



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 26 287 T2 2005.10.27**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 001 774 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 26 287.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FI98/00559**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 929 466.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/000132**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.06.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.01.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.10.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/47**

A61K 31/41, C07D 405/14

(30) Unionspriorität:

882262	25.06.1997	US
937118	24.09.1997	US

(73) Patentinhaber:

Orion Corp., Espoo, FI

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**PYSTYNEN, Jarmo, FIN-02260 Espoo, FI;
HAIKALA, Heimo, FIN-02180 Espoo, FI;
KAHEINEN, Petri, FIN-00250 Helsinki, FI;
KAIVOLA, Juha, FIN-00200 Helsinki, FI;
POLLESELLO, Piero, FIN-02700 Grankulla, FI;
ULMANEN, Ismo, FIN-01200 Vantaa, FI;
TENHUNEN, Jukka, FIN-01820 Klaukkala, FI;
TILGMANN, Carola, FIN-02420 Jorvas, FI**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON PHOSPHOLAMBANHEMMER ZUR STEIGERUNG DER KORONÄRE DURCH-
BLUTUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft die Verwendung eines Phospholambaninhibitors bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung des koronaren Flusses, insbesondere zum Erreichen einer direkten Dilatation der Koronararterien.

[0002] Eine Kontraktion der Muskelzelle wird gesteuert durch die Menge an freiem cytosolischem Calcium, das mit Calmodulin in glatten Muskelzellen oder mit Troponin C in Herzmuskelzellen und Skelettmuskelzellen wechselwirkt. Diese calciumaktivierten Proteine lösen eine Kaskade von Ereignissen aus, die zu einer Zellverkürzung und Muskelkontraktion führen.

[0003] Eines der bedeutendsten Enzyme, das dazu beiträgt, die Muskelkontraktion zu beenden oder zu verhindern, ist die Ca^{2+} -ATPase, die im Innern der Zelle in dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisiert ist. Dieses Enzym überträgt cytosolisches Calcium gegen den Konzentrationsgradienten in die intrazellulären Calciumspeicher. Die Funktion der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) wird gesteuert durch ein kleines Protein, das Phospholamban genannt wird. Wenn Phospholamban dephosphoryliert wird, inhibiert es die SERCA. Im Gegensatz dazu inhibiert phosphoryliertes Phospholamban diese Calciumpumpe nicht. Die Entfernung des Inhibitoreffekts von Phospholamban wird als eine Stimulation der Calciumaufnahme in das SR angesehen, da einige der SERCA-Moleküle zu jeder Zeit unter der Inhibitorsteuerung von Phospholamban stehen.

[0004] Es zeigte sich, daß Phospholamban eine bedeutende Rolle im Herzmuskel (Lindemann, J. P. et al., "Betaadrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles", J. Biol. Chem. 258: 464–471, 1983) und in den langsamen Skelettmuskeln spielt, wobei der schnelle Skelettmuskel keinerlei Phospholamban exprimiert (Hoh, J. F. Y., "Muscle fiber types and function", Current Opinion in Rheumatology, 4: 801–808, 1992). Darüber hinaus wird Phospholamban in Mousaorta exprimiert (Lalli, J. et al., "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle", Circ. Res. 80(4): 506–513, 1997), und es wird daher angenommen, daß Phospholamban SERCA in peripherem Gefäßgewebe steuert.

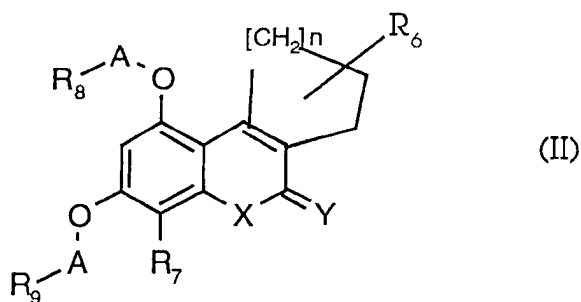
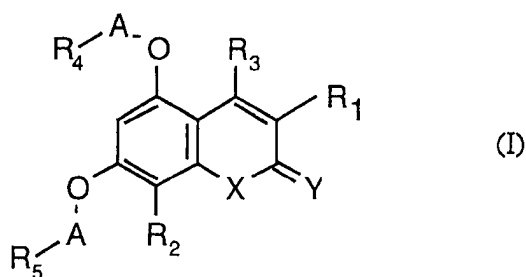
[0005] Aufgrund seiner Inhibitorwirkungen auf die SERCA, die im Herzgewebe vorhanden ist, unterdrückt Phospholamban sowohl die Relaxationsrate als auch die Kontraktionsrate im Herz von Säugetieren. Daher würde eine Verbindung, die in der Lage ist, die Inhibitorwirkungen von Phospholamban auf Herz-SERCA zu verringern, z. B. durch Unterbrechung der Phospholamban-SERCA-Wechselwirkung, brauchbar sein bei der Behandlung einer Herzinsuffizienz.

[0006] Erst kürzlich wurde ein Beweis erbracht, daß PLB in aortalen Endothelialzellen vorhanden ist (Sutliff, R. L. et al., "Functional and biochemical evidence for modulation of endothelial cell function by phospholamban", FASEB Journal 12(5): A957, 1998), wo es die Aktivität der Isoform der SERCA, die auf dem endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist, moduliert. Es wurde auch gezeigt, daß eine verringerte Aktivität des Calciumpumpens des endoplasmatischen Retikulums in aortalen Endothelialzellen zu einer mangelhaften Endothelium-abhängigen Relaxation von glatten aortalen Gefäßzellen führt (Liu, L. H. et al., "Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca^{2+} signalling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 3", J. Biol. Chem. 272(48): 30538–30545, 1997).

[0007] Es gibt keinen veröffentlichten Beleg für das Vorkommen von Phospholamban in Endothelialzellen von Koronararterien.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Es wurde nun herausgefunden, daß Verbindungen der Formeln (I) oder (II) wirksam sind bei der Abschwächung der Inhibitoreffekte von Phospholamban auf Herz-SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) wirken als Phospholambaninhibitoren durch direktes Binden an das Phospholambanprotein. Dadurch eliminieren die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) die Inhibitorwirkung von Phospholamban auf die SERCA, wie die Proteinkinasen, wenn sie Phospholamban phosphorylieren.



worin

R_1 gleich Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aryl, Arylalkyl, Hydroxyalkyl, Halogenalkyl, Alkoxy, COR_{10} , $CONR_{10}R_{11}$, OR_{10} , $S(O)_mR_{10}$, $NR_{10}COR_{11}$ oder $NR_{10}R_{11}$ ist, wobei R_{10} gleich Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aryl, Arylalkyl, Hydroxyalkyl, Halogenalkyl, Alkoxy oder Hydroxy ist und R_{11} gleich Wasserstoff, Alkyl, Aryl, Arylalkyl, Alkoxy, Aryloxy, Hydroxy oder Acyl ist oder wobei im Fall, daß X NR_{11} ist, R_1 auch Carboxylalkyl sein kann,

R_6 gleich Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aryl, Arylalkyl ist,

R_2 und R_7 gleich Wasserstoff, Alkyl, Aryl, Arylalkyl, Alkenyl, COR_{10} , $CONR_{10}R_{11}$, Halogen, Trifluormethyl, Nitro oder Cyano bedeuten, wobei R_{10} und R_{11} wie oben definiert sind,

R_3 gleich Wasserstoff, Alkyl, Aryl oder Arylalkyl ist,

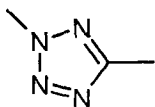
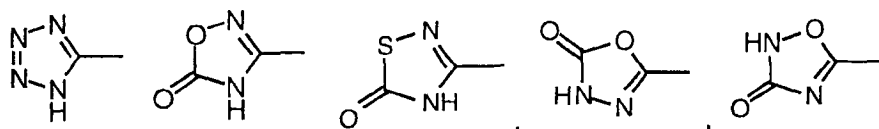
A gleich Alkyl oder substituiertes Alkyl bedeutet,

m gleich 0–2 ist und n gleich 1–3 ist,

Y gleich O, NR_{11} oder S bedeutet, wobei R_{11} genauso wie oben ist,

X gleich O, NR_{11} oder S bedeutet, wobei R_{11} genauso wie oben ist,

R_4 , R_5 , R_8 und R_9 unabhängig eine der folgenden Gruppen bedeuten:



oder in dem Fall, wobei X gleich NR_{11} ist, R_4 , R_5 , R_8 und R_9 auch unabhängig $HOOC-$, $R_{12}OOC-$, H_2NCO- oder $HOHNCO-$ sein können, wobei R_{12} Alkyl, Arylalkyl oder Aryl bedeutet,

und wobei jeder oben definierte Arylrest als solcher oder als Teil einer anderen Gruppe substituiert sein kann, und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

[0009] Darüber hinaus wurde überraschenderweise herausgefunden, daß die Phospholambaninhibitoren der Formeln (I) oder (II) den koronaren Fluß in isolierten schlagenden Herzen von Meerschweinchen, die mit konstantem Druck durchströmt wurden, erhöhten. Die Größenordnung des Effekts auf den koronaren Fluß überstieg deutlich die erhöhenden Effekte der Verbindungen auf die Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeiten der linken Herzkammer, was anzeigt, daß die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) direkt die Koronararterien erweitern. Der Effekt der Verbindungen (I) oder (II) auf den koronaren Fluß geht den anderen Effekten voraus, was bestätigt, daß die Koronardilatation eine Folge war der direkten Wirkung der Verbindungen auf die Koronararterien. Darüber hinaus wurde herausgefunden, daß der vasodilatatorische Effekt der Phospholambaninhibitoren von (I) oder (II) von einem Endothelial-medierten Mechanismus herrührt. Wir denken daher, daß Phospholambaninhibitoren eine Vasodilatation induzieren und den koronaren Fluß verstärken durch Blockie-

ren des Inhibitoreffekts von PLB auf SERCA auf dem endoplasmatischen Retikulum der Endothelialzellen der Koronararterien.

[0010] Mit der unerwarteten Fähigkeit zur direkten Dilatation der Koronararterien sind Phospholambaninhibitoren, wie die Verbindungen (I) oder (II), brauchbar bei der Behandlung von Zuständen, bei denen eine Erhöhung des koronaren Flusses gewünscht ist, z. B. bei koronaren Herzerkrankungen und bei einer hämodynamischen Krise, bei der der niedrige aortale Blutdruck den koronaren Perfusionsdruck senkt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] [Fig. 1](#) zeigt CD-Spektren von 50 μM an PLB[1–36 a. a.] (plb), PLB[1–36 a. a.] (Ser16PO₃⁻, Thr17PO₃⁻) (plbPP), Verbindung des Beispiels 1c, und der Mischungen PLB[1–36 a. a.] + Verbindung des Beispiels 1c und PLB[1–36 a. a.] (Ser16PO₃⁻, Thr17PO₃⁻) + Verbindung des Beispiels 1c in Wasser bei Raumtemperatur.

[0012] [Fig. 2A](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c (50 und 100 μM) auf die Ca²⁺-Aufnahmerate in die SR-Vesikel des Herzmuskels.

[0013] [Fig. 2B](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c (50 und 100 μM) auf die Ca²⁺-Aufnahmerate in die SR-Vesikel des schnellen Skelettmuskels.

[0014] [Fig. 3A](#) zeigt die Erhöhung des koronaren Flusses, die mediiert wird durch den direkten Dilatationseffekt der Verbindung des Beispiels 1c auf die Koronararterien, welche glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelialzellen enthalten.

[0015] [Fig. 3B](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c auf die positive Ableitung (positives dP/dt max) des linken Kammerdrucks.

[0016] [Fig. 3C](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c auf die negative Ableitung (negatives dP/dt max) des linken Kammerdrucks.

[0017] [Fig. 4A](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c auf den koronaren Fluß (ml/min) ohne Zugabe von Triton $\times 100$.

[0018] [Fig. 4B](#) zeigt die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c auf den koronaren Fluß (ml/min) mit Triton $\times 100$, das verwendet wird zur Zerstörung der Endothelialzellen der Koronargefäße.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt eine Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zum Erreichen einer direkten Dilatation der Koronararterien zur Verfügung. Darüber hinaus stellt die Erfindung eine Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Koronarherzerkrankungen zur Verfügung. Die Erfindung stellt auch eine Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer hämodynamischen Krise zur Verfügung, bei der der niedrige aortale Blutdruck den koronaren Perfusionsdruck senkt.

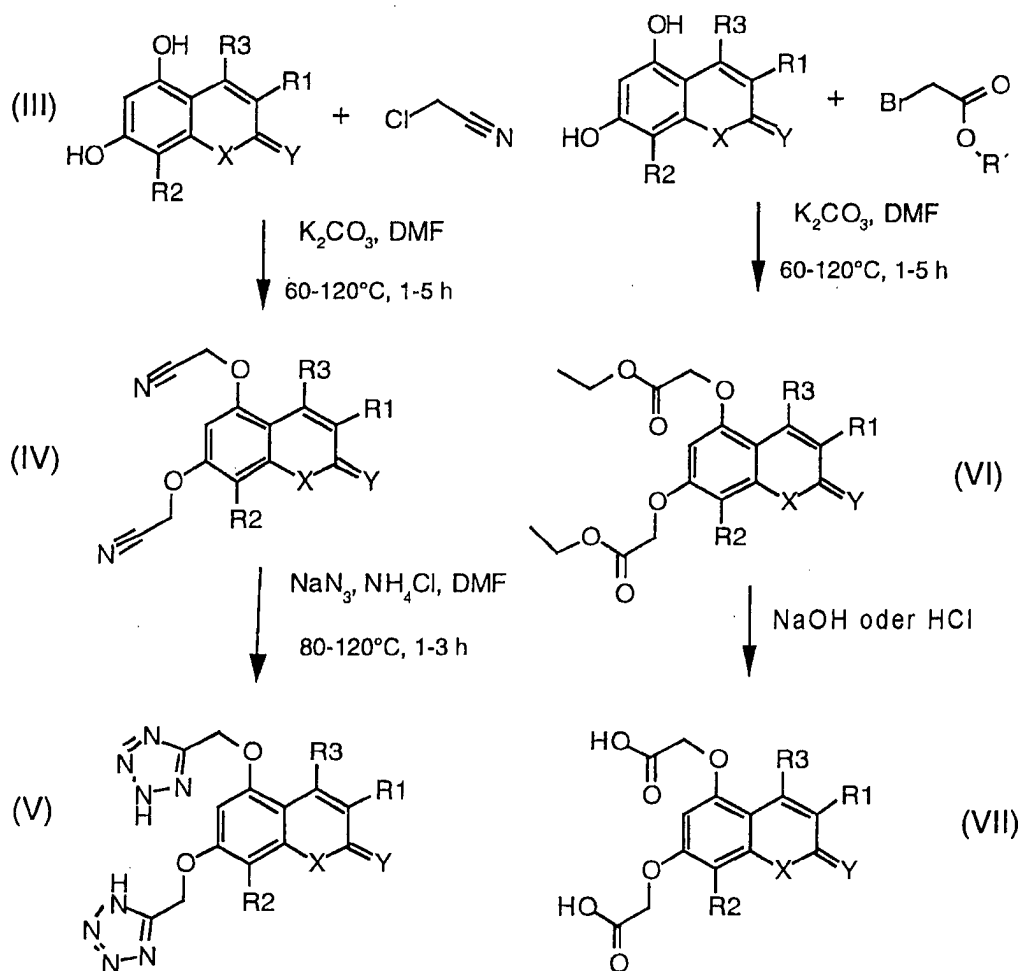
[0020] Der Begriff "Phospholambaninhibitor" bedeutet hier eine Verbindung, welche den Inhibitoreffekt von Phospholamban auf SR Ca²⁺-ATPase durch direktes Binden an das Phospholambanprotein abschwächt.

[0021] Der Inhibitoreffekt einer gegebenen Verbindung auf Phospholamban kann dargestellt werden durch Messen des Effekts der Verbindung auf die Calciumaufnahme in die SR-Vesikel, die präpariert wurden aus Herzgewebe, und in die SR-Vesikel, die präpariert wurden aus schnellem Skelettmuskel (Psoas m.). Beide Arten an SR-Vesikeln enthalten Ca²⁺-ATPase, jedoch enthalten die Vesikel des schnellen Skelettmuskels kein Phospholamban (Hoh JFY, "Muscle fiber types and function", Current Opinion in Rheumatology, 4: 801–808, 1992). Eine Erhöhung der Calciumaufnahme in die SR-Vesikel, die präpariert wurden aus Herzgewebe, jedoch nicht in die SR-Vesikel, die präpariert wurden aus schnellem Skelettmuskel, zeigt an, daß die Verbindung die Inhibitorwirkung von Phospholamban auf SR Ca²⁺-ATPase durch direktes Binden an das Phospholambanprotein abschwächt und daß die Verbindung anwendbar ist als ein Phospholambaninhibitor in dem Verfahren der Erfindung. Das direkte Binden einer Verbindung an das Phospholambanprotein kann festgestellt werden durch die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie. Die Verfahren zur Bestimmung, ob eine Verbindung die Inhibitorwirkung von Phospholamban auf SR Ca²⁺-ATPase durch direktes Binden an das Phospholambanprotein ab-

schwächt, d. h. ein Phospholambaninhibitor ist, werden im experimentellen Abschnitt ausführlich dargestellt.

[0022] Die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) können hergestellt werden aus den 1,3-Dihydroxy-substituierten heteroaromatischen Verbindungen durch Alkylieren der Dihydroxyverbindungen mittels geeigneter Alkylierungsmittel, zum Beispiels mittels Chloracetonitril oder Bromessigsäureester gemäß dem folgenden Schema 1, wobei R_1 , R_2 , R_3 , X und Y genauso wie oben definiert sind, R' eine Schutzgruppe für das Hydroxyl, z. B. Methyl, Benzyl oder Tetrahydropyranyl, ist.

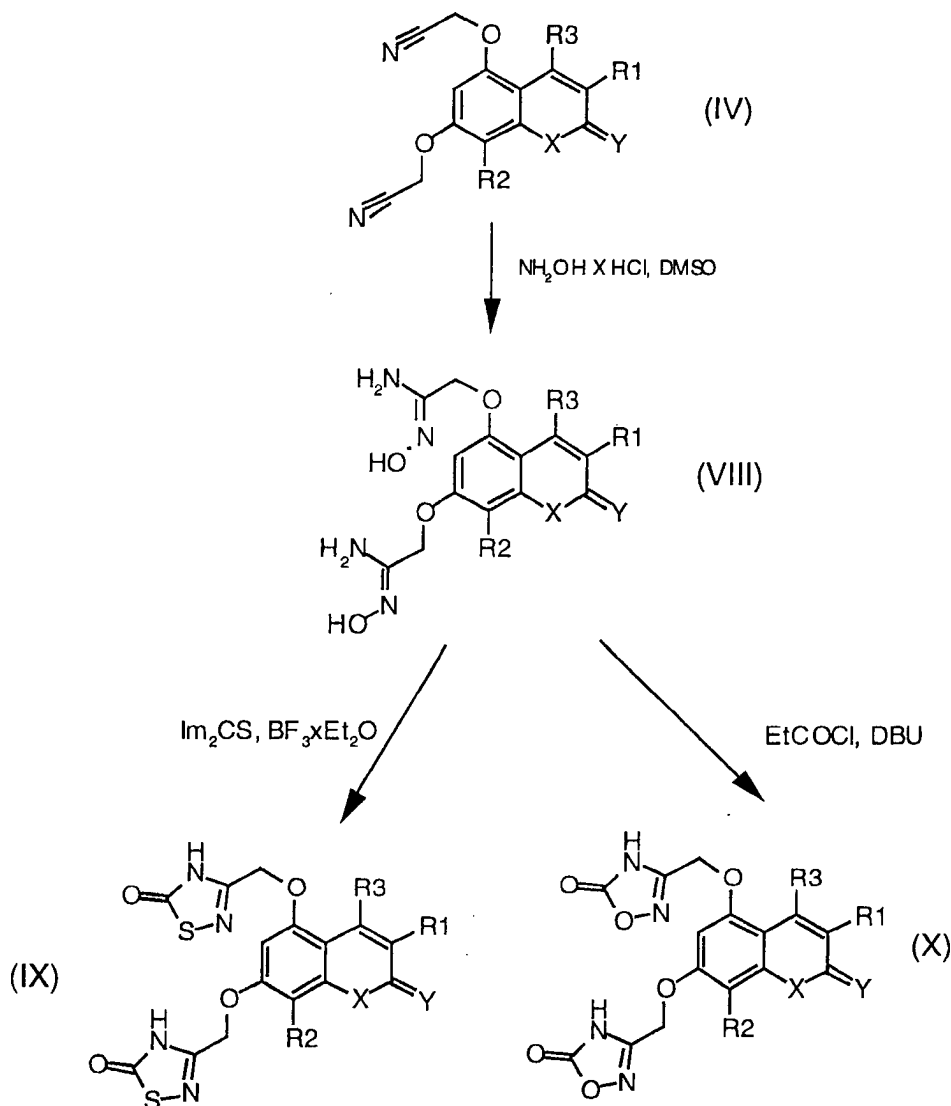
SCHEMA 1



[0023] Die oben beschriebene Cyanoverbindung (IV) wird verwendet zur Herstellung der 1,2,4-Oxadiazol- und 1,2,4-Thiadiazol-Derivaten, wobei die Verfahren verwendet werden, die beschrieben sind in J. Med. Chem. 1996, 39, 5228-5235.

[0024] Die Synthesen werden in Schema 2 aufgezeigt, wobei R_1 , R_2 , R_3 , X und Y genauso wie oben definiert sind.

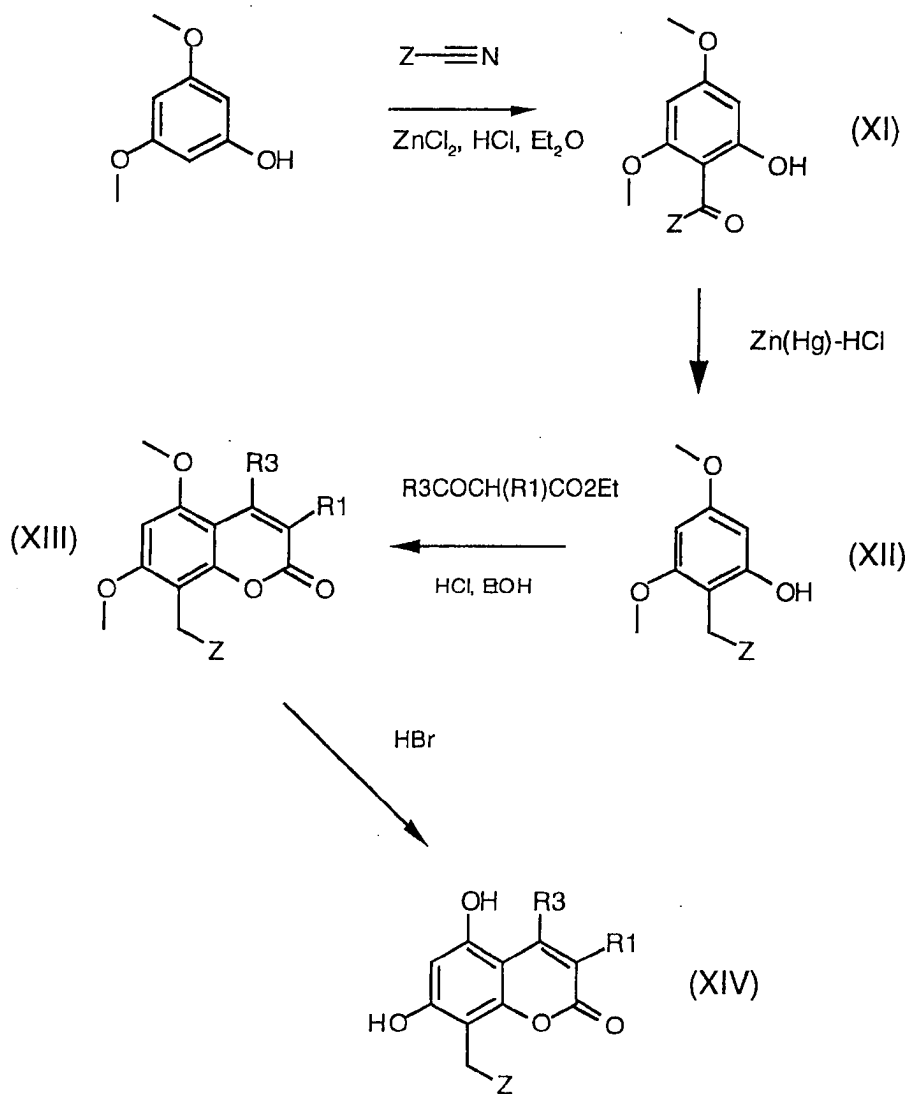
SCHEMA 2



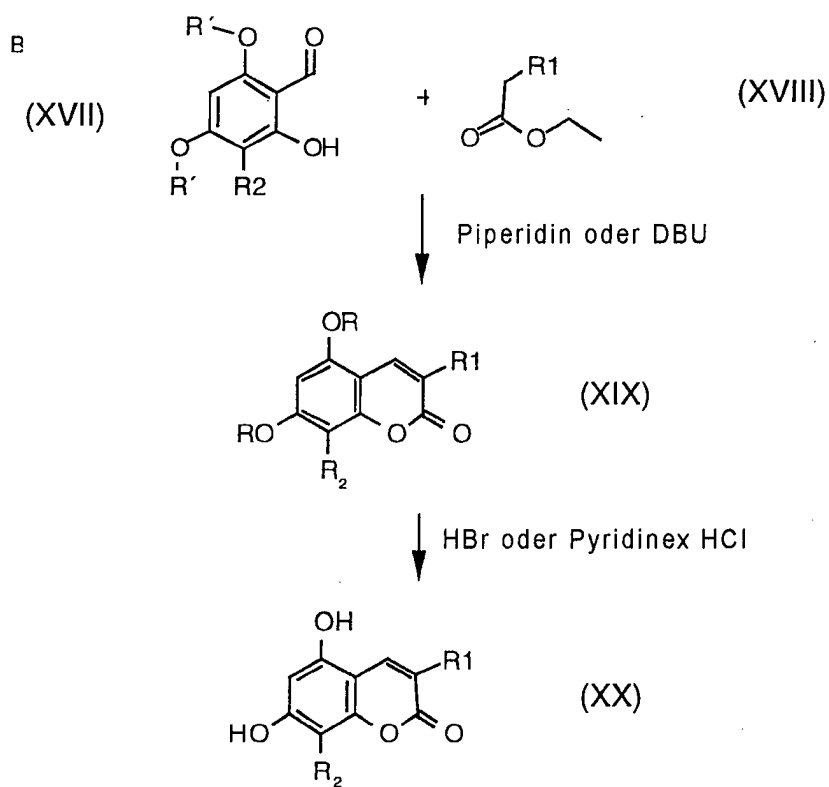
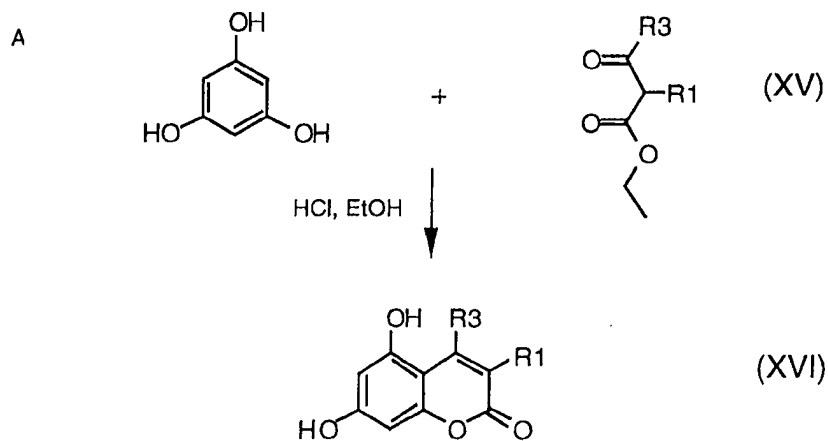
[0025] Die anderen Heterocyclen wie Gruppen R_4 , R_5 , R_8 und R_9 werden hergestellt wie in Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 45–50, beschrieben

[0026] Die Dihydroxyaromaten (III) werden hergestellt unter Verwendung der Literaturverfahren. Die Cumarine (XIV), (XVI) und (XX) werden hergestellt durch die Verwendung der Knoevenagel-Kondensation oder der von-Pechmann-Reaktion, wie in Schema 3 und 4 dargestellt, wobei R_1 , R_2 und R_3 genauso wie oben definiert sind, Z gleich Alkyl, Aryl, Arylalkyl oder Alkenyl ist und R' eine Schutzgruppe für die Hydroxyle, z. B. Methyl, Benzyl oder Tetrahydropyranyl, ist.

SCHEMA 3

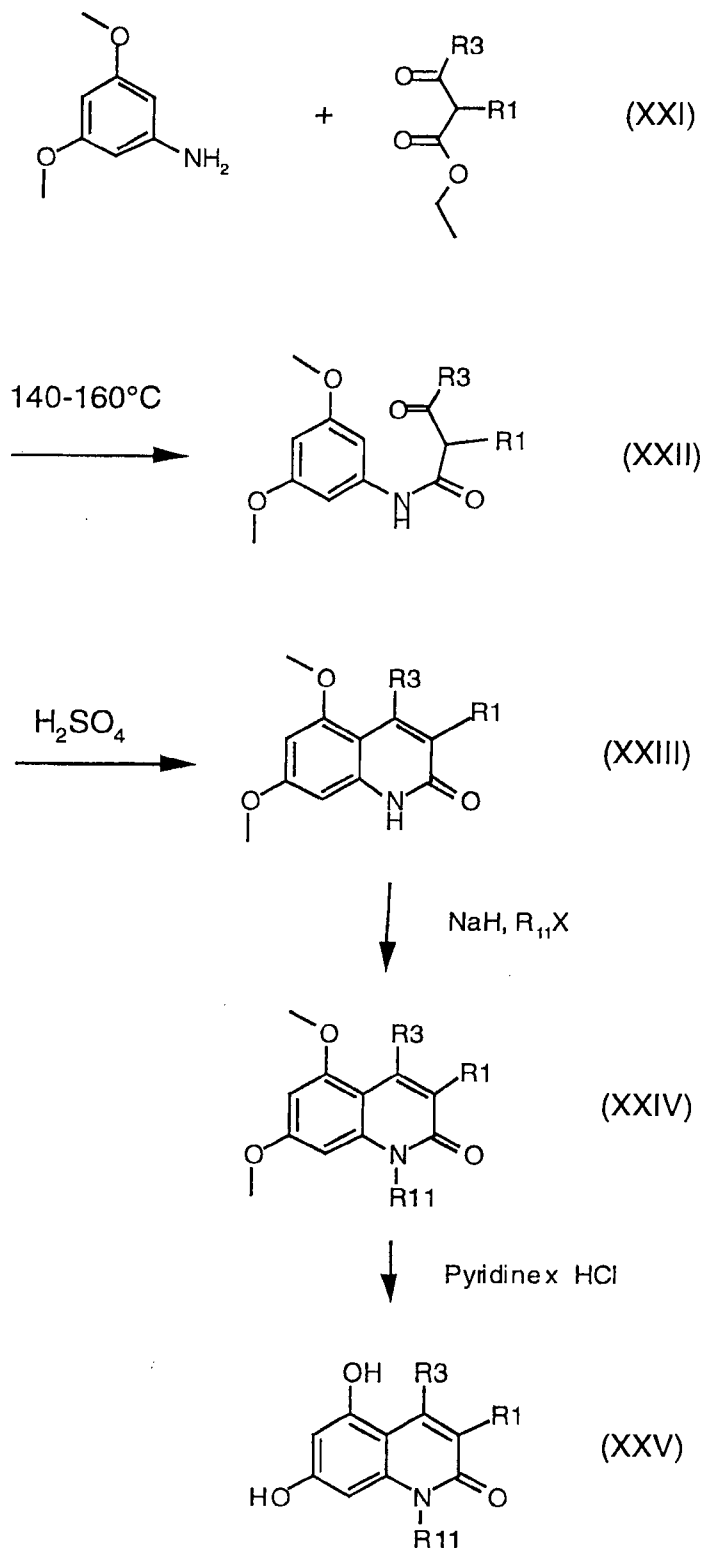


SCHEMA 4



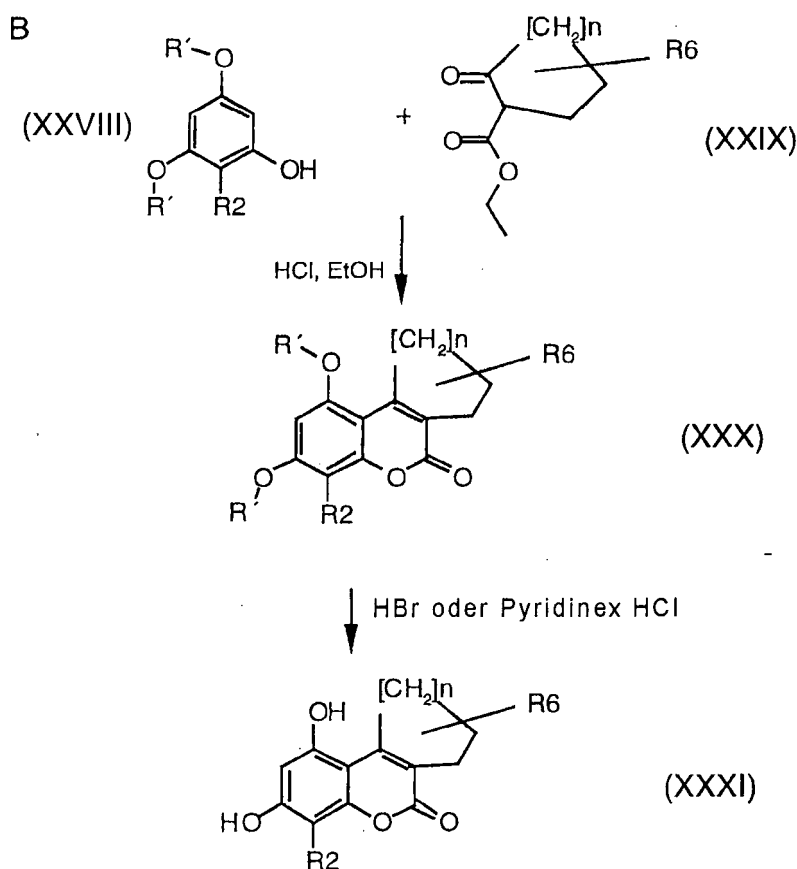
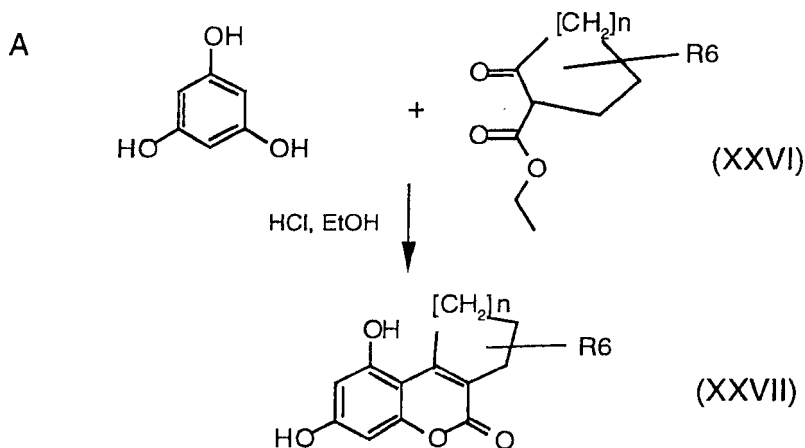
[0027] Die Chinolinone werden hergestellt durch die Knorr-Reaktion, wie in Schema 5 beschrieben, wobei R_1 , R_{11} und R_3 genauso wie oben definiert sind, X ein Halogen ist.

SCHEMA 5



[0028] Die cyclischen Verbindungen (II) können entsprechend hergestellt werden aus Verbindung (XXXI), die gemäß Schema 6 hergestellt werden kann, wobei R₂ und R₆ genauso wie oben definiert sind, R' ein Schutzgruppe für die Hydroxyle, z. B. Methyl, Benzyl oder Tetrahydropyranyl, ist.

SCHEMA 6



[0029] Cyclische Chinolinverbindungen (II) können unter Verwendung von Schema 5 entsprechend hergestellt werden aus (XXVI).

[0030] Salze und Ester der Verbindungen können, wenn anwendbar, hergestellt werden durch bekannte Verfahren. Physiologisch verträgliche Salze sind brauchbar als aktive Medikamente, jedoch sind Salze mit Alkali- oder Erdalkalimetallen bevorzugt. Physiologisch verträgliche Ester sind ebenfalls als aktive Medikamente brauchbar. Beispiele sind die Ester mit aliphatischen oder aromatischen Alkoholen.

[0031] Der Begriff "Alkyl", wie er hierin als solches oder als Teil einer anderen Gruppe verwendet wird, umfaßt sowohl geradkettige, verzweigt-kettige und cyclische Reste von bis zu 18 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, am meisten bevorzugt 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Der Begriff "niederes Alkyl", wie er hierin als solches oder als Teil einer anderen Gruppe verwendet wird, umfaßt geradkettige, verzweigt-kettige und cyclische Reste von 1 bis 7, vorzugsweise 1 bis 4, am meisten bevorzugt 1 oder 2 Kohlenstoffatomen. Spezifische Beispiele für die Alkyl- und niederen Alkylreste sind jeweils Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl,

tert-Butyl, Pentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Cyclohexyl, Octyl, Decyl und Dodecyl, einschließlich der zahlreichen verzweigt-kettigen Isomere davon.

[0032] Der Begriff "Acyl", wie er hierin als solches oder als Teil einer anderen Gruppe verwendet wird, bezeichnet eine Alkylcarbonyl- oder Alkenylcarbonylgruppe, wobei die Alkyl- und Alkenylgruppen wie oben definiert sind.

[0033] Der Begriff "Aryl", wie er hierin als solches oder als Teil einer anderen Gruppe verwendet wird, bezeichnet eine monocyclische oder bicyclische Gruppe, die von 6 bis 10 Kohlenstoffatome im Ringabschnitt enthält. Spezifische Beispiele für Arylgruppen sind Phenyl, Naphthyl und dergleichen. "Aroyl" bedeutet auf eine entsprechende Weise eine Arylcarbonylgruppe.

[0034] Der Begriff "Alkoxy", wie er hierin als solches oder als Teil einer anderen Gruppe verwendet wird, umfaßt eine Alkylgruppe, wie sie oben definiert ist, verknüpft mit einem Sauerstoffatom. "Aryloxy" bedeutet auf entsprechende Weise eine mit einem Sauerstoffatom verbundene Arylgruppe.

[0035] Der Begriff "substituiert", wie er hierin in Zusammenhang mit verschiedenen Resten verwendet wird, bezeichnet Halogensubstituenten wie Fluor, Chlor, Brom, Iod oder Trifluormethylgruppe, Amino-, Alkyl-, Alkoxy-, Aryl-, Alkylaryl-, Halogenaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Hydroxy-, Alkylamino-, Alkanoylamino-, Arylcarbonylamino-, Nitro-, Cyano-, Thiol- oder Alkylthio-Substituenten.

[0036] Die "substituierten" Gruppen können 1 bis 3, vorzugsweise 1 oder 2, am meisten bevorzugt 1 der oben erwähnten Substituenten enthalten.

[0037] Phospholambaninhibitoren wie die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) können einem Patienten in therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht werden, die im allgemeinen von ungefähr 0,1 bis 500 mg, üblicherweise von ungefähr 0,5 bis 50 mg, pro Tag reichen in Abhängigkeit von dem Alter, dem Gewicht, dem Zustand des Patienten, der Verabreichungsrouten und dem verwendeten Phospholambaninhibitor. Der Begriff "therapeutisch wirksame Menge" bedeutet hierbei eine Menge, die eine direkte Dilatation der Koronararterien eines Patienten erzeugt. Die in der Erfindung verwendete aktive Verbindung, welche eine Verbindung der Formel (I) oder (II) oder irgendeine Verbindung ist, die eine wie oben definierte Phospholamban-inhibierende Aktivität besitzt, kann unter den im Stand der Technik bekannten Prinzipien zu Dosierungsformen formuliert werden. Sie kann einem Patienten als solches oder in Kombination mit geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffen in der Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Suppositorien, Emulsionen, Suspensionen oder Lösungen gegeben werden. Die Wahl geeigneter Bestandteile für die Zusammensetzung ist Routine für einen Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet. Es ist offensichtlich, daß geeignete Träger, Lösungsmittel, gelbildende Bestandteile, Dispersionen-bildende Bestandteile, Antioxidationsmittel, Farbstoffe, Süßstoffe, Benetzungsmittel und andere Bestandteile, die normalerweise auf diesem Gebiet der Technologie verwendet werden, ebenfalls eingesetzt werden können. Die Zusammensetzungen, welche die aktive Verbindung enthalten, können enteral oder parenteral gegeben werden, wobei die orale Route der bevorzugte Weg ist. Der Gehalt der aktiven Verbindung in der Zusammensetzung reicht von ungefähr 0,5 bis 100%, vorzugsweise von ungefähr 0,5 bis ungefähr 20%, bezogen auf das Gewicht der Gesamtzusammensetzung.

Experimente

[0038] Der Effekt der in der Erfindung verwendeten Verbindungen auf Phospholamban wurde verifiziert durch Messen ihrer Effekte auf die Calciumaufnahme in die SR-Vesikel, die präpariert wurden aus Herzgewebe, und in die Vesikel, die präpariert wurden aus schnellem Skelettmuskel (Psoas m.). Beide Arten an SR-Vesikel enthalten Ca^{2+} -ATPase, jedoch enthalten die Vesikel aus dem schnellen Skelettmuskel kein Phospholamban (Hoh JFY, "Muscle fiber types and function", Current Opinion in Rheumatology, 4: 801-808, 1992). Diese Experimente der Calciumaufnahme zeigten, daß die Verbindung des Beispiels 1c aktiv war in lediglich den Vesikeln, die aus Herzgewebe präpariert wurden, was vermuten ließ, daß der Effekt sich auf die Abschwächung einer Phospholambaninhibition begründete. Darüber hinaus wurde das direkte Binden der Verbindung des Beispiels 1c an Phospholamban demonstriert durch Anwendung der Circular dichroismus-Spektroskopie. Ferner wurde die Expressierung von Phospholamban in Schweinekoronararterien belegt mittels mRNA-Messungen und unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Phospholamban. Ferner wurden die Effekte der Verbindung des Beispiels 1c auf den koronaren Fluß und auf die Ableitungen des linken Kammerdrucks in isolierten schlagenden Herzen von Meerschweinchen, die mit konstantem Druck durchspült wurden, demonstriert. Schließlich wurde der Endothelial-medierte Mechanismus des vasodilatatorischen Effekts der Verbindungen der Erfindung demonstriert. Die Verfahren werden nachfolgend ausführlich beschrieben.

Experiment 1. Effekte auf die Calciumaufnahme in die SR-Vesikel, die aus Herz- und schnellem Skelettmuskel präpariert wurden

Herstellung der SR-Vesikel

[0039] Meerschweinchen (10–12) wurden enthauptet. Ihre Herzen oder die Psoas-Muskel wurden entnommen, in eiskaltem 0,9%igem NaCl gewaschen und in einem Puffer, der 20 mM Tris-Maleat, 0,3 M Sucrose, pH 7,0, enthielt, in Stücke geschnitten. Danach wurden Gewebestücke mit Polytron und ferner mit Potter (10 Hübe) homogenisiert. Die Homogenisate wurden während 15 min bei 4°C bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, und das Pellet wurde in 5 ml an Puffer (20 mM Tris-Maleat, 0,3 M Sucrose, pH 7,0) resuspendiert und erneut während 10 min bei 4°C bei 1000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem früher gesammelten Überstand vereinigt und nochmals während 20 min bei 4°C bei 10.000 g zentrifugiert. Der abschließende Überstand wurde in eine Flasche filtriert, die mit einem Magnetrührer ausgestattet war. Es wurde KCl zu dem filtrierten Überstand gegeben, um die Endkonzentration von 0,6 M (bei 4°C) zu ergeben. Die erhaltene Lösung wurde während 60 min bei 4°C bei 100.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml des Puffers, der 20 mM Tris-Maleat, 0,3 M Sucrose, pH 7,0, enthielt, suspendiert und während 60 min bei 4°C bei 100.000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml an Puffer, der 20 mM Tris-Maleat, 0,3 M Sucrose, 0,1 M KCl, pH 7,0, enthielt, suspendiert und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde ebenfalls gemessen, um die getrennt hergestellten Vesikelzubereitungen zu standardisieren.

Calciumaufnahmeassay

[0040] In dem Calciumaufnahmeassay wurde der Fluoreszenzindikator Fluo-3 verwendet, um die Abnahme der extravesikulären Ca^{2+} -Konzentration zu erfassen, wenn die SR- Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} von dem extravesikulären Raum in die SR-Vesikel überträgt.

[0041] Die oben erhaltenen SR-Vesikel (50 µg Protein/ml) wurden mit oder ohne der Testverbindung während 5 min bei 37°C in dem Assaypuffer, der 40 mM Imidazol, 95 mM KCl, 5 mM NaN_3 , 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 5 mM Kaliumoxalat, 2 µM Ruthenium-Rot, 5 µM Fluo-3, pH 7,0, enthielt, vorinkubiert. Das freie Calcium wurde mittels CaCl_2 auf 0,1 µM oder auf 0,04 µM eingestellt. Die Reaktion wurde initiiert durch Zugabe von ATP (5 mM). Das endgültige Reaktionsvolumen betrug 1,5 ml. Die Fluoreszenz der Reaktionsmischung wurde während 3 min unter Verwendung der Anregungs- und Emissionswellenlängen von 510 nm bzw. 530 nm gemessen.

Ergebnisse

[0042] Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c (50 und 100 µM) auf die Ca^{2+} -Aufnahmerate in die Herz-SR-Vesikel (A) und die SR-Vesikel des schnellen Skelettmuskels (B). Angegeben werden Mittelwerte \pm SEM der drei Experimente pro Gruppe. Es ist ersichtlich, daß die Verbindung des Beispiels 1c die Calciumaufnahme in die Herz-SR-Vesikel beschleunigt, aber die Calciumaufnahme in die SR-Vesikel, die aus dem schnellen Skelettmuskel präpariert wurden, nicht verändert.

[0043] Tabelle 1 zeigt die Wirkungen verschiedener anderer Phospholambaninhibitoren der Formeln (I) oder (II) auf die Ca^{2+} -Aufnahmerate in die Herz-SR-Vesikel (A) und die SR-Vesikel des schnellen Skelettmuskels (B). Die Experimente wurden bei 0,1 µM bzw. bei 0,04 µM an freien Calciumkonzentrationen durchgeführt.

TABELLE 1. Stimulation (%) der Ca²⁺-Aufnahme in die Vesikelpräparationen, die erhalten wurden aus dem ventrikulären Myocardium (A) und dem schnellen Skelettmuskel (B) des Herzens von Meerschweinchen

Verbindung des Beispiels Nr.	Die Stimulation (%) der Ca ²⁺ -Aufnahme	
	A	B
3c***	51	0
2c*	26	-1
7c*	5	-17
8g*****	18	0
11b*	28	nb
12*	32	nb
13d**	23	nb
14c*****	18	nb
18e*	13	nb
21*	11	nb
23*****	20	nb

***** 5 µM,
 **** 10 µM,
 *** 20 µM,
 ** 50 µM,
 * 100 µM,

nb nicht bestimmt

Experiment 2. Bindung der Verbindung des Beispiels 1c an den cytosolischen Teil von Phospholamban, demonstriert mittels Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie

[0044] Durch Peptidsystemen wurden sowohl das N-terminale Fragment mit 36 Aminosäuren des Human-Phospholambans (PLB[1-36 a. a.]) als auch das N-terminale Fragment mit 36 Aminosäuren des doppelt phosphorylierten Human-Phospholambans (PLB[1-36 a. a.] (Ser16PO₃⁻, Thr17PO₃⁻)) erhalten. Die Peptide wurden mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt, mittels Massenspektroskopie hinsichtlich der Homogenität analysiert, und es wurde eine Reinheit von 97% gefunden. Die Peptide wurden lyophilisiert und dann für eine CD-Analyse in Wasser auf eine Endkonzentration von 0,1 mM resuspendiert. Der pH-Wert beider Lösungen war zwischen 3 und 4 und wurde nicht weiter eingestellt. Die Verbindung des Beispiels 1c wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 mM in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf 7,2 eingestellt.

[0045] Es wurden Circular dichroismusspektren von Proben mit 100 µl bei 24°C erhalten. Die Spektren wurden aufgezeichnet auf einem Jasco J-720 Spektropolarimeter unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Pfadlänge von 1 mm. Die Bandbreite betrug 1 nm, die Empfindlichkeit 20 mdeg, die Schrittauflösung 0,5 nm, die Antwortzeit 0,5 s und die Scangeschwindigkeit 20 nm/min (von 250 bis 190 nm). Die Spektren wurden dargestellt in $[\theta] \times 10^{-3} \times \text{Grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

[0046] Die CD-Spektren von PLB[1-36 a. a.] und der Mischungen PLB[1-36 a. a.] + Verbindung des Beispiels 1c zeigen, daß eine dramatische Änderung in der durchschnittlichen Struktur des Peptids stattgefunden hat nach Zugabe der Verbindung des Beispiels 1c. Es ist eine deutliche Zunahme des α -helikalen Beitrags zu sehen ([Fig. 1](#)). Ein solches Verhalten wurde für viele Calmodulin-bindende Peptide gezeigt, welche Helices in dem gebundenen Zustand bilden. Die CD-Studien zeigten, daß, wenn solche Peptide Calmodulin binden, eine Erhöhung der Helizität des Komplexes über die Summe der beiden einzelnen nicht wechselwirkenden Komponenten auftritt (zur Übersicht siehe: O'Neil, K. T. und DeGrado, W. F. "How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices", TIBS 15: 59-64, 1990). Darüber hinaus wurde frü-

her mittels NMR demonstriert, daß das N-terminale Fragment von PLB[aa.1–25] direkt mit Calmodulin wechselwirkt (Gao, Y. et al. "Interaction of calmodulin with phospholamban and caldesmon: comparative studies by ¹H-NMR spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 1160: 22–34, 1992). Das vorliegende Experiment verifiziert somit, daß die Verbindung des Beispiels 1c einen Komplex mit PLB an seiner N-terminalen Domäne bildet.

[0047] Die Verbindung des Beispiels 1c, zugegeben zu PLB[1–36 a. a.] (Ser16PO₃⁻, Thr17PO₃⁻), besitzt keinen Einfluß auf die Struktur des phosphorylierten Peptids in dem Maße wie für das nichtphosphorylierte. Die CD-Messungen zeigen, daß die Verbindungen des Beispiels 1c mit dem cytosolischen Teil des Phospholambans PLB[1–36 a. a.] wechselwirken und nicht wechselwirken oder schwach wechselwirken mit dem phosphorylierten Phospholamban (PLB[1–36 a. a.] (Ser16PO₃⁻, Thr17PO₃⁻)). Somit ist die Wechselwirkung spezifisch für das nichtphosphorylierte Phospholamban.

Experiment 3. Erfassung von Phospholamban und Ca²⁺-ATPase-Polypeptiden durch Immunoblotten aus Schweineherzgewebe

Verfahren

[0048] Gewebeproben des Myocardium der linken Herzkammer, der Aorta, der proximalen Koronararterie (die ersten 2 cm der Koronararterie ausgehend von der Aorta) ebenso wie der distaleren Koronararterie (die nächsten 2 cm), die von drei Schweinen erhalten und in einen Pool gegeben wurden, wurden unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und die Pulver in Homogenisationspuffer (50 mM K⁺-Phosphatpuffer pH 7,0, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,3 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 0,3 M Sucrose) suspendiert. Jede Gewebeprobe wurde mit einem Potter-Elvehjelm-Homogenisator 20 mal bei +4°C homogenisiert (1100 Upm). Die Proteinkonzentration wurde gemessen gemäß Bradford, M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. Zur Bestimmung der Ca²⁺-ATPase und der Phospholamban(PLB)-Proteine wurden 30 µg an Gesamtprotein einer jeden Gewebeprobe mittels SDS-PAGE (13%) analysiert gemäß Laemmli, U., (1970), *Nature*, 227, 680–685. Die Proteine wurden mittels Western-Blotting (Towbin, H. et al., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 4350–4354) auf einer 0,45 µm-Nitrocellulosemembran (Bio-Rad Laboratories) erfaßt. Die Membranen zur Erfassung von Ca²⁺-ATPase-Protein wurden inkubiert mit anti-SR Ca²⁺-ATPase-polyklonalem Antikörper (1 : 500), gefolgt von einem sekundären anti-Kaninchen-IgG-POD-Antikörper. Zur Erfassung der Ca²⁺-ATPase wurde alternativ ein monoklonaler anti-SR-Ca²⁺-ATPase-Antikörper (1 : 1000; Affinity Bioreagents), gefolgt von einem anti-Maus-IgG-POD, verwendet.

[0049] Die Membranen zur Erfassung des PLB-Proteins wurden mit monoklonalem anti-PLB-Antikörper (Upstate Biotechnology, Inc.) bei einer Verdünnung von 1 : 1000 inkubiert, die Membranen wurden ferner mit anti-Maus-IgG-POD gewaschen und inkubiert. Die Membranen wurden entwickelt mittels ECL-Immunodetektion (Amersham Life Science), gefolgt von einem TMB-stabilisierten Substrat für HPR (Promega Corp.).

Ergebnisse

[0050] Gemäß den Western-Blots wurde die Ca²⁺-ATPase in allen Gewebeproben detektiert. Die Western-Blots ergaben auch, daß PLB in dem linken ventrikulären Myocardium und in der distalen Koronararterie gefunden wurde. Basierend auf unseren Western-Blots konnte kein PLB aus Gewebeproben detektiert werden, die von der Aorta und dem proximalen Teil der Koronararterie stammen.

Experiment 4. Analyse der Anwesenheit von Phospholamban-mRNA im Schweineherzgewebe

Verfahren

[0051] Zur Beantwortung der Frage, ob der glatte Muskel oder die Endothelialzellen einer Schweinekoronararterie Phospholamban(PLB)-mRNA enthielten, wurden Northern-Analysen mit den Proben dieser drei gepoolten Herzen durchgeführt im Hinblick auf die Anwesenheit von PLB-mRNA, wobei auf dem Gebiet gut bekannte Verfahren verwendet wurden. Es wurde eine RNA-Reinigung in kleinem Maßstab mit Gewebe des linken ventrikulären Myocardiums, der Aorta und der Koronararterie (proximaler und distalerer Bereich) des Schweins durchgeführt durch Pulverisieren von 200–800 mg des Gewebes unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser. Das Pulver wurde in einer Denaturierungslösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7, 0,5% N-Lauroylsarcosin, 0,1 M 2-Mercaptoethanol) suspendiert. Nach einer sauren Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die gesamte RNA zweimal mit Isopropanol ausgefällt und anschließend in Wasser gelöst. Die Konzentration der RNAs in den resultierenden Zubereitungen wurde spektrofotometrisch bestimmt, und deren Integrität wurde in nicht denaturierendem Agarosegel, das mit Ethidiumbromid angefärbt war, ana-

lysiert.

[0052] Die Northern-Analyse von PLB-mRNA in diesen Zubereitungen wurden gemäß herkömmlichen Verfahren durchgeführt (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Kurz zusammengefaßt wurden 10 µg und 20 µg an Gesamt-RNA von jedem Gewebe in 1% Formaldehyd/Agarose-Gel geladen. Als eine Kontrolle wurden 10 µg an RNA-Zubereitung, die von einem menschlichen Herzmuskelgewebe gewonnen wurde, verwendet, und es wurden im Handel erhältliche RNA-Ladder (BRL, Gaithersburg, MD) verwendet, um die Molekulargewichte der RNAs zu bestimmen. Nach dem Transfer der separierten RNAs auf einen Nylonfilter (Hybond-N, Amersham, UK) wurde der Filter mit dem ³²P-markierten Codierbereich des menschlichen PLB-Gens hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der Filter in stringenten Bedingungen, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet gut bekannt sind, gewaschen und auf Kodak X-Omat-Film belichtet.

Ergebnisse

[0053] Die Ergebnisse zeigen, daß das linke ventrikuläre Gewebe des Schweineherzens RNA enthält, welche mit der PLB-Hybridisierungssonde reagiert. In den Proben von Geweben der Aorta und der Koronararterie des Schweins wurde, wenn auch mit deutlich geringerer Intensität, ein Signal an derselben Position detektiert. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Ansicht, daß das PLB-Gen in dem Koronararteriengewebe des Schweins aktiv ist.

Experiment 5. Die Wirkungen auf die Ableitungen des linken ventrikulären Drucks und des koronaren Flusses

Verfahren

[0054] In dieser Studie wurden Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 300–400 g verwendet. Nachdem die Meerschweinchen durch einen Schlag auf den Kopf getötet und enthauptet wurden, wurde das Herz schnell entnommen. Das Herz wurde dann in kaltem oxygenierten Perfusionspuffer gespült. In die Aorta wurde eine Kanüle eingesetzt und mit einer Binde gesichert. Eine Gegenperfusion begann, sobald das Herz in eine thermostatisch gesteuerte Feuchtigkeitskammer der Langendorff-Apparatur gegeben wurde. Als ein Perfusionspuffer wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung (37°C) verwendet, die äquilibriert wurde in einem thermostatisch gesteuerten Blasenoxxygenator mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂). Die Zusammensetzung der Tyrode-Lösung betrug (in mM): NaCl 135; MgCl₂ × 6H₂O 1; KCl 5; CaCl₂ × 2H₂O 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ × 2H₂O 1; Glucose 10; pH 7,3–7,4. Die Experimente wurden unter Bedingungen eines konstanten Drucks (50 mmHg) durchgeführt. Nach einer kurzen Vorstabilisierung (10 min) wurde durch die linke Pulmonalvene und den linken Vorhof ein Latexballon (Größe 4) sorgfältig in der linken Kammer plziert. Der Latexballon wurde an einer Edelstahlkanüle befestigt, die mit einem Druckwandler gekoppelt war. Der Latexballon, die Kanüle und die Kammer des Druckwandlers waren mit einer Mischung aus Ethylenglycol/Wasser (1 : 1) gefüllt, wobei jegliche Luftblasen vermieden wurden. Durch den Druckwandler wurde der isovolumetrische linke Ventrikulardruck aufgezeichnet. Die maximalen positiven und negativen Ableitungen des linken Ventrikulardrucks wurden unter Verwendung der digitalisierten Drucksignale berechnet. Am Anfang des Experiments wurde das Volumen des Ballons eingestellt, um einen diastolischen Druck von ungefähr 5 mmHg zu erhalten. Die koronare Fluß (ml/min) wurde kontinuierlich mittels eines elektromagnetischen Durchflußmessers mit einer oberhalb der Aortakanüle eingesetzten Durchflußsonde aufgezeichnet. Man ließ das Herz mit einer koaxialen Elektrode, die auf der Oberfläche des rechten Vorhofs angeordnet war, mit 250 Schlägen/min schlagen. Vor dem Starten des Experiments ließ man das Herz weitere 30–50 min mit einem Vehikel (0,1% DMSO) sich stabilisieren, um einen stabilen koronaren Fluß zu erreichen.

[0055] Nach einem Aufzeichnen der Basislinie während 15 min wurden in Intervallen von 15 min verschiedene Konzentrationen der Testverbindung des Beispiels 1c zu dem Perfusionspuffer gegeben. Es wurde der Konzentrationsbereich von 0,3–30 µM getestet. Die Vehikelkonzentration (0,1% DMSO) wurde während des Experiments konstant gehalten.

Ergebnisse

[0056] [Fig. 3A](#) zeigt die Zunahme des koronaren Flusses, der durch den direkten Dilatationseffekt der Verbindung des Beispiels 1c auf die Koronararterien, welche vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelialzellen enthielten, mediiert wurde. Die [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen die Wirkung der Verbindung des Beispiels 1c auf die positiven und negativen Ableitungen (positives und negatives dP/dt max) des linken Ventrikulardrucks. Gegeben sind Mittelwerte ± SEM aus sechs Herzen, die mit 250 Schlägen/min schlugen.

[0057] Aus den obigen Experimenten folgt, daß die Zunahme des koronaren Flusses mediiert wird durch den direkten Dilatationseffekt auf die Koronararterien und daß der Dilatationseffekt von der Inhibierung des in den Koronararterien vorhandenen Phospholambans herrührt. Die Ergebnisse lassen daher eine potentielle Verwendung von Phospholambaninhibitoren bei der Behandlung von Patienten als möglich erscheinen, welche unter einer Abnahme des koronaren Flusses leiden.

[0058] Tabelle 2 zeigt die EC50-Werte und maximalen Effekte verschiedener anderer Phospholambaninhibitoren der Formel (I) oder (II) auf den koronaren Fluß.

TABELLE 2. EC50-Werte und maximale Effekte (%-Änderung von der Basislinie) auf den koronaren Fluß

Verbindung des Beispiels Nr.	EC50 (μM)	Maximaler Effekt
3c	5	+174 % bei 30 μM
5c	> 10	+52 % bei 30 μM
14c	1,5	+112 % bei 10 μM
8g	1	+100 % bei 10 μM
12	5	+60 % bei 10 μM
11b	1	+38 % bei 3 μM
18e	5	+69 % bei 30 μM
13d	6	+104 % bei 30 μM
21	2	+141 % bei 10 μM
23	0,9	+55 % bei 3 μM

Experiment 6

[0059] Dieses Experiment zeigt auf, daß der Vasodilatatoreffekt des Phospholambaninhibitors des Beispiels 1c von einem Endothelial-medierten Mechanismus herrührt. Die Substanz P, ein Endothelial-abhängiger Vasodilatator, wurde als eine Referenzverbindung verwendet. Triton \times 100 wurde verwendet zur Zerstörung der Endothelialzellen der Koronargefäße.

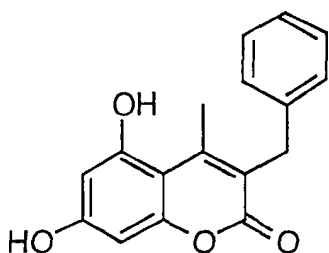
[0060] Das Experiment wurde durchgeführt unter einem Zustand des konstanten Drucks (50 mmHg) an einem freischlagenden Herzen. Der koronare Fluß (ml/min) wurde kontinuierlich mittels eines elektromagnetischen Durchflußmessers mit einer oberhalb der Aortakanüle eingesetzten Durchflußsonde aufgezeichnet.

[0061] Nach 15 min der Aufzeichnung der Grundlinie wurde ein Bolusdosis der Substanz P (0,1 μM /0,3 ml) über einen Seitenzweig der Aortakanüle ([Fig. 4B](#)) dem Perfusionspuffer zugegeben. Die Zugabe der Substanz P wurde zweimal wiederholt, bevor die Injektion von Triton \times 100 (0,05%/0,2 ml) über eine Nadel, die unmittelbar oberhalb der Aorta in die Kanüle eingesetzt wurde, gegeben wurde. Nach 85 min der Triton \times 100-Injektion wurde eine Kontrolldosis der Substanz P zweimal zu dem Perfusionspuffer gegeben, um zu überprüfen, ob die Endothelialzellen zerstört worden sind. Danach wurde der Konzentrationsbereich von 0,3–30 μM der Verbindung des Beispiels 1c getestet. Die Vehikelkonzentration (0,1% DMSO) wurde im Verlauf des Experiments konstant gehalten. In [Fig. 4A](#) ist ein Kontrollexperiment gezeigt, wobei der Effekt des Beispiels 1c bei demselben Konzentrationsbereich zu sehen ist, wenn das Endothelin nicht durch Triton \times 100 zerstört wird.

[0062] Die folgenden nichteinschränkenden Beispiels veranschaulichen die Herstellung von Phospholambaninhibitoren.

BEISPIELE

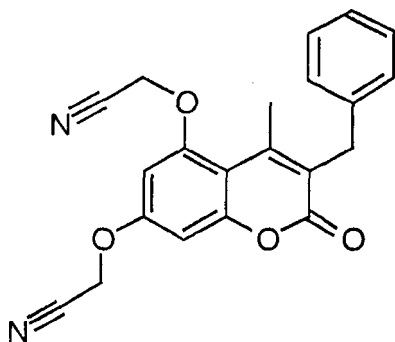
Beispiel 1. Herstellung von 3-Benzyl-5,7-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on
a) 3-Benzyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0063] Eine Lösung von Phloroglucinoldihydrat (20 g) und Ethyl-2-benzylacetoacetat (27,5 ml) in Ethanol (320 ml) wurde mit trockenem HCl bei 0°C während fünf Stunden behandelt, und die Lösung wurde über Nacht auf der Temperatur gehalten. Die gelbe Lösung wurde konzentriert und mit Wasser verrieben, die Feststoffe filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das resultierende Hydrat wurde dreimal aus Toluol bis zur Trockne eingedampft, mit Petrolether (Siedepunkt 40–60°C) verrieben und filtriert. Ausbeute: 33,4 g (96%). Schmelzpunkt: 258–260°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,525 (s, 3H, CH₃), 3,887 (s, 2H, CH₂Ph), 6,171 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,274 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,167–7,279 (m, 5H, Ph), 10,2 (s, 1H, OH), 10,47 (s, 1H, OH).

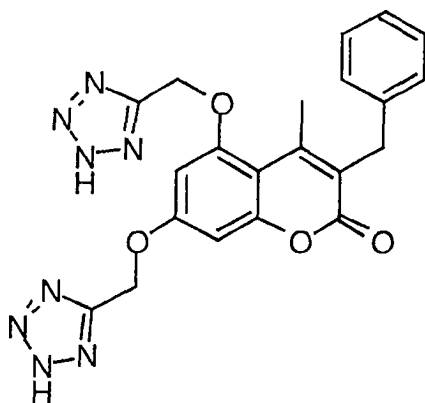
b) 3-Benzyl-5,7-bis(cyanomethoxy)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0064] Chloracetonitril (6,86 g), Kaliumcarbonat (23,9 g) und 12,2 g des Produkts aus Beispiel 1a wurden während zwei Stunden bei 100°C unter Stickstoff in 120 ml an DMF gerührt. Die Reaktionsmischung wurde gekühlt und in Eiswasser gegossen. Die Feststoffe wurden filtriert und mit Wasser gewaschen. Ausbeute: 13,8 g (88%). Schmelzpunkt: 147–154°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,525 (s, 3H, CH₃), 3,969 (s, 2H, CH₂Ph), 5,307 (s, 2H, OCH₂CN), 5,314 (s, 2H, OCH₂CN), 6,814 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,940 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,18–7,292 (m, 5H, Ph).

c) 3-Benzyl-5,7-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



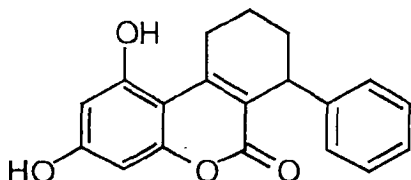
[0065] Das Produkt aus Beispiel 1b (1 g), Natriumazid (0,42 g) und Ammoniumchlorid (0,34 g) wurden während fünf Stunden bei 100°C unter Stickstoff in DMF (5 ml) gerührt. Man ließ die Reaktionsmischung abkühlen

und sie wurde dann in Eiswasser gegossen. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 10–11 eingestellt und die Lösung entweder einmal mit Ethylacetat extrahiert oder durch CELITE filtriert. Die Lösung wurde mit Chlorwasserstoffsäure auf pH 2 angesäuert, auf 5°C gehalten und filtriert. Ausbeute: 0,96 g (81%). Schmelzpunkt: 229–233°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,468 (s, 3H, CH₃), 3,937 (s, 2H, CH₂Ph), 5,596 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,602 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,832 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,851 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,171–7,283 (m, 5H, Ph).

Beispiel 2. Herstellung von 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-7-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on

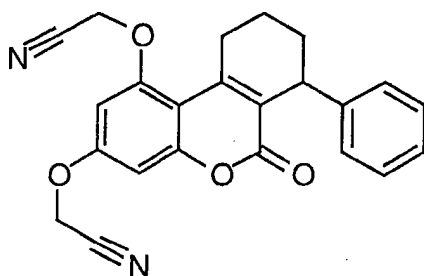
a) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-dihydroxy-7-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0066] Eine Lösung von Phloroglucinol (0,7 g) und 2-Ethoxycarbonyl-3-phenylcyclohexanon (1,5 g) in Ethanol wurde wie in Beispiel 1a beschrieben mit trockenem HCl behandelt. Das Produkt wurde zuerst aus Ethanol-Wasser (1 : 1) rekristallisiert und dann mit Ether verrieben. Ausbeute: 0,61 g.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,38–1,52 (m, 1H), 1,57–1,66 (m, 1H), 1,69–1,78 (m, 1H), 1,86–1,96 (m, 1H), 2,9–3,02 (m, 1H), 3,3–3,4 (m, 1H), 4,050 (b, 1H), 6,157 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,297 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,076–7,265 (m, 5H), 10,153 (s, 1H), 10,456 (s, 1H).

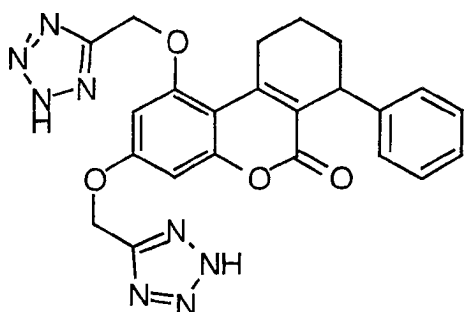
b) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis(cyanomethoxy)-7-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0067] Das Produkt aus Beispiel 2a (0,5 g) wurde mit Chloracetonitril (0,25 g) und Kaliumcarbonat (1,12 g) wie in Beispiel 1b beschrieben in DMF (5 ml) behandelt. Ausbeute: 0,6 g.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,38–1,58 (m, 1H), 1,6–1,7 (m, 1H), 1,7–1,76 (m, 1H), 1,89–1,99 (m, 1H), 2,9–3,03 (m, 1H), 3,2–3,28 (m, 1H), 4,111 (b, 1H), 5,314 (s, 2H), 5,349 (s, 2H), 6,840 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,925 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,108–7,274 (m, 5H).

c) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-7-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



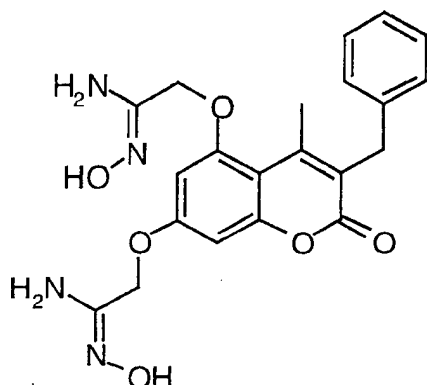
[0068] Das Produkt aus Beispiel 2b (0,6 g) wurde wie in Beispiel 1c mit Natriumazid (0,2 g) und Ammoniumchlorid (0,17 g) in DMF (5 ml) behandelt. Das Produkt wurde aus einer Mischung aus DMF, Ethanol und Wasser (ungefähr 1 : 2 : 3) rekristallisiert. Ausbeute: 0,41 g. Schmelzpunkt: 153–154°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,38–1,5 (m, 1H), 1,5–1,6 (m, 1H), 1,69–1,76 (m, 1H), 1,87–1,96 (m, 1H), 2,9–3,05 (m, 1H), 3,2–3,3 (m, 1H), 4,094 (b, 1H), 5,602 (s, 2H), 5,643 (s, 2H), 6,832 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,851

(d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,089–7,212 (m, 5H).

Beispiel 3. Herstellung von 3-Benzyl-5,7-bis[(2,5-dihydro-5-oxo-4H-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

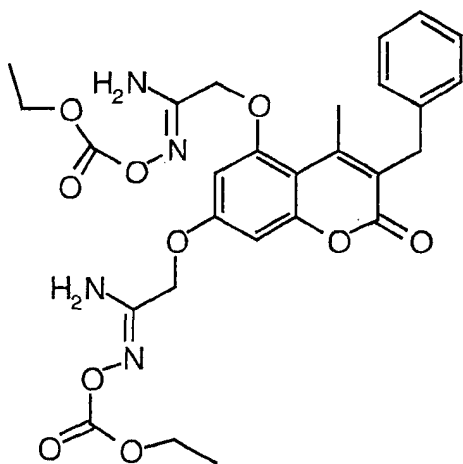
a) 3-Benzyl-5,7-bis[(hydroxyamidino)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0069] Zu einer Suspension aus Hydroxylaminhydrochlorid (0,97 g) in DMSO (2 ml) wurde Triethylamin (1,94 ml) gegeben und die resultierende Mischung während 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Kristalle wurden filtriert und mit THF gewaschen. Das Filtrat wurde konzentriert und das Produkt aus Beispiel 1b (0,5 g) zugegeben. Diese Lösung wurde über Nacht bei 75°C gehalten. Die Reaktionsmischung wurde mit Eiswasser behandelt, der pH-Wert auf 11 eingestellt und die Feststoffe filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 0,5 g. Schmelzpunkt: 155–160°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,56 (s, 3H, CH₃), 3,938 (s, 2H), 4,466 (s, 2H), 4,486 (s, 2H), 5,565 (s, H, NH₂), 5,709 (s, 2H, NH₂), 6,658 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,692 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,168–7,284 (m, 5H, Ph), 9,346 (s, 1H, OH), 9,362 (s, 1H, OH).

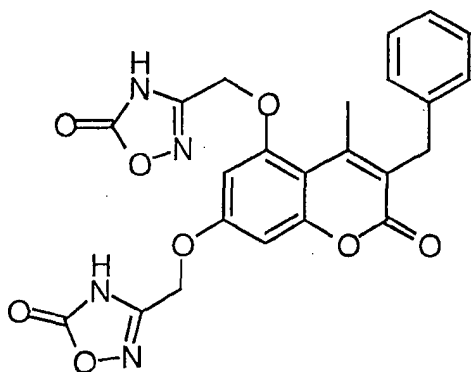
b) 3-Benzyl-5,7-bis[(ethoxycarbonyloxyamidino)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0070] Ethylchloroformiat (0,45 ml) wurde zu einer Lösung des Produkts aus Beispiel 3a (1 g) und Pyridin (0,38 ml) in DMF (5 ml) bei 0°C gegeben. Die Reaktionsmischung wurde während zusätzlicher 30 Minuten bei dieser Temperatur gehalten, und dann wurde Eiswasser zugegeben. Die Feststoffe wurden filtriert und mit Wasser gewaschen. Ausbeute: 1,63 g. Schmelzpunkt: 87–92°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,215–1,256 (m, 6H), 2,553 (s, 3H), 3,947 (s, 2H), 4,140–4,198 (m, 4H), 4,566 (s, 2H), 4,599 (s, 2H), 6,688 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,718 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,792 (b, 2H, NH₂), 6,818 (b, 2H, NH₂), 7,171–7,285 (m, 5H).

c) 3-Benzyl-5,7-bis[(2,5-dihydro-5-oxo-4H-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

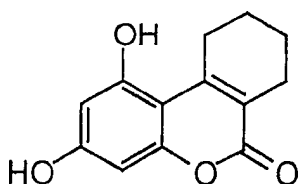


[0071] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,5 g) und DBU (0,8 ml) in DMF (5 ml) wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Eiswasser behandelt und angesäuert. Die Feststoffe wurden filtriert und mit Wasser gewaschen. Die resultierende feste Masse wurde in 0,1 N Natriumhydroxidlösung aufgenommen, mit Aktivkohle behandelt und schließlich angesäuert. Ausbeute: 0,64 g. Schmelzpunkt: 130–136°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,524 (s, 3H), 3,954 (s, 2H), 5,187 (s, 2H), 5,215 (s, 2H), 6,748 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,834 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,158–7,289 (m, 5H), 12,8 (b, 2H).

Beispiel 4. Herstellung von 7,8,9,10-Tetrahydro-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1,3-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on

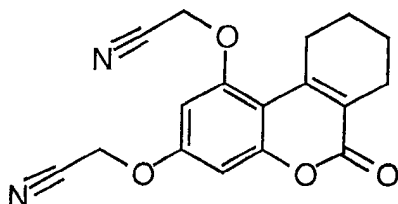
a) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0072] Phloroglucinol (1 g) und Ethyl-2-oxocyclohexancarboxylat (1,32 g) wurden in 75%iger Schwefelsäure (10 ml) über Nacht gerührt, die Mischung in Eiswasser gegossen und filtriert. Ausbeute: 1,55 g.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,65 (b, 4H), 2,345 (b, 2H), 3,037 (b, 2H), 6,138 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,245 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 10,069 (b, 1H, OH), 10,322 (s, 1H, OH).

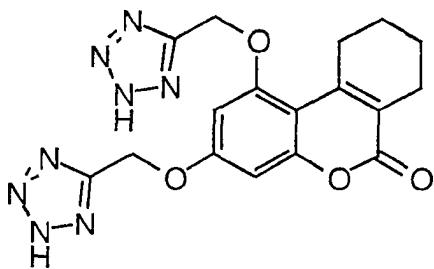
b) 7,8,9,10-Tetrahydro-bis(cyanomethoxy)-1,3-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0073] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,5 g), Chloracetonitril (0,34 g) und Kaliumcarbonat (1,5 g) in DMF (5 ml) wurde wie in Beispiel 1b umgesetzt. Ausbeute: 0,44 g.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,68 (b, 4H), 2,41 (b, 2H), 3,00 (b, 2H), 5,297 (s, 2H), 5,309 (s, 2H), 6,797 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,899 (d, 1H, J = 2,4 Hz).

c) 7,8,9,10-Tetrahydro-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1,3-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on

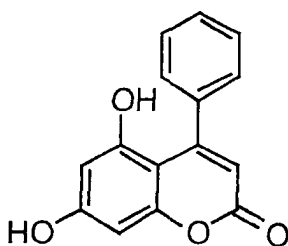


[0074] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,4 g) wurde wie in Beispiel 1c mit Natriumazid (0,18 g) und Ammoniumchlorid (0,14 g) in DMF (2,5 ml) behandelt. Das Produkt wurde aus Ethanol-DMF (1 : 1) rekristallisiert. Ausbeute: 0,17 g. Schmelzpunkt: 283–286°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,626 (b, 4H), 2,393 (b, 2H), 2,971 (b, 2H), 5,583 (s, 2H), 5,599 (s, 2H), 6,811 (s, 2H).

Beispiel 5. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-phenyl-2H-1-benzopyran-2-on

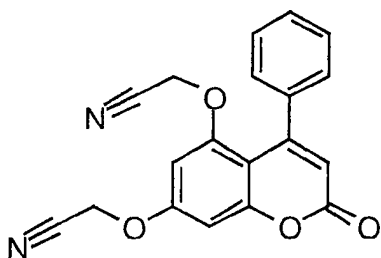
a) 5,7-Dihydroxy-4-phenyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0075] Eine Lösung von Phloroglucinol (2,00 g) und Ethylbenzoylacetat (3,05 g) in Ethanol (30 ml) wurde wie in Beispiel 1a beschrieben mit trockenem HCl behandelt. Das Produkt wurde aus Ethanol-Wasser (1 : 1) rekristallisiert. Ausbeute: 3,0 g (75%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 5,739 (s, 1H, CH=C), 6,155 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,263 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,305–7,381 (m, 5H, Ph), 10,084 (s, 1H, OH), 10,368 (s, 1H, OH).

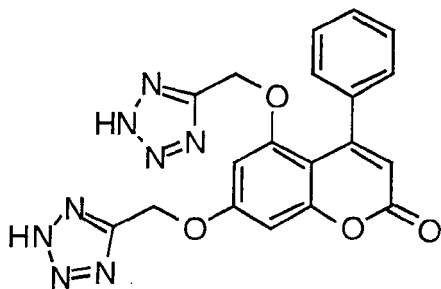
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-4-phenyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0076] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,00 g) wurde wie in Beispiel 1b beschrieben mit Chloracetonitril (0,62 g) und Kaliumcarbonat (2,72 g) in DMF (5 ml) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde in Eiswasser gegossen und die Mischung mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde mit 1 M NaOH gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Das Produkt wurde aus Isopropanol rekristallisiert. Ausbeute: 0,41 g (31%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 4,845 (s, 2H, OCH₂CN), 5,344 (s, 2H, OCH₂CN), 6,086 (s, 1H, CH=C), 6,770 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,040 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,320–7,443 (m, 5H, Ph).

c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-phenyl-2H-1-benzopyran-2-on

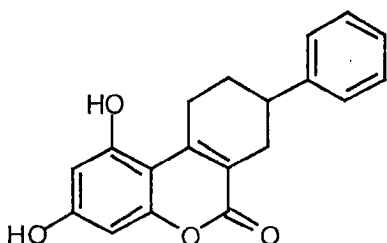


[0077] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,40 g) wurde während 2 Stunden bei 100°C mit Natriumazid (0,16 g) und Ammoniumchlorid (0,14 g) in DMF (2 ml) behandelt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,40 g (79%). Schmelzpunkt: 222–224°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 5,148 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,649 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,968 (s, 1H, CH=C), 6,811 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,962 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,994–7,185 (m, 5H, Ph).

Beispiel 6. Herstellung von 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-8-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on

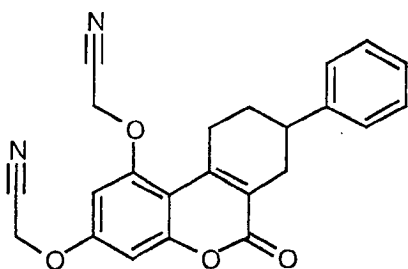
a) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-dihydroxy-8-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0078] Eine Lösung von Phloroglucinol (1,56 g) und Ethyl-2-oxo-5-phenylcyclohexancarboxylat (2,52 g) in Ethanol (25 ml) wurde wie in Beispiel 1a beschrieben mit trockenem HCl behandelt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser und EtOH gewaschen. Ausbeute: 1,0 g (32%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,72–1,82 (m, 1H), 2,01 (b, 1H), 2,317–2,387 (m, 1H), 2,707–2,763 (m, 1H), 2,830 (b, 1H), 3,041 (b, 1H), 3,35 und 3,40 (b, 1H), 6,174 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,277 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,200–7,350 (m, 5H, Ph), 10,131 (s, 1H, OH), 10,401 (s, 1H, OH).

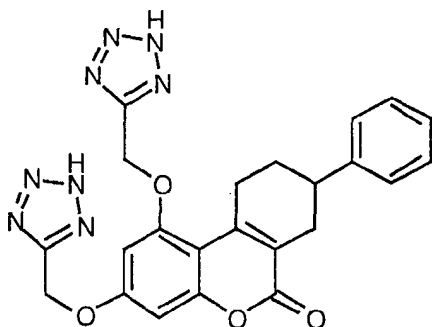
b) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis(cyanomethoxy)-8-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on



[0079] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,0 g) wurde wie in Beispiel 1b beschrieben mit Chloracetonitril (0,57 g) und Kaliumcarbonat (1,0 g) in DMF (5 ml) behandelt. Das DMF wurde verdampft und der Rückstand in EtOAc gelöst. Das Ethylacetat wurde mit 1 M NaOH gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Das Produkt wurde aus Aceton-Isopropanol (1 : 3) rekristallisiert. Ausbeute: 0,50 g (40%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 1,75–1,88 (m, 1H), 2,05 (b, 1H), 2,38–2,48 (m, 1H), 2,77–2,85 (m, 1H), 2,90 (b, 1H), 3,07 (b, 1H), 3,22 und 3,28 (b, 1H), 5,316 (s, 2H, OCH₂CN), 5,331 (s, 2H, OCH₂CN), 6,829 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,939 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,210–7,380 (m, 5H, Ph).

c) 7,8,9,10-Tetrahydro-1,3-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-8-phenyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on

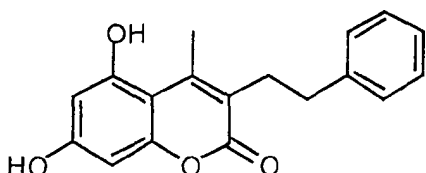


[0080] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,30 g) wurde mit Natriumazid (0,10 g) und Ammoniumchlorid (0,09 g) in DMF (2 ml) während 3,5 Stunden bei 100°C behandelt. Das Produkt wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1c isoliert. Ausbeute: 0,30 g (82%). Schmelzpunkt: 235–245°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,70–1,80 (m, 1H), 1,96 (b, 1H), 2,38–2,446 (m, 1H), 2,836 (m, 2H), 3,052 (b, 1H), 3,252 und 3,301 (b, 1H), 5,604 (s, 2H, OCH₂CN), 5,632 (s, 2H, OCH₂CN), 6,827 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,858 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,209–7,351 (m, 5H, Ph).

Beispiel 7. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2H-1-benzopyran-2-on

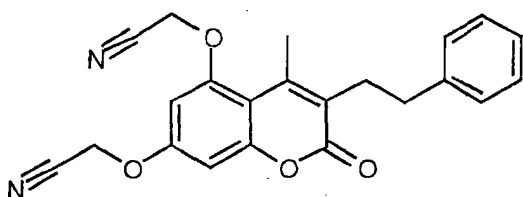
a) 5,7-Dihydroxy-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2H-1-benzopyran-2-on



[0081] Eine Lösung von Phloroglucinol (0,87 g) und Ethyl-2-(2-phenylethyl)acetoacetat (1,62 g) in Ethanol (30 ml) wurde wie in Beispiel 1a beschrieben mit trockenem HCl behandelt. Ausbeute: 1,77 g (87%). Schmelzpunkt: 248–252°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,413 (s, 3H, CH₃), 2,652–2,782 (m, 4H, CH₂CH₂), 6,151 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,256 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,183–7,304 (m, 5H, Ph), 10,137 (s, 1H, OH), 10,369 (s, 1H, OH).

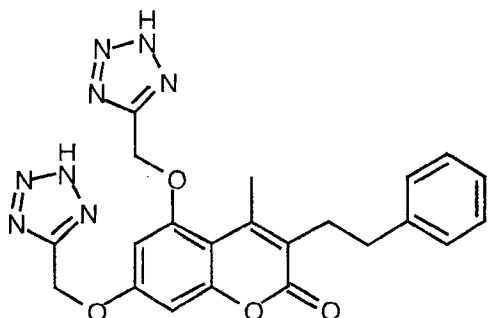
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2H-1-benzopyran-2-on



[0082] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,90 g) wurde mit Chloracetonitril (0,48 g) und Kaliumcarbonat (2,1 g) während 0,5 Stunden bei 100°C in DMF (5 ml) behandelt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 1,00 g (88%). Schmelzpunkt: 179–183°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,384 (s, 3H, CH₃), 2,699–2,754 (m, 2H, CH₂CH₂), 2,805–2,841 (m, 2H, CH₂CH₂), 5,302 (s, 4H, OCH₂CN), 6,790 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,909 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,190–7,307 (m, 5H, Ph).

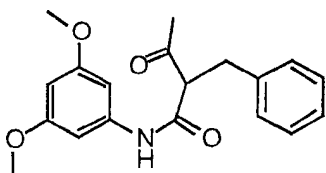
c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2H-1-benzopyran-2-on



[0083] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,40 g) wurde mit Natriumazid (0,15 g) und Ammoniumchlorid (0,12 g) während 2,5 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) behandelt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c isoliert. Ausbeute: 0,385 g (78%). Schmelzpunkt: 248–250°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,368 (s, 3H, CH₃), 2,668–2,707 (m, 2H, CH₂CH₂), 2,783–2,822 (m, 2H, CH₂CH₂), 5,593 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,604 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,819 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,834 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,161–7,291 (m, 5H, Ph).

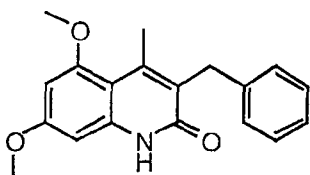
Beispiel 8. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon
a) 2-Benzyl-3-oxobutansäure-3,5-dimethoxyanilid



[0084] 3,5-Dimethoxyanilin (5 g) wurde portionsweise zu vorerwärmtem (160°C) Ethyl-2-benzylacetoacetat (15 ml) unter Stickstoff gegeben und während 60 Minuten bei der Temperatur gehalten. Die gekühlte Lösung wurde mit Heptanethylether verdünnt und filtriert. Ausbeute: 5,2 g (49%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,183 (s, 3H), 3,069 (d, 2H, J = 7,2 Hz), 3,923 (t, 1H, J = 7,2 Hz), 6,616 (dd, 1H, J = 2,3 Hz), 6,765 (d, 2H, J = 2,3 Hz), 7,13–7,3 (m, 5H), 10,123 (s, 1H).

b) 3-Benzyl-5,7-dimethoxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0085] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,2 g) wurde zu vorerwärmter (85°C) Methansulfonsäure (3,5 ml) gegeben und während 15 Minuten bei der Temperatur gehalten. Man ließ die Lösung abkühlen und behandelte sie dann mit Eiswasser. Das Produkt wurde filtriert, mit Natriumbicarbonat und Wasser gewaschen. Ausbeute: 1,08 g (95%).

¹H-NMR (300 MHz): 2,486 (s, 3H), 3,785 (s, 3H), 3,808 (s, 3H), 3,985 (s, 2H), 6,315 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,472 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,1–7,3 (m, 5H), 11,52 (s, H).

c) 3-Benzyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon

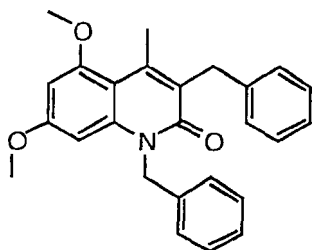


[0086] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1 g) wurde während 20 Minuten unter Stickstoff in Pyridinhydrochlorid (5 g) unter Rückfluß gehalten. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser behandelt und das Produkt

filtriert. Ausbeute: 0,9 g (100%). Schmelzpunkt: 307–312°C.

¹H-NMR (300 MHz): 2,503 (s, 3H), 3,942 (s, 2H), 6,102 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,187 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,1–7,25 (m, 5H), 9,725 (s, 1H), 9,984 (s, 1H), 11,285 (s, 1H).

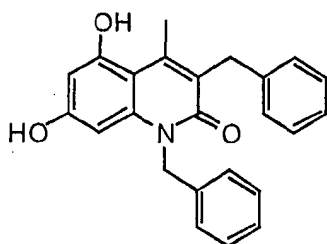
d) 1,3-Dibenzyl-5,7-dimethoxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0087] Das Produkt des Beispiels 8b (1 g), Kalium-*t*-butoxid (0,62 g) und Benzylbromid (0,68 ml) wurden während 4 Stunden bei 60°C in DMSO (10 ml) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser behandelt, mit Toluol extrahiert und verdampft. Das Produkt wurde mit Ethylether verrieben und filtriert. Ausbeute: 0,5 g (39%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,537 (s, 3H), 3,708 (s, 3H), 3,826 (s, 3H), 4,124 (s, 2H), 5,56 (b, 2H), 6,413–6,434 (m, 2H), 7,154–7,332 (m, 10H).

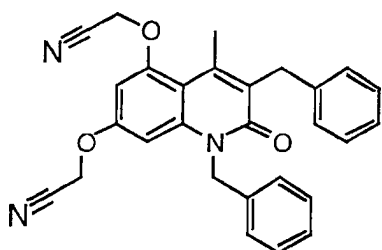
e) 1,3-Dibenzyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0088] Das Produkt des vorherigen Beispiels (2 g) wurde wie in Beispiel 8c beschrieben mit Pyridinhydrochlorid (10 g) behandelt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert und eingedampft. Ausbeute: 1,4 g (75%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,570 (s, 3H), 4,076 (s, 2H), 5,450 (b, 2H), 6,135 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 6,199 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 7,128–7,333 (m, 10H), 9,83 (b, 1H), 10,166 (s, 1H).

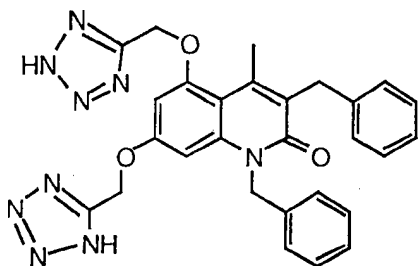
f) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0089] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,4 g) wurde wie in Beispiel 1b beschrieben mit Chloracetonitril (0,76 g) und K₂CO₃ (2,5 g) in DMF (20 ml) behandelt. Ausbeute: 1,5 g (89%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,555 (s, 3H), 4,146 (s, 2H), 5,214 (s, 2H), 5,275 (s, 2H), 5,578 (s, 2H), 6,735 (s, 2H), 7,13–7,33 (m, 10H).

g) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon

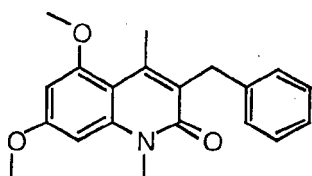


[0090] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,3 g) wurde wie in Beispiel 1c beschrieben mit Natriumazid (0,41 g) und Ammoniumchlorid (0,34 g) behandelt. Ausbeute: 0,69 g (45%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,471 (s, 3H), 4,113 (s, 2H), 5,477 (s, 2H), 5,55 (b, 2H), 5,574 (s, 2H), 6,670 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,775 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,13–7,32 (m, 10H).

Beispiel 9. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-benzyl-1,4-dimethyl-2(1H)-chinolinon

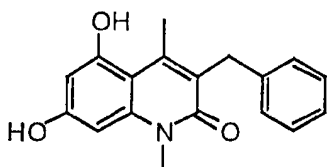
a) 3-Benzyl-5,7-dimethoxy-1,4-dimethyl-2(1H)-chinolinon



[0091] Das Produkt des Beispiels 8b (0,5 g), t-BuOK (0,2 g) und Methyljodid (0,4 ml) wurden während zwei Tagen bei 35°C in DMSO (5 ml) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser behandelt und mit Toluol extrahiert. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Toluol-Ethylacetat-Essigsäure 8 : 2 : 1 als dem Eluenten gereinigt. Ausbeute: 0,24 g (46%).

¹H-NMR (300 MHz): 2,51 (s, 3H), 3,632 (s, 2H), 3,846 (s, 3H), 3,896 (s, 3H), 4,047 (s, 2H), 6,468 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,558 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,1–7,26 (m, 5H).

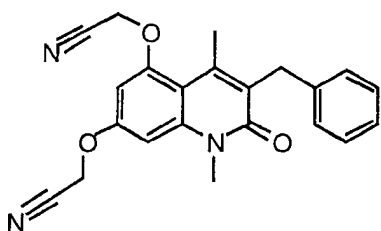
b) 3-Benzyl-5,7-dihydroxy-1,4-dimethyl-2(1H)-chinolinon



[0092] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,2 g) wurde wie in Beispiel 8c beschrieben mit Pyridinhydrochlorid (2 g) behandelt und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Ausbeute: 0,16 g (89%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,567 (s, 3H), 3,515 (s, 3H), 4,005 (s, 2H), 6,244 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,268 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,08–7,25 (m, 5H), 9,879 (s, 1H), 10,113 (s, 1H).

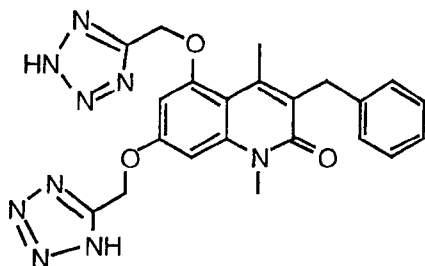
c) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-3-benzyl-1,4-dimethyl-2(1H)-chinolinon



[0093] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,15 g), Chloracetonitril (0,08 g) und K₂CO₃ (0,28 g) wurden wie in Beispiel 1b beschrieben in DMF (2 ml) umgesetzt. Ausbeute: 0,16 g (84%).

¹H-NMR (400 MHz): 2,524 (s, 3H), 3,658 (s, 3H), 4,079 (s, 2H), 5,292 (s, 2H), 5,379 (s, 2H), 6,766 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,855 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,13–7,24 (m, 5H).

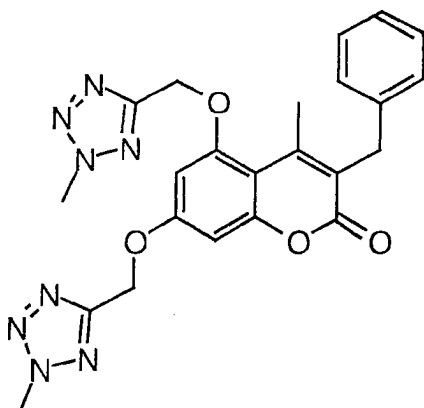
d) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-benzyl-1,4-dimethyl-2(1H)-chinolinon



[0094] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,15 g) wurde wie in Beispiel 1c beschrieben mit NaN_3 (57 mg) und NH_4Cl (47 mg) in DMF (2 ml) behandelt. Ausbeute: 0,115 g. Schmelzpunkt: 250–253°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 2,451 (s, 3H), 3,649 (s, 3H), 4,042 (s, 2H), 6,792 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 6,833 (d, 1H, $J =$ Hz), 7,1–7,25 (m, 5H).

Beispiel 10. Herstellung von 3-Benzyl-5,7-bis[(2-methyl-1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on und der drei Isomeren

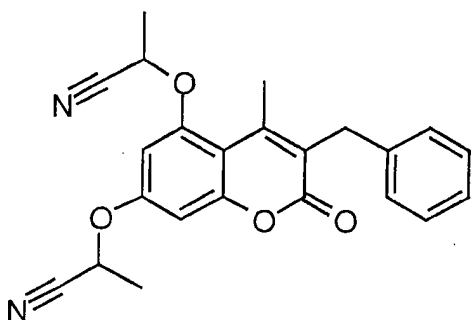


[0095] 0,07 ml an Methyljodid wurden zu einer Lösung von 0,2 g des Produkts aus Beispiel 1c und 0,31 g an K_2CO_3 in 2 ml an DMF gegeben, und die Mischung wurde während 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Eiswasser gegossen und filtriert. Ausbeute: 0,2 g als eine Mischung von vier Regioisomeren. Schmelzpunkt: 71–76°C.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): 2,47 (s, CH_3), 2,48 (s, CH_3), 3,93 (s, CH_2Ph), 4,11 (s, NCH_3), 4,12 (s, NCH_3), 4,15 (s, NCH_3), 4,38 (s, NCH_3), 4,40 (s, NCH_3), 5,51 (s, OCH_2), 5,52 (s, OCH_2), 5,62 (s, OCH_2), 5,67 (s, OCH_2), 6,84–6,91 (m, 2H), 7,16–7,28 (m, 5H, Ph).

Beispiel 11. Herstellung von 3-Benzyl-5,7-bis[1-(1H-tetrazol-5-yl)ethoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on, Mischung aus Stereoisomeren

a) 3-Benzyl-5,7-bis-[(1-cyano)ethoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

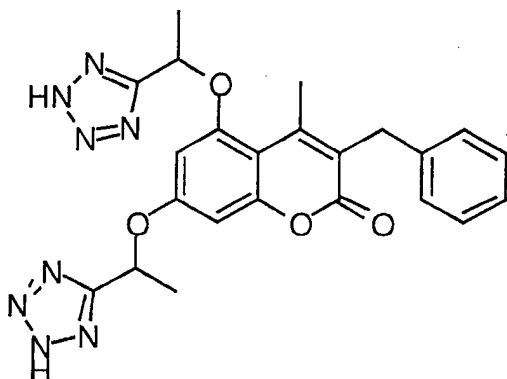


[0096] Das Produkt des Beispiels 1a (1 g), 2-Chlorpropionitril (0,7 g) und Kaliumcarbonat (2 g) wurden während 60 Minuten unter Stickstoff bei 110°C in DMF (15 ml) erwärmt. Die Mischung wurde mit Wasser behandelt, filtriert und mit 1 N NaOH und Wasser gewaschen. Ausbeute: 1,2 g.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 300 MHz): 1,74–1,78 (t + t, 6H, CH-CH_3), 2,53 (s, 3H), 3,97 (s, 2H), 5,58–5,66 (m, 2H,

CH-CH₃), 6,87 (m, 1H), 6,99 (d, 1H), 7,18–7,31 (m, 5H).

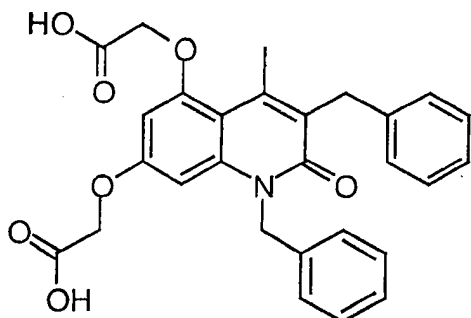
b) 3-Benzyl-5,7-bis[1-(1H-tetrazol-5-yl)ethoxy]-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on, Mischung aus Stereoisomeren



[0097] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,5 g), Natriumazid (0,18 g) und Ammoniumchlorid (0,15 g) wurden während 90 Minuten bei 100°C in DMF (7 ml) erwärmt. Das Produkt wurde mit Wasser behandelt, mit Ethylacetat extrahiert und eingedampft. Ausbeute: 0,57 g. Schmelzpunkt: 91–104°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 1,69–1,77 (m, 6H, CH-CH₃), 2,54 (s, 3H), 3,94 (s, 2H), 6,10–6,17 ((m, 2H, CH-CH₃), 6,65 (dd, 1H), 6,74 (dd, 1H), 7,13–7,30 (m, 5H).

Beispiel 12. Herstellung von 5,7-Bis(carboxymethoxy)-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon

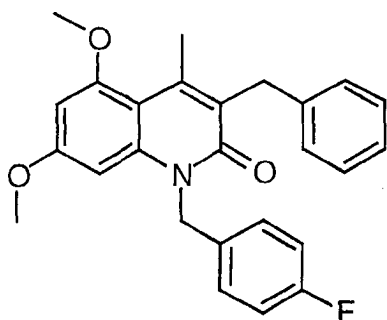


[0098] Das Produkt des Beispiels 8f (0,2 g) wurde während einer Stunde in einer Lösung von konzentrierter Chlorwasserstoffsäure (3 ml) und Essigsäure (2 ml) unter Rückfluß gehalten. Das Produkt wurde bei 25°C filtriert. Ausbeute: 0,14 g.

¹H-NMR (300 Mhz, DMSO-d₆): 2,63 (s, CH₃), 4,14 (s, 2H, CH₂Ph), 4,66 (s, 2H, OCH₂COOH), 4,79 (s, 2H, OCH₂COOH), 5,53 (s, 2H, NCH₂Ph), 6,41 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 7,13–7,34 (m, 10H, Ph).

Beispiel 13. Herstellung von 3-Benzyl-5,7-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1-(4-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon

a) 1-Benzyl-5,7-dimethoxy-3-(4-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon

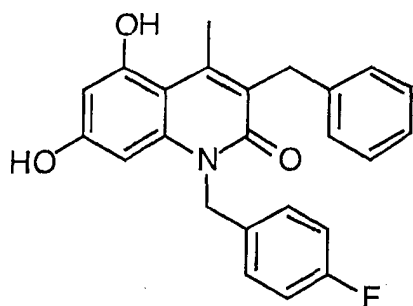


[0099] Das Produkt des Beispiels 8b (2 g), Kalium-tert-butoxid (0,87 g) und 4-Fluorbenzylchlorid (1,12 g) wurden wie in Beispiel 8d während drei Stunden bei 60°C in DMSO (20 ml) erwärmt. Ausbeute: 1,28 g.

¹H-NMR (400 Mhz, DMSO-d₆): 2,53 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 5,55 (s, 2H), 6,43 (s, 2H), 7,12–7,2 (m,

5H), 7,26–7,28 (m, 4H).

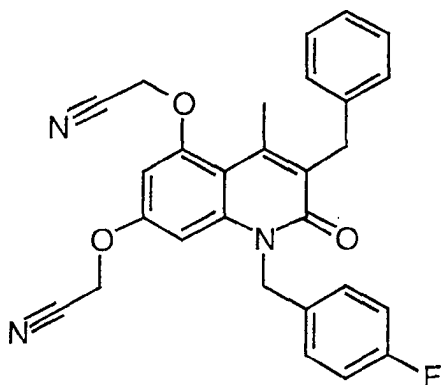
b) 3-Benzyl-5,7-dihydroxy-1-(4-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0100] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,25 g) wurde während 9 Minuten bei ungefähr 225°C in Pyridinhydrochlorid (12,5 g) erwärmt. Ausbeute: 1 g.

¹H-NMR (300 Mhz, DMSO-d₆): 2,56 (s, 3H), 4,07 (s, 2H), 5,4 (b, 2H), 6,13 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,20 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,12–7,28 (m, 9H), 9,88 (s, 1H), 10,22 (s, 1H).

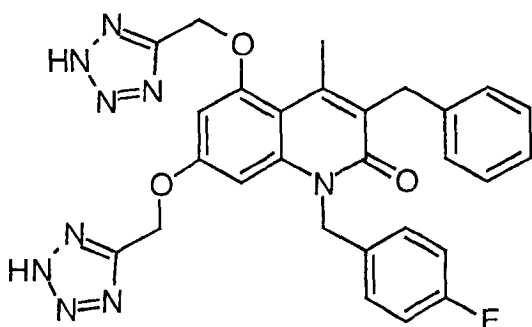
c) 3-Benzyl-5,7-Bis(cyanomethoxy)-1-(4-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0101] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1 g), ClCH₂CN (0,43 g) und K₂CO₃ (1,42 g) wurden während einer Stunde bei 120°C in DMF (8 ml) erwärmt. Ausbeute: 0,94 g.

¹H-NMR (300 Mhz, DMSO-d₆): 2,55 (s, 3H), 4,14 (s, 2H), 5,25 (s, 2H), 5,28 (s, 2H), 5,57 (s, 2H), 6,74 (s, 2H, ArH), 7,1–7,3 (m, 9H).

d) 3-Benzyl-5,7-bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-1-(4-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon

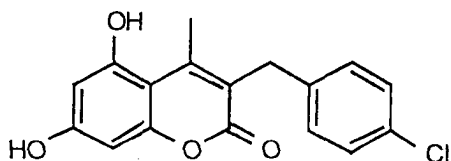


[0102] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,5 g), Natriumazid (0,14 g) und Ammoniumchlorid (0,12 g) wurden während 90 Minuten bei 120°C in DMF (5 ml) erwärmt. Das Produkt wurde mit Acetonitril verrieben. Ausbeute: 0,28 g. Schmelzpunkt: 126–132°C.

¹H-NMR (300 Mhz, DMSO-d₆): 2,48 (s, 3H), 4,11 (s, 2H), 5,51 (s, 2H), 5,55 (s, 2H), 5,58 (s, 2H), 6,67 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,78 (d, 1H, J = 2,1 Hz).

Beispiel 14. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-(4-chlorbenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

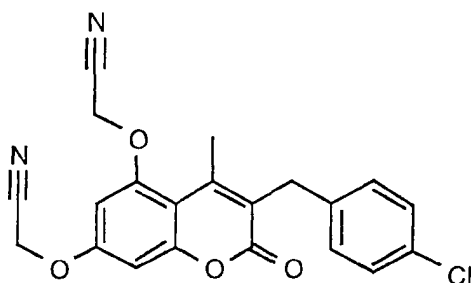
a) 3-(4-Chlorbenzyl)-5,7-dihydroxy-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0103] Eine Lösung von Phloroglucinol (1,57 g) und Ethyl-2-(4-chlorbenzyl)acetoacetat (3,18 g) in Ethanol (25 ml) wurde während 1,5 Stunden bei 0°C mit trockenem HCl behandelt und die Lösung über Nacht bei der Temperatur gehalten. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand mit Wasser verrieben. Ausbeute: 3,87 g (98%). Schmelzpunkt: 270–278°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,52 (s, 3H, CH₃), 3,87 (s, 2H, CH₂), 6,17 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,28 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,18–7,34 (m, 4H, Ph), 10,21 (s, 1H, OH), 10,48 (s, 1H, OH).

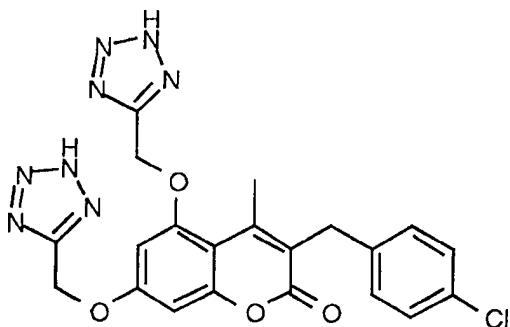
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-3-(4-chlorbenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0104] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,00 g), Chloracetonitril (0,50 g) und Kaliumcarbonat (2,18 g) wurden während 30 Minuten bei 100°C in DMF (5 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,90 g (72%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,52 (s, 3H, CH₃), 3,95 (s, 2H, CH₂), 5,308 (s, 2H, OCH₂CN), 5,312 (s, 2H, OCH₂CN), 6,81 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,94 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,22–7,33 (m, 4H, Ph).

c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-(4-chlorbenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

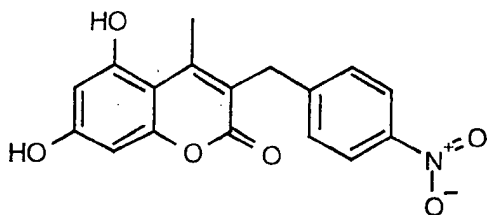


[0105] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,40 g), Natriumazid (0,14 g) und Ammoniumchlorid (0,11 g) wurden während 2 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c isoliert. Ausbeute: 0,40 g (82%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,46 (s, 3H, CH₃), 3,92 (s, 2H, CH₂), 5,602 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,609 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,83 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,85 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,20–7,33 (m, 4H, Ph).

Beispiel 15. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-(4-nitrobenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

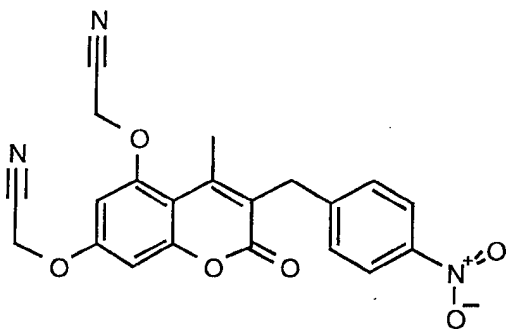
a) 5,7-Dihydroxy-4-methyl-3-(4-nitrobenzyl)-1-benzopyran-2-on



[0106] Eine Lösung von Phloroglucinol (0,48 g) und Ethyl-2-(4-nitrobenzyl)acetoacetat (1,00 g) in Ethanol (150 ml) wurde während 7,5 Stunden bei 0°C mit trockener HCl behandelt und die Lösung über Nacht bei der Temperatur gehalten. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand mit Wasser verrieben. Ausbeute: 0,63 g (51%). Schmelzpunkt: 280–285°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,53 (s, 3H, CH₃), 4,03 (s, 2H, CH₂), 6,19 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,29 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,40–7,51 und 8,11–8,17 (m, 4H, Ph), 10,25 (s, 1H, OH), 10,52 (s, 1H, OH).

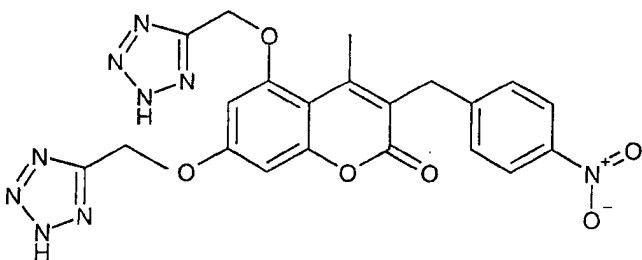
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-3-(4-nitrobenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0107] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,57 g), Chloracetonitril (0,27 g) und Kaliumcarbonat (1,20 g) wurden während 50 Minuten bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,47 g (67%). Schmelzpunkt: 178–185°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,53 (s, 3H, CH₃), 4,11 (s, 2H, CH₂), 5,319 (s, 2H, OCH₂CN), 5,323 (s, 2H, OCH₂CN), 6,83 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,96 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,48–7,53 und 8,12–8,16 (m, 4H, Ph).

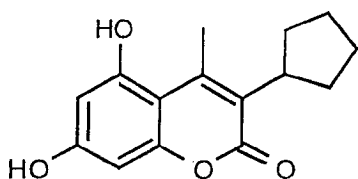
c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-(4-nitrobenzyl)-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0108] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,38 g), Natriumazid (0,12 g) und Ammoniumchlorid (0,11 g) wurden während 2 Stunden bei 100°C in DMF (3 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,25 g (54%). Schmelzpunkt: 240–244°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,47 (s, 3H, CH₃), 4,08 (s, 2H, CH₂), 5,611 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,623 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,85 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,87 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,46–7,50 und 8,12–8,16 (m, 4H, Ph).

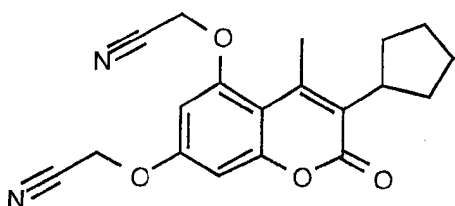
Beispiel 16. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-cyclopentyl-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on
a) 3-Cyclopentyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0109] Eine Lösung von Phloroglucinol (2,00 g) und Ethyl-2-cyclopentylacetoacetat (3,14 g) in Ethanol (40 ml) wurde während 2,5 Stunden bei 0°C mit trockenem HCl behandelt und die Lösung über Nacht auf der Temperatur gehalten. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand mittels Flashchromatographie gereinigt, wobei mit Toluol-EtOAc-AcOH (8 : 1 : 1) eluiert wurde. Ausbeute: 1,22 g (29%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 1,50–1,88 (m, 8H, -(CH₂)₄-), 2,57 (s, 3H, CH₃), 3,25 (m, 1H, CH), 6,11 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,25 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 10,25 (b, 2H, OH).

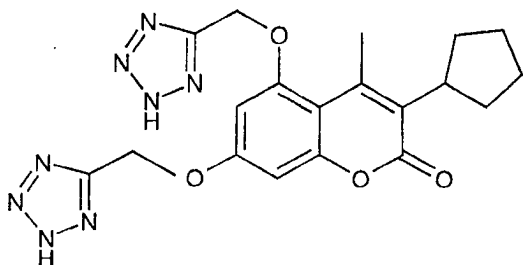
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-3-cyclopentyl-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on



[0110] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,50 g), Chloracetonitril (0,31 g) und Kaliumcarbonat (0,61 g) wurden während 40 Minuten bei 80°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,56 g (86%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 1,55–1,90 (m, 8H, -(CH₂)₄-), 2,56 (s, 3H, CH₃), 3,37 (m, 1H, CH), 5,29 (s, 2H, OCH₂CN), 5,31 (s, 2H, OCH₂CN), 6,75 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,88 (d, 1H, J = 2,5 Hz).

c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-cyclopentyl-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-on

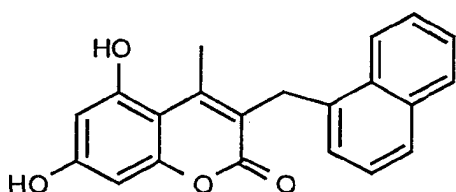


[0111] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,30 g), Natriumazid (0,13 g) und Ammoniumchlorid (0,11 g) wurden während 1,5 Stunden bei 100°C in DMF (1 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,30 g (80%). Schmelzpunkt: 248–252°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 1,53–1,89 (m, 8H, -(CH₂)₄-), 2,51 (s, 3H, CH₃), 3,34 (m, 1H, CH), 5,59 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,61 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,80 (s, 2H).

Beispiel 17. Herstellung von 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-3-(1-naphtylmethyl)-2H-1-benzopyran-2-on

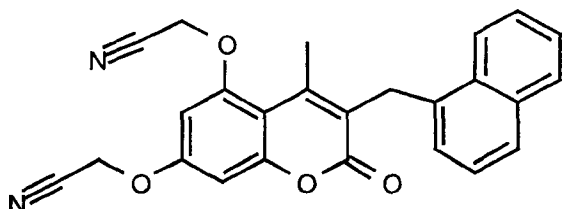
a) 5,7-dihydroxy-4-methyl-3-(1-naphtylmethyl)-2H-1-benzopyran-2-on



[0112] Eine Lösung von Phloroglucinol (0,47 g) und Ethyl-2-(1-naphthylmethyl)acetoacetat (1,00 g) in Ethanol (20 ml) wurde während 3 Stunden bei 0°C mit trockenem HCl behandelt und die Lösung über Nacht auf der Temperatur gehalten. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand mit Wasser verrieben und aus Isopropanol-Wasser (1 : 1) rekristallisiert. Ausbeute: 0,96 g (78%). Schmelzpunkt: 275–280°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,45 (s, 3H, CH₃), 4,32 (s, 2H, CH₂), 6,23 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,32 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,97–8,25 (m, 7H, Naph), 10,26 (s, 1H, OH), 10,53 (s, 1H, OH).

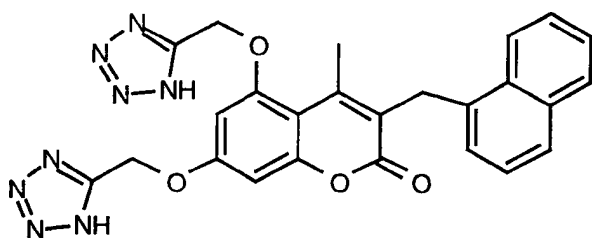
b) 5,7-Bis(cyanomethoxy)-4-methyl-3-(1-naphthylmethyl)-2H-1-benzopyran-2-on



[0113] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,80 g), Chloracetonitril (0,36 g) und Kaliumcarbonat (0,66 g) wurden während 1 Stunde bei 100°C in DMF (4 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,30 g (30%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,45 (s, 3H, CH₃), 4,40 (s, 2H, CH₂), 5,34 (s, 2H, OCH₂CN), 5,36 (s, 2H, OCH₂CN), 6,86 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,010 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,016–8,27 (m, 7H, Naph).

c) 5,7-Bis[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-3-(1-naphthylmethyl)-2H-1-benzopyran-2-on

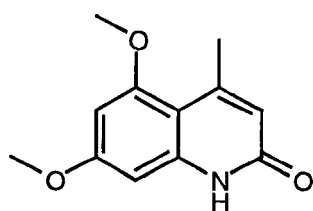


[0114] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,25 g), Natriumazid (0,080 g) und Ammoniumchlorid (0,072 g) wurden während 2,5 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,11 g (36%). Schmelzpunkt: 164–174°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,40 (s, 3H, CH₃), 4,37 (s, 2H, CH₂), 5,63 (s, 2H, OCH₂Tet), 5,65 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,87 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,98–8,26 (m, 7H, Naph).

Beispiel 18. Herstellung von 1-Benzyl-5,7-bis-[(1H-tetrazol-5-yl)-methoxy]-4-methyl-2(1H)-chinolinon

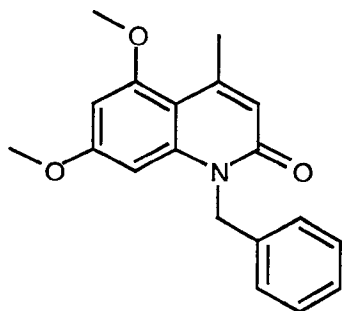
a) 5,7-Dimethoxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0115] tert-Butyl-acetoacetat (1,58 g) wurde auf 120°C erwärmt, und es wurde in Xylol (4 ml) gelöstes Dimethoxyanilin (1,53 g) zugegeben. Die Mischung wurde während 20 Minuten bei 120–130°C erwärmt und dann auf Raumtemperatur gekühlt. Es wurde Methansulfonsäure (2 ml) zugegeben und die Mischung während 10 Minuten bei Umgebungstemperatur gerührt. Es wurde Wasser (40 ml) zugegeben und der Niederschlag filtriert und getrocknet. Ausbeute: 1,31 g (60%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,50 (s, 3H, CH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 6,03 (s, 1H, CH=C), 6,31 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 11,4 (b, 1H, NH).

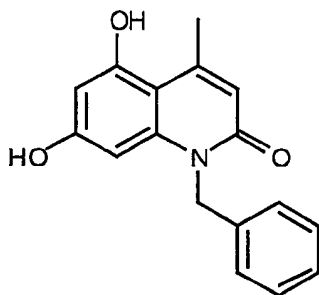
b) 1-Benzyl-5,7-dimethoxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0116] Das Produkt des vorherigen Beispiels (1,20 g) wurde in DMSO (15 ml) suspendiert, und es wurden t-BuOK (0,68 g) und Benzylbromid (1,03 g) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Umgebungstemperatur gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und das Produkt mit EtOAc extrahiert. EtOAc wurde getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Toluol rekristallisiert. Ausbeute: 0,80 g (47%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,55 (d, 3H, J = 1,1 Hz, CH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 5,48 (b, 2H, NCH₂), 6,29 (d, 1H, J = 1,1 Hz, CH=C), 6,4 (s, 2H), 7,18–7,33 (m, 5H, Ph).

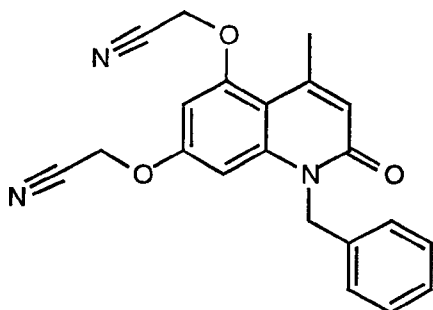
c) 1-Benzyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0117] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,69 g) wurde in CH₂Cl₂ (14 ml) gelöst und die Reaktionsmischung auf -20°C gekühlt. Es wurde BBr₃ (2,4 g) in CH₂Cl₂ (1 M Lösung) zugegeben und man ließ die Mischung sich über Nacht auf Umgebungstemperatur erwärmen. Der Niederschlag wurde filtriert, mit CH₂Cl₂ gewaschen und in EtOAc gelöst. EtOAc wurde mit verdünnter HCl gewaschen, getrocknet und zur Trockne eingedampft. Ausbeute: 0,34 g (54%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,56 (d, 3H, J = Hz, CH₃), 5,33 (b, 2H, NCH₂), 6,11 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,13 (d, 1H, J = 1,0 Hz, CH=C), 6,17 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,12–7,34 (m, 5H, Ph), 9,90 (b, 1H, OH), 10,22 (s, 1H, OH).

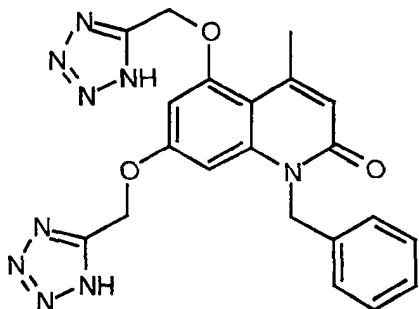
d) 1-Benzyl-5,7-bis(cyanomethoxy)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0118] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,34 g), Chloracetonitril (0,13 g) und Kaliumcarbonat (0,34 g) wurden während 1,5 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Es wurde Wasser zugegeben und der Niederschlag filtriert und getrocknet. Das Produkt wurde aus Isopropanol rekristallisiert. Ausbeute: 0,20 g (46%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,57 (s, 3H, CH₃), 5,22 (s, 2H, OCH₂CN), 5,30 (s, 2H, OCH₂CN), 5,50 (b, 2H, NCH₂), 6,42 (s, 1H, CH=C), 6,70 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,73 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,21–7,32 (m, 5H, Ph).

e) 1-Benzyl-5,7-bis-[(1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-2(1H)-chinolinon

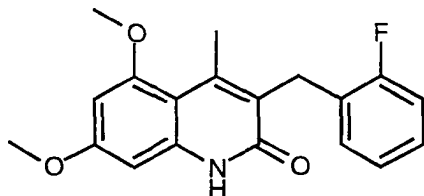


[0119] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,20 g), Natriumazid (0,072 g) und Ammoniumchlorid (0,060 g) wurden während 3 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,21 g (85%). Schmelzpunkt: 246–249°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,50 (s, 3H, CH₃), 5,48 (b, 4H, OCH₂Tet, NCH₂), 5,60 (s, 2H, OCH₂Tet), 6,34 (s, 1H, CH=C), 6,64 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 6,77 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 7,18–7,32 (m, 5H, Ph).

Beispiel 19. Herstellung von 1-Benzyl-5,7-bis[1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon

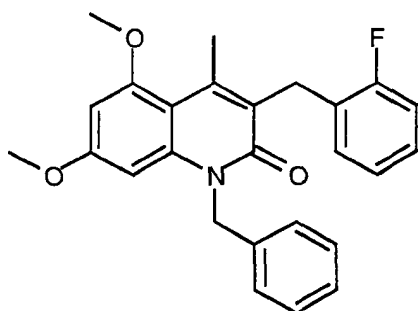
a) 5,7-Dimethoxy-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0120] Ethyl-2-(2-fluorbenzyl)acetoacetat (2,5 g) in Xylol (1 ml) wurde auf 150°C erwärmt, und es wurde 3,5-Dimethoxyanilin (1,46 g) in Xylol (4 ml) in kleinen Portionen während 30 Minuten zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde während 3 Stunden bei 160°C erwärmt und dann auf Raumtemperatur gekühlt. Es wurde Methansulfonsäure (1,7 ml) zugegeben und die Mischung während 30 Minuten bei Umgebungstemperatur gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und der Niederschlag filtriert und getrocknet. Das Produkt wurde mit warmem Ethanol verrieben. Ausbeute: 0,64 g (21%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,45 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,97 (s, 2H), 6,33 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,48 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,90–7,25 (m, 4H), 11,61 (s, 1H).

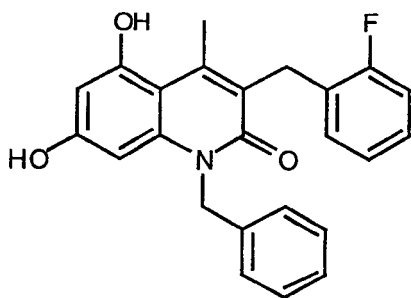
b) 1-Benzyl-5,7-dimethoxy-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0121] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,62 g) wurde mit t-BuOK (0,23 g) und Benzylbromid (0,36 g) während 2,6 Stunden bei 60°C in DMSO (12 ml) behandelt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 18b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,39 g (49%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,51 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 4,11 (s, 2H), 5,55 (b, 2H), 6,433 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,443 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,97–7,33 (m, 9H).

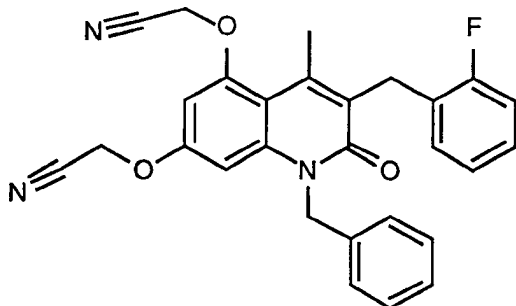
c) 1-Benzyl-5,7-dihydroxy-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0122] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,34 g) wurde wie in Beispiel 18c mit BBr_3 (8,48 g) in CH_2Cl_2 (7 ml) behandelt. Ausbeute: 0,30 g (82%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): 2,55 (s, 3H), 4,06 (s, 2H), 5,40 (b, 2H), 6,13 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,22 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,97–7,33 (m, 9H), 10,3 (b, 2H).

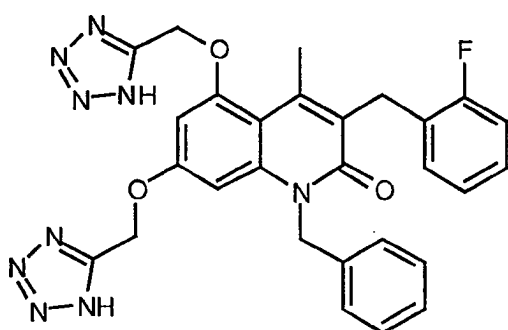
d) 1-Benzyl-5,7-bis(cyanomethoxy)-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0123] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,21 g), Chloracetonitril (0,086 g) und Kaliumcarbonat (0,37 g) wurden während 2 Stunden bei 100°C in DMF (2 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,18 g (71%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): 2,53 (s, 3H), 4,13 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 5,29 (s, 2H), 5,57 (b, 2H), 6,746 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz), 6,756 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz), 7,00–7,32 (m, 9H).

e) 1-Benzyl-5,7-bis[1H-tetrazol-5-yl]methoxy-3-(2-fluorbenzyl)-4-methyl-2(1H)-chinolinon

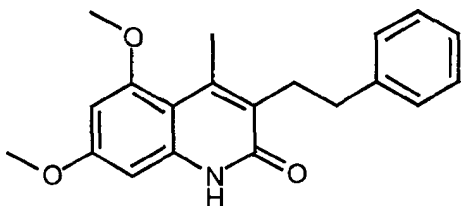


[0124] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,17 g), Natriumazid (0,051 g) und Ammoniumchlorid (0,042 g) wurden während 3 Stunden bei 100°C in DMF erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,17 g (85%). Schmelzpunkt: $135\text{--}140^\circ\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): 2,46 (s, 3H), 4,10 (s, 2H), 5,48 (s, 2H), 5,51 (b, 2H), 5,59 (s, 2H), 6,68 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 6,79 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 6,99–7,32 (m, 9H).

Beispiel 20. Herstellung von 1-Benzyl-5,7-bis[1H-tetrazol-5-yl)methoxy]-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon

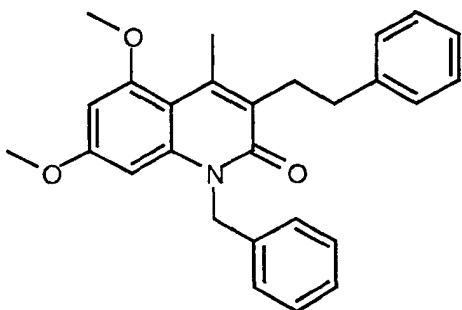
a) 5,7-Dimethoxy-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon



[0125] Ethyl-2-(2-phenylethyl)acetoacetat (2,70 g) in Xylol (5 ml) wurde wie in Beispiel 19a beschrieben mit 3,5-Dimethoxyanilin (1,60 g) bei 150°C behandelt. Es wurde bei Raumtemperatur Methansulfonsäure (4,0 ml) zugegeben und die Mischung während 1 Stunde bei 80°C erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 19a beschrieben isoliert. Ausbeute: 1,38 g (41%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,45 (s, 3H), 2,64–2,68 (m, 2H), 2,82–2,86 (m, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 6,30 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,18–7,30 (m, 5H), 11,45 (s, H).

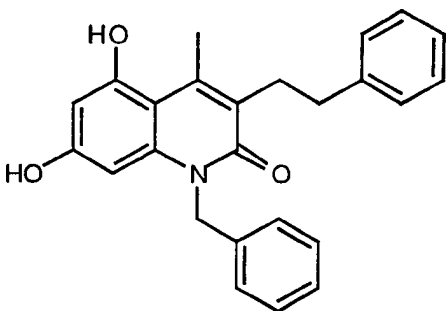
b) 1-Benzyl-5,7-dimethoxy-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon



[0126] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,61 g), t-BuOK (0,24 g) und Benzylbromid (0,36 g) wurden während 2 Stunden bei 60°C in DMSO (12 ml) erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 18b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,31 g (40%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,51 (s, 3H), 2,73–2,77 (m, 2H), 2,96–3,00 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 5,55 (b, 2H), 6,40 (s, 2H), 7,17–7,33 (m, 10H).

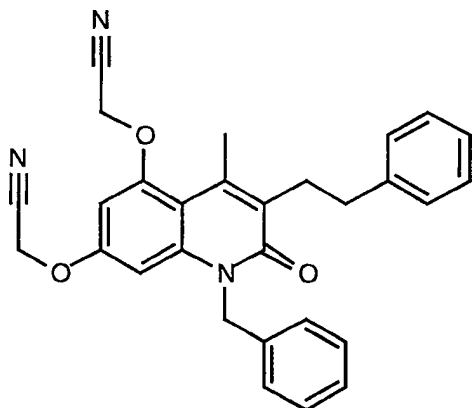
c) 1-Benzyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon



[0127] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,31 g) wurde mit BBr₃ (0,75 g) in CH₂Cl₂ (5 ml) wie in Beispiel 18c beschrieben behandelt. Ausbeute: 0,26 g (89%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 2,56 (s, 3H), 2,69–2,75 (m, 2H), 2,90–2,95 (m, 2H), 5,39 (b, 2H), 6,08 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 6,19 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 7,11–7,33 (m, 10H), 10,2 (b, 2H).

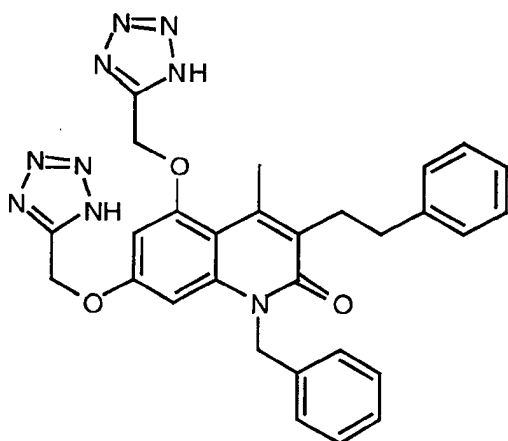
d) 1-Benzyl-5,7-bis(cyanomethoxy)-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon



[0128] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,22 g), Chloracetonitril (0,091 g) und Kaliumcarbonat (0,39 g) wurden während 2 Stunden bei 100°C erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1b beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,20 g (76%).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,50 (s, 3H), 2,73–2,77 (m, 2H), 2,98–3,02 (m, 2H), 5,21 (s, 2H), 5,29 (s, 2H), 5,56 (b, 2H), 6,70 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,72 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,18–7,33 (m, 10H).

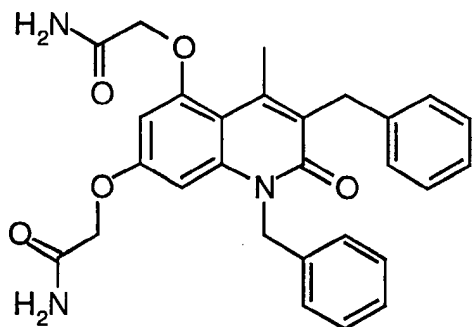
e) 1-Benzyl-5,7-bis[1H-tetrazol-5-yl]methoxy-4-methyl-3-(2-phenylethyl)-2(1H)-chinolinon



[0129] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,19 g), Nariumazid (0,057 g) und Ammoniumchlorid (0,047 g) wurden während 3 Stunden bei 100°C in DMF erwärmt. Das Produkt wurde wie in Beispiel 1c beschrieben isoliert. Ausbeute: 0,18 g (78%). Schmelzpunkt: 215–218°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 2,46 (s, 3H), 2,70–2,74 (m, 2H), 2,95–2,99 (m, 2H), 5,47 (s, 2H), 5,54 (b, 2H), 5,57 (s, 2H), 6,64 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 6,77 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 7,16–7,33 (m, 10H).

Beispiel 21. Herstellung von 5,7-Bis(aminocarbonylmethoxy)-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon

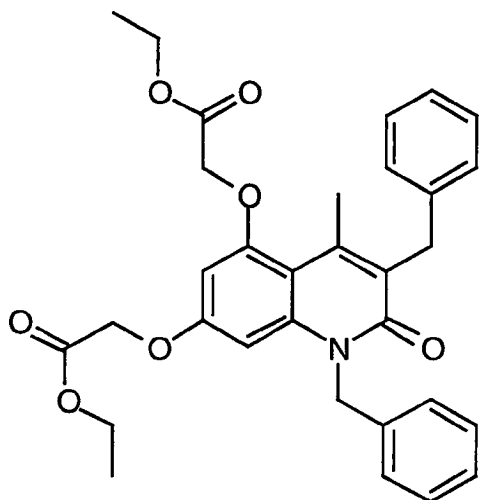


[0130] Die Mischung aus 5,7-Dihydroxy-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon (0,5 g), Kaliumcarbonat (0,9 g) und 2-Chloracetamid (0,25 g) wurde während 2 Stunden bei 100°C in DMF (6,5 ml) umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Eiswasser behandelt und filtriert. Das Produkt wurde mit heißem Ethanol verrieben.

Ausbeute: 0,32 g. Schmelzpunkt: 252–253°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 2,63 (s, 3H, CH₃), 4,13 (s, 2H, PhCH₂), 4,37 (s, 2H, OCH₂), 4,55 (s, 2H, OCH₂), 5,54 (s, 2H, NCH₂Ph), 6,40 (d, 1H, J = 2 Hz, ArH), 6,53 (d, 1H, J = 2 Hz, ArH), 7,13–7,33 (m, 10H, Ph), 7,44 (d, 2H, J = 65 Hz, CONH₂), 7,47 (d, 2H, J = 68 Hz, CONH₂)

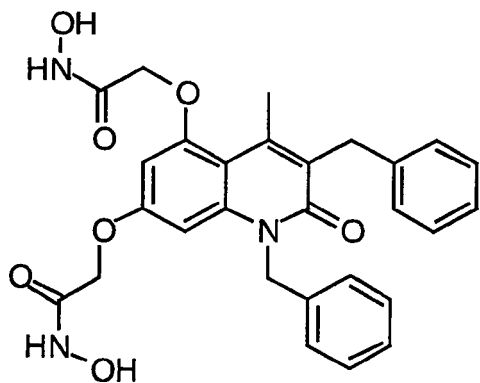
Beispiel 22. Herstellung von 5,7-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0131] Die Mischung aus 5,7-Dihydroxy-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon (1 g), Ethyl-2-bromacetat (0,63 ml) und Kaliumcarbonat (1,49 g) wurde während 3 Stunden unter Stickstoff bei 110°C in DMF (5 ml) erwärmt, in Eiswasser gegossen und filtriert. Das resultierende Feststoffmaterial wurde mit Ether verrieben und erneut filtriert. Ausbeute: 1,03 g. Schmelzpunkt: 113–116°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,15 (t, 3H, CH₃CH₂, J = 7,1 Hz), 1,20 (t, 3H, CH₃CH₂, J = 7,1 Hz), 2,63 (s, 3H, CH₃), 4,03 (q, 2H, CH₂CH₃, J = 7,1 Hz), 4,13 (s, 2H, CH₂Ph), 4,17 (q, 2H, CH₂CH₃, J = 7,1 Hz), 4,78 (s, 2H, OCH₂), 4,90 (s, 2H, OCH₂), 6,41 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 6,44 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 7,13–7,33 (m, 10H, Ph).

Beispiel 23. Herstellung von 5,7-Bis(hydroxyaminocarbonylmethoxy)-1,3-dibenzyl-4-methyl-2(1H)-chinolinon



[0132] Das Produkt des vorherigen Beispiels (0,3 g), Hydroxylaminhydrochlorid (0,32 g) und 5 N NaOH (1,05 ml) wurden während 6 Stunden bei 50°C in Ethanol (8 ml) umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser behandelt und basisch gemacht (pH 10) und filtriert. Das Filtrat wurde auf pH 2 angesäuert und filtriert. Ausbeute: 0,2 g. Schmelzpunkt: 121–127°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): die tautomeren Formen der Hydroxamsäure sind in den OCH₂-Signalen zu sehen: 2,63 (s, 3H, CH₃), 4,13 (s, 2H, CH₂Ph), 4,41 (s, 2H, OCH₂), 4,54 (s, 2H, OCH₂), 4,64 (s, 2H, HON=C(OH)CH₂O), 4,65 (s, 2H, HON=C(OH)CH₂O), 4,77 (s, 2H, HON=C(OH)CH₂O), 4,78 ((s, 2H, HON=C(OH)CH₂O), 5,54 (s, 2H, NCH₂Ph), 6,38–6,54 (m, 2H, ArH), 7,14–7,34 (m, 10H, Ph), 9,05 (b, 2H, NOH), 10,84 (s, 1H, HONHCO), 10,88 (s, 1H, HONHCO).

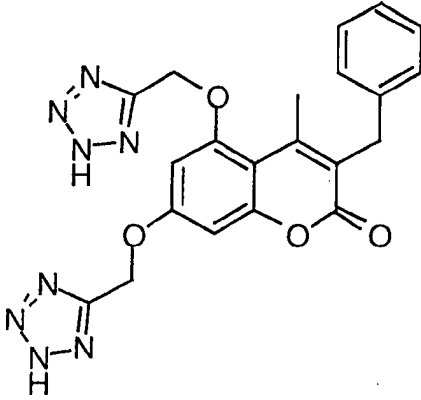
Patentansprüche

1. Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zum Erreichen direkter Dilatation der Koronararterien.

2. Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Koronarerkrankungen.

3. Verwendung eines Phospholambaninhibitors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung hämodynamischer Krise, bei der der niedrige aortale Blutdruck den koronaren Perfusionsdruck senkt.

4. Verbindung der Formel



und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

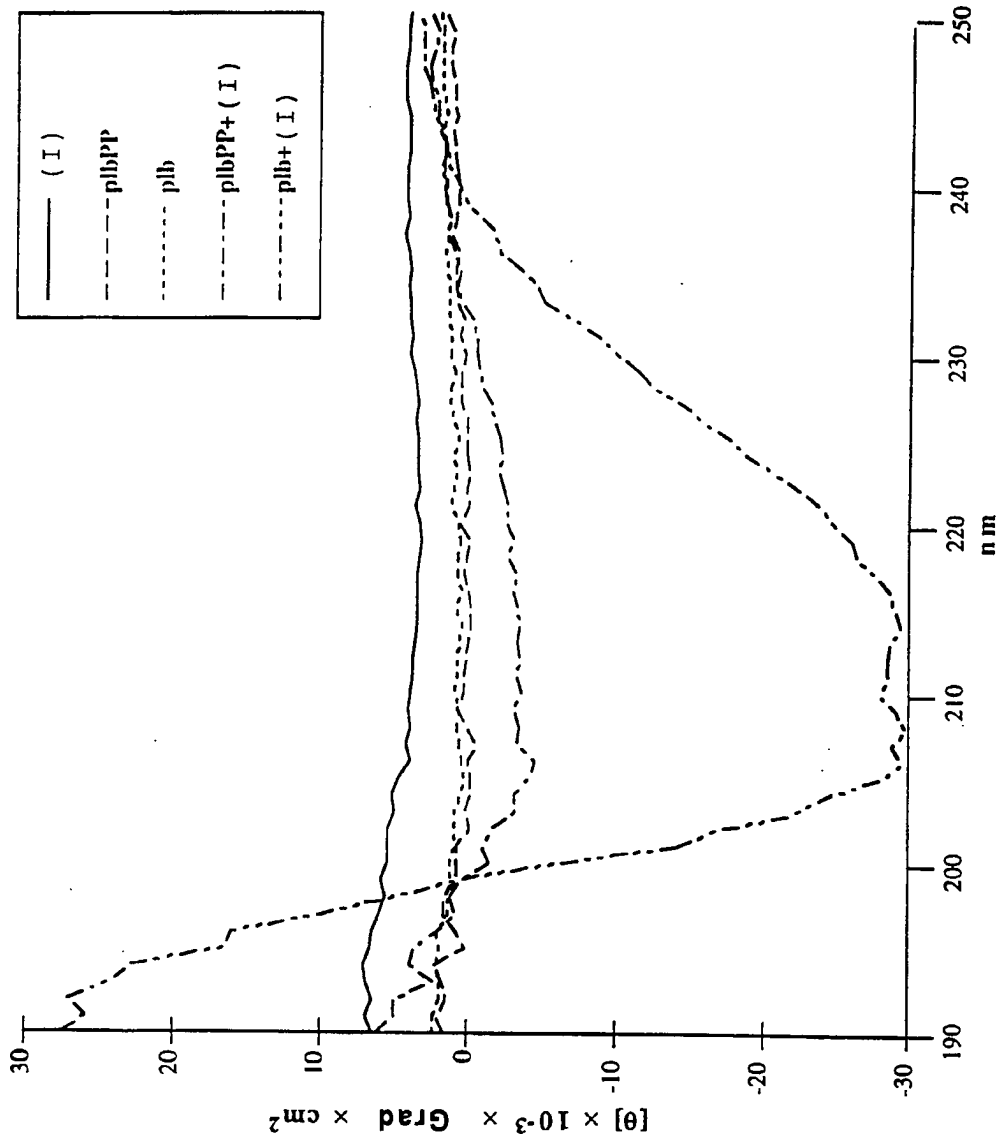


FIG. 1

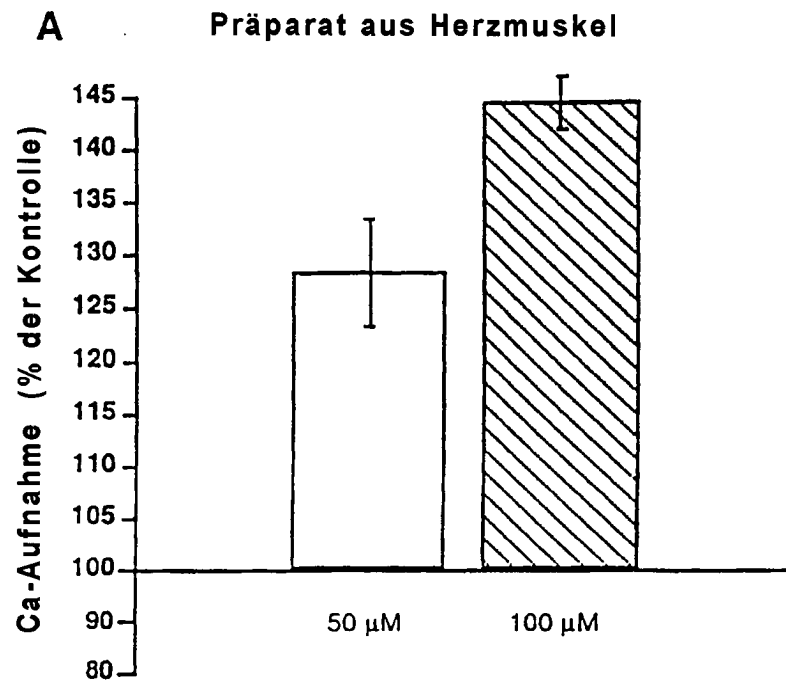


FIG. 2A

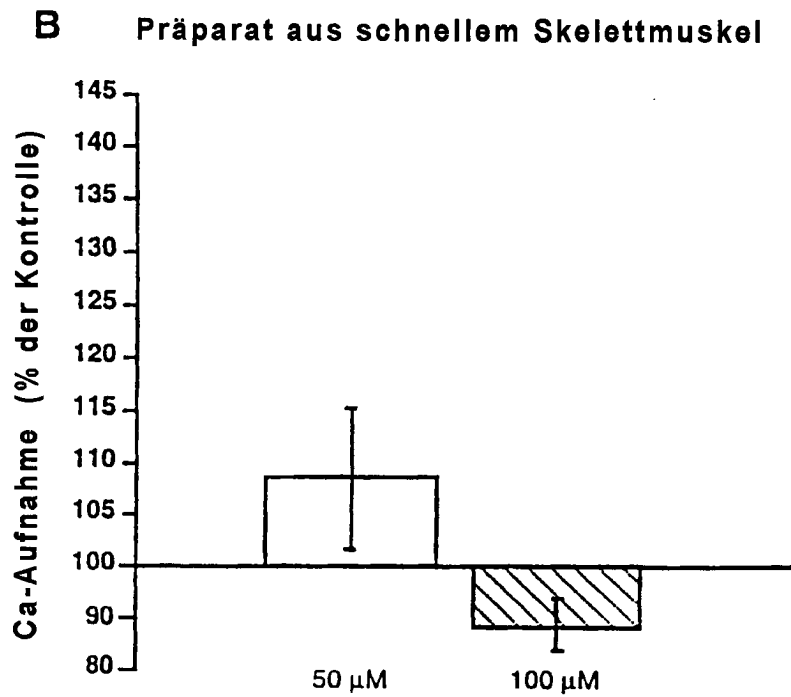


FIG. 2B

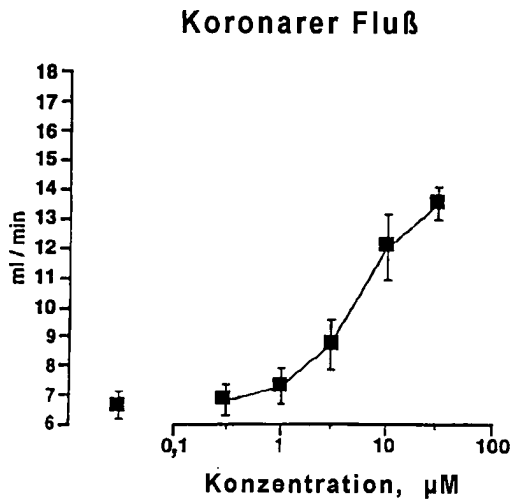


FIG. 3A

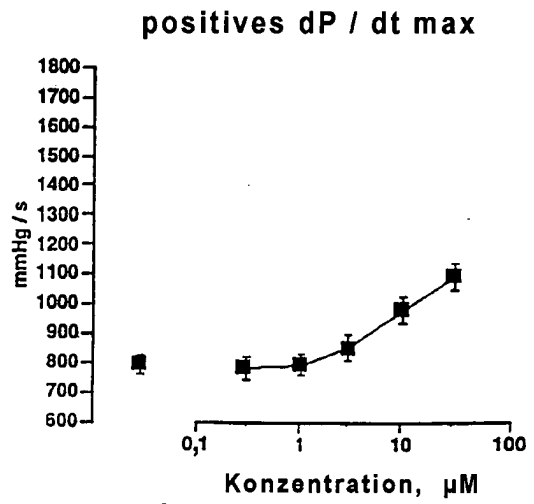


FIG. 3B

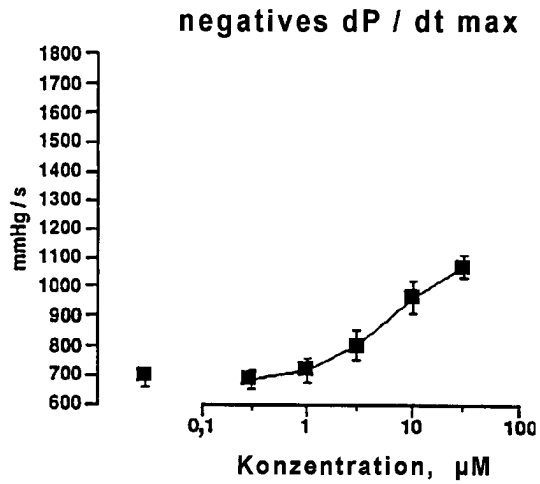


FIG. 3C

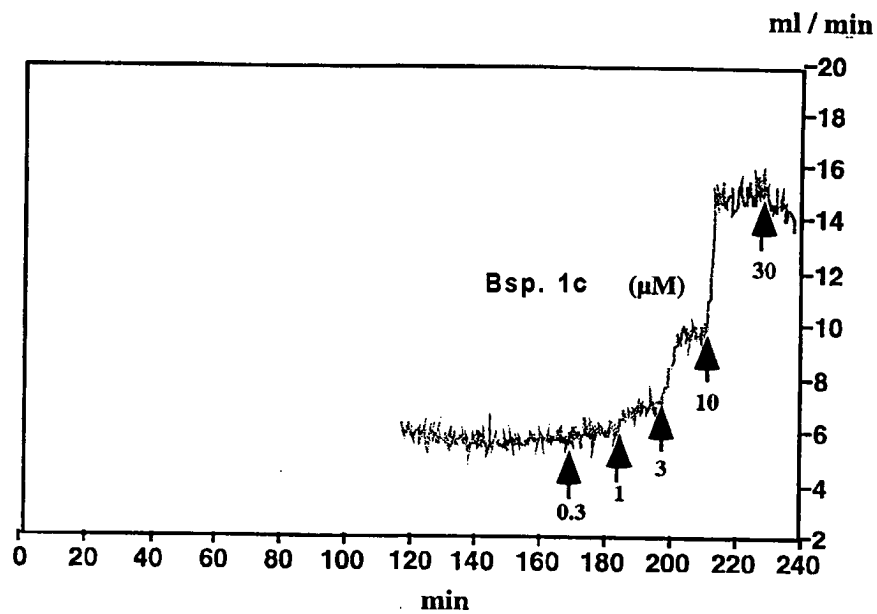


FIG. 4A

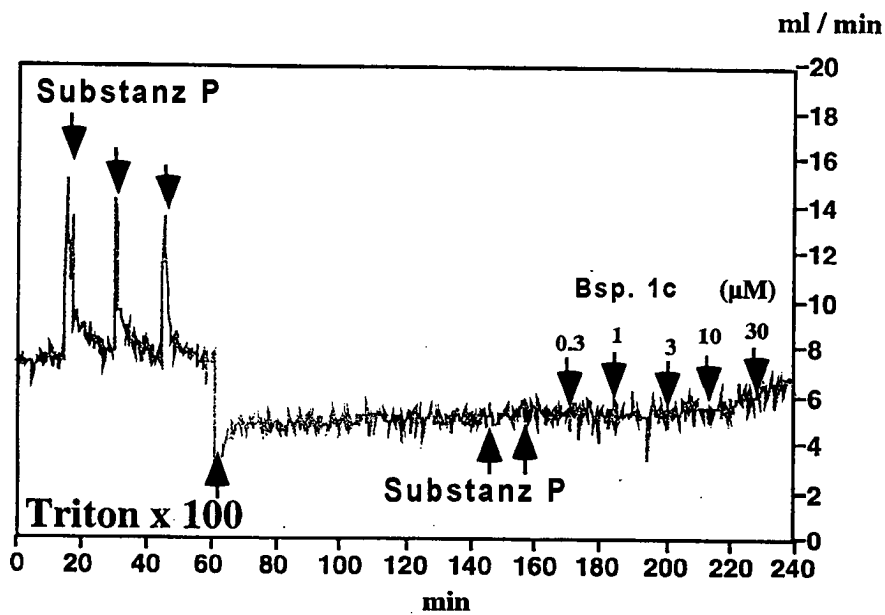


FIG. 4B