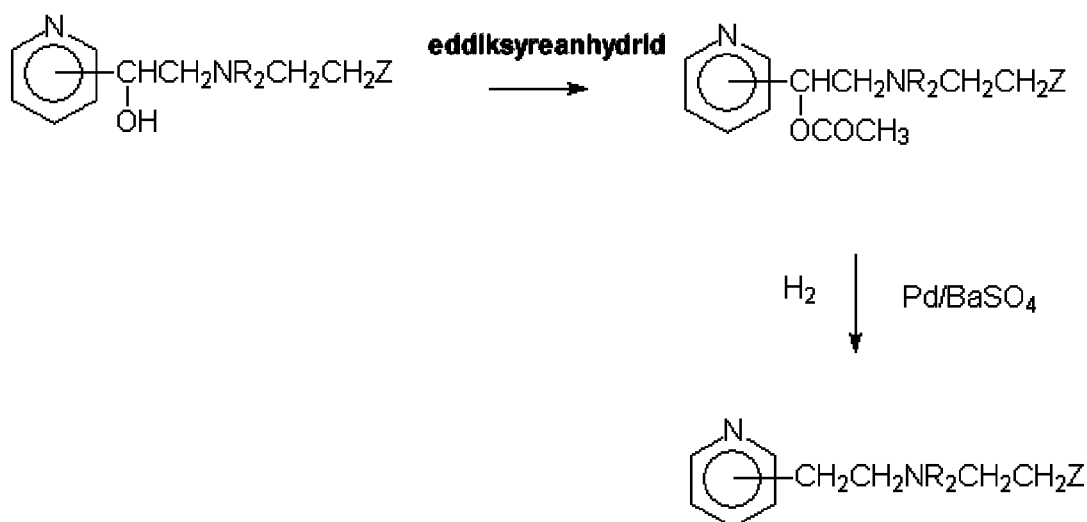
20

I det sluttelige syntesetrinnet blir en karbonylgruppe i de nye mellomproduktforbindelsene XI redusert til en alkoholgruppe. Reaksjonen utføres med konvensjonelle reduksjonsmidler, fortrinnsvis med de som er egnet for reduksjon av karbonylgruppen til gruppen $-R_2HN-CO-$. Spesielt egnet er et metallhydridkompleks, slik som $LiAlH_4$ i et inert oppløsningsmiddel, fortrinnsvis i eter slik som tetrahydrofuran (THF), dietyleter, dioksan og lignende. De ønskede tittel-pyridyletanol(fenyletyl)aminene av formel I som dannes isoleres og renses på konvensjonell måte, fortrinnsvis ved kolonnekromatografi på silikagel og de kan deretter, om ønsket, omdannes til fysiologisk akseptable syreaddisjonssalter derav.

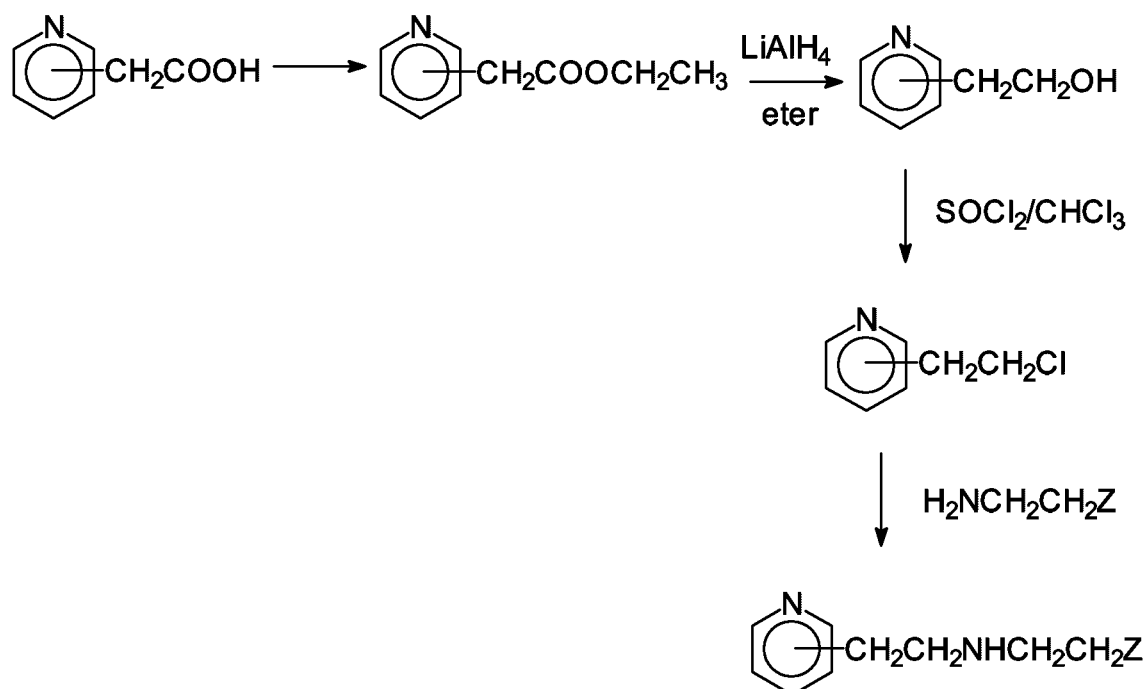
30

Fremgangsmåtene for fremstilling av de nye derivatene av pyridyletanol(fenyletyl)amin av formel I i henhold til variantene (a) og (b) er vist på figur 5.

- Syntesen av de nye derivatene av pyridyletanol(fenyletyl)aminer av formel I hvor R_1 er et hydrogenatom, kan utføres slik at de nye forbindelsene av formel I ifølge oppfinnelsen hvor R_1 er en hydroksylgruppe, først acetyleres på konvensjonell måte, for eksempel med eddiksyreanhydrid (acetanhydrid) og deretter blir den dannede O-acetylforbindelsen katalytisk hydrogenert ved bruk av vanlige metoder, slik som med palladium på en bærer, for eksempel bariumsulfat, ifølge nedenstående variant (c):



- 10 Ved den andre varianten kan de nye derivatene av pyridyletanol(fenyletyl)amin av formel I fremstilles, idet R_1 representerer et hydrogenatom, ifølge nedenstående variant (d):



Den opprinnelige 2-, 3- eller 4-substituerte pyridyleddiksyren forestres på konvensjonell måte, som kjent innen den tidligere teknikk, for eksempel ved å omdanne den til dens pyridyleddiksyreetyler som deretter reduseres med konvensjonelle reduksjonsmidler, fortrinnsvis med de som er egnet for reduksjon av estergruppen til en alkoholgruppe. Spesielt egnet er et metallhydridkompleks, slik som litiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) i et inert oppløsningsmiddel, fortrinnsvis i eter, slik som dietyleter, tetrahydrofuran, dioksan og lignende. Deretter blir den dannede 2-, 3- eller 4-substituerte pyridyletanolen omdannet til 2-, 3- eller 4-substituert pyridyletylenklorid med vanlige kloreringsmidler, slik som tionylklorid i et inert oppløsningsmiddel, slik som kloroform. Det dannede substituerte pyridyletylenkloridet anvendes til alkylering av primære aminer av formel VI for fremstilling av tittelderivatene av pyridyletanol(fenyletyl)aminer av formel I hvor R_1 representerer et hydrogenatom.

I henhold til målet med oppfinnelsens ble effekten av de nye derivatene av pyridyletanol(fenyletyl)amin som ligander av sigmareseptorer på inhibering av kolesterolbiosyntese bestemt. En *eks vivo*-metode for metabolisk merking av udødelige humane heptatocytter ble benyttet. Den radioaktivt merkede tidligforløperen for kolesterol[^3H]-acetat ble tilsatt til celler, med eller uten tilsetning av sigmaligander. To uavhengige forsøk med metabolisk merking og sterolanalyse ble utført. Resultatene av begge analyser er reproducerbare og viser at de testede substansene nedsetter kolesterolsyntese i signifikant grad.

Av nye ligander av sigmareseptorer ifølge foreliggende oppfinnelse utvises det høyeste potensialet for inhibering av kolesterolbiosyntese av substansen 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanol, i form av dihydrobromidsaltet (signatur BK 35 . 2HBr).

Det er nylig fastslått at sigmaligander bindes til sigmareseptorer som er strukturhomologer av sterol- $\Delta 8,7$ -isomerase fordi de tilhører den samme genfamilien. Sterol- $\Delta 8,7$ -isomerase bidrar til den sene delen av kolesterolbiosyntese, hvilket klart fremgår fra figur 1. Figur 1 viser at de mest vanlig benyttede substratene er $\Delta 8$ -kolesterol og zymosterol som er forskjellige med hensyn til metningen av sidekjeden ved posisjon $\Delta 24,25$. Figur 2 representerer kolesterolbiosyntese med markerte virkningssteder for inhibitorer av kolesterolsyntese.

Effekten av nye pyridyletanol(fenyletyl)aminer og sigmaligander ifølge oppfinnelsen er mer selektiv enn effekten av statiner, benyttet i terapi, slik som lovastatin eller pravastatin som inhiberer HMG-CoA-reduktase tilhørende den tidlige delen av kolesterolbiosyntese.

5

Med nye pyridyletanol(fenyletyl)aminer ifølge oppfinnelsen er det muliggjort en mer selektiv virkning med færre bivirkninger på grunn av inhiberingen av kolesterolbiosyntese i de sene trinnene av denne biosyntesereaksjonsveien. Disse substansene er følgelig spesielt nyttige for behandlingen av hyperkolesterolemi og hyperlipemi. Disse effektene til de nye pyridyletanol(fenyletyl)aminene var virkelig uventet for så vidt som det hittil i medisinsk praksis og terapi mangler substanser som vil senke kolesterolnivået ved å rette virkningen på enzymer i sene trinn av kolesterolbiosyntesen.

Anvendelse av de nye pyridyletanol(fenyletyl)aminene av formel I ifølge oppfinnelsen, nedsetter i markert grad de patologisk forøkede blodkolesterolnivåene hos behandlede pasienter. Doseringen og anvendelsesfrekvensen avhenger av egenskapene til et individuelt legemiddel, dets biotilgjengelighet og farmakokinetiske egenskaper, og pasientens tilstand.

Forliggende oppfinnelse vedrører følgelig også anvendelse av forbindelsene med formel I og de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav som ligander av sigmareseptorer for inhibering av kolesterolbiosyntese, for fremstilling av farmasøytiske preparater for behandling av hyperkolesterolemi og hyperlipidemi hos mennesker.

Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytiske preparater, kjennetegnet ved at de innbefatter forbindelsen med formel I og de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav.

Farmasøytiske preparater inneholder den aktive substansen sammen med den fysiologisk compatible, organiske eller uorganiske bærer, slik som vann, laktose, stivelse og dets derivater, magnesiumstearat, kalk, planteoljer og lignende. Farmasøytiske preparater blir fortrinnsvis administrert oralt, slik som i form av tabletter, kapsler, piller, pulver, granulater, oppløsninger, siruper, suspensjoner, eliksirer og lignende. Administrering kan også utføres parenteralt, for eksempel i form av sterile oppløsninger, suspensjoner eller emulsjoner. Farmasøytiske preparater kan steriliseres og/eller inkludere bestanddeler, slik som konserveringsmidler, stabilisatorer, emulgeringsmidler, bufferstoffer og andre additiver.

Foreliggende oppfinnelse illustreres av følgende eksempler:

EKSEMPEL 1

5

1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-fenyletyl)-N-propylamino)etanol (BK 31)

Fremstilling av utgangsforbindelsene:

10 N-propyl(β -fenyletyl)amin

1,2 ml (9,5 mmol) av fenyletylamin, 0,93 ml (9,5 mmol) av n-propyljodid, 5 ml trietylamin og 5 ml THF (tetrahydrofuran) ble anbragt i en kolbe, og reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved tilbaketilbakepumpetemperatur for reaksjonsblandingen i 3,5 timer og deretter avkjølt. Det ble dannet et salt som ble frafiltrert, oppløsningen ble inndampet og en ønsket forbindelse ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase: $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 3$). Dette ga 0,62 g (40%) av N-propyl-(β -fenyletyl)amin i form av oljen (molekylvekt: 163.264, formel: $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}$).

20 3-bromacetylpyridinhydrobromid

Til 10g (82, 5 mmol) 3-acetylpyridin ble det tilsatt 30 ml av 48% hydrobromsyre. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 70°C, og 4,2 ml brom ble tilsatt dråpevis under omrøring. Etter fullført bromtilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt ytterligere i 15 minutter ved den samme temperaturen og avkjølt på is. Det ble dannet en krystallinsk forbindelse som ble frafiltrert og grundig vasket med aceton. Dette ga 21 g (90%) av 3-bromacetylpyridinhydrobromid med smeltepunkt 195 - 200°C.

Fremstilling av tittelforbindelsen 1-(3-pyridyl)-2-(N-fenyletyl)-N-propylamino)etanol

30

Til 1,01 g (3,6 mmol) 3-bromacetylpyridinhydrobromid ble det tilsatt 20 ml absolutt etanol og 0,5 g (13,2 mmol) natriumborhydrid. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 20°C i 2 timer, filtrert og til filtratet inneholdende 3-pyridyloksiran ble det tilsatt 0,96 g (5,9 mmol) N-propyl-(β -fenyletyl)amin. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved tilbaketilbakepumpetemperatur for reaksjonsblandingen i 4 timer og inndampet til en tørr rest, og til denne ble det tilsatt 20 ml kloroform. En fast del ble frafiltrert, filtratet ble inndampet, og en oljerest som ble oppnådd ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silika-

35

gel 60, mobil fase: CHCl_3 : CH_3OH = 10 : 3). Dette ga 0,56 g (55%) av tittelforbindelsen i form av oljebasen.

0,56 g (2 mmol) av en renset oljebase av 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-fenyletyl)-N-propylamino)etanol ble oppløst i 5 ml aceton. Den resulterende oppløsningen ble avkjølt på is, og under omrøring ble 2,5 ml etanolisk oppløsning av hydrobromsyreoppløsning (0,35 g (4,3 mmol HBr)) tilsatt. Til en dannet utfelling ble det tilsatt 3 ml dietyleter. Etter omrøring i 2 timer på is ble et krystallinsk produkt frafiltrert og vasket med dietyleter. Dette ga 0,7 g (80%) av 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-fenyletyl)-N-propylamino)etanoldihydrobromid, med smeltepunkt 113 - 120°C (molekylvekt: 446.238, bruttoformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} \cdot 2\text{HBr}$).

^1H NMR-spektrum, D_2O , ppm ifølge DSS (0ppm): 8.89, 8.80 (2H), 8.65, 8.57 (1H), 8.10 (1H), 7.38 (5H), 5.47 (1H), 3.7-3.1 (8H), 1.80 (2H), 0.97 (3H).

IR (infrarødt) spektrum (KBr-skive) er vist på figur 6.

EKSEMPEL 2

1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanol (BK 33)

Fremstilling av 1-(3-pyridyl)-2-metylaminoetanol

Til 1,01 g (3,6 mmol) 3-bromacetylpyridinhydrobromid, fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ble det tilsatt 20 ml absolutt etanol og 0,5 g (13,2 mmol) natriumborhydrid, og reaksjonsblandingen ble omrørt ved 20°C i 2 timer og filtrert. Til filtratet inneholdende 3-pyridyloksiran ble det tilsatt 1,3 ml 33% etanolisk oppløsning av metylamin og oppvarming foretatt ved reaksjonsblandingsens tilbakeløpstemperatur i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter inndampet til en tørr rest og 20 ml kloroform ble tilsatt til denne resten. En fast del ble frafiltrert, filtratet ble inndampet og en oljerest ble dannet som ble renset ved kolonnekromatografi på silikagel (mobil fase: CHCl_3 : CH_3OH = 10 : 3). Dette ga 0,33 g (60%) av tittelforbindelsen i form av oljebasen (molekylvekt: 152.196, bruttoformel: $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$).

Fremstilling av 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-metylamino)etanol

Til en kolbe inneholdende 5442 mg (2,6 mmol) DCC (dicykloheksylkarbodiimid) ble det tilsatt 2 ml metylenklorid, og en oppløsning av 538 mg (2,6 mmol) 3,4-diklorfenyl-
 eddiksyre i 3 ml metylenklorid ble tilsatt dråpevis under omrøring, hvilket resulterte i
 dannelsen av en utfelling. Etter omrøring i 5 minutter ble 400 mg (2,6 mmol) 1-(3-pyri-
 5 dydyl)-2-metylaminoetanol tilsatt til reaksjonsblandingen og omrøring foretatt i ytterligere
 1 time ved 20°C. Det ble dannet en utfelling som ble frafiltrert og oppløsningen ble inn-
 dampet. Det inndampede filtratet ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (sili-
 kagel 60, mobil fase: CHCl_3 : CH_3OH = 10 : 0,5). Dette ga 715 mg (80%) av 1-(3-
 pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl-N-metylamino)etanol (molekylvekt: 339.224,
 10 bruttoformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$).

Fremstilling av tittelforbindelsen 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl-N-metyl-
 amino)etanol (BK-33)

15 0,53 g (13,9 mmol) litiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) ble anbragt i en kolbe, 6 ml vann-
 fri tetrahydrofuran (THF) ble tilsatt og blandingen avkjølt på is. Til reaksjonsblandingen
 ble det, under omrøring, dråpevis tilsatt en oppløsning av 1,1 g (3,2 mmol) 1-(3-
 pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-etylamin)etanol i 10 ml vannfri
 tetrahydrofuran (THF). Etter fullført tilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt i
 20 ytterligere 1 time ved 20°C, avkjølt på is og under sterk omrøring ble det trinnvis tilsatt
 6,5 ml 15% NaOH og deretter 16 ml metylenklorid (CH_2Cl_2). En organisk fase ble
 separert, tørket på vannfritt Na_2SO_4 og inndampet på en rotasjonsfordamper, hvilket
 resulterte i dannelsen av en oljeres som deretter ble rensset ved kolonnekromatografi på
 silikagel (silikagel 60, mobil fase: CH_3OH : etylacetat = 10 : 2). Dette ga 0,63 g (60%)
 25 av tittelforbindelsen i form av oljebasen.

0,60 g (1,84 mmol) av rensset oljebase ble oppløst i 3,5 ml aceton. Oppløsningen ble av-
 kjølt på is og under omrøring ble det tilsatt 2,4 ml etanolisk oppløsning av hydrobrom-
 syre (0,328 g HBr; 4,1 mmol). Til den dannede resten ble det tilsatt 2ml dietyleter. Etter
 30 omrøring av reaksjonsblandingen i 2 timer på is ble det dannet et krystallinsk produkt
 som ble frafiltrert og vasket med dietyleter. Dette ga 0,72 g (80%) 1-(3-pyridyl)-2-(N-
 (2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanoldihydrobromid, med smeltepunkt på 157
 - 161°C (molekylvekt: 487.074, bruttoformel $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OCl}_2 \cdot 2\text{HBr}$).

35 ^1H NMR-spektrum; D_2O , ppm ifølge DSS (0ppm): 8.90 (1H), 8.78 (1H), 8.64 (1H),
 8.10 (1H), 7.50 (2H), 7.24 (1H), 5.50 (1H), 3.52 (4H), 3.08 (5H).

IR-spektrum (KBr-skive) er vist på figur 9.

EKSEMPEL 3

5 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanol (BK-35)

Fremstilling av 1-(3-pyridyl)-2-propylaminoetanol

Til 1,01 g (3,6 mmol) 3-bromacetylpyridinhydrobromid, fremstilt som beskrevet i ek-
 10 sempel 1, ble det tilsatt 20 ml absolutt etanol og 0,5 g (13,2 mmol) natriumborhydrid
 (NaBH_4). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 20°C i 2 timer og filtrert. Til filtratet in-
 neholdende 3-pyridyloksiran ble det tilsatt 0,7 ml (8,5 mmol) n-propylamin og det ble
 foretatt oppvarming ved reaksjonsblandings tilbakeløpstemperatur i 5 timer.
 Reaksjonsblandingen ble deretter inndampet til en tørr rest og til denne ble det tilsatt 20
 15 ml kloroform, hvorefter en fast del ble frafiltrert, filtratet ble inndampet, hvilket ga en
 oljerest som ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase:
 CHCl_3 : etylacetat = 10 : 2). Dette ga 0,33 g (50%) 1-(3-pyridyl)-2-propylaminoetanol i
 form av oljebasen (molekylvekt: 180.25, bruttoformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$).

20 Fremstilling av 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-propylamino)etanol

Til en kolbe inneholdende 630 mg (3,1 mmol) DCC (dicykloheksylkarbodiimid) ble det
 tilsatt 3 ml metylenklorid, og en oppløsning av 625 mg (3,1 mmol) 3,4-diklorfenylen-
 diksyre i 5 ml metylenklorid ble tilsatt dråpevis under omrøring, hvilket resulterte i dan-
 25 nelsen av en utfelling. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 5 minutter, og til denne ble det
 tilsatt 550 mg (3,05 mmol) 1-(3-pyridyl)-2-metylaminoetanol i 6 ml metylenklorid,
 hvorefter omrøring ble foretatt i ytterligere 1 time ved 20°C . Dette ga en utfelling som
 ble frafiltrert og den resulterende oppløsningen ble inndampet. Det inndampede filtratet
 ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase: CHCl_3 :
 30 CH_3OH = 10 : 0,5). Dette ga 0,56 g (50%) 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-
 diklorfenyl)acetyl)-N-propylamino)etanol i form av en olje (molekylvekt: 367.278,
 bruttoformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$).

35 Fremstilling av tittelforbindelsen 1-(3-pyridyl)-2-[N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propyl- amino]etanol (BK-35)

0,43 g (11,3 mmol) litiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) ble anbragt i en kolbe, 6 ml vannfritt tetrahydrofuran (THF) ble tilsatt, og blandingen ble avkjølt på is. Til reaksjonsblandingen ble det under omrøring dråpevis tilsatt en oppløsning av 1 g (2,7 mmol) 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-propylamino)etanol i 10 ml vannfri THF.

5 Etter fullført tilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt ytterligere i 1 time ved 20°C , avkjølt på is og 6,4 ml 15% NaOH ble tilsatt trinnvis under sterk omrøring og deretter ble 16 ml metylenklorid tilsatt. Den oppnådde organiske fasen ble separert, tørket på vannfritt Na_2SO_4 og inndampet på en rotasjonsfordamper. Den inndampede resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, første mobile fase: $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 0,5$; andre mobile fase: etylacetat : $\text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1,5$). Dette ga 0,58 g (60%) av tittelforbindelsen i form av oljebase.

0,50 g (1,4 mmol) av den oppnådde, rensede oljebasen ble oppløst i 4 ml aceton. Den resulterende oppløsningen ble avkjølt på is og 1,1 ml etanolisk oppløsning av

15 hydrobromsyre (0,25 g HBr; 3,1 mmol) ble tilsatt under omrøring. Dette ga en hvit utfelling og til denne ble det tilsatt 3 ml dietyleter, og etter omrøring på is i 2 timer ble det dannet et krystallinsk produkt som ble frafiltrert og vasket med dietyleter. Dette ga 0,62 g (85%) 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-propylamino)etanoldihydrobromid, med smeltepunkt $198 - 202^\circ\text{C}$ (molekylvekt: 515,124; bruttoformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OCl}_2 \cdot 2\text{HBr}$).

20

^1H NMR-spektrum, D_2O , ppm ifølge DSS (0ppm): 8.91 (1H), 8.81 (1H), 8.64 (1H), 8.12 (1H), 7.54 (2H), 7.27 (1H), 5.50 (1H), 3.58 (2H), 3.48 (2H), 3.34 (2H), 3.16 (2H), 1.82 (2H), 1.00 (3H)

25

IR-spektrum (KBr-skive) er vist på figur 8.

EKSEMPEL 4

30 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanol (BK-38)

Fremstilling av 1-(4-pyridyl)-2-metylaminoetanol

Til 1,01 g (3,6 mmol) 4-bromacetylpyridinhydrobromid, fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ble det tilsatt 20 ml absolutt etanol og 0,5 g (13,2 mmol) natriumborhydrid, og reaksjonsblandingen ble omrørt ved 20°C i 2 timer og deretter filtrert, og til filtratet som inneholdt 4-pyridyloksiran ble det tilsatt 1,3 ml 33% etanolisk oppløsning av

35

metylamin. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved dens tilbakeløpstemperatur i 3 timer, hvorefter den ble inndampet til en tørr rest og til denne resten ble det tilsatt 20 ml kloroform, og en fast del ble frafiltrert. Filtratet ble inndampet, og den oppnådde olje-
 5 resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase: CHCl_3 : etylacetat = 10 : 2). Dette ga 0,30 g (55%) av tittelforbindelsen i form av oljebasen (molekylvekt: 152,196, bruttoformel: $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$).

Fremstilling av 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-metylamino)etanol

10 Til en kolbe inneholdende 0,54 g (2,6 mmol) DCC (dicykloheksylkarbodiimid) ble det tilsatt 2 ml metylenklorid og 0,54 g (2,6 mmol) 3,4-diklorfenyldiksyre i 4 ml metylenklorid ble tilsatt dråpevis, og dette ga en utfelling. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 5 minutter og 400 mg (2,6 mmol) 1-(4-pyridyl)-2-metylaminoetanol i 3 ml metylenklorid ble tilsatt og omrøring foretatt i ytterligere 1 time ved 20°C. Dette ga en utfelling
 15 som ble frafiltrert, og den resulterende oppløsningen ble inndampet. Det inndampede filtratet ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase: CHCl_3 : CH_3OH = 10 : 0,5). Dette ga 0,53 g (60%) 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-metylamino)etanol.

20 Fremstilling av tittelforbindelsen 1-(4-pyridyl)-2-[N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino]etanol (BK-38)

510 mg (13,5 mmol) litiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) ble anbragt i en kolbe, 6 ml vannfritt THF ble tilsatt og blandingen ble avkjølt på is. Til reaksjonsblandingen ble det
 25 under omrøring dråpevis tilsatt en oppløsning av 1,02 g (3 mmol) 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)acetyl)-N-metylamino)etanol i 10 ml vannfri THF. Etter fullført tilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt i ytterligere 1 time ved romtemperatur, avkjølt på is og 6,6 ml 15% NaOH ble tilsatt trinnvis under sterk omrøring og deretter ble 16 ml metylenklorid tilsatt. Den organiske fasen ble separert, tørket på vannfritt Na_2SO_4 og
 30 inndampet på en rotasjonsfordamper til oppnåelse av en oljerest som ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (silikagel 60, mobil fase: CHCl_3 : CH_3OH = 10 : 1). Dette ga 0,54 g (55%) av tittelforbindelsen i form av oljebase.

0,50 g (1,54 mmol) av den rensede oljebasen ble oppløst i 3 ml aceton. Den resulterende
 35 oppløsningen ble avkjølt på is og 1,8 ml etanolisk oppløsning av hydrobromsyre (0,274 g HBr; 3,4 mmol) ble tilsatt under omrøring. Dette ga en utfelling og til denne ble det tilsatt 3 ml dietyleter. Etter omrøring av reaksjonsblandingen på is i 2 timer ble det dan-

net et krystallinsk produkt som ble frafiltrert og vasket med dietyleter. Dette ga 0,64 g (85%) 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl)-N-metylamino)etanoldihydrobromid med smeltepunkt på 191 - 194°C (molekylvekt: 487.074; bruttoformel: $C_{17}H_{18}N_2OCl_2 \cdot 2HBr$).

5

1H NMR-spektrum, D_2O , ppm ifølge DSS (0ppm): 8.81 (2H), 8.14 (2H), 7.47 (2H), 7.22 (1H), 5.54 (1H), 3.50 (4H), 3.08 (5H)

IR-spektrum (KBr-skive) er vist på figur 7.

10

EKSEMPEL 5

Testing av fire sigmareseptorer (BK-31 . 2HBr, BK-33 . 2HBr, BK-35 . 2HBr og BK-38 . 2HBr) fra eksemplene 1 til 4, inhibitorer av kolesterolbiosyntese ved sterol-
 15 $\Delta 7,8$ -isomerasenivået.

20

Den inhiberende effekten på kolesterolbiosyntese til foreliggende nye sigmareseptorligander (BK-31 . 2 HBr, BK-33 . 2HBr, BK-35 . 2HBr og BK-38 . 2HBr), fremstilt ifølge eksemplene 1 til 4, ble evaluert. En *ex vivo*-metode for metabolisk merking av udødelige humane hepatocytter ble benyttet. Den radiomerkede kolesterolbiosyntese [3H]-acetat-forløperen ble tilsatt til cellene, med eller uten tilsetning av sigmaligander. Til slutt ble det utført to uavhengige forsøk med metabolisk merking og sterolanalyse for hver forbindelse.

25

Materialer og metoder

Cellekultur og tilsetning av sigmaligandreseptorer

30

Den udødelige humane hepatocytcellerlinjen HepG₂ ble fordelt på 75 cm²-kolber i forholdet 1 : 2, to kolber for hver tilstand. Cellene ble dyrket i DMEM-kultur (L-arginin.HCl 0,084 g/l, L-cystein L-cystein.2HCl 0,0626 g/l, L-glutamin 0,584 g/l, glycine 0.03 g/l, L-histidin.HCl.H₂O 0,042 g/l, L-isoleucin 0,105 g/l, L-leucin 0,105 g/l, L-lysin.HCl 0,146 g/l, L-metionin 0,03 g/l, L-fenylalanin 0,066 g/l, L-serin 0,042 g/l, L-treonin 0,095 g/l, L-tryptofan 0,016 g/l, L-tyrosin 2Na.2H₂O 0,10379 g/l, L-valin 0,094
 35 g/l, kolinklorid 0,004 g/l, folsyre 0,004 g/l, myo-inositol 0,0072 g/l, niacinamid 0,004 g/l, D-pantotensyre 0,004 g/l, pyridoksal.HCl 0,004 g/l, riboflavin 0,0004 g/l,

tiamin.HCl 0,004 g/l, kalsiumklorid $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,265 g/l, ferrinitrat $\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g/l, magnesiumsulfat [anhydrid] 0,09767 g/l, kaliumklorid 0,4 g/l, natriumklorid 6,4 g/l, basisk natriumfosfat [anhydrid] 0,109 g/l, glukose 4,5 g/l og fenolrødt, Na 0,0159 g/l) med 5% bovinserum og 1% L-glutamin. Etter 24 timer ble det tilsatt et medium av 100 μM ligander av sigmareseptorer (BK-31 $\cdot 2\text{HBr}$, BK-33 $\cdot 2\text{HBr}$, BK-35 $\cdot 2\text{HBr}$ and BK-38 $\cdot 2\text{HBr}$) til cellene. De kjente inhibitorene av kolesterolbiosyntese, 100 μM lovastatin eller pravastatin, begge inhibitorer av HMG-CoA reduktase, og 100 μM flukonazol som inhiberer enzymer i P450 famillien hvortil lanosterol 14α - demetylase (CYP51) også tilhører, ble benyttet som positive kontroller. Celler dyrket i normale medier uten tilsetning av inhibitorer tjente som negativ kontroll. Mediet ble byttet etter 24 timer. Etter 48 timer ble 40 μCi [^3H] acetat tilsatt pr. 1 ml av mediet (400 μCi pr. kolbe). Mediet ble aspirert etter 24 timer, og cellene ble tryptinisert med 2 ml trypsin. Cellene ble oppsamlet i 4 ml av mediet, sentrifugert og cellepelletten resuspendert i destillert vann (1 ml pr. kolbe). Cellene ble homogenisert ved fryse-tining. Steroler ble ekstrahert fra homogenatet. Proteinkonsentrasjon ble bestemt i homogenatet med Bio-rad reagensen ifølge produsenten anbefalte protokoll.

Sterolekstraksjon

Homogenatet ble overført til små glassflasker med inert hette. 3 ml av ekstraksjonsoppløsningen (75% n-heptan : 25% isopropanol (vol/vol) ble tilsatt. De lukkede flaskene ble utsatt for sterk rysting i en rysteanordning i et mørkt rom i 2 timer. Etter ekstraksjonen ble flaskene sentrifugert (2000 g, 10 min), den organiske fasen ble overført til glassrør, tørket under nitrogen og vasket med 2 ml n-heptan av HPLC-kvalitet, sentrifugert (2000 g, 5 min) og den organiske fasen overført til nye glassrør. Før analyse ble prøver lagret i oppløsningsmiddel av HPLC-kvalitet i mørket og under kjølige forhold.

HPLC analyse

30

HPLC står for høytytelsesvæskeskromatografi)

De tørkede ekstraktene ble oppløst i 250 μl n-heptan. 100 μl porsjoner ble injisert i normalfase-kolonnen (ChromSpher Si, 150 mm x 3 mm, partikkelstørrelse 5 μm) med

den mobile fasen 99,5% n-heptan: 0,5% isopropanol ved en strømningsrate på 1 ml/min og ved romtemperatur.

Deteksjon av steroler

5

Sterolene ble detektert med UV-detektor ved to bølgelengder: 200 nm for lanosterol/T-MAS og kolesterol og 249 nm for 4,4-dimetyl- α -kolesta-8,14,24-trien-3 β -ol (FF-MAS) og indre standard ergosterol. For bestemmelse av sterol etter metabolisk merking ble det benyttet en radiodetektor med gjennomstrømningscelle. Sterolbestemmelsen ble utført i henhold til retensjonstider for standardene: lanosterol (Steraloids), kolesterol (Steraloids), ergosterol (Sigma), 4,4-dimetyl- α -kolesta-8,14,24,-trien-3 β -ol (FF-MAS) og [^3H] FF-MAS (laboratoriekilde A.G.Byskov, Rikshospitalet, København Universitet). Resultatene ble normalisert ifølge mengden av intern ergosterolstandard og konsentrasjonen av proteiner i homogenatet. Resultatene representerer gjennomsnittsverdien for to målinger med behørig standardavvik.

15

Resultater

Metaboliske merkinger av cellene viste utmerkede resultater for nivået av en nedsatt mengde syntetisert kolesterol. Kolesterol hadde en topp for radiodetektoren ved ca. 6,0 min. Figur 3 viser mengden av radiomerket kolesterol etter metabolisk merking av cellene og tilsetningen av forskjellige inhibitorer. Negativ kontroll, normalt medium – medium uten tilsetning av inhibitorer, A – analyse 1, B – analyse 2, AU – vilkårlige enheter. Kolesteroltopp, som vist på figur 3, var signifikant senket i cellene med tilsatte sigmaligander, og var tydeligst for forbindelsen med signatur BH-35 . 2HBr. I tillegg til en fullstendig blokkering i kolesterolsyntesen, slik det fremgår fra figur 3, viste de testede forbindelsene også en effekt på akkumulering av tidlige mellomprodukter i kolesterolbiosyntesens postsqualendel. En forøket mengde av sterolene som representerer lanosterol eller 4,4-dimetyl- α -kolesta-8(9),24,-dien-3 β -ol (T-MAS) ble registrert. Den største innvirkningen ble utvist av forbindelsen med signatur BK-35 . 2HBr med ti gangers økning av dannet mellomprodukt, som vist på fig. 4. Figur 4 viser mengden av det radiomerkede mellomproduktet sterol X som ble eluert etter kolesterol

30

(7-dehydrokolesterol eller lanosterol). Signaturene er de samme som på fig. 3. A – analyse 1, B – analyse 2.

All analyse bekrefter at de nye derivatene av pyridyletanol(fenyletyl)aminer som
 5 sigmaligander ifølge foreliggende oppfinnelse blokkerer kolesterolsyntese og mest sannsynlig ved sterol $\Delta 8,7$ -isomerasenivået. I nærvær av forbindelsen med signatur BK-35.2HBr blir kolesterolmengden minsket og mengden av mellomprodukter som foreligger før sterol $\Delta 8,7$ -isomasetrinnet blir forøket.

10 De velkjente inhibitorene av HMG-CoA-reduktase (lovastatin og pravastatin) og lanosterol 14α -demetylase (flukonazol) tjente som positive kontroller for disse analysenes nøyaktighet. Lovastatin og pravastatin ga fullstendig blokkering av biosyntesen, som vist i figur 3. Fluconazol var som forventet en svakere inhibitor av kolesterolbiosyntese fordi den ikke er en spesifikk inhibitor av den humane lanosterol-
 15 14α demetylase. Mengden av lanosterol eller 4,4-dimetyl- α -kolesta-8(9),24,-dien-3 β -ol (T-MAS) ble ikke forøket av statinene fordi disse forbindelsene blokkerer biosyntesen ved HMG-CoA reduktasenivået som forekommer ved begynnelsen av kolesterolbiosyntese-reaksjonsveien, og dermed før lanosterol og T-MAS.

20 Konklusjoner

Det er funnet at celler dyrket i nærvær av de testede forbindelsene med signaturene BK-31 . 2HBr, BK-33 . 2HBr, BK-35 . 2HBr og BK-38 . 2HBr, i signifikant grad syntetiserer nedsatte mengder av kolesterol. På grunnlag av disse resultatene kan det
 25 konkluderes med at alle testede forbindelser, dvs. nye derivater av pyridyletanol(fenyletyl)aminer ifølge foreliggende oppfinnelse er inhibitorer av kolesterolbiosyntese, mest sannsynlig ved sterol $\Delta 7,8$ -isomerasenivået. Den største senkingen av kolesterol blir observert for forbindelsen med signatur BK-35 . 2HBr, det vil
 si, 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorofenyl)etyl)-N-propylamino)etanoldihydrobromid. Resultatene som er oppnådd i de siste to uavhengige
 30 forsøkene er reproducerbare og viser at av alle testede sigmaligander er forbindelsen med signatur BK-35.2HBr den beste inhibitoren av kolesterolbiosyntese ifølge

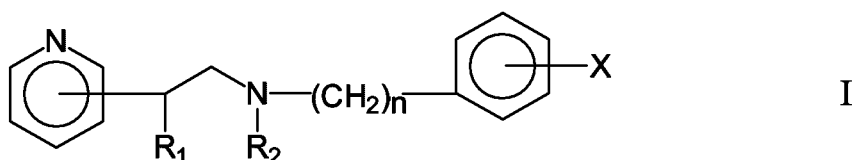
foreliggende oppfinnelse og er således særlig egnet for behandling av hyperkolesterolemi og hyperlipemi.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelser, k a r a k t e r i s e r t v e d at de har formel I

5



hvor

n er et helt tall fra 1 til 4,

10 R₁ er en hydroksylgruppe,R₂ er en rettkjedet eller forgrenet lavere C₁₋₆alkylgruppe,X er hydrogen, fluor, klor, brom, hydroksylgruppe, trifluormetylgruppe, 3,4-di-Cl, 2,4-di-Cl eller lavere C₁₋₆alkoksygruppe,

og enantiomerer, diastereoisomerer eller racemater derav eller de fysiologisk akseptable

15 syreaddisjonssaltene derav.

2.

Forbindelser ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at n er et helt tall 2, R₁ er en hydroksylgruppe, R₂ er en metyl-, etyl-, n-propyl-, isopropyl-, n-butyl- eller isobutylgruppe og X er et hydrogenatom eller fenyl disubstituert med 2

20 kloratomer i posisjonen 3 og 4 eller i posisjonene 2 og 4.

3.

Forbindelse ifølge krav 1 og 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at R₁

25 er en hydroksylgruppe i RS-konfigurasjonen.

4.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er 1-(3-pyridyl-2-(N-(2-(3,4-diklorofenyl)etyl-N-propylamino)etanol og et

30 dihydrobromidsalt derav.

5.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-fenyletyl)-N-propylamino)etanol og et dihydrobromidsalt derav.

5 6.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er 1-(3-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)etyl-N-metylamino)etanol og et dihydrobromidsalt derav.

10 7.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er 1-(4-pyridyl)-2-(N-(2-(3,4-diklorfenyl)-N-metylamino)etanol og et dihydrobromidsalt derav.

15 8.

Forbindelser av formel I ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 og de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav som ligander av sigmareseptorer for inhibering av kolesterolbiosyntese i behandlingen av hyperkolesterolemi og hyperlipemi hos mennesker.

20

9.

Farmasøytiske preparater, k a r a k t e r i s e r t v e d at de innbefatter forbindelsen av formel I ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 og de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav.

25

10.

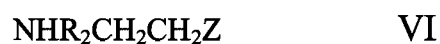
Anvendelse av forbindelsene av formel I ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 og de fysiologisk akseptable syreaddisjonssaltene derav som ligander av sigmareseptorer for inhibering av kolesterolbiosyntese, for fremstilling av farmasøytiske preparater for
30 behandling av hyperkolesterolemi og hyperlipemi hos mennesker.

11.

Fremgangsmåte for fremstilling av forbindelsene av formel I ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten innbefatter

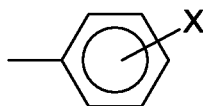
5

a) alkylering av sekundære aminer av formel VI



hvor

10 R_2 er som definert ovenfor i formel I og Z er en gruppe



hvor X er som definert ovenfor i formel I,

15 med pyridyloksiran av formel VII



og, om ønsket, omdannelse av de oppnådde forbindelsene av formel I til saltet, eller

20 b) alkylering av primære aminer av formel VIII

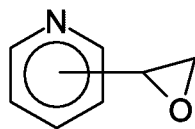


hvor R_2 er som definert ovenfor i formel I,

25

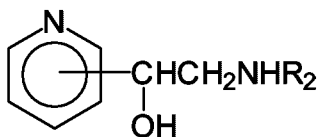
med pyridyloksiran av formel VII

25



VII

til mellomproduktforbindelser av formel IX



IX

5 hvor R_2 er som definert ovenfor i formel I,

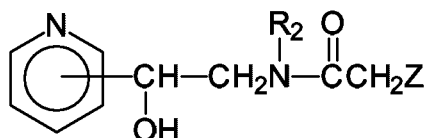
og kondensering med derivatene av fenyleddiksyre av formel X



10

hvor Z er som definert ovenfor,

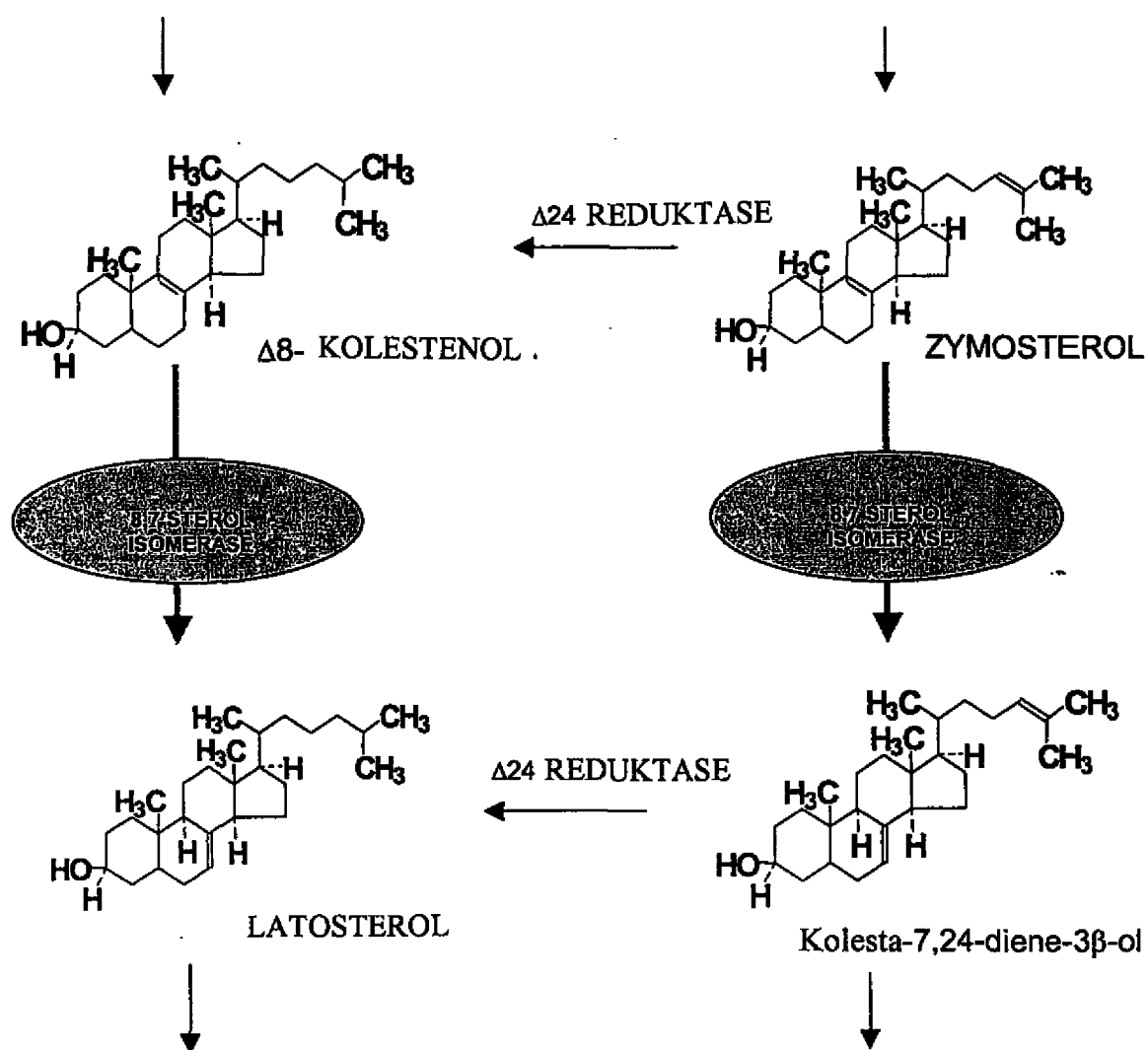
til mellomproduktforbindelser av formel XI



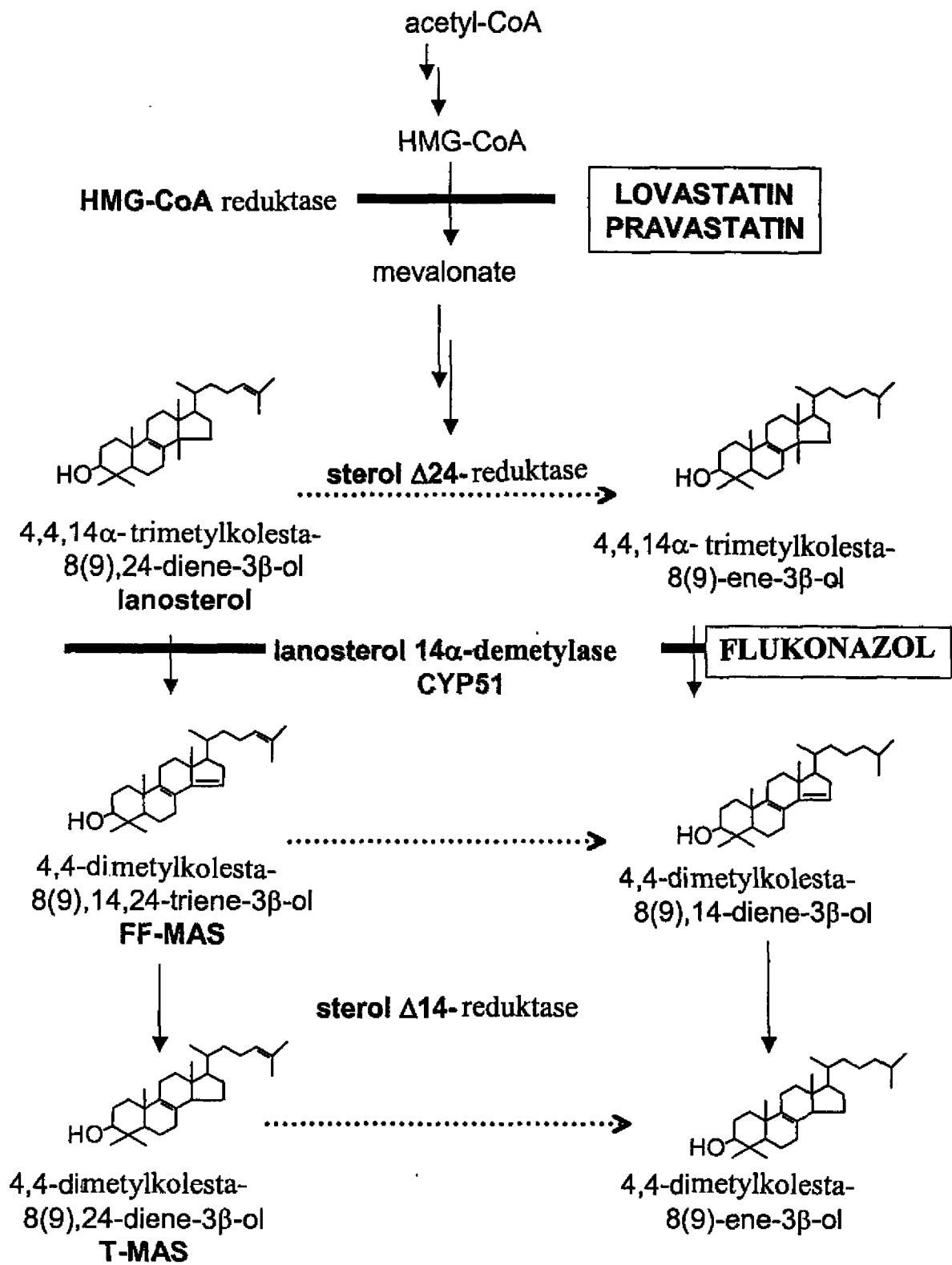
XI

15 og redusering av disse til tittelforbindelsen formel I, og om ønsket, omdannelse av disse til saltet.

Figur 1



Figur 2



Figur 2

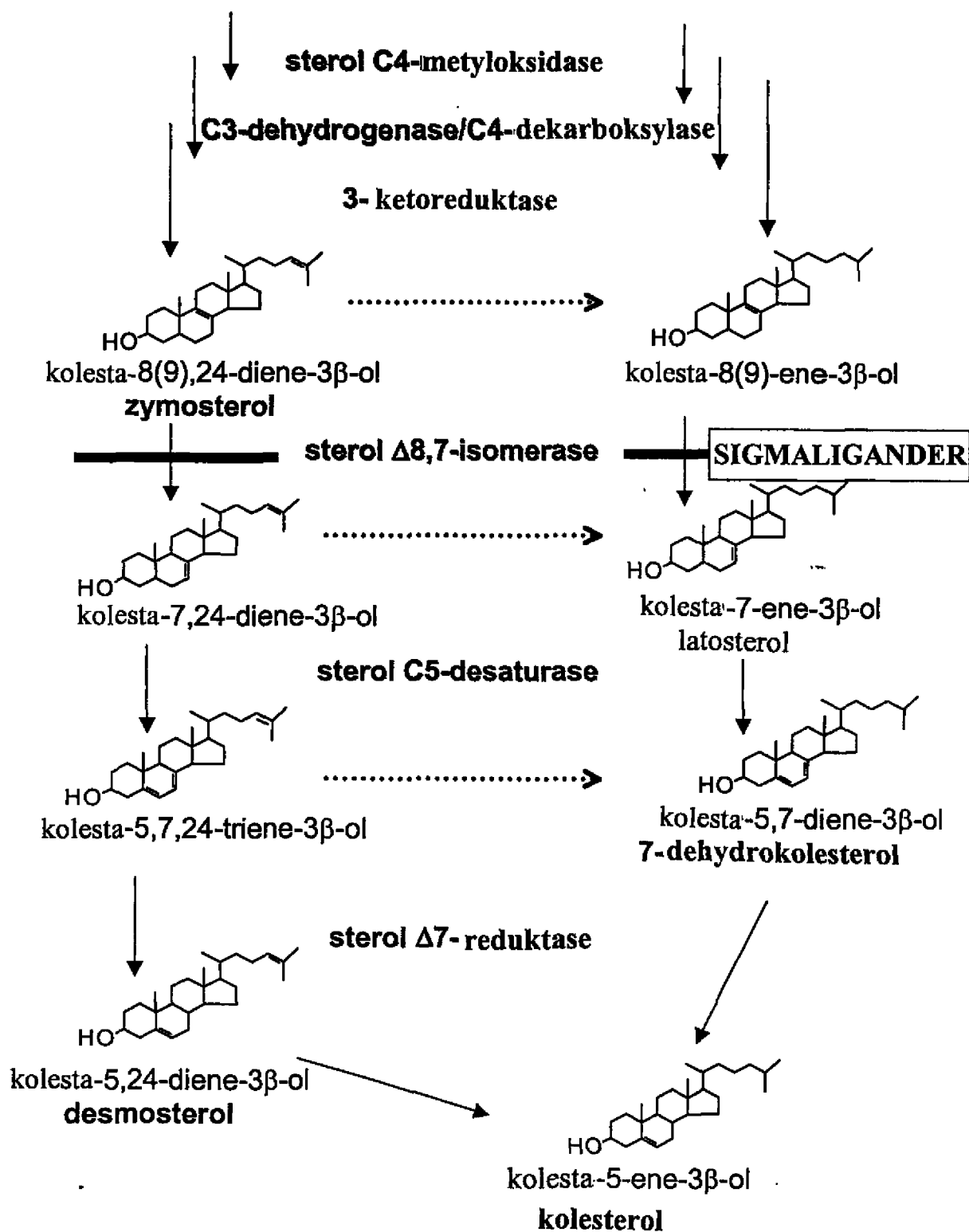
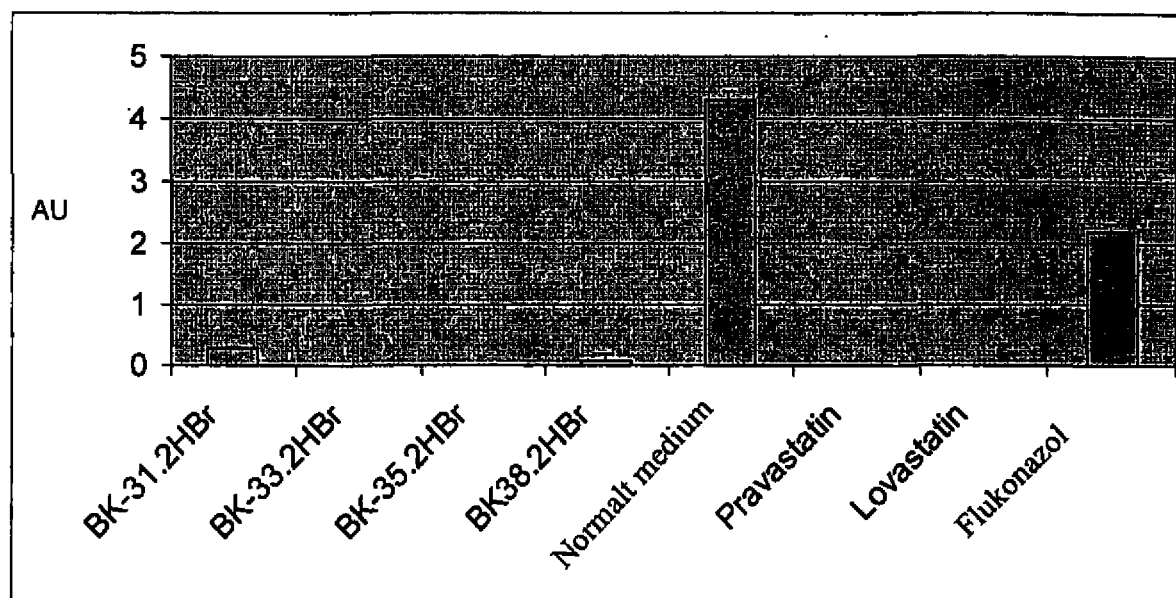
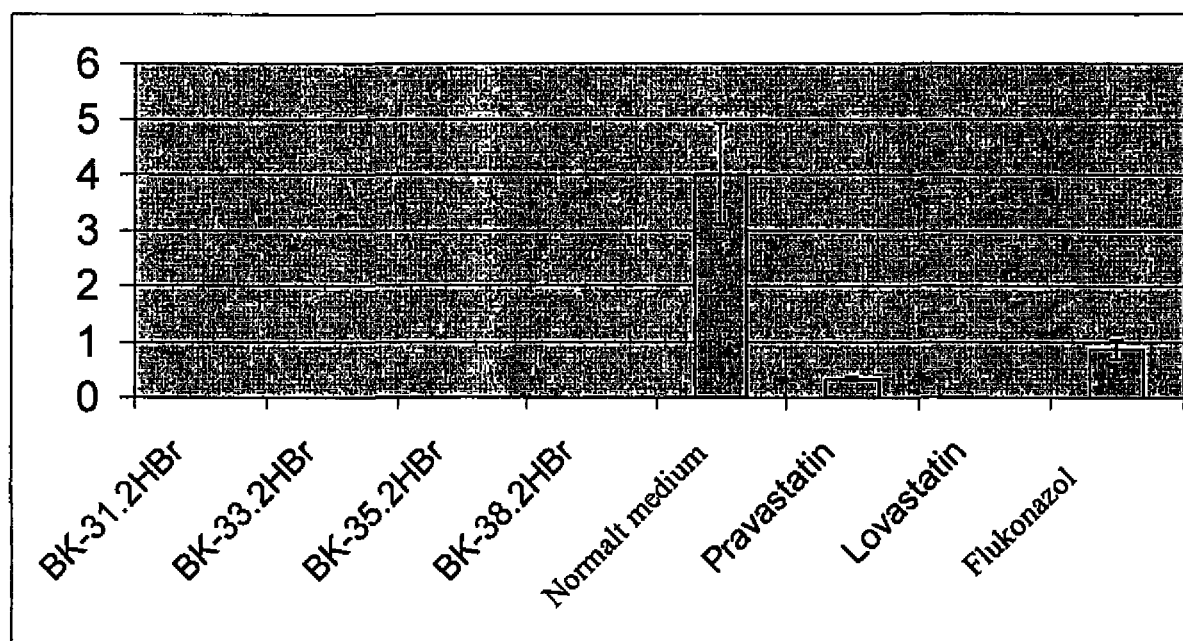


Figure 3

A

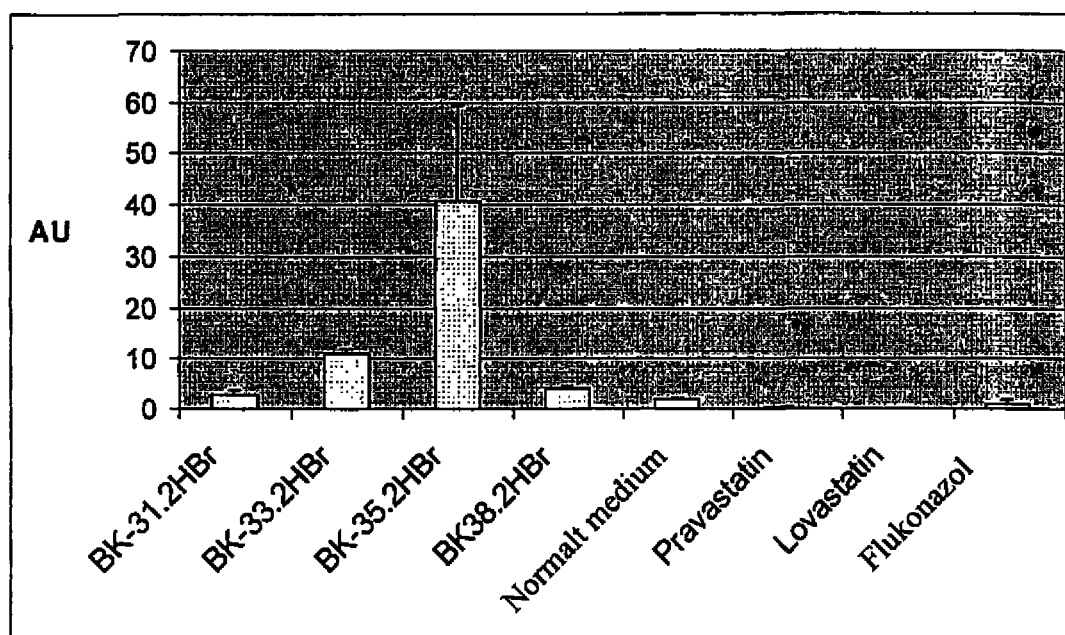


B

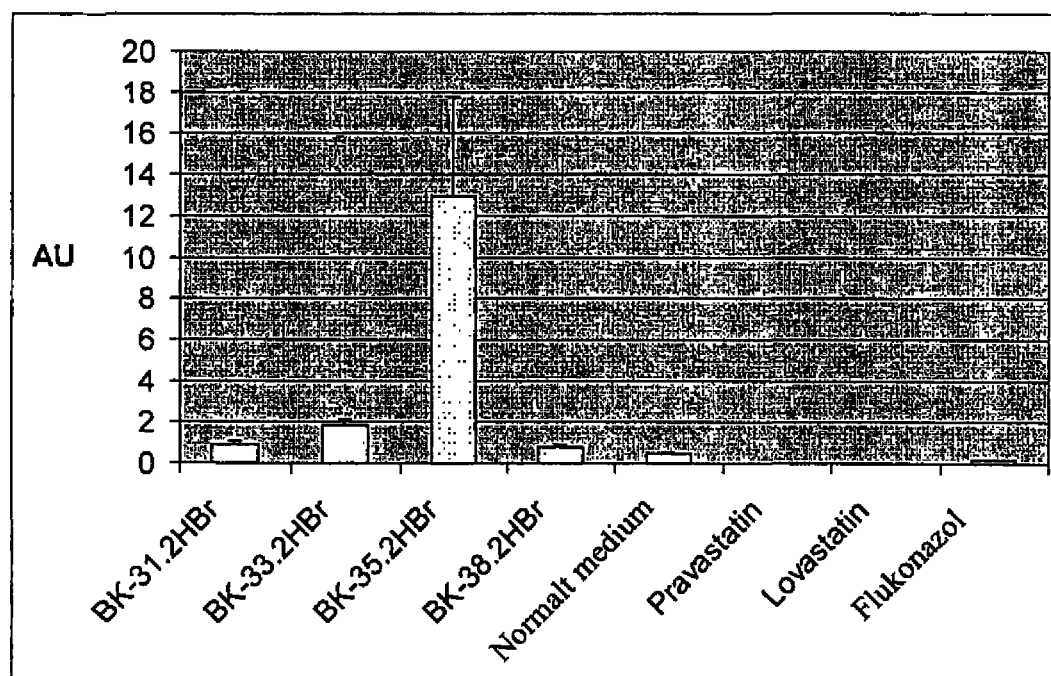


Figur 4

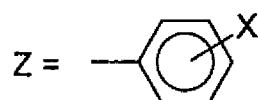
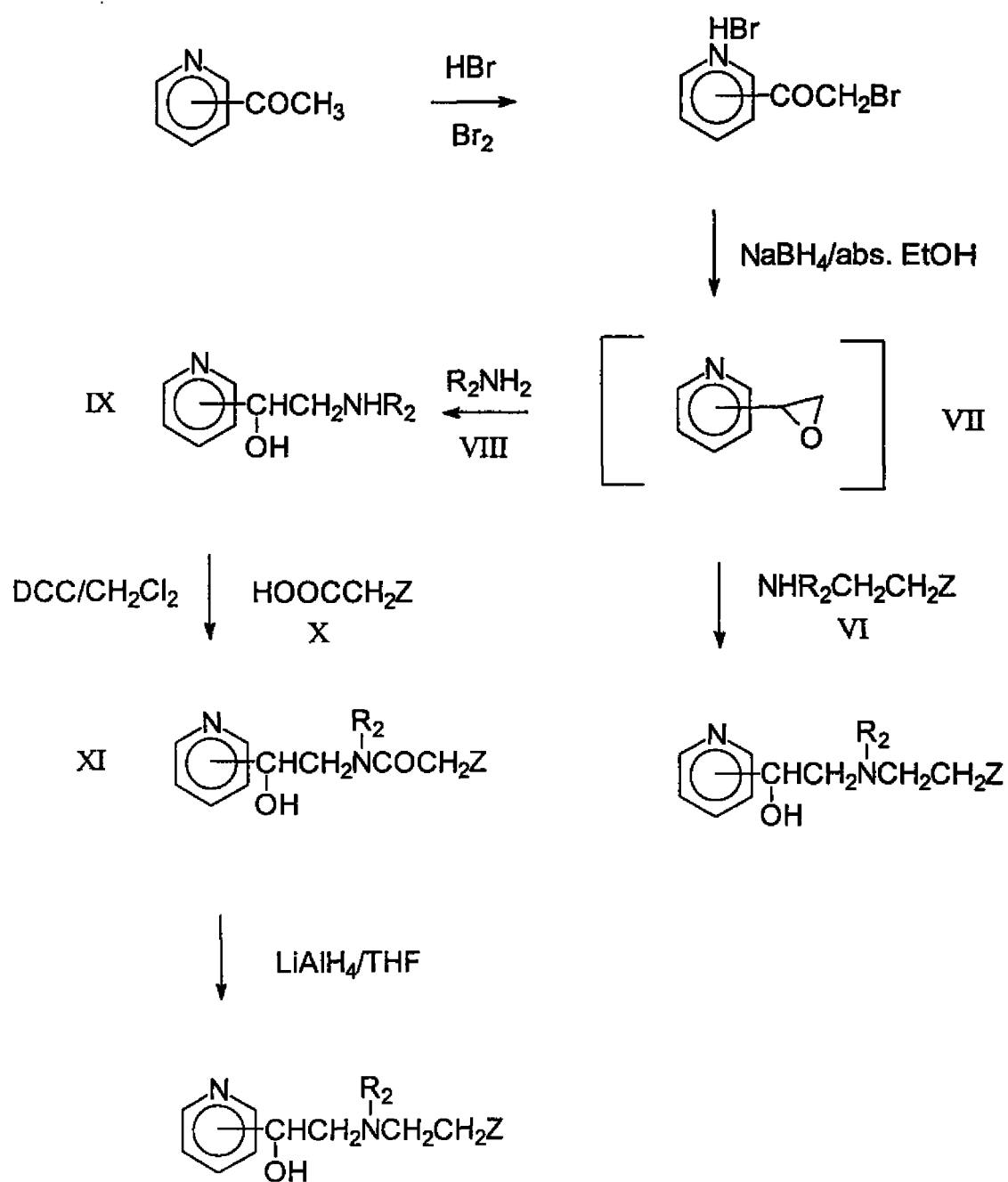
A



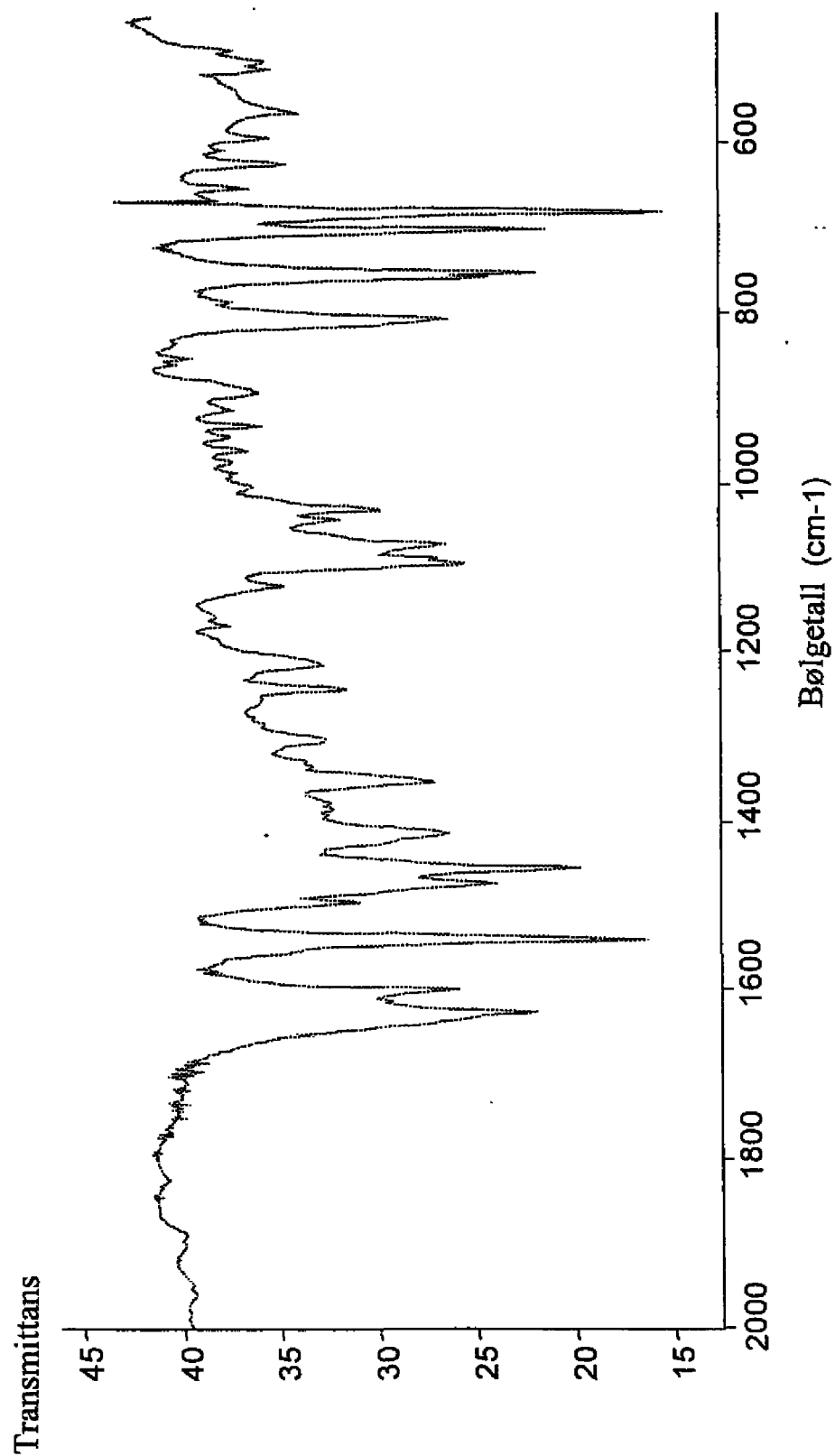
B



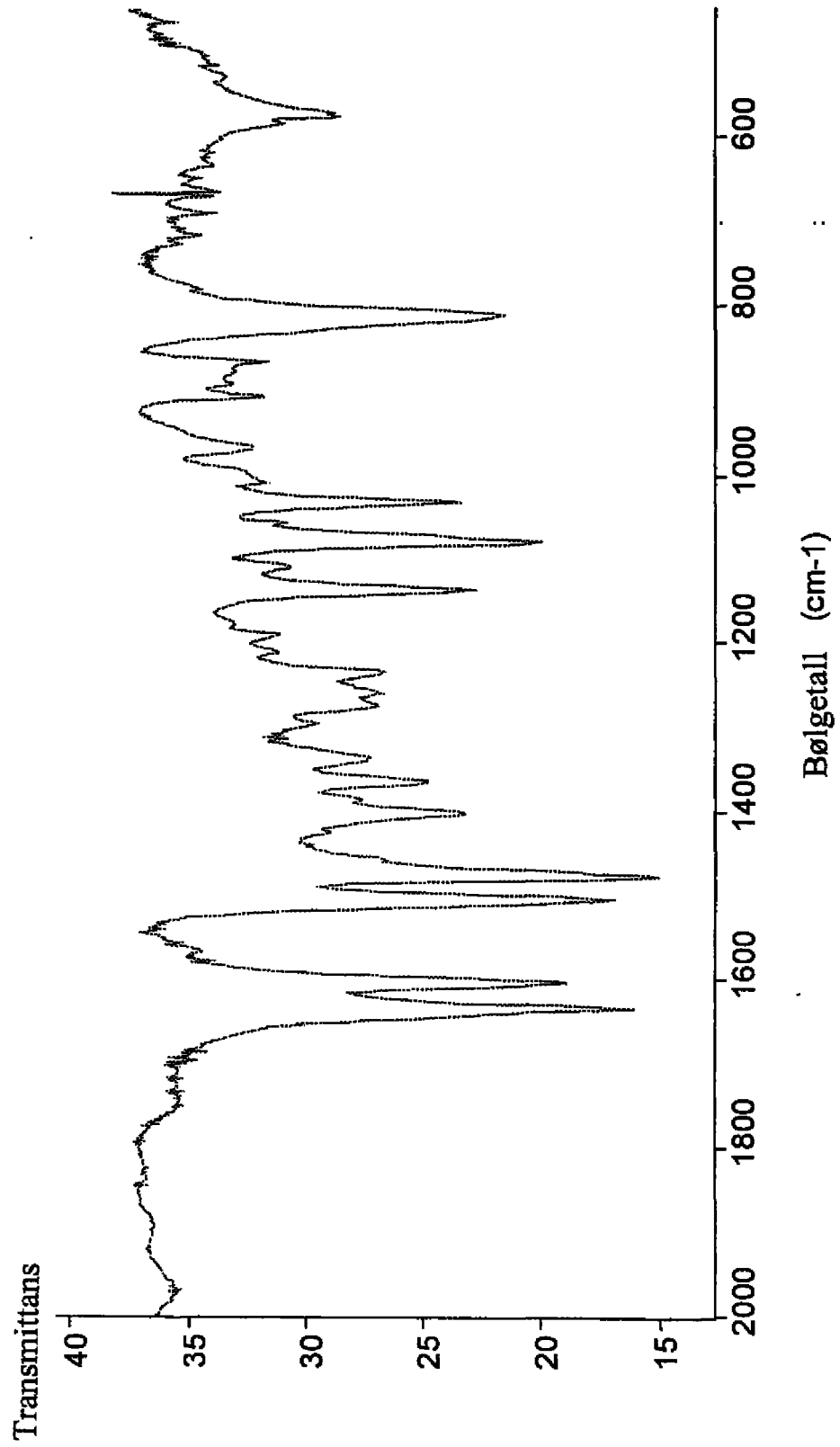
Figur · 5



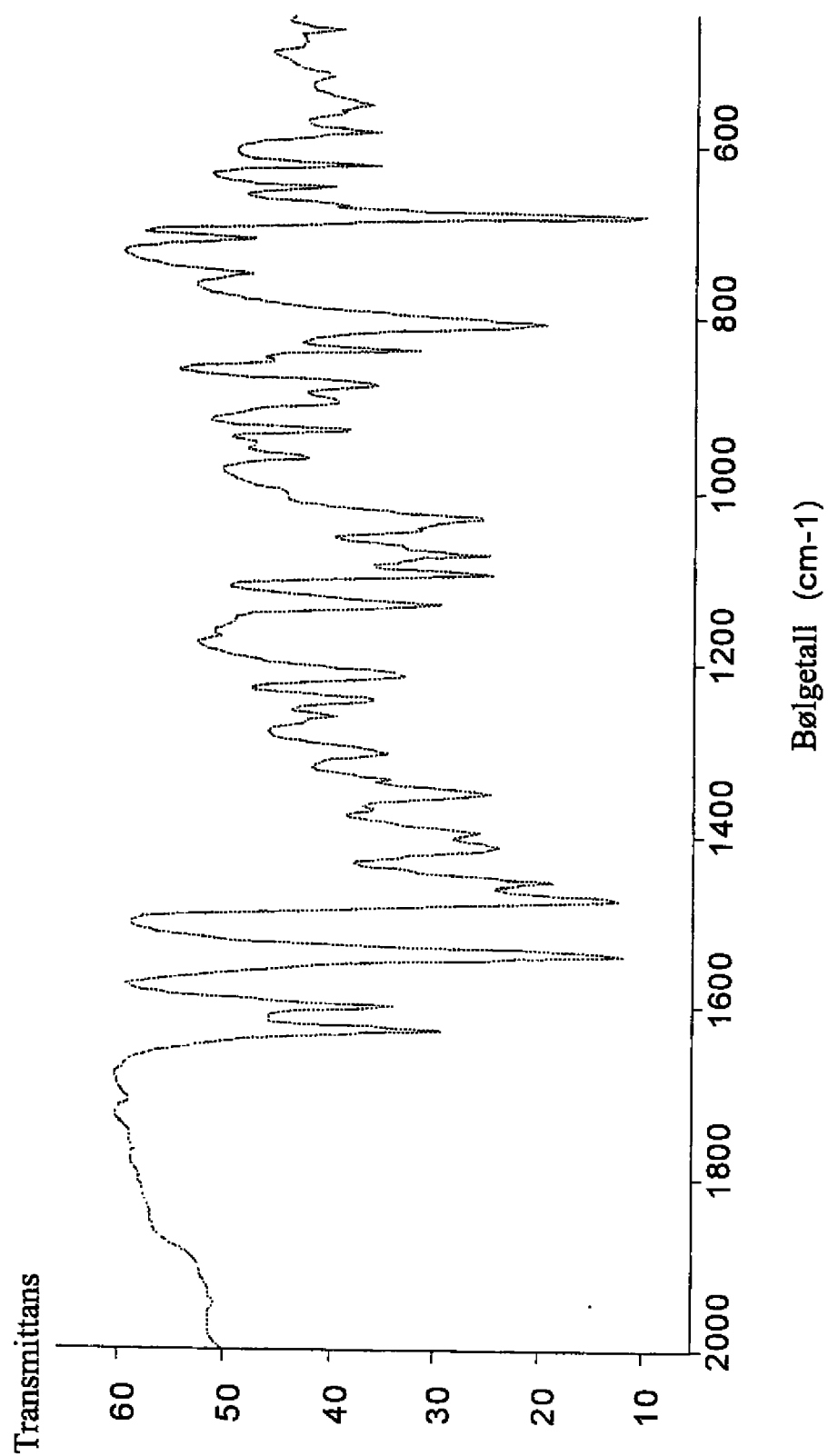
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

