

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 2044/2009
(22) Anmeldetag: 28.12.2009
(45) Veröffentlicht am: 15.07.2014

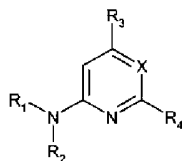
(51) Int. Cl.: **C07D 213/74** (2006.01)
C07D 239/42 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
WO 2006000420 A1
USUI, S. et al. Identification of novel PPARalpha ligands by the structural modification of a PPARgamma ligand. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, Vol. 16, Seiten 3249-3254.
WAGAW, S. et al. The Synthesis of Aminopyridines: A Method Employing Palladium-Catalyzed Carbon-Nitrogen Bond Formation. J. Org. Chem. 1996, Vol. 61, Nr. 21, Seiten 7240-7241.
DE 10063173 A1
EP 1364952 A1
WO 2006037117 A1
WO 2003063794 A2
WO 2003002544 A1

(73) Patentinhaber:
TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
1040 WIEN (AT)
(72) Erfinder:
MIHOVILOVIC MARKO DIPL.ING. DR.
PERCHTOLDSORF (AT)
SCHNÜRCH MICHAEL DR.
WIENER NEUSTADT (AT)
KOLEY MOUMITA MSc
WIEN (AT)
HILBER KARLHEINZ DR.
WIEN (AT)
KÖNIG XAVER DIPL.ING.
MÖDLING (AT)
(74) Vertreter:
HÄUPL & ELLMEYER KG,
PATENTANWALTSKANZLEI
WIEN

(54) SUBSTITUIERTE PYRIDINE UND PYRIMIDINE

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Produktion von cardiomyocytenähnlichen Zellen, umfassend die Kultivierung von Säugetierzellen in Gegenwart einer Verbindung der Formel



worin X CH oder N ist,

R₁ und R₂ sowie R₅ und R₆ jeweils H, Alkyl, Aryl oder Cycloalkyl sind und R₃ und R₄ jeweils H oder NR₅R₆ sind,

oder

R₁ und R₂ und/oder R₅ und R₆ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen heterocyclischen Ring bilden, oder

R₁ und/oder, wenn X CH ist, R₅ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, und zusammen mit einem C-Atom des Pyrimidin- oder

Pyridin-Rings einen heterocyclischen Ring bildet/bilden,

wobei die Alkyl-, Aryl- oder Cycloalkyl-Gruppen von R₁, R₂, R₅ und R₆ mit 0 bis 2 Gruppen R_{1a}, ausgewählt aus Halogen, Alkyl, Alkoxy, -OH, -N(R_{1b}, R_{2b}), -SO₂N(R_{1b}, R_{2b}), -C(O)N(R_{1b}, R_{2b}), Heterocyclyl, -O-Aryl und -N-Aryl, substituiert sind, wobei R_{1b} und R_{2b} Wasserstoff oder Alkyl sind;

mit der Maßgabe:

dass R₄ nicht NR₅R₆ ist, wenn X N ist, und dass als Säugetierzellen keine menschlichen omnipotenten Zellen eingesetzt werden.

Beschreibung

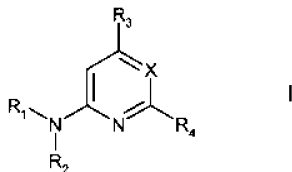
SUBSTITUIERTE PYRIDINE UND PYRIMIDINE

[0001] Die vorliegende Erfindung beinhaltet substituierte Pyridine und Pyrimidine, die als pharmazeutisch nützliche Substanzen identifiziert wurden. Im speziellen haben solche Substanzen einen cardiomyogenen Effekt auf omnipotente, pluripotente und auf bestimmte Zelllinien vorgeprägte Säugetierzellen die für die intra-cardiale (intra cardiac) Transplantation zur Behandlung von Herzkrankheiten benutzt werden können.

[0002] Die Bildung von Herzmuskelzellen (cardiac myocytes) (Cardiomyocyten), oder cardiomyocytenähnlichen Zellen von transplantierten Säugetierzellen in das Herz eines Patienten ist eine sehr wichtige Methode. Zum Beispiel kann es dadurch zu einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt kommen.

[0003] Gemäß vorliegender Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass cardiomyocytenähnliche Zellen nicht nur von omnipotenten oder pluripotenten Säugetierzellen sondern auch von Zelllinien vorgeprägte Säugetierzellen wie zum Beispiel Vorläuferzellen von Skelettmuskelzellen (skeletal muscle-committed cells) (Skelett Myoblasten) (skeletal myoblasts) erhalten werden können, wenn sie mit bestimmten neuen Verbindungen behandelt werden, wie sie durch diese Erfindung bereitgestellt werden.

[0004] In einer Hinsicht stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Produktion von cardiomyocytenähnlichen Zellen, umfassend die Kultivierung von omnipotenten, pluripotenten oder Zelllinien vorbestimmten Säugetierzellen, insbesondere Skelett- Myoblasten, in Gegenwart einer Verbindung der Formel



[0005] bereit, worin

[0006] X CH oder N ist,

[0007] R₁ und R₂ unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder Cycloalkyl sind,

[0008] R₃ und R₄ unabhängig voneinander H oder NR₅R₆ sind,

[0009] R₅ und R₆ unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder Cycloalkyl sind;

[0010] oder

[0011] R₁ und R₂ und/oder R₅ und R₆ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, jeweils einen heterocyclischen Ring mit 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O und S, bilden, oder

[0012] R₁ und/oder, wenn X CH ist, R₅ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie jeweils gebunden sind, und zusammen mit einem C-Atom des Pyrimidin- oder Pyridin-Rings einen heterocyclischen Ring bildet/bilden,

[0013] wobei die Alkyl-, Aryl- oder Cycloalkyl-Gruppen von R₁, R₂, R₅ und R₆ mit 0 bis 2 Gruppen R_{1a} substituiert sind, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogen, Alkyl, Alkoxy, -OH, -N(R_{1b}, R_{2b}), -SO₂N(R_{1b}, R_{2b}), -C(O)N(R_{1b}, R_{2b}), Heterocyclyl, -O-Aryl und -N-Aryl, wobei R_{1b} und R_{2b} unabhängig voneinander aus Wasserstoff und Alkyl ausgewählt sind;

[0014] mit der Maßgabe:

[0015] dass R₄ nicht NR₅R₆ ist, wenn X N ist, und

[0016] dass als Säugetierzellen keine menschlichen omnipotenten Zellen eingesetzt werden.

[0017] In einer Verbindung der Formel I gilt bevorzugt:

[0018] R_1 ist Wasserstoff, Alkyl; wie C_{1-4} Alkyl; z.B. inklusive C_{1-2} Alkyl substituiert mit Aryl, Cycloalkyl wie C_{3-8} Cycloalkyl, oder Aryl, wie C_{6-12} Aryl;

[0019] wobei Alkyl, Cycloalkyl oder Aryl unsubstituiert oder mit 0-2 Gruppen R_{1a} substituiert sind, wobei die R_{1a} Gruppen unabhängig von einander ausgewählt sind aus Halogen, Alkyl, z.B. C_{1-4} Alkyl, Alkoxy, z.B. C_{1-4} Alkoxy, -OH, -N(R_{1b} , R_{2b}), -SO₂N(R_{1b} , R_{2b}), -C(O)N(R_{1b} , R_{2b}), Heterocyclyl, -N-Aryl und -O-Aryl, oder

[0020] wenn die R_{1a} Gruppen an benachbarte Atome gebunden sind, bilden die R_{1a} Gruppen gegebenenfalls zusammen eine Gruppe -O-(CH₂)₁₋₂-O-, -OC(CH₃)₂CH₂- oder -(CH₂)₃₋₄-, oder

[0021] R_1 und R_2 bilden zusammen mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen heterocyclischen Ring, welcher gegebenenfalls mit Alkyl, wie C_{1-4} Alkyl, Cycloalkyl, wie C_{3-8} Cycloalkyl, Hydroxyalkyl, wie Hydroxy C_{1-4} alkyl, Alkylaryl oder Aryl, wie C_{0-2} Alkylaryl substituiert ist; oder

[0022] R_1 bildet zusammen mit dem Stickstoff, an den es gebunden ist, und zusammen mit einem C-Atom des Pyrimidin- oder Pyridin-Rings einen Ring, welcher gegebenenfalls mit Alkyl, wie C_{1-4} Alkyl, Cycloalkyl, wie C_{3-8} Cycloalkyl, Hydroxyalkyl, wie Hydroxy C_{1-4} alkyl, Alkylaryl oder Aryl, wie C_{0-2} Alkylaryl, substituiert ist; und

[0023] jede Gruppe R_{1b} oder R_{2b} ist unabhängig voneinander ausgewählt aus Wasserstoff und Alkyl, wie C_{1-4} Alkyl, oder R_{1b} oder R_{2b} bilden zusammen mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, Heterocyclyl.

[0024] In einer Verbindung der Formel I gilt bevorzugt:

[0025] R_2 ist Wasserstoff, Alkyl, wie C_{1-4} Alkyl; z.B. inklusive C_{1-2} Alkyl substituiert mit Aryl, Cycloalkyl wie C_{3-8} Cycloalkyl, oder Aryl, wie C_{6-12} Aryl;

[0026] wobei Alkyl, Cycloalkyl oder Aryl gegebenenfalls mit 0-2 Gruppen R_{1a} substituiert sind, wobei R_{1a} wie oben beschrieben definiert ist;

[0027] In einer Verbindung der Formel I gilt bevorzugt:

[0028] R_5 und R_6 haben die Bedeutung wie hier für R_1 bzw. R_2 beschrieben.

[0029] In einer Verbindung der Formel I gilt noch mehr bevorzugt:

[0030] - X ist N oder CH, und/oder

[0031] - R_1 ist C_{3-8} Cycloalkyl oder C_{1-3} Alkyl, gegebenenfalls substituiert mit Hydroxy, z.B. C_{1-3} Alkyl, unsubstituiert oder substituiert mit Hydroxy, und C_{3-8} Cycloalkyl, das unsubstituiert ist,

z.B. ist R_1 Methyl, Ethyl, Propyl, wie n-Propyl, Isopropyl, Hydroxyethyl, wie

2-Hydroxyethyl, Hydroxypropyl, wie 3-Hydroxypropyl, Cyclohexyl; und/oder

[0032] - R_2 ist H; und/oder

[0033] - R_5 ist Methoxyphenyl, wie 3-Methoxyphenyl, 4-Methoxyphenyl; Morpholinylphenyl, wie 4-Morpholin-1-yl-phenyl, Phenylaminophenyl, wie 4-Phenylamino-phenyl, Phenoxyphenyl, wie 4-Phenoxy-phenyl; und/oder

[0034] - R_6 ist H.

[0035] In einer Verbindung der Formel I kann jede definierte Gruppe von Substituenten eine bevorzugte Gruppe von Substituenten sein, z.B. unabhängig von jeder anderen definierten Gruppe von Substituenten oder definierten Einzelsubstituenten. In einer Verbindung der Formel I kann jeder definierte Einzelsubstituent ein bevorzugter Substituent sein, z.B. unabhängig von jeder anderen definierten Gruppe von Substituenten oder definierten Einzelsubstituenten.

[0036] Besonders bevorzugt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren unter Verwendung einer Verbindung der Formel I zur Verfügung, die ausgewählt ist aus:

[0037] 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino) ethan-1-ol,

[0038] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol,

[0039] N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,

[0040] 2-(6-(4-Morpholinophenylamino) pyrimidin-4-ylamino) ethanol,

[0041] N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4,6-diamin,

[0042] 3-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol,

[0043] 2-(6-(4-(Phenylamino)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,

[0044] 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,

[0045] N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-propylpyrimidin-4,6-diamin,

[0046] N⁴-Ethyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,

[0047] N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-methylpyrimidin-4,6-diamin,

[0048] N⁴-Isopropyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,

[0049] 2-(6-(3-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,

[0050] 2-(4-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,

[0051] 2-(4-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,

[0052] 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,

[0053] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol,

[0054] 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol, und

[0055] 3-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol;

[0056] z.B. eine Verbindung wie in den Beispielen 1 bis 19 dargelegt.

[0057] Falls hier nicht speziell anders definiert, umfasst jede Gruppe (jeder Substituent) 1 bis 18 C-Atome, zum Beispiel:

[0058] - Alkyl schließt z.B. (C₁₋₄)Alkyl ein,

[0059] - Cycloalkyl schließt z.B. (C₃₋₈)Cycloalkyl ein,

[0060] - Alkoxy schließt z.B. (C₁₋₄)Alkoxy ein,

[0061] - Aryl schließt (C₆₋₁₈)Aryl, z.B. Phenyl, ein,

[0062] - Arylalkyl schließt z.B. (C₆₋₈)Aryl(C₁₋₂)alkyl ein,

[0063] - Heterocyclyl und heterocyclische Ringe schließen z.B. mit ein:

[0064] - aliphatisches und aromatisches Heterocyclyl,

[0065] - 4- bis 8-gliedriges Heterocyclyl,

[0066] - Heterocyclyl, gegebenenfalls anelliert mit einem anderen Ring (System), z.B. anelliert mit Aryl; z.B. oder anelliert mit einem heterocyclischen Ring (System);

[0067] - Heterocyclyl mit 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O, S;

[0068] z.B. inklusive Morpholinyl;

[0069] - Halogen schließt F, Cl, Br, I ein.

[0070] Verbindungen der Formel I umfassen Verbindungen in jeglicher Form, z.B. in freier Form und in der Form von Co-Kristallen, in der Form von Salzen, in der Form von Solvaten und in der

Form eines Salzes und eines Solvats.

[0071] Besonders bevorzugt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren unter Verwendung einer Verbindung der Formel I in der Form eines Salzes zur Verfügung.

[0072] Derartige Salze umfassen bevorzugt pharmazeutisch annehmbare Salze, obwohl pharmazeutisch nicht annehmbare Salze miteingeschlossen sind, z.B. zum Zweck der Herstellung / Isolierung / Reinigung.

[0073] Ein Salz einer Verbindung der Formel I inkludiert ein Metallsalz oder ein Säureadditionssalz. Metallsalze umfassen zum Beispiel Alkali- oder Erdalkalimetallsalze; Säureadditionssalze inkludieren Salze einer Verbindung der Formel I mit einer Säure.

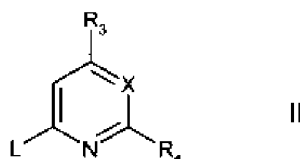
[0074] Eine Verbindung der Formel I in freier Form kann in die entsprechende Verbindung in der Form eines Salzes umgewandelt werden und umgekehrt. Eine Verbindung der Formel I in freier Form oder in der Form eines Salzes und in der Form eines Solvates kann in die entsprechende Verbindung in freier Form oder in Salzform in nicht solvatisierter Form umgewandelt werden und umgekehrt.

[0075] Eine Verbindung der Formel I kann gegebenenfalls in der Form von Isomeren oder Isomerengemischen vorliegen; z.B. als optische Isomere, Diastereoisomere, cis/trans- Konformere. Eine Verbindung der Formel I kann z.B. asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten und kann daher in der Form von Enantiomeren oder Diastereoisomeren und Gemischen davon vorliegen, z.B. als Racemat. Eine Verbindung der Formel I kann in der (R)-, (S)- oder (R,S)- Konfiguration vorliegen, vorzugsweise in der (R)- oder (S)- Konfiguration, bezüglich jedes der Substituenten an einem derartigen asymmetrischen Kohlenstoffatom in einer Verbindung der Formel I, z.B. für den Fall dass eine Cyloalkylgruppe vorhanden ist.

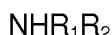
[0076] Isomerengemische können in geeigneter Weise getrennt werden, z.B. gemäß bzw. analog einer konventionellen Methode, um reine Isomere zu erhalten. Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von Verbindungen der Formel I in jedweder isomeren Form und jedwedem Isomerengemisch.

[0077] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Tautomere von Verbindungen der Formel I, wo immer Tautomere vorliegen können.

[0078] Weiters wird ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I, offenbart, umfassend die Schritte
Umsetzungen einer Verbindung der Formel



[0079] wobei X, R₃ und R₄ wie oben definiert sind und L eine Abgangsgruppe ist, z.B. Halogen, mit einer Verbindung der Formel:



[0080] wobei R₁ und R₂ wie oben definiert sind, und Isolieren einer Verbindung der Formel I, worin X, R₁, R₂, R₃ und R₄ wie oben definiert sind, aus der Reaktionsmischung.

[0081] In einem Intermediat der Formel II (Ausgangsmaterial) können funktionelle Gruppen, wenn vorhanden, gegebenenfalls in geschützter Form oder in der Form eines Salzes vorliegen, wenn eine salzbildende Gruppe vorhanden ist. Gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen können zu einem passenden Zeitpunkt entfernt werden, unter Verwendung oder in Analogie zu konventionellen Methoden.

[0082] Eine so erhaltene Verbindung der Formel I kann z.B. in eine andere Verbindung der

Formel I umgewandelt werden, oder eine in freier Form erhaltene Verbindung der Formel I kann in eine Verbindung der Formel I in Form eines Salzes umgewandelt werden und vice versa.

[0083] Die obige Reaktion ist eine Substitutionsreaktion und kann in geeigneter Weise durchgeführt werden, z.B. analog einer konventionellen Methode, oder z.B. wie hier dargelegt.

[0084] Intermediate (Ausgangsmaterialien) der Formel II sind bekannt oder können gemäß oder in Analogie zu etablierten Methoden hergestellt werden, oder wie hier spezifiziert.

[0085] Jeder hier beschriebene Verbindung, z.B. eine Verbindung der Formel I, und Intermediate der Formel II können in geeigneter Weise hergestellt werden, z.B. gemäß oder in Analogie zu konventionellen Methoden oder z.B. wie hierin dargelegt.

[0086] Es wurde gefunden, dass cardiomyocytenähnliche Zellen von Skelett Myoblasten ausgehend erhalten werden können, wenn sie in der Gegenwart einer Verbindung der Formel I kultiviert werden; und somit wurde gefunden, dass Verbindungen der Formel 1 einen cardiomyogenen Effekt generieren können und daher als Pharmazeutika verwendbar sein können.

[0087] Die Aktivität der Verbindungen der Formel I kann mit der folgenden BIOLOGISCHEN TESTMETHODE gezeigt werden:

BIOLOGISCHE TESTMETHODE

(Methodische Ansätze für die biologische Testung)

[0088] Zelltypen

[0089] C2C12 Myoblasten aus dem Skelettmuskel (American Type Culture Collection, ATCC),

[0090] P19 embryonale Karzinomzellen (ATCC)

[0091] Zellkultur

[0092] C2C12 Zellen werden in einem Wachstumsmedium kultiviert, das aus gem. Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), 4.5 g/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 g/ml Streptomycin, und 20% fötalem Kälberserum besteht. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert; sobald ca. 50-70% Zellkonfluenz erreicht ist wird mittels Serum Reduktion die Differenzierung der unreifen Skelettmuskelzellen (Myoblasten) ausgelöst. Zu diesem Zweck werden die Myoblasten in Differenzierungsmedium inkubiert; dieses ist identisch zum Wachstumsmedium, außer dass es 2% Pferdeserum statt 20% Kälberserum enthält. Zu testende Wirkstoffe werden immer zum Differenzierungsbeginn appliziert. DMSO, das als Lösungsmittel für die „kleinen Moleküle“ verwendet wird, wird in den entsprechenden Konzentrationen den Kontrollzellmedien beigemischt. Die Kulturmedien werden dreimal pro Woche gewechselt.

[0093] P19-Zellen werden in Monoschichten in MEM-alpha Medium mit 7,5% Kälberserum neugeborener Kälber und 2,5% FBS bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Bei ca. 60% Zellkonfluenz werden die zu testenden „kleinen Moleküle“ appliziert. DMSO, das als Lösungsmittel für die „kleinen Moleküle“ verwendet wird, wird in den entsprechenden Konzentrationen den Kontrollzellmedien beigemischt. Die Kulturmedien werden dreimal pro Woche gewechselt.

[0094] Bewertung der kardiomyogenen Aktivität der "kleinen Moleküle"

1) Um in der Lage zu sein, in kurzer Zeit eine große Anzahl von „kleinen Molekülen“ auf ihre kardiomyogene Aktivität überprüfen zu können (high throughput screen), verwenden wir einen ANF- Promotor- Reporter Assay. In diesem Testverfahren wird eine Aufregulation der Expression von ANF durch eine erhöhte Luziferaseaktivität angezeigt. ANF (atrialer natriuretischer Faktor) ist ein Polypeptidhormon, das vor allem in Kardiomyozyten synthetisiert wird. Es gilt als Marker gen spezifisch für Kardiomyozyten. Für den Test wurde ein Fragment, das die Ratten ANF-Promotor-Region enthält, vermehrt und dann in das PGL3-BV Luziferase- Reporter- Plasmid subkloniert. C2C12 und P19 Zellen, die vorher transient mit diesem Plasmid transfiziert wurden, werden für die Screening-Experimente ausgewählt. In diesen Experimenten werden Zellen in 48 oder 96- Well-Platten entweder in normalem Medium (Kontrollzellen) oder in Medi-

en mit verschiedenen einzelnen „kleinen Molekülen“ (Versuchsgruppen) in einer Konzentration von 1 μ M für 8 Tage behandelt. Danach wird die Luziferase- Aktivität gemessen. Eine signifikante Aufregulierung der ANF- Expression (angezeigt durch ein erhöhtes Luziferase- Signal) durch ein „kleines Molekül“, die mittels dieses Tests aufgedeckt werden kann, ist der erste Indikator für die kardiomyogene Aktivität eines „kleinen Moleküls“.

2) Nur wenn ein „kleines Molekül“ ANF im genannten Reporter- Assay signifikant aufreguliert, wird auch die Expression von ANF und anderen klassischen kardialen Markern mittels RT-PCR- Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten (1-12 Tage der Behandlung) getestet. Die folgenden Herzmarker werden verwendet: ANF, GATA4, Nkx2.5, α - schwere Myosinkette, leichte Myosinketten 2a und 2v.

3) Elektrophysiologische Experimente: Um zu testen, ob „kleine Moleküle“ neben der Induktion von kardialen Markern auch „kardiomyogene Funktion“ induzieren können, werden ihre Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen getestet. Dazu werden nur jene „kleinen Moleküle“, die ihre kardiomyogene Aktivität in den oben beschriebenen Experimenten (1 und 2) bewiesen haben, in Ganzzell- Ableitungen mittels der Patch-Clamp-Technik untersucht. Ionenströme in unbehandelten und mit „kleinen Molekülen“ behandelten Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1-12 Tage Behandlungsdauer) verglichen.

[0095] Na Ströme werden bei Raumtemperatur ($22 \pm 1,5^\circ\text{C}$) mit einem Axoclamp 200B Patch-Clamp-Verstärker aufgenommen. Pipetten werden aus Aluminiumsilikat- Glas (AF150-100- 10; Science Products) mit einem P-97 horizontalen Puller (Sutter Instruments) gezogen, und zeigen Widerstände zwischen 1 und 2 Mega-Ohm, wenn sie mit der Pipettenlösung (105 mM CsF, 10 mM NaCl, 10 mM EGTA und 10 mM HEPES; pH 7,3) gefüllt sind. Die Voltage- Clamp Protokolle und die Datenerfassung werden mit einer pCLAMP 6.0 Software (Axon Instruments) über eine 12-Bit A/D-D/A-Schnittstelle durchgeführt (Digidata 1200; Axon Instruments). Eine Bad- Lösung, bestehend aus 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 und 10 mM HEPES; pH 7,4 wird verwendet, um Aufnahmen zu erhalten. Wenn Na Ströme durch die Behandlung mit „kleinen Molekülen“ induziert werden, wird ihre kardiale Natur überprüft. Dazu wird die Expression der kardialen Na-Kanal Isoform $\text{Na}_v1.5$ in Skelettmuskelzellen bestätigt durch a) den Nachweis seiner charakteristischen Eigenschaften (z. B. langsame Eintrittskinetik in den schnellinaktivierten Zustand und eine große Resistenz gegenüber dem langsam- inaktivierten Zustand im Vergleich zu adulten $\text{Na}_v1.4$ Skelettmuskel- Natriumkanälen oder $\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.2$ Natriumkanälen aus dem Gehirn), b) Tetrodotoxin (TTX) Experimente ($\text{Na}_v1.5$ ist TTX-resistent!) und c) RT-PCR-Analysen. Ca Ströme werden von einem Haltepotential von -80 mV durch depolarisierende Spannungsschritte zwischen -50 und +80 mV in 10 mV- Intervallen ausgelöst. Ein 1-s Präpuls zu -50 mV unmittelbar vor dem Testpuls kann angewandt werden, um T-Typ Ca-Kanäle zu inaktivieren. Dies erzeugt reine L-Typ Ca Ströme, was mit Nitrendipin (10 μ M), einem selektiven L-Typ- Ca Kanalblocker, überprüft werden kann. Steady- State- Inaktivierung wird durch Pulse auf -10 mV, von verschiedenen Haltepotentialen (HPs) ausgehend, getestet. Neben Ca, wird auch Ba als Ladungsträger verwendet, um zu zwischen der Ca- und Spannungsabhängigen Inaktivierung zu unterscheiden. Die externe Badlösung enthält (in mM): 10 CaCl_2 , 145 Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl), 10 HEPES (pH 7,4 mit TEA-OH). 10 CaCl_2 wird durch 10 BaCl_2 substituiert, wenn Ba der gewünschte Ladungsträger ist. Die interne Lösung enthält 145 Cäsium-Aspartat, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0,1 Cs-EGTA, 2 Mg-ATP (pH 7,4 mit CsOH). Bei Ca Strömen kann die wesentliche kardiale L-Typ- Ca Kanalisiform $\text{Ca}_v1.2$ leicht durch ihre schnelle Aktivierungskinetik im Vergleich zum Skelettmuskel $\text{Ca}_v1.1$ Kanal identifiziert werden. Neben der spannungsabhängigen Inaktivierung zeigt $\text{Ca}_v1.2$ (aber nicht $\text{Ca}_v1.1$) zusätzlich eine Ca-abhängige Inaktivierung. Schließlich können PCR- Experimente eindeutig klären, welche Ca Kanal Isoformen zu den jeweils gemessenen Strömen beitragen. Aktionspotential- Registrierungen: Aktionspotentiale werden in der Stromklemme- Konfiguration der Patch Clamp Technik in Standard- Lösungen und mittels Standard- Protokollen aufgezeichnet. In Kürze, nach Etablierung einer Ganzzellableitung im Spannungsklemme- Modus, und nach Kompensation für die Pipettenkapazität, wird der Strom zu einem Ruhemembranpotential von -80 mV geklemmt. Aktionspotentiale werden dann durch 2-ms depolarisierende Impulse bei einer Frequenz von 1

Hz ausgelöst. Herz- versus Skelettmuskel- oder neuronale Aktionspotentiale können leicht durch ihre längere Dauer identifiziert werden.

ERGEBNISSE AUS DEN EXPERIMENTEN

[0096] a. C2C12 Zellen

[0097] ANF Reporter Assay

[0098] Verbindungen der Formel I zeigen Aktivität in diesem Test, z. B. die nach Beispiel 1 erhaltene Verbindung (1 μ M für 8 Tage) erzeugt eine 3-fache Erhöhung des Luciferase- Signals im ANF-Reporter-Assay. Dies bedeutet eine Aufregulation der Expression von ANF in C2C12 Zellen, die mit dieser Substanz behandelt wurden, und deutet somit auf eine kardiomyogene Wirkung dieser Verbindung hin. Unseres Wissens ist dies der erste Bericht über eine kardiomyogene Wirkung eines „kleinen Moleküls“ auf Skelettmuskel- Vorläuferzellen. Die Verbindungen, die gemäß den Beispielen 2 und 3 erlangt wurden, zeigen eine ähnliche Aktivität wie die nach Beispiel 1 erhaltene Verbindung. Diese ist jedoch weniger ausgeprägt. z.B. in einem einzelnen Experiment erhöhte die Verbindung des Beispiels 3 mäßig das Luciferase-Signal im ANF-Reporter-Assay.

[0099] Elektrophysiologische Testung

[00100] Die Verbindungen, die gemäß den Beispielen 1 und 2 erhalten wurden (1 μ M für 8 Tage), erhöhen mäßig die Tetrodotoxin (TTX)- Resistenz der Na-Ströme in den C2C12 Zellen. Dies weist auf eine Aufregulation der Expression der Herz Na Kanal Isoform Na_v1.5 hin. Darüber hinaus beschleunigt die Verbindung erhalten nach Beispiel 1 erheblich die Kinetik der Aktivierung von Ca Strömen in C2C12 Zellen. Dieser Effekt ist besonders interessant, weil Herz Ca Kanäle, verglichen mit den Skelettmuskel Ca-Kanälen, wesentlich schneller aktivieren. Folglich erzeugt die Behandlung mit einer Verbindung erhalten nach Beispiel 1 Herz- ähnliche Na und Ca Ströme in C2C12 Zellen. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Verbindung, erhalten nach Beispiel 1, kardiomyogene Funktion durch Aufregulation von kardialen Ionenkanälen in C2C12 Myoblasten induziert.

[00101] b.P19 Zellen

[00102] ANF Reporter Assay

[00103] Retinsäure (1 μ M für 8 Tage), ein bekannter Induktor von Kardiogenese, erhöht das Luziferase-Signal in unserem ANF Reporter Assay stark, was auf eine Aufregulation der Expression von ANF in Retinsäure- behandelten P19 Zellen hinweist. Auch die Verbindungen, die gemäß den Beispielen 1, 2, 3 und 10 erhalten wurden, erhöhten das Luziferase-Signal im ANF-Reporter Assay. Dies weist auf eine Aufregulation der Expression von ANF in den mit diesen Verbindungen behandelten P19 Zellen hin.

[00104] Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Verbindungen der Formel I kardiomyogene Effekte in C2C12 Skelettmuskel- Myoblasten und/oder P19 embryonalen Karzinom Zellen generieren. Die Verbindung, die gemäß Beispiel 1 erhalten wurde, ist eine bevorzugte Verbindung; z.B. wirkt sie an beiden Zelltypen. Folglich ist der kardiomyogene Effekt dieser Verbindung bemerkenswerterweise nicht auf pluripotente Stammzellen (P19) beschränkt, sondern trifft auch auf Vorläuferzellen des Skelettmuskels (C2C12 Myoblasten) zu. Darüber hinaus induziert die Verbindung, die gemäß Beispiel 1 erhalten wurde, neben der Aufregulation des kardialen Markers ANF, auch mehr Herz- ähnliche Ionenströme in C2C12 Zellen, und induziert somit kardiomyogene Funktion.

[00105] Verbindungen der Formel I zeigen Aktivität in der oben beschriebenen BIOLOGISCHEN TESTMETHODE und sind daher potentielle Kandidaten, um für die Behandlung von Herzfehlfunktionen (Krankheiten) verwendet zu werden, die mit einer verminderten Herzfunktion einhergehen.

[00106] Insbesondere können Verbindungen der Formel I zur Produktion von cardiomyocyten-ähnlichen Zellen aus omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten Säugetierzellen

(lineage committed mammalian cells) verwendet werden. Dies gilt nicht nur für Stammzellmodelle (z.B. P19 Zellen oder C2C12 Zellen), sondern auch für Zellen, die von einem Herzpatienten vor einer Zelltransplantation isoliert wurden, z.B. Skelettmyoblasten (skeletal myoblasts).

[00107] So eine Behandlung kann z.B. durch eine intra-cardiale Injektion von cardiomyocytenähnlichen Zellen erfolgen, die durch die Behandlung von omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten Säugetierzellen mit einer Verbindung der Formel I erhalten werden. So eine Behandlung kann die Regeneration von beschädigtem Herzregionen z.B. nach einem Myokardinfarkt zur Folge haben und kann die Herzfunktion verbessern.

[00108] Insbesondere können Verbindungen der Formel I zur Herstellung von cardiomyocytenähnlichen Zellen aus omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten Zellen verwendet werden, z.B. solche die aus dem eigenen Körper stammen, und diese cardiomyocytenähnlichen Zellen können in weiterer Folge für die Behandlung von Funktionsstörungen im Zusammenhang mit dem Herz verwendet werden. So eine Behandlung kann z.B. durch eine Injektion von cardiomyocytenähnlichen Zellen die durch die Behandlung von omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten Säugetierzellen mit einer Verbindung der Formel I erhalten wurden. So eine Behandlung kann eine Verbesserung von beschädigten Herzregionen hervorrufen und kann eine Verbesserung der Regeneration von beschädigten Regionen induzieren, die z.B. durch einen Herzinfarkt beschädigt wurden.

[00109] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung
die Verwendung einer Verbindung der Formel I
zur Behandlung von omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten
Säugetierzellen, um cardiomyocytenähnliche Zellen zu produzieren;
zur Verfügung.

[00110] So hergestellte cardiomyocytenähnliche Zellen können in einer therapeutisch wirksamen Menge, z.B. parenteral, einem Subjekt, das so eine Behandlung benötigt, verabreicht werden.

[00111] Weiters wird eine Methode für die Behandlung von Herzfehlfunktionen (cardiac disorders), z.B. Fehlfunktionen, die mit einer verminderten Herzleistung assoziiert sind, offenbart, umfassend die Schritte

[00112] (i) Zurverfügungstellen von omnipotenten-, pluripotenten- oder vorprogrammierten Zellen, z.B. Skelettmyoblasten, eines Subjektes, das eine derartige Behandlung benötigt,

[00113] (ii) Kultivieren der besagten Zellen in der Gegenwart einer Verbindung der Formel I, um cardiomyocytenähnlichen Zellen zu produzieren, und

[00114] (iii) Verabreichung von im Schritt (ii) hergestellten cardiomyocytenähnlichen Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge an ein Subjekt, das eine derartige Behandlung benötigt.

[00115] Die Behandlung mit cardiomyocytenähnlichen Zellen, hergestellt durch eine Methode die gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung gestellt wird, kann mit anderen Strategien zur Behandlung von Herzkrankheiten kombiniert werden.

[00116] In den folgenden Beispielen sind alle Temperaturen in Grad Celsius angegeben (°C) und nicht korrigiert.

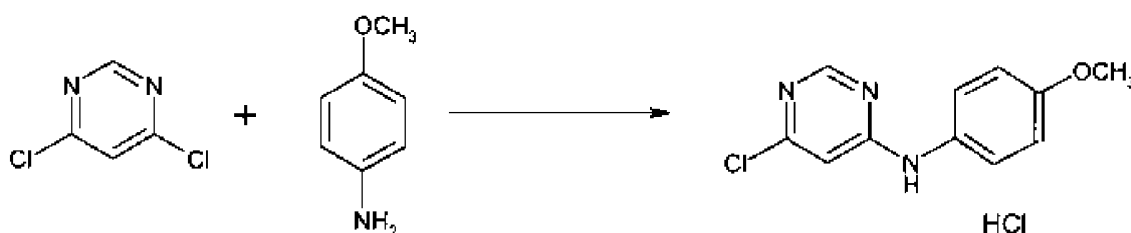
[00117] Die folgenden Abkürzungen werden verwendet:

| | |
|--------|---|
| BINAP | 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| EtOH | Ethanol |
| EtOAc | Ethylacetat |
| HR-MS | hoch auflösende Massenspektroskopie |
| i-PrOH | 2-Propanol |
| Fp. | Schmelzpunkt |
| MPLC | Mitteldruckflüssigchromatographie |
| n-BuOH | n-Butanol |
| PE | Petrolether |
| r.t. | Raumtemperatur |
| DC | Dünnschichtchromatographie |

BEISPIEL 1

[00118] 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethan-1-ol

[00119] 1.a 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



[00120] 1.57 g 4,6-Dichloropyrimidin und 1 g p-Methoxyanilin wurden in 15 mL i-PrOH gelöst und die erhaltene Mischung wurde mit 1.5 mL 37% HCl versetzt. Die erhaltene Mischung wurde für 2.5 Stunden unter Stickstoffatmosphäre auf Rückfluss erhitzt. Ein farbloser Niederschlag wurde gebildet und durch Filtration isoliert. 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin wurde in Form des Hydrochlorids als farblose Kristalle erhalten.

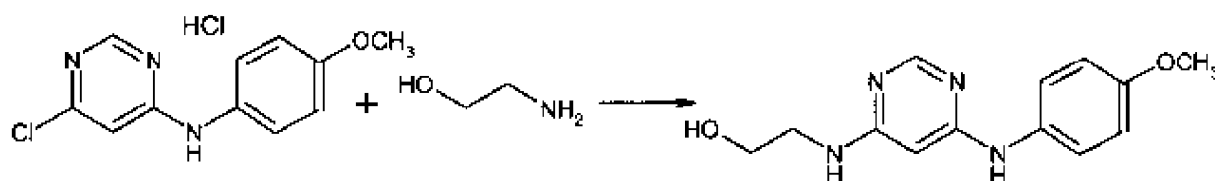
[00121] Ausbeute: 56% der Theorie.

[00122] Fp.: 121-123 °C.

[00123] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200MHz): δ = 3.75 (s, 3H), 3.72 (s, 1H), 6.95 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 9.89 (s, 1H).

[00124] $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50MHz): δ = 55.3 (q), 104.1 (d), 114.1 (d), 122.6 (d), 131.6 (s), 155.7 (s), 157.1 (s), 158.1 (d), 161.3 (s).

[00125] 1b. 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethan-1-ol



[00126] 250 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids, 62 mg Ethanolamin und 296 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 45 Minuten auf 200 °C unter Mikrowellen-

bedingungen erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde aus einer Mischung von n-BuOH/EtOH umkristallisiert.

[00127] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00128] Ausbeute: 77% der Theorie. Fp.: 173 °C.

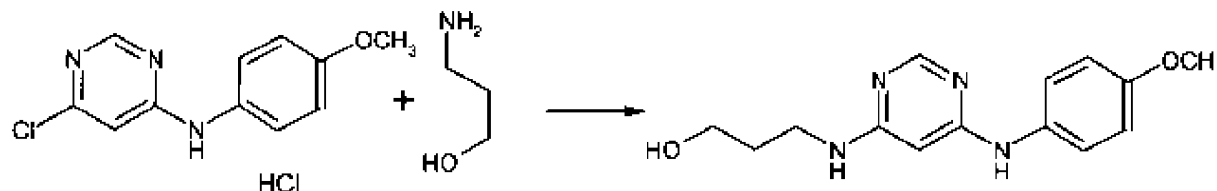
[00129] ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz): δ = 3.21 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 3.45 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 4.71 (t, J = 5.38 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 6.74(s, 1H), 6.87 (d, J = 8.99 Hz, 2H), 7.32 (d, J=9.19 Hz, 2H), 8.00 (s, 1H), 8.63 (s, 1H).

[00130] ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50MHz): δ = 42.9 (t), 55.1 (q), 59.9 (t), 113.9 (s), 121.8 (d), 133.4 (d), 154.3 (s), 157.5 (d), 160.3 (d) 162.7 (s).

[00131] Elementaranalyse: Berechnet C 59.99, H 6.20, N 21.52: Gefunden C 59.68, H 6.00, N 21.11;

BEISPIEL 2

[00132] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol



[00133] Wurde analog der Methode in Beispiel 1b hergestellt, aber unter Einsatz von 75 mg Propanolamin anstelle von 62 mg Ethanolamin.

[00134] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00135] Ausbeute: 85% der Theorie. Fp.: 151-152 °C.

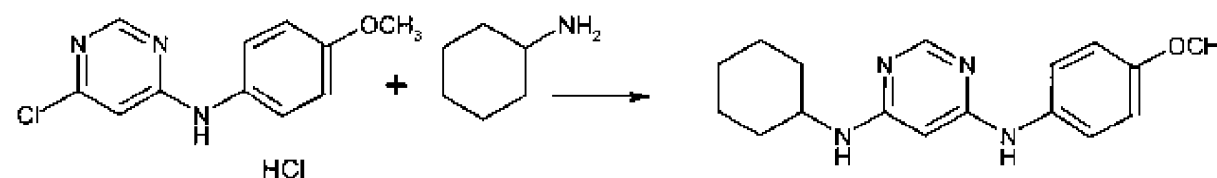
[00136] ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz): δ = 1.62 (m, 2H), 3.19 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 3.44 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 4.48 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 6.72 (t, J = 5.37 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.11 (s, 1H), 8.69 (s, 1H).

[00137] ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 200MHz): δ = 32.6 (t), 37.5(t), 55.3 (q), 58.5 (t), 114.1 (4), 122.0 (d), 133.4 (s), 154.5(s), 157.5 (d), 160.5 (s), 162.7 (s).

[00138] Elementaranalyse: Berechnet C 61.30, H 6.61, N 19.42: Gefunden C 61.17, H 6.67, N 19.39;

BEISPIEL 3

[00139] N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin



[00140] 200 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids, 80 mg Cyclohexylamin und 109 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH (2 mL) gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 90 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (silica,

PE:EtOAc = 1:3) gereinigt.

[00141] N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00142] Ausbeute: 70% der Theorie. Fp.: 218-219°C.

[00143] ¹H-NMR (CDCl₃, 200MHz): δ = 1.05-2.01 (m, 11H), 3.42 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.69 (d, 1H, J = 6.5 Hz), 5.49 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.13 (s, 1H).

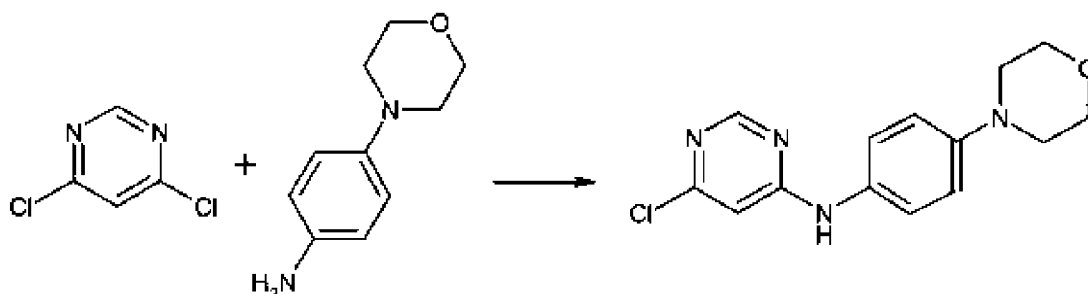
[00144] ¹³C-NMR (CDCl₃, 50MHz): δ = 24.7 (t), 25.7 (t), 33.0 (t), 49.6 (q/d), 55.6 (q/d), 114.8 (d), 125.3(d), 131.7 (s), 156.9 (s), 158.4 (d), 161.8 (S), 162.2(s).

[00145] HR-MS: Berechnet [MH]⁺ = 299.1866; Gemessen [MH]⁺ = 299.1878.

BEISPIEL 4

[00146] 2-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol

[00147] 4a. 6-Chlor-N-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4-amin



[00148] 100 mg 4,6-Dichloropyrimidin und 92 mg p-Morpholinoanilin wurden in 5 mL i-PrOH gelöst. Die so erhaltene Mischung wurde für 6 Stunden unter Stickstoffatmosphäre auf Rückfluss 84°C erhitzt. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag der durch Filtration gewonnen wurde.

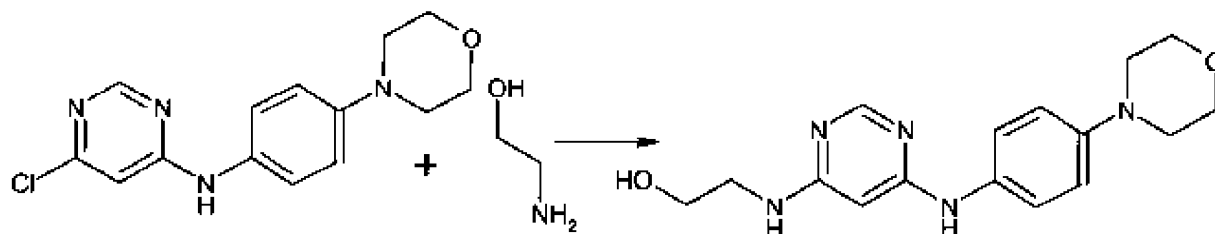
[00149] 6-Chlor-N-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4-amin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00150] Ausbeute: 46% der Theorie. Fp.: 165-166°C.

[00151] ¹H-NMR (CH₃OD, 200MHz): δ = 3.59 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.99 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 6.75 (s, 1H), 7.53 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 9.19 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H).

[00152] ¹³C-NMR (CH₃OD, 50MHz): δ = 53.5 (t), 63.1 (t), 104.6 (d), 119.8 (d), 120.3 (d), 156.4 (s), 156.9 (s), 160.3(d).

[00153] 4b. 2-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol



[00154] 78 mg 6-Chlor-N-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4-amin, 33 mg Ethanolamin und 70 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 60 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200°C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde aus einer Mischung von n-BuOH-EtOH umkristallisiert.

2-(6-(4-Morpholinophenylamino) pyrimidin-4-ylamino) ethanol wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00155] Ausbeute: 77% der Theorie. Fp.: 204-207 °C.

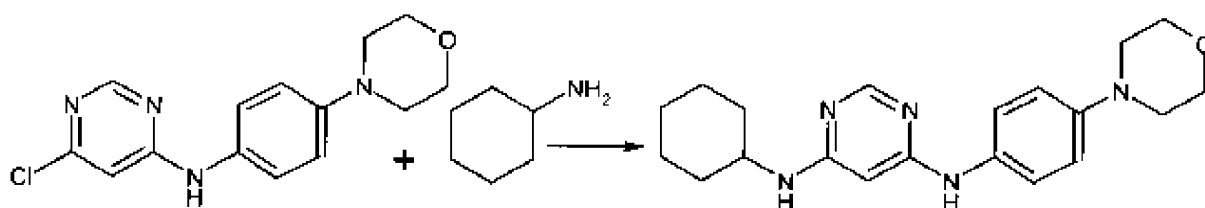
[00156] ^1H -NMR (CH_3OD , 200MHz): δ = 3.11 (t, J = 4.69 Hz, 4H), 3.36 (m, 2H), 3.66 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.84 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 5.69 (s, 1H), 6.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H).

[00157] ^{13}C -NMR (CH_3OD , 50MHz): δ = 44.5 (t), 51.0 (t), 61.8 (t), 68.9 (t), 82.9 (d), 117.9 (d), 125.4 (d), 133.3 (s), 137.7 (s), 149.9 (s), 158.4 (d), 164.2 (s).

[00158] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 316.1768$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 316.1760$.

[00159] Beispiel 5

[00160] N^4 -Cyclohexyl- N^6 -(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4,6-diamin



[00161] 78 mg 6-Chlor-N-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4-amin, 55 mg Cyclohexylamin und 72 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 90 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. Beim Abrotieren von n-BuOH bildete sich ein Niederschlag der aus einer Mischung von n-BuOH-EtOH umkristallisiert wurde.

[00162] N^4 -Cyclohexyl- N^6 -(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00163] Ausbeute: 44% der Theorie. Fp.: 239-240 °C.

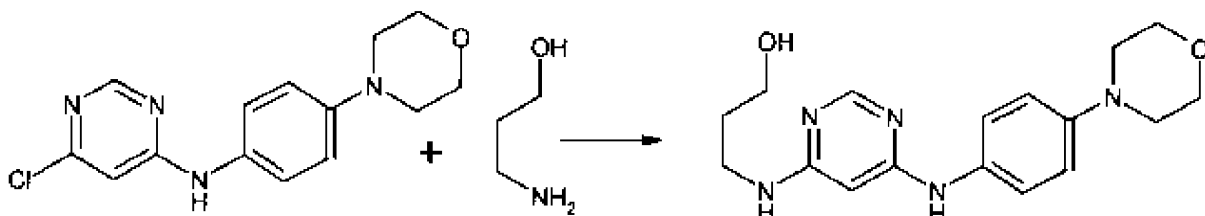
[00164] ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200MHz): δ = 0.98-1.90 (m, 11H), 3.01 (t, J = 4.5 Hz 4H), 3.72 (t, J = 4.2 Hz, 4H), 5.61 (s, 1H), 6.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.51 (s, 1H).

[00165] ^{13}C -NMR (CH_3OD , 50MHz): δ = 24.8 (t), 25.2 (t), 32.8 (t), 48.5 (d), 49.3 (t), 66.5 (t), 82.6 (d), 115.8 (d), 121.9 (d), 132.8 (s), 146.6 (s), 157.6 (d), 160.5 (s), 161.9 (s).

[00166] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 354.2288$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 354.2288$.

BEISPIEL 6

[00167] 3-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol



[00168] 165 mg 6-Chlor-N-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4-amin, 86 mg Propanolamin und 147 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst. Die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 60 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. n-BuOH wurde abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde aus einer Mischung von n-BuOH-EtOH umkristallisiert.

[00169] 3-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol wurde in Form eines

farblosen Feststoffes erhalten.

[00170] Ausbeute: 40% der Theorie. Fp.: 198-199°C.

[00171] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 200MHz): δ = 1.56-1.71 (m, 2H), 3.01 (t, J = 4.2 Hz, 4H), 3.19 (s, 2H), 3.43 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.72 (t, J = 4.1 Hz, 4H), 4.47 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 6.71 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 8.57 (s, 1H).

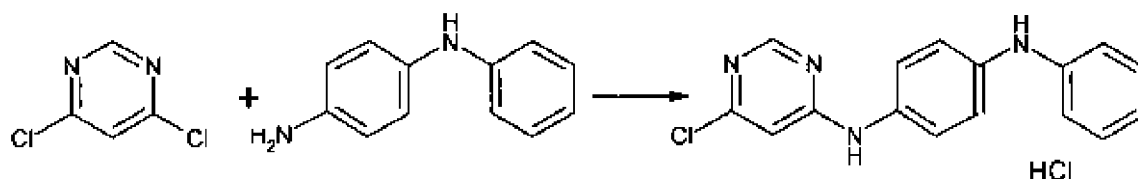
[00172] $^{13}\text{C-NMR}$ (CH_3OD , 50MHz): δ = 32.2 (q), 37.4 (t), 49.3 (t), 58.3 (t), 66.3 (t), 82.2 (d), 115.9 (d), 121.9 (d), 132.8 (d), 146.4 (s), 157.7 (d), 160.5 (s), 162.7 (s).

[00173] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 330.1925$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 330.1937$.

BEISPIEL 7

[00174] 2-(6-(4-(Phenylamino)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol

[00175] 7a. N^1 -(6-Chlorpyrimidin-4-yl)- N^4 -phenylbenzene-1,4-diamin



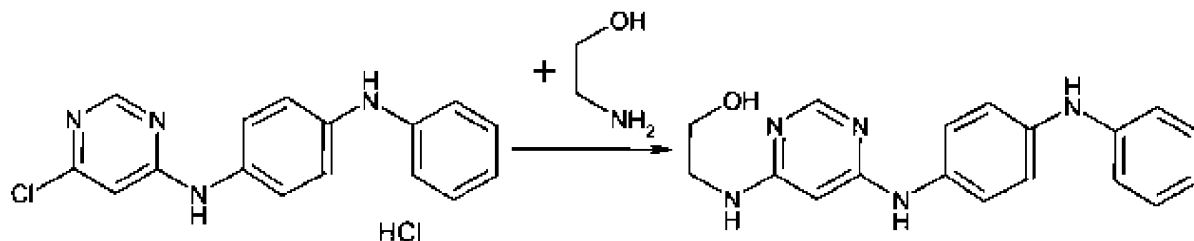
[00176] 200 mg 4,6-Dichloropyrimidin und 190 mg 4-aminodiphenylamin wurden in 5 mL i-PrOH gelöst und der so erhaltene Mischung wurden 0.3 mL 37% HCl hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 4 Stunden unter Stickstoffatmosphäre auf Rückfluss (84°C) erhitzt. Ein leicht gelber Niederschlag wurde gebildet der durch Filtration gewonnen wurde. N^1 -(6-Chlorpyrimidin-4-yl)- N^4 -phenylbenzene-1,4-diamin in Form des Hydrochlorids wurde in Form eines leicht gelben Feststoffes erhalten.

[00177] Ausbeute: 45% der Theorie.

[00178] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 200MHz): δ = 3.8 (s, 1H), 6.8 (s, 2H), 7.1 (t, J =8.99Hz, 4H), 7.3 (t, J =7.43Hz, 2H), 7.5 (d, J =7.62Hz, 2H), 7.9 (s, 1H), 8.5(s, 1H), 10.0 (s, 1H).

[00179] $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 50MHz): δ = 104.1 (d), 116.1 (d), 117.9 (d), 119.1 (d), 122.4 (d), 129.2 (d), 133.2 (s), 143.9 (s), 150.1 (s), 157.3 (s), 158.9 (d), 161.1 (s).

[00180] 7b. 2-(6-(4-(Phenylamino)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol



[00181] 176 mg N^1 -(6-Chlorpyrimidin-4-yl)- N^4 -phenylbenzene-1,4-diamin in Form des Hydrochlorids, 72 mg Ethanolamin und 153 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und unter Mikrowellenbedingungen für 60 Minuten auf 200°C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (EtOAc als Eluent) gereinigt. 2-(6-(4-(Phenylamino)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol wurde in Form eines Feststoffes erhalten.

[00182] Ausbeute: 32% der Theorie. Fp.: 154-155°C.

[00183] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 200MHz): δ = 3.24-3.27 (m, 4H), 3.61 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 5.64 (s, 1H), 6.95-7.07 (m, 4H), 7.08-7.21 (m, 4H), 7.92 (s, 1H).

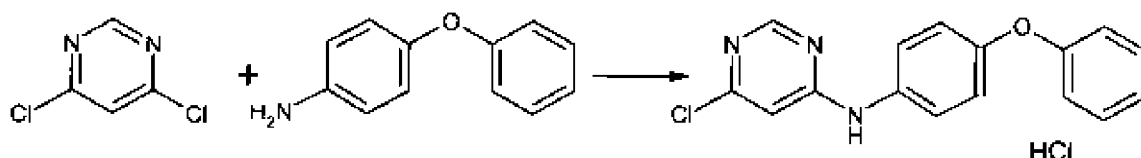
[00184] ^{13}C -NMR (CD_3OD , 50MHz): δ = 43.8 (t), 60.9 (t), 82.3 (d), 117.4 (d), 118.6 (d) 120.4 (d), 124.9 (d), 129.3 (d), 132.1 (s), 141.5 (s), 144.7 (s), 157.8 (d), 162.0 (s), 163.6 (s).

[00185] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 322.1662$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 322.1674$.

BEISPIEL 8

[00186] 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol

[00187] 8a. 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



[00188] 200 mg 4,6-Dichloropyrimidin und 191 mg 4-Aminodiphenylamin wurden in 5 mL i-PrOH gelöst und zu der so erhaltenen Mischung wurden 0.3 mL 37% HCl hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 4 Stunden unter Stickstoffatmosphäre auf Rückfluss (84 °C) erhitzt wobei sich ein braun-roter Niederschlag bildete der durch Filtration gewonnen wurde.

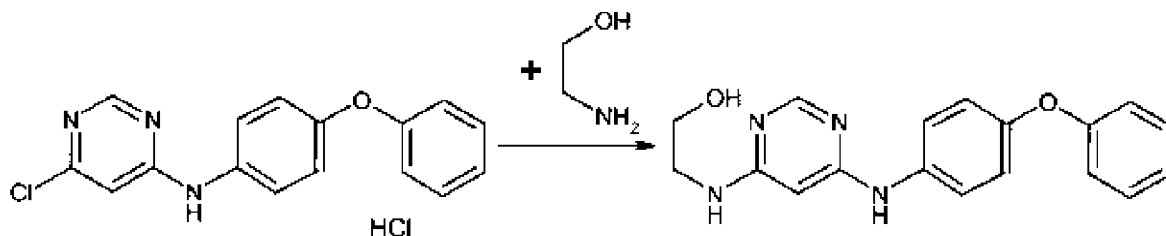
[00189] 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyrimidin-4-amin wurde in Form des Hydrochlorids als braun-roter Feststoff erhalten.

[00190] Ausbeute: 50% der Theorie.

[00191] ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200MHz): δ = 6.9 (s, 2H), 7.0 (m, 5H), 7.4 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 7.6 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 8.4 (s, 1H), 10.3(s, 1H), 10.8 (s, 1H).

[00192] ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50MHz): δ = 104.9(d), 117.9 (d) 119.4 (d) 122.2 (d), 122.8 (d), 130.0 (d), 134.8 (s), 144.8 (s), 151.9 (s), 157.1 (s), 158.3 (d), 161.3 (s).

[00193] 8b. 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol



[00194] 225 mg 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyrimidin-4-amin, 82 mg Ethanolamin und 173 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellenvial übergeführt und für 60 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (EtOAc:EtOH = 10:1) gereinigt. 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

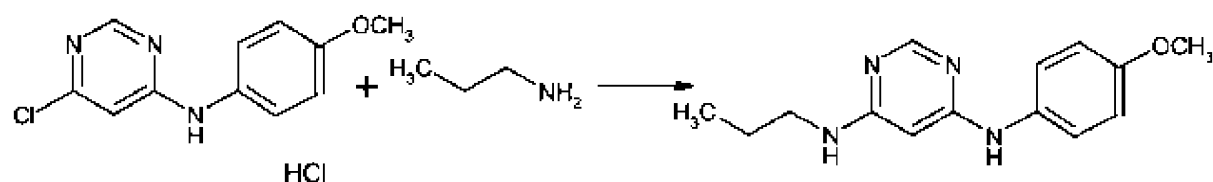
[00195] Ausbeute: 60% der Theorie. Fp.: 154-156 °C.

[00196] ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200MHz): δ = 3.19-3.30 (m, 2H), 3.49 (q, $J= 5.7$ Hz, 2H), 4.73 (t, $J= 5.2$ Hz, t), 5.77 (s, 1H), 6.73-7.13 (m, 6H), 7.35 (t, $J= 8.8$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.7 (s, 1H), 8.90 (s,1H).

[00197] ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50MHz): δ = 42.9 (t), 60.7 (t), 83.0 (d), 117.4 (d), 119.9 (d) 121.2 (d), 122.7 (d), 130.03 (d), 131.9 (s), 141.2 (s), 144.2 (s), 157.3 (d), 161.9 (s), 163.8(s). Elementaranalyse: Berechnet C 67.07, H 5.63, N 17.38: Gefunden C 67.11, H 5.48, N 17.00;

BEISPIEL 9

[00198] N^4 -(4-Methoxyphenyl)- N^6 -propylpyrimidin-4,6-diamin



[00199] 100 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids, 66 mg Propylamin und 120 mg DIPEA wurden in 1 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 60 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde aus einer Mischung von n-BuOH-EtOH umkristallisiert. N^4 -(4-Methoxyphenyl)- N^6 -propylpyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00200] Ausbeute: 82% der Theorie. Fp.: 194-196 °C.

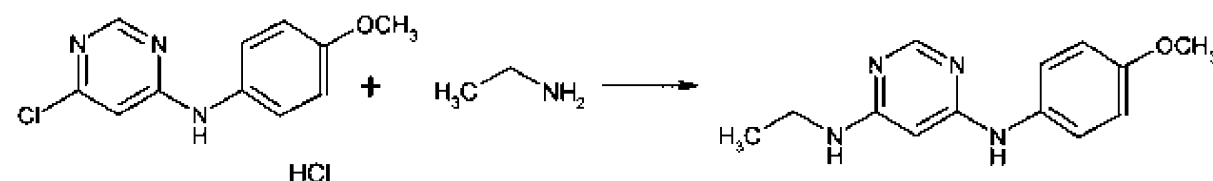
[00201] 1H -NMR $CDCl_3$, 200MHz): δ = 0.95 (t, J= 7.7 Hz, 3H), 1.51-1.67 (m, 2H), 3.09 (q, J= 6.9 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 4.81 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.90 (d, J= 8.2 Hz, 2H), 7.19 (d, J= 8.6 Hz, 2H), 8.13 (s, 1H).

[00202] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 115 (q), 22.5 (d), 43.3 (d), 55.6 (q), 80.3 (d), 114.8 (d), 125.8 (d), 131.3 (s), 157.0 (s), 158.2 (d), 162.0 (s), 163.2 (s).

[00203] Elementaranalyse: Berechnet C 65.09, H 7.02, N 21.69: Gefunden C 65.14, H 6.79, N 21.43;

BEISPIEL 10

[00204] N^4 -Ethyl- N^6 -(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin



[00205] N^4 -Ethyl- N^6 -(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin wurde analog der Methode in Beispiel 9 erhalten, allerdings wurden 83 mg Ethylamin anstelle von 66 mg Propylamin und 45 Minuten anstelle von 60 Minuten Mikrowellenbestrahlung verwendet. N^4 -Ethyl- N^6 -(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

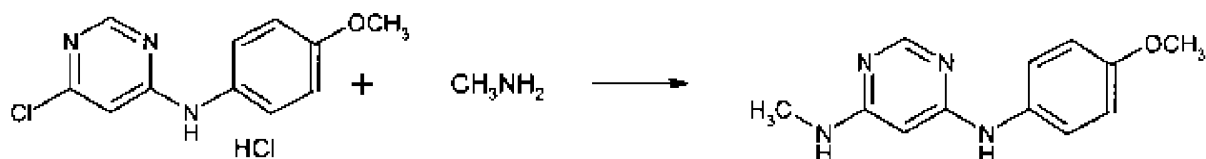
[00206] Ausbeute: 71% der Theorie. Fp.: 190-193 °C.

[00207] 1H -NMR $CDCl_3$, 200MHz): δ = 1.20 (t, J= 6.8 Hz, 3H), 3.07-3.325 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.87 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 6.91 (d, J= 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, J= 8.6 Hz, 2H), 8.12 (s, 1H). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 14.3 (q), 36.3 (t), 55.4 (q), 80.3 (d), 114.6 (d), 125.5 (d), 131.3 (s), 157.0 (s), 158.2 (d), 162.0 (s), 163.0 (s).

[00208] Elementaranalyse: Berechnet C 63.91, H 6.60, N 22.93: Gefunden C 63.68, H 6.43, N 22.59;

BEISPIEL 11

[00209] N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-methylpyrimidin-4,6-diamin



[00210] 100 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids, 57 mg Methylamin und 238 mg DIPEA wurden in einem verschraubbaren Gefäß in 1 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung für 1 Stunde auf 120°C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand wurde aus einer Mischung von n-BuOH/EtOH umkristallisiert. N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-methylpyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines leicht gelben Feststoffes erhalten.

[00211] Ausbeute: 91% der Theorie. Fp.: 174-182°C.

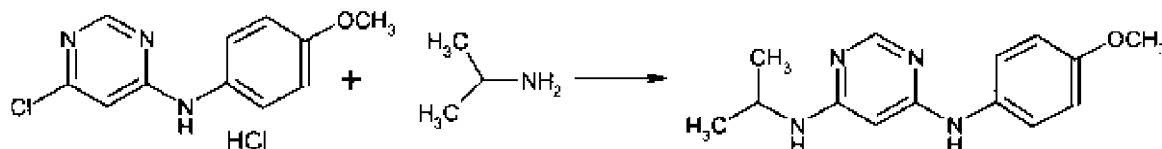
[00212] ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz): δ = 2.70 (d, J= 4.7 Hz, 3H), 3.72 (s, 3H), 5.58 (s, 1H), 6.71 (d, J= 4.7 Hz, 1H), 6.87 (d, J= 9.2 Hz, 2H), 7.37 (d, J= 8.8 Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 8.67 (s, 1H).

[00213] ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50MHz): δ = 27.4 (q), 55.1 (q), 81.9 (d), 113.8 (d), 121.8 (d), 133.6 (s), 154.3 (s), 157.5 (d), 160.5 (s), 163.1 (s).

[00214] HR-MS: Berechnet [MH]⁺ = 231.1240; Gemessen [MH]⁺ = 231.1242.

[00215] Beispiel 12

[00216] N⁴-(2-Propyl)-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin



[00217] 100 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids, 44 mg Isopropylamin und 95 mg DIPEA wurden in 1 mL n-BuOH in in einem verschraubbaren Vial gelöst und für 1 Stunde auf 120°C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und der so erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (PE: EtOAc 1:1) gereinigt. N⁴-Isopropyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00218] Ausbeute: 73% der Theorie. Fp.: 180-182°C

[00219] ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz): δ = 1.08-1.11 (d, J= 6.5 Hz, 7H), 3.70 (s, 3H), 5.60 (s, 1H), 6.61 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 6.85 (d, J= 8.8 Hz, 2H) 7.34 (d, J= 8.9 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 8.59 (s, 1H).

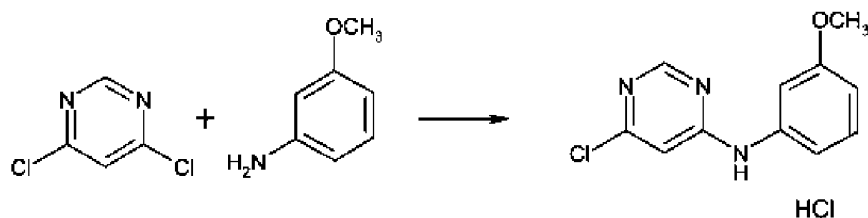
[00220] ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50MHz): δ = 22.6 (q), 41.3 (d), 55.3 (q), 82.8 (d), 114.1 (d), 122.3 (d), 133.6 (s), 154.5 (s), 157.7 (d), 160.5 (s), 161.9 (s).

[00221] HR-MS: Berechnet [MH]⁺ = 259.1553; Gemessen [MH]⁺ = 259.1552.

BEISPIEL 13

[00222] 2-(6-(3-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol

[00223] 13a. 6-Chlor-N-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



[00224] 250 mg 4,6-Dichlorpyrimidin und 158 mg m-Methoxyanilin wurden in 3 mL i-PrOH gelöst. Zu der so erhaltenen Mischung wurden 0.25mL 37% HCl hinzugefügt. Die so erhaltene Mischung wurde für 2.5 Stunden unter Stickstoffatmosphäre auf Rückfluss (84 °C) erhitzt. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag der durch Filtration gewonnen wurde.

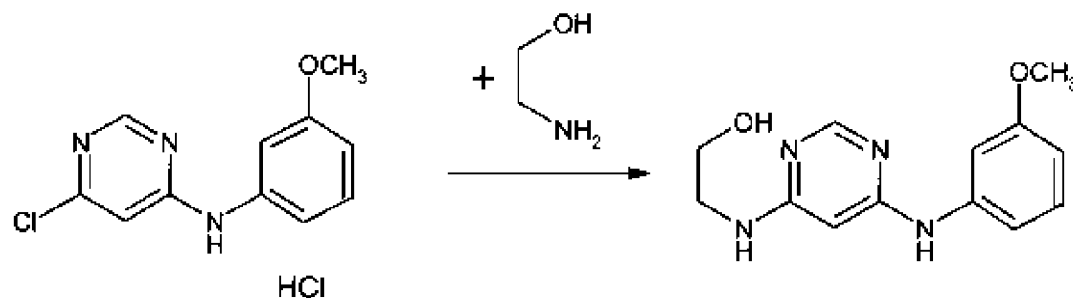
[00225] 6-Chlor-N-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin in Form des Hydrochlorids wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

[00226] Ausbeute: 33% der Theorie.

[00227] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200MHz): δ = 3.74 (s, 3H), 6.65 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.12-7.37 (m, 3H), 8.49 (s, 1H), 10.02 (s, 1H).

[00228] $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50MHz): δ = 55.1 (q), 105.1 (d), 106.3 (d), 108.5 (d), 112.5 (d), 129.4 (d), 140.2 (s), 157.7 (s), 158.5 (d), 159.7 (s), 161.3 (s).

[00229] 13b. 2-(6-(3-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol



[00230] 100 mg 6-Chlor-N-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin, 27 mg Ethanolamin und 119 mg DIPEA wurden in 2 mL n-BuOH gelöst und die so erhaltene Mischung in ein Mikrowellengefäß übergeführt und für 45 Minuten unter Mikrowellenbedingungen auf 200 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion wurde n-BuOH abrotiert und zum so erhaltenen Rückstand wurden 5 mL Wasser hinzugefügt. Die so erhaltene Mischung wurde mit EtOAc extrahiert, die Phasen getrennt und die organische Phase getrocknet und einrotiert.

[00231] 2-(6-(3-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol wurde in Form eines gelben Öls erhalten.

[00232] Ausbeute: 84% der Theorie.

[00233] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200MHz): δ = 3.21 -3.27 (m, 2H), 3.48 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 4.73 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 6.49 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 7.01-7.21 (m, 3H), 8.07 (s, 1H), 8.87 (s, 1H).

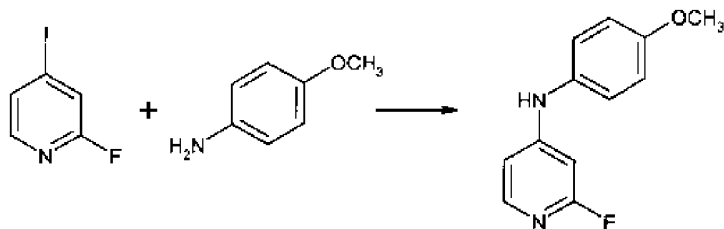
[00234] $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50MHz): δ = 42.9 (t), 54.8 (q), 59.7 (t), 81.8 (d), 105.1 (d), 106.5 (d), 111.5 (d), 129.4 (d), 141.9 (s), 157.3 (d), 159.3 (s), 159.7 (s), 162.9 (s).

[00235] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 261.1346$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 261.1349$.

BEISPIEL 14

[00236] 2-(4-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol

[00237] 14a. (2-Fluor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-4-amin



[00238] 50 mg 2-Fluor-4-iodopyridin, 33 mg p-Anisidin, 108 mg K_2CO_3 , 1 mg $Pd(OAc)_2$ und 6 mg BINAP wurden in ein Mikrowellengefäß gewogen und 2 mL trockenes Toluol hinzugefügt. Das Vial wurde verschlossen, evakuiert und mit Argon gespült. Diese Mischung wurde unter Rühren in einem CEM Explorer™ Mikrowellengerät für 30 Minuten auf 180°C erhitzt und die so erhaltene Mischung auf r.t. gekühlt. Der dabei gebildete Feststoff wurde abfiltriert und mit 10 mL CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel des Waschens und des Filtrates wurde vereinigt und einrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. (2-Fluor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-4-amin wurde in Form gelber Kristalle erhalten.

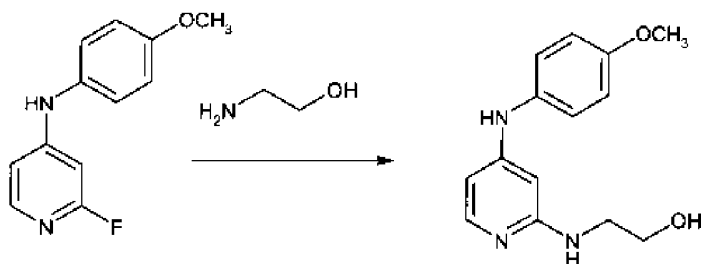
[00239] Ausbeute: 63% der Theorie. Fp.: 150°C

[00240] 1H -NMR ($CDCl_3$, 200MHz): δ = 3.83 (s, 3H) 6.20 (d, J = 1.7 Hz, 1H) 6.31 (s, 1H) 6.49 - 6.54 (m, 1H) 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H) 7.14 (d, J = 8.8 Hz, 2H) 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

[00241] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 55.5 (t) 91.6 (q, J_{C-F} = 42.4 Hz), 107.5 (q, J_{C-F} = 2.8 Hz), 114.9 (d), 125.8 (d), 131.4 (s), 147.4 (q, J = 18.7 Hz), 156.5 (d, J_{C-F} = 11.6Hz), 157.6 (s), 165.5 (d, J_{C-F} = 232.7 Hz).

[00242] Elementaranalyse: Berechnet C 66.05% H 5.08% N 12.84%, Gefunden: C 65.76% H 4.84% N 12.62%.

[00243] 14b. 2-(4-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol



[00244] 36 mg (2-Fluor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-4-amin wurden mit 80.6 mg Ethanolamin gemischt und die so erhaltene Mischung in einem verschraubbaren Vial unter Argon für 3 Tage auf 150°C erhitzt. Die so erhaltene Mischung wurde auf r.t. gekühlt und 5 mL 2N NaOH wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde 3x mit EtOAc extrahiert und die organische Phasen vereinigt und abrotiert. 2-(4-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol wurde in Form eines braunen Feststoffes erhalten.

[00245] Ausbeute: 89% der Theorie. Fp.: 164-165°C.

[00246] 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 200MHz): δ = 3.22 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 5.89 (s, 1H), 6.05 (m, 2H), 6.89 (d, J =8.8 Hz, 2H), 7.07 (s, J =8.8 Hz, 2H), 7.59 (s, J =5.7 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H).

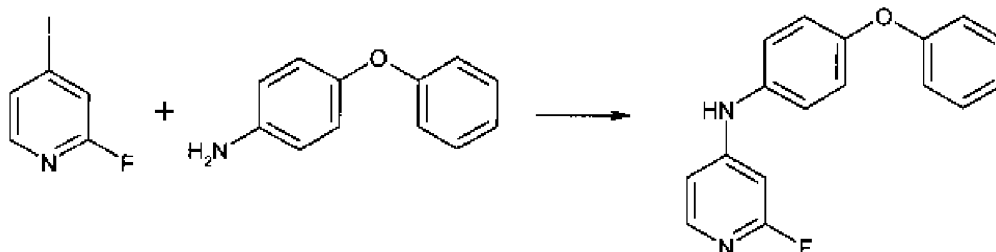
[00247] ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 50MHz): δ = 43.8 (t), 55.2 (q), 60.7 (t), 89.3 (d), 114.4 (d), 122.9 (d), 133.9 (s), 147.4 (d), 151.9 (s), 154.9 (s), 159.9 (s).

[00248] HR-MS: Berechnet $[MH]^+$ = 260.1394; Gemessen $[MH]^+$ = 260.1400.

BEISPIEL 15

[00249] 2-(4-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol

[00250] 15a. 2-Fluor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-4-amin



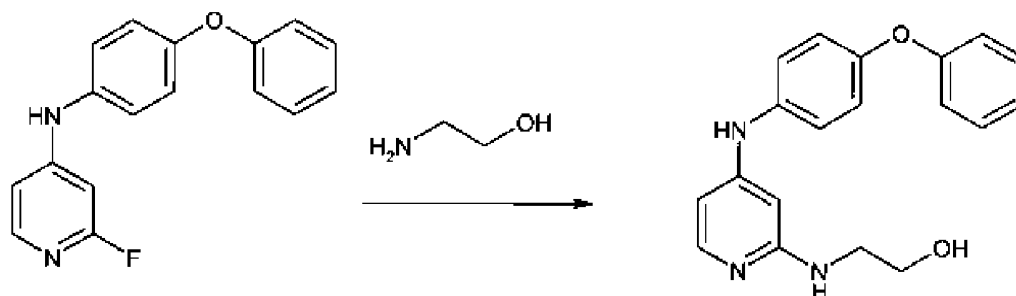
[00251] 100 mg 2-Fluor-4-iodopyridin, 100 mg 4-Phenoxyanilin, 218 mg K_2CO_3 , 2 mg $Pd(OAc)_2$ und 6 mg BINAP wurden in ein Mikrowellengefäß eingewogen und 2 mL trockenes Toluol hinzugefügt. Das Vial wurde verschlossen, evakuiert und mit Argon gespült. Die Mischung wurde unter rühren in einem CEM Explorer™ Mikrowellengerät für 30 Minuten auf 180°C erhitzt. Die so erhaltene Mischung wurde auf r.t. abgekühlt. Der dabei gebildete Feststoff wurde abfiltriert und mit 10 mL CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel des Waschens und des Filtrates wurde vereinigt und einrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

[00252] 2-Fluor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-4-amin wurde in Form brauner Kristalle erhalten. Ausbeute: 75% der Theorie. Fp.: 149°C.

[00253] 1H -NMR ($CDCl_3$, 200MHz): δ = 6.51 (d, J = 1.9 Hz, 1H) 6.61 (s, 1H) 6.81 (d, J = 5.8 Hz, 1H) 7.23 (d, J = 2.1 Hz, 2H) 7.37 (m, 3H) 7.48 (s, 1H) 7.57 (t, J = 7.9 Hz, 3H) 8.80 (d, J = 5.8 Hz, 1H)

[00254] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 92.0 (q, J_{C-F} = 39.5 Hz), 107.8 (q, J_{C-F} = 3.2 Hz), 118.9 (d), 119.9 (d), 123.5 (d), 125.0 (d), 129.9 (d), 133.9 (s), 147.9 (q, J_{C-F} = 22.9 Hz), 154.8 (s), 155.8 (d, J_{C-F} = 11.9 Hz) 157.0 (s), 165.6 (d, J_{C-F} = 233.0Hz).

[00255] 15b. 2-(4-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol



[00256] 53 mg 2-Fluor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-4-amin in 80.6 mg Ethanolamin wurden in einem verschraubbaren Gefäß unter Argon für 3 Tage auf 150°C erhitzt. Die so erhaltene Mischung wurde auf r.t. gekühlt und 5 mL 2N NaOH wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde 3x mit 15 mL EtOAc extrahiert und die organische Phasen vereinigt und abrotiert und 2-(4-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol isoliert.

[00257] Ausbeute: 89% der Theorie.

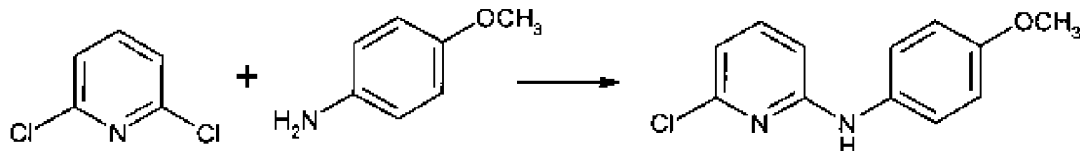
[00258] 1H -NMR (CD_3OD , 200MHz): δ = 3.33-3.37 (m, 2H), 3.68 (t, J=5.5 Hz, 2H), 6.05 (d, J=1.9 Hz, 1H), 6.20 (dd, J_1 =6.1 Hz, J_2 =2.2 Hz, 1H), 6.95 (s, 2H), 6.97-7.02 (m, 2H), 7.08 (t, J=7.3 Hz, 1H), 7.14-7.23 (m, 2H), 7.26-7.39 (m, 2H), 7.61 (d, J=6.1 Hz, 1H).

[00259] ^{13}C -NMR (CD_3OD , 50MHz): δ = 45.5 (t), 62.4 (t), 90.9 (d), 102.8 (d), 119.3 (d), 121.1 (d), 124.1 (d), 124.4 (d), 130.8 (d), 137.8 (s), 147.9 (d), 154.2 (s), 154.5 (s), 159.3 (s), 161.5 (s).

BEISPIEL 16

[00260] 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol

[00261] 16a. 6-Chloro-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-2-amin



[00262] 100 mg 2,6-Dichlorpyridin, 100 mg p-Anisidin, 329 mg K_2CO_3 , 3 mg $Pd(OAc)_2$ und 9 mg BINAP wurden in ein Mikrowellengefäß eingewogen und 2.5 mL trockenes Toluol hinzugefügt. Das Gefäß wurde verschlossen, evakuiert und mit Argon gespült. Die Mischung wurde unter Rühren in einem CEM Explorer™ Mikrowellengerät für 30 Minuten auf 180 °C erhitzt. Die so erhaltene Mischung wurde auf r.t. abgekühlt. Der dabei gebildete Feststoff wurde abfiltriert und mit 10 mL CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel des Waschens und des Filtrates wurde vereinigt und einrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

[00263] 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-2-amin wurde in Form eines gelben Feststoffes erhalten.

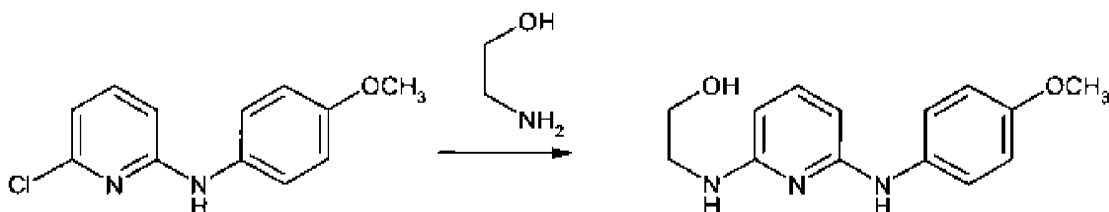
[00264] Ausbeute: 72% der Theorie. Fp.: 74-76 °C.

[00265] 1H -NMR ($CDCl_3$, 200MHz): δ = 3.8 (s, 3H), 6.52 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 6.65 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.89 (d, J=9.4 Hz, 2H), 7.19 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.34 (t, J= 7.9 Hz, 1H).

[00266] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 54.6 (q), 103.8 (d), 112.4 (d), 113.8 (d), 123.7 (d), 131.1 (s), 139.1 (d), 148.5 (s), 155.9 (s), 156.4 (s).

[00267] Elementaranalyse: Berechnet C 68.81, H 4.42, N 11.95: Gefunden C 68.60, H 4.22, N 8.92;

[00268] 16b. 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol



[00269] 190 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-2-amin wurden mit 397 mg Ethanolamin vermischt und die so erhaltene Mischung in einem verschraubbaren Gefäß unter Argon für 3 Tage auf 150 °C erhitzt. Die so erhaltene Mischung wurde auf r.t. abgekühlt und 5 mL EtOAc wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde 3x mit 5 mL EtOAc extrahiert und die organische Phasen vereinigt und abrotiert. Der so erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (EtOAc:PE 3:1). 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol wurde in Form eines braunen Öls isoliert.

[00270] Ausbeute: 73% der Theorie.

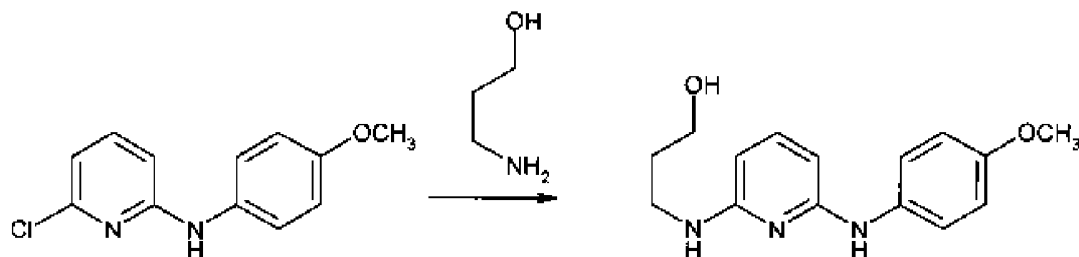
[00271] 1H -NMR ($CDCl_3$, 200MHz): δ = 3.35 (t, J=4.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.84 (t, J=4.6 Hz, 2H), 5.80 (d, J=7.8 Hz, 1H), 5.92 (d, J=9.4 Hz, 2H), 6.89 (d, J=8.9 Hz, 2H), 7.17 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.32 (t, J= 7.6 Hz, 1H).

[00272] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50MHz): δ = 54.6 (q), 103.8 (d), 112.4 (d), 113.8 (d), 123.7 (d), 131.1 (s), 139.1 (d), 148.5 (s), 155.9 (s), 156.4 (s).

[00273] HR-MS: Berechnet $[MH]^+$ = 260.1394; Gemessen $[MH]^+$ = 260.1389.

BEISPIEL 17

[00274] 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol



[00275] 95 mg 6-Chlor-N-(4-methoxyphenyl)pyridin-2-amin wurden mit 244 mg n-Propanolamin gemischt und diese Mischung analog der Methode in Beispiel 16b behandelt. 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol wurde in Form eines braunen Öls isoliert.

[00276] Ausbeute: 64% der Theorie.

[00277] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz): δ = 1.6-1.8 (m, 2H), 3.3 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.6 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.7 (s, 3H), 5.7 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.8 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.8 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.1 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.2 (t, J = 8.2 Hz, 1H).

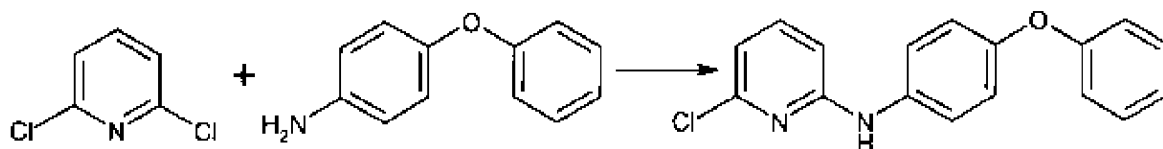
[00278] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50MHz): δ = 22.9 (t), 38.8 (t), 55.5 (q), 59.2 (t), 94.1 (d), 114.6 (d), 125.3 (d), 131.6 (s), 142.3 (d), 153.9 (s), 155.2 (d), 156.9 (s), 178.4 (s).

[00279] HR-MS: Berechnet $[\text{MH}]^+ = 274.1550$; Gemessen $[\text{MH}]^+ = 274.1555$.

BEISPIEL 18

[00280] 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol

[00281] 18a. 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-2-amin



[00282] 100 mg 2,6-Dichlorpyridin, 150 mg 4-Phenoxyanilin, 329 mg K_2CO_3 , 3 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 9 mg BINAP wurden in ein Mikrowellenvial eingewogen und 2.5 mL trockenes Toluol hinzugefügt. Die so erhaltene Mischung wurde analog der Methode in Beispiel 16a behandelt. Für die Säulenchromatographie wurde eine Mischung von $\text{EtOAc}:\text{PE} = 1:10$ verwendet. 6-Chloro-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-2-amin wurde in Form gelber Kristalle erhalten.

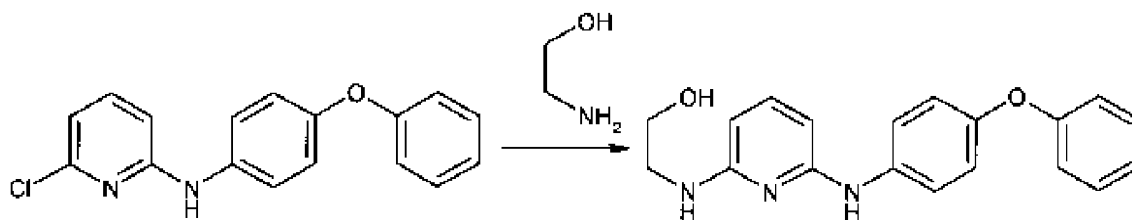
[00283] Ausbeute: 77% der Theorie. Fp.: 69-73 °C.

[00284] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz): δ = 6.58-6.75 (q, J = 7.2 Hz, 3H), 6.95-7.06 (m, 4H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.21-7.31 (m, 3H), 7.32-7.36 (m, 1H), 7.37-7.44 (m, 1H).

[00285] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50MHz): δ = 105.3 (d), 113.9 (d), 118.5 (d), 120.0 (d), 123.2 (d), 123.6 (d), 129.8 (d), 134.8 (s), 140.0 (d), 149.7 (s), 153.5 (s), 156.7 (s), 157.5 (s).

[00286] Elementaranalyse: Berechnet C 68.81%, H 4.42%, N 11.95%; Gefunden: C 68.60%, H 4.225%, N 8.92%.

[00287] 18b. 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol



[00288] Eine Mischung von 130 mg 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-2-amin in 214 mg Ethanolamin wurde in ein verschraubbares Gefäß gefüllt und analog der Methode in Beispiel 16b behandelt. Für die Säulenchromatographie wurde eine Mischung von EtOAc:PE = 1:1 (anstelle von EtOAc:PE = 3:1) verwendet. 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol wurde in Form eines braunen Öls erhalten.

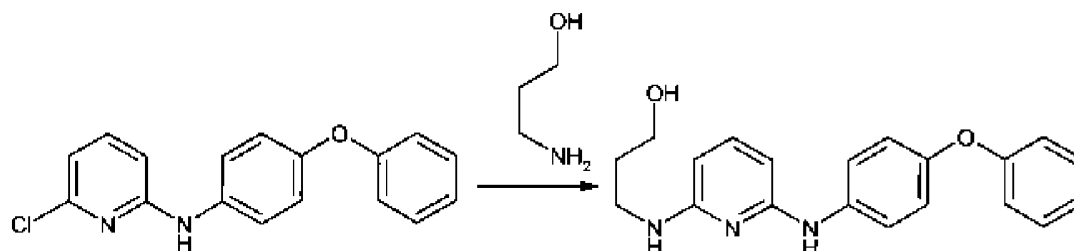
[00289] Ausbeute: 73% der Theorie.

[00290] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz): δ = 3.30 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.8 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 5.8 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.9 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.8-7.4 (m, 11H).

[00291] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50MHz): δ = 45.2, 53.4, 60.4, 94.5, 118.7, 119.8, 123.4, 125.3, 129.8, 133.2, 143.8, 152.2, 153.7, 154.6, 157.2, 177.5.

BEISPIEL 19

[00292] 3-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol



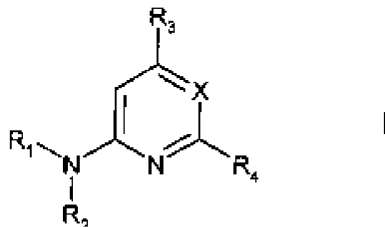
[00293] Eine Mischung von 150 mg 6-Chlor-N-(4-phenoxyphenyl)pyridin-2-amin in 304 mg n-Propanolamin in einem verschraubbaren Gefäß unter Argon wurde analog der Methode in Beispiel 16b behandelt. 3-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol wurde in Form eines braunen Öls erhalten.

[00294] Ausbeute: 73% der Theorie.

[00295] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz): δ = 1.8-1.9 (m, 2H), 3.4 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.7 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 5.9 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.0 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.9-7.4 (m, 11H).

Patentansprüche

- Verfahren zur Produktion von cardiomyocytenähnlichen Zellen, umfassend die Kultivierung von omnipotenten, pluripotenten oder Zelllinien vorbestimmten Säugetierzellen, insbesondere Skelett-Myoblasten, in Gegenwart einer Verbindung der Formel



worin

X CH oder N ist,

R₁ und R₂ unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder Cycloalkyl sind,

R₃ und R₄ unabhängig voneinander H oder NR₅R₆ sind,

R₅ und R₆ unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder Cycloalkyl sind, oder

R₁ und R₂ und/oder R₅ und R₆ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, jeweils einen heterocyclischen Ring mit 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O und S, bilden, oder

R₁ und/oder, wenn X CH ist, R₅ zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie jeweils gebunden sind, und zusammen mit je einem C-Atom des Pyrimidin- oder Pyridin-Rings einen heterocyclischen Ring bildet/bilden,

wobei die Alkyl-, Aryl- oder Cycloalkyl-Gruppen von R₁, R₂, R₅ und R₆ mit 0 bis 2 Gruppen R_{1a} substituiert sind, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogen, Alkyl, Alkoxy, -OH, -N(R_{1b}, R_{2b}), -SO₂N(R_{1b}, R_{2b}), -C(O)N(R_{1b}, R_{2b}), Heterocyclyl, -O-Aryl und -N-Aryl, wobei R_{1b} und R_{2b} unabhängig voneinander aus Wasserstoff und Alkyl ausgewählt sind; mit der Maßgabe:

dass R₄ nicht NR₅R₆ ist, wenn X N ist, und

dass als Säugetierzellen keine menschlichen omnipotenten Zellen eingesetzt werden.

- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der Verbindung der Formel I zumindest eine der Gruppen R₁, R₂, R₅ und R₆ ausgewählt ist aus (C₁₋₄)Alkyl, (C₃₋₈)Cycloalkyl, (C₁₋₄)Alkoxy, (C₆₋₁₈)Aryl, (C₆₋₁₈)Aryl(C₁₋₂)alkyl und 4- bis 8-gliedrigen, aliphatischen und aromatischen Heterocyclen mit 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O und S.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung der Formel I in Form eines Salzes eingesetzt wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung der Formel I ausgewählt ist aus:
 2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethan-1-ol,
 3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol,
 N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,
 2-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,
 N⁴-Cyclohexyl-N⁶-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-4,6-diamin,
 3-(6-(4-Morpholinophenylamino)pyrimidin-4-ylamino)propan-1-ol,
 2-(6-(4-(Phenylamino)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,
 2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,
 N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-propylpyrimidin-4,6-diamin,
 N⁴-Ethyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,
 N⁴-(4-Methoxyphenyl)-N⁶-methylpyrimidin-4,6-diamin,

- N⁴-Isopropyl-N⁶-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4,6-diamin,
2-(6-(3-Methoxyphenylamino)pyrimidin-4-ylamino)ethanol,
2-(4-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,
2-(4-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,
2-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,
3-(6-(4-Methoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol,
2-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)ethanol,
3-(6-(4-Phenoxyphenylamino)pyridin-2-ylamino)propan-1-ol
und Salzen davon.
5. Verwendung einer Verbindung der Formel I, wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, zur Herstellung von cardiomyocytenähnlichen Zellen durch Kultivierung von omnipotenten, pluripotenten oder Zelllinien vorbestimmten Säugetierzellen, insbesondere Skelett-Myoblasten, in Gegenwart der Verbindung der Formel I, mit der Maßgabe, dass die Zellen keine menschlichen omnipotenten Zellen sind.
 6. Verwendung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die omnipotenten, pluripotenten oder Zelllinien vorbestimmten Säugetierzellen von einem menschlichen oder tierischen Patienten stammen, der an einer Herzkrankheit leidet, und die daraus hergestellten cardiomyocytenähnlichen Zellen zur Transplantation als Behandlung der Herzkrankheit bei dem Patienten bestimmt sind.
 7. Verfahren zur Herstellung eines Transplantats zur Behandlung einer Herzkrankheit bei einem menschlichen oder tierischen Patienten, umfassend die folgenden Schritte:
 - (i) das Zurverfügungstellen von omnipotenten-, pluripotenten- oder Zelllinien vorbestimmten Säugetierzellen, insbesondere Skelett-Myoblasten, eines Patienten, der eine solche Behandlung benötigt,
 - (ii) das Kultivieren dieser Zellen in Gegenwart einer Verbindung der Formel I wie einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, um cardiomyocytenähnliche Zellen zu produzieren, die zur Transplantation in den Patienten in einer therapeutisch wirksamen Menge bestimmt sind,mit der Maßgabe, dass als Zellen keine menschlichen omnipotenten Zellen eingesetzt werden.

Hierzu keine Zeichnungen