

**Cyclische und acyclische Phenoether
als neuartige organselektive K_{ATP} -Kanalöffner:
Synthese und pharmakologische Charakterisierung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joachim Schönlau

aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Weber

Korreferent: Prof. Dr. H. Lemoine

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juli 2005

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das möglichste getan hat.“

Goethe, *Italiänische Reise*, Zweiter Teil (16. März 1787)

Meiner Freundin Silke Hausmann und meiner Familie

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Ionenkanäle	2
1.2	Klassifizierung der Kaliumkanäle	3
1.3	Beschreibung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle K_{ATP} -Kanäle	3
1.3.1	Vorkommen der K_{ATP} -Kanäle	3
1.3.2	Topologie des K_{ATP} -Kanals	4
1.3.3	Kir-Untereinheiten	4
1.3.4	SUR-Untereinheit	5
1.3.5	Isoformen der K_{ATP} -Kanäle durch Kombination der SUR- und Kir-Untereinheiten	6
1.4	Regulation der K_{ATP} -Kanäle	8
1.5	K_{ATP} -Kanal modulierende Wirkstoffe	11
1.5.1	Kaliumkanalblocker	11
1.5.2	Kaliumkanalaktivatoren (KCO).....	12
1.5.2.1	Benzopyran-Reihe	13
1.5.2.2	Benzo- und Pyridothiadiazin-Reihe.....	14
1.6	Bindungsstellen der KCOs am SUR	15
1.7	Kardioprotektive Wirkung von Kaliumkanalöffnern	18
1.7.1	Mitochondriale K_{ATP} -Kanäle	18
1.7.2	Ischemic Preconditioning IPC	18
1.7.3	Kardioselektive K_{ATP} -Kanal-Modulatoren	19
1.8	Pharmakodynamische Effekte der KCO in verschiedenen Geweben	22
1.8.1	Wirkung der KCOs auf das Herz.....	22
1.8.2	Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäße	22
<u>2</u>	<u>THEMA DER ARBEIT</u>	<u>25</u>
<u>3</u>	<u>CHEMISCH-ALLGEMEINER TEIL</u>	<u>29</u>
3.1	Synthesestrategie.....	30
3.2	Darstellung der Ausgangsverbindungen	31
3.2.1	Aufbau des 2,2-Dimethyl-2[H]-benzopyrans	31
3.2.2	Synthese der 3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2,2-dialkyl-2H-1-benzopyrane.....	35
3.2.3	Synthese der 4-Chloranilinobenzopyrane.....	38
3.2.3.1	Synthese der Acetate von 32 und 33.....	40
3.2.4	Versuche zur Synthese von 32a	41
3.2.5	Synthese der Zwischenprodukte.....	43

3.2.5.1	Synthese von N-(4-Chlorphenyl)-(1 <i>H</i> -imidazol-2-ylmethyl)amin 39.....	43
3.2.5.2	Synthese von 2-Hydroxy-5-nitroacetophenon 13a	43
3.2.5.3	Synthese von 4-Hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid	46
3.2.6	Darstellung der acyclischen Phenoether (offene Benzopyrane).....	47
3.2.6.1	Aufbau der acyclischen Phenoether vom Pyridon-Typ	47
3.2.6.2	Synthese der acyclischen Phenoether vom Typ der Amide und Thioamide	50
3.3	Spektroskopische Eigenschaften	52
3.3.1	Spektroskopische Eigenschaften der 4-Chloranilinochromanole	52
3.3.1.1	Infrarotspektroskopie.....	52
3.3.1.2	Massenspektrometrie.....	53
3.3.1.3	¹ H-NMR-Spektren.....	53
3.3.2	Struktur der diastereomeren Epoxide 28 und 28a	57
3.3.3	Röntgenstrukturanalyse von 28	59
3.3.4	¹ H-NMR-Spektroskopische Untersuchung der diastereomeren Epoxide 28 und 28a ..	60
3.3.5	CD-Spektrum von 32 und 33	64
4	PHARMAKOLOGISCHER TEIL	65
4.1	Material und Methoden.....	66
4.1.1	Isolierte Gewebe der Ratte	66
4.1.1.1	Präparation von Aorta und Trachea für funktionelle Versuche	66
4.1.1.2	Enzymatische Desaggregation von Trachealmuskelzellen	67
4.1.1.3	Züchtung glatter Muskelzellen der Aorta (RASMC).....	67
4.1.1.4	Gewinnung von Herzmyozyten aus der Ratte	68
4.1.2	Relaxationsstudien.....	69
4.1.2.1	Versuchsaufbau	69
4.1.2.2	Versuchsdurchführung	69
4.1.2.3	Versuchsauswertung.....	70
4.1.3	Calciuminduzierte Kontraktionsversuche an der Rattenaorta.....	72
4.1.3.1	Versuchsaufbau	72
4.1.3.2	Versuchsdurchführung	72
4.1.3.3	Versuchsauswertung:.....	73
4.1.4	Kompetitionsbindungsstudien	74
4.1.4.1	Kompetitionsbindungsuntersuchung mit [³ H]-P1075	74
4.1.4.2	Versuchsdurchführung an intakten desaggregierten Herzzellen der Ratte	74
4.1.4.3	Versuchsdurchführung an glatten Muskelzellen der Rattenaorta	75
4.1.4.4	Kompetitionsbindungsuntersuchung mit [³ H]-(+)-PN 200,110	75
4.1.4.5	Auswertung der Kompetitionsbindungen	75
4.2	Ergebnisse	77

4.2.1	Radioligandbindung am K_{ATP} -Kanal mit [3H]-P1075	77
4.2.1.1	Kultivierte glatte Muskelzellen der Rattenaorta (RASM)	77
	4-Chloranilinochromanole und kardioprotektive $K_{ATP}CO$	77
	Pyridone als acyclische Phenoether	82
	Amide/ Thioamide als offene Phenoether	85
4.2.2	Ergebnisse an Rattenherzzellen	87
4.3	Funktionelle Experimente an isolierten Aorten und Tracheen der Ratte	93
4.3.1	4-Chloranilinoderivate und (3S,4R)- BMS-180448	94
4.3.2	Pyridone als offene Phenoether	99
4.4	Hemmwirkung der KCO auf die calciuminduzierte Kontraktur.....	102
4.5	Radioligandbindung am L-Typ Ca^{2+}-Kanal mit [3H]-(+)-PN 200,110.....	118
4.6	Schildplotanalyse	126
4.6.1	Erstellung und Berechnung der nicht-linearen Schildplots für Glibenclamid mit (3R,4S)-JS09 und Bimakalim als Agonisten	126
4.6.2	Erstellung und Berechnung der nicht linearen Schildplots für BPDZ44 mit (3R,4S)-JS09 und Bimakalim als Agonisten	131
4.6.3	Analyse der Blockerwirkung von Glibenclamid und BPDZ44 im linearen Schildplot.	134
4.6.4	Charakterisierung von BPDZ44 und BPDZ79 anhand von Radioligandbindung und Relaxationsexperimenten	136
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>145</u>
5.1	Untersuchung der Bindungsaffinität und Wirkung der am K_{ATP}-Kanalöffner	148
5.1.1	Bindungsaffinität zu den K_{ATP} -Kanälen an Aorten- und Herzzellen der Ratte	148
5.1.2	Wirksamkeit der so genannten kardioprotektiven 4-Chloranilinobenzopyrane an der Aorta der Ratte	149
5.1.3	Wirksamkeit der so genannten kardioprotektiven 4-Chloranilinobenzopyrane an der Trachea der Ratte	152
5.1.4	Bindungs- und Wirkungseigenschaften von (3S,4R)-BMS-180448.....	154
5.1.5	Molekularbiologische Gründe für die Aortenselektivität.....	155
5.2	Non-K_{ATP}-Kanal-Wirkung der 4-Chloranilinobenzopyrane (BMS-191095-Analoga).....	158
5.3	Acyclische Phenoether als neue Kandidaten für K_{ATP}-Kanalöffner: Pyridone, Amide und Thioamide.....	163
5.4	Pharmakologische Charakterisierung von BPDZ44 und BPDZ79 als Abkömmlinge von Diazoxid.....	167
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>175</u>
7	<u>KONKORDANZ</u>	<u>187</u>

7.1	Strukturformeln und Bezeichnungen	188
8	<u>CHEMISCH-EXPERIMENTELLER TEIL</u>	193
8.1	Abkürzungsverzeichnis	194
8.2	Allgemeine Angaben zu Material und Methoden.....	196
8.3	Chemikalien:	197
8.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften	199
8.5	Substanzen.....	201
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	253

1 EINLEITUNG

1.1 Ionenkanäle

Die Zellmembran besitzt durch Proteine gebildete Ionenkanäle, die durch Konformationsänderung der Kanalproteine geöffnet oder geschlossen werden können. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Geometrie und Ladungsverteilung lassen sie im geöffneten Zustand meist nur bestimmte Ionen hindurchtreten. Die treibende Kraft für die jeweilige Ionenbewegung ist der Ionengradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Die Ionenkanäle lassen sich nach ihrer Ionenspezifität und den für die Öffnung verantwortlichen Steuerungsmechanismen einteilen. Den Ionen entsprechend unterscheidet man u.a. Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Kanäle. Darüber hinaus gibt es neben spannungsabhängigen und G-Protein gekoppelten Kanälen eine Vielzahl von ligandgesteuerten Ionenkanälen, zu denen die ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) zählen.

Kaliumkanäle stellen wichtige Targets für eine immer größer werdende Anzahl an Substanzen dar. Insbesondere die Kaliumkanäle, die durch die intrazelluläre Adenosin-triphosphatkonzentration (ATP-sensitive Kaliumkanäle, K_{ATP} -Kanäle) reguliert werden (Ashcroft et al., 1998), sind vom größten Interesse. Die K_{ATP} -Kanäle spielen eine große Rolle bei der Regelung des Membranpotentials der Zelle. Sie sind u.a. an vielen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt:

- Regulation des Herzens
- Kontraktion der Muskulatur
- Freisetzung von Neurotransmittern
- Insulinsekretion
- Zellproliferation.

Substanzen, die diese Kaliumkanäle öffnen, werden als Kaliumkanalöffner KCO (K^+ -channel opener) oder auch PCO (potassium channel opener) bezeichnet. Wirkstoffe mit dem umgekehrten Effekt sind als Kaliumkanalblocker (KCB) bekannt.

1.2 Klassifizierung der Kaliumkanäle

Die Gruppe der Kaliumkanäle ist heterogen. Es kann eine Klassifizierung hinsichtlich der Anzahl der transmembranären Domänen durchgeführt werden:

- Spannungsabhängige Kaliumkanäle
- Zwei-Poren-Kanäle (twin-pore channels)
- Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle „inward rectifier“

Die Anzahl der transmembranären Domänen und der Poren sind unterschiedlich (s. Tab. 1.1)

Die ATP-sensitiven Kaliumkanäle gehören zur letzten Gruppe.

Tab. 1.1: Klassifizierung der Kaliumkanäle

Familie	Anzahl transmembranärer Domänen	Anzahl der Poren
Spannungsabhängige Kaliumkanäle	6	1
Zwei-Poren-Kanäle	4	2
Kir (inward rectifier)	2	1

Dissertation Plücker, 2004

1.3 Beschreibung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle K_{ATP} -Kanäle

1.3.1 Vorkommen der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle konnten schon in einer Vielzahl von Geweben identifiziert werden. Zuerst wurden sie in der Herzmuskulatur von Noma (1983) entdeckt, alsdann in den β -Zellen des Pankreas (Cook et al., 1984), in der Skelettmuskulatur (Spruce et al., 1985), in den Neuronen (Bernadi et al., 1988) und in glatten Muskelzellen (Standen et al., 1989). Zudem konnten auch in Mitochondrien K_{ATP} -Kanäle entdeckt werden, auf die später noch genauer eingegangen wird.

1.3.2 Topologie des K_{ATP} -Kanals

K_{ATP} -Kanäle bestehen aus einem Oktamer, das aus zwei verschiedenen Proteinuntereinheiten besteht:

- Vier identische Untereinheiten bilden die **K_{ATP} -Kanal-Pore Kir 6.x**. Sie bewirkt, dass bei kontrolliertem Membranpotential die einwärtsgerichtete Leitfähigkeit der Kaliumionen größer ist als die nach außen gerichtete.
- Weitere vier identische Untereinheiten bilden das **Regulatorprotein** das **SUR** (**S**ulfonylurea receptor subunit). Dieses Protein gehört zu den ABC-Proteinen (**A**T**P**-binding cassette protein) und gilt als die Bindungsstelle für Kaliumkanalöffner (KCO) und Kaliumkanalblocker (KCB)

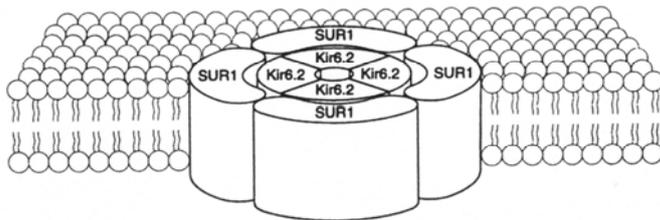


Abb. 1.1: Strukturmodell eines K_{ATP} -Kanals am Beispiel von Kir6.2/SUR1 (Seino 1999)

1.3.3 Kir-Untereinheiten

Bislang konnten sieben Kir-Unterfamilien, Kir1.0-7.0, identifiziert werden. Die K_{ATP} -Kanäle gehören zur Unterfamilie von Kir6.0, die einen schwachen Kalium-Einstrom besitzen. Die Kir-Einheiten verschiedener Unterfamilien können unterschiedliche Funktionen ausüben (s. Tab. 1.2)

Kir 6.0-Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranären Segmenten, M1 und M2, die mit einer extrazellulären Porenregion verbunden sind, die die hohe Selektivität für Kaliumionen determiniert. Die N- und C-Termini befinden sich im Intrazellulärraum. Hier liegen auch die Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen (Proteinkinase-A (PKA) und Proteinkinase-C (PKC)). Bisher sind zwei Isoformen Kir 6.1 (Inagaki et al., 1995) und Kir 6.2 (Sakura et al., 1995) entdeckt worden. Beide Isoformen bestehen aus ca. 400 Aminosäuren mit einer Sequenzhomologie von ca. 70%. Das Kir 6.1 Protein besteht aus 424 Aminosäuren, wobei die Sequenzhomologie nur zu 40-50% mit anderen Vertretern der Kir-Familie übereinstimmt. Das Kir 6.2 Protein besitzt 390 Aminosäuren. Die typische Aminosäuresequenz Gly-Tyr-Gly in vielen Porenregionen der Kaliumkanäle ist bei den K_{ATP} -Kanälen durch Gly-Phe-Gly ersetzt.

Tab. 1.2: Einteilung der Kir-Kanäle nach Nomenklatur und Funktion

Kanal	Funktion
Kir1.0 (ROMK)	Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase und renale Kaliumsekretion
Kir2.0 (IRK)	Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und Modulation des Aktionspotentials
Kir3.0 (GIRK)	Modulation der Herzfrequenz und neuronale Reizleitung
Kir4.0	Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase in Nieren und Gliazellen
Kir5.0	unbekannt
Kir6.0 (K _{ATP})	Verbindet metabolischen Status der Zelle mit der Erregbarkeit der Zellmembran, Insulinsekretion, und Cytoprotektion; Aufrechterhaltung des vaskulären Muskeltonus
Kir7.0	Aufrechterhaltung des Ruhepotentials der Membran

Doupnik et al., 1995 ; Krapivinsky et al., 1998

1.3.4 SUR-Untereinheit

Das Regulatorprotein SUR gehört zu den Zielproteinen für Kaliumkanalöffner (KCO) und Kaliumkanalblocker (KCB). Es besitzt ca. 1600 Aminosäuren und hat 17 transmembranäre Segmente (TM). Diese verteilen sich auf drei verschiedenen Domänen (TMD0, TMD1 und TMD2), die aus 5 bzw. je 6 Segmenten bestehen. In intrazellulären Schleifen existieren charakteristische Walker-Motive A und B (Walker et al., 1982) mit Bindungstaschen für Nucleosidphosphate (**n**ucleotid **b**inding **f**olds; NBF1 und NBF2) Man geht davon aus, dass diese sehr wichtig für die Regulation durch die Nucleotide und damit für die Aktivität der ABC-Proteine sind.

Es können bislang verschiedene SUR-Untereinheiten unterschieden werden. Der Aufbau der SUR-Proteine ist im Allgemeinen ähnlich. Man unterscheidet SUR1 und SUR2, die zu 67% übereinstimmen. SUR2 Untereinheiten werden nochmals in SUR2A und SUR2B unterteilt. Sie unterscheiden sich lediglich in den letzten 47 Aminosäuren des C-Terminus. Eine weitere Untereinheit (SUR2C) konnte aus m-SUR2A geklont werden. Die Funktion ist bislang unklar (Chutkow et al., 1996).

1.3.5 Isoformen der K_{ATP} -Kanäle durch Kombination der SUR- und Kir-Untereinheiten

Molekularbiologische Analysen deckten auf, dass die Koexpression von SUR und Kir6.x essentiell ist, um einen funktionsfähigen K_{ATP} -Kanal zu bilden. Die spezifischen Eigenschaften der K_{ATP} -Kanalsubtypen werden durch die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten bestimmt. K_{ATP} -Kanäle unterscheiden sich hinsichtlich der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften. Es muss betont werden, dass die Koexpression der Proteinuntereinheiten des K_{ATP} -Kanals gewebsspezifisch ist, weshalb die K_{ATP} -Kanäle unterschiedliche Funktionen erfüllen. In den meisten Geweben ist Kir6.2 die porenbildende Untereinheit. Eine Übersicht über die Eigenschaften der Isoformen findet man in der nachfolgenden Tabelle.

Tab. 1.3: Eigenschaften der unterschiedlichen K_{ATP} -Kanal-Isoformen

KATP-Kanal	Pharmakologische Eigenschaft	Literatur
Kir6.1/SUR1	Aktivierung durch Diazoxid, Hemmung durch 5-Hydroxydecanoat	Liu et al., 2001
Kir6.2/SUR1	Aktivierung durch Diazoxid ; starke Hemmung durch Glibenclamid	Miki et al., 1997
Kir6.1/SUR2B	Aktivierung durch Cromakalim, Pinacidil und Diazoxid ; geringe Hemmung durch Glibenclamid	Isomoto et al., 1996
Kir6.2/SUR2A	Aktivierung durch Cromakalim und Pinacidil, jedoch nicht durch Diazoxid; geringe Hemmung durch Glibenclamid	Aguilar-Bryan et al., 1995

Kaliumkanalöffner (KCO) z.B. Diazoxid, Cromakalim und Pinacidil sowie Kaliumkanalblocker (KCB) z.B. Glibenclamid waren wichtige Werkzeuge, um die Vielfalt der K_{ATP} -Kanal-Isoformen aufzudecken.

Kir6.2/SUR1 Die Kombination dieser Untereinheit formt den klassischen K_{ATP} -Kanal der β -Zelle des Pankreas. Versuche mit Kir6.2-„knockout“ β -Zellen zeigten selbst bei sehr niedrigem Glucosespiegel, einen erhöhten Metabolismus (Insulinsekretion) der β -Zellen, wie auch ein höheres Ruhepotential als bei Wildtypzellen (Miki et al., 1998). SUR1-„knockout“-Mäuse bildeten β -Zellen ohne K_{ATP} -Kanal-Aktivität. In diesem Fall blieb die Insulinsekretion auch bei Erhöhung der Glucosekonzentration oder Zugabe von Sulfonylharnstoffen stark gehemmt. Dies zeigt deutlich eine Beteiligung der K_{ATP} -Kanäle an der Regulierung der Insulinsekretion in

den β -Zellen des Pankreas. Diese Kombination des K_{ATP} -Kanals wird durch den ADP/ATP-Quotienten gesteuert. Hohe ADP-Spiegel aktivieren wie auch Diazoxid den K_{ATP} -Kanal, während Diazoxid hohe ATP-Konzentrationen oder auch der Kaliumkanalblocker Glibenclamid den Kanal schließen.

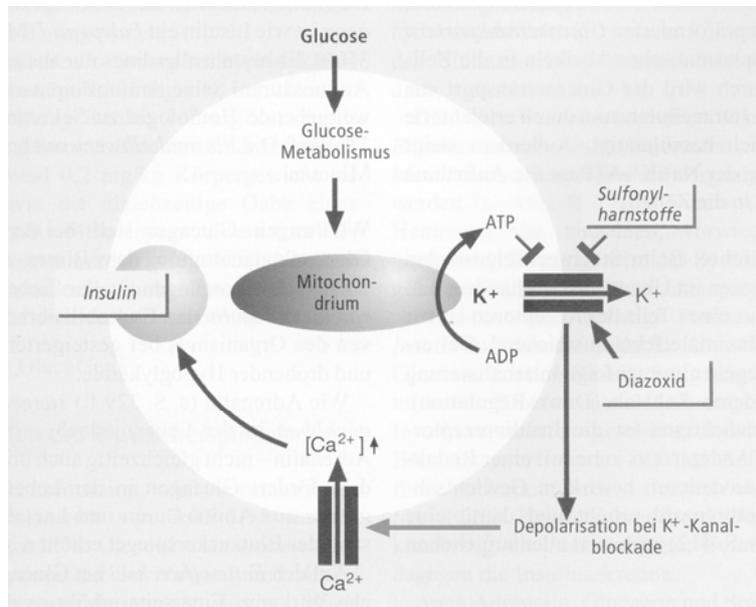


Abb. 1.2: Stimulation der Exozytose von Insulin durch Schließen von K_{ATP} -Kanälen mittels ATP sowie Sulfonylharnstoffen und Hemmung der Insulin-Freisetzung durch Diazoxid (Mutschler, 8. Auflage)

Kir6.1/SUR2A: Interessanterweise führt diese Kombination von Proteinuntereinheiten zu keinem funktionstüchtigen K_{ATP} -Kanal. Mit ^{86}Rb -Efflux-Methoden konnte keine Aktivität des Kanals nachgewiesen werden (Aguilar et al., 1998a). Diese Kombination ist eher von molekularbiologischem Interesse.

Kir6.2/SUR2A: Der so zusammengesetzte K_{ATP} -Kanal zeigt ähnliche Leitfähigkeiten wie der K_{ATP} -Kanal der β -Zellen des Pankreas, jedoch war der „bursting pattern“ ähnlich dem der K_{ATP} -Kanäle am Herzen. Die IC_{50} der ATP-Hemmwirkung war in etwa 10-fach höher als die an den Kanälen der β -Zellen. Es wird angenommen, dass die Herzmuskelzellen (sarkolemmal) (Babenko et al., 1998) aus diesen Untereinheiten aufgebaut sind, sowie die K_{ATP} -Kanäle der Skelettmuskulatur (Chutkow et al., 1996; Tucker et al., 1997).

Der Kir6.2/SUR2A-Kanal kann durch Cromakalim und Pinacidil aktiviert werden, wie an nativen K_{ATP} -Kanälen gezeigt werden konnte (Inagaki et al., 1995).

Kir6.1/SUR2B: Die Koexpression dieser Untereinheiten ergibt einen Kanal mit geringer Kaliumleitfähigkeit. Die allgemeine Leitfähigkeit liegt auch niedriger als für

Kir6.2-Kanäle. Diese Kombination ist für die Regulation des vaskulären Tonus wichtig. Dieser Kanal ist ATP-unempfindlich, kann jedoch durch MgATP aktiviert werden (Yamada et al., 1997). Folglich ist dieser Kanal kein typischer K_{ATP} -Kanal, entspricht aber in den Eigenschaften den der Nukleotid-aktivierten Kanäle der Portalvene der Ratten (Zhang et al., 1996).

Kir6.2/SUR2B Die Koexpression dieser Untereinheit führt zu K_{ATP} -Kanälen, die durch Diazoxid und Pinacidil aktiviert werden können (Isomoto et al., 1996). Diese Kombination des K_{ATP} -Kanals kommt in einer Vielzahl von Zellen der glatten Muskulatur vor (Chutkow et al., 1996; Isomoto et al., 1996), wurde aber auch schon in Neuronen des Mittelhirns entdeckt (Liss et al., 1999). Eine Übersicht über Vorkommen und Eigenschaft der verschiedenen Kaliumkanäle gibt Tab. 1.4 in Verbindung mit Tab. 1.3 (S. 6).

Tab. 1.4: Vorkommen der K_{ATP} -Kanal-Isoformen und ihre pharmakologische Eigenschaft

	Kir Untereinheit	SUR-Untereinheit	Literatur
Mitochondrien	Kir6.1	SUR1	Liu et al., 2001
Pankreas	Kir6.2	SUR1	Aguilar-Bryan et al., 1995; Sakura et al., 1995
Neuronen	Kir6.2	SUR1	Niki et al., 1997
Herzmuskelzellen	Kir6.2	SUR2A	Inagaki et al., 1995; Chutkow et al., 1996, Babenko et al., 1998
Skelettmuskulatur	Kir.6.2	SUR2A	Chutkow et al., 1996 ; Tucker et al., 1997
glatter Muskel	Kir6.2	SUR2B	Isomoto et al., 1996; Chutkow et al., 1996
Portalvene	Kir6.1	SUR2B	Zhang et al., 1996
Neuronen	Kir6.1	SUR2B	Liss et al., 1999

1.4 Regulation der K_{ATP} -Kanäle

Die Regulation der K_{ATP} -Kanäle erfolgt überwiegend durch die endogenen Substanzen ATP und Nucleosiddiphosphat (z.B. ADP und GDP), wird also vom metabolischen Zustand der Zelle gesteuert.

Ein Merkmal der K_{ATP} -Kanäle ist die Hemmung ihrer Aktivität durch ATP, die im Einzelnen bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. ATP und ADP beeinflussen in komplexer Weise den K_{ATP} -Kanal, wobei man verschiedene Effekte unterscheidet:

Hemmung, Regeneration und Stimulierung. Die Gabe von ATP oder an Mg^{2+} gebundenem ATP zu geöffneten K_{ATP} -Kanälen, führt zur deren Schließung. Welcher Nucleotid-Ligand dabei die stärkste Wirkung entfaltet, ist vom Gewebe abhängig. In Herzmuskelzellen haben freies ATP sowie an Magnesium gebundenes ATP (MgATP) eine gleich starke Wirkung auf K_{ATP} -Kanäle. Zur halbmaximalen Hemmung der Kanalaktivität werden 20-30 μM ATP bzw. MgATP benötigt (Terzic et al., 1994), dagegen ist ATP^{4-} in Pankreaszellen stärker wirksam ($IC_{50} = 4 \mu M$) als MgATP ($IC_{50} = 26 \mu M$).

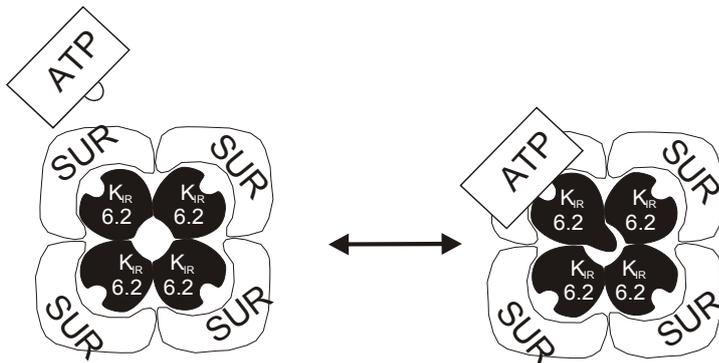


Abb. 1.3: Hemmung des K_{ATP} -Kanals durch Anlagerung von ATP (Schwanstecher et al., 2000)

Die Bindungsstelle von freiem ATP und ADP befindet sich auf der intrazellulären Seite des Kir6.2, während Nucleotide (ATP, ADP, GTP, GDP und UDP), die an Magnesium gebunden sind, mit den NBDs der verschiedenen SUR-Proteinen interagieren und dadurch die Kanalaktivität beeinflussen. ADP und viele andere Nucleosiddiphosphate hemmen in Abwesenheit von Mg^{2+} die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle, während MgADP diese erhöht. Selbst die durch ATP gehemmten Kanäle erfahren eine Aktivitätssteigerung durch die Zugabe von MgADP. Diese Tatsache führte zum Schluss, dass das Verhältnis von ADP/ATP entscheidend für die Regulation des K_{ATP} -Kanals ist (Dunne, 1986).

Ein Öffnen der Kanäle bewirkt die Einstellung des Gleichgewichtspotentials der Membran bei ca. -80 mV. Es wird angenommen, dass die K_{ATP} -Kanäle an der Ausbildung des Ruhepotentials beteiligt sind und die Aktionspotentiale kontrollieren. Am besten erforscht sind die Kanäle in den β -Zellen des Pankreas. Hier bewirkt das Öffnen weniger Kaliumkanäle die Einstellung des Ruhepotentials, während ein Schließen die Depolarisation der Plasmamembran begünstigt. Ob die K_{ATP} -Kanäle in Herzmuskelzellen, glatten Muskelzellen oder Neuronen unter normalen physiologischen Bedingungen geöffnet sind, ist noch nicht geklärt. Als erwiesen gilt, dass K_{ATP} -Kanäle in ruhenden, isolierten Herzmuskelzellen geöffnet werden können, wenn sie sich im hypoxischen Zustand befinden (Babenko et al., 1992). Dies bewirkt einen

verringerten Calciumeinstrom. Die Folge ist ein verminderter Bedarf an ATP und Sauerstoff.

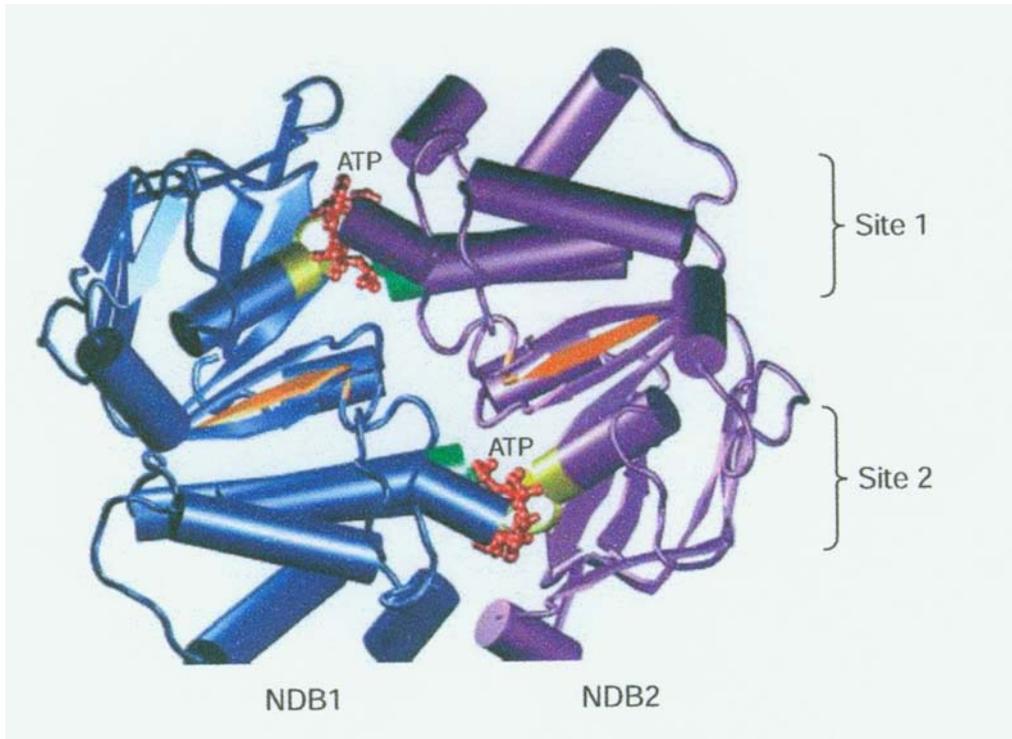


Abb. 1.4: Modell der NBDs vom SUR1 mit gebundenem MgATP

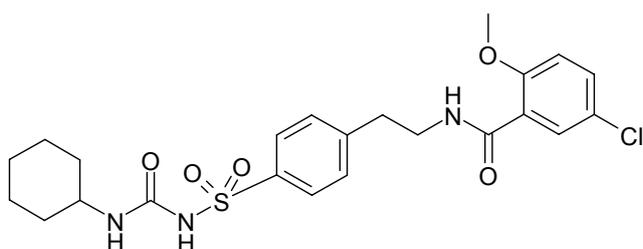
Die Walker A u. B Motive sind gelb markiert. NBD1 wird blau, NBD2 violett und MgATP rot dargestellt (nach Campbell et al., 2003)

1.5 K_{ATP} -Kanal modulierende Wirkstoffe

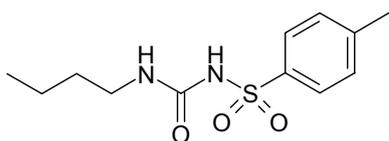
Da K_{ATP} -Kanäle praktisch in allen Zellen vorkommen, spielen sie eine große Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse. Deshalb sind Wirkstoffe interessant, die diese Kanäle entweder blockieren oder aktivieren. Mit diesen Substanzen kann man einen tiefen Einblick in die Funktionsweise der K_{ATP} -Kanäle erhalten.

1.5.1 Kaliumkanalblocker

K_{ATP} -Blocker vermindern die Öffnungswahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals. Eine Blockade des K_{ATP} -Kanals verursacht eine Depolarisation der Zellmembran, die eine Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle bewirkt. Dies ermöglicht in den β -Zellen des Pankreas eine gesteigerte Exozytose von Insulin, bedingt durch den erhöhten Calcium-Einstrom in die Zelle. Als bekannteste Vertreter sind hier Glibenclamid **1** und Tolbutamid **2** zu nennen, wobei Glibenclamid die „Stammsubstanz“ aller Sulfonylharnstoff-Derivate darstellt.



1



2

Abb. 1.5: Kaliumkanalblocker vom Sulfonylharnstoff-Typ

1.5.2 Kaliumkanalaktivatoren (KCO)

Kaliumkanalöffner hingegen bewirken eine Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle, die eine Hyperpolarisation der Zellmembran nach sich zieht. Dadurch sinkt die Erregbarkeit der Zelle.

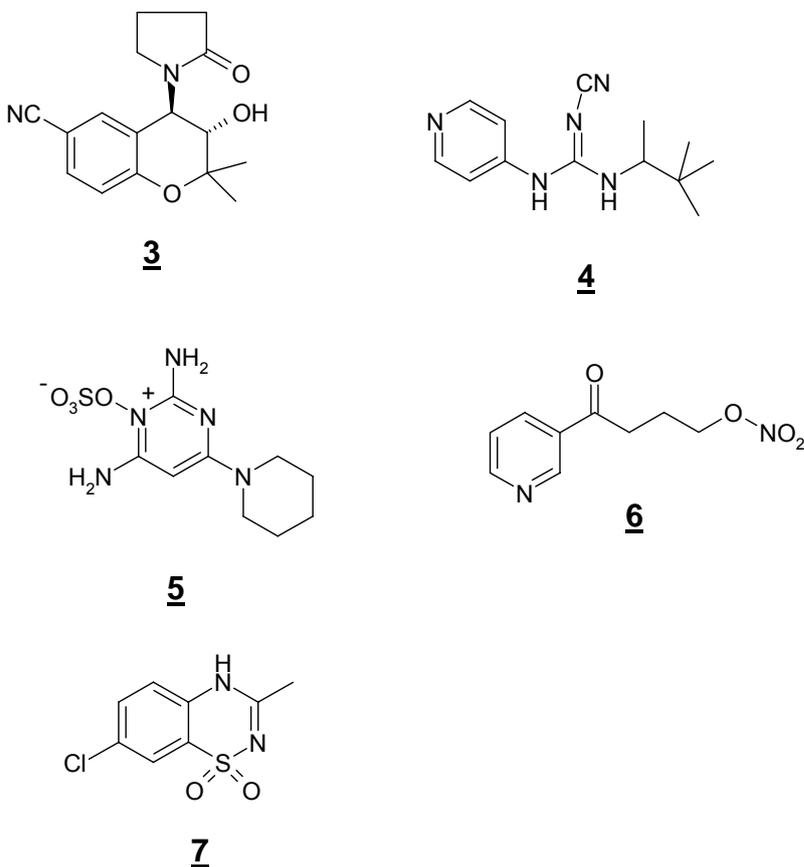


Abb. 1.6: Kaliumkanalöffner verschiedener Substanzklassen: Cromakalim (3), Pinacidil (4), Minoxidilsulfat (5), Nicorandil (6), Diazoxid (7),

Tab. 1.5: Wichtige chemische Strukturklassen der KCO

Chemische Struktur	Substanzvertreter
Benzopyrane	Cromakalim <u>3</u>
Cyanoguanidine	Pinacidil <u>4</u> , P-1075
Pyrimidine	Minoxidil <u>5</u>
Pyridylnitrate	Nicorandil <u>6</u>
Benzothiadiazine	Diazoxid <u>7</u>

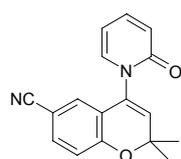
Die für diese Arbeit wichtigen Strukturklassen sollen hier kurz vorgestellt werden.

1.5.2.1 Benzopyran-Reihe

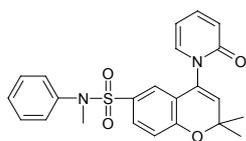
Die Wirkstoffe vom Chromanol-Typ bilden die größte Gruppe. Ihre Geburtsstunde lag im Jahre 1986, als Cromakalim (**3**) als potenter Vasodilatator identifiziert wurde. Eine Affinitätssteigerung konnte durch Einführung eines Pyridonringes an C4 des Benzopyrangrundgerüsts und Dehydratisierung zwischen C3 und C4 erzielt werden. Als Muttersubstanz dieser Chromene gilt das Bimakalim (Bergmann und Gericke, 1993).

Von Bimakalim ausgehend konnten durch Einführung von Sulfonamidsubstituenten an C-6 Substanzen mit ähnlich hoher Affinität zum K_{ATP} -Kanal synthetisiert werden wie Bimakalim. Als besonders wirksam erwiesen sich die Sulfonsäureanilide ES-44 und ES-150 (Salamon et al., 2002). Dabei wird vermutet, dass eine zusätzliche Bindungsstelle innerhalb der Rezeptorregion existiert, die über π -Wechselwirkung mit dem aromatischen Sulfonsäureamid-Substituenten interagieren kann.

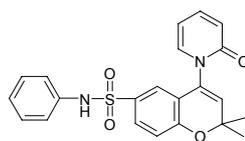
Die Einführung einer Thioamidgruppe in Position 4 des Benzopyrangrundgerüsts führte zur Substanzreihe der Carbothioamide, die zu den wirksamsten Benzopyranen gerechnet werden können ($pEC_{50} = 10.77$, Sato et al., 1993).



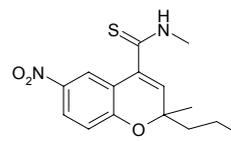
Bimakalim



ES-150



ES-44



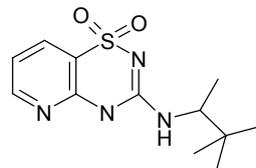
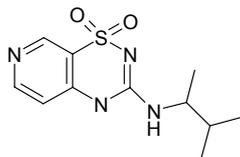
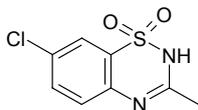
Carbothioamid

2,6-Disubstituierte Benzopyrane vom Cromakalim-Typ wurden als neue K_{ATP} -Kanal-Agonisten vorgestellt. Die Ergebnisse aus den Wirkstoff-Tests zeigen, dass die meisten dieser Vertreter ähnlich gute vasorelaxierende Eigenschaften an der Rattenaorta haben wie das Cromakalim **3**. Einige jedoch üben wie das Diazoxid eine Hemmung auf die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas aus (Sebille et al., 2005)

1.5.2.2 Benzo- und Pyridothiadiazin-Reihe

Muttersubstanz der Thiadiazine ist das Diazoxid. Diazoxid verhält sich als atypischer KCO. Wie oben erwähnt ist die Bindungsstelle für Diazoxid am SUR nicht die gleiche wie die für andere KCO. Diazoxid ist die einzige Verbindung die sowohl an SUR1 und SUR2B mit ähnlicher Affinität bindet (Ashcroft und Gribble, 2000). Somit relaxiert Diazoxid die glatte Muskulatur und hemmt die Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas.

Vom Diazoxid ausgehend, entwickelten Pirotte und Mitarbeiter pankreasselektive und glattnuskulärselektive Substanzen. Die neuen Substanzen stellen Hybride zwischen Diazoxid und Pinacidil dar. Der Austausch des 7-Chlorbenzolrestes durch einen Pyridinring verbesserte die Selektivität zu den β -Zellen des Pankreas und führte zu einer stärkeren Hemmung der Insulinsekretion. Als Prototyp dieser Substanzreihe gilt BPDZ44 (Pirotte et al., 1993). Durch Veränderung der Stickstoffposition im Pyridinring erhält man Substanzen mit umgekehrter Gewebeselektivität. So zeichnet sich BPDZ79 durch eine starke Vasorelaxation bei kaum ausgeprägter Hemmung der Insulinsekretion aus.



Diazoxid

BPDZ44

BPDZ79

Die neusten Vertreter aus der Klasse der Benzothiadiazine (3-Alkylamino-4H-1,2,4,-benzothiadiazin-1,1-dioxid) tragen Strukturveränderungen an Position 7 und 3 des Moleküls. Je nach Substitution zeigen die Substanzen eine starke insulinfreisetzende Hemmung der β -Zellen des Pankreas oder eine vasorelaxierende Wirkung an der Aorta der Ratte (Boverie et al., 2005).

1.6 Bindungsstellen der KCOs am SUR

Viele Untersuchungen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass K_{ATP} -Kanalöffner mit der SUR-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals wechselwirken. Dies konnte vor allem mit Hilfe von radioaktiv markierten KCOs in Bindungsstudien gezeigt werden. Die bislang verfügbaren Radioliganden gehören verschiedenen chemischen Klassen an (Abb. 1.7).

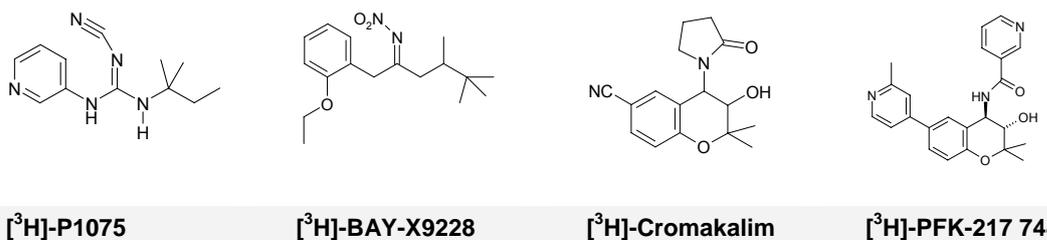


Abb. 1.7: Radioliganden vom KCO-Typ unterschiedlicher chemischer Substanzklassen

Erste Versuche, die spezifische Bindungsstelle für [³H]-Cromakalim am SUR zu finden, schlugen fehl (Howlett et al., 1992). Es war nicht möglich, Daten aus Bindungsversuchen mit den Daten aus funktionellen Experimenten zu korrelieren. Dagegen konnte für das Pinacidil-Analogon [³H]-P1075 (Quast et al., 1993) und für die Nitroverbindung [³H]-Bay-X9228 (Hoffmann et al., 1993) die Bindungsstelle an intakten Zellen und Geweben beschrieben werden. Für Bindungsstudien am K_{ATP} -Kanal konzentrierte man sich auf [³H]-P1075, weil dieser Radioligand eine hohe Bindungsaffinität zum SUR2A und SUR2B, nicht aber zum SUR1 aufweist. So konnte [³H]-P1075 für Verdrängungsversuche eingesetzt werden, um die Bindungsaffinität auch für KCOs anderer chemischer Substanzklassen abzuschätzen.

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Bindungsstelle für KCOs an der SUR-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals lokalisiert ist (Hambrock et al., 1999; Schwanstecher et al., 1998; Uhde et al., 1999). Es wird auch postuliert, dass sogar Kir-Untereinheiten die Bindungsaffinität von KCO zu SUR-Untereinheiten modulieren können (Lemoine et al., 1997).

Die Fähigkeit des Pinacidils mit K_{ATP} -Kanälen vom SUR2-Typ nicht aber vom SUR1-Typ zu interagieren, wurde ausgenutzt, um die Bindungsregion der KCO an den SUR-Untereinheiten einzugrenzen. Die transmembranären Segmente **TM 16-17** und Teile der zytosolischen Schleifen, die zwischen **TM 13 und 14** gefunden wurden, sind die Regionen am SUR, die an der Transduktion beteiligt sind, um die Kir6.2-Pore zu öffnen.

Dass TM 17 eine wichtige Rolle in der Bindung von KCO an den SUR spielt, konnte durch Bildung chimärer K_{ATP} -Kanäle aus SUR1 und SUR2 mithilfe des Benzopyrans SR47063 gezeigt werden (Moreau et al., 2000). Die Mutation zweier Aminosäuren (Thr-1253 und Leu-1249) innerhalb von TM17 am SUR2A verringerte die Wirksamkeit von SR47063, konnte aber zuletzt nicht die Aktivität der Substanz komplett hemmen.

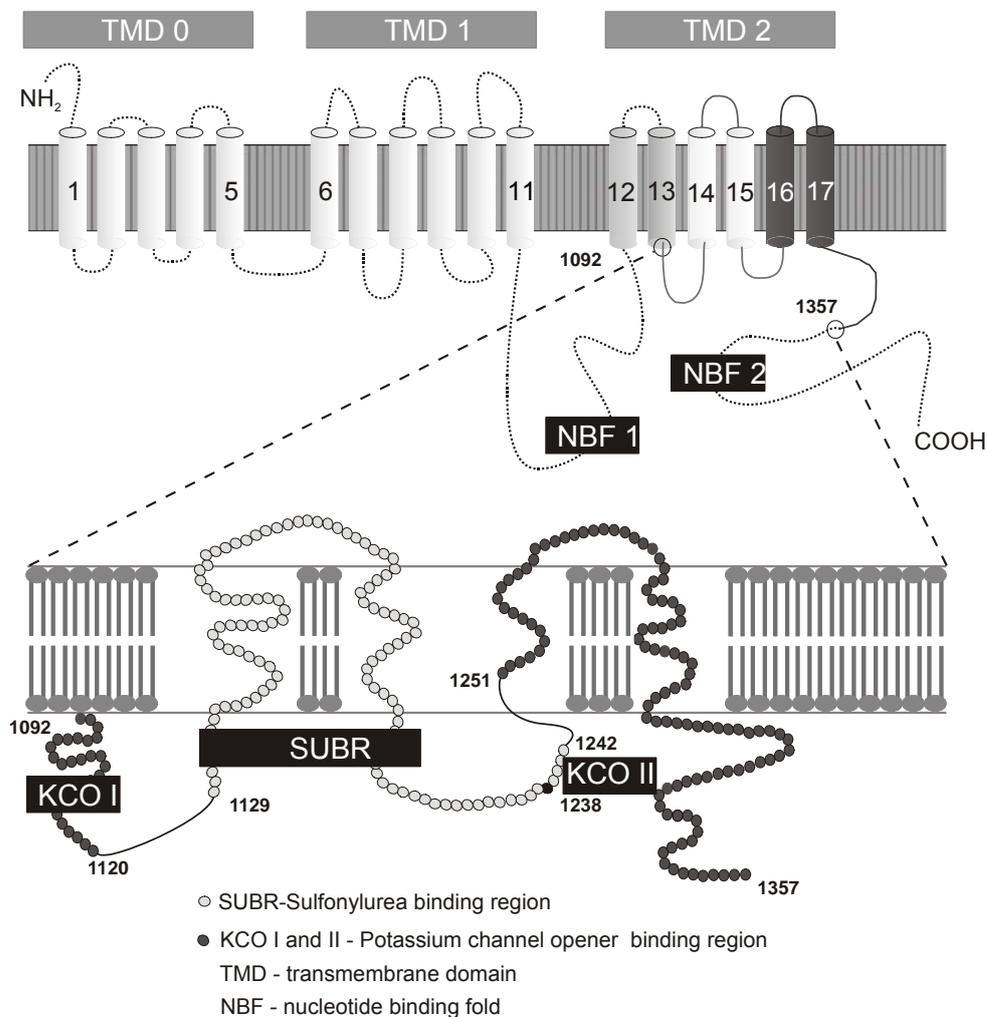


Abb. 1.8: Topologie der SUR-Untereinheit und Lokalisation der Bindungsstellen für Kaliumkanalöffner (Uhde et al., 1999)

Zwei Regionen im TMD2 des SUR sind essentiell für die KCO-Bindung. KCO I (Tyr-1059 bis Leu-1087) und KCO II (Arg-1218 bis Asn-1320), dargestellt durch schwarze Kreise. Die Sulfonylharnstoff-Bindungsstelle (SUBR) wird in der Region Ile-1088 bis Val-1217 vermutet, dargestellt als graue Kreise.

Durch Austausch der Aminosäuren Threonin und Methionin des SUR1 an den Positionen 1285 und 1289 durch die entsprechenden Aminosäuren des SUR2 konnte die Bindung des K_{ATP} -Kanal-Antagonisten Glibenclamid an die SUR1-Untereinheit nicht wesentlich beeinflusst werden. Dagegen stieg die Bindungsaffinität für Pinacidil und

P1075 zum SUR1(T1285L, M1289T) gegenüber der SUR1-Untereinheit vom Wildtyp an. Die Bindungsaffinität von Diazoxid in diesem Experiment blieb unverändert (Hambrock et al., 2004). Diese Befunde belegen ebenfalls, dass die Region des TM 17 essentiell für die Bindung von K_{ATP} -Kanal-Agonisten am SUR2 ist.

Die Bindungsstelle des Diazoxids ist noch nicht gefunden worden. Diazoxid aktiviert sowohl Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2B in Anwesenheit von MgATP und bindet an Kir6.2/SUR2A in Anwesenheit von MgADP ohne am zuletzt genannten Kanal eine wesentliche Reaktion auszulösen. Die transmembranären Bereiche TM 6-11 und NBF1 sind wahrscheinlich für die Bindung des Diazoxids wichtig, da die Sensitivität zu Diazoxid am SUR2A in Gegenwart von MgATP (Schwanstecher et al., 1998) übertragen werden konnte, durch die Transferierung oben genannter Domänen von SUR1 auf SUR2A (Babenko et al., 2000).

Der Bindungsbereich für die Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid **1** liegt in der Nähe der cytosolischen Schleifen TM 12-17 von SUR1. Folglich liegt die Bindungstasche für die Sulfonylharnstoffe in unmittelbarer Nähe zu der Bindungsstelle der KCOs (Tanabe et al., 1999) (s. Abb. 1.8).

1.7 Kardioprotektive Wirkung von Kaliumkanalöffnern

Kaliumkanalöffner haben nicht nur einen vasodilatierenden Effekt. In den letzten Jahren ist beobachtet worden, dass einige der Substanzen in der Lage sind, das Myokard zu schützen (Kardioprotektion). Dies ermöglicht eine neue Therapierichtung gegen Herzinfarkt und andere Herzkrankheiten, die Haupttodesursachen in Europa sind.

So spielen wohl sarkolemmale und mitochondriale K_{ATP} -Kanäle des Herzens eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Kardioprotektion.

1.7.1 Mitochondriale K_{ATP} -Kanäle

Mitochondrien sind wichtig für den Energiestoffwechsel einer Zelle. Es gilt als erwiesen, dass Mitochondrien an so komplexen Prozessen beteiligt sind wie Apoptose und Kardioprotektion (O'Rourke et al., 2000). Man vermutet, dass die Kardioprotektion mit dem Angriff von Kaliumkanalöffnern auf den mitochondrialen K_{ATP} -Kanal zusammenhängt (Grover et al., 2002).

Leider hat man bis heute keine klare Vorstellung vom Aufbau des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals (mito K_{ATP}). Grover et al. (2000) konnten zwei verschiedene Proteine identifizieren: ein Kanalprotein und ein Regulatorprotein (SUR). Daraus kann man schließen, dass die mito K_{ATP} -Kanäle ähnlich komplex aufgebaut sind wie die sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle.

1.7.2 Ischemic Preconditioning IPC

IPC ist ein endogener Schutzmechanismus des Herzens. Wird das Herz für kurze Zeit einer Ischämie oder Hypoxie ausgesetzt, so wird nach anschließender Perfusion des Gewebes, durch ICP ein kardioprotektiver Effekt hervorgerufen (Murray et al., 1990). Bei einem anschließenden Herzinfarkt kann so das Ausmaß der Gewebsschädigung bis zu 75% gesenkt werden. Eine große Anzahl an Mediatoren und Signalstoffen werden für dieses Phänomen verantwortlich gemacht. Die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle wird als Hauptgrund für den schützenden Effekt angesehen.

So konnten Kaliumkanalöffner diesen endogenen Schutzmechanismus nachahmen, während Kaliumkanalblocker wie Glibenclamid, diesen Schutzeffekt unterdrückten (Gross et al., 1992)

Am Herzen konnten bislang zwei Arten von K_{ATP} -Kanälen identifiziert werden (Grover 1997): der sarkolemmale K_{ATP} -Kanal (sarco K_{ATP}) und der mitochondriale K_{ATP} -Kanal (mito- K_{ATP}) (Gross et al., 1999). Welcher Kanal-Typ für die IPC verantwortlich ist,

bleibt noch unklar. Vermutlich spielen beide eine Rolle zur Ausbildung des Schutzeffekts am Herzen (Suzuki et al., 2002; Tanno et al., 2001).

Kürzlich wurden Befunde aus Kir2/Kir6.1 „knockout“-Maus-Modellen (Seino und Miki, 2003; Seino und Miki, 2004, Minami et al., 2004) publiziert, die die Rolle der aus SUR1/Kir6.2-Untereinheiten komponierten K_{ATP} -Kanäle in der β -Zelle des Pankreas und im Hypothalamus für die Glucose-induzierte Insulinsekretion als entscheidend bestätigt wurde, während SUR2/Kir6.2-Kanäle bei der Glucoseaufnahme in die Muskulatur eine Rolle spielen. Im kardiovaskulären System besitzen Kir6.1-Kanäle eine Hauptbedeutung bei der Regulation des vaskulären Tonus (SUR2B/Kir6.1).

So ist die Kir6.1 „Knockout“-Maus ein Modell für die Prinzmetal-Angina. Interessanterweise bestätigten Kir6.2 „knockout“-Maus-Modelle, die keine funktionierenden sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle ($sarck_{ATP}$) besitzen, dass diese (SUR2A/Kir6.2-Proteineinheiten) essentiell für die Kardioprotektion sind. Ohne den funktionierenden $sarck_{ATP}$ konnte keine Reduktion der Infarktgröße am Herzen beobachtet werden (Nakaya et al., 2003).

1.7.3 Kardioselektive K_{ATP} -Kanal-Modulatoren

Die kardioprotektive Wirkung von Cromakalim **3** konnte in vitro und in vivo gezeigt werden (Grover et al., 1989). Allerdings kann die Substanz, durch ihre starke vasodilatierende Eigenschaft, nur begrenzt therapeutisch eingesetzt werden. Strukturveränderungen des Cromakalims führten zum ersten Wirkstoff mit einer kardioselektiven Eigenschaft, dem (3S,4R)-BMS-180448 **8**. (3S,4R)-BMS-180448 hat wie das Cromakalim ein Benzopyrangrundgerüst. In Position 4 ist, dem Pinacidil ähnlich, ein Cyanoguanidinrest eingefügt worden. Weitere Strukturveränderungen an C-4 ergaben (3R,4S)-BMS-191095 **9**. Interessanterweise besitzen (3R,4S)-BMS-191095 und (3S,4R)-BMS-180448 eine umgekehrte Konfiguration an den beiden Asymmetriezentren.

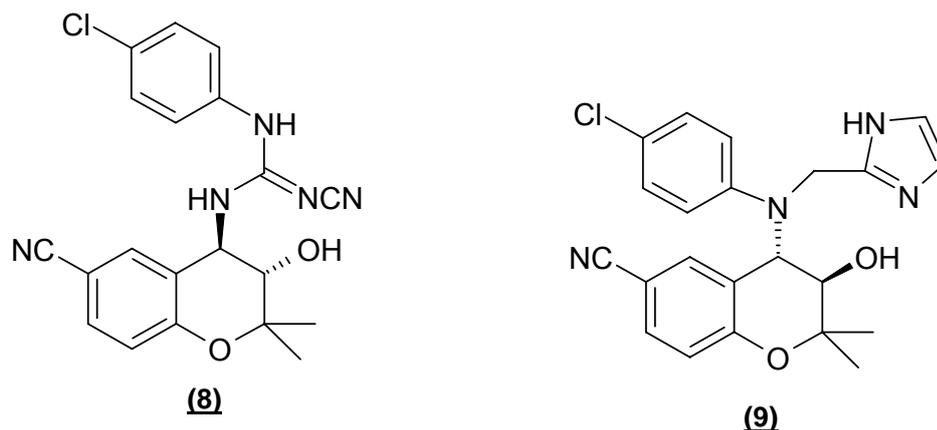


Abb. 1.9: Die ersten kardioselektiven Kaliumkanalöffner (3S,4R)-BMS-180448 **8** und (3R,4S)-BMS-191095 **9**

(3S,4R)-BMS-180448 soll *in vitro* eine 200-fach höhere kardioselektive Wirkung als Cromakalim aufweisen. (3R,4S)-BMS-191095 soll darüber hinaus deutlich wirksamer sein als (3S,4R)-BMS-180448 (Tab. 1.6).

Zur Bestimmung der Vasorelaxation, wurden vorkontrahierte Aorten der Ratte benutzt. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte kumulativ. Diese *in vitro* Versuche wurden durch *in vivo* Versuche an Hunden untermauert.

Die kardioprotektive Wirkung der Verbindungen wurde am isolierten Herzen der Ratte bestimmt. Gemessen wurde die Zeit (min), die nötig war, um das Herz bei globaler Ischämie zur Kontraktion (Anstieg des diastolischen Herzinnendrucks um 5 mm Hg) zu bringen.

Tab. 1.6: Vasorelaxierende und kardioprotektive Eigenschaft von Cromakalim, BMS-180448 und BMS-191095

Wirkstoff	antiischämische Wirkung $EC_{25}(\mu M)^1$	vasorelaxierende Wirkung $IC_{50}(\mu M)^2$	Ratio EC_{25}/IC_{50}
Cromakalim	8.9	0.032	278
(3S,4R)-BMS-180448	2.5	1.8	1.4
(3R,4S)-BMS-191095	1.4	>30	<0.05

1 die EC_{25} wird aus der Zunahme der Zeit ermittelt, die nötig ist, um das Herz bei globaler Ischämie zu kontrahieren

2 die IC_{50} bezeichnet die Dosis, die den halbmaximalen Relaxationseffekt ergibt

Auffällig ist, dass die kardioselektive Wirkung von BMS-191095 nicht auf eine wesentliche Verbesserung der kardioprotektiven Wirkung zurückzuführen ist, sondern vor allem auf eine Abnahme der vasorelaxierenden Eigenschaft.

1.8 Pharmakodynamische Effekte der KCO in verschiedenen Geweben

Die wichtigsten Effekte, die von Kaliumkanalöffner ausgehen, und die in diese Arbeit eine Rolle spielen, werden nochmals kurz zusammengefasst.

1.8.1 Wirkung der KCOs auf das Herz

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass einige KCOs einen günstigen protektiven Effekt auf das Herz ausüben (Atwal et al., 1996). So konnten Grover et al. (1989) zeigen, dass die KCOs der ersten Generation wie Pinacidil und Cromakalim einen antiischämischen Einfluss auf das Herz ausüben. Der genaue Mechanismus dieser protektiven Wirkung ist bis heute umstritten. So sind KCOs in der Lage, ein „Preconditioning“ zu imitieren, ohne dass vorher eine Ischämie aufgetreten ist. K_{ATP} -Blocker wie Glibenclamid **1** (Gross et al., 1992), und 5-OH-Decanoat (Auchampach et al., 1991) können diese Wirkung abschwächen. KCOs wie P-1075 oder BMS-191095 entfalten einen akuten Schutz, der bis zu 24 Stunden anhalten kann (verzögerter Herzschutz). Man ging davon aus, dass ausschließlich sarkolemme K_{ATP} -Kanäle am Schutzmechanismus beteiligt waren. Gross et al., (Gross et al., 2003) konnten folgenden Zusammenhang in einem Versuch herstellen. P-1075, BMS-191095, sowie Diazoxid induzierten einen verzögerten Herzschutz. Dabei benötigten P-1075 und Diazoxid ebenfalls die $sarck_{ATP}$ -Kanäle als Trigger, BMS-191095 dagegen nicht.

1.8.2 Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäße

Das Interesse an KCOs als Anihypertensiva wurde dadurch geweckt, dass Cromakalim und Pinacidil in der Lage waren, glatte Muskelzellpräparate durch die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle zu relaxieren (Escande et al., 1988; Sanguinetti et al., 1988; Standen et al., 1989). Durch Hyperpolarisation der Zellmembran vermindern sie die Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Zudem sollen sie die Sensitivität der kontraktilen Elemente für Calcium senken (Okada et al., 1993), sowie die Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern vermindern (Ito et al., 1991; Itoh et al., 1992). Diese Effekte sind über den PIP_2 -Stoffwechsel miteinander verbunden, weshalb PIP_2 als endogener Modulator des K_{ATP} -Kanals angesehen wird (Shyng et al., 1998; Baukrowitz et al., 1998).

Eine große Zahl strukturverschiedener KCOs einschließlich der Benzopyrane und Cyanoguanidine wurden in den letzten Jahren als potentielle Antihypertensiva angesehen. Allerdings haben es nur Diazoxid, Nicorandil und Pinacidil es bis zur Marktreife geschafft. Der größte Anteil der KCOs zeigte keinen Vorteil gegenüber

anderen Wirkstoffgruppen, die bei Hypertonie eingesetzt werden können, wie z. B. Calciumantagonisten.

Deshalb waren weitere Untersuchungen notwendig, um das Prinzip der kardioprotektiven Wirkung von Kaliumkanalöffnern besser zu verstehen.

2 THEMA DER ARBEIT

Wie einleitend ausführlich dargestellt, ist die kardioselektive, bzw. kardioprotektive Wirkung von Substanzen für eine Pharmakotherapie der koronaren Herzerkrankungen und des Herzinfarkts von grundsätzlicher Bedeutung. Das große Problem bei der Entwicklung geeigneter Wirkstoffe aus der Reihe der K_{ATP} -Kanalöffner vom Typ der Benzopyrane war die gleichzeitig auftretende Gefäßrelaxation und der damit verbundene Blutdruckabfall, so dass solche Verbindungen eine klinische Prüfung nicht bestehen konnten.

Aus diesem Grunde wurden später Cyanoguanidino-Chromanole (Typ BMS-180448, 1. Generation) und Chloranilino-Chromanole (Typ BMS-191095, 2. Generation) entwickelt, die sich durch geringere Gefäßwirkung und eine hervortretende Herzwirkung auszeichnen sollten. Über die verschiedenen molekularen Mechanismen dieser Selektivität wurden von den Erstautoren verschiedene Hypothesen angeboten, ohne dass diese endgültig geklärt werden konnten.

Da die Kardioselektivität bisher ausschließlich in sehr aufwändigen Tierexperimenten bestimmt werden konnte, sollte versucht werden, mit molekularpharmakologischen und –physiologischen Methoden ebenfalls Aussagen zur Wirkung und Selektivität dieser neuen Substanzreihe zu machen und die Mechanismen, die an beiden beschriebenen Effekten beteiligt sind, besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob sich die Wirkung der als kardioselektiv beschriebenen Substanzen auch in diesen rezeptornahen bzw. zellbasierten experimentellen Modellen nachweisen lassen. Dazu geeignet erschien die Durchführung von Radioligandbindungsstudien an isolierten Herzzellen und kultivierten Gefäßmuskelzellen der Aorta, sowie - zur Unterscheidung von Agonismus und Antagonismus - die Durchführung von Relaxationsexperimenten an isolierten Aortenringen und Trachealmuskelstreifen der Ratte. Die ermittelten Daten sollten mit den Literaturbefunden verglichen werden, um dort postulierte Kardioselektivität kritisch zu hinterfragen und zu werten.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Synthese und analytische Charakterisierung von BMS-191095 und analogen 4-Chloranilinochromanolen mit veränderten Substituenten und potentiell höherer Affinität und Selektivität
- Enantiospezifische Darstellung der optischen Antipoden zur Ermittlung der enantiomerischen Affinitätsquotienten

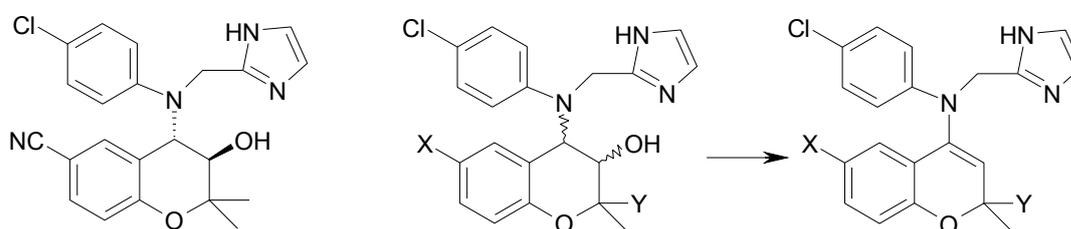
- Synthese und analytische Charakterisierung von acylischen Phenolettern vom Pyridon- und Carbothioamidtyp als Strukturabwandlung der cyclischen Benzopyrane
- Bestimmung von Affinitäten der Wirkstoffe für K_{ATP} -Kanäle von Herz- und Aortenzellen im Radioligandbindungstest
- Messung der durch diese neuen Verbindungen induzierten Relaxation der glatten Muskulatur von Aorta und Trachea der Ratte zur Aufklärung möglicher Selektivitäten
- Abgrenzung der K_{ATP} -Kanal-vermittelten Relaxation der dargestellten Substanzklasse von anderen Relaxationsmechanismen
- Kritische Diskussion der in der Literatur vertretenen Hypothese zur Kardioprotektion auf Basis der gemessenen Rezeptorselektivität

3 CHEMISCH-ALLGEMEINER TEIL

3.1 Synthesestrategie

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, zeigte die Substanz (3R,4S)-BMS-191095 (**9**) eine gute kardioprotektive Wirkung, die mit einer hohen Selektivität verbunden ist. Ziel der Arbeit war es, Veränderungen am Molekül vorzunehmen, um eine gesteigerte Wirksamkeit bei möglichst hoher Selektivität zu erzielen.

Da der Aminrest in Position 4 von **9** für die Selektivität verantwortlich ist, sollte diese Position unverändert bleiben. Veränderungen sollten in Position 2 und 6 vorgenommen werden, sowie nach Möglichkeit die Beseitigung der Chiralitätszentren in Positionen 3 und 4 durch Dehydratisierung der entsprechenden Chromanole.



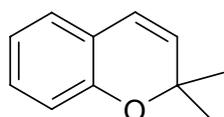
(3R,4S)-BMS-191095 **9**

Da die nachträgliche Einführung der Substituenten X und Y am fertigen Benzopyran-Grundgerüst problematisch war, mussten die geeigneten Synthesestufen in frühem Stadium der Synthese zum größten Teil nach Literaturvorschriften hergestellt werden.

3.2 Darstellung der Ausgangsverbindungen

3.2.1 Aufbau des 2,2-Dimethyl-2[*H*]-benzopyrans

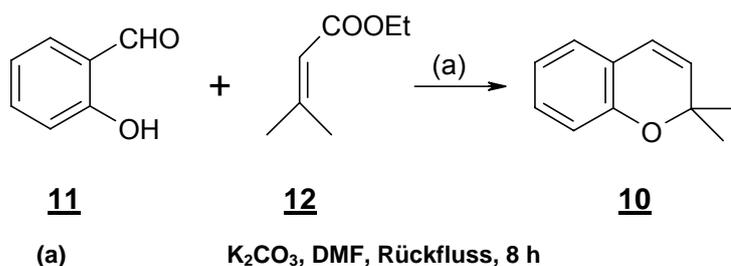
In diesem Abschnitt sollen die drei wichtigsten Methoden zum Aufbau des Benzopyrangrundgerüsts exemplarisch am Beispiel des 2,2-Dimethyl-2[*H*]-benzopyrans **10** aufgeführt werden. Modifikationen an Position 2 und Position 6 des Benzopyrangrundgerüsts ergeben sich durch die Verwendung der entsprechenden modifizierten Edukte.



10

Methode A (Kawase)

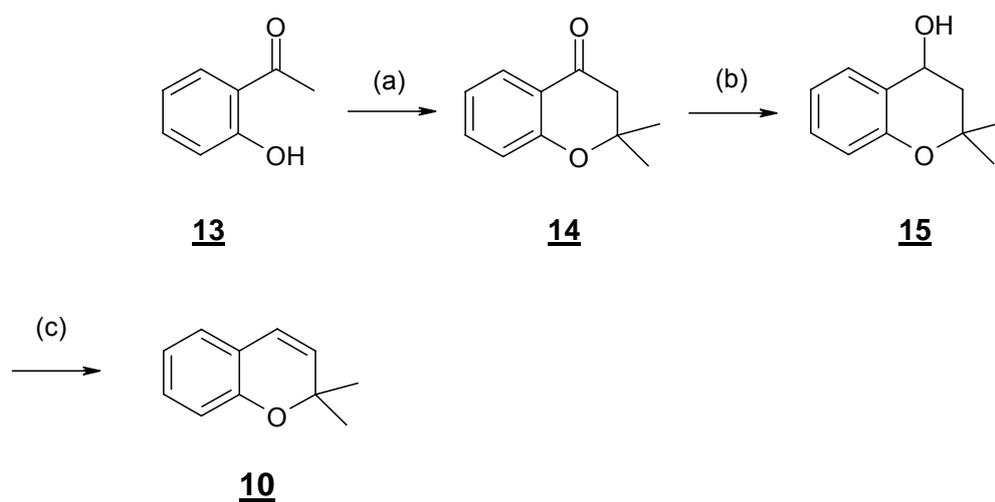
Das Verfahren nach Kawase et al. (1982) stellt eine Einstufensynthese dar, bei der Salicylaldehyd **11** mit 3,3-Dimethylacrylsäureester **12** zum Chromen **10** cyclisiert wurde. Da jedoch elektronenziehende Substituenten in *para*-Stellung des Phenols diese Umsetzung verhindern, musste dieser Syntheseweg ausgeschlossen werden, weil die gewünschten Chromene (6-Nitro, 6-Cyano, etc.) so nicht dargestellt werden können.



Schema 1: Chromensynthese nach Kawase

Methode B (Kabbe et al., 1978):

Kabbe et al. erhielten durch Erhitzen von 2-Hydroxyacetophenon **13** mit Aceton unter Zusatz von Pyrrolidin in Toluol das 4-Chromanon **14**. Dieses wurde mit Natriumborhydrid zum 4-Chromanol **15** in Methanol reduziert. Die anschließende Wasserabspaltung mit p-Toluolsulfonsäure lieferte das gewünschte Produkt **10**.



(a) Keton, Pyrrolidin, Toluol

(b) Na₂BH₄, Methanol

(c) p-Toluolsulfonsäure, Toluol

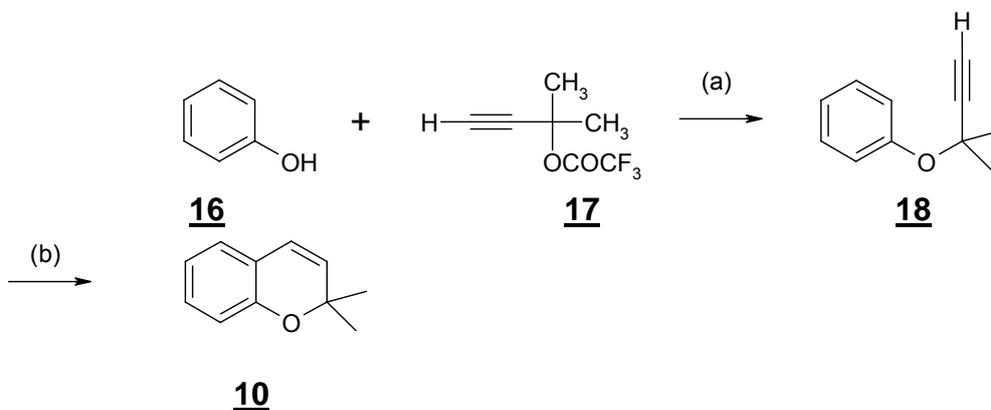
Schema 2: Chromensynthese nach Kabbe (Acetophenon-Weg)

Tab. 3.1: Substanzen, die nach dem Acetophenonweg synthetisiert wurden

Acetophenon	Keton	Produkt	
2-Hydroxy-5-nitroacetophenon	Aceton		20
2-Hydroxy-5-nitroacetophenon	2-Pentanon		22

Methode C (Godfrey et al., 1994):

Godfrey et al. versetzten Phenol **16** mit Trifluoressigsäure-3-methylbutin-3-yl-ester **17** in Acetonitril und erhielten den entsprechenden Propargylether **18**. Anschließendes Erhitzen des Propargylethers führte zur Cyclisierung und somit zum entsprechenden Chromen **10** (Schema 3).

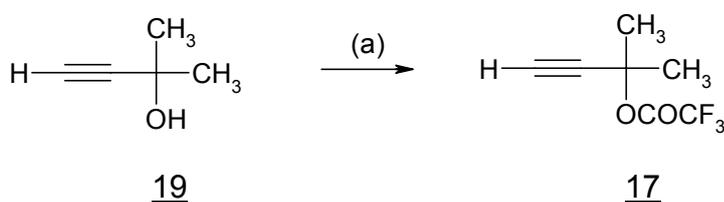


(a) DBU, Cu(II)-chlorid, Acetonitril

(b) (in o-Dichlorbenzol oder Diethylanilin)

Schema 3: Chromensynthese nach Godfrey (Butin-Weg)

Die hier gezeigte Darstellung des Propargylethers war eine Verbesserung der Methode nach Evans et al. (1983). Evans benutzte anstelle des Butinesters **17** das 3-Chlor-3-methylbutin, welches im Labor durch seine hohe Flüchtigkeit schlecht zugänglich war. Die Synthese des Trifluoressigsäurebutinesters **17** dagegen erwies sich als sehr leicht. 2-Methyl-3-butin-2-ol **19** wurde mit Trifluoressigsäureanhydrid und DBU in Acetonitril verestert (Schema 4). Ohne weitere Aufreinigung war die Umsetzung mit dem Phenol zum Propargylether möglich.

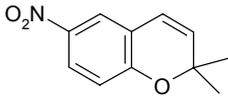
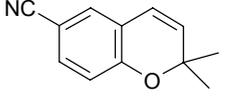
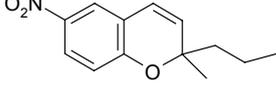
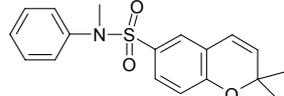


(a) Trifluoressigsäureanhydrid, DBU, Acetonitril

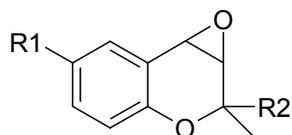
Schema 4

Das für die weiteren Syntheseschritte jeweils benötigte Benzopyrangrundgerüst wurde im Rahmen dieser Arbeit überwiegend nach Methode C synthetisiert. Diese Variante war *in puncto* Ausbeute der Methode B deutlich überlegen. Zudem bedurfte es weniger Syntheseschritte, um das Benzopyrangrundgerüst zu erhalten. Hinzu kommt, dass die Edukte im Allgemeinen in großen Mengen zur Verfügung standen, da diese käuflich zu erwerben waren.

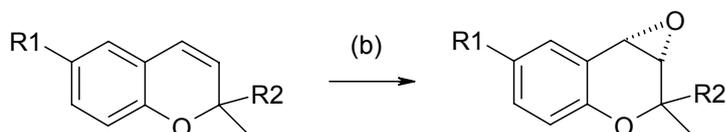
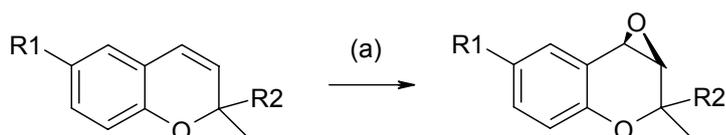
Tab. 3.2: Synthetisierte 2H-Benzopyrane

Phenol	Alkohol	Produkt	
p-Nitrophenol	3-Methyl-1-butin-3-ol		<u>20</u>
p-Hydroxybenzonnitril	3-Methyl-1-butin-3-ol		<u>21</u>
p-Nitrophenol	3-Methyl-1-hexin-3-ol		<u>22</u>
4-Hydroxy-N-methyl-N-phenyl-benzensulfonamid <u>45</u>	3-Methyl-1-butin-3-ol		<u>23</u>

3.2.2 Synthese der 3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2,2-dialkyl-2H-1-benzopyrane



Es ist bekannt, dass (3R,4S)-BMS-191095 **9** und das entsprechende Enantiomer unterschiedliche biologische Eigenschaften zeigen. Eutomer und Distomer zeigen einen enantiomeren Quotienten, der dieses Substanzpaar charakterisiert. Weil sich die Konfiguration des Amins **9** aus der Konfiguration des eingesetzten Epoxids ergab, war es notwendig, eine Methode zur enantiospezifischen Epoxidsynthese zu finden. Die chiralen Epoxide sollten möglichst enantiomerenrein und in guten Ausbeuten darstellbar sein. Die Umsetzung des Benzopyrangrundgerüsts mit Wasserstoffperoxid unter Einsatz eines Jacobsenkatalysators lieferte die gewünschten Oxirane in analysenreiner Form (Schema 5). Die so gebildeten 6-substituierten Epoxide erwiesen sich als sehr stabil und konnten gut isoliert werden.

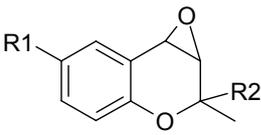
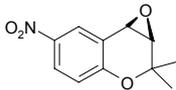
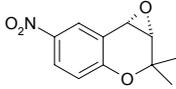
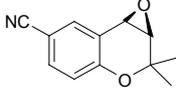
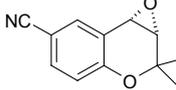
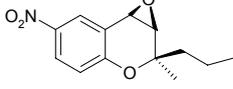
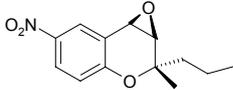
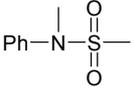
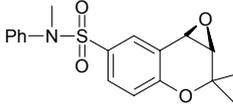


(a) **30**, H₂O₂, Imidazol, Methanol/Dichlormethan 3:1

(b) **31**, H₂O₂, Imidazol, Methanol/Dichlormethan 3:1

Schema 5 (Sun et al., 1997)

Tab. 3.3: Synthetisierte Epoxide als Vorstufe der 4-Chloranilinochromanole

						
R1	R2	Phenol	Alkohol	Katalysator	Produkt	
-NO ₂	-CH ₃	p-Nitrophenol	3-Methyl-1-butin-3-ol	(R,R)		<u>24</u>
-NO ₂	-CH ₃	p-Nitrophenol	3-Methyl-1-butin-3-ol	(S,S)		<u>25</u>
-CN	-CH ₃	p-Hydroxybenzonnitril	3-Methyl-1-butin-3-ol	(R,R)		<u>26</u>
-CN	-CH ₃	p-Hydroxybenzonnitril	3-Methyl-1-butin-3-ol	(S,S)		<u>27</u>
-NO ₂	C ₃ H ₇	p-Nitrophenol	3-Methyl-1-hexin-3-ol	(R,R)		<u>28</u>
						<u>28a</u>
	-CH ₃	p-Hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzensulfonamid	3-Methyl-1-butin-3-ol	(R,R)		<u>29</u>

Als Katalysator wurden das (R,R)-(-)-N,N'-Bis(3,5-di-*tert*-butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid **30** und das (S,S)-(+)-N,N'-Bis(3,5-di-*tert*-butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid **31** verwendet.

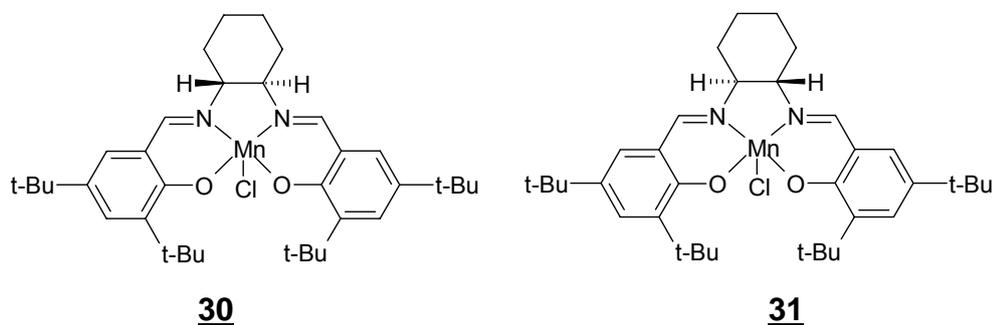


Abb. 3.1: Strukturformel der Jacobsenkatalysatoren **30 und **31****

In der Literatur (Sun et al., 1997) wurde bereits die hohe Enantioselektivität bei der Epoxidierung von 2,2-Dimethylchromen beschrieben. Der Reaktionsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgedeckt, aber man geht von folgender Sequenz aus:

Als Intermediat tritt ein hochreaktiver Mn(V)-oxo-salenkomplex als für die Epoxidierung verantwortliche Spezies auf (Srinivasan, K., 1986). Das Alken nähert sich über einen Seitenangriff dem Sauerstoffatom. Dabei bildet es ein Radikalintermediat, das zum Epoxid weiterreagiert. Durch den raumerfüllenden Salicylidensubstituenten ist eine Annäherung des Alkens an der 3,3' und 5,5'-Position des Katalysators stark erschwert. Einen guten Zugang zum Sauerstoffatom findet das Olefin in Nachbarschaft der Diiminbrücke (Jacobsen, E.N., 1991).

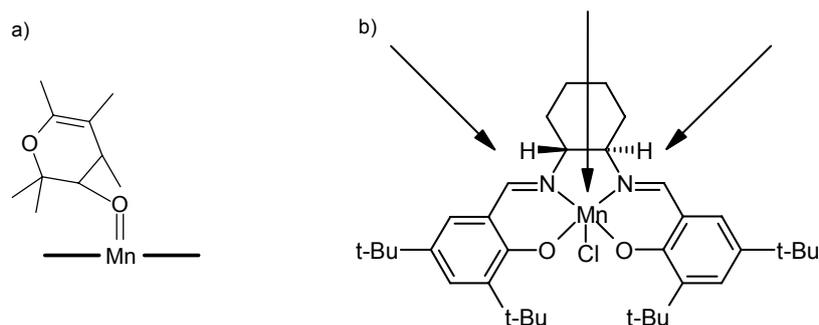


Abb. 3.2: Darstellung des Seitenangriffs eines Alkens an das Salen-Mn-oxointermediat

- (a) Seitenansicht: Das Sauerstoffatom ragt aus der Molekülebene hinaus.
 (b) Draufsicht: Der Oxoligand ragt aus der Molekülebene. Die Angriffsmöglichkeiten des Alkens werden durch die Pfeile symbolisiert.

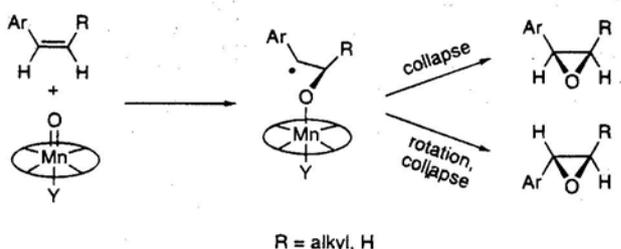
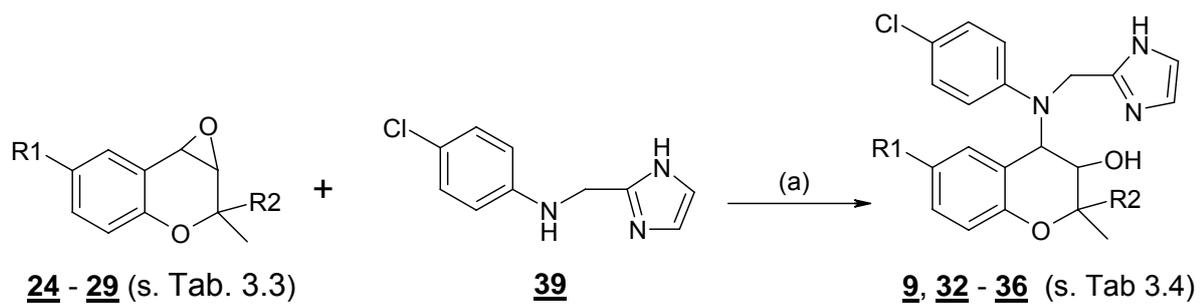


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus

Das Alken nähert sich durch einen Seitenangriff dem Sauerstoffatom des reaktiven Mn(V)-oxosalenkomplexes unter Bildung eines Radikalintermediates, das zum Epoxid reagiert,

3.2.3 Synthese der 4-Chloranilinobenzopyrane

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die von der Gruppe um Atwal beschriebene Methode (Rovnyak et al., 1997). Das Epoxid wurde mit dem Amin **39** und wasserfreiem Cobaltchlorid in Acetonitril gelöst. Die Menge an Lösungsmittel war entscheidend für die Höhe der Ausbeute des Produktes. Eine zu große Menge an LM verringerte die Ausbeute erheblich. Andere Cobaltsalze kamen nicht zum Einsatz, weil diese nicht in Acetonitril löslich waren. Die Substanzen wurden in äquimolaren Mengen zusammen gegeben. Dem Ansatz wurde Argon als Schutzgas zugeführt und dieser 16 h bei 60°C gerührt.



Schema 6

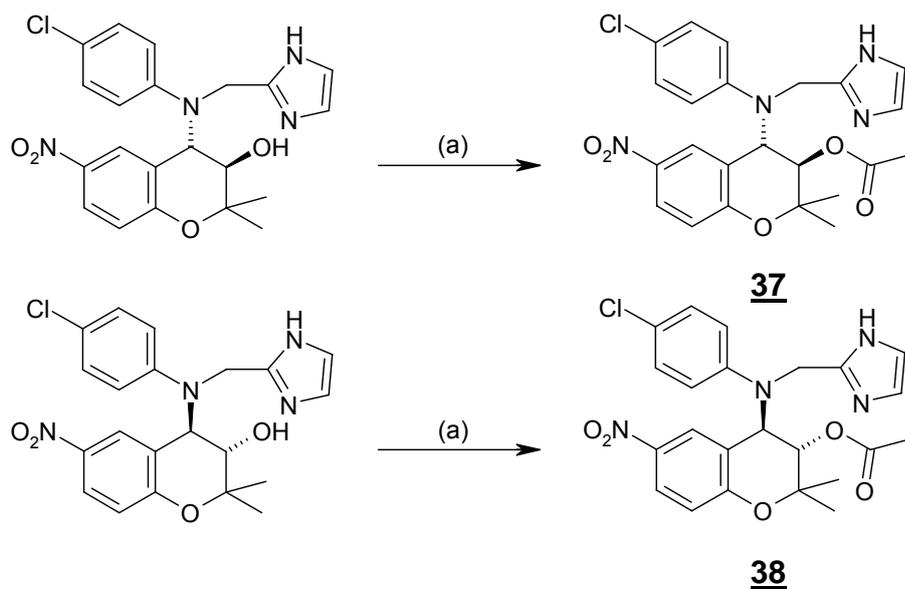
(a) Cobalt(III)-chlorid, Acetonitril

Tab. 3.4: Synthese der 4-Chloranilinochromanole

Edukt	Produkt	
	(3R,4S)-JS09	32
	(3S,4R)-JS09	33
	(3R,4S)-BMS-191095	9
	(3S,4R)-BMS-191095	34
	(3R,4S)-JS16	35
	(3R,4S)-JS33	36

3.2.3.1 Synthese der Acetate von 32 und 33

Die Veresterung der Hydroxy-Gruppe an C-3 gelang mit Acetylchlorid. Dabei wurde das entsprechende Amin mit Triethylamin in Chloroform gelöst und vorsichtig Acetylchlorid zugegeben. Nach einer halben Stunde war das Edukt quantitativ umgesetzt. Die Lösung wurde auf Eis gegossen und mit Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde mehrfach mit weinsaurer wässriger Lösung gewaschen. Diese Produkte erhielt man durch Ausfällen mit Petrolether 60/80.

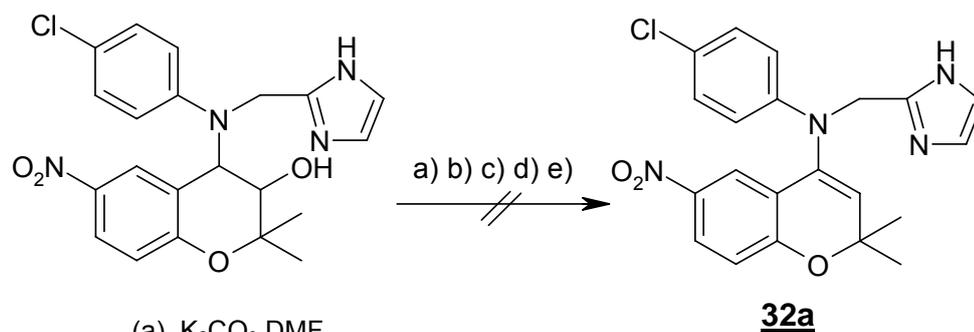


(a) Acetylchlorid, Triethylamin, Chloroform

Schema 7: Synthese der Acetate 37 und 38

3.2.4 Versuche zur Synthese von **32a**

Im weiteren Verlauf der Syntheseriehe sollte durch Dehydratisierung von **32** oder **33** die Verbindung **32a** hervorgehen, welches keine Chiralität mehr aufweist. Der Aminrest in 4-Position würde somit senkrecht über dem Ringsystem stehen, was neue Aspekte geben sollte. Doch jegliche Versuche das gewünschte Produkt zu erhalten, schlugen fehl.



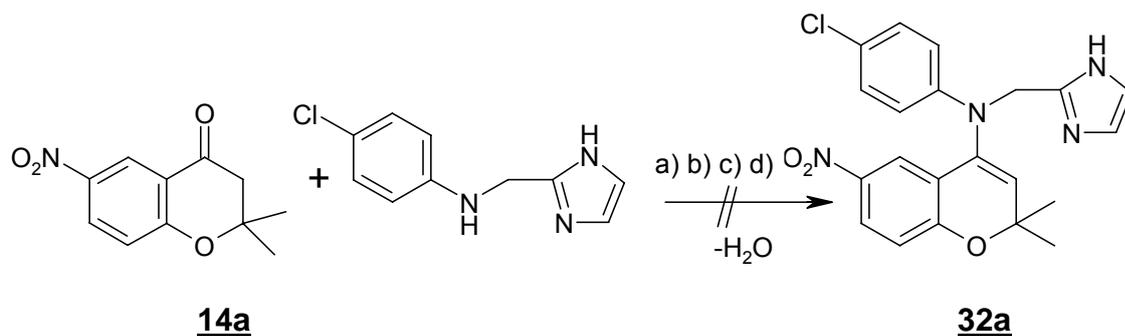
- (a) K_2CO_3 , DMF
- (b) K_2CO_3 , Toluol abs.
- (c) NaOH (Asbest), Dioxan
- (d) NaH, Toluol abs.
- (e) p-Toluolsulfonsäure, Toluol abs.

Schema 8

Als erstes wurde versucht, über die Wasserabspaltung zum gewünschten Produkt zu gelangen. Zur Dehydratisierung wurde sowohl die saure als auch die basische Katalyse gewählt. Die Umsetzung mit p-Toluolsulfonsäure in Toluol schlug genauso fehl wie die Umsetzung mit NaOH auf Asbest in Dioxan. Auch der Versuch, über Veränderung der Temperatur zum Ziel zu kommen brachte keinen Erfolg. Zu **32** wurde Kaliumcarbonat hinzugesetzt und in Toluol unter Rückfluss gekocht. Es konnte dabei das Edukt isoliert werden. Die gleiche Reaktion in DMF als Lösungsmittel und einer Reaktionstemperatur von 155°C blieb ergebnislos.

Keine Umsetzung brachte die Behandlung von **32** mit Natriumhydrid in Tetrahydrofuran.

Als zweiter Weg zur Darstellung von **32a** wurde eine Enaminsynthese ins Auge gefasst. Dazu wurde die Carbonylverbindung **14a** mit dem Amin **39** in Toluol zusammengegeben und mit p-Toluolsulfonsäure unter Rückfluss erhitzt. Danach konnten lediglich die Edukte isoliert werden.



- (a) p-Toluolsulfonsäure, Toluol
- (b) Δ
- (c) Titan(IV)-Chlorid, Toluol abs.
- (d) Montmorillonit K10, DMF

Schema 9

Auch das Erhitzen der Carbonylverbindung mit dem Amin im Verhältnis 1:2 auf 200 °C brachte keinen Erfolg. Auf der DC-Platte erkennbar waren nur die Edukte sowie Polymerisierungsprodukte, die an der Startlinie hängen bleiben.

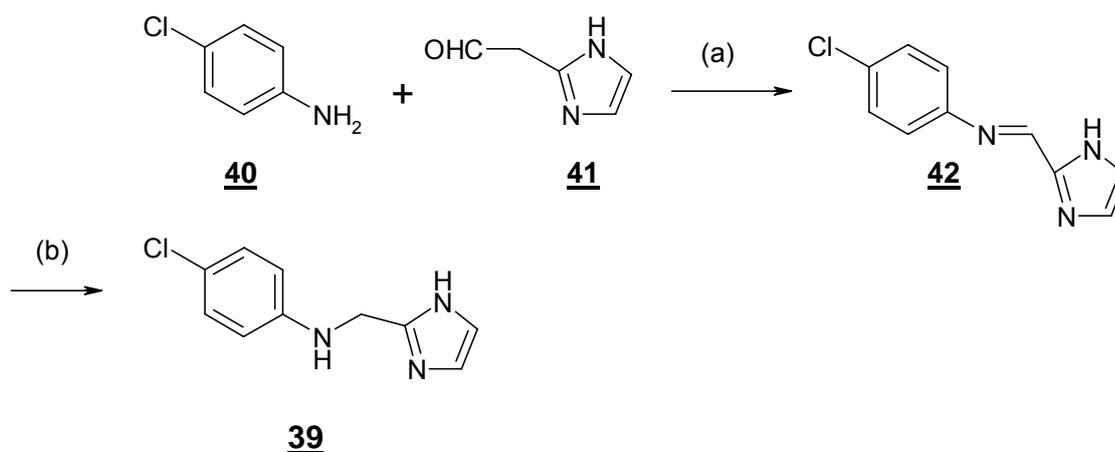
Auch unter Einwirkung von Titan(IV)-chlorid konnte das Keton **14a** mit dem Amin **39** nicht zum gewünschten Produkt umgesetzt werden (Gabbutt et al., 1995).

In einem letzten Versuch wurden **14a**, **39** und Montmorillonit-K10 6 h unter Rückfluss gekocht. Doch auch hier war keine Umsetzung erkennbar. Danach wurden keine weiteren Versuche unternommen (s. Schema 9).

3.2.5 Synthese der Zwischenprodukte

3.2.5.1 Synthese von N-(4-Chlorphenyl)-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amin 39

Die Reaktion von 4-Chloranilin mit 2-Imidazolcarboxaldehyd ergibt im ersten Schritt das Imin 42. Dazu wird das Anilin 40 mit dem Aldehyd 41 in Methanol gelöst und für 16 h bei 60°C gerührt. Das Zwischenprodukt wurde nicht isoliert, sondern direkt mit Natriumborhydrid bei 0°C zum Amin 39 reduziert (Schema 10).



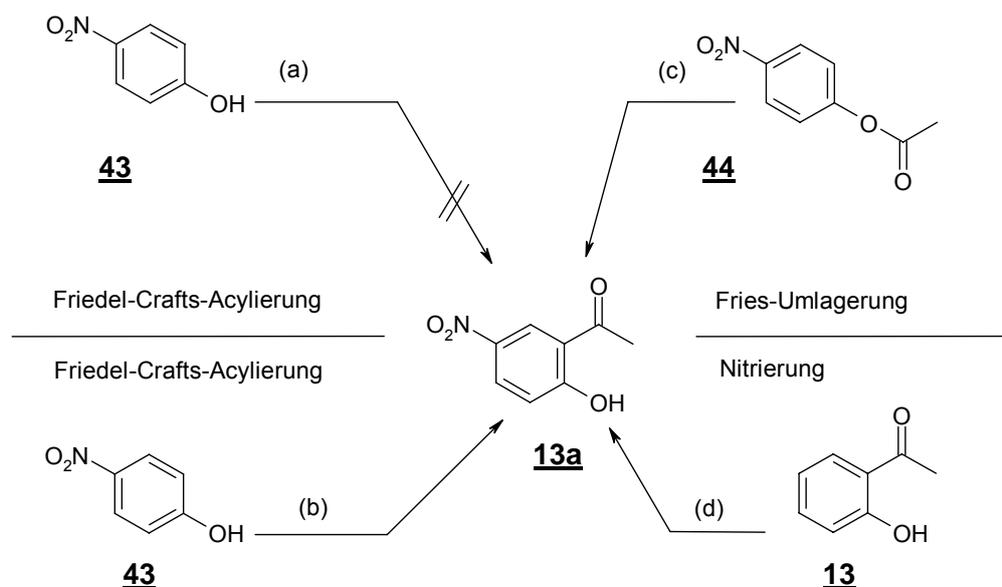
(a) Methanol

(b) NaBH₄

Schema 10: Synthese des Amins 39

3.2.5.2 Synthese von 2-Hydroxy-5-nitroacetophenon 13a

Die Synthese nach Kabbe erforderte das Einsetzen von 2-Hydroxy-5-nitroacetophenon 13a als Edukt. Da diese Verbindung kommerziell nicht erhältlich war, musste sie im Labor synthetisiert werden. Es wurde Wert darauf gelegt, einen Weg zu finden, der die Substanz mit hoher Ausbeute lieferte. Verschiedene Strategien wurden verfolgt.



- (a) Acetylchlorid, Al(III)-chlorid, Dichlorethan
 (b) Acetylchlorid, Al(III)-chlorid, Nitrobenzol
 (c) Montmorillonit K 10, Mikrowelle
 (d) HNO₃ 100%, Eisessig

Schema 11 **Synthese des 2-Hydroxy-5-nitro-acetophenons 13a**

Friedel-Crafts-Acylierung

Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Verwendung einer Lewis-Säure, gewöhnlich Aluminiumchlorid, da die elektrophile Natur des Acylhalogenids in der Regel nicht ausreicht, um eine Substitution aromatischer Verbindungen herbeizuführen. Im Komplex mit dem Acylhalogenid wird die Carbonylgruppe aktiviert und dadurch die Elektrophilie erhöht. Dem Angriff auf den Aromaten folgt die Abspaltung des Protons unter Ausbildung des gewünschten Produktes.

Zu a) Die Methode der Friedel-Crafts-Acylierung, in der Dichlorethan als Lösungsmittel eingesetzt wurde, stammte aus der allgemeinen Arbeitsvorschrift des Organikums. Unter diesen Synthesebedingungen konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Der Aromat besitzt mit der Nitrogruppe einen stark desaktivierenden Substituenten. Die Reaktionsbedingung war zu mild gewählt, um die gewünschte Acylierung zu erreichen. Stattdessen wurde unter diesen Bedingungen ausschließlich der Essigsäure-4-nitrophenylester **44** gebildet.

Zu b) Es wurden die Reaktionsbedingungen dahingehend geändert, dass als Lösungsmittel Nitrobenzol verwendet wurde. Die Reaktion verlief zunächst bei RT.

Anschließend wurde der Ansatz 4 h bei 120°C gerührt, um das Produkt zu erhalten. In der Regel gelingt die Friedel-Crafts-Acylierung mit stark desaktivierenden Substituenten nicht, es sei denn die Wirkung dieser Gruppe wird durch eine Hydroxygruppe kompensiert. Es kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass zum Teil intermediär der Essigsäure-4-nitrophenylester gebildet wurde. Aber durch die hohe Temperatur dürfte dieser über eine Friesumlagerung in das gewünscht Produkt überführt worden sein.

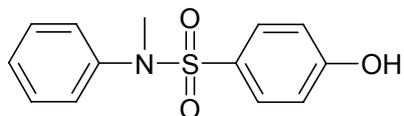
Thermische Fries-Umlagerung

Zu c) Die Fries-Umlagerung von Phenolestern ist eine beliebte Methode zur Darstellung von Hydroxyketonen. In der Literatur (Kad G.L., 1996) wird eine Variante beschrieben, bei der gänzlich auf Lösungsmittel verzichtet werden kann. Der entsprechende Ester wird dabei mit dem Silikat Montmorillonit K10 als Katalysator in einem Haushaltsmikrowellengerät bei 600 W behandelt. Obwohl die Literaturliteraturausbeute für die Umlagerung von **44** zu **13a** bei 97 % liegt, entstand das gewünschte Produkt nur in Spuren neben wenig p-Nitrophenol. Überwiegend fand keine Umsetzung statt. Die Umsetzung von **44** mit Aluminiumchlorid in Nitrobenzol führte nur zu sehr geringen Ausbeuten an **13a**.

Nitrierung

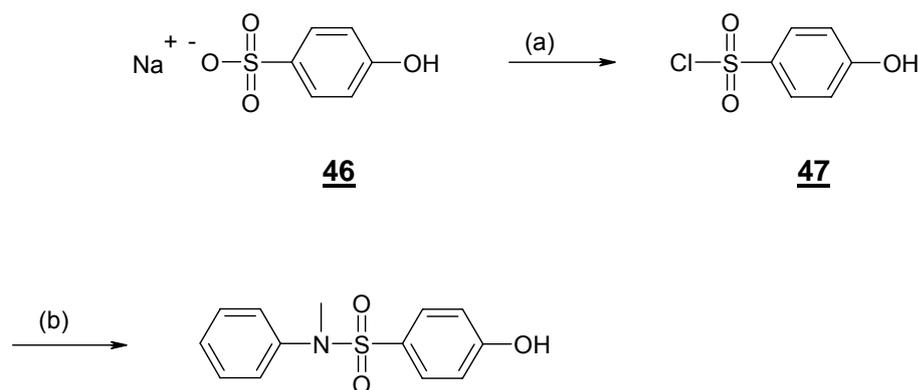
Zu d): Die Nitrierung von **13a** gelang mit rauchender Salpetersäure in Eisessig. Dazu wurde **13** in Eisessig gelöst und vorsichtig rauchende Salpetersäure hinzugetropft. Der Ansatz wurde 16 h bei 60°C gerührt. Nach der Synthese wurde die Essigsäure im Vakuum bei max. 40°C abrotiert und der verbliebene Ansatz auf Eis gegossen. Es entstand eine gelbe Fällung, die abfiltriert werden konnte. Die Fällung bestand aus dem rohen Produkt **13a**, das mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel oder Wasserdampfdestillation aufgereinigt werden konnte.

3.2.5.3 Synthese von 4-Hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid

**45**

Die einfachste Methode zur Darstellung von Sulfonamiden geht von Sulfochloriden aus, die mit dem entsprechenden Amin umgesetzt werden. Um die frei werdenden Protonen abzufangen, kann das Amin im Überschuss hinzugegeben werden oder es wird eine Hilfsbase wie Triethylamin zugesetzt. Als Lösungsmittel kommen Dioxan, Aceton und Ether in Frage.

Zur Darstellung von **45** wurde 4-Hydroxybenzolsulfonat-Natrium **46** mit Thionylchlorid umgesetzt. Als Katalysator wurde DMF eingesetzt. Das Gemisch wurde bei 60°C für 4 h gerührt. Dabei entstand eine opake Lösung. Nach Extraktion mit Ethylacetat erhielt man **47** als Rohprodukt, welches direkt über eine Aminolyse mit N-Methylanilin zu **45** umgesetzt wurde. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur.



Schema 12

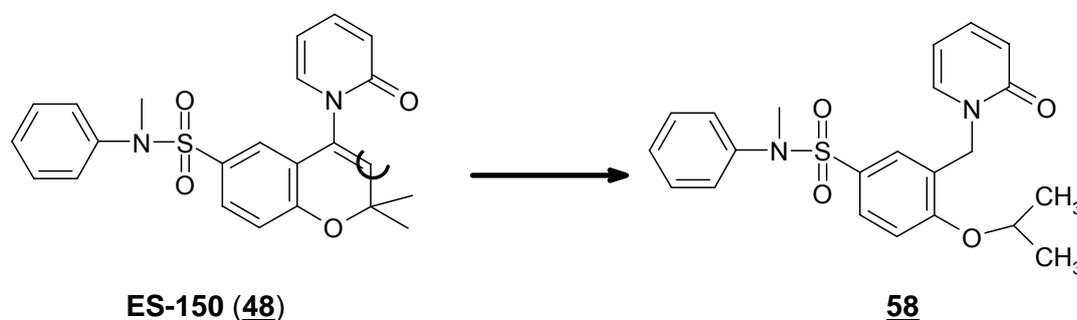
45

(a) Thionylchlorid, DMF

(b) N-Methylanilin

3.2.6 Darstellung der acyclischen Phenoether (offene Benzopyrane)

Bei den im Folgenden beschriebenen Substanzen handelt es sich um ein „aufgeschnittenes“ Benzopyran **48**. Salamon et al. (2002) postulierten für das Sulfonamid ES-150 (**48**), dass es im Bereich der Bindungsstelle der KCO auf dem Sulfonylharnstoffrezeptor nicht nur Unterschiede zwischen den Wirkstoffklassen gibt, sondern dass auch die Bindungsstelle für die Benzopyranderivate komplexer aufgebaut ist. Es wurde angenommen, dass **48** mit dem N-Phenylsulfonamid eine zusätzliche Bindungsstelle am Rezeptor erschließt, die bevorzugt über π -Wechselwirkung zustande kommt (Salamon et al., 2001). Diese Hypothese sollte mit Modellsubstanzen überprüft werden, die Strukturelemente von **48** in offener Phenoetherstruktur aufweisen. Dabei sollte das starre Benzopyrangrundgerüst durch eine monocyclische Verbindung ersetzt werden, die sowohl die Partialstruktur des Pyridons als auch die der Alkyloxygruppe noch besitzt. Ziel war es, Substanzen zu erhalten, die über den Phenylring des Sulfonamids die neue Bindungsstelle ansprechen. Zudem sollte durch den jetzt beweglichen Pyridonring bzw. durch die variable Etherstruktur eine verbesserte Anpassung des Wirkstoffes am Rezeptor ermöglicht werden, um somit eine höhere Bindungsaffinität zu erzielen.

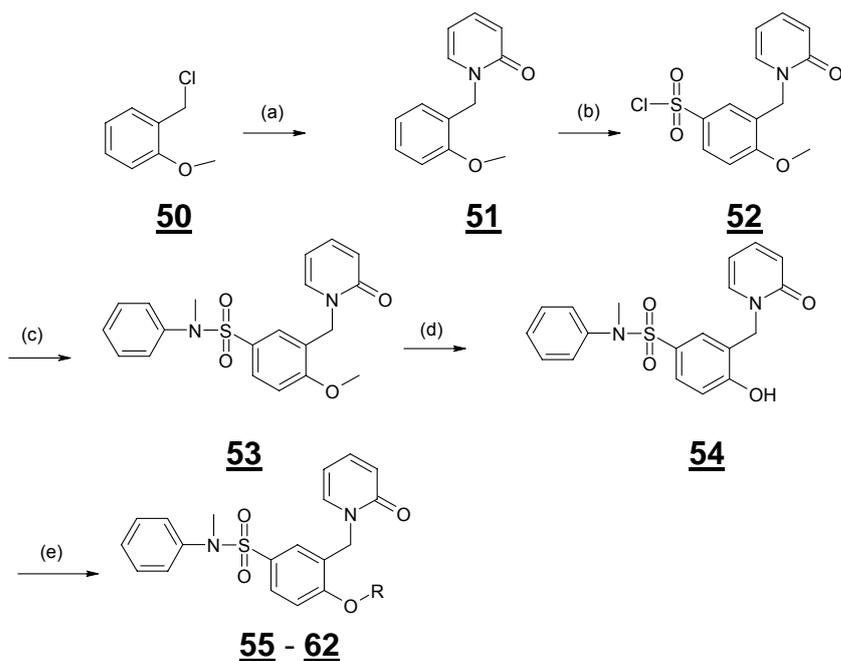


Die Strategie bestand darin, ein Sulfonamidgrundgerüst aufzubauen, das lediglich die Variation an der Alkyloxystruktur aufweist. Die Veretherung sollte deshalb im letzten Syntheseschritt erfolgen.

3.2.6.1 Aufbau der acyclischen Phenoether vom Pyridon-Typ

Im ersten Schritt wurde das Benzylchlorid **50** mit 2-Hydroxypyridin unter Zusatz von Kaliumcarbonat in Toluol unter Rückfluss gekocht. Der Phenoether **51** wurde anschließend mit Chlorsulfonsäure zunächst bei -10°C und dann bei RT in trockenem

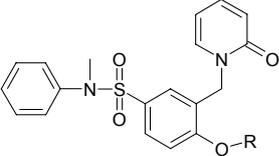
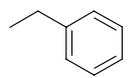
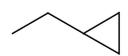
Chloroform zum Sulfochlorid **52** umgesetzt. Um anschließend das Sulfonamid **53** zu erhalten, wurde **52** in einer Reibschale mit N-Methylanilin unter Zusatz von Triethylamin und Dioxan verrieben. Der Ether wurde mit Bortribromid in trockenem Dichlormethan in das Phenol **54** gespalten. Die Etherbildung erfolgte mit **54** und den entsprechenden Alkylhalogeniden zu den Ethern **55 - 62** (Englert et al., 2001) Dazu wurde das Phenol in trockenem DMF gelöst und Kaliumcarbonat als Protonenfänger eingesetzt. Der Ansatz wurde auf 80°C gebracht und 3 h gerührt. Schema 13 zeigt den Gesamtsyntheseweg.



- (a) 2-Hydroxypyridin, Toluol
 (b) Chlorsulfonsäure, Chloroform
 (c) N-Methylanilin, Triethylamin, Dioxan
 (d) BBr_3 , Dichlormethan
 (e) Alkylhalogenid, K_2CO_3

Schema 13: Darstellung der acyclischen Pyridone

Tab. 3.5: Übersicht über die dargestellten Pyridone

 Pyridone			
Pyridone aliphatisch unverzweigt			
Substanz-Nr	R=	Reagenz	Laborcode
<u>54</u>	-H	_1	JS39
<u>53</u>	-CH ₃	_2	JS45
<u>55</u>	-C ₂ H ₅	Ethylbromid	JS42
<u>56</u>	-C ₃ H ₇	n-Propylbromid	JS43
<u>57</u>		1-Brom-2-propen	JS49
Pyridone aliphatisch verzweigt			
<u>58</u>		Isopropylbromid	JS26
<u>59</u>		2-Brompentan	JS48
<u>60</u>		1-Brom-2,2-dimethylpropan	JS47
Pyridone cyclisch			
<u>61</u>		Benzylbromid	JS44
<u>62</u>		Cyclopropylmethylbromid	JS46

¹ Vorstufe 54

² Die Substanz 53 entstand aus einer Reihe, in der nicht die Etherspaltung mit BBr₃ durchgeführt wurde

3.2.6.2 Synthese der acyclischen Phenoether vom Typ der Amide und Thioamide

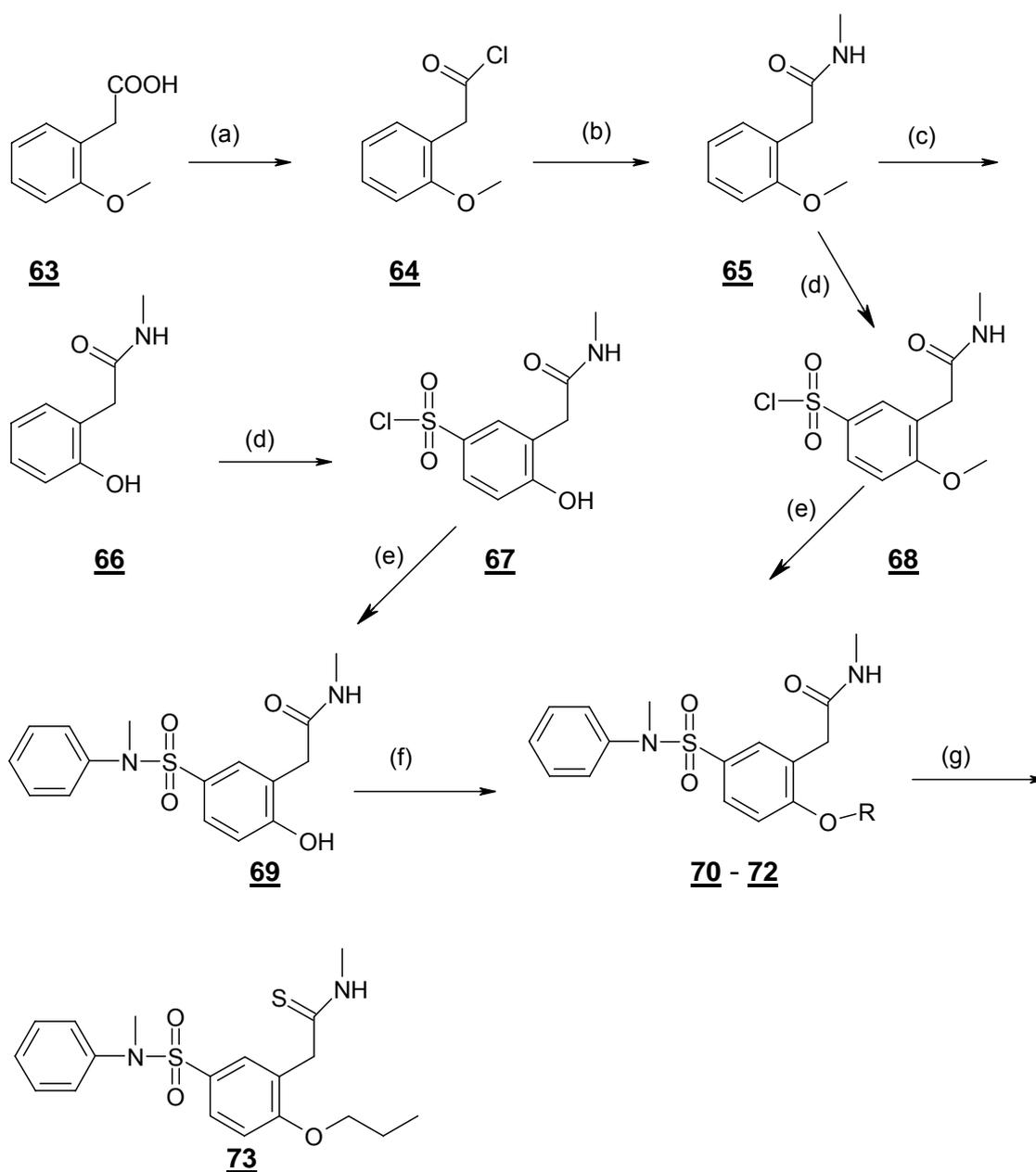
Die Phenyllessigsäure **63** wurde mit Phosphorpentachlorid in das Säurechlorid **64** überführt, das mittels Destillation gereinigt und sofort zum Amid **65** umgesetzt wurde.

Analog zu den offenen Pyridonen wurde die Etherspaltung mittels Bortribromid in Chloroform durchgeführt. Anschließend wurde **66** mit Chlorsulfonsäure zu **67** umgesetzt. Durch Zugabe von N-Methylanilin erhielt man das Sulfonamid **69**. Die Veretherung zu den entsprechenden Alkyloxyverbindungen erfolgte mit den entsprechenden Alkylhalogeniden (s. Schema 14). Der Phenoether **70** wurde durch Sulfochlorierung von **65** und anschließender Umsetzung mit N-Methylanilin erhalten.

Die Umsetzung des Amids zum Thioamid **73** erfolgte mit Lawessons-Reagenz in Toluol bei 100°C. Nach 2 h war das Edukt quantitativ umgesetzt. Die Aufreinigung wurde durch SC über Kiesegel vorgenommen.

Tab. 3.6: Darstellung der Amide und Thioamide

acyclische Amide				
Substanz-Nr	R1=	R2=	Reagenz	Laborcode
70	O	-CH ₃	-	JS67
71	O	-C ₂ H ₅	Ethylbromid	JS71
72	O	-C ₃ H ₇	n-Propylbromid	JS68
73	S	-C ₃ H ₇	n-Propylbromid	JS69



Schema 14: Darstellung der Amide und Thioamide

- (a) Phosphorpentachlorid, Diethylether
- (b) N-Methylamin-Lösung 40%; Dioxan
- (c) BBr_3 , Dichlormethan
- (d) Chlorsulfonsäure, Chloroform
- (e) N-Methylanilin; Triethylamin, Dioxan
- (f) Alkylhalogenid, K_2CO_3 , DMF
- (g) Lawessons-Reagenz, Toluol

3.3 Spektroskopische Eigenschaften

3.3.1 Spektroskopische Eigenschaften der 4-Chloranilinochromanole

3.3.1.1 Infrarotspektroskopie

Das exemplarische IR-Spektrum (KBr) der Verbindung **32** zeigt eine charakteristische, intensive Bande für die cyclische Etherstruktur bei $\nu \sim 1275 \text{ cm}^{-1}$ und die typischen Doppelbanden der geminalen Methylgruppen bei $\sim 1360 \text{ cm}^{-1}$ und 1380 cm^{-1} . Bei der 2-Propylverbindung **35** fehlt die Absorptionsbande bei $\nu \sim 1360$. Die Cyanoverbindungen **9** und **35** zeigen die typische $\text{C}\equiv\text{N}$ -Valenzschwingung bei $\nu \approx 2230 \text{ cm}^{-1}$

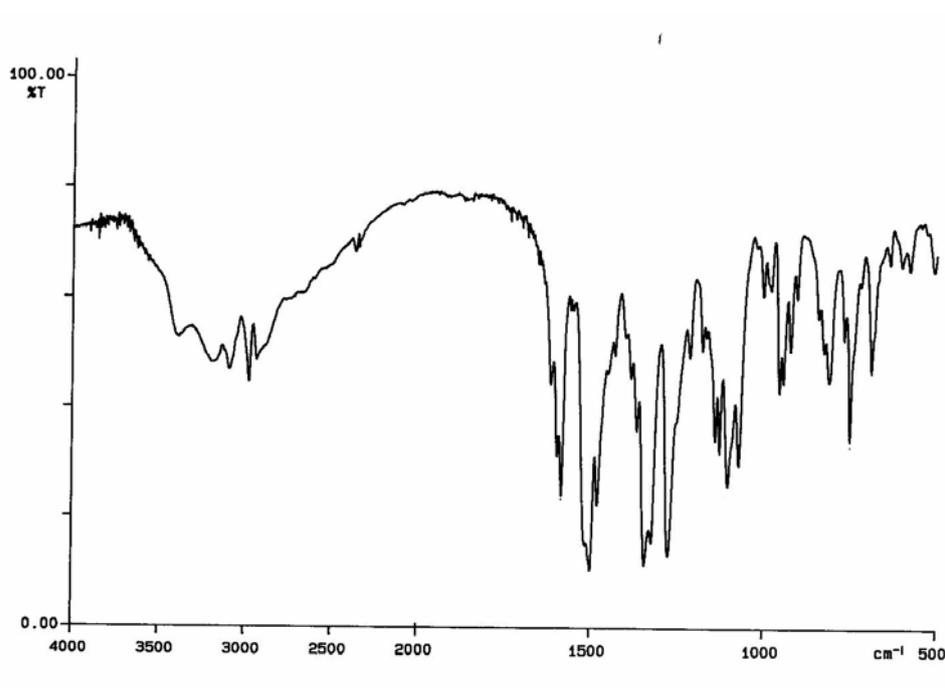


Abb. 3.4: IR-Spektrum [KBr] von **32**

3.3.1.2 Massenspektrometrie

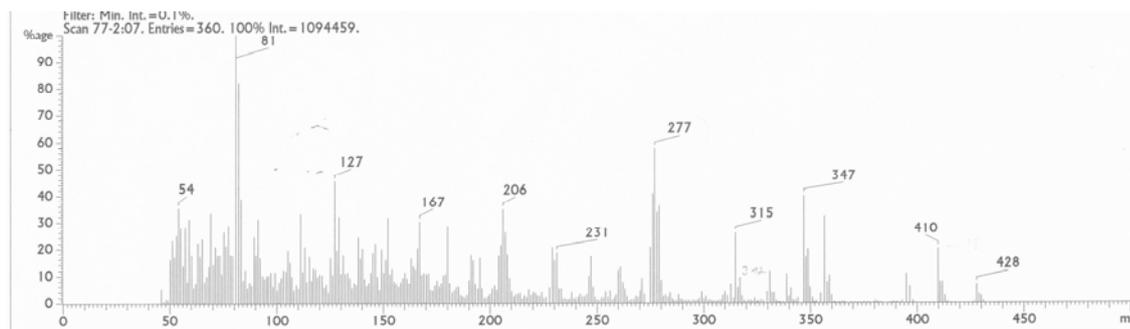


Abb. 3.5: Massenspektrum von 32

In Abb. 3.5 ist ein typisches Massenspektrum von 32 abgebildet. Das Molekülion wird -wenn überhaupt- nur sehr schwach oder wie hier zu sehen als $[M^{+\bullet}] = 428$ oder $[M^{+\bullet}+1]$ registriert.

Isotopenspitzen sind daher nicht wirklich zu erkennen. Auch das Ion, das nach Wasserabspaltung resultiert, ($m/z = 410$) ist nur von geringer Intensität. Etwas intensiver zeigt sich das Fragment bei $m/z = 347$, das nach Abspaltung des Imidazolymethyl-Restes (81) registriert wird. Dieses stellt selbst oder in protonierter Form den Basispeak dar (s. Abb. 3.5)

Die beiden Fragmente bei $m/z = 127/129$ sind dem 4-Chloranilin zuzuordnen. Die intensiven Fragmente um $m/z = 277$ treten nur in den Nitrochromanolen auf und sind schwer zu interpretieren.

3.3.1.3 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Chromanole wurden wegen der geringen Löslichkeit in anderen Lösungsmitteln in DMSO- d_6 aufgenommen. Diese hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Spektren auch bei höherer Temperatur aufgenommen werden konnten, da es bei üblicher Messtemperatur zu einer starken Verbreiterung einiger Resonanzlinien kommt, so dass die Zuordnung oft nicht eindeutig getroffen werden konnte.

Vergleicht man die chem. Verschiebung der aromatischen Protonen im Benzopyranteil, so fällt die relative Hochfeldverschiebung von H-5 im Vergleich zum entsprechenden Chromen 10 auf, während die beiden übrigen Protonen H-7 und H-8 keine große Veränderung zeigen. Aus Modellbetrachtung geht hervor, dass H-5 in den Anisotropiebereich des aromatischen Restes in 4-Position hineinragt und somit eine Abschirmung erfährt.

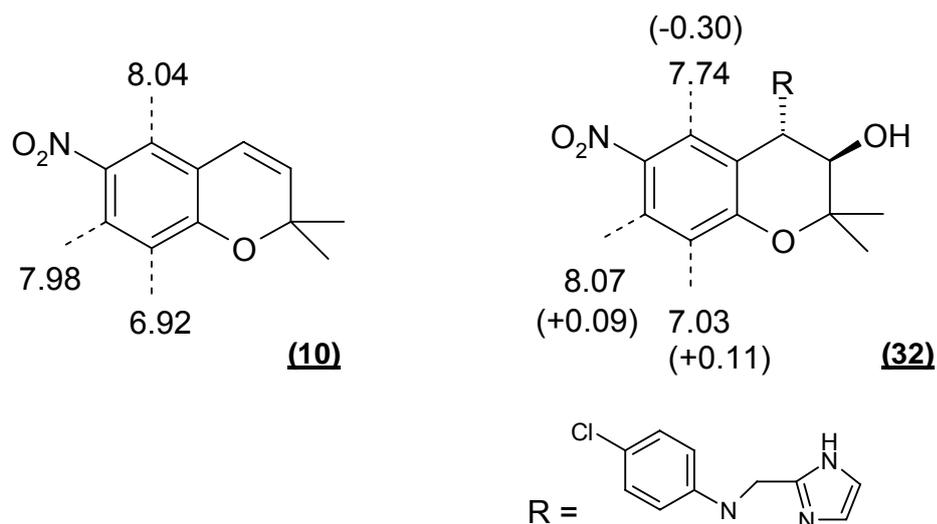


Abb. 3.6: Einfluss des Substituenten an 4-Position auf die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen im Benzopyranring. Die Zahlen in Klammern zeigen den Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen **10** und **32**

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der 4-Chloranilinochromanole **9**, **32** – **36** in DMSO- d_6 zeigen bei einer Messtemperatur von 20°C schlecht aufgelöste Signale, so dass deren Zuordnung problematisch ist. Dies soll am Beispiel des 4-Chloranilino-6-nitrochromanols **32** näher beschrieben werden.

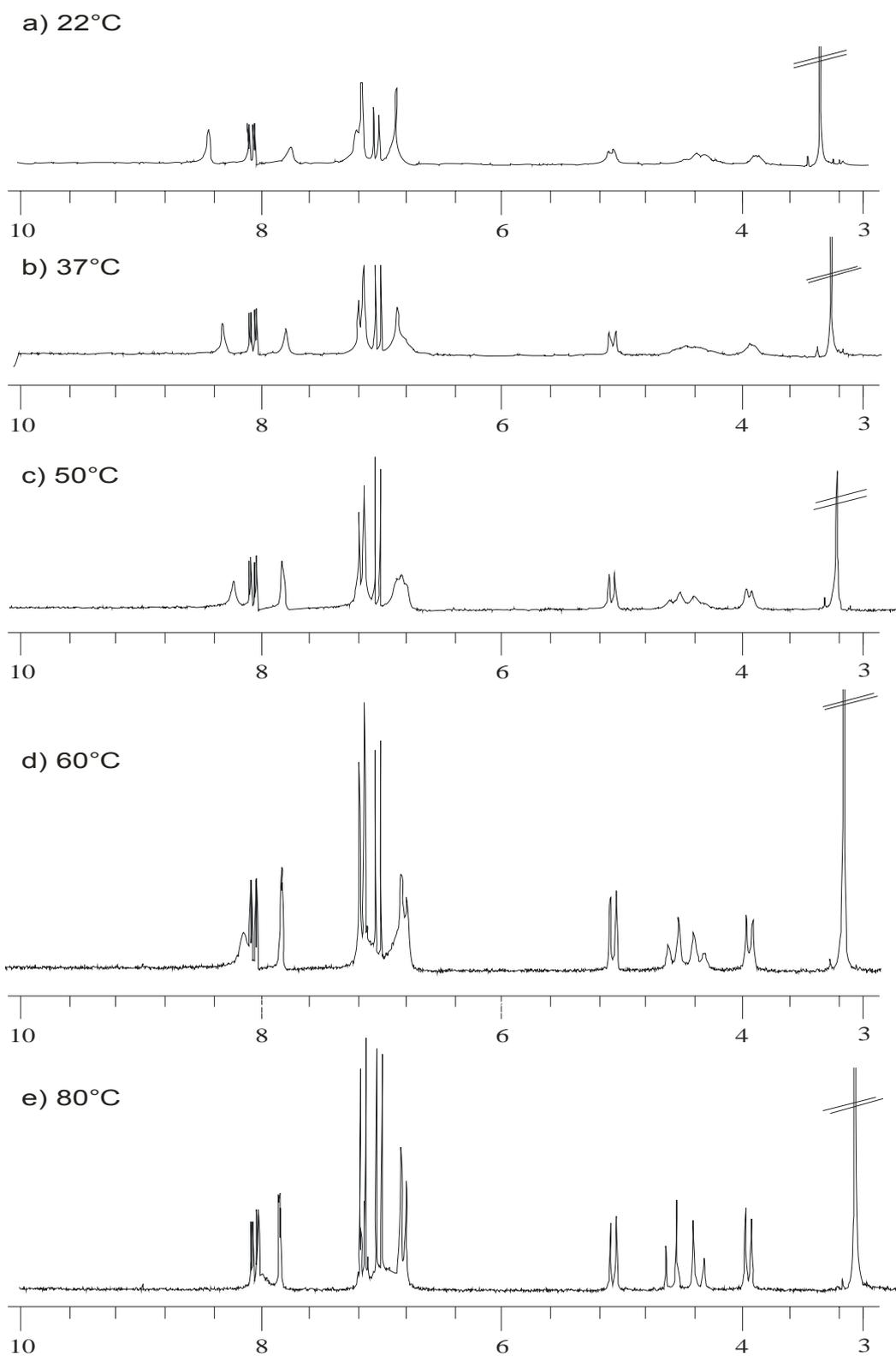


Abb. 3.7: Ausschnitt der 200 MHz- ^1H -NMR-Spektren von **32** in DMSO- d_6 bei verschiedener Messtemperatur. a) bei 22°C, b) bei 37°C, c) bei 50°C, d) bei 60°C, e) bei 80°C.

Das bei Raumtemperatur aufgenommene Spektrum (**a**) zeigt für einige Protonen eine mehr oder weniger schlechte Auflösung der entsprechenden Resonanzsignale. Während die beiden aromatischen Protonen des Benzopyrans H-7 (dd) und H-8 (d) eine gut erkennbare Feinstruktur der Signale aufweisen, sind die Signale der übrigen aromatischen Protonen und vor allem die benzyllischen Protonen sowie H-3 und H-4 stark verbreitert und schlecht aufgelöst. Auch die pseudoäquatoriale Methylgruppe zeigt das Phänomen der Signalverbreiterung (vgl. dazu die NMR-Diskussion der diastereomeren Epoxide auf Seite 57). Als Ursache für die beobachteten Effekte kommt eine relativ langsame Gleichgewichtseinstellung verschiedener Konformationen des beweglichen 3,4-Dihydro-2*H*-pyranringes aufgrund des voluminösen 4-Substituenten in Betracht. Aus diesem Grund wurde eine Serie von weiteren Spektren bei steigender Messtemperatur aufgenommen (Abb. 3.7).

Beginnend bei ca. 50°C verändert sich das Spektrum signifikant und die vorher breiten Signale zeigen eine veränderte Struktur, die sich bei weiterer Temperaturerhöhung immer stärker ausprägt und bei ca. 80°C ein Optimum an Auflösung erreicht. Die chemische Verschiebung der Signale wird dabei nicht verändert.

Eine Ausnahme bilden die Signale der austauschbaren Protonen, die zu höherem Feld „wandern“. Nach der Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur erhält man das Ausgangsspektrum wieder zurück.

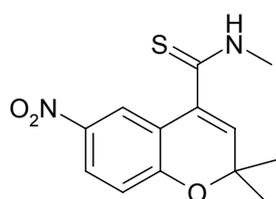
Aus dem Spektrum bei 80°C (**e**) lassen sich alle Signale gut zuordnen und die entsprechenden Kopplungskonstanten in erster Näherung entnehmen (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **32** in DMSO-d6 bei 80°C.

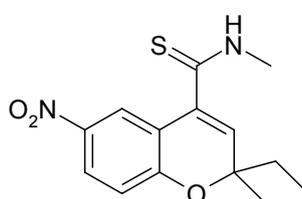
Chemische Verschiebung	Aufspaltung	Anzahl der Protonen	H-Atom	Kopplungs-konstante
1.37 ppm	s (breit)	3 H	CH_3 („a“)	
1.52 ppm	s	3 H	CH_3 („e“)	
3.93 ppm	d	1 H	H-3	$^3J = 9.9 \text{ Hz}$
4.45 ppm	AB	2 H	$-\text{CH}_2-$	$^2J = 17.3 \text{ Hz}$
5.05 ppm	d	1 H	H-4	$^3J = 9.9 \text{ Hz}$
6.79 ppm	„d“	2 H	aromat. H	Imidazol
6.99 ppm	d	1 H	H-8	$^3J_{7,8} = 9.0 \text{ Hz}$
7.10 ppm	m	4 H	aromat. H	Chloranilin
7.81 ppm	d	1 H	H-5	$^4J_{5,7} = 2.6 \text{ Hz}$
8.03 ppm	dd	1 H	H-7	$^3J_{7,8} = 9.0 \text{ Hz}$ $^4J_{5,7} = 2.6 \text{ Hz}$
8.0 ppm	s (breit)	1 H	OH	austauschbar
12.0 ppm	s (breit)	1 H	NH	austauschbar

3.3.2 Struktur der diastereomeren Epoxide **28** und **28a**

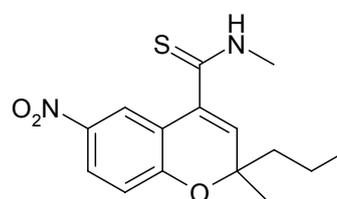
Im Zuge der Synthese der so genannten kardioselektiven Verbindungen, war es von Interesse, neben der Position 6 des Benzopyrangrundgerüsts, auch die Position 2 mit unterschiedlichen Resten zu substituieren. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Wirksamkeit von K_{ATP} -Öffnern aus der Reihe der Benzopyrancarbothioamide deutlich gesteigert werden kann, wenn eine der beiden Methylgruppen in 2-Position durch einen Propylrest ersetzt wird. Deshalb sollte auch in der 4-Chloranilin-Reihe eine solche Variation realisiert werden.



pEC₅₀ = 8.87



pEC₅₀ = 9.74



pEC₅₀ = 10.77

Bei der Synthese des zugrunde liegenden Epoxids verwendet man ein Racemat aus (2R)- und (2S)-2-Methyl-6-nitro-2-propyl-2H-1-benzopyran. Würde man damit eine „normale“ Epoxidierung durchführen, entstünde daraus ein Gemisch zweier Enantiomerenpaare (2R,3R,4R) und (2S,3S,4S) sowie (2R,3S,4S) und (2S,3R,4R). Zur Vereinfachung des Produktspektrums bot sich die enantiospezifische Synthese der Epoxide mittels der Jacobsen-Katalysatoren an. Da am Ende die (3R,4S)-Reihe von größerem Interesse war, wurde zunächst nur der (R,R)-Jacobsen-Katalysator verwendet, so dass die Konfiguration der resultierenden Epoxide als (3R,4R) festgelegt war. Tatsächlich erhielt man nach der selektiven Epoxidierung ein 1:1 Gemisch zweier Diastereomere **28** und **28a**, das durch präparative SC an Kieselgel partiell aufgetrennt werden konnte. Im Vorlauf reicherte sich **28** an, das schließlich aus Petrolether kristallisiert und so analysenrein gewonnen werden konnte. Dagegen scheiterten alle Versuche, **28a** ebenfalls in kristalliner Form zu erhalten. Hier führte auch eine wiederholte SC nur zu einer Anreicherung von **28a**, so dass auf eine weitere Umsetzung mit diesem Gemisch verzichtet wurde.

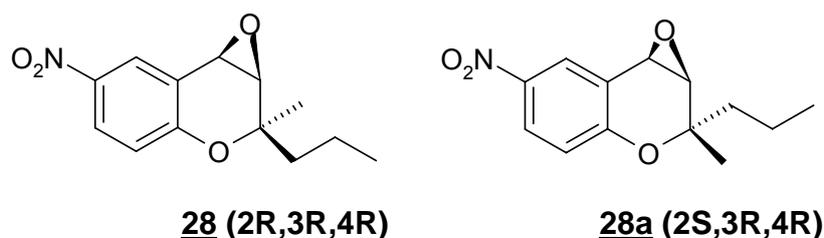


Abb. 3.8: Absolute Konfiguration von **28** und **28a**

3.3.3 Röntgenstrukturanalyse von 28

Zur Durchführung der Röntgenstrukturanalyse wurde ein aus Petrolether 60/80 gezüchteter Einkristall verwendet. **Abb. 3.9** zeigt die Kristallstruktur des Epoxids 28.

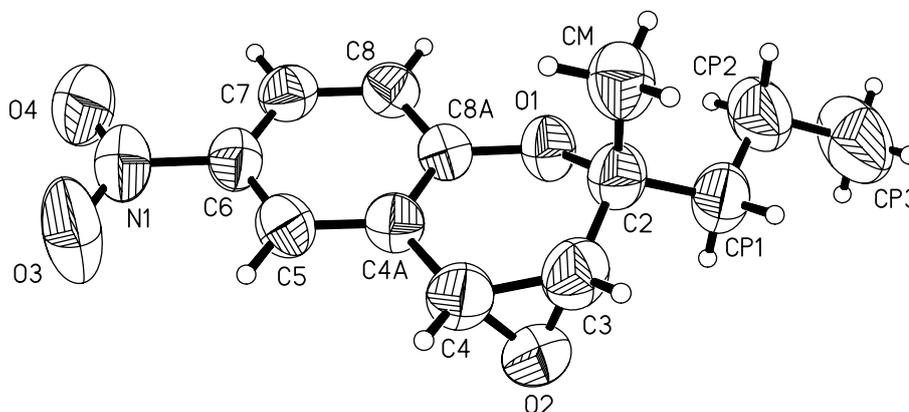


Abb. 3.9: Kristallstruktur des Epoxids 28

Deutlich zu erkennen ist hier, wie sich der Sauerstoff des Oxiranringes, ebenso wie der Pyran-Sauerstoff, auf die gleiche Seite „nach unten“ orientiert. Die Methylgruppe in 2-Position steht auf der entgegengesetzten Seite der beiden Sauerstoffatome und nimmt eine pseudoaxiale, der Propylrest eine pseudoäquatoriale Position ein. Obwohl die Röntgenstruktur lediglich Aufschluss über die relative Konfiguration eines Moleküls gibt, lässt sich damit die absolute Konfiguration von 28 bestimmen.

Durch den Einsatz des (RR)-Jacobsenkatlysatoren bei der Epoxidierung war die Konfiguration des Epoxids mit (3R,4R) festgelegt, so dass sich aus der Röntgenstrukturanalyse die folgende Konfiguration für 28 ergab: (2R,3R,4R).

3.3.4 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopische Untersuchung der diastereomeren Epoxide **28** und **28a**

Es wurden die $^1\text{H-NMR}$ -Daten des kristallinen Epoxids **28**, sowie die des Öls ermittelt, das beide Komponenten **28** und **28a** erhält.

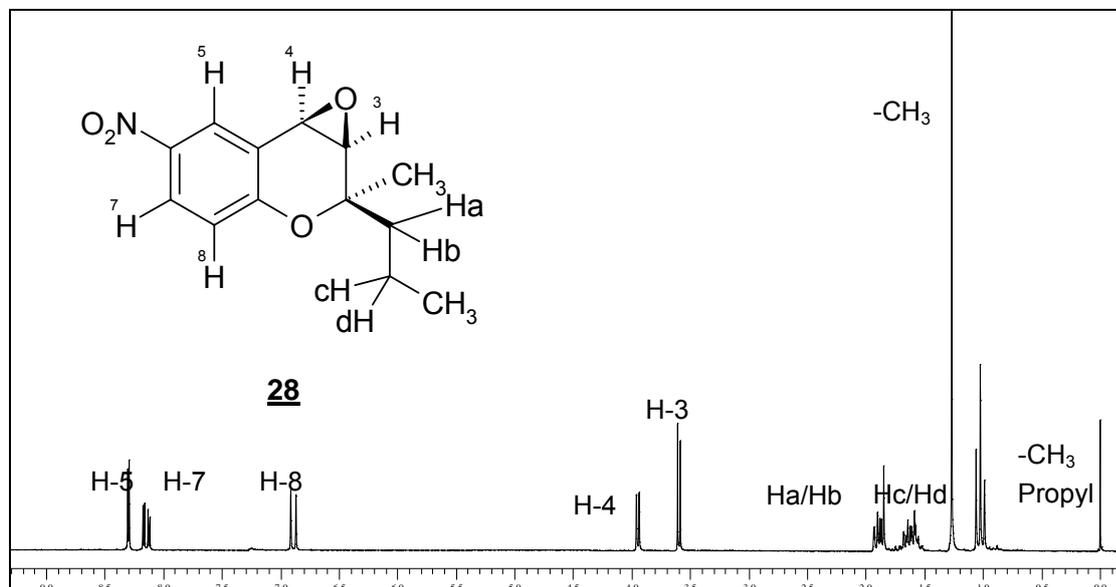


Abb. 3.10: 200 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **28** in CDCl_3

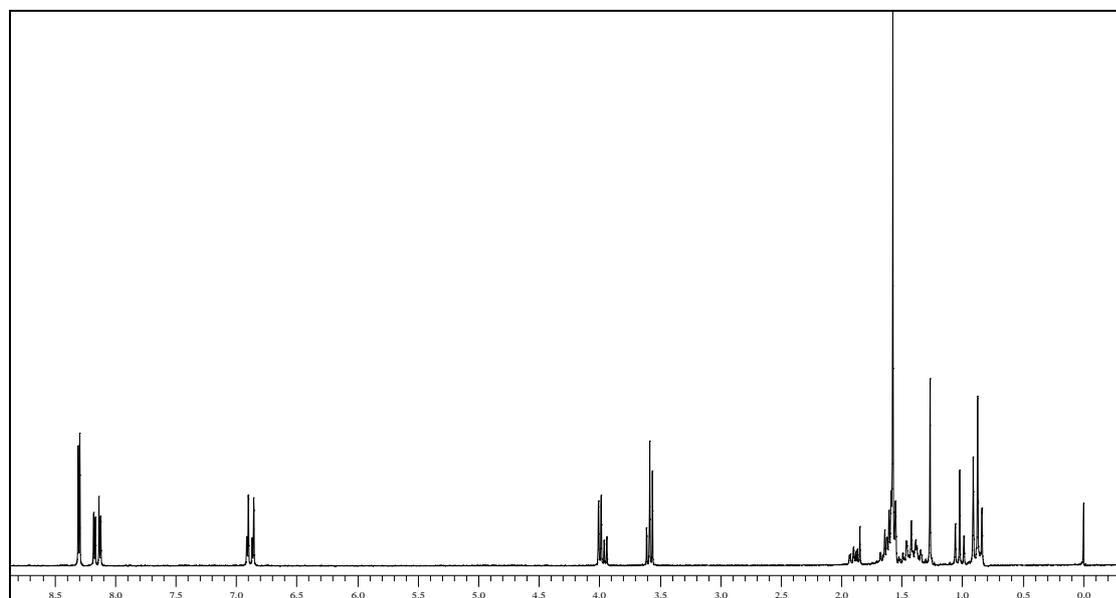
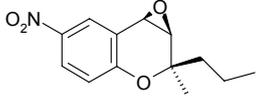
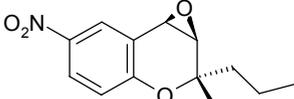


Abb. 3.11: 200 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **28** und **28a** in CDCl_3 . Die Komponenten liegen im Verhältnis von ca. 30:70 vor

Während die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen in **28** und **28a** nahezu identisch ist, zeigen die Alkylprotonen in 2-Position deutliche Unterschiede (s. Tab. 3.8).

Tab. 3.8: ¹H-NMR-Daten der diastereomeren Epoxide **28** und **28a**

200 MHz-Spektrum in CDCl ₃					Δδ
	δ [ppm]		δ [ppm]		
-CH ₃	1,27	s	1.64	s	-0.37
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	1,06	t	0.89	t	0.17
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	1,65	m	1.42	m	0.23
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	1,93	m	1.60	m	0.33
H-3	3,59	d	3.57	d	0.02
H-4	3.94	d	4.00	d	-0.06
H-5	8,30	d	8.30	d	0.00
H-7	8.13	dd	8,13	dd	0.00
H-8	6.88	d	6.87	d	0.00

Dabei fällt auf, dass die Methyl-Gruppen an C-2 der beiden Diastereomeren den größten Unterschied der chemischen Verschiebung aufweisen. Die chemische Verschiebung der Propylprotonen der beiden Isomere unterscheidet sich umso stärker, je näher sie am Pyranring substituiert sind. (s. Tab. 3.8). Die Ursachen dieses Effektes sind nicht von vornherein klar. Zunächst würde man vermuten, dass die elektronegativen Anisotropiebereiche auf der Seite des Oxiransauerstoffs zu einer Abschirmung der Alkylprotonen führen, die in diesen Bereich hinein ragen. Bei **28** beobachtet man jedoch genau das Gegenteil: die Methylgruppe steht auf der Gegenseite, ist aber stark abgeschirmt ($\delta = 1.27$ ppm), während die α -Methylprotonen des Propylsubstituenten auf der „Sauerstoff-Seite“ entschirmt werden. Daraus folgt, dass die Anisotropie des Epoxidrings nicht für den beobachteten Effekt in Frage kommt.

Betrachtet man die chemische Verschiebung bei anderen 2,2-Dimethyl-2H-benzopyranen, so fällt auf, dass der Unterschied der chemischen Verschiebung der beiden Methylgruppen umso größer wird, je „flexibler“ der 2H-Pyranring ist.

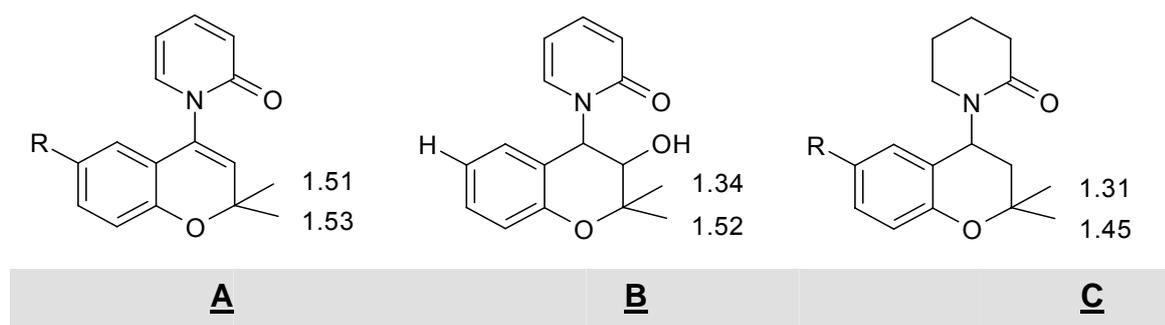


Abb. 3.12: Chemische Verschiebung der Methylprotonen in verschiedenen Benzopyranen in CDCl_3 (Salamon, Diss. 2001; Derix, Diss. 1998)

So erscheinen die Methylgruppen im Chromen **A** kaum getrennt, während sie im Chromanol **B** deutliche Unterschiede zeigen (**Abb. 3.12**). Dies hat jedoch nicht seinen Grund in der 3-OH-Gruppe, wie man an **C** erkennt. Vielmehr lassen sich alle beobachteten Effekte zwanglos erklären, wenn man die möglichen Konformationen im 2H-1-Benzopyran betrachtet. Dabei nimmt in **B** und **C**, jeweils einer der beiden Methylsubstituenten -auch im schnellen Gleichgewicht- jeweils die pseudoaxiale, der andere eine pseudoäquatoriale Position ein. Geht man davon aus, dass die in der Röntgenstruktur von **28** ermittelte pseudoaxiale Ausrichtung der Methylgruppe auch in einer CDCl_3 -Lösung beibehalten wird, so lässt dies nur den Schluss zu, dass solche pseudoaxialen Methylgruppen unabhängig von den weiteren Substituenten im Heterocyclus eine Hochfeldverschiebung gegenüber den pseudoäquatorialen Methylgruppen aufweisen. Dieser Effekt dürfte in erster Linie durch das „Eintauchen“ in den Randbereich des aromatischen Ringstroms zustande kommen (s. Abb. 3.9).

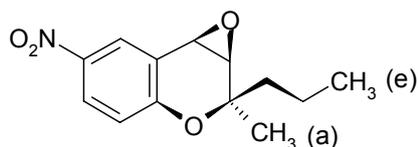
Eine pseudoäquatoriale Methylgruppe orientiert sich in einem Bereich außerhalb des beschriebenen Effekts, und ihr Resonanzsignal erscheint deshalb paramagnetisch verschoben. Betrachtet man das ^1H -NMR-Spektrum von **28a** mit der an C-2 umgekehrten Konfiguration, so spricht die deutliche Tieffeldverschiebung des Methylsignals ($\delta = 1.64$) für eine pseudoäquatoriale Ausrichtung, so dass dem Propylrest nur die pseudoaxiale Lage bleibt.

Dies überrascht jedoch nur auf den ersten Blick, da sich beim Umklappen des 2H-3,4-Epoxyopyran-Halbsessels der Propylrest zwar pseudoäquatorial, die Methylgruppe jedoch auf die gleiche Seite wie der Oxiransauerstoff orientiert, was offensichtlich ungünstig ist und durch die Berechnung der totalen Bindungsenthalpie bestätigt wird (s. Abb. 3.13).

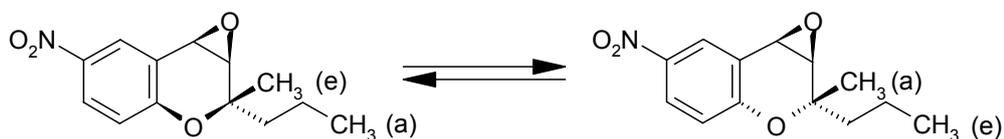
Aus diesen Gründen muss davon ausgegangen werden, dass der größere Alkylrest in **28a** eine pseudoaxiale Position bevorzugt. Dies wird verständlich, wenn man die A-

Werte¹ für verschiedene äquatoriale und axiale Alkylsubstituenten am Cyclohexan zur Erklärung heranzieht: sie unterscheiden sich nur geringfügig zwischen den n-Alkylgruppen und vergrößern sich dann signifikant, wenn mehr als eine α -Verzweigung hinzukommt.

Aufgrund der vorstehenden Betrachtungen könnte es möglich sein, die bevorzugte Konformation von 2,2-dialkylierten 2*H*-1-Benzopyranen direkt aus ihren ¹H-NMR-Spektren abzuleiten.



28 [117.1 kcal/mol]*



28a [115.9 kcal/mol]*

28a-1 [130.0 kcal/mol]*

Abb. 3.13: Berechnung der totalen Bindungsenthalpie der diastereomeren Epoxide 28 in 28a bzw. 28a-1

¹ A-Wert in kJ * mol⁻¹: Unterschied der Freien Enthalpie ($-\Delta G^\circ = RT \times \ln k$). Die A-Werte sind positiv, wenn der betreffende Substituent die equatoriale Stellung bevorzugt. Me (7.1), Et (75), i-Pr (8.8), t-Bu (21).

Lit. H. Günter, NMR-Spektroskopie, 2. Auflage (1983); Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 241ff

* Berechnet mit dem Programm SYBYL6.5 (Tripos Associates, St. Louis, MO, USA) auf einer Silicon Graphics Indigo 2 Workstation

3.3.5 CD-Spektrum von 32 und 33

Bei der Messung des Zirkulardichroismus wird die Lichtabsorption von zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen in Abhängigkeit von der Wellenlänge beobachtet und zur sterischen Analyse der Substanzen herangezogen. Dabei verhalten sich die Spektren der Enantiomere spiegelbildlich zueinander.

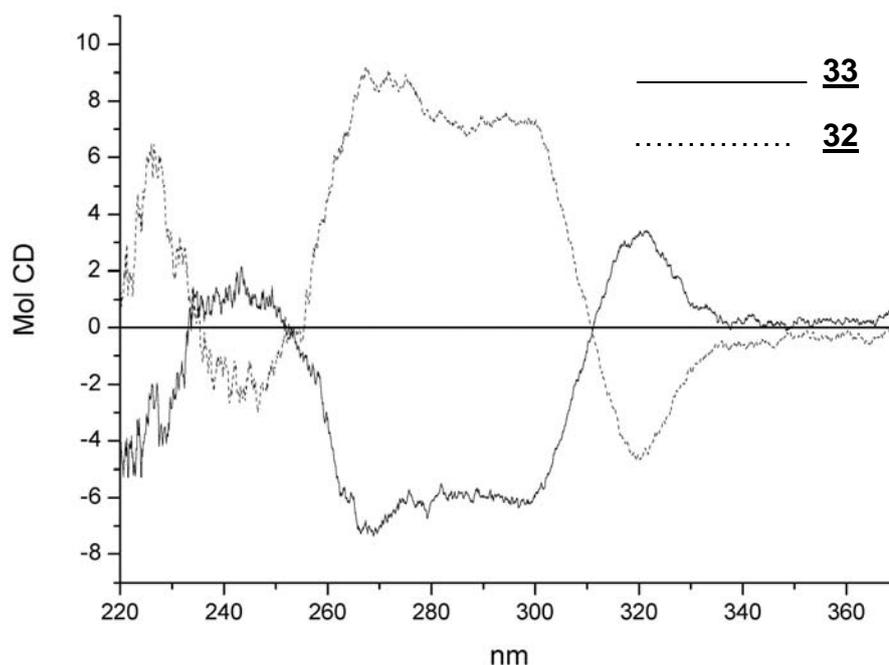


Abb. 3.14: CD-Spektrum von (3R,4S)-JS-09 32 und (3S,4R)-JS09 33 gemessen in Acetonitril (Uvasol)

Mit Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Braun, Institut für Organische Chemie der HHU Düsseldorf für die Erstellung der CD-Spektren

4 PHARMAKOLOGISCHER TEIL

4.1 Material und Methoden

Die synthetisierten Substanzen wurden mit einem Laborcode (JS...) versehen. Später wurden diesen Laborcodes Substanznummern zugeordnet, die sich aus der Konzeption der Arbeit ergaben. Im chemischen Teil werden zur besseren Übersicht nur die Substanznummern verwendet, während in diesem Abschnitt die Laborcodes übernommen werden. Am Ende der Arbeit ist eine Übersicht aller Substanzen in der Konkordanz beigefügt.

Für die Relaxationsexperimente wurden Aorten und Tracheen männlicher Wistar-Ratten verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug 220 – 400 g. Für eine Versuchsreihe wurden zwei Wistar-Ratten genommen. Diese wurden drei Minuten lang mit Diethylether anästhesiert. Nach Thoraxöffnung wurde das Herz-Lungen-Paket gewonnen. Die Organe wurden sofort in eine mit Carbogen (Sauerstoff 95%, CO₂ %) begaste Krebspufferlösung überführt. Die Krebslösung hatte folgende Zusammensetzung in mM: NaCl 89, NaHCO₃ 29, KCl 5, Na₂HPO₄ 1, MgSO₄ 0.5, EDTA 0.04, CaCl₂ 2.25. Die Aorta und Trachea wurden mit einer Ca²⁺-freien Krebspufferlösung perfundiert, um das Blut zu entfernen. Herz und Lunge wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie später für die Rezeptormembrangewinnung einzusetzen. Aorta und Trachea wurden für die physiologischen Versuche gebraucht.

4.1.1 Isolierte Gewebe der Ratte

4.1.1.1 Präparation von Aorta und Trachea für funktionelle Versuche

Die Aorta wurde am Aortenbogen durchtrennt und auf einem Edelstahlmandrin aufgezo-gen. Anhaftendes Fettgewebe und Blutgerinnsel wurden entfernt, sowie die Adventitia, um eine bessere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Es wurde nur der Teil der Aorta descendens bis zum Zwerchfell verwendet. Hiervon wurden 4 mm breite Ringe mit einer Schere abgeschnitten.

Die Trachea wurde unterhalb des Larynx und an der Bifurcatio tracheae durchtrennt und auf einem Mandrin aufgezo-gen. Fett- und Bindegewebe wurden entfernt sowie anhaftende Blutgerinnsel. Die Trachea wurde in Ringe geschnitten und auf der gegenüberliegenden Seite der Muskulatur längs aufgeschnitten. Die so gewonnenen rechteckigen Gewebe wurden auf der einen Seite des Knorpelsegmentes so eingeschnitten, dass ein Anschlingen mit Nahtmaterial (Flexafil 6/0, J. Pfrimmer & Co., Erlangen) möglich war. Die Präparate wurden bis zum Einbringen in die Versuchsanlage in mit Carbogen begaster Krebspufferlösung bei RT aufbewahrt.

Um die Präparate der einzelnen Tiere unterscheiden zu können, wurde verschiedenfarbiges Nahtmaterial benutzt.

4.1.1.2 Enzymatische Desaggregation von Trachealmuskelzellen

Zur enzymatischen Desaggregation wurde das gesamte glatte Muskelmaterial zweier Tracheen verwendet, welche in schmale Streifen geschnitten wurden. Diese Streifen wurden in einem Kalium-Methansulfonat-Puffer folgender Zusammensetzung inkubiert (in mM): KOH 130, Taurin 20, Pyruvat 5, Creatin 5, CaCl₂ 0.1, Hepes 10. Es wurde solange Methansulfonsäure hinzugefügt, bis sich ein pH-Wert von 7.4 einstellte. Die enzymatische Desaggregation wurde mit 1g/l Kollagenase (Sigma C2139) und 0.2 g/l Pronase E (Serva) durchgeführt. Während der Desaggregation befanden sich die Trachealmuskelstreifen in drei 100 ml Erlenmeyerkolben, die jeweils 10 ml Puffer enthielten, und die auf eine Temperatur von 37°C gehalten wurden. Die so gewonnenen Zellen wurden 10 Minuten lang mit 200 g zentrifugiert und mit enzymfreiem Puffer gewaschen. Die gesamte Inkubation bis zur vollständigen Verdauung betrug zwischen 5 und 6 Stunden. Zur Durchführung der Radioligandbindungen wurden die gewaschenen Zellen nach Zentrifugierung in 30 ml einer 1 mM KHCO₃-Lösung resuspendiert und mit einem Homogenisator (Glas-Glas) homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min lang bei 40.000 g zentrifugiert, der Niederschlag in KHCO₃ resuspendiert und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt (Methode, Lemoine 1990).

4.1.1.3 Züchtung glatter Muskelzellen der Aorta (RASMC)

Die Gewinnung der glatten Muskelzellen für Radioligandbindungsexperimente in den Multiwellkammern erfolgte in Anlehnung an ein von Ross beschriebenes Verfahren (Ross, 1971). Aus der Aorta wurden unter sterilen Bedingungen Ringe von 1mm Breite gewonnen, und in 6-well Zellkulturschalen (Corning, N.Y., USA) überführt. Nach Zusatz des Nährmediums (DMEM, Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, Gibco, Innchinnan Scotland) wurden Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C mit 93 % Sauerstoff und 7 % CO₂ begast. Dem Medium wurden außerdem 10 % fetales Kälberserum, 2 mM Glutamat, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Nach 10-14 Tagen wurden die Aortenringe entfernt und die angewachsenen Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) passagiert (Passage 1). Zum Ablösen der Zellen wurde eine 0.05 %ige Trypsinlösung mit 0.02 % EDTA verwendet. Nach weiteren 7 Tagen erfolgte erneutes Ablösen und

Überführung in 24-well Zellkulturschalen (Passage 2), in denen die Radioligandbindungsexperimente durchgeführt wurden.

4.1.1.4 Gewinnung von Herzmyozyten aus der Ratte

Die männlichen Wistar-Ratten, ca. 180 – 200g schwer, wurden mit Etherdämpfen anästhesiert. Herz und Aorta wurden entnommen und in ein Gefäß mit auf 37°C vortemperierten und mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) begaste Vorperfusatlösung (35 mM NaCl, 24.9 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄ * 7 H₂O, 1.2 mM KH₂PO₄, 10mM HEPES, 133 mM Saccharose, 10 mM Glucose; pH 7.4) überführt (Teschmacher und Lemoine, 1995). Eine Kanüle wurde in die Aorta des entnommenen Herzens eingeführt und mit der Vorperfusatlösung retrograd bis zum kompletten Auswaschen des Blutes perfundiert und dann in ein Organbad überführt. Die Perfusion wurde mit der Enzymlösung (Vorperfusatlösung), die mit hochreinem Serumalbumin (Serva fatty acid free), Kollagenase aus Clostridium histolyticum (0.5 mg/ml; 0.9 U/mg, Serva) und Hyaluronidase aus Rinderhoden (50 mg/ml; 330 U/mg, Sigma) ergänzt war, durchgeführt. Zur Partikelfreiheit wurde die Enzymlösung über Millipore-Filter filtriert und in einer Glasglocke (Gegenstromprinzip) ständig begast und temperiert. Dieser Vorgang dauerte in etwa 30 Minuten, Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe in der atrioventrikulären Ebene abgetrennt Diese wurden bis zum benötigten Andauungszustand etwa 5 Minuten in der Enzymlösung gelassen. Durch leichtes Schütteln konnten die Herzzellen desaggregiert werden und durch ein Sieb (Maschengröße ca. 800 µM) filtriert werden. Die Zellen wurden in begaster Waschlösung (in mM: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 25 Hepes, 5 Glucose, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂, Serumalbumin 2% (Serva standard grade), pH 7.4) resuspendiert und in drei Waschschrritten gereinigt. Die erste und zweite Zentrifugation erfolgte 5 min lang bei 15g (Sigma 3-12), die dritte 5 min lang bei 7 g. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach der dritten Zentrifugation sind die Zellen in Waschlösung ohne MgCl₂ und nur 0.2% Serumalbumin resuspendiert worden. Die so gewonnen reinen Herzzellen konnten nun für die Radioligandbindungsversuche verwendet werden. Nach jedem Waschschriff ist mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellvitalität (Anteil an „rod-shaped-Zellen (stäbchenförmig), bei denen die Morphologie erhalten geblieben ist; Die sphärischen (abgerundeten) Zellen weisen einen beschädigten kontraktilen Apparat auf und wurden als nicht vital eingestuft) mikroskopisch bestimmt worden. Die Zellvitalität betrug meist 80%, die Zellzahl ca. 10 Millionen Zellen pro Herz.

4.1.2 Relaxationsstudien

4.1.2.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchung der isometrischen Kraftentwicklung der Muskelstreifen erfolgte in einer modifizierten Apparatur nach Blinks (Lemoine, 1990). Eine Einheit bestand aus einem gläsernen Organbad, das aus zwei Kammern bestand, und zwei isometrischen Transducern (Swema, SG4-45), die durch an Kugellager geführte Feintriebe aufgehängt waren. Die Muskelhalter zur Untersuchung bestanden aus einem rigidem Stahldraht (V2A) und einem beweglichen Wolframdraht (\varnothing 0.5 mm), der in die Transducer eingehängt wurde. Die Aortenringe wurden auf den statischen und den beweglichen Draht aufgeschoben. Um eine gleichmäßige, entlang der Zugrichtung verlaufende Kraft messen zu können, wurden die Drähte gegenläufig in das Gewebe eingeführt. Die Trachealmuskelstreifen waren mit einer festen Klammer ausgestattet, in die ein Knorpelteil geklemmt wurde, während der zweite mit Nahtmaterial angeknötete Knorpelteil direkt am Transducerhebel befestigt wurde.

Die zwei Kammern der Blinksbäder waren parallel angeordnet. In der einen Kammer befand sich das Gewebe, durch die andere Kammer wurde Carbogengas durchgeleitet. Der Gasstrom bewirkte eine Zirkulation zwischen den Kammern. Durch den Zweikammeraufbau der Blinksbäder konnte eine störende Vibration durch den Gasstrom weitgehend vermieden werden. Durch das Kreislaufsystem der Bäder war eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe sichergestellt. Die Organbäder wurden während der gesamten Versuchsdauer auf 32.5°C gehalten.

Die Kalibrierung des Meßsystems erfolgte mit 2 g und 1 g Gewichtsstücken. So konnte auch die Linearität der Messapparatur überprüft werden.

Die in die Apparatur eingebrachten Gewebe wurden anschließend mit einer Kraft von ca. 5 mN vorgedehnt. Während der einstündigen Equilibrierungs-Phase relaxierte das Gewebe auf einen konstanten Basaltonus. In dieser Zeit wurde die Krebspufferlösung mehrfach ausgetauscht. Zusätzlich wurden zu der zur Präparation eingesetzten Krebspufferlösung für die Durchführung des Experiments noch folgende Komponenten hinzugefügt (Konzentrationen in mM): Glucose 10, Na-Pyruvat 5, Na-Glutamat 5, Na-Fumarat 5, NaHCO₃ 5.

4.1.2.2 Versuchsdurchführung

Nach der Vordehnung und der Equilibrierungsphase der glattmuskulären Präparate wurde ein geeigneter Agonist hinsichtlich der Stabilität und Wirksamkeit am Gewebe

gewählt, der das Gewebe zur Kontraktur brachte. Um die Kontraktur auszulösen, wurde zur Aorta Kaliumchlorid (25 mM) und zur Trachea Carbachol (0.2 $\mu\text{mol/l}$) ins Organbad gegeben. Zwei Vorkontraktionen bewirkten eine agonistenabhängige Sensibilisierung der Gewebe, d.h. dass diese stärker kontrahierten. Die Carbacholdosis entsprach somit der halbmaximalen muskarinergen Stimulierung. In Abänderung zur Standardkrebspufferlösung wurde für die Aortenversuche eine Natrium-reduzierte Krebspufferlösung verwendet, um die Isotonie zu bewahren. Die Krebplösung hatte folgende Zusammensetzung (Konzentrationen in mM): NaCl 69; NaHCO_3 29, KCl 25, CaCl_2 2.25, Na_2HPO_4 1, MgSO_4 0.5, Na_2EDTA 0.04 und wurde durch Glucose 10, Na-Pyruvat 5, Na-Glutamat 5, Na-Fumarat 5, NaHCO_3 5 ergänzt.

Auch für die „High-Kaliumversuche“ ($\text{K}^+ = 137$ mM) ist eine modifizierte Krebspufferlösung verwendet worden (Konzentrationen in mM): NaCl 6; KHCO_3 29, KCl 108, CaCl_2 2.25, Na_2HPO_4 1, MgSO_4 0.5, Na_2EDTA 0.04.

Nach Erreichen einer konstanten Kraft (ca. 60-90 min) wurde kumulativ, in steigender Dosierung, die zu untersuchende Verbindung (KCO) hinzupipettiert. Die nächste Dosis wurde erst nach Einstellung eines konstanten Tonus hinzugegeben. Die zu untersuchende Substanz wurde zuvor in DMSO gelöst, um eine Stocklösung von $10^{-1} - 3 \cdot 10^{-2}$ mol/l zu erhalten. Diese wurde je nach Löslichkeit mit Wasser oder einer wässrigen DMSO-Lösung weiter verdünnt. Da DMSO in höheren Konzentrationen selbst relaxierend wirkt, ist darauf geachtet worden, eine Maximalkonzentration im Test von 2‰ nicht zu überschreiten. Abschließend wurde durch Wirkstoffe mit K_{ATP} -Kanal-unabhängigem Wirkmechanismus die Maximalrelaxation des Gewebes ermittelt. Hinzugegeben wurde deshalb an der Aorta Nitroprussid-Natrium (6 $\mu\text{mol/l}$) und an der Trachea Isoprenalin (0.2 $\mu\text{mol/l}$).

4.1.2.3 Versuchsauswertung

Die Registrierungen der Vielkanalschreiber wurden mit Hilfe des Softwarepaketes SAS 604 ausgewertet (Lemoine, 1992). Für jedes Gewebe wurde hierbei durch lineare Extrapolation der einzelnen Messwerte der halbmaximale Wirkeffekt ermittelt.

Untersuchung des Antagonismus zwischen einem KCO ((3R,4S)-JS09, Bimakalim) und einem K_{ATP} -Kanalblocker (Glibenclamid, BPDZ44)

An Aortenpräparaten wurden kumulative Dosis-Wirkungskurven (DWK) in Abwesenheit und Anwesenheit eines K_{ATP} -Blockers durchgeführt. Anhand der Verschiebung der gemessenen pEC_{50} -Werte der einzelnen Dosis-Wirkungskurven wurde die Analyse nach Arunlakshana und Schild (1959) durchgeführt. Für ein homogenes

Rezeptorsystem ergibt sich die Verschiebung (CR) der DWK in Abhängigkeit von der Konzentration und Affinität des Agonisten aus der Gleichung (Gl. 1)

$$\log(\text{CR} - 1) = \log([\text{B}]) - \log K_B \quad \text{Gl. 1}$$

Diese Gleichung kann für ein einfaches graphisches Auswertungsverfahren (Schildplot) genutzt werden. Hierbei erfolgt die Auftragung der Werte (CR-1) gegen $\log [\text{B}]$. Der am Schnittpunkt der Abszisse mit der Geraden berechnete Wert wird auch pA_2 -Wert genannt und entspricht $-\log K_B$ (pK_B), wenn es sich um eine einfach kompetitive Wechselwirkung handelt. Auf diese Weise lassen sich aus dem Schildplot die Dissoziationskonstanten (K_B) für kompetitive Antagonisten berechnen. Eine Schildplot-Steigung von 1.0 gibt eine reine Agonisten/Antagonisten-Wirkung am Rezeptor wieder.

Wird ein System mit zwei Rezeptorsubtypen, die beide die physiologische Wirkung des Agonisten A vermitteln angenommen, so kann eine nicht-lineare Auswertung herangezogen werden

$$\log(\text{CR}-1) = \log[\text{B}]-\log\{(\sigma_1 K_{B1} + \sigma_2 K_{B2}) * [\text{B}] + K_{B1} K_{B2} * ([\text{B}] + \sigma_2 K_{B1} + \sigma_1 K_{B2})^{-1}\} \quad \text{Gl. 2}$$

Der Konzentrationsquotient, der im klassischen Schildplot eindeutig durch Affinität und Konzentration des Antagonisten B bestimmt wird, hängt in einem System mit zwei Rezeptorsubtypen, zusätzlich von der Subtypenselektivität der verwendeten Agonisten ab, welche in Form der fraktionierten Stimuli σ quantifiziert wird. Liegt ein System mit zwei Rezeptorsubtypen vor, so müsste bei sehr kleiner und sehr großer Antagonisten-Konzentration B die Geradengleichung sich der Steigung 1 nähern (Lemoine et al., 1983).

4.1.3 Calciuminduzierte Kontraktionsversuche an der Rattenaorta

4.1.3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau der calciuminduzierten Kontraktionsversuche entsprach dem der Relaxationsstudien. Es wurden hier lediglich Aortenpräparate eingesetzt.

4.1.3.2 Versuchsdurchführung

Nach der Vordehnung und Equilibrierungsphase der Aortenringe wurde zunächst das Gewebe mehrfach mit einer calciumfreien Standardkrebspufferlösung gewaschen. Dieser Vorgang wurde nach 15 min wiederholt. Schließlich wurde die calciumfreie Standardkrebspufferlösung gegen eine calciumfreie „High-Kalium-Lösung“ ($K^+ = 137$ mM, s.o.) ausgetauscht. Im Unterschied zur oben genannten Lösung enthielt diese kein Calcium. Zusätzlich wurden noch folgende Komponenten hinzugefügt (Konzentrationen in mM): Glucose 10, Na-Pyruvat 5, Na-Glutamat 5, Na-Fumarat 5, $NaHCO_3$ 5. Nach erneuter Einstellung des Basaltonus wurde die Kontraktur mit Calcium 2.25 mM ausgelöst. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus (ca. 60 min) wurde das glattmuskuläre Gewebe erneut mit dem calciumfreien Puffer gewaschen, um den Basaltonus zu restituieren. Nach einer Equilibrierungszeit von 60 min und mehrmaligen Waschens mit Krebslösung (calciumfrei!) wurde das Gewebe erneut kontrahiert. Dieser Vorgang wurde so häufig wiederholt, bis die Kraft zweier aufeinander folgender Kontraktionen am selben Gewebe gleich war (3 – 4 Kontraktionen). Nach einer weiteren Equilibrierungsphase in calciumfreier Krebspufferlösung wurde das Gewebe mit der zu untersuchenden Verbindung inkubiert. Da acht Organbäder zur Verfügung standen, war es möglich, neben einer Kontrolle sieben verschiedene Konzentrationen der Verbindung zu untersuchen. Nach 30 min Inkubationszeit wurde den Organbädern sukzessiv sechs Dosen $CaCl_2$ beigefügt. Die ersten beiden und die letzte Dosis enthielten 0.25 mM $CaCl_2$, die restlichen Dosen jeweils 0.5 mM. So erhält man additiv eine Gesamtkonzentration von 2.25 mM $CaCl_2$, was der Konzentration der Krebspufferlösung entsprach. Die Zugabe der Dosen erfolgte nach Einstellung eines stabilen Plateaus (ca. 15 – 20 min).

4.1.3.3 Versuchsauswertung:

Die Auswertung der Schreiber erfolgte mit Hilfe der SAS 604 Software. Dabei wurden die einzelnen Messwerte als prozentualer Wert der Maximalkontraktion aus der Vorkontraktion dargestellt. Anschließend konnte aus der Maximalkontraktion und der dazugehörigen Konzentration der Verbindung eine Dosis-Wirkungskurve mit maximal sieben Messpunkten dargestellt werden. Anhand dieser konnte die $pEC_{50} \pm SEM$ bestimmt werden.

$$E\% = E_{\max} \cdot \left(\frac{A^P}{A^P + K^P} \right) * 100 \quad \text{Gl. 3}$$

$E\%$ = Prozentuale Kontraktion

E_{\max} = maximale Aktivität

K = pEC_{50} (halbmaximale Wirkung)

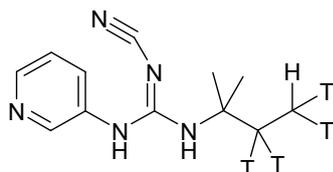
A = Agonist

P = Hill-Koeffizient; definiert die Steilheit der Kurve

4.1.4 Kompetitionsbindungsstudien

4.1.4.1 Kompetitionsbindungsuntersuchung mit [³H]-P1075

Als Radioligand wurde [³H]-P1075 (N-Cyano-N'[1,1-dimethyl-[2,2,3,3]-[³H]propyl-N''-(3-pyridinyl)guanidin mit einer spezifischen Aktivität von 121 Ci/mmol (Manley et al., 1993; Quast et al., 1993) eingesetzt.



[³H]-P1075

4.1.4.2 Versuchsdurchführung an intakten desaggregierten Herzzellen der Ratte

Steigende Konzentrationen der verschiedenen KCOs wurden in Vials vorpipettiert. Zur Bestimmung der nicht spezifischen Bindung wurde 1 µmol/l kaltes P-1075 benutzt. In die Vials wurden die folgenden Komponenten pipettiert:

- 1) KCO (Konzentrationen gemäß der Verdünnungsreihe)
- 2) Radioligand [³H]-P1075 1.0 – 1.5 nM
- 3) 40000 Zellen/Testtube in 20 mM HEPES, 5 mM Glucose, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA 6 ATP

Der Versuchsansatz wurde gut geschüttelt und bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eiskalter Stopplösung (10 mM Tris x HCl-Puffer + 5 mM MgCl₂) beendet. Der gebundene Anteil von Radioligand wurde vom freien Anteil durch schnelle Vakuumfiltration über Whatmann GF/A Glasfaser getrennt. Die Filter wurden mit Waschlösung mehrmals nachgewaschen und danach ausgestanzt, um sie dann in Vials zu überführen. Nach Zugabe von 1 ml Szintillator (Ultima Gold) wurden die Vials 1 Stunde geschüttelt. Danach erfolgte die Messung der Proben im Szintillatonscounter (Packard 1500) mit 50% Effizienz des Zählprozesses.

4.1.4.3 Versuchsdurchführung an glatten Muskelzellen der Rattenaorta

Die kultivierten glatten Muskelzellen (in 24-well Zellkulturschalen) wurden mit 200 µl HBSS (Hank's balanced salt solution) folgender Zusammensetzung versetzt (Konzentration in mM): 137 NaCl, 20 HEPES, 5 Glucose, 5.4 KCl, 4.2 NaHCO₃, 1.3 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 0.44 KH₂PO₄, 0.34 NaHPO₄. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Radioliganden [³H]-P1075 und der entsprechenden Verdünnung der Testsubstanz gestartet, wobei die Mengenverhältnisse den mit Herzzellen durchgeführten Versuchen entsprachen. Nach 45 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mehrfach mit kalter HBSS-Lösung gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 200 µl 0.5 N NaOH verwendet und die Zellkulturschalen nochmals 60 min bei 37°C stehengelassen. Die so abgelösten Zellen wurden anschließend in 2 ml Vials überführt, die Zellkulturschalen nochmals mit 100 µl 0.5 NaOH gewaschen und nach Zusatz von 1 ml Szintillator (Ultima Gold) im Szintillationscounter (Packard1500) mit einer Effizienz von 40% vermessen.

4.1.4.4 Kompetitionsbindungsuntersuchung mit [³H]-(+)-PN 200,110

Die Versuchsdurchführung erfolgte in gleicher Weise, wie die an glatten Muskelzellen. Als Pufferlösung wurde 50 mM TRIS-HCl (pH 7.4) eingesetzt. Als Radioligand wurde [³H]-(+)-PN 200,110 eingesetzt. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde Nitrendipin eingesetzt. Zur Methodik des Versuchs siehe auch Voigt et al. (1995).

4.1.4.5 Auswertung der Kompetitionsbindungen

Die Kompetitionsbindung ermöglicht die Bestimmung der Affinitätswerte unmarkierter Substanzen (in diesem Fall KCOs). Diese konkurrieren mit dem Radioliganden (L*, [³H]-P1075) um die Rezeptorbindungsstelle. Die [³H]-P1075-Konzentration wurde konstant gehalten (L*≈K_L; ca. 1 nmol/l), die Konzentrationen wurden über mehrere Zehnerpotenzen variiert. Durch halblogarithmische Auftragung der KCO-Konzentrationen (-log[L]) gegen die spezifische Bindung erhält man sigmoide, fallende Kurven, die nachstehenden Gleichungen (Ehle et al., 1985; Lemoine et al., 1985) folgen:

$$B_S([L]) = B_0 - B_0 \frac{[L]}{[L] + K_L (1 + [L^*]/K_L^*)} \quad \text{Gl. 4}$$

B₀ und B_S([L]) stellen die spezifische Bindung des Radioliganden [L]* ([³H]-P1075) in Abwesenheit und in Gegenwart von [L] dar. K_L* und K_L bezeichnen die Gleichgewichtskonstante des Radioliganden [³H]-P1075 bzw. des kompetierenden Li-

ganden. Aus der KCO-Konzentration, bei der der Radioligand nur noch zu 50% bindet (IC_{50} , Wendepunkt der sigmoiden Kurve), kann die Dissoziationskonstante (K_D) der KCOs mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung errechnet werden.

Die zur Berechnung notwendigen pK_L^* -Werte für den Radioliganden [3H]-P1075 wurde der Literatur entnommen (Lemoine et al., 1996; Lemoine et al., 1998)

$$K_D = \frac{IC_{50}}{(1 + [L^*]/K_L^*)} \quad \text{Gl. 5}$$

Substanzen

Bimakalim	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
BPDZ44	Pirotte (Universität Liège ; Belgien)
BPDZ79	Pirotte (Universität Liège ; Belgien)
Carbachol	Sigma (St. Louis, Montana USA)
Glibenclamid	Aventis AG (Frankfurt, Deutschland)
Nitroprussid-Natrium	RBI Research Chemicals Int. (Natick, MA, USA)
P1075	Leo (Ballerup, Dänemark)
3H -P1075	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Radioligandbindung am K_{ATP} -Kanal mit [3H]-P1075

Mit [3H]-P1075 stand ein agonistischer K_{ATP} -Kanal-Radioligand zur Verfügung (Manley et al., 1993; Quast et al., 1993). Mit [3H]-P1075 kann belegt werden, dass die synthetisierten Verbindungen mit dem K_{ATP} -Kanal interagieren, und die Dissoziationskonstanten der KCO-Testsubstanzen können mit diesem Radioligand-Verdrängungstest ermittelt werden. Mit Hilfe der Gleichungen (Gl.4 und Gl. 5) konnten die Dissoziationskonstanten (pK_D) für die untersuchten Verbindungen errechnet werden. Aufgrund der Konzeption des Experimentes war es nicht möglich festzustellen, ob die Verbindungen am K_{ATP} -Kanal eine agonistische oder antagonistische Wirkung ausübten. Deshalb wurden darüber hinaus Relaxationsexperimente an der Aorta und der Trachea der Ratte durchgeführt, die später beschrieben werden.

4.2.1.1 Kultivierte glatte Muskelzellen der Rattenaorta (RASMC)

4-Chloranilinochromanole und kardioprotektive $K_{ATP}CO$

Die Resultate der Kompetitionsbindungen sind in Tab. 4.1 (S. 81 f) aufgeführt. Die höchste Affinität dieser Reihe zeigt die Verbindung (3R,4S)-JS09 mit $pK_D = 6.06 \pm 0.08$, die sich von BMS-191095 durch Austausch der Cyanogruppe durch eine Nitrogruppe ableitet. Die Leitstruktur BMS-191095 zeigte dagegen eine geringere Affinität von $pK_D = 5.79 \pm 0.04$ (s. Abb. 4.1).

Die Umkehrung der Konfiguration an Position 3 und 4 des Chromengrundgerüsts von (3R,4S)-JS09 führte zur Verbindung (3S,4R)-JS09, die etwa 10-fach niedriger affin ist, als das (3R,4S)-Enantiomer (Abb. 4.1). Die Umkehrung der Konfiguration von (3R,4S)-BMS-191095 zeigte dagegen nur einen Affinitätsverlust um das 5-fache ((3S,4R)-BMS-191095 $pK_D = 5.09 \pm 0.05$). Die Acetylierung der Hydroxylgruppe von (3R,4S)-JS09 brachte einen Affinitätsverlust um etwa den Faktor 7 ((3R,4S)-JS-09-Ac $pK_D = 5.20 \pm 0.09$) gegenüber (3R,4S)-JS-09 (Abb. 4.2).

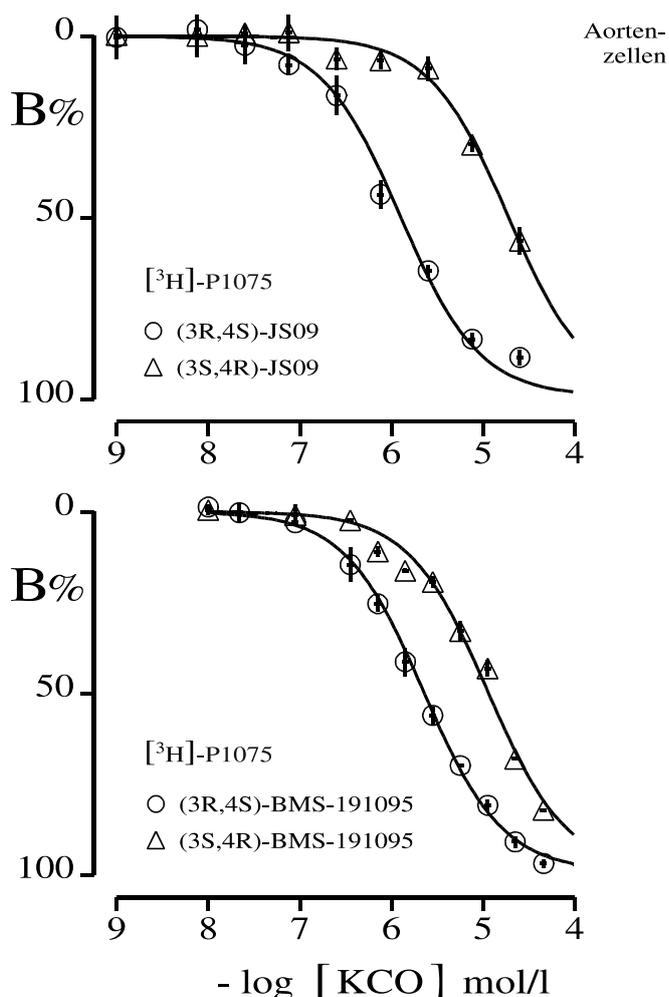


Abb. 4.1: Vergleich der Enantiomere von BMS-191095 und seines Nitro-Derivates JS-09: Radioligandbindung mit [³H]-P 1075 an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta

Vor Start der Radioligandbindung mit [³H]-P1075 wurde der Zellkultur-Puffer DMEM gegen die mit HEPES gepufferte Salzlösung ausgetauscht und die Reaktion durch Gabe des Radioliganden [³H]-P1075 und der entsprechend verdünnten Testsubstanzen gestartet. Die Inkubationszeit betrug 45 min bei einer Temperatur von 37°C. Die Bindungsreaktion wurde durch Absaugen der Inkubationslösung und dreifaches Waschen mit kalter Salzlösung (4°C) gestoppt und die verbliebenen gewaschenen Zellen mit NaOH abgelöst und in Vials überführt. Nach Zugabe von Szintillator wurden die Proben im Szintillatorcounter bei einer Effizienz von 50% vermessen. Die Berechnung der sigmoiden Kurven resultierte aus Gl. 4. Die Auftragung der Kurve erfolgte von 0% bis 100%, wobei 0% Verdrängung (B% = 0) der Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des kompetierenden Ligand entspricht und 100% Verdrängung (B = 100) der unspezifischen Bindung des Radioliganden, welche durch einen Überschuss an kaltem P-1075 (1 µM) definiert ist, entspricht. Die Symbole zeigen die Mittelwerte ± SEM (SEM werden durch die senkrechten Balken dargestellt).

Oben: Die Verbindung (3R,4S)-JS09 zeigt in der Bindung mit [³H]-P1075 an den glattmuskulären Aortenzellen eine signifikant höhere Affinität mit einem pK_D von 6.06 ± 0.08 als (3S,4R)-JS09 mit pK_D = 4.88.

Unten: Die Leitsubstanz (3R,4S)-BMS-191095 hat gegenüber seinem Enantiomer (3S,4R)-BMS-191095 einen geringeren Affinitätsunterschied (pK_D = 5.79 vs. pK_D = 5.09).

(pK_D-Werte s. Tab. 4.1)

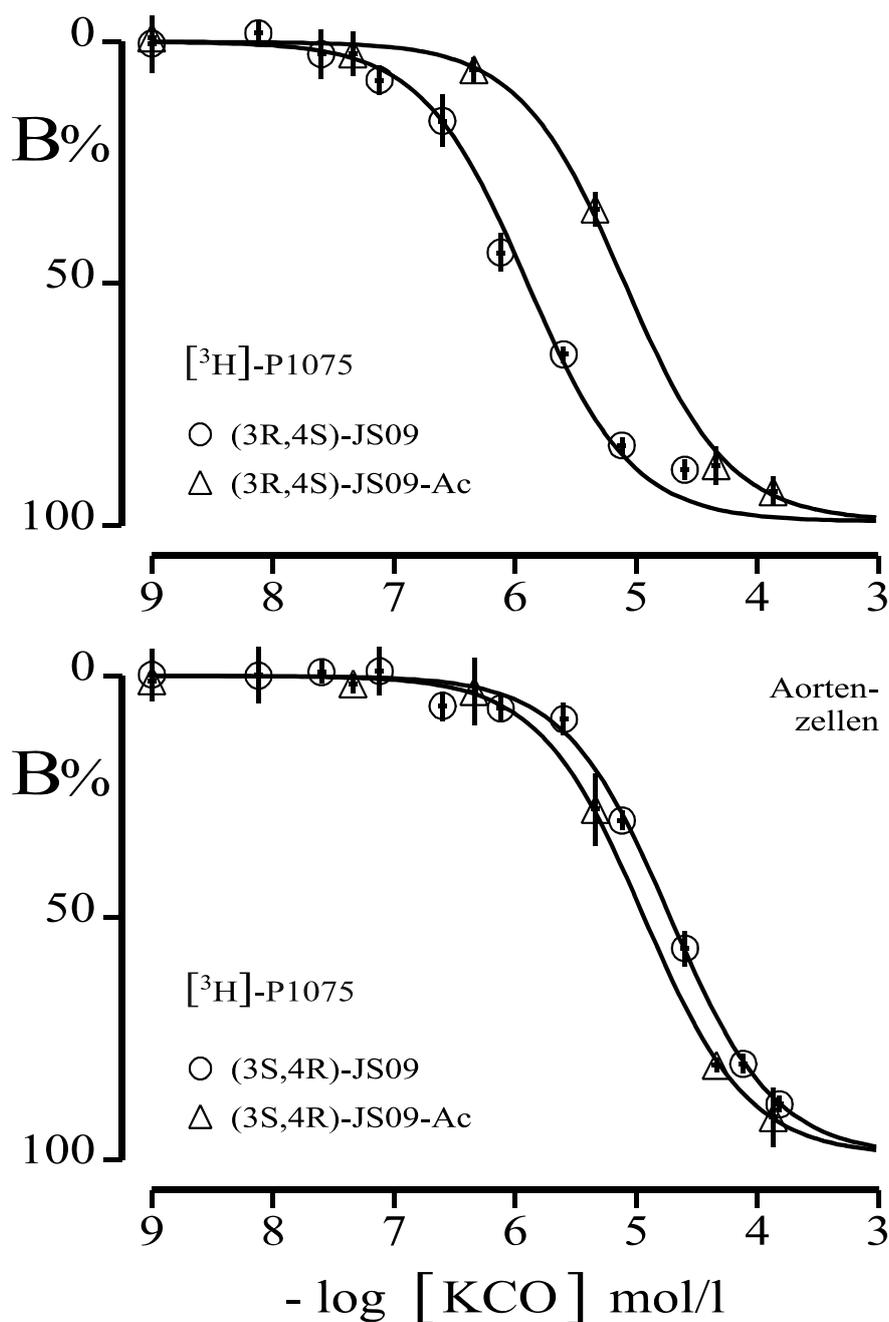


Abb. 4.2: Vergleich beider Enantiomere von JS09 und seiner acetylierten Derivate: Radioligandbindung mit $[^3\text{H}]$ -P-1075 an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta

Oben: Die Acetylierung der Hydroxygruppe bewirkt bei (3R,4S)-JS-09 einen Affinitätsverlust um etwa den Faktor 10. ($\text{pK}_D = 6.06$ vs. 5.20)

Unten: Die Acetylierung der Hydroxygruppe bewirkt bei der Verbindung (3S,4R)-JS09 sogar eine geringe Umkehrung der Affinität ($\text{pK}_D = 4.88$ vs. 5.05).

(pK_D -Werte s. Tab. 4.1)

Für die niederaffine Substanz (3S,4R)-JS09 bedeutete die Acetylierung zu (3S,4R)-JS09-Ac kaum Änderung der Bindungsaffinität am K_{ATP} -Kanal ((3R,4S)-JS09 $pK_D = 4.88$ vs. (3S,4R)-JS09-Ac $pK_D = 5.05$, Abb. 4.2), wobei sich die Werte geringfügig umkehren.

Auch der Austausch einer Dimethylgruppe gegen eine Methyl-Propylgruppe ((3R,4S)-JS-16), die bei einem Thioamid der Benzopyranreihe (Sato und Koga et al., 1993) zu einer höheren biologischen Aktivität und zu einer stärkeren Bindung an den K_{ATP} -Kanal beitrug, brachte einen Aktivitätsverlust im Vergleich mit (3R,4S)-JS09 ($\Delta pK_D = -0.39$ s. Tab. 4.1).

Die Substanz (3R,4S)-JS33, die an Position 6 eine Sulfonamidstruktur besitzt, zeigte keine verbesserten Bindungseigenschaften gegenüber (3R,4S)-JS09 (Abb. 4.3).

Die kardioselektive Substanz der ersten Generation BMS-180448 hingegen besaß eine Affinität von 6.29 ± 0.03 (Tab. 4.1).

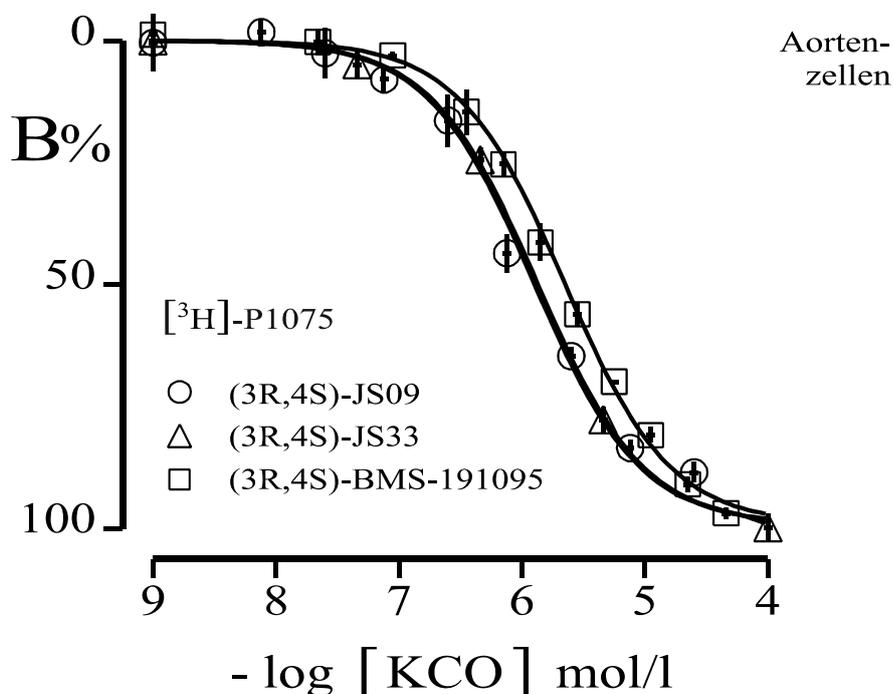
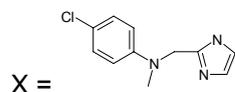


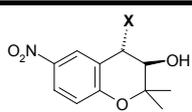
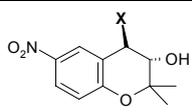
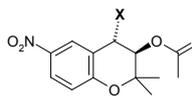
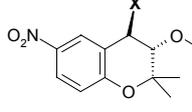
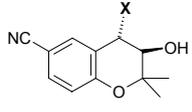
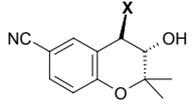
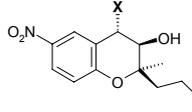
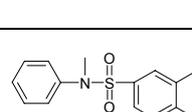
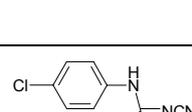
Abb. 4.3: Vergleich des Sulfonamid-substituierten Derivates (3R,4S)-JS33 mit (3R,4S)-BMS-191095 und seinem Nitro-Derivat (3R,4S)-JS09: Radioligandbindung mit [3H]-P-1075 an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta

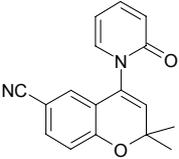
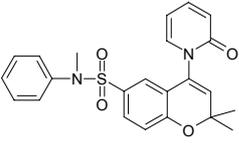
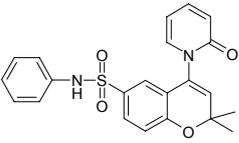
(3R,4S)-JS33 besitzt an Position 6 eine Sulfonamidstruktur. Die Substanz besitzt eine etwas schwächere Affinität als (3R,4S)-JS09 ($pK_D = 5.97$ vs. 6.06) und etwa gleich hohe Affinität zu (3R,4S)-BMS-191095 ($pK_D = 5.97$ vs. 5.79).

(pK_D -Werte s. Tab. 4.1)

Tab. 4.1: Ergebnisse der Kompetitionsstudie mit 4-Chloranilinochromanolen an kultivierten Muskelzellen der Rattenaorta (RASCМ) und an Herzmuskelzellen der Ratte



Strukturformel	Substanz	RASCМ pK _D	Herzzellen pK _D	ΔpK _D
	(3R,4S)-JS09	6.06 ± 0.08	5.89 ± 0.04	0.17 ± 0.09
	(3S,4R)-JS09	4.88 ± 0.06	5.10 ± 0.08	- 0.22 ± 0.10
	(3R,4S)-JS09-Ac	5.20 ± 0.09	4.96 ± 0.05	0.24 ± 0.10
	(3S,4R)-JS09-Ac	5.05 ± 0.13	4.98 ± 0.08	0.07 ± 0.15
	(3R,4S)-BMS-191095	5.79 ± 0.04	5.62 ± 0.07	0.17 ± 0.08
	(3S,4R)-BMS-191095	5.09 ± 0.05	5.12 ± 0.07	- 0.03 ± 0.09
	JS16	5.67 ± 0.10	5.53 ± 0.07	0.14 ± 0.11
	JS33	5.97 ± 0.06	5.72 ± 0.05	0.25 ± 0.08
	(3S,4R)-BMS-180448 ^b	6.29 ± 0.03	6.23 ± 0.05	0.06 ± 0.06

Strukturformel	Substanz	RASCM pK _D	Herzzellen pK _D	ΔpK _D
	Bimakalim	7.98 ± 0.04	7.51 ± 0.05	0.47 ± 0.06
	ES-150 ^a	7.87 ± 0.12	7.69 ± 0.05	0.18 ± 0.13
	ES-44 ^a	8.05 ± 0.04	7.83 ± 0.04	0.22 ± 0.06

a Salamon et al., 2002

b Lemoine et al., 1998

Pyridone als acyclische Phenoether

Als Leitstruktur für diese Pyridone diene das von Salamon (Salamon et al., 2002) synthetisierte Benzopyranderivat ES150. Dieses war ähnlich affin am K_{ATP}-Kanal (pK_D = 7.87) wie die Muttersubstanz Bimakalim (pK_D = 7.98). Mit der Substanzklasse der acyclischen Phenoether konnte keine Affinitätssteigerung bezüglich ES-150 erzielt werden (s. Tab. 4.2, S. 84).

In der Reihe der linear-aliphatischen Pyridone wird der Einfluss der Substituenten auf die Affinität deutlich. Das Phenol JS39 hat die niedrigste Affinität mit pK_D = 4.56. Durch Alkylierung der Hydroxylgruppe konnte eine Affinitätssteigerung erzielt werden. Durch Einführung eines Methylrestes wurde die Affinität gering vergrößert (0.25 log-Einheiten, Tab. 4.2). Der Austausch der Methylgruppe gegen eine Ethylgruppe (JS42) führte zu einer Affinitätssteigerung um 1.32 log-Einheiten gegenüber JS39 (pK_D = 5.88 vs. pK_D 4.56; Tab. 4.2). Dieser Effekt konnte mit einer n-Propylgruppe (JS43) um 1.63 log-Einheiten gegenüber JS39 gesteigert werden (pK_D = 6.19 vs. pK_D = 4.56, Tab. 4.2). Die Alkylierung des Phenols mit einem ungesättigten Propenrest (JS49) führte dagegen zu einer Verringerung der Affinität pK_D = 5.56 gegenüber 6.19 des Propyl-Derivates (JS43). Eine Vergrößerung der gesättigten, aliphatischen Alkylkette bedeutete somit eine Erhöhung der Affinität zum K_{ATP}-Rezeptor um das 40-fache gegenüber dem Phenol.

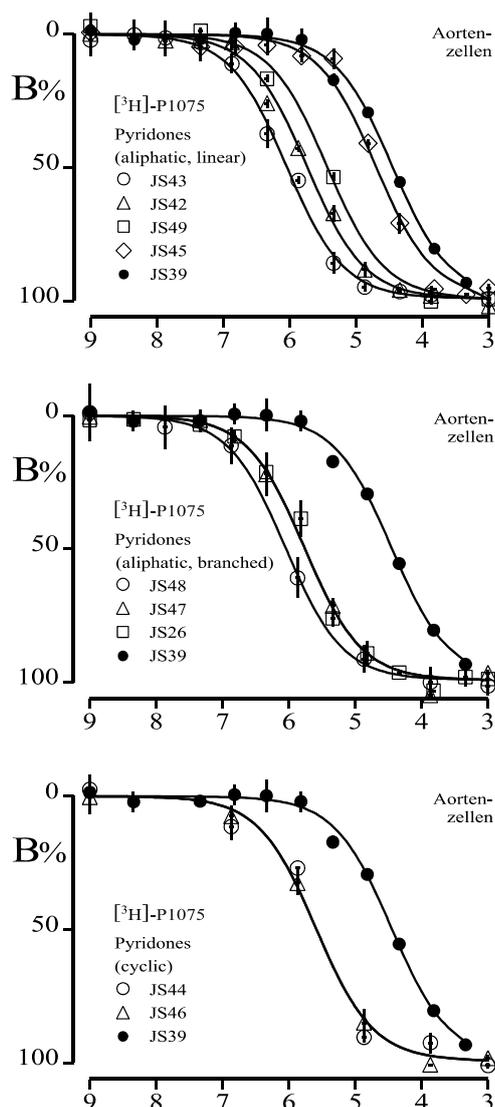


Abb. 4.4: Vergleich linear-aliphatisch (oben), verzweigt aliphatisch (Mitte) und cyclisch (unten) substituierter Pyridone: Radioligandbindung mit $[^3\text{H}]\text{-P-1075}$ an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta

Oben: Durch Verlängerung der unverzweigten Alkylkette der Alkyloxystruktur, konnte eine Affinitätserhöhung gegenüber der Hydroxygruppe erzielt werden. $-\text{OH} < -\text{CH}_3 < -\text{C}_2\text{H}_5 < \text{C}_3\text{H}_7$ (JS39<JS45<JS42<JS43). Die Einführung eines Propenrestes JS49 zeigt gegenüber dem Propylrest JS43 eine um 0.62 log-Einheiten niedrigere Affinität.

Mitte: Der Austausch der unverzweigten aliphatischen Alkylketten gegen raumerfüllende, verzweigte Alkylketten führte zu Verbindungen, deren Dissoziationskonstanten bei ca. $\text{pK}_D = 6$ lagen. Dabei zeigte die Methylbutyl-substituierte Verbindung JS48 eine etwas höhere Affinität gegenüber den beiden Derivaten JS26 u. JS43.

Unten: Das Einbringen cyclischer Reste brachte Substanzen mit einem pK_D -Wert von 5.70. Die Substitution mit einem Benzylrest (JS44) unterschied sich nicht vom Cyclopropylmethyl-substituierten (JS46) hinsichtlich der Bindungsaffinität.

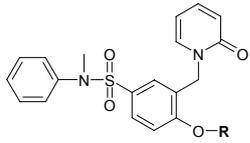
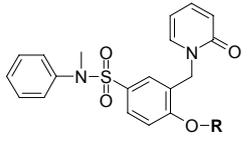
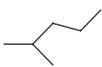
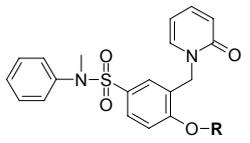
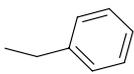
(pK_D -Werte s. Tab. 4.2)

Die Reihe der verzweigt aliphatischen Pyridone zeigte die gleichen Bindungsaffinität wie die längerkettigen, unverzweigten aliphatischen Pyridone.

Die Einführung eines Isopropylrestes (JS26) bzw. eines 2,2-Dimethylpropylrestes (JS47) führte zu Verbindungen, die signifikant gleiche Affinitäten aufwiesen mit etwa $pK_D = 5.88$ (s. Tab. 4.2). Eine Affinitätssteigerung konnte dagegen mit der Verbindung JS48 erzielt werden ($pK_D = 6.17$, Tab. 4.2), bei der das Phenol mit einem 1-Methylbutylrest substituiert ist.

Die Einführung carbocyclischer Alkylsubstituenten am Phenol brachte jedoch keine Affinitätssteigerung gegenüber den acyclischen Phenoether. Das Benzylderivat JS44 zeigte im Vergleich zum Cyclopropylderivat praktisch identische Dissoziationskonstanten (pK_D 5.71 vs. 5.72, Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ergebnisse der Kompetitionsstudie mit der Substanzklasse der Pyridone als offene Phenoether an kultivierten Aortenmuskelzellen (RASCN) und Herzmuskelzellen der Ratte

Pyridone aliphatisch, linear	R		RASCN pK_D	Herzellen pK_D	ΔpK_D
	- H	JS39	4.56 ± 0.05	4.30 ± 0.07	0.26 ± 0.09
	- CH ₃	JS45	4.81 ± 0.06	4.82 ± 0.04	-0.01 ± 0.07
	- C ₂ H ₅	JS42	5.88 ± 0.04	5.25 ± 0.08	0.63 ± 0.09
	- C ₃ H ₇	JS43	6.19 ± 0.06	5.66 ± 0.10	0.53 ± 0.12
		JS49	5.56 ± 0.06	5.61 ± 0.08	-0.05 ± 0.10
Pyridone aliphatisch, verzweigt	R		RASCN pK_D	Herzellen pK_D	ΔpK_D
		JS26	5.87 ± 0.05	5.69 ± 0.07	0.18 ± 0.09
		JS47	5.88 ± 0.09	5.60 ± 0.06	0.31 ± 0.11
		JS48	6.17 ± 0.12	5.57 ± 0.07	0.60 ± 0.14
Pyridone cyclisch					
		JS44	5.71 ± 0.09	5.40 ± 0.09	0.31 ± 0.13
		JS46	5.72 ± 0.09	5.42 ± 0.08	0.30 ± 0.12

Amide/ Thioamide als offene Phenoether

Als Leitstruktur für diese Substanzklasse dienten Thioamide aus der Benzopyranreihe (Sato und Koga et al., 1993), die eine außerordentliche Affinität zum K_{ATP} -Kanal aufweisen. Bei den hier getesteten „offenen“ acyclischen Phenoethern mit einer zusätzlichen Amid/Thioamid-Struktur ergaben sich folgende Bindungsdaten (s. Tab. 4.3)

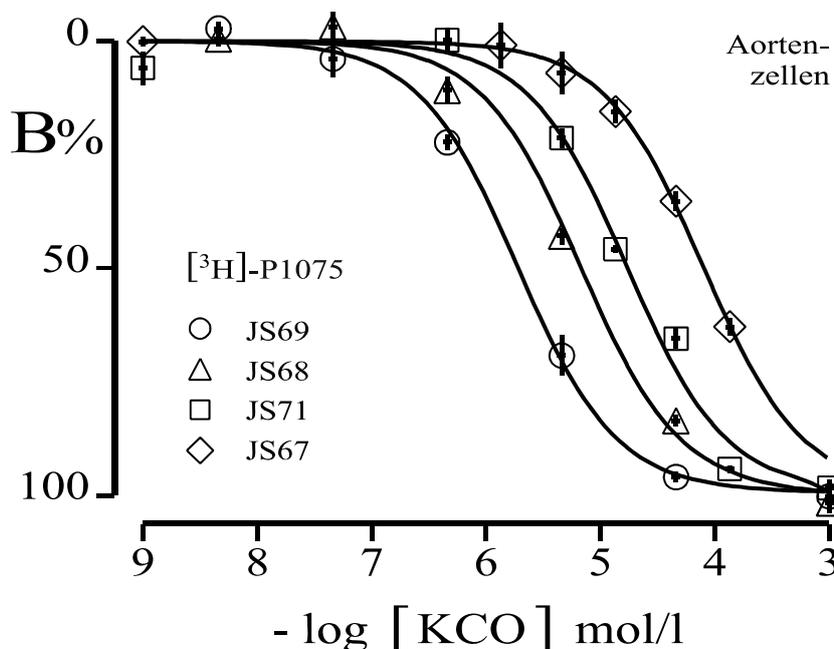


Abb. 4.5: Vergleich von Amiden/Thioamiden : Radioligandbindung mit [³H]-P 1075 an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta

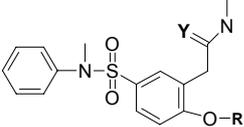
Die Substanzklasse der Amide zeigte eine geringe Bindungsaffinität am K_{ATP} -Kanal. Durch Verlängerung der Alkylkette an der Alkyloxygruppe konnte eine Affinitätssteigerung erzielt werden (Methyl (JS67) vs. Propyl (JS68)) $\Delta pK_D = 1.03$. Der Vergleich des Thioamids (JS69) mit dem Amid (JS68) brachte eine Affinitätssteigerung um etwa den Faktor 5.

(pK_D -Werte s. Tab. 4.3)

In der Klasse der Amide und Thioamide zeigten sich trotz geringer Affinität deutliche Unterschiede: Die Vergrößerung der Alkylkette des Ethers bewirkte ähnlich wie bei den Pyridonen eine Affinitätssteigerung. Sie beginnt mit $pK_D = 4.25$ bei der Methylverbindung JS67. Durch die Anwesenheit eines Ethylrestes (JS71) konnte die Affinität um etwa das 5-fache bzw. durch einen Propylrest (JS68) um das 10-fache gesteigert werden (Tab. 4.3).

Durch Austausch des Sauerstoffs der Amidgruppe (JS68) gegen ein Schwefelatom (JS69), konnte eine weitere Steigerung der Bindungsaffinität um das 5-fache bewirkt werden ($pK_D = 5.28$ vs. $pK_D = 5.83$; Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Ergebnisse der Kompetitionsstudie mit der Substanzklasse der Amide/Thioamide als offene Phenoether an kultivierten Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM) und an Herzmuskelzellen der Ratte

Amide/Thioamide	R	Y	Substanz	RASCM pK _D	Herzzellen pK _D	ΔpK _D
	- CH ₃	O	JS67	4.25 ± 0.04	3.99 ± 0.07	0.26 ± 0.08
	- C ₂ H ₅	O	JS71	4.92 ± 0.05	4.57 ± 0.10	0.35 ± 0.11
	- C ₃ H ₇	O	JS68	5.28 ± 0.06	5.08 ± 0.08	0.20 ± 0.10
	- C ₃ H ₇	S	JS69	5.83 ± 0.06	5.28 ± 0.10	0.55 ± 0.12

4.2.2 Ergebnisse an Rattenherzzellen

Die Kompetitionsbindungsexperimente wurden auch an intakten Herzzellen der Ratte durchgeführt. Im Vergleich zu den Aortenzellen sind die Herzzellen wesentlich jünger, weil diese ca. 60 Minuten nach dem Tiertod in intaktem Zustand zur Verfügung stehen. Die Aortenzelle dagegen benötigen als Explantkulturen ca. 24 Tage um im Experiment eingesetzt zu werden. In Bindungsexperimenten an intakten Zellen ist die Zugabe von ATP für die Bindungsfähigkeit von K_{ATP} -Kanalantagonisten nicht nötig.

Die Ergebnisse der Experimente an Rattenherzzellen ergeben sigmoide Kurven und entsprechen qualitativ weitgehend den Ergebnissen der Untersuchung an den glattmuskulären Zellen der Rattenaorta. Im Vergleich zum Aortenmodell konnte bei nahezu allen Substanzen eine niedrigere Affinität nachgewiesen werden. (s. Tab. 4.1 bis Tab. 4.3).

Tab. 4.4: Enantiomerischer Quotient aus der Kompetitionsstudie mit $[^3H]$ -P1075

Substanz	enantiomerischer Quotient	
	RASCM	Herzzellen
(3R,4S)-JS-09	1.18 ± 0.10	0.79 ± 0.09
(3S,4R)-JS09		
(3R,4S)-JS-09-Ac	0.15 ± 0.16	-0.02 ± 0.09
(3S,4R)-JS09-Ac		
(3R,4S)-BMS-191095	0.70 ± 0.11	0.50 ± 0.09
(3S,4R)-BMS-191095		

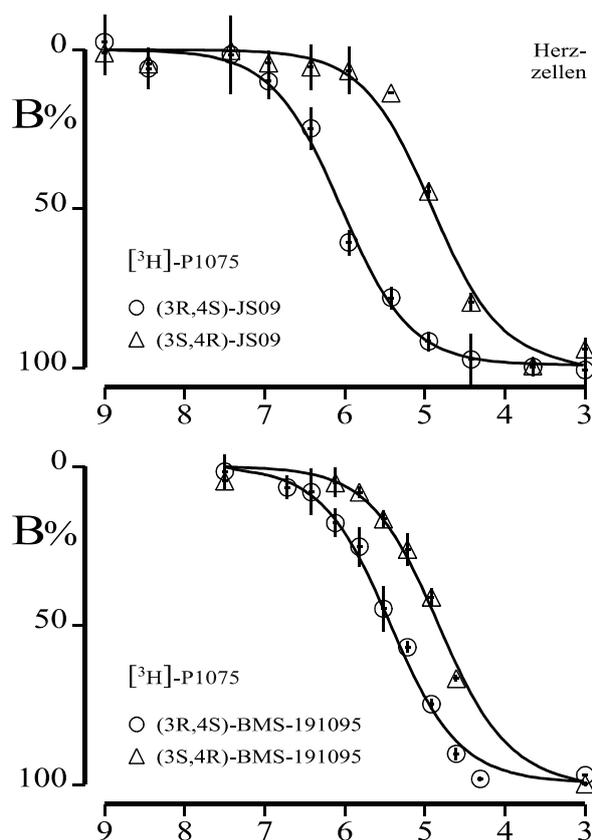


Abb. 4.6: Vergleich der Enantiomere von BMS-191095 und seines Nitro-Derivates JS09: Radioligandbindung mit [³H]-P 1075 an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Enzymatisch desaggregierte Zellen des Rattenherzens kommen bei diesem Bindungsexperiment zur Verwendung. Die Methode der Gewinnung der Herzmyozyten wurde ausführlich im Methodenteil beschrieben. Der Versuch wird wie folgt durchgeführt: es wurde eine Verdünnungsreihe des $K_{ATP}CO$ in DMSO/Wasser hergestellt, bei der die Endkonzentration des Lösungsmittels im Testansatz 1 ‰ nicht überschreitet. KCO , der Radioligand [³H]-P1075 und die Rezeptoren aus dem Rattenherzen wurden vermischt und 45 min bei 37°C inkubiert. Der gebundene Anteil des Radioliganden wurde vom freien Radioliganden durch Vakuumfiltration über Glasfaserfilter getrennt. Die ausgestanzten Filter wurden in Szintillationsvials überführt und 1 ml Szintillator hinzugegeben. Unter Lichtausschluss wurden die Testansätze 60 min geschüttelt und danach im Szintillationscounter vermessen.

Bei 10^{-3} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit 2 μ M P1075 bestimmt wurde.

Oben: Die Verbindung (3R,4S)-JS09 zeigte, wie nahezu alle Substanzen an der Herzmembran eine um etwa $\Delta pK_D = 0.17$ niedrigere Affinität als an der glatten Muskelzelle der Rattenaorta. (3R,4S)-JS09 zeigt gegenüber (3S,4R)-JS09 eine um fast 0.8 log-Einheiten höhere Affinität ($pK_D=5.89$ vs. $pK_D=5.10$)

Unten: Die Leitsubstanz (3R,4S)-BMS-191095 hat gegenüber ihrem Enantiomer (3S,4R)-BMS-191095 einen geringeren Affinitätsunterschied von ($pK_D=5.62$ vs. $pK_D = 5.12$)

(pK_D -Werte s. Tab. 4.1, S. 81 f)

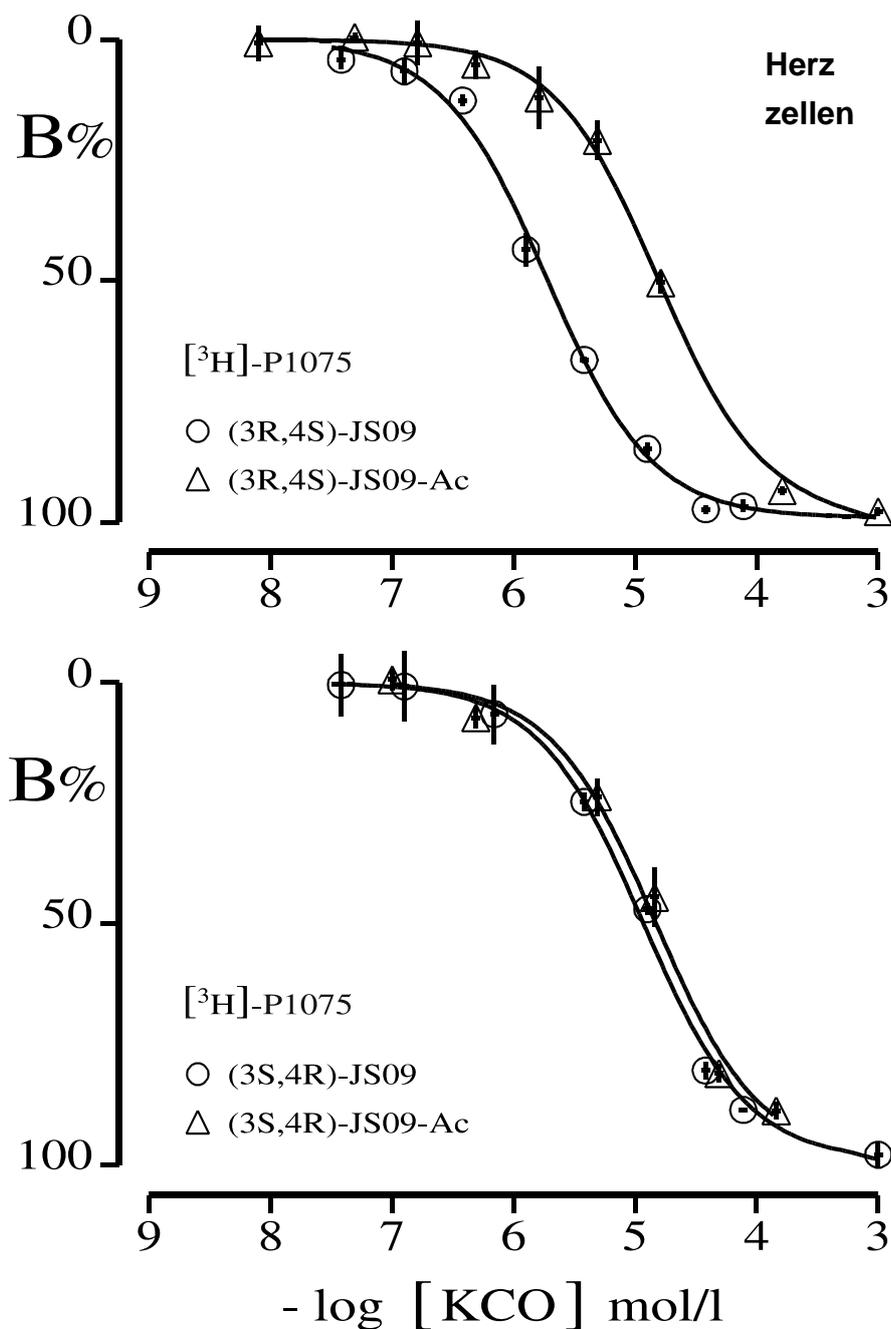


Abb. 4.7: Vergleich beider Enantiomere von (3R,4S)-JS09 und seiner acetylierten Derivate: Radioligandbindung mit $[^3\text{H}]\text{-P 1075}$ an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Bei 10^{-3} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit $2\ \mu\text{M}$ P1075 bestimmt wurde.

Oben: Die Acetylierung der Hydroxygruppe bewirkt bei (3R,4S)-JS09 mit $\text{pK}_D = 4.96$ einen Affinitätsverlust um etwa den Faktor 10 .

Unten: Die Acetylierung der Hydroxygruppe bewirkt bei der Verbindung (3S,4R)-JS09 eine sehr geringe Änderung ihrer Affinität.

(pK_D -Werte s. Tab. 4.1, S. 81f)

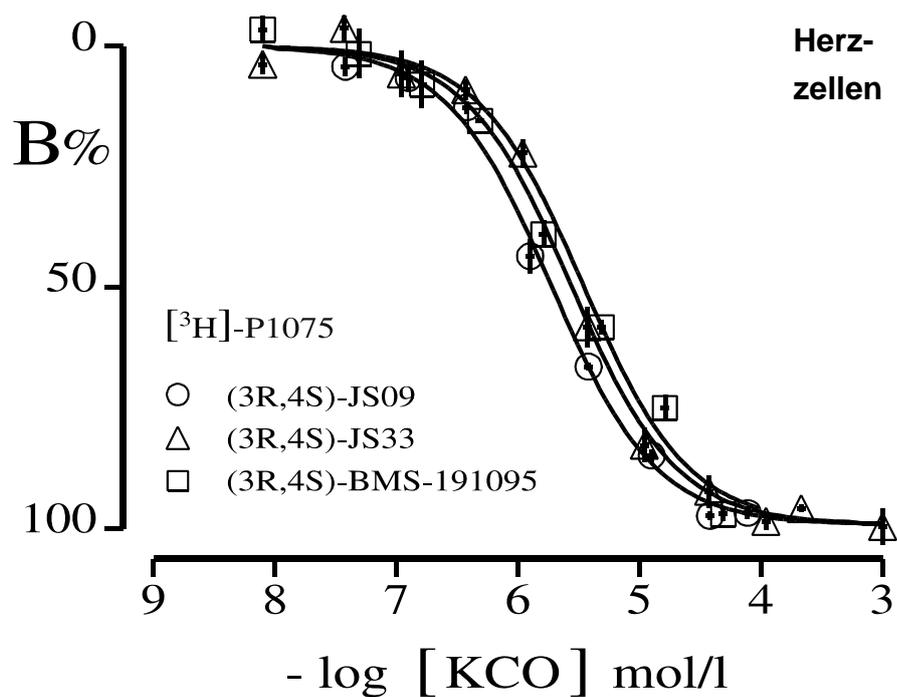


Abb. 4.8: Vergleich des Sulfonamids (3R,4S)-JS33 mit (3R,4S)-BMS-191095 und seinem Nitro-Derivat (3R,4S)-JS09: Radioligandbindung mit [³H]-P 1075 an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Bei 10^{-3} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit 2 μ M P1075 bestimmt wurde.

Die Substanz (3R,4S)-JS33, die den Sulfonamidrest an Position 6 trägt, hat mit $pK_D = 5.72 \pm 0.05$ eine etwa schwächere Affinität gegenüber (3R,4S)-JS09 und eine höhere Affinität als (3R,4S)-BMS-191095.

(pK_D -Werte s. Tab. 4.1)

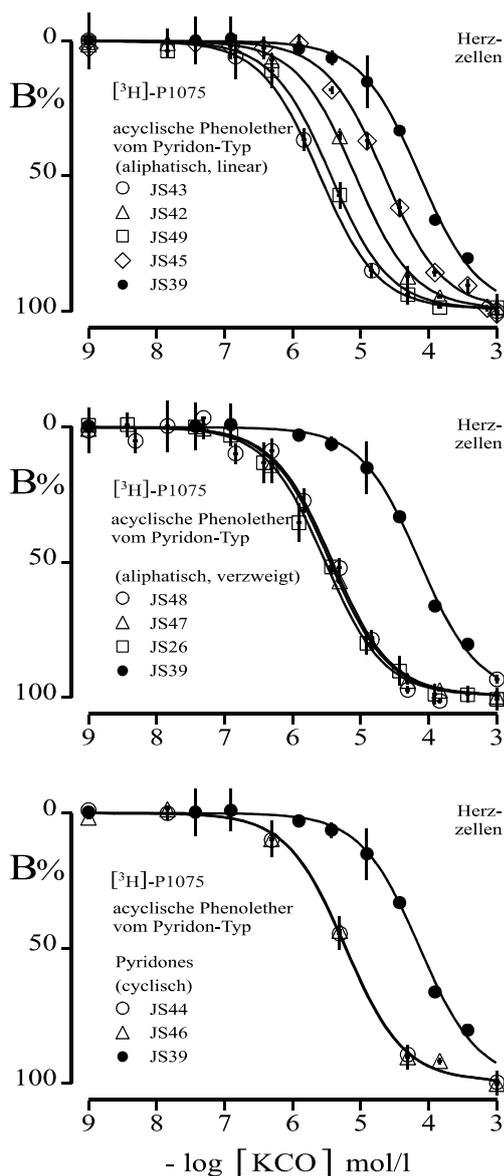


Abb. 4.9: Vergleich linear-aliphatisch (oben), verzweigt aliphatisch (Mitte) und cyclisch (unten) substituierter Phenoether aus der Reihe der Pyridone: Radioligandbindung mit $[^3\text{H}]\text{-P 1075}$ an isolierten Herzmuskelzellen der Ratten

Bei 10^{-3} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit $2 \mu\text{M}$ P1075 bestimmt wurde.

Oben: Verlängerung der Alkylkette der Alkyloxygruppe ruft eine Steigerung der Affinität hervor. Der Austausch des Propylrestes gegen einen Propenylrestes zeigt keinen Affinitätsunterschied.

Mitte: Die Einführung verzweigter Aliphaten führt zu Verbindungen, die sich untereinander in ihrer Affinität nicht unterscheiden.

Unten: Die cyclischen Verbindungen zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Affinität zum Rezeptor. Zum Vergleich wurde in allen Fällen das PhenolJS39 gezeigt.

(pK_D -Werte s. Tab. 4.2, s. 84)

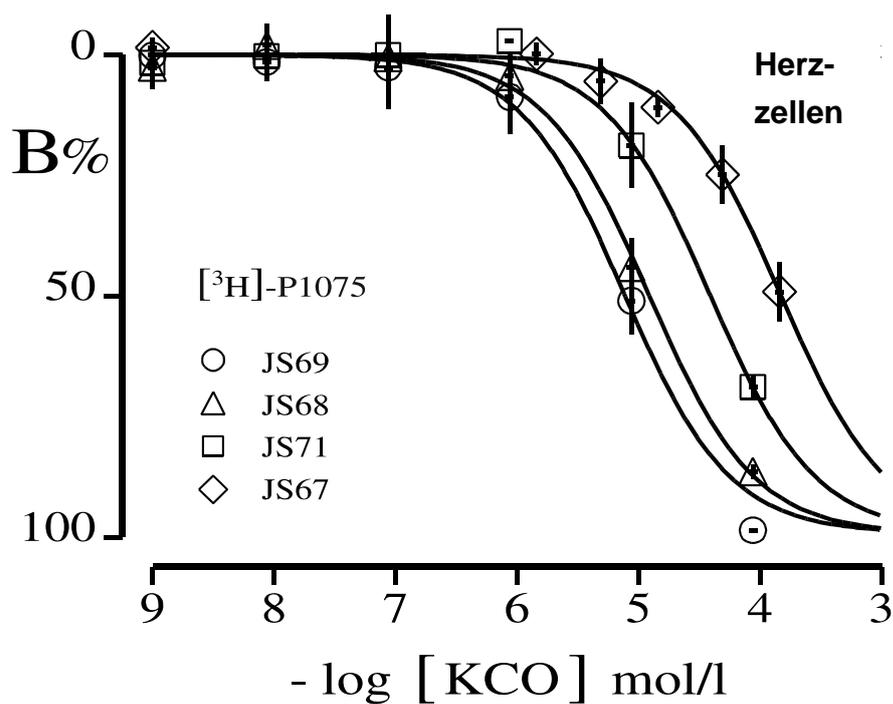


Abb. 4.10: Vergleich von Amiden/Thioamiden : Radioligandbindung mit $[^3\text{H}]\text{-P 1075}$ an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

Bei 10^{-3} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit $2 \mu\text{M}$ P1075 bestimmt wurde.

Die Verbindungen der Substanzklasse der Amide und Thioamide zeigen hier in etwa die gleichen Affinitätsunterschiede wie an den glatten Muskelzellen der Rattenaorta.

(pK_D - Werte s. Tab. 4.3, S. 86)

4.3 Funktionelle Experimente an isolierten Aorten und Tracheen der Ratte

Da die Kompetitionsbindung mit [^3H]-P1075 nur eine Affinität der Testsubstanzen zum K_{ATP} -Kanal ergibt und prinzipbedingt nicht zwischen Agonisten und Antagonisten unterscheiden kann, wurden Relaxationsexperimente an Rattenaortenringen und Rattentrachealstreifen durchgeführt.

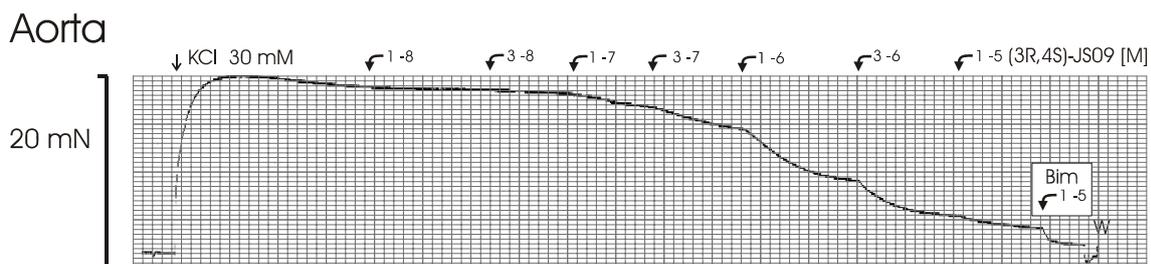


Abb. 4.11: Originalregistrierung eines Relaxationsexperiments mit (3R,4S)-JS09 an der Ratte aorta zur Erstellung einer kumulativen Dosiswirkungskurve

Nach entsprechender Präparation der Aorta wurde das Gewebe mit 5 mN vorgedehnt. Dabei wurde die Krebslösung alle 20 Minuten gewechselt. Nach einer einstündigen Equilibrierungsphase wurde eine erste Kontraktur mit 30 mM KCl ausgelöst. Diese wurde nach 15 Minuten durch Austausch der Pufferlösung durch frische Krebslösung abgebrochen. Der Muskeltonus ging dabei auf den Basalwert zurück (wird hier nicht gezeigt). Nach einer weiteren Stunde wurde eine zweite Kontraktur mit der gleichen KCl-Konzentration ausgelöst. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus (nach ca. 1.5 – 2 Std.) wurde die Testsubstanz (3R,4S)-JS-09 kumulativ hinzugegeben. Dabei löste der K_{ATP} -Kanal-Antagonist die Relaxation des Gewebes aus. Am Ende des Versuchs wurde Bimakalim zur Bestimmung des Maximaleffektes eines K_{ATP} -Kanal-Antagonisten hinzugegeben und nach Erreichen eines stabilen Tonus das Gewebe mit frischer Krebslösung mehrfach gewaschen.

Die Abb. 4.11 zeigt die Originalregistrierung eines Relaxationsexperiments an der Rattenaorta mit (3R,4S)-JS09. Nach Präparation der Aortenringe wurden diese mehrfach in den Blinksbädern mit Krebspufferlösung gewaschen und mit Kaliumchlorid (30 mM) vorkontrahiert (nicht im Bild dargestellt). Um das Experiment zu starten, wurde durch Zugabe von Kaliumchlorid (indiziert mit 30 mM) die Kontraktion an der Aorta ausgelöst. Verursacht wird sie durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration. Diese bewirkt die Anhebung des Membranpotentials bis zum Durchbrechen des Schwellenpotentials für die spannungsabhängigen Calciumkanäle. Die so erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Kontraktur des glatten Muskels.

Nachdem sich das Equilibrium eingestellt hat (ca. 1.5 – 2 h), wurde die Testsubstanz (3R,4S)-JS09 beginnend mit 10^{-8} M kumulativ zum Gewebe hinzugegeben. Mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M ist die Auslöseschwelle der Relaxation des Aortenrings

erreicht. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M wurde in etwa der halbmaximale Effekt von (3R,4S)-JS09 erreicht. Mit der letzten Dosis wurde eine Endkonzentration von 10^{-5} M erzielt. Diese hatte kaum noch einen Effekt auf die Relaxation der Aortenringe. Um die Maximalrelaxation der Aortenringe, die durch einen K_{ATP} -Kanal-Antagonist erreicht wird, zu testen, wurde Bimakalim (Bim 10^{-5} M) zugesetzt. Am Ende des Versuchs wurde das Gewebe mit physiologischer Krebspufferlösung gewaschen (W).

4.3.1 4-Chloranilinoderivate und (3S,4R)- BMS-180448

Alle Ergebnisse der Relaxationsstudie sind in Tab. 4.5 (S. 101) aufgelistet. Hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit zeigten alle untersuchten 4-Chloranilinoderivate einen ausgeprägten vasorelaxierenden Effekt. Es kann angenommen werden, dass dieser durch die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle verursacht wird, weil die pEC_{50} -Werte in etwa mit den pK_D -Werten aus den Kompetitionsstudien an RASCM übereinstimmen. Einzige Ausnahme bildet die Substanz (3S,4R)-JS09. Die Konzentration für die halbmaximale Relaxation der Aorta liegt etwa 8-fach niedriger ($pEC_{50} = 5.76$, Tab. 4.5, S. 117) als für den K_D -Wert der Bindung ($pK_D = 4.88$, Tab. 4.1, S. 81) aus der Kompetitionsbindungsstudie mit [3H]-P1075 an RASCM. Außerdem zeigten die 4-Chloranilinoderivate an der Aorta eine wesentlich stärkere Potenz für die Relaxation (pEC_{50}) als an der Trachea. So zeigte das Nitroderivat (3R,4S)-JS09 an der Aorta eine $pEC_{50} = 6.31$. An der Trachea liegt die pEC_{50} bei 4.86 (Abb. 4.12). Die ΔpEC_{50} von 1.45 beim direkten Vergleich von Aorta und Trachea ist sehr groß.

Die pEC_{50} -Werte für die Relaxation der Trachea konnte meist nicht direkt gemessen werden, weil der Effekt der Relaxation zu schwach ausgeprägt war. In diesen Fällen wurden die Werte durch Extrapolation ermittelt.

Interessant ist auch ein Vergleich der enantiomerischen Quotienten (EQ) von JS09 (S. 100).

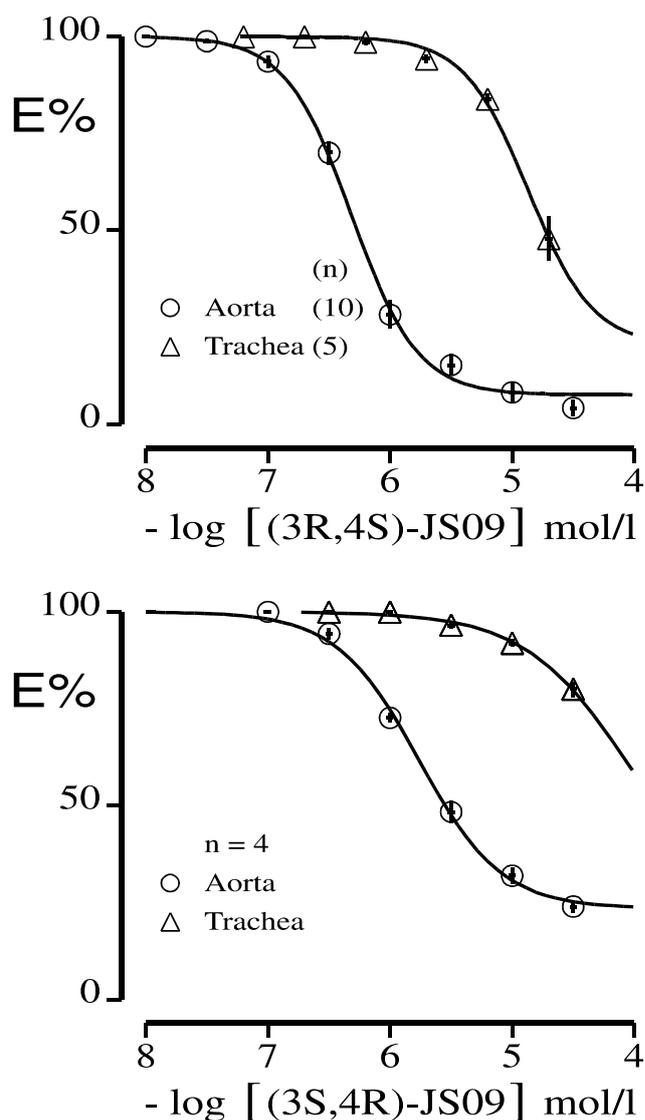


Abb. 4.12: Vergleich der Relaxationswirkung (E%) der Nitroderivate (3R,4S)-JS-09 und (3S,4R)-JS09 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte.

Nach Stimulation der Muskelstreifen erfolgte die kumulative Zugabe steigender Konzentration der KCO. Dargestellt werden die relaxierenden Wirkungen von (3R,4S)-JS09 und (3S,4R)-JS09 an der Aorta und Trachea.

Oben: Das Eutomer (3R,4S)-JS-09 zeigt eine der Bindungsstudie entsprechende Relaxation bei $pEC_{50} = 6.31 \pm 0.03$ an der Aorta. Die Trachea zeigt die halbmaximale Relaxation erst bei $pEC_{50} = 4.86 \pm 0.03$.

Unten: Das Distomer (3S,4R)-JS09 zeigte eine gute relaxierende Wirkung mit $pEC_{50} = 5.76 \pm 0.03$. Die Bestimmung der pEC_{50} an der Trachea konnte nur durch Extrapolation der Daten bestimmt werden. Der Wert lag bei $pEC_{50} = 4.02 \pm 0.01$.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.5, S. 101)

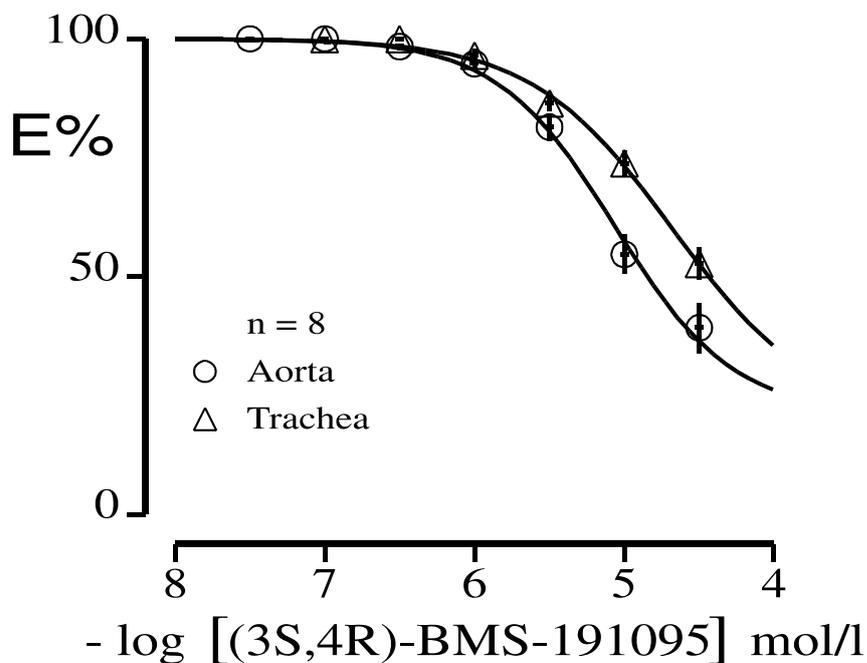
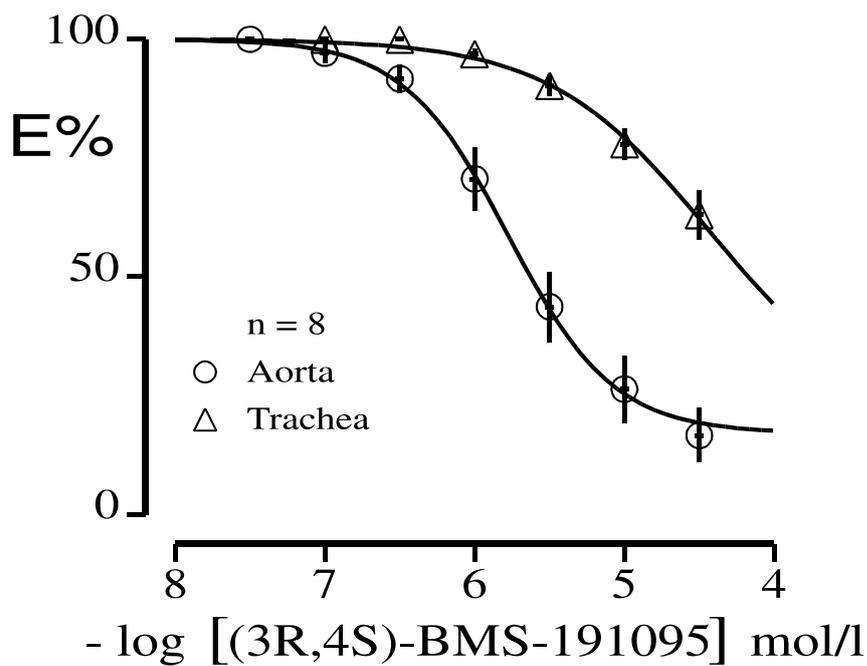


Abb. 4.13: Vergleich der Relaxationswirkung ($E\%$) der Cyanoderivate (3R,4S)-BMS-191095 und (3S,4R)-BMS-191095 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte.

Oben: Die stärker wirksame Verbindung (3R,4S)-BMS-191095 besaß an der Aorta eine pEC_{50} von 5.77 ± 0.08 und an der Trachea von 4.43 ± 0.09 mit ΔpEC_{50} von 1.34 ± 0.12 .

Unten: (3S,4R)-BMS-191095 zeigte bei geringerer Wirkung auch kleinere Unterschiede an der Aorta mit $pEC_{50} = 5.06 \pm 0.05$ und mit $pEC_{50} = 4.67 \pm 0.04$ an der Trachea ($\Delta pEC_{50} = 0.39 \pm 0.06$).

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.5, S. 101)

Die Cyanoverbindung (3R,4S)-BMS-191095 zeigte im physiologischen Experiment wie in der Radioligandbindung eine etwa 3-fach schwächere Wirkung ($pEC_{50} = 5.77$) als das Nitroderivat. Die ΔpEC_{50} zwischen Aorta und Trachea liegt bei 1.34 (Abb. 4.13).

Das (3S,4R)-Enantiomer von BMS-191095 erzielte an der Aorta eine pEC_{50} von 5.06. An der Trachea erfährt die Testsubstanz einen Wirkverlust von ca. 0.39 log gegenüber der Aorta. Somit ist der Unterschied zwischen Aorta und Trachea nicht sehr stark ausgeprägt wie beim (3R,4S)-Enantiomer. Gegenüber (3R,4S)-BMS-191095 verliert das (3S,4R)-Enantiomer 0.71 log-Einheiten an Aortenwirksamkeit. (Abb. 4.13).

Betrachtet man die so genannte „kardioselektive“ Substanz der 1. Generation (3S,4R)-BMS-180448, so ist auch hier, wie bei (3S,4R)-JS09, keine gute Übereinstimmung zwischen Bindungsexperiment und Relaxation an der Aorta zu erkennen. Einer pEC_{50} von 5.53 ± 0.06 (Tab. 4.5) steht ein pK_D -Wert von 6.29 ± 0.03 (s. Tab. 4.1) mit [3H]-P1075 an RASCM gegenüber. Wie bei den anderen Testsubstanzen ist auch bei dieser die Relaxation an der Trachea deutlich schwächer (Abb. 4.14 oben).

Noch stärker zeigt sich dieses Phänomen bei dem Sulfonamidabkömmling JS33. Die Substanz zeigt eine halbmaximale Relaxation der Rattenaorta bei 6.33 ± 0.03 (Tab. 4.5). Die halbmaximale Wirkung von 4.50 ± 0.08 an der Trachea konnte wiederum nur durch Extrapolation ermittelt werden (Abb. 4.14 unten).

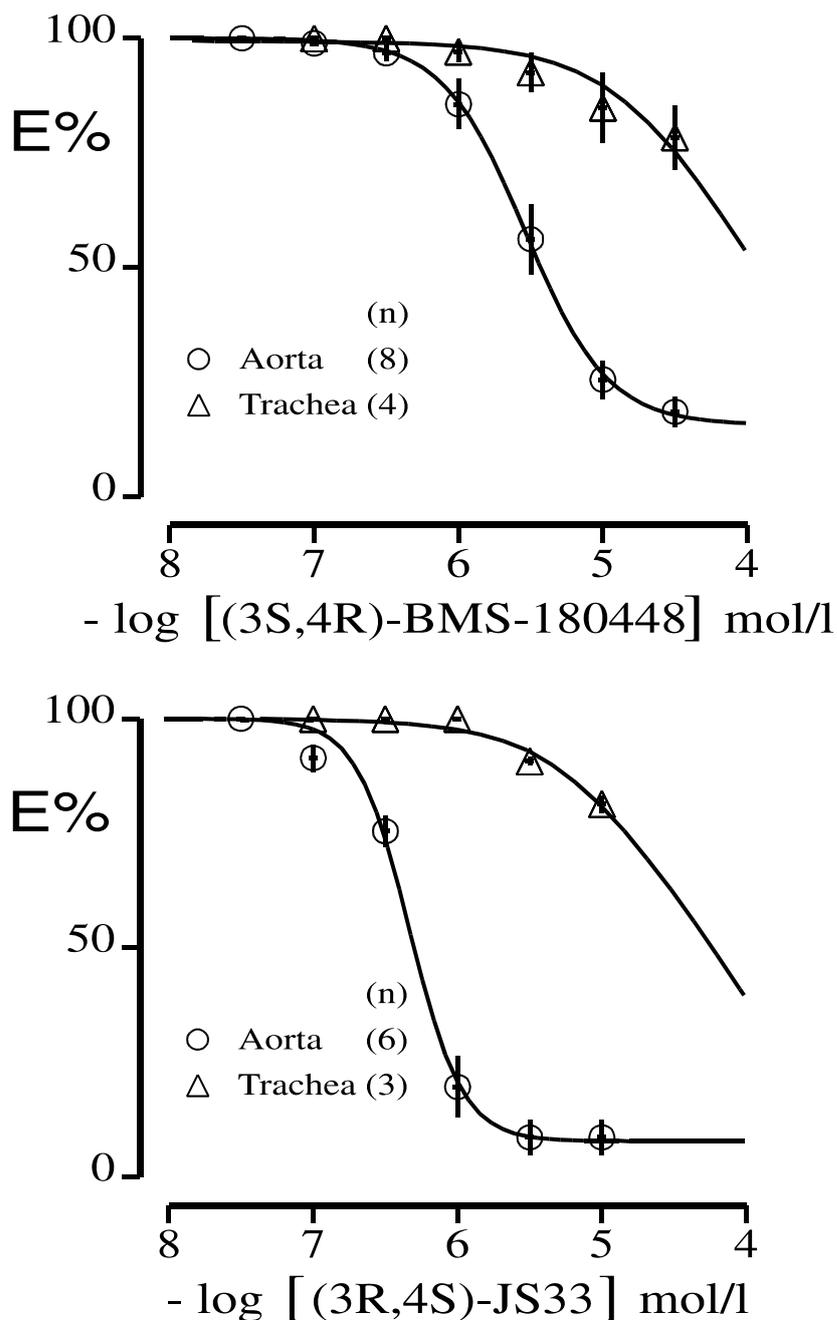


Abb. 4.14: Vergleich der Relaxationswirkung des Cyanoguanidins (3S,4R)-BMS-180448 und des Sulfonamids (3R,4S)-JS33 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte.

Oben: Die Substanz (3S,4R)-BMS-180448 zeigte im Relaxationsversuch an der Aorta eine $pEC_{50} = 5.53 \pm 0.06$. An der Trachea zeigte sie eine sehr schwache Wirkung. Die pEC_{50} war im Versuch direkt nicht zu ermitteln, die Extrapolation ergab eine pEC_{50} von 4.14 ± 0.04 bei einer gesetzten Steigung von 1.

Unten: Die Sulfonamidverbindung (3R,4S)-JS33 zeigte an der Aorta eine gute Wirkung mit $pEC_{50} = 6.33 \pm 0.03$. Eine Wirkung an der Trachea blieb fast aus. Die halbmaximale Wirkung lag bei $pEC_{50} = 4.5$ und konnte nur mittels Extrapolation ermittelt werden.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.5, S. 101)

4.3.2 Pyridone als offene Phenoether

Aus der Substanzklasse der Pyridone wurden exemplarisch zwei Verbindungen am Relaxationsmodell getestet, um eine agonistische Wirkung am K_{ATP} -Kanal aufzuzeigen. JS26 und JS43 zeigten in der Relaxation eine halbmaximale Relaxation bei ca. 10^{-6} M. Mit einer pEC_{50} von etwa 5.6 hatten die Substanzen an der Trachea eine geringere halbmaximale Wirkung als an der Aorta. Der ΔpEC_{50} -Wert zwischen Aorta und Trachea von etwa 0.51 für JS26 bzw. $\Delta pEC_{50} = 0.63$ für JS43 ist ebenfalls typisch für die klassischen Kaliumkanalöffner (Salamon et al., 2002) s. Abb. 4.15.

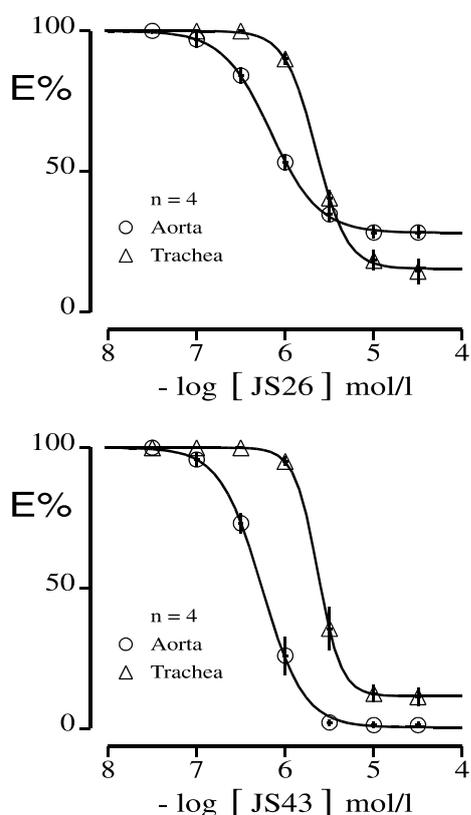


Abb. 4.15: Vergleich der Relaxationswirkung eines Isopropyl-substituierten Pyridons JS26 mit dem Propyl-substituierten Pyridon JS43 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea.

Oben: Die Substanz JS26 relaxiert ähnlich wie andere KCO. Sie zeigte eine geringfügig bessere Wirkung an der Aorta ($pEC_{50} = 6.16$) als an der Trachea ($pEC_{50} = 5.65$).

Unten: Die Substanz JS43 zeigt an der Aorta eine $pEC_{50} = 6.26$, an der Trachea $pEC_{50} = 5.63$. Der Unterschied zwischen Aorta und Trachea betrug $\Delta pEC_{50} = 0.63$. Bei JS43 fällt auf, dass die Relaxation der Aorta praktisch vollständig (maximal) und an der Trachea nahezu vollständig auftritt.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.5, S. 101)

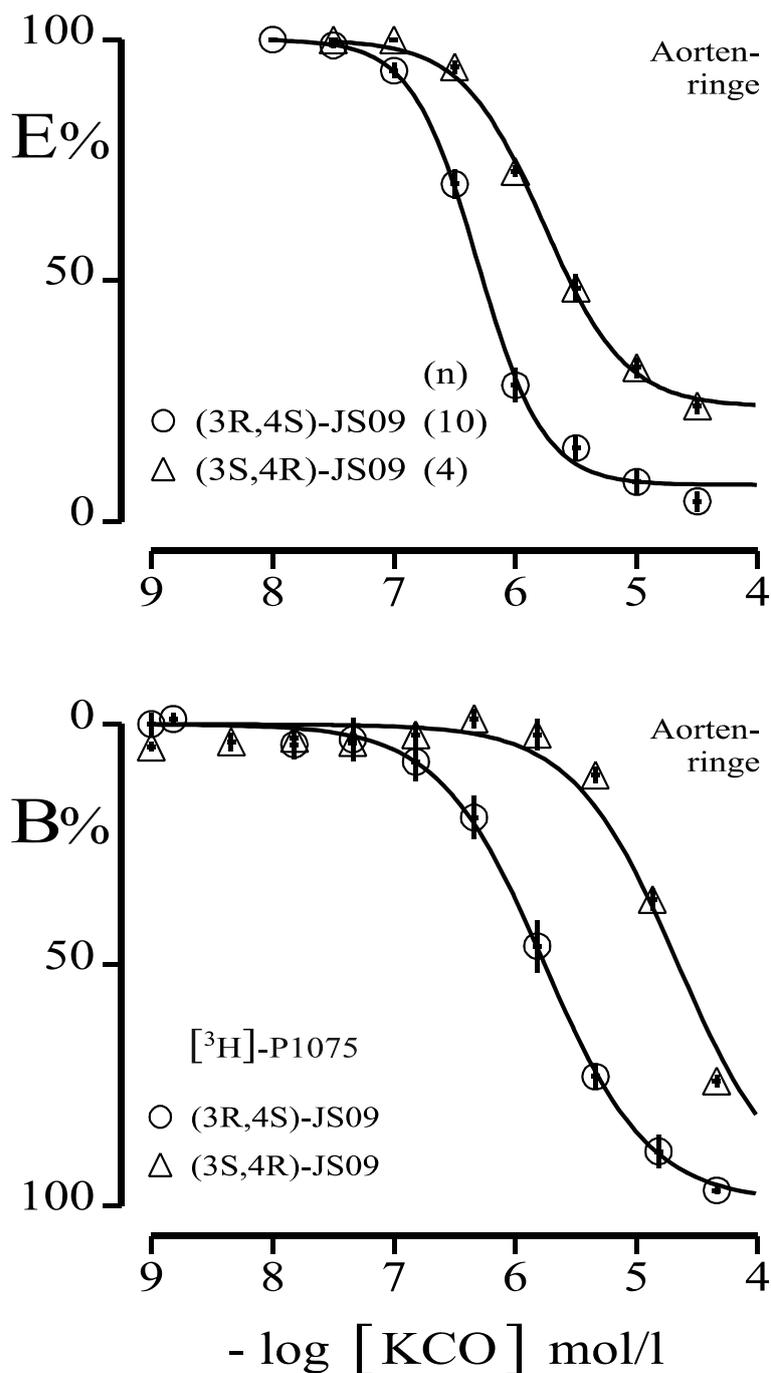


Abb. 4.16: Vergleich der enantiomerischen Quotienten der Nitroderivate (3R,4S)-JS09 und (3S,4R)-JS09 in der RLB an Aortenzellen der Ratte und in der Relaxationswirkung an isolierten Aortenringen.

Zur Darstellung kommen die unterschiedlichen enantiomerischen Quotienten von JS09, die an der Aorta in der RLB mit [^3H]-P1075 unten und im Relaxationsversuch an der Aorta mit Kaliumchlorid 25 mM als Stimulus oben, ermittelt wurden. Auffällig ist, dass der Quotient in der Bindung mit 1.13 deutlich größer ist als im physiologischen Experiment $\Delta p\text{EC}_{50} = 0.78$. Diskutiert wird deshalb eine zweite Wirkart, die von JS09 ausgeht (s. Kap. 4.4)

($p\text{EC}_{50}$ -Werte s. Tab. 4.5)

Tab. 4.5: Ergebnisse der Relaxationsexperimente an der Aortenringen und Trachealmuskelstreifen der Ratte

		Aorta	(n)	ΔpEC_{50} Aorta-Trachea	Trachea	(n)
Substanz		25 mM K ⁺			0.2 μ M Carbachol	
(3R,4S) - JS09	pEC ₅₀	6.31 \pm 0.03	(10)	<i>1.45 \pm 0.04</i>	4.86 \pm 0.03	(5)
	Max [%]	92.8 \pm 1.61			80.1 \pm 2.23	
	Steigung P	1.60 \pm 0.13			1.63 \pm 0.16	
(3S,4R)- JS09	pEC ₅₀	5.76 \pm 0.03	(4)	<i>1.74 \pm 0.03</i>	4.02 \pm 0.01	(4)
	Max [%]	76.7 \pm 1.95			80.7 \pm 0.96	
	Steigung P	1.28 \pm 0.10			1*	
(3R,4S)- BMS-191095	pEC ₅₀	5.77 \pm 0.08	(8)	<i>1.34 \pm 0.12</i>	4.43 \pm 0.09	(8)
	Max [%]	83.1 \pm 4.18			81.4 \pm 1.86	
	Steigung P	1.23 \pm 0.22			0.82 \pm 0.07	
(3S,4R)- BMS-191095	pEC ₅₀	5.06 \pm 0.05	(8)	<i>0.39 \pm 0.06</i>	4.67 \pm 0.04	(8)
	Max [%]	79.0 \pm 2.39			80.2 \pm 1.72	
	Steigung P	1.10 \pm 0.10			0.92 \pm 0.07	
(3S,4R)- BMS-180448	pEC ₅₀	5.53 \pm 0.06	(8)	<i>1.39 \pm 0.07</i>	4.14 \pm 0.04	(4)
	Max [%]	84.5 \pm 4.81			79.7 \pm 3.06	
	Steigung P	1.52 \pm 0.27			1*	
(3R,4S)- JS33	pEC ₅₀	6.33 \pm 0.03	(6)	<i>1.83 \pm 0.04</i>	4.50 \pm 0.02	(3)
	Max [%]	92.3 \pm 2.59			80.2 \pm 1.20	
	Steigung P	2.37 \pm 0.33			1*	
JS26	pEC ₅₀	6.16 \pm 0.03	(4)	<i>0.51 \pm 0.04</i>	5.65 \pm 0.02	(4)
	Max [%]	72.1 \pm 1.46			84.9 \pm 1.88	
	Steigung P	1.60 \pm 0.15			2.47 \pm 0.26	
JS43	pEC ₅₀	6.26 \pm 0.03	(4)	<i>0.63 \pm 0.04</i>	5.63 \pm 0.03	(4)
	Max [%]	99.8 \pm 1.68			88.5 \pm 2.16	
	Steigung P	1.83 \pm 0.15			3.30 \pm 0.57	
Die Steigung P entspricht dem Hillkoeffizienten; * P wurde gleich 1 gesetzt						

4.4 Hemmwirkung der KCO auf die calciuminduzierte Kontraktur

Aus den Ergebnissen der Radioligandbindungsversuche mit [³H]-P1075 und den funktionellen Untersuchungen an der Rattenaorta im Relaxationsmodell (s. Kap. 4.3) wurde bereits deutlich, dass die 4-Chloranilinochromanole keine ausschließliche K_{ATP}-Kanalwirkung zeigen. Es schien daher interessant, im physiologischen Modell zu untersuchen, ob ein nicht-K_{ATP}-Kanal-vermittelter Effekt zur Relaxation der Aorta beiträgt.

Zur Unterdrückung einer Kaliumkanal-Aktivierung wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass die extrazelluläre Kaliumkonzentration mit 136 mM („High-Kalium“) der intrazellulären Kaliumkonzentration angepasst wird.

Diese Versuchsanordnung ist zwar für die Aorta, nicht aber für die Untersuchung der Trachea geeignet, da dort bei hoher Kaliumkonzentration keine stabile Kontraktion aufrechterhalten werden kann.

Abb. 4.17 zeigt die Originalregistrierung an vier Aortenringen eines derartigen „High-Kalium“-Versuches. Die obere Spur entspricht der Registrierung für die Kontrolle in Abwesenheit eines Kaliumkanalöffners. In einem ersten Schritt wurde, nach den drei üblichen Testkontraktionen (nicht dargestellt, siehe Beschreibung im Methodenteil), die Kontraktion mit 136 mM Kaliumchlorid ausgelöst. Die entwickelte Kraft diente zur Bestimmung der Bezugskontraktion (ΔmN 14.5), die für die Berechnung der Dosis-Wirkungskurven nötig war.

Anschließend wurden die Aortenringe mit calciumfreier Norm-Kaliumlösung gewaschen (W). So wurde die extrazelluläre Kaliumionenkonzentration wieder auf physiologische Werte gebracht und das extrazelluläre Calcium ausgewaschen. Das Waschen der Aortenringe wurde zweimal wiederholt. Die Normkaliumlösung wurde vor Beginn der Kontraktion, zur Erstellung der Calcium-Dosis-Wirkungskurve, gegen eine calciumfreie „High-Kaliumlösung“ (136 mM K⁺) ausgetauscht (indiziert mit 0.0 mM CaCl₂ in Abb. 4.17). Die Kontraktion wurde durch Zugabe von Calciumchlorid (0.5 mM) ausgelöst.

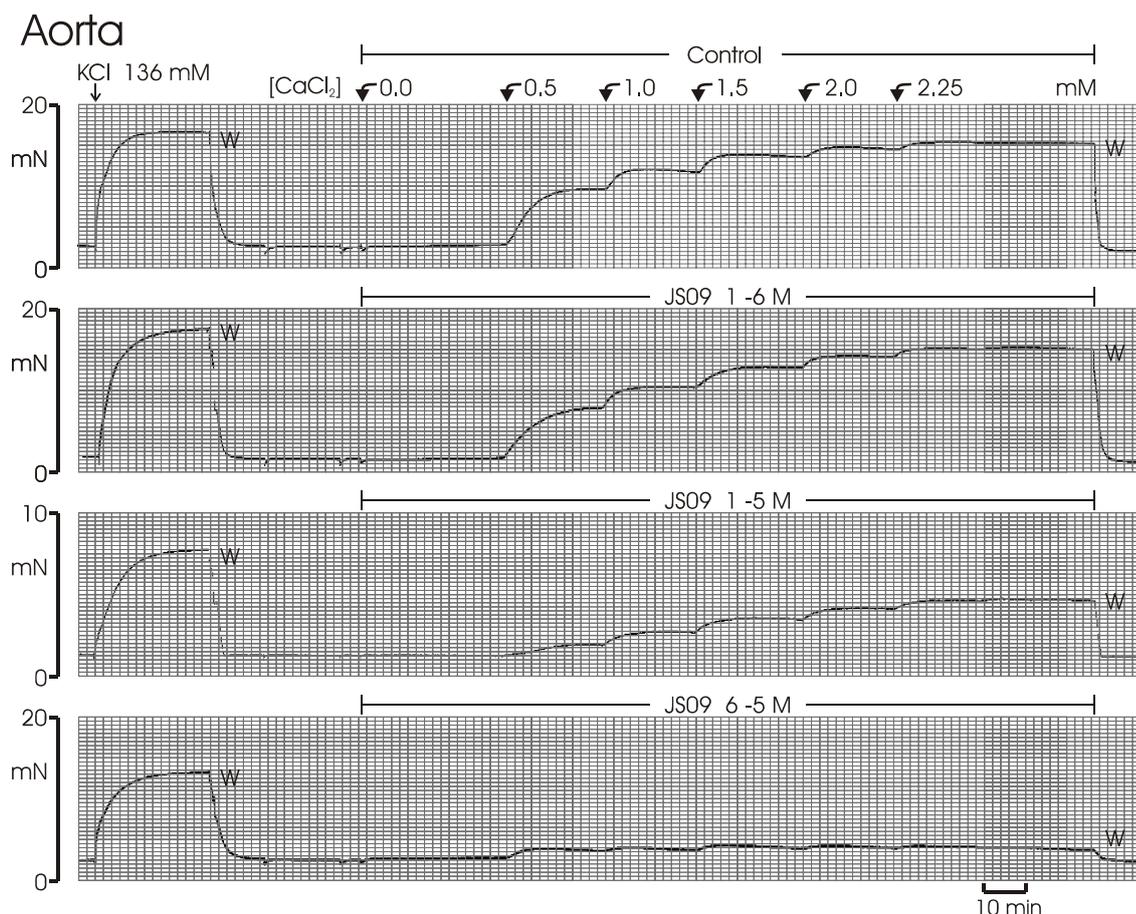


Abb. 4.17: Originalregistrierung einer Calciumdosiswirkungskurve in Anwesenheit von (3R,4S)-JS09 an der Rattenaorta.

Die letzte der Testkontraktionen (s. 4.1 Material und Methoden) ist im Bild (indiziert mit 136 mM KCl) als Kontrollkontraktion gezeigt. Daraufhin wurde mit calciumfreier Pufferlösung ($4 \cdot 10^{-5}$ M EDTA) das Gewebe mehrfach gewaschen, um das extrazelluläre Calcium zu entfernen. Danach wurde die vorhandene Pufferlösung gegen eine calciumfreie Krebslösung mit 136 mM Kaliumchlorid ausgetauscht (indiziert als W). Einem Organbad wurde keine Testsubstanz zugesetzt und diente somit als Kontrolle (Spur 1). In die übrigen Organbäder gab man jeweils eine unterschiedliche Dosis der Testsubstanz (3R,4S)-JS09 (Spur 2: 10^{-6} M; Spur 3: 10^{-5} M; Spur 4: $6 \cdot 10^{-5}$ M). Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min wurde die Kontraktion durch Zugabe von Calciumchlorid 0.5 mM ausgelöst. Nach Erreichen des Equilibriums, wurde die nächste Dosis von 1.0 mM CaCl₂ ins Organbad hinzugegeben. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich eine Endkonzentration von 2.25 mM Calciumchlorid in der Lösung befand. Danach wurde das Gewebe mehrmals mit frischer Krebslösung gewaschen.

Nachdem sich ein Equilibrium nach ca. 15 min eingestellt hatte, wurden weitere Calciumdosen hinzugefügt (1.0 mM, 1.5 mM). Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis sich eine Gesamtkonzentration von 2.25 mM (Normcalcium-Konzentration der Krebspufferlösung) im Puffer befand. Anschließend wurde das Gewebe erneut gewaschen (W). In Spur 1 ist zu erkennen, dass die Kontraktion am Ende des Versuches eine entwickelte Kraft von etwa 12.5 mN erreichte, die nahezu gleich ist mit der entwickelten Kraft der Ausgangskontraktion von etwa 15 mN für diesen Versuch.

Die Versuche der Spuren 2 bis 4 wurden zeitgleich und mit den gleichen Calcium-Konzentrationen wie in Spur 1 durchgeführt. In Abänderung zum oben dargestellten Verfahren wurde der Versuch in Anwesenheit des zu untersuchenden Kaliumkanalöffners (3R,4S)-JS09 durchgeführt. In Spur 2 wird die Calcium-Dosis-Wirkungskurve in Anwesenheit von 10^{-6} M (3R,4S)-JS09 dargestellt. Die Kontraktion am Ende des Versuchs erreichte eine Kraft von fast 14 mN und ist nahezu gleich mit der entsprechenden Bezugskontraktion von ca. 15 mN für diesen Versuch. In Spur 3 wird die Calcium-Dosis-Wirkungskurve in Anwesenheit von 10^{-5} M (3R,4S)-JS09 dargestellt. Der Aortenring konnte in diesem Fall nur halbmaximal kontrahiert werden. In Anwesenheit von $6 \cdot 10^{-5}$ M (3R,4S)-JS09 (Spur 4) wurde die Kontraktion fast vollständig unterdrückt. Sie erreicht nur eine Kraft von 1 mN, während die Bezugskontraktion 10 mN erreichte. Entgegen der Erwartung zeigte der Kaliumkanalöffner (3R,4S)-JS09 bei Konzentrationen $> 10^{-6}$ M eine Hemmung der Kontraktion, obwohl ein „reiner“ Kaliumkanalöffner in einer High-Kaliumlösung wegen des Ausgleichs der Kaliumionenkonzentration wirkungslos sein sollte.

In Abb. 4.18 werden Versuchsverläufe zur Erstellung von Calciumdosiswirkungskurven gegenübergestellt, bei denen die Rattenaortenringe sich in Pufferlösungen mit 30 mM K^+ (aktiver K_{ATP} -Kanal) und 136 mM K^+ (inaktiver K_{ATP} -Kanal) befanden. Die oberen beiden Spuren stellen die Calcium-Dosis-Wirkungskurve der Kontrollen in Abwesenheit von (3R,4S)-JS09 bei Kaliumkonzentration von 30 mM und 136 mM dar. Dabei gilt zu beachten, dass der Versuch, der in Spur 2 dargestellt ist, im Anschluss an den Versuch der Spur 1 am selben Aortenring durchgeführt wurde. Die Versuche wurden analog Abb. 4.17 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Calcium-Dosis-Wirkungskurve mit einer geringeren Calcium-Konzentration (0.125 mM) gestartet wurde. Wie zu erwarten war, erreichten die Kontraktionen am Ende des Versuchs annähernd die gleichen Werte wie die Bezugskontraktionen am Anfang der Versuche. Die Spuren 3 und 4 zeigen die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Anwesenheit von (3R,4S)-JS09, die in gleicher Weise wie bei der Kontrolle, hintereinander durchgeführt wurden. Hier zeigten die Aortenringe ein ganz anderes Verhalten als bei der Kontrolle. In Spur 3 (aktiver K_{ATP} -Kanal) konnte in Anwesenheit von $3 \cdot 10^{-6}$ M (3R,4S)-JS09 mit Calciumchlorid keine Kontraktion am Aortenring ausgelöst werden.

Aorta

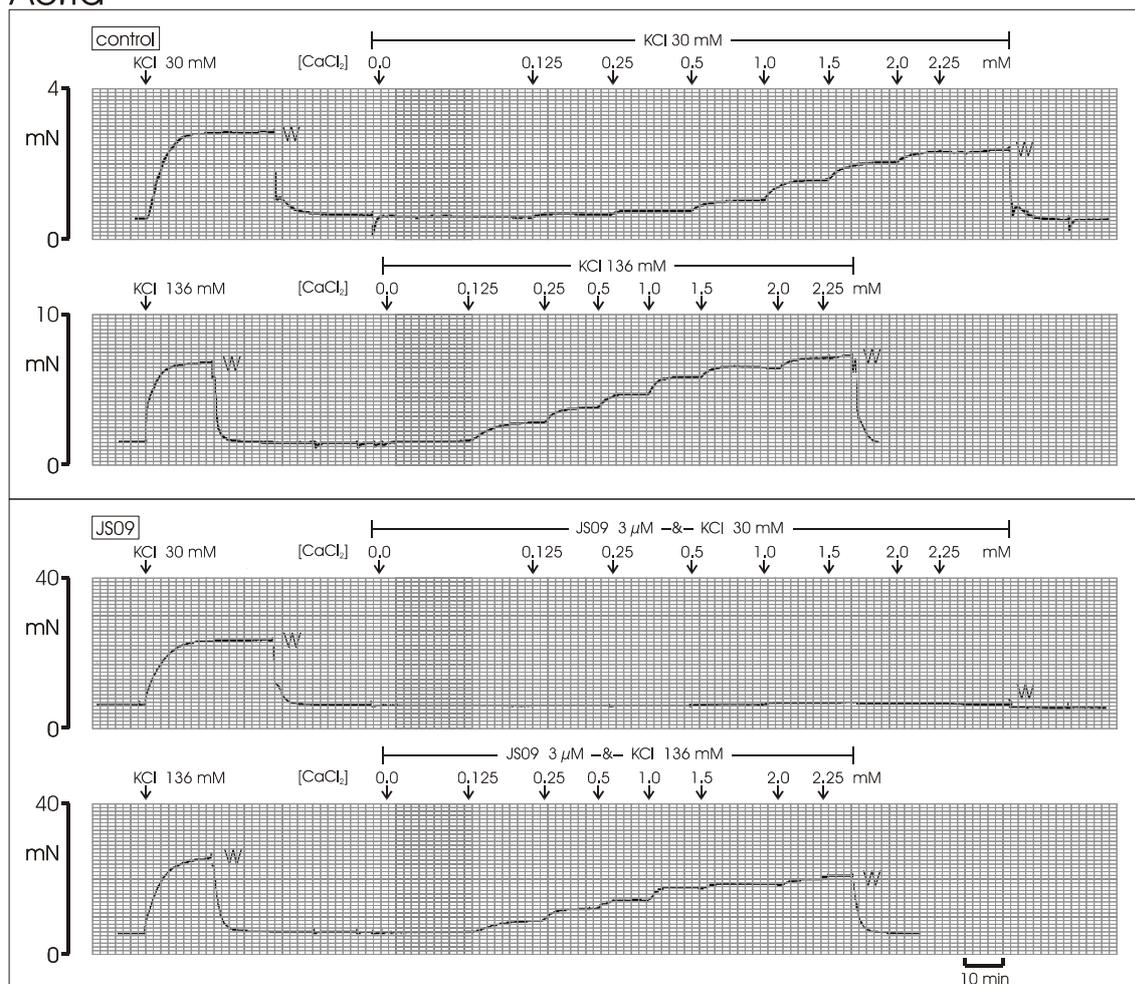


Abb. 4.18: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3R,4S)-JS09 bei unterschiedlicher Kaliumkonzentration in den Pufferlösungen

Dargestellt wird der Unterschied zwischen einer nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelten und einer K_{ATP} -Kanal-vermittelten Kontraktionshemmung. Die Testkontraktion bei 30 mM und 136 mM K^+ dient bei der Berechnung der Dosis-Wirkungskurven als Bezugsgröße (100 %). (W) indiziert den Austausch der Pufferlösung gegen eine calciumfreie Lösung. Initial wurde eine CaCl_2 -Lösung in einer Konzentration von 0.125 mM hinzugegeben. Sukzessiv wurde die Konzentration bis 2.25 mM CaCl_2 erhöht.

Spur 1 und 2: Spur 1 und 2 dienten als Kontroll-Dosis-Wirkungskurven für die calciuminduzierte Kontraktion in Gegenwart von 30 mM (Spur 1) und 136 mM (Spur 2) KCl. Man erkennt, dass die Kontrollen in Spur 1 und 2 annähernd die Kontraktionskraft aus der Vorkontraktion erreichen.

Spur 3 und 4: In Spur 3 und 4 wurde $3 \mu\text{M}$ (3R,4S)-JS09 zugesetzt. Auffällig ist die komplette Hemmung der Kontraktion (Spur 3) bei einer Kaliumionenkonzentration von 30 mM. Spur 4 zeigt den gleichen Versuch bei einer Kaliumionenkonzentration von 136 mM. Durch den ausgeschalteten K_{ATP} -Kanal zeigt nur der nicht K_{ATP} -Kanal-vermittelte Effekt seine Wirkung. Die Kontraktion konnte nicht vollständig hergestellt werden, wie es bei einem reinen K_{ATP} -Kanal vermittelten Effekt der Fall gewesen wäre. Beim Ausgleich der intra- und extrazellulären Kaliumkonzentration zeigen sich nur non- K_{ATP} -Kanal-Hemmwirkungen: Das Maximum der Kontraktion nach (3R,4S)-JS09-Gabe ist um 4 mN geringer als das der Kontrolle.

In Spur 4 (inaktiver K_{ATP} -Kanal) fehlten zur erwarteten vollständigen Kontraktion der Rattenaorta noch ca. 1/3 der Bezugskontraktion, was die nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung bedingt.

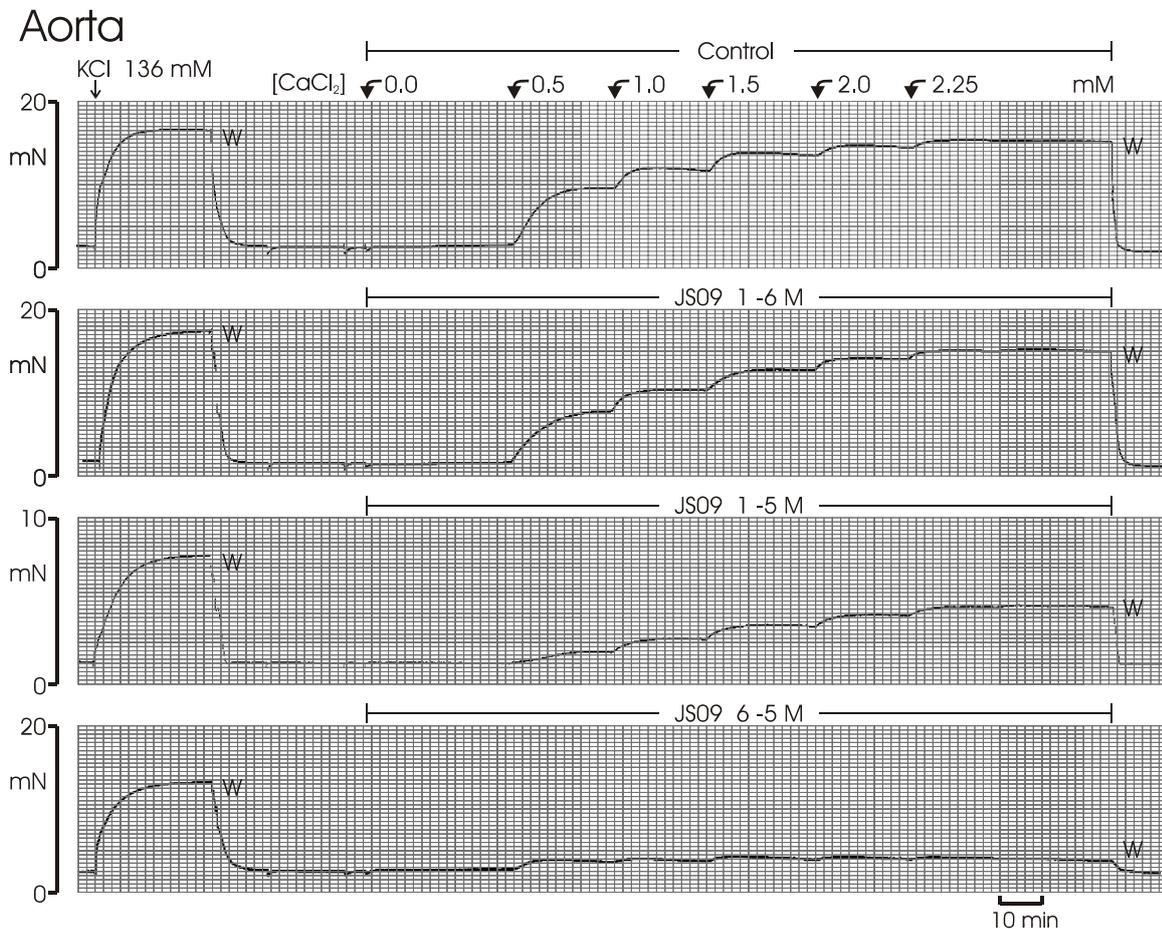
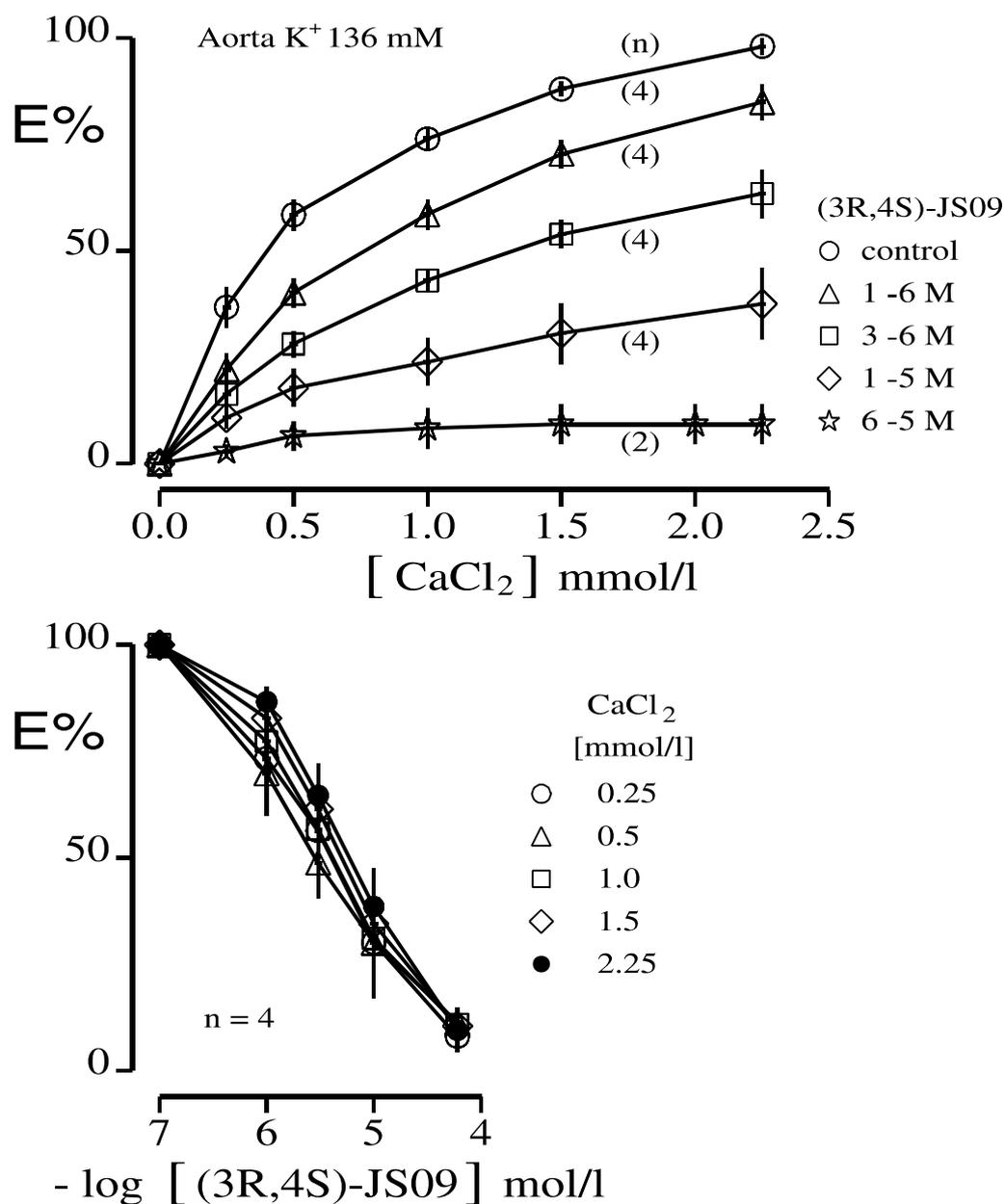


Abb. 4.19: Unterschiedliche Hemmung der Calcium-Dosiswirkungskurve durch verschiedene KCO

Gezeigt wird die unterschiedliche Hemmwirkung der KCOs auf die Calcium-Dosis-Wirkungskurve. Spur 1 dient als Kontroll-Dosiswirkungskurve. Spur 2 zeigt die Dosis-Wirkungskurve in Anwesenheit von 10^{-6} M Bimakalim. Es konnte keine wesentliche Hemmung beobachtet werden. Spur 3 zeigt den gleichen Versuch mit $3 \cdot 10^{-5}$ M BPDZ44. Die Substanz konnte die Dosis-Wirkungskurven um etwa 15% hemmen. Durch Zugabe von (3R,4S)-JS09 am Ende der Versuche (s. Spur 2 u. 3) konnte die Aorta entgegen der Erwartung an einen reinen K_{ATP} -Kanal-Agonisten relaxiert werden. Mit $2 \cdot 10^{-5}$ M (3R,4S)-JS09 konnte die Calcium-Dosis-Wirkungskurven fast vollständig unterdrückt werden.

Die Substanz Bimakalim diente als Kontrollsubstanz und zeigte keinen Einfluss auf die calciuminduzierte Kontraktion. (Abb. 4.19). BPDZ44 konnte die Calcium-Dosis-Wirkungskurve um etwa 15% hemmen.



**Abb. 4.20: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3R,4S)-JS09 nach Vor-
kontraktion der Aortenpräparate mit 136 mM K⁺; nicht-K_{ATP}-Kanal-vermittelte
Wirkung von (3R,4S)-JS09**

Oben: In Gegenwart von 136 mM K⁺ ist der K_{ATP}-Kanal funktionslos. Die Abbildung zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von (3R,4S)-JS09 bei unterschiedlichen Konzentrationen. (3R,4S)-JS09 hemmt die Kontraktion bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M halbmaximal und bei $6 \cdot 10^{-5}$ M vollständig

Unten: Das Diagramm zeigt die Inhibitionskurven, die durch Umnormierung (Umparametrisierung) der Calcium-Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 aus der oberen Abbildung erhalten wurden. (Details s. Material und Methoden). Die halbmaximale Wirkung lag bei etwa $pEC_{50} = 5.25$

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

Die Abb. 4.20 zeigt die Calciumdosiswirkungskurven (oberes Bild) und Calciuminhibitionskurven (unteres Bild) in An- und Abwesenheit von (3R,4S)-JS09. Dabei wurden die Messdaten prozentual zur Bezugskontraktion ($E\% = 100\%$) ins Verhältnis gesetzt.

Das obere Bild der Abb. 4.20 zeigt fünf Calciumdosiswirkungskurven, die oberste wurde in Abwesenheit von (3R,4S)-JS09 erstellt (Kontrolle), die übrigen in Anwesenheit von 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M und $6 \cdot 10^{-5}$ M (3R,4S)-JS09. Es wurden keine höheren Konzentrationen als $6 \cdot 10^{-5}$ M benutzt, da sich bei sehr hohen Konzentrationen toxische Wirkungen ergeben. Die Dosis-Wirkungskurven zeigen eine einfache hyperbole Form. Das untere Bild zeigt die Inhibitionskurven für (3R,4S)-JS09, die aus den Calcium-Dosis-Wirkungs-Kurven errechnet wurden. Diese erhielt man durch Umnormierung der $E\%$ -Werte der Calcium-Dosis-Wirkungskurve (im oberen Bildteil), indem man – beispielsweise für die höchste benutzte Calcium-Konzentration – den Effekt von 2.25 mM Calcium in Abwesenheit des K_{ATP} -Kanalöffners ((3R,4S)-JS09) als 100 % und den Basaltonus vor Induktion der Kalium-Kontraktion als 0 % setzt. Die Hemmung der Calcium-Wirkung durch die 5 verschiedenen (3R,4S)-JS09-Konzentrationen ergeben dann eine Inhibitionskurve für (3R,4S)-JS09 (● im unteren Bildteil). In gleicher Weise verfährt man mit jeder den anderen Calcium Konzentrationen 0.25, 0.5, 1.0 und 1.5 mM. Für die dosisabhängige Wirkung konnte für (3R,4S)-JS09 eine $pEC_{50} = 5.25 \pm 0.13$ im Experiment ermittelt werden (Tab. 4.6). (3R,4S)-JS09 konnte bei einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-5}$ M die Kontraktion des Aortenrings fast um mehr als 90 % unterdrücken.

Abb. 4.21 zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven und Inhibitionskurven für die am K_{ATP} -Kanal niederaffine Verbindung (3S,4R)-JS09. Diese wurden analog Abb. 4.20 erstellt. Im oberen Bild erkennt man, dass (3S,4R)-JS09 schon bei einer Konzentration von 10^{-6} M die Kontraktion um mehr als 30% und bei $6 \cdot 10^{-5}$ M um mehr als 90% unterdrückt. Der berechnete pEC_{50} -Wert lag bei 5.92 ± 0.07 (Tab. 4.6, S. 117). Entgegen der Erwartung zeigte in diesem Versuch die am K_{ATP} -Kanal niederaffine Substanz (3S,4R)-JS09 eine höhere Aktivität hinsichtlich der non- K_{ATP} -Kanal-Wirkung als (3R,4S)-JS09 ($\Delta pEC_{50} = 0.67$).

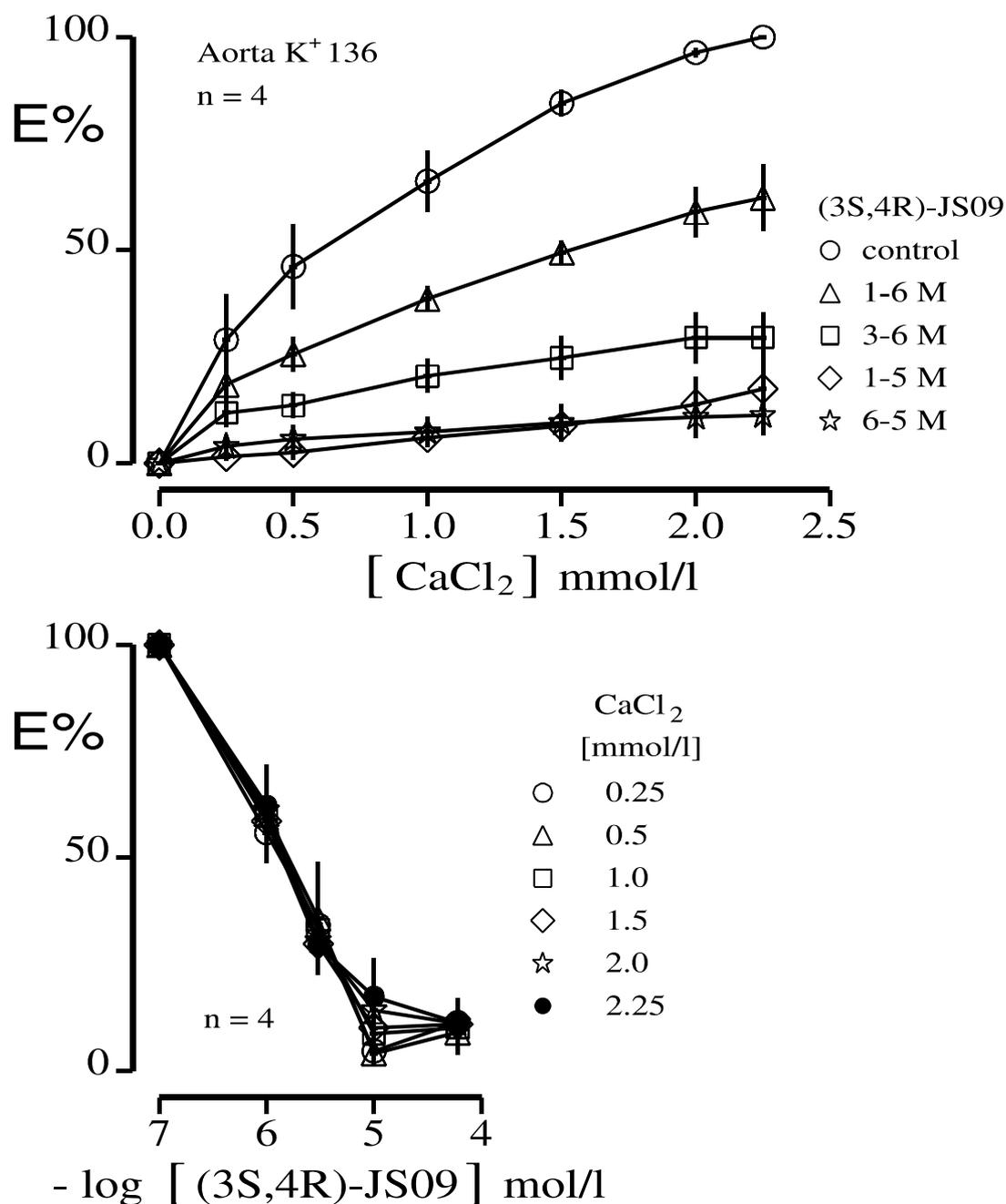


Abb. 4.21: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3S,4R)-JS09 an mit 136 mM Kaliumchlorid kontrahierten Aortenpräparaten; nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung von (3S,4R)-JS09

Oben: Die Abbildung zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von (3S,4R)-JS09 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Mit 10^{-6} M (3S,4R)-JS09 wurde ca. 40% der Calcium-Wirkung unterdrückt. In Gegenwart von 136 mM K^+ ist ein reiner K_{ATP} -Kanal-Agonist funktionslos.

Unten: Das Diagramm zeigt die Inhibitionskurven, die durch Umnormierung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven für (3S,4R)-JS09 aus der oberen Abbildung erhalten wurden. (Details s. Material und Methoden). Der pEC_{50} -Wert ist schon bei etwa 5.90 erreicht.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

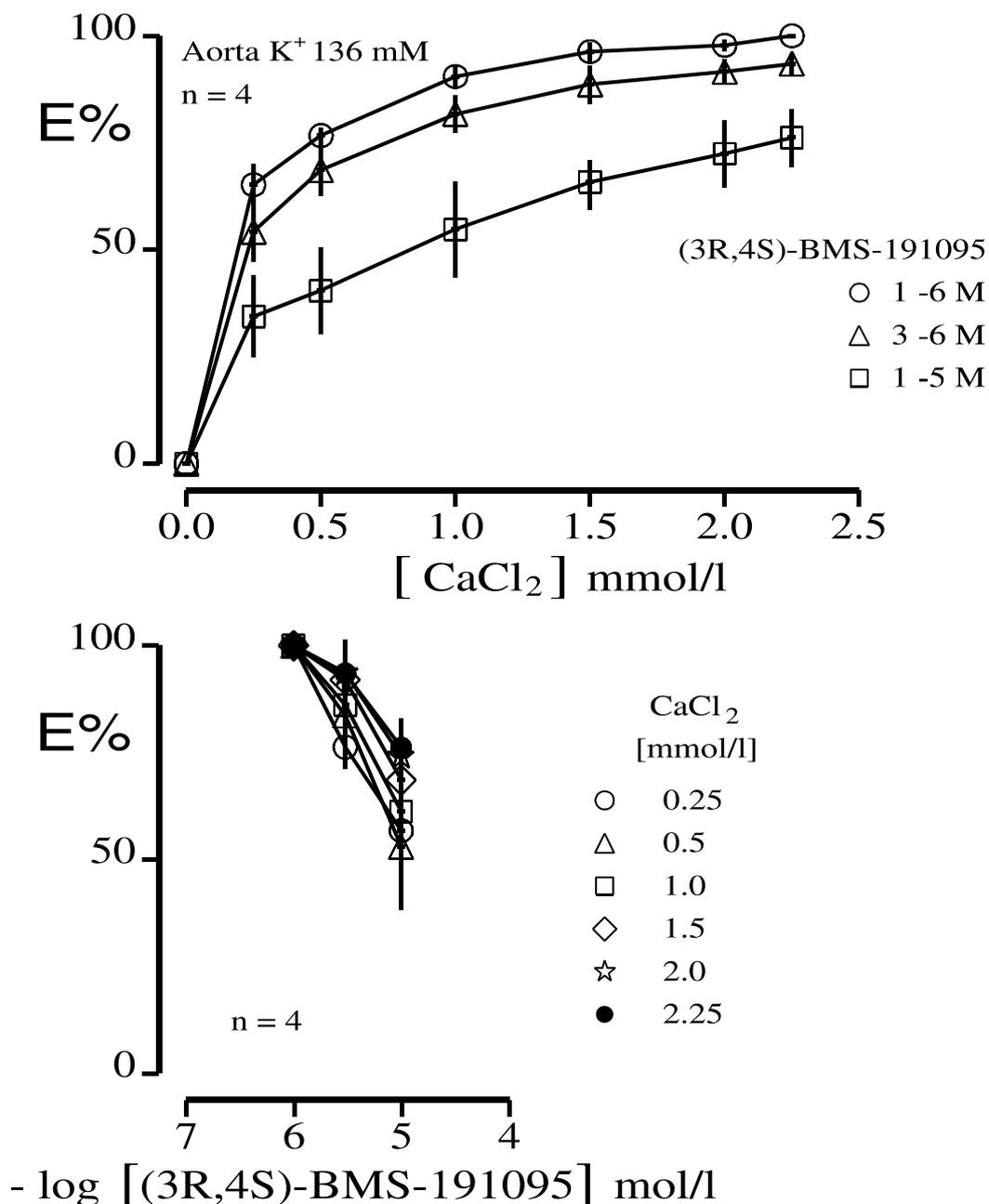


Abb. 4.22: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3R,4S)-BMS-191095 an mit 136 mM Kaliumchlorid kontrahierten Aortenpräparaten; nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung von (3R,4S)-BMS-191095

Oben: Die Abbildung zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von (3R,4S)-BMS-191095 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Auch mit höheren Dosen (10^{-5} M) konnte keine halbmaximale Unterdrückung erreicht werden. In Gegenwart von 136 mM K^+ ist ein reiner K_{ATP} -Kanal-Agonist funktionslos.

Unten: Das Diagramm zeigt die Inhibitionskurven, die durch Umnormierung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-BMS-191095 aus der oberen Abbildung erhalten wurden. (Details s. Methodenteil). Es konnte keine komplette Dosis-Wirkungskurve erzielt werden.

(pEC₅₀-Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

Deutlich schwächer als die JS09-Substanzen in der Hemmung war (3R,4S)-BMS191095, welches sich strukturell von (3R,4S)-JS09 nur durch einen Cyanorest anstelle einer Nitrogruppe unterscheidet. In Abb. 4.22 zeigt die Inhibitionskurve im oberen Bild bei 10^{-5} mM noch keinen halbmaximalen Effekt. Der extrapolierte pEC_{50} -Wert lag bei 4.59. Damit war die Cyanoverbindung um 0.66 log-Einheiten schlechter wirksam als das Nitroanalogon (4.59 vs. 5.25; Tab. 4.6, S. 117).

Die Experimente für (3R,4S)-JS33 findet man in Abb. 4.23. Die Inhibitionskurven im oberen Bild zeigen einen halbmaximalen Effekt bei etwa 10^{-5} M. Allerdings konnte die Kontraktion des Aortenringes nur zu etwa 2/3 gehemmt werden. Das untere Bild zeigt eine sigmoide Kurve, die bei etwa $E = 30\%$ ausläuft. Die Dosis-Wirkungskurven liegen eng beieinander. Die berechnete pEC_{50} für die Hemmung der Calciumwirkung lag bei 5.10 ± 0.11 und damit in der gleichen Größenordnung wie die von (3R,4S)-JS09 (5.25 ± 0.13 , Tab. 4.6, S. 117).

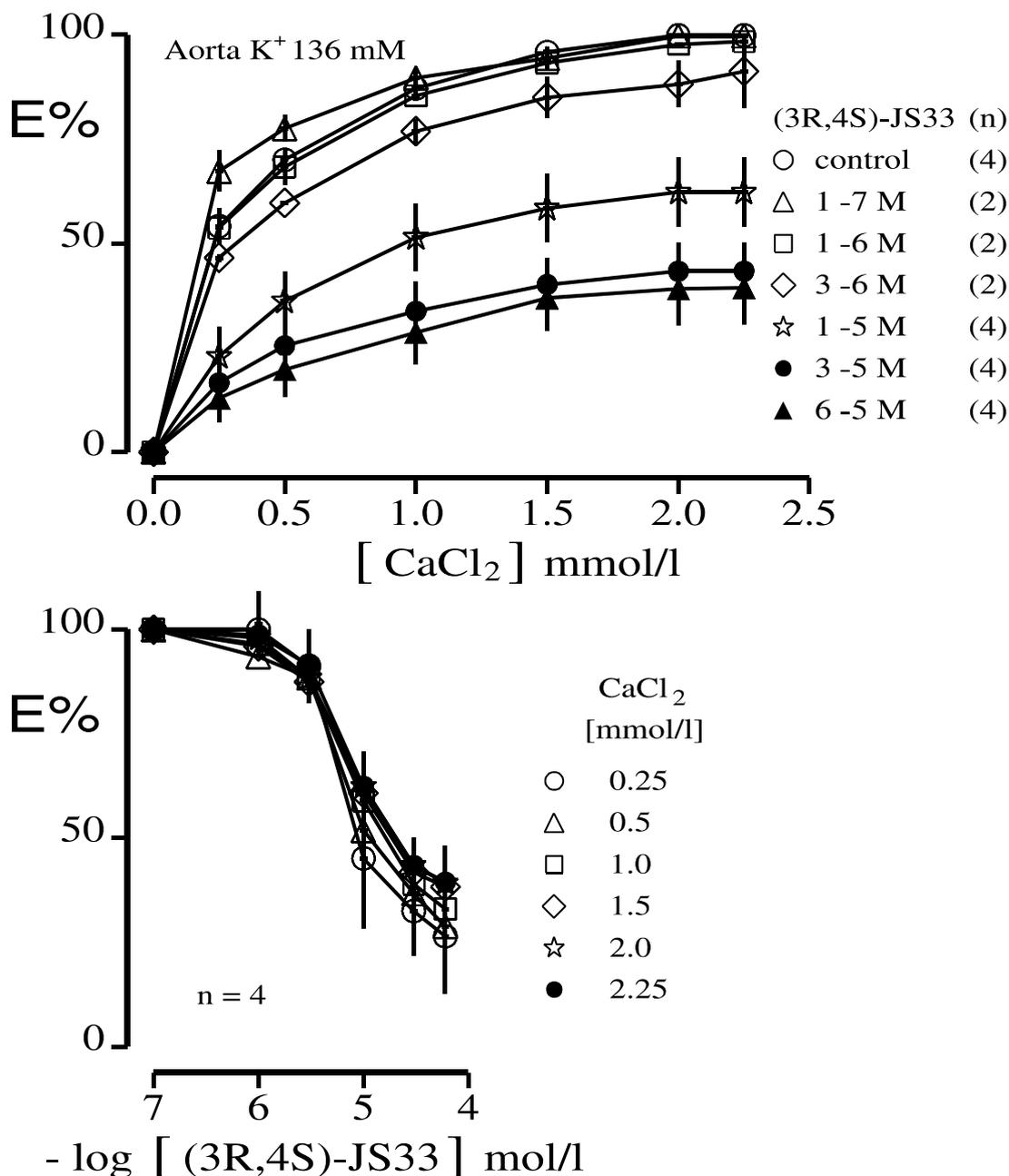


Abb. 4.23: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3R,4S)-JS33 an mit 136 mM Kaliumchlorid kontrahierten Aortenpräparaten; nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung von (3R,4S)-JS33

Oben: Die Abbildung zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von (3R,4S)-JS33 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Mit höheren Dosen konnte keine Maximalunterdrückung der Kontraktion erreicht werden. Die halbmaximale Wirkung liegt bei etwa 10^{-5} M. In Gegenwart von 136 mM K^+ ist ein reiner K_{ATP} -Kanal-Agonist funktionslos.

Unten: Das Diagramm zeigt die Inhibitionskurven, die durch Umnormierung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS33 aus der oberen Abbildung erhalten wurden. Details s. Methodenteil. Der pEC_{50} -Wert liegt bei etwa 5.1 bezogen auf die Maximalunterdrückung.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

Nachdem für die kardioselektiven Kaliumkanalöffner der 2. Generation vom 4-Chloranilinochromanol-Typ eine relativ hohe Wirksamkeit auf die Relaxation der Aorta gefunden worden war, stellte sich die Frage, ob auch die entsprechenden Substanzen der 1. Generation wie z.B. (3S,4R)-BMS-180448 diese Zusatzwirkung aufweisen.

Aorta

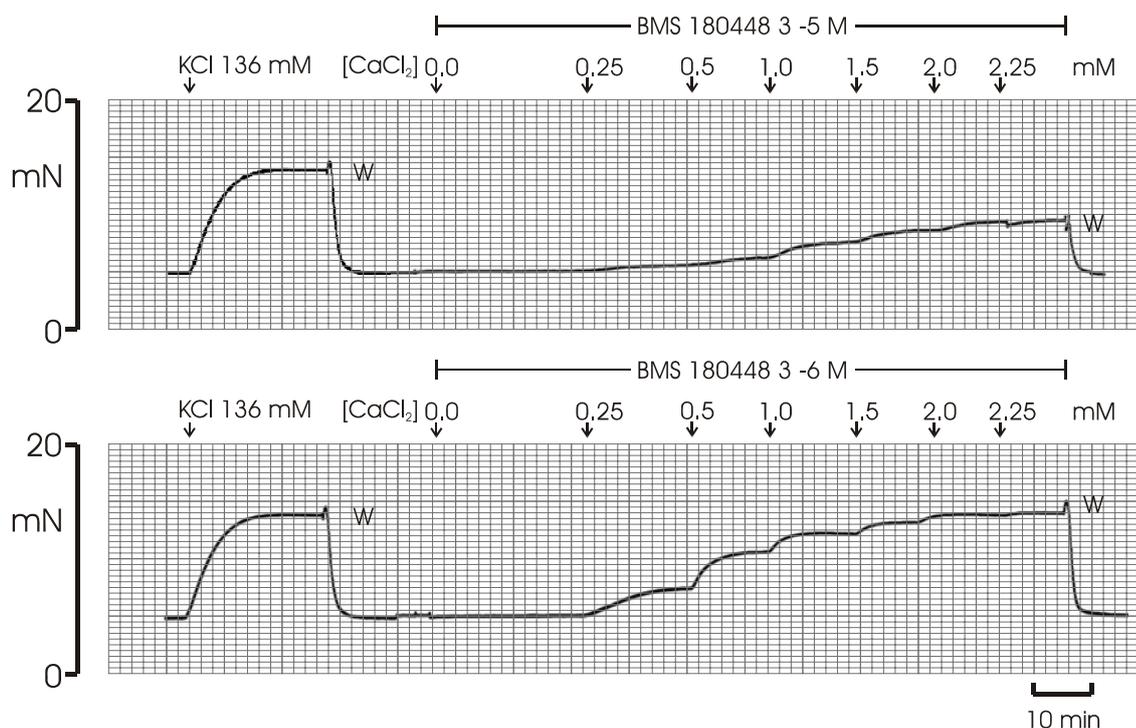


Abb. 4.24: Originalregistrierung einer Calciumdosiswirkungskurve in Anwesenheit von (3S,4R)-BMS-180448 an der Rattenaorta

Abgebildet ist die Originalregistrierung des calciuminduzierten Kontraktionsversuchs mit BMS-180448. Die erste Spur zeigt den Versuchsverlauf bei einer Wirkstoffkonzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M. Die Kontraktionskraft erreicht einen halbmaximalen Wert. Spur 2 zeigt den Parallelversuch mit $3 \cdot 10^{-6}$ M (3S,4R)-BMS-180448. Diese Wirkstoffkonzentration zeigt keinen hemmenden Einfluss auf die Kontraktion.

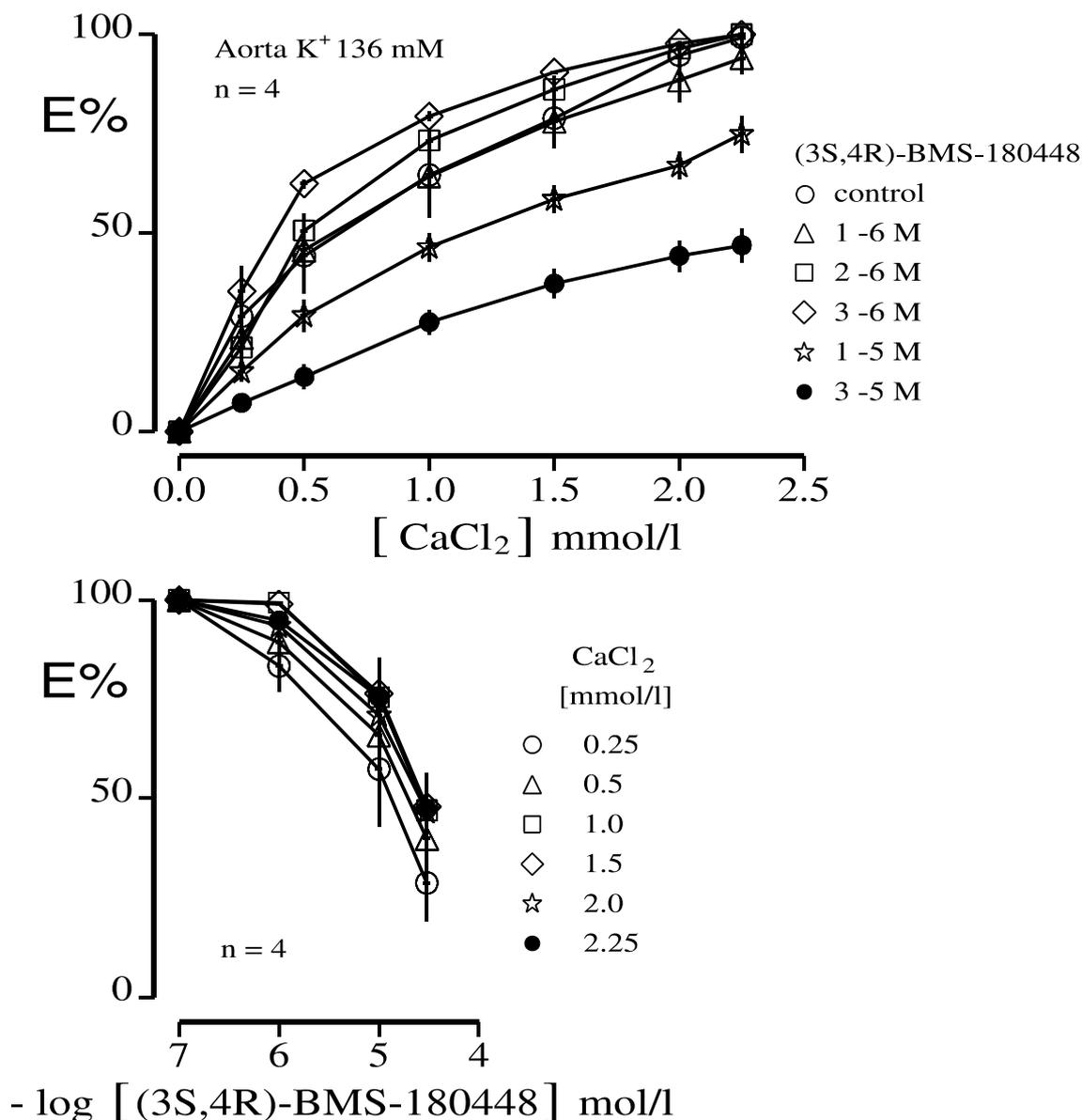


Abb. 4.25: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven durch (3S,4R)-BMS-180448 an mit 136 mM Kaliumchlorid kontrahierten Aortenpräparaten; nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung von (3S,4R)-BMS-180448

Oben: Die Abbildung zeigt die Calcium-Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit von (3S,4R)-BMS-180448 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Eine Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M erbrachte eine halbmaximale Hemmwirkung. In Gegenwart von 136 mM K^+ ist ein reiner K_{ATP} -Kanal-Agonist funktionslos.

Unten: Das Diagramm zeigt die Inhibitionskurven, die durch Umnormierung der Calcium-Dosis-Wirkungskurven für BMS-180448 aus der oberen Abbildung erhalten wurden. (Details s. Methodenteil). Die Inhibitionskurve wurde auf Null extrapoliert und der pEC_{50} -Wert ermittelt. Dieser lag bei etwa $pEC_{50} = 4.73$.

(pEC_{50} -Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

Deshalb wurde (3S,4R)-BMS-180448 im gleichen Modell untersucht. In Abb. 4.24 wird die Originalregistrierung der Dosis-Wirkungskurven von BMS-180448 bei

Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-5}$ M (Spur 1) und $3 \cdot 10^{-6}$ M (Spur 2) an der Rattenaorta in High-Kaliumlösung dargestellt. Während die zu untersuchende Verbindung bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mM keinen Effekt zeigt, schwächt sie bei $3 \cdot 10^{-5}$ M die Kontraktion um etwa 50 % ab.

Abb. 4.24 oberes Bild zeigt die Inhibitionskurven für (3S,4R)-BMS-180448. Deutlich zu erkennen ist, dass keine maximale Unterdrückung der Kontraktion bei hohen Dosen bewirkt werden konnte. Die halbmaximale Kontraktion lag bei etwa 10^{-5} M. Der berechnete pEC_{50} -Wert lag bei 4.73 ± 0.05 (Tab. 4.6, S. 117). Obwohl die Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M nahe der toxischen Grenze lag, konnte BMS-180448 keine vollständige Hemmung der Kontraktion bewirken.

In Abb. 4.26 werden die durch Umnormierung erhaltenen Inhibitionskurven für die Calcium-Konzentration 2.25 mM aller Versuche über eine nicht-lineare Regression (Gl. 3) nochmals geglättet dargestellt. Auffällig ist, dass (3S,4R)-JS09 effektiver als (3R,4S)-JS09 die Calciumkanäle hemmt, umgekehrt wie am K_{ATP} -Kanal, wo (3R,4S)-JS09 eine stärkere Wirkung zeigt. Dies könnte man als cross-over-effect von (3S,4R)-JS09 und (3R,4S)-JS09 im Hinblick auf die K_{ATP} - bzw. Calciumkanal-Wirkung bezeichnen.

(3R,4S)-BMS-191095 und (3S,4R)-BMS-180448 zeigen dagegen nur eine schwache Hemmwirkung: erst Konzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ üben einen hemmenden Effekt von 50 % aus; (Abb. 4.26). In Abb. 4.24 ist die gute Wirkung von (3R,4S)-JS33 erkennbar, jedoch wird die Kontraktion nur zu 60 % gehemmt. Ob diese nicht über den K_{ATP} -Kanal-vermittelte Relaxation über den L-Typ-Calciumkanal vermittelt wird, wird im nächsten Kapitel näher untersucht.

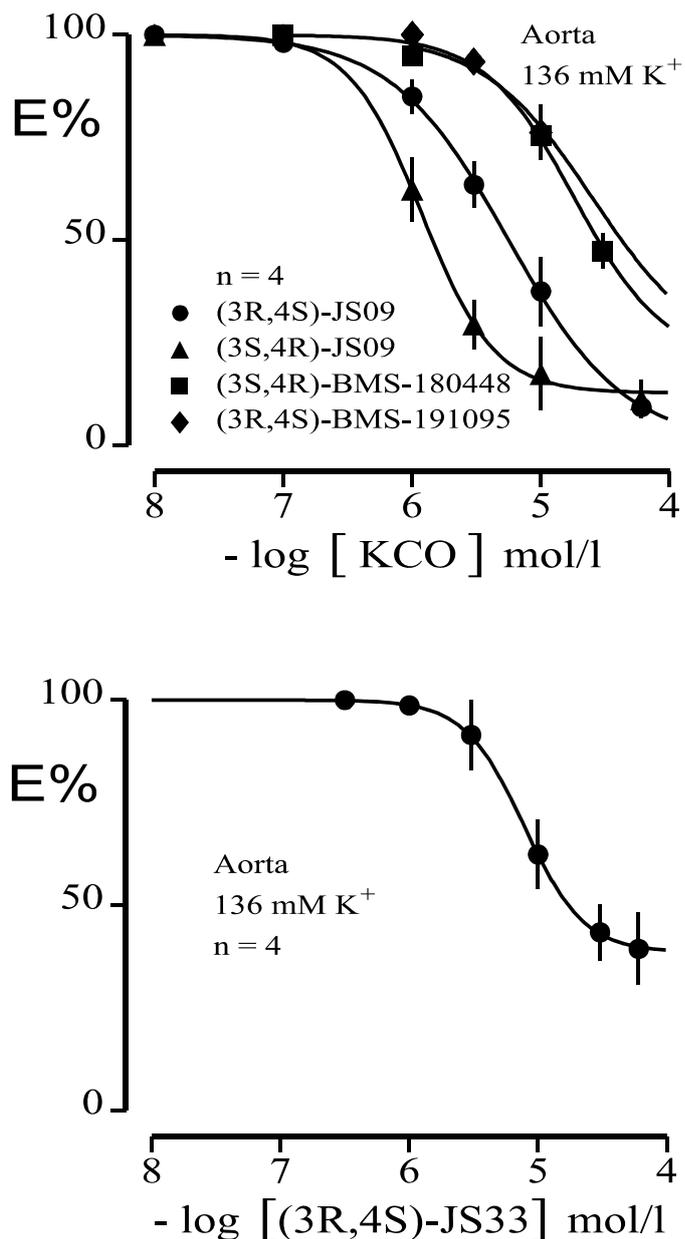


Abb. 4.26: Darstellung der DWK der Substanzen (3R,4S)-JS09, (3S,4R)-JS09, (3S,4R)-BMS191095, (3R,4S)-JS33, (3S,4R)-BMS180448 bei einer Kaliumchloridkonzentration von 136 mM

Oben: Im Diagramm sind die oben genannten Substanzen außer (3R,4S)-JS33 mit ihren Dosis-Wirkungskurven (geglättete Kurven, Fit nach Gl.3) bei einer Calciumkonzentration von 2.25 mM und „High-Kalium“ (136 mM) dargestellt. Auffällig ist, dass als K_{ATP} -Kanalöffner schwächere (3S,4R)-JS09 eine stärkere Relaxationswirkung als (3R,4S)-JS09 zeigte.

Unten: Darstellung der DWK der Substanz (3R,4S)-JS33 bei 2.25 mM Calcium- und einer Kaliumchloridkonzentration von 136 mM. Die Substanz zeigt eine gute Wirksamkeit in nicht toxischen Konzentrationsbereichen. Die geglättete Kurve von JS33 zeigt noch mal die nicht komplette Unterdrückung der Kontraktur (ca. 30%)

(pEC₅₀-Werte s. Tab. 4.6, S. 117)

Tab. 4.6: Relative Wirksamkeit der KCO im funktionellen „High-Kalium“-Relaxationsversuch zur Ermittlung der Blockade des Calciumeinstroms in die Aortazelle. Die Werte wurden durch eine nicht-lineare Regression ermittelt.

Substanzname	pEC₅₀ ± SEM -log mol/l	E% max ± SEM	n
(3R,4S)-JS09	5.25 ± 0.13	100.0 ± 9.6	4
(3S,4R)-JS09	5.92 ± 0.07	87.6 ± 4.8	4
(3R,4S)-BMS191095	4.59 ± 0.07	80.3 ± 5.2	4
(3R,4S)-JS33	5.10 ± 0.11	61.7 ± 7.0	4
(3S,4R)-BMS180448	4.73 ± 0.05	80.2 ± 2.8	4

4.5 Radioligandbindung am L-Typ Ca^{2+} -Kanal mit [^3H]-(+)-PN 200,110

In Kapitel 4.4 wurde die Hemmung der calciuminduzierten Kontraktion durch die Substanzen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass einige der untersuchten Verbindungen die calciuminduzierte Kontraktion der Aortenringe verringerten bzw. ganz unterdrückten. Es bestand jedoch zunächst keine Klarheit darüber, ob und über welchen Calciumkanal dieser Effekt vermittelt wurde.

Aus nahe liegenden Gründen sollte daher untersucht werden, ob dieser Effekt durch die Bindung der Substanzen an den L-Typ Calciumkanal verursacht wird. Zu diesem Zweck wurden Kompetitionsbindungen mit [^3H]-(+)-PN 200,110 an Katzenherzmembranen (KLV) bzw. Kälbertrachealzellen (CKT) durchgeführt. Dieser Radioligand ist ein ^3H -Analogon des Calciumantagonisten Isradipin, welcher eine hohe Affinität zum L-Typ Calciumkanal aufweist. Zur Berechnung der Dissoziationskonstante (pK_D) wurde die Cheng-Prusoffgleichung (Gl. 5, S. 76) angewandt. Wegen der hohen Affinität von [^3H]-(+)-PN 200,110 weicht die Verdrängungskurve nach Korrektur mit dem Cheng-Prusoff-Faktor von der unkorrigierten Verdrängungskurve (Gl. 4, S. 75) bis zu einer log-Einheit ab. Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen wurden untersucht und die Ergebnisse in Tab. 4.7 aufgelistet.

Die Abb. 4.27 zeigt die Kompetitionskurven im Vergleich, durchgeführt mit [^3H]-P1075 (O) und [^3H]-(+)-PN 200,110 (Δ), für die KCO Bimakalim und (3S,4R)-BMS-180448. Die mit der Cheng-Prusoffgleichung korrigierten Verdrängungskurven zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten werden als gestrichelte Kurven dargestellt.

Bimakalim zeigte keine Affinität zum L-Typ Calciumkanal (oberes Bild); damit konnte das Ergebnis aus der calciuminduzierten Kontraktion bestätigt werden. Im unteren Bild sind die Kompetitionskurven für (3S,4R)-BMS-180448 abgebildet. Zu erkennen ist, dass die Verbindung etwa 1.6 log-Einheiten weniger an den L-Typ Calciumkanal bindet als an den K_{ATP} -Kanal. Das Ergebnis aus der Kompetitionsbindung ist mit dem Ergebnis der calciuminduzierten Kontraktion vergleichbar ($\text{pK}_D = 4.62$ vs. $\text{pEC}_{50} = 4.73$, Tab. 4.7 u. Tab. 4.6).

Tab. 4.7: Ergebnisse der Radioligandbindung mit [³H]-(+)-PN 200,110 an Membranen des Katzenherzens (KLV) und Kälbertrachealzellen (CKT) im Vergleich zu den [³H]-P1075-Bindungsdaten an Rattenherzzellen.

$$\Delta pK_D = pK_D ([^3\text{H}]\text{-P1075}) - pK_D (\text{KLV})$$

Substanz	[³ H]-(+)-PN 200,110 KLV ^a pK _D (-log M)	[³ H]-(+)-PN 200,110 CKT ^b pK _D (-log M)	[³ H]-P1075 ^c pK _D (-log M)	ΔpK _D (c-a)
Benzopyrane				
(3R,4S)-JS09	5.07 ± 0.04	5.28 ± 0.06	5.89 ± 0.04	0.82 ± 0.06
(3S,4R)-JS09	5.66 ± 0.03	5.46 ± 0.03	5.10 ± 0.08	-0.56 ± 0.09
(3R,4S)-JS09-Ac	4.96 ± 0.05	5.63 ± 0.04	4.69 ± 0.05	0.00 ± 0.07
(3S,4R)-JS09-Ac	5.47 ± 0.03	5.56 ± 0.06	4.98 ± 0.08	-0.49 ± 0.09
(3R,4S)-BMS-191095	5.10 ± 0.03	5.38 ± 0.07	5.62 ± 0.07	0.52 ± 0.08
(3S,4R)-BMS-191095	5.07 ± 0.02	5.70 ± 0.10	5.12 ± 0.07	0.05 ± 0.07
(3R,4S)-JS33	5.53 ± 0.04	-----	5.72 ± 0.05	0.19 ± 0.06
(3R,4S)-JS16	4.48 ± 0.13	-----	5.53 ± 0.07	1.05 ± 0.15
(3S,4R)-BMS-180448	4.62 ± 0.05	4.79 ± 0.07	6.23 ± 0.05	1.61 ± 0.07
Bimakalim	< 3.0	1.02 ± 4.58	7.51 ± 0.05	> 4.5
Pyridone				
JS42	3.94 ± 0.15	-----	5.25 ± 0.08	1.31 ± 0.16
JS43	4.25 ± 0.08	-----	5.66 ± 0.10	1.41 ± 0.13
JS49	3.70 ± 0.11	-----	5.61 ± 0.08	1.91 ± 0.14
JS26	4.20 ± 0.05	-----	5.69 ± 0.07	1.49 ± 0.09
JS47	4.75 ± 0.03	-----	5.60 ± 0.06	0.85 ± 0.07
JS48	4.85 ± 0.03	-----	5.57 ± 0.07	0.72 ± 0.08
JS44	4.48 ± 0.05	-----	5.40 ± 0.09	0.93 ± 0.10
JS46	4.31 ± 0.06	-----	5.42 ± 0.08	1.11 ± 0.10
Amide/Thioamide				
JS71	< 3.0	-----	4.57 ± 0.10	>1.57
JS68	< 3.0	-----	5.08 ± 0.08	>2.08
JS69	4.73 ± 0.04	-----	5.28 ± 0.10	0.55 ± 0.10
JS55	< 3.0	-----	3.93 ± 0.13	> 0.90

a Daten aus Tab. 4.1, Tab. 4.2 und Tab 4.3

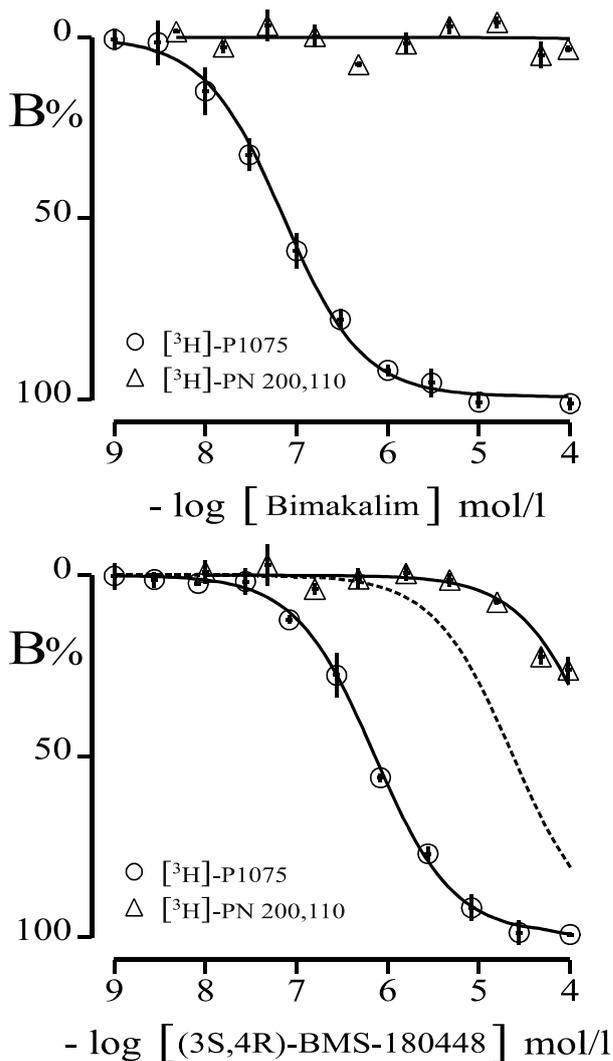


Abb. 4.27: Vergleich der K_{ATP} - und Calciumkanalbindung von (3S,4R)-BMS-180448 und Bimakalim

Oben: Graphische Auswertung der Bindungsdaten von Bimakalim mit [^3H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASC)) und [^3H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Bimakalim zeigt keine Bindungsaffinität für den L-Typ Calciumkanal.

Unten: Darstellung der Kompetitionskurven von (3S,4R)-BMS-180448 mit [^3H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASC)) und [^3H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Für die Calciumkanalbindung ergibt sich keine vollständige Kurve. Die Rezeptorbesetzungskurve (Gl. 5), (gestrichelt dargestellt), erhält man durch Korrektur der mit dem Cheng-Prusoff-Faktor. Die Rezeptorbesetzungskurve für die K_{ATP} -Kanal-Bindung wird nicht dargestellt, weil diese nahezu identisch mit der Verdrängungskurve ist. Somit besitzt (3S,4R)-BMS-180448 eine Selektivität von $\Delta pEC_{50} = 1.61$ zugunsten des K_{ATP} -Kanals.

(pK_D -Werte s. Tab. 4.7, S. 119)

In der Abb. 4.28 sind die Kompetitionskurven für (3R,4S)-JS09 (oben) und (3S,4R)-JS09 (unten) abgebildet. Für (3R,4S)-JS09 wurde ein pK_D -Wert von 5.07 (Tab. 4.7) für den Calciumkanal ermittelt, während am K_{ATP} -Kanal der Herzzellen von der Ratte ein

$pK_D = 5.89$ gemessen wurde. Interessant ist das Ergebnis für das Enantiomer (3S,4R)-JS09 (unteres Bild). Wie im Versuch der calciuminduzierten Kontraktion hat die Verbindung auch in der Kompetitionsbindung eine höhere Affinität zum L-Typ Calciumkanal als zum K_{ATP} -Kanal an Herzzellen ($pK_D = 5.66$ vs. $pK_D = 5.10$).

Auch die Acetylierung, die zu den Verbindungen (3R,4S)-JS09-Ac und (3S,4R)-JS09-Ac (nicht im Bild dargestellt) führt, bringt nur einen geringen Affinitätsverlust (etwa 0.15 log-Einheiten, s Tab. 4.7). Die Substanz (3S,4R)-JS09-Ac zeigt ebenfalls einen „cross over“ in der Kompetitionsbindung mit [3H]-(+)-PN 200,110 verglichen mit [3H]-P1075 ($pK_D = 5.47$ vs. 4.98, Tab. 4.7).

In der Abb. 4.29 werden die Enantiomere von BMS-191095 miteinander verglichen. Für (3R,4S)-BMS-191095 ist die Dissoziationskonstante in der [3H]-(+)-PN 200,110-Kompetitionsbindung etwas kleiner als in der [3H]-P1075-Kompetitionsbindung, während die Kompetitionsbindungsdaten für (3S,4R)-BMS-191095 nahezu gleich sind.

Die Dissoziationskonstanten sind für (3R,4S)-JS33 in der Kompetitionsbindung mit [3H]-(+)-PN 200,110 und [3H]-P1075 identisch (s. Abb. 4.30). (3R,4S)-JS16 zeigte in der Kompetitionsbindung mit [3H]-(+)-PN 200,110 nur eine niedrige Affinität. Mit $pK_D = 4.48$ war die Bindungskonstante so niedrig, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bindung unspezifisch ist.

Aus der Reihe der Pyridone, Amide und Thioamide hatten alle Verbindungen bis auf die verzweigt-aliphatische Verbindung JS47 ($pK_D = 4.75$) und JS48 ($pK_D = 4.85$) Dissoziationskonstanten < 4.5 (Tab. 4.7). Damit sind diese zu gering, um von einer spezifischen Bindung an den L-Typ Calciumkanal zu sprechen. Exemplarisch sind die Kompetitionskurven für drei Vertreter dieser Substanzklasse in Abb. 4.31 abgebildet.

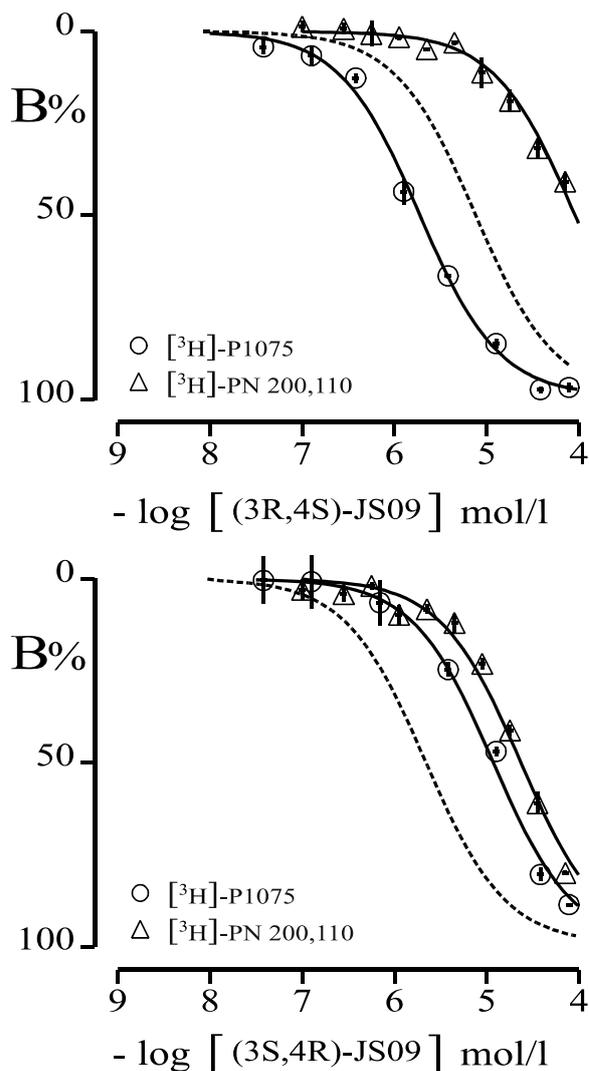


Abb. 4.28: Vergleich der K_{ATP} - und Calciumkanalbindung von (3R,4S)-JS09 und (3S,4R)-JS09

Oben: Darstellung der Kompetitionskurven von (3R,4S)-JS09 mit [3 H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM)) und [3 H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die Substanz weist nahezu 10-fach höhere Selektivität zum K_{ATP} -Kanal auf als zum Calciumkanal ($\Delta pK_D \approx 0.82$).

Unten: Darstellung der Kompetitionskurven von (3S,4R)-JS09 mit [3 H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM)) und [3 H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die korrigierte Kurve wird gestrichelt dargestellt. Die Verbindung zeigt einen „cross over“. Die Selektivität nimmt zugunsten des L-Typ Calciumkanals zu ($\Delta pK_D = -0.56$)

(pK_D -Werte s. Tab. 4.7, S.119)

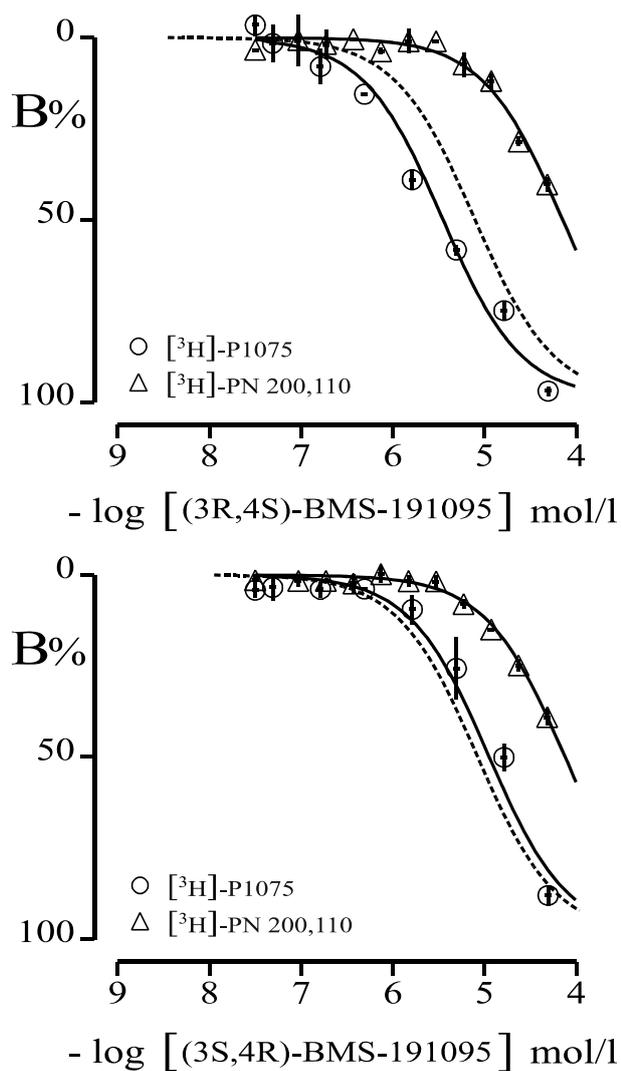


Abb. 4.29: Vergleich der K_{ATP} - und Calciumkanalbindung von (3R,4S)-BMS-191095 und (3S,4R)-BMS-191095

Oben: Darstellung der Kompetitionskurven von (3R,4S)-BMS-191095 mit [³H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCN)) und [³H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die Substanz zeigt eine höhere Selektivität zum K_{ATP} -Kanal ($\Delta pK_D = 0.52$).

Unten: Darstellung der Kompetitionskurven von (3S,4R)-BMS-191095 mit [³H]-P1075 (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCN)) und [³H]-(+)-PN 200,110 (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die korrigierte Kurve wird gestrichelt dargestellt. Die Kurve wird nicht komplett dargestellt. Es ist keine Selektivität zwischen dem K_{ATP} -Kanal und dem L-Typ Calciumkanal erkennbar ($\Delta pK_D = 0.05$).

(pK_D -Werte s. Tab. 4.7; S. 119)

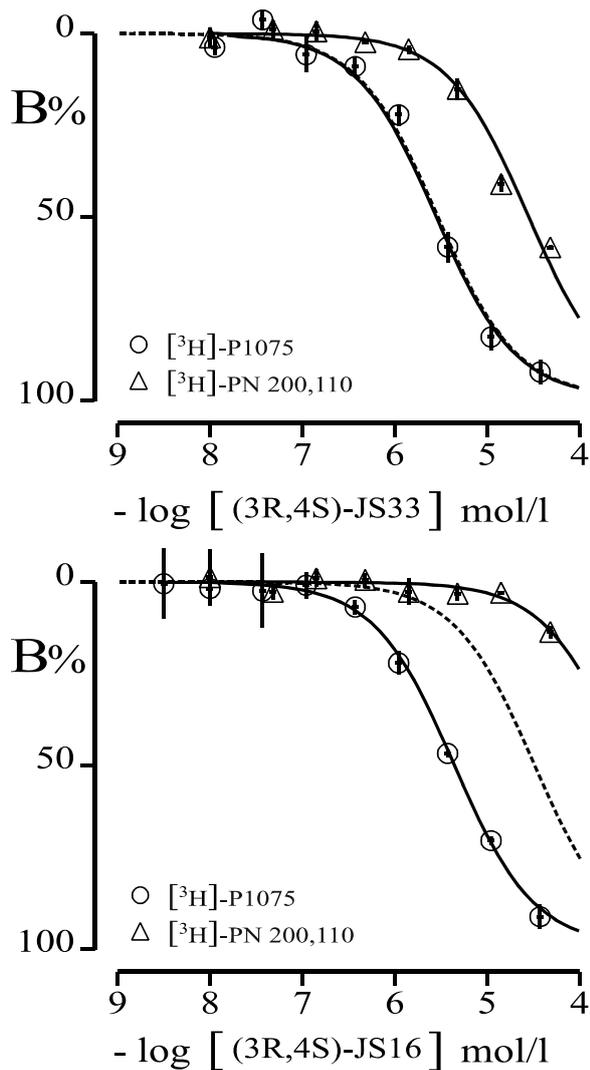


Abb. 4.30: Vergleich der K_{ATP} - und Calciumkanalbindung von (3R,4S)-JS33 und (3R,4S)-JS16

Oben: Darstellung der Kompetitionskurven von (3R,4S)-JS33 mit $[\text{3H}]\text{-P1075}$ (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM)) und $[\text{3H}]\text{-PN 200,110}$ (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die korrigierte Kurve wird gestrichelt dargestellt. Die Verdrängungskurve konnte vollständig gemessen werden. Die Substanz (3R,4S)-JS33 zeigt keine Selektivität zwischen K_{ATP} -Kanal und L-Typ Calciumkanal.

Unten: Darstellung der Kompetitionskurven von (3R,4S)-JS16 mit $[\text{3H}]\text{-P1075}$ (K_{ATP} -Kanal glatter Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM)) und $[\text{3H}]\text{-PN 200,110}$ (L-Typ Calciumkanal an Herzmembranen der Katze). Die korrigierte Kurve wird gestrichelt dargestellt. Die Verdrängungskurve konnte nur über eine Fit-Funktion ermittelt werden (Gl. 3). Die Substanz zeigt eine höhere Affinität zum K_{ATP} -Kanal ($\Delta pK_D = 1.05$).

(pK_D -Werte s. Tab. 4.7, S. 119)

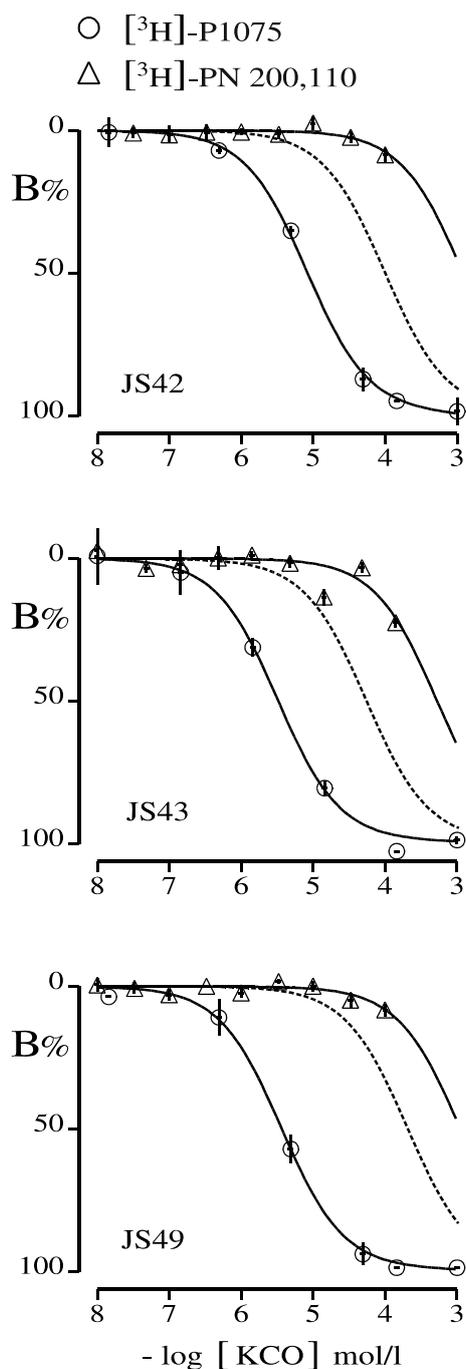


Abb. 4.31: Vergleich der K_{ATP} - und Calciumkanalbindung der Stoffklasse der acyclischen Phenoether am Beispiel von JS42, JS43 und JS49

Für die K_{ATP} -Kanal-Bindung wurde [³H]-P1075 an RASCM und für die Calciumkanalbindung [³H]-(+)-PN 200,110 Herzmembranen der Katze verwendet. Vergleich der Kompetitionskurven aus [³H]-P1075 und [³H]-(+)-PN 200,110-Bindung: Dargestellt sind die Kompetitionskurven für die Vertreter aus der Reihe der Pyridone. Sie zeigen nur kleine Dissoziationskonstanten. Die Kurven konnten nur über einen Fit ermittelt werden. Die Selektivität zugunsten des K_{ATP} -Kanals ist groß ($\Delta pK_D > 1$)

(pK_D -Werte s. Tab. 4.7, S. 125)

4.6 Schildplotanalyse

Diese Versuchsreihe sollte Aufschluss über mögliche K_{ATP} -Kanal-Subtypen für die Wirkung von (3R,4S)-JS09 geben, die an der Relaxation des Aortengewebes beteiligt sind. Dazu wurden Dosis-Wirkungskurven von KCO in An- und Abwesenheit von K_{ATP} -Kanal-Blockern erstellt. Für homogene Rezeptorsysteme liefert die Schild-Regression (Gl. 1, S. 71) nach Arunlakshana und Schild (1959) ein geeignetes Auswertungsverfahren. Für heterogene Systeme aus Rezeptorsubtypen wurde die nicht-lineare Regression (Gl. 2, S. 71; Lemoine et al., 1983) angewendet. Anstelle von Glibenclamid, das nicht dazu geeignet ist, Rezeptorsubtypen aufzudecken, wurde der neue K_{ATP} -Kanal-Blocker BPDZ44 verwendet, der eine Thiadiazinstruktur aufweist.

4.6.1 Erstellung und Berechnung der nicht-linearen Schildplots für Glibenclamid mit (3R,4S)-JS09 und Bimakalim als Agonisten

In Abb. 4.32 werden die Relaxationskurven (3R,4S)-JS09 in An- und Abwesenheit des K_{ATP} -Kanalantagonisten Glibenclamid gezeigt, die am selben Tag mit denselben Aortenringen erstellt worden sind. Die oberste Spur zeigt die Relaxationskurve für den Versuch mit (3R,4S)-JS09, ohne Zugabe eines Blockers am Aortenring der Ratte. Das Gewebe wurde mit 30 mM K^+ vorkontrahiert und anschließend durch Zugabe des Agonisten, beginnend mit einer Dosis von 10^{-7} M, die sukzessiv gesteigert wurde, vollständig relaxiert. Man erkennt, dass die pEC_{50} bei etwa 3×10^{-7} M erreicht wurde. Das Gewebe war bei einer Konzentration von 3×10^{-6} M fast völlig erschlaft. Die Zugabe des KCOs Bimakalim (indiziert durch Bim 1-5 M in Abb. 4.24) führt zu keiner weiteren Erschlaffung des Gewebes.

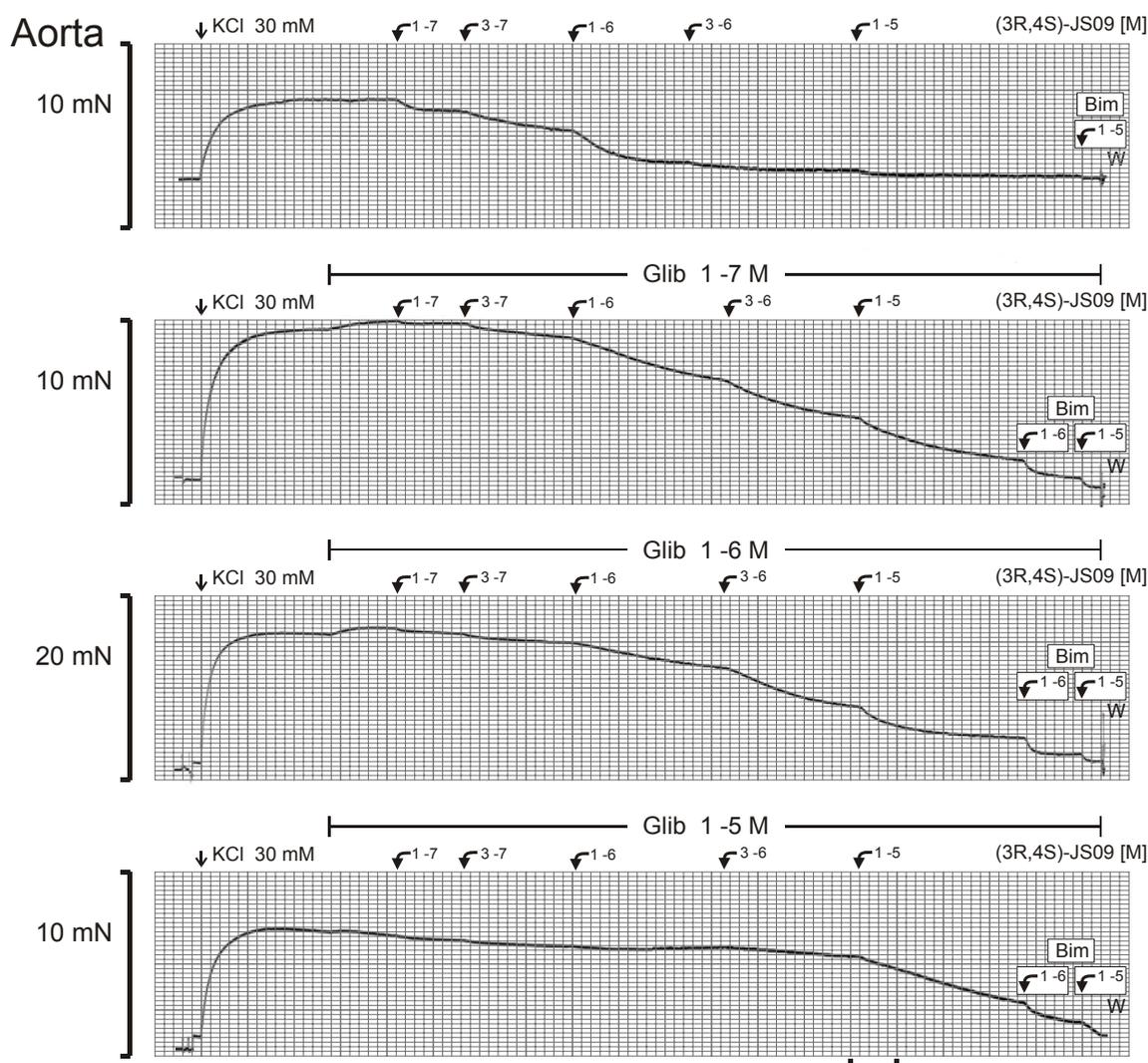


Abb. 4.32: Hemmung der Relaxationswirkung von (3R,4S)-JS09 an isolierten Aortenringen der Ratte durch steigende Dosen von Glibenclamid

Die Vorstimulierung der Aortenpräparate wurde mit 30 mM K^+ durchgeführt. Die obere Spur wurde in Abwesenheit von Glibenclamid registriert. Die Aortenringe der Spuren 2, 3 und 4 wurden mit unterschiedlichen Dosen Glibenclamid inkubiert (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M). Anschließend wurde diese durch Zugabe kumulativer Dosen (3R,4S)-JS09, beginnend mit 10^{-7} M (s. gekrümmte Pfeile), relaxiert. Die Maximalrelaxation der Aortenringe wurde mit 10^{-6} M bzw. 10^{-5} M Bimacalim ermittelt. Anschließend wurden die applizierten Substanzen ausgewaschen (W).

Die Spuren 2, 3 und 4 der Abb. 4.32 zeigen den Kurvenverlauf bei Zugabe des K_{ATP} -Kanalblockers Glibenclamid. Um die toxische DMSO-Konzentration nicht zu erreichen, wurde eine Maximalkonzentration von 10^{-5} M der Substanz (3R,4S)-JS09 (in DMSO gelöst) nicht überschritten. Spur 2 gibt die Dosis-Wirkungskurve wieder, bei der das Gewebe mit 10^{-7} M Glibenclamid inkubiert wurde. Man kann erkennen, dass Glibenclamid eine leichte Verstärkung der Kontraktion bewirkte. Anschließend wurde die Relaxation des Gewebes mit steigender Bimacalimkonzentration gestartet. Die EC_{50} wurde bei ca. 10^{-6} M erreicht. Das Gewebe wurde mit 10^{-5} M Bimacalim

maximal erschlaft, um einen Bezugswert für die Berechnung der Dosis-Wirkungskurven zu erhalten. Dem Gewebe, dessen Relaxation im Kurvenverlauf der Spur 3 gezeigt wird, wurde Glibenclamid in einer Konzentration von 10^{-6} M zugesetzt. In diesem Fall wurde die EC_{50} erst bei ca. $3 \cdot 10^{-6}$ M erreicht. Wurde dem Aortengewebe 10^{-5} M Glibenclamid zugesetzt, so war keine Relaxation bis zu einer (3R,4S)-JS09-Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M zu beobachten. Die EC_{50} wurde bei einer Konzentration von ca. 10^{-5} M erreicht. Eine weitere maximale Erschlaffung des Gewebes konnte mit Bimakalim erzielt werden.

Zur Berechnung eines nicht-linearen Schildplots zur Unterscheidung von Rezeptorsubtypen müssen in der Regel zwei Agonisten unterschiedlicher Selektivität eingesetzt werden, was hier am Beispiel von Bimakalim und (3R,4S)-JS09 gezeigt wird.

Das obere Bild in Abb. 4.33 gibt die Dosis-Wirkungskurven von Bimakalim in Gegenwart steigender Konzentrationen von Glibenclamid wieder. Die maximale Wirkstärke von Bimakalim ist nicht gemindert worden. Jedoch verschoben sich die Dosis-Wirkungskurven von Bimakalim in Gegenwart von Glibenclamid zu höheren Konzentrationen. Dabei wurden diese Dosis-Wirkungskurven parallel verschoben. Die halbmaximale Relaxationswirkung von Bimakalim ohne Zugabe von Glibenclamid lag bei etwa 25 nM ($pEC_{50} = 7.6$), was dem Wert vorangegangener Arbeiten (Salamon et al., 2001; Dissertation: $pEC_{50} = 7.79 \pm 0.07$) entsprach. Die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 10^{-7} M Glibenclamid, führte schon zu einer Rechtsverschiebung der Kurve um 0.3 log-Einheiten. Die pEC_{50} lag nunmehr bei etwa 7.4. Durch Zugabe von $3 \cdot 10^{-7}$ M Glibenclamid wurde die Dosis-Wirkungskurven um etwa 0.5 log-Einheiten (pEC_{50} etwa bei 7.10), durch Zugabe von 10^{-6} M Glibenclamid um etwa 0.75 log-Einheiten (pEC_{50} etwa bei 6.85), durch Zugabe von 10^{-5} M Glibenclamid um etwa 1.5 log-Einheiten (pEC_{50} etwa bei 6.12) verschoben.

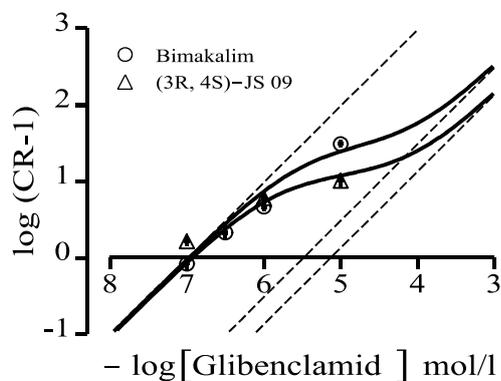
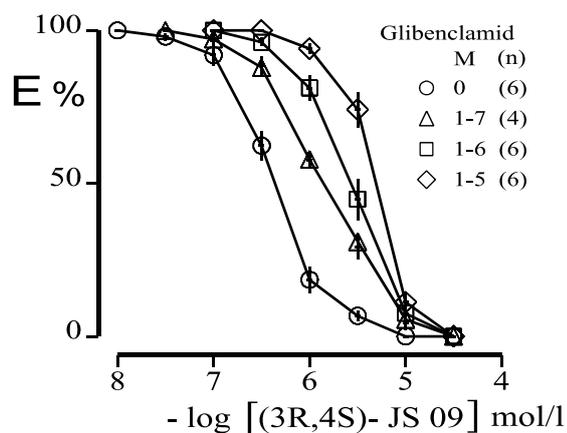
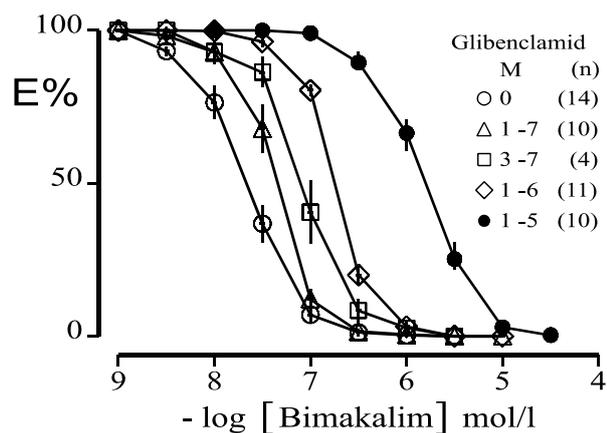


Abb. 4.33: Analyse der konzentrationsabhängigen Hemmung von (3R,4S)-JS09 und Bimakalim durch Glibenclamid

Oben: Dosiswirkungskurven von Bimakalim in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Glibenclamid (10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, 10^{-5} M).

Mitte: Dosiswirkungskurven von (3R,4S)-JS-09 in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Glibenclamid (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M).

Unten: Nicht-linearer Schildplot. Doppelt logarithmische Auftragung der Konzentrationsquotienten (CR-1), bestimmt auf 50%-Niveau, gegen die Konzentrationen von Glibenclamid. Die Konzentrationsquotienten (CR) stammen aus den oberen Dosis-Wirkungskurven für Bimakalim (O) und den mittleren Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 (Δ). Der Schätzwert der Dissoziationskonstante ergab einen Wert von $pK_B = 7.00 \pm 0.08$.

Das Diagramm in der Mitte aus Abb. 4.33 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 in An- und Abwesenheit von Glibenclamid. Auch hier ist eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 zu höheren Konzentrationen zu beobachten. Der pEC_{50} -Wert für die Dosis-Wirkungskurve für (3R,4S)-JS09 in Abwesenheit von Glibenclamid ergibt die gleichen Ergebnisse wie Abb. 4.12. Die Inkubation der Aortenringe mit 10^{-7} M Glibenclamid führte zur Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve um etwa 0.4 log-Einheiten (pEC_{50} etwa bei 5.8). Somit war die Verschiebung stärker ausgeprägt als bei Bimakalim. Die Zugabe von 10^{-6} M Glibenclamid führte zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven um 0.8 log-Einheiten (pEC_{50} etwa bei 5.5), und die Zugabe von 10^{-5} M Glibenclamid zu einer Verschiebung um 1.04 log-Einheiten. Vergleicht man die pEC_{50} -Werte untereinander bei steigender Glibenclamidkonzentration, so ist zu beobachten, dass die ΔpEC_{50} -Werte für (3R,4S)-JS09 stetig abnehmen. Im Diagramm ist auch keine äquidistante Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven zu erkennen. Bei einer 10fachen Dosissteigerung des Blockers erwartet man bei einfach kompetitiven Blockaden eine zusätzliche Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve um 1 log-Einheit. Vielmehr bleiben diese bei einer Glibenclamidkonzentration von etwa 10^{-6} M quasi „stehen“.

Im unteren Bild der Abb. 4.33 ist der nicht-lineare Schildplot für Bimakalim und (3R,4S)-JS09 in Anwesenheit von Glibenclamid dargestellt. An der Ordinate wird der Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses (CR-1) (concentration ratio) abgelesen. CR wurde aus den ΔpEC_{50} der Dosis-Wirkungskurven in Ab- und Anwesenheit von Glibenclamid errechnet (Gl. 1). Während der Schildplot für Bimakalim nahezu linear war und eine Glibenclamid-Affinität mit einem pK_B -Wert von ca. 7.0 ergab (Tab. 4.8), knickte der Schildplot bei Verwendung von (3R,4S)-JS09 ab 10^{-6} M Glibenclamid ab (s. Abb. 4.33). Dabei zeigte (3R,4S)-JS09 einen fraktionierten Stimulus (Angabe zur Rezeptorsubtypselektivität) von 0.93 ± 0.08 und Bimakalim von 0.97 ± 0.03 (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Ergebnisse der nicht-linearen Schildplot-Analyse

Blocker	frakt. Stimulus (3R,4S)-JS-09	frakt. Stimulus Bimakalim	pK_B
Glibenclamid	0.93 ± 0.08	0.97 ± 0.03	7.00 ± 0.08
BPDZ44	0.78 ± 0.15	0.95 ± 0.05	5.76 ± 0.15

4.6.2 Erstellung und Berechnung der nicht linearen Schildplots für BPDZ44 mit (3R,4S)-JS09 und Bimakalim als Agonisten

Die Abb. 4.34 gibt den Versuchsablauf für Bimakalim als Agonist und BPDZ44 als Antagonist wieder. Der Versuch wurde wie in der Legende beschrieben durchgeführt. Die oberste Spur zeigt den Kurvenverlauf der Relaxation ohne Blocker. Zuerst wurde der Aortenring mit 30 mM KCl vorkontrahiert. Die Relaxation des Gewebes wurde bei einer Bimakalimkonzentration ab $3 \cdot 10^{-9}$ M ausgelöst. Eine halbmaximale Erschlaffung des Gewebes liegt im Konzentrationsbereich von Bimakalim zwischen 10^{-8} M und $3 \cdot 10^{-8}$ M.

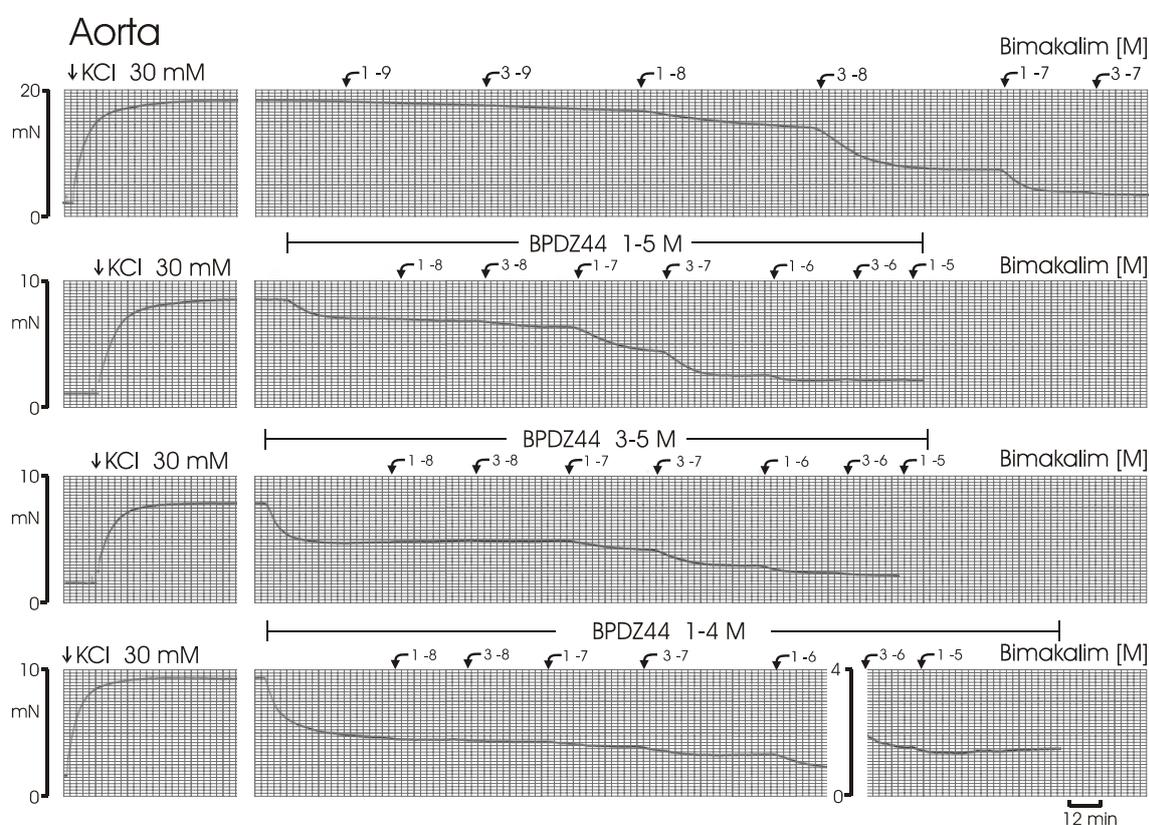


Abb. 4.34: Hemmung der Dosis-Wirkungskurven für Bimakalim an isolierten Aortenringen der Ratte durch steigende Dosen BPDZ44

Die Vorstimulierung der Aortenpräparate wurde mit 30 mM K^+ durchgeführt. Die obere Spur wurde in Abwesenheit von BPDZ44 registriert. Die Aortenringe der Spuren 2, 3 und 4 wurden mit unterschiedlichen Dosen BPDZ44 inkubiert (10^{-5} M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M). Anschließend wurde diese durch kumulative Zugabe von Bimakalim, beginnend mit 10^{-8} M (s. gekrümmte Pfeile), relaxiert. BPDZ44 zeigt nach Zugabe eine Eigenwirkung, die allerdings 50 % der maximalen Relaxation nicht überstieg.

In Spur 2 wird der Kurvenverlauf der Relaxation nach Zugabe von 10^{-5} M BPDZ44 gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, dass das Aortengewebe um etwa 20 % erschlafft. BPDZ44 zeigt somit an der Aorta einen agonistischen Effekt. Jedoch wurde gleichzeitig die pEC_{50} für Bimakalim zu etwa 10^{-7} M verschoben, was für einen antagonistischen Effekt von BPDZ44 spricht. Damit ist BPDZ44 als partieller Agonist charakterisiert. Wurde der Aorta nach Kontraktion mit KCl eine Dosis von $3 \cdot 10^{-5}$ M BPDZ44 verabreicht, so verstärkten sich beide Effekte (Spur 3). Das Gewebe wurde zu ca. 40 % erschlafft. Zudem wurde die agonistische Wirkung für Bimakalim gehemmt, da der halbmaximale Relaxationseffekt erst bei etwa 10^{-7} M erreicht wurde. Spur 4 zeigt den Versuchsablauf, nachdem 10^{-4} M BPDZ44 hinzugegeben wurde, die in der Nähe der toxischen Grenzdosis liegt. Das Gewebe wurde so stark mit BPDZ44 relaxiert (> 50 %), dass eine Signalverstärkung durchgeführt werden musste (Umkalibrierung von 10 mN auf 4 mN). Trotzdem ist der Kurvenverlauf der Relaxation der Aorta noch gut erkennbar. Bimakalim erreicht den halbmaximalen Effekt bei $pEC_{50} = 10^{-6}$ M.

Die Abb. 4.35 oberes Bild zeigt die Dosis-Wirkungskurven für Bimakalim in An- und Abwesenheit von BPDZ44. Die maximale Wirkstärke von Bimakalim blieb nach Inkubation der Aortenringe mit BPDZ44 unbeeinflusst. Jedoch veränderten sich die pEC_{50} -Werte zu höheren Konzentrationen, je höher die Glibenclamidkonzentration war. Zu erkennen ist, dass dabei die Dosis-Wirkungskurven parallel verschoben wurden. So ergab die Zugabe von 10^{-6} M BPDZ44 eine Verschiebung um etwa 0.10 log-Einheiten, die Inkubation mit 10^{-4} M BPDZ44 ein Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve um etwa 1.3 log-Einheiten ($3 \cdot 10^{-6}$ M BPDZ44: $\Delta pEC_{50} \approx 0.4$; 10^{-5} M BPDZ44: $\Delta pEC_{50} \approx 0.7$; $3 \cdot 10^{-5}$ M BPDZ44: $\Delta pEC_{50} \approx 1.0$).

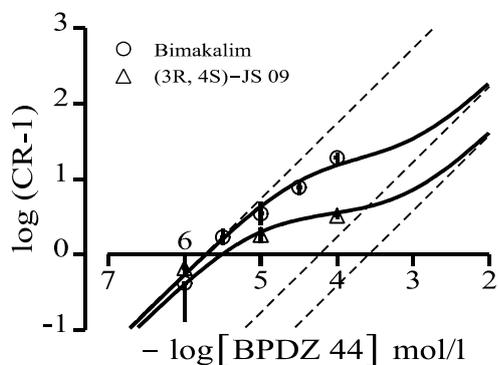
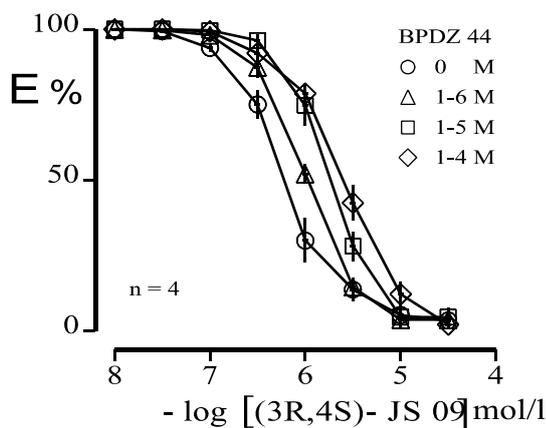
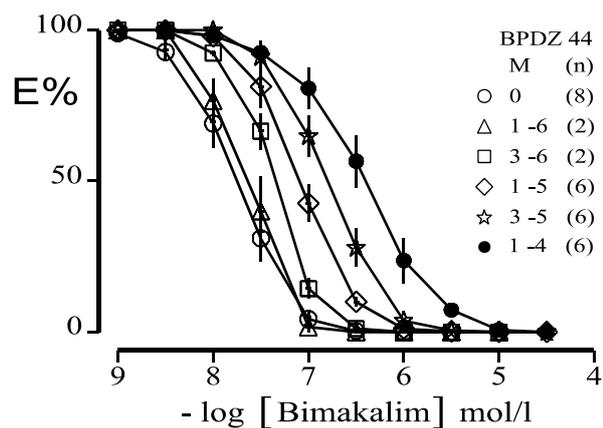


Abb. 4.35: Analyse der konzentrationsabhängigen Hemmung von Bimakalim und (3R,4S)-JS09 durch BPDZ44

Oben: Dosiswirkungskurve von Bimakalim in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von BPDZ44 (10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M)

Mitte: Dosiswirkungskurve von (3R,4S)-JS-09 in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Glibenclamid (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M)

Unten: Nicht-linearer Schildplot. Doppelt logarithmische Auftragung der Konzentrationsquotienten (CR-1), bestimmt auf 50 %-Niveau, gegen die Konzentrationen von BPDZ44. Die Konzentrationsquotienten (CR) stammen aus den oberen Dosis-Wirkungskurven für Bimakalim (O) und den mittleren Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 (Δ). Der Schätzwert der Dissoziationskonstante ergab eine Wert von $pK_B = 5.76 \pm 0.15$

Das mittlere Bild der Abb. 4.35 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für (3R,4S)-JS09 in An- und Abwesenheit von BPDZ44. Die Verschiebung der Kurven nach Inkubation von BPDZ44 ist nur schwach ausgeprägt (10^{-4} M BPDZ44: $\Delta pEC_{50} \approx 0.6$). Die maximale Wirkstärke konnte mit (3R,4S)-JS09 erreicht werden. Das untere Bild der Abb. 4.35 zeigt den nicht-linearen Schildplot für BPDZ44. Während der Konzentrationsquotient von Bimakalim einen nahezu linearen Verlauf zeigt, knickt der Schildplot für (3R,4S)-JS09 bei einer Konzentration von 10^{-5} M BPDZ44 nahezu waagrecht zur Abszisse ab (keine weitere Zunahme der Blockadewirkung des Antagonisten). Der Schildplot hatte einen fraktionierten Stimulus von 0.78 ± 0.15 für (3R,4S)-JS09 und von 0.95 ± 0.05 für Bimakalim bei einem $pK_B = 5.76 \pm 0.15$ für BPDZ44 (Tab. 4.8).

4.6.3 Analyse der Blockerwirkung von Glibenclamid und BPDZ44 im linearen Schildplot

Zur weiteren Verdeutlichung der Ergebnisse im nicht-linearen-Schildplot wurde auch der lineare Schildplot berechnet. Die Berechnung des Schildplots erfolgte aus den Daten, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven ergaben (s. Abb. 4.33 und Abb. 4.35). Zur Berechnung des Schildplots nach Arunlakshana und Schild (1959) wurde Gl.1 (S. 71) angewendet. Abb. 4.36 zeigt die Ergebnisse in graphischer Darstellung. So zeigen die Schildplots, die sich aus Bimakalim ergeben, eine Steigung von etwa 0.8, die Schildplots mit (3R,4S)-JS09 dagegen hatten eine Steigung von etwa 0.4 (Tab. 4.9). Somit kann eine reine Agonisten-Antagonisten-Wirkung für (3R,4S)-JS09 am K_{ATP} -Kanal ausgeschlossen werden, da in diesem Fall eine Steigung von 1 erreicht werden muss. Aus den Schildplots, die mit Bimakalim erstellt wurden, errechneten sich pK_B -Werte von 6.90 für Glibenclamid ($pK_D = 7.98$) und 5.57 für BPDZ44 (Tab. 4.9). Die Ergebnisse, die sich aus den Schildplots für (3R,4S)-JS09 ergeben, können aufgrund der niedrigen Steigung nicht interpretiert werden.

Tab. 4.9: Ergebnisse der Schildplot-Regression nach Arunlakshana und Schild

Agonist	Blocker	Steigung	pK_B
(3R,4S)-JS09	Glibenclamid	0.40 ± 0.06	7.69 ± 0.26
(3R,4S)-JS-09	BPDZ 44	0.35 ± 0.06	5.57 ± 0.16
Bimakalim	Glibenclamid	0.78 ± 0.05	6.90 ± 0.06
Bimakalim	BPDZ 44	0.79 ± 0.15	5.64 ± 0.18

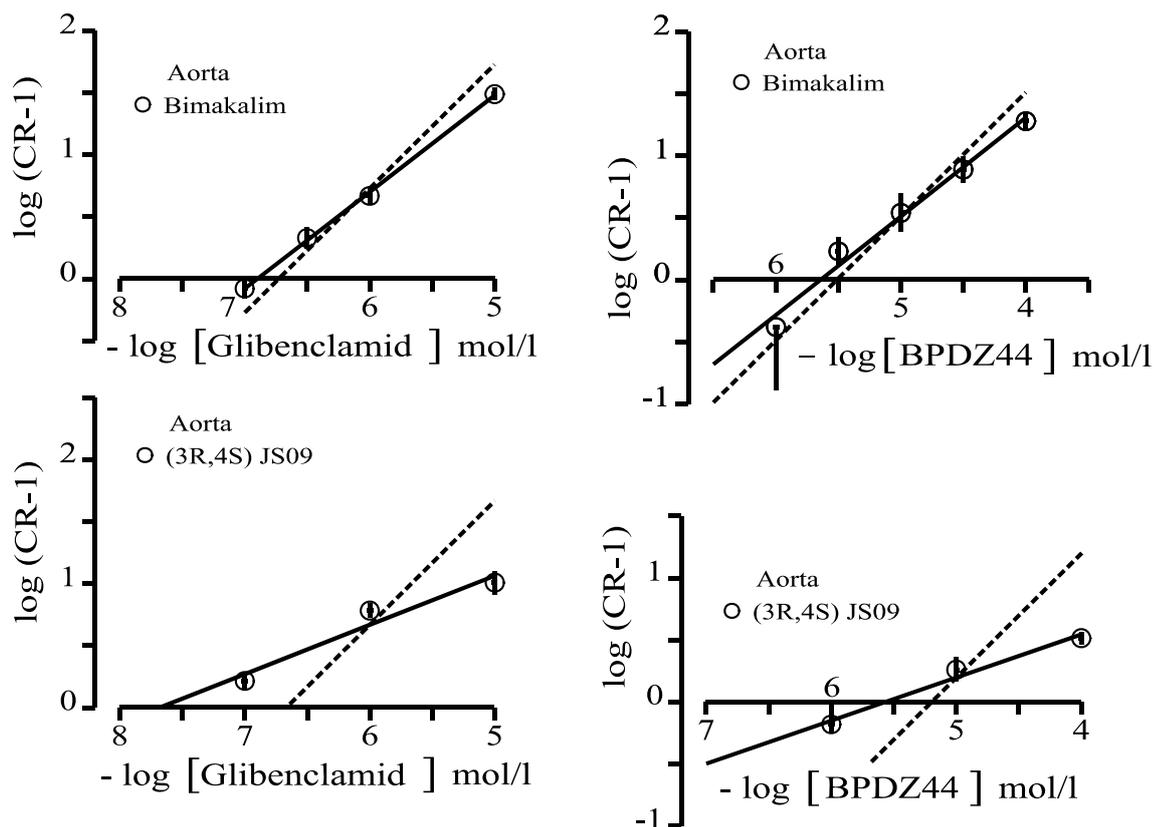


Abb. 4.36: lineare Schildplotanalyse durch konzentrationsabhängige Hemmung eines KCO mit einem K_{ATP} -Blocker

Doppelt logarithmische Auftragung der Konzentrationsquotienten (CR-1) gegen die Konzentration der Antagonisten von Glibenclamid und BPDZ44. Die Konzentrationsquotienten (CR-1) wurden für Glibenclamid der **Abb. 4.33** und für BPDZ44 der **Abb. 4.35** entnommen. Die für eine einfach-kompetitive Wechselwirkung annähernden Geraden mit der Steilheit 1 wurde gestrichelt dargestellt. Sie zeigt insbesondere große Abweichung der (3R,4S)-JS09-Daten.

4.6.4 Charakterisierung von BPDZ44 und BPDZ79 anhand von Radioligandbindung und Relaxationsexperimenten

Seither wurde die Substanz BPDZ44 als „reiner“ Kaliumkanalöffner (KCO) eingestuft (Pirrotte et al.; 1993), doch nach den vorstehenden Untersuchungen mit der Substanz ergibt sich eine differenziertere Sichtweise, die in der nachfolgenden Diskussion näher erläutert werden soll.

Um die Affinität zum K_{ATP} -Kanal nachzuweisen, wurden zuerst Kompetitionsbindungen mit dem radioaktiven Pinacidilabkömmling [3H]-P1075 durchgeführt (Abb. 4.37 u. Tab. 4.10; S. 141).

An Aortenzellen (RASCN) zeigten die Diazoxidabkömmlinge einen $pK_D = 6.06$ für BPDZ44 und $pK_D = 6.54$ für BPDZ79. Diazoxid hatte eine etwa 10-fach schwächere Bindungsaffinität mit $pK_D = 4.96$. Auch an den Herzmembranen der Ratte konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden. Hier hatte BPDZ44 eine Bindungsaffinität von $pK_D = 6.16$ und BPDZ79 von 6.27. Auch an den Herzmembranen zeigte Diazoxid eine deutlich schwächere Bindung mit $pK_D = 4.69$ (Tab. 4.10, S. 141).

In der Radioligandbindung mit [3H]-(+)-PN 200,110 an Rattenherzzellen war keine Affinität der drei Thiadiazine zu den Calciumkanälen vom L-Typ erkennbar (Tab. 4.10, S. 141).

Aus Abb. 4.37 geht hervor, dass alle Substanzen an den K_{ATP} -Kanal binden. Allerdings geben die Bindungsstudien keinen Aufschluss darüber, ob der Kanal aktiviert oder blockiert wird. Die physiologischen Relaxationsexperimente an der Aorta und Trachea der Ratte mit BPDZ44 und BPDZ 79 sollten Klarheit bringen (Abb. 4.38).

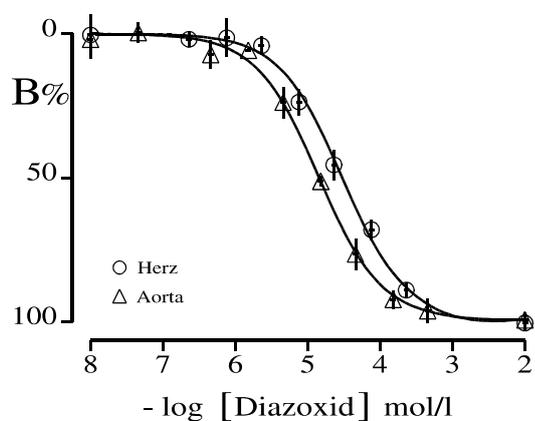
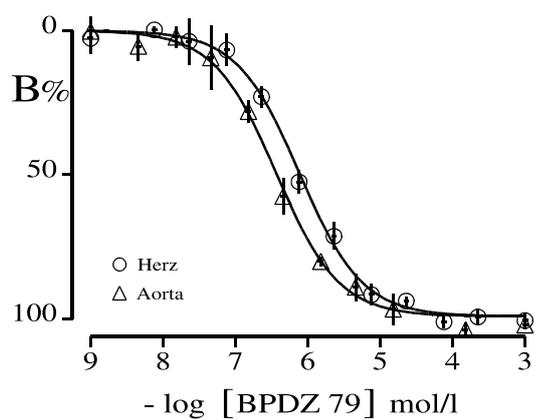
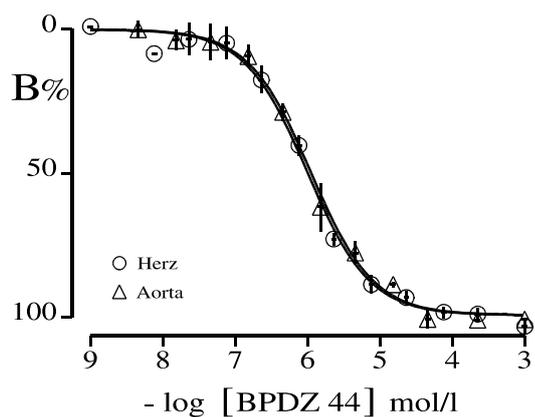


Abb. 4.37: Vergleich der Kompetitionskurven mit [^3H]-P1075 von BPDZ44, BPDZ79 und Diazoxid an Herz- und Aortenzellen (RASCN)

Bei 10^{-3} M bzw. 10^{-2} M ist die unspezifische Bindung gezeigt, die mit $2 \mu\text{M}$ P1075 bestimmt wurde.

Oben: BPDZ44 erreicht einen pK_D -Wert von etwa 6.0. Dabei sind die Kompetitionskurven an RASCN und an Herzzellen identisch.

Mitte: BPDZ79 besitzt geringfügig höhere Affinität zum K_{ATP} -Kanal als BPDZ44, wobei an RASCN mit $\text{pK}_D = 6.54$ eine höhere Affinität gemessen wurde als an Herzzellen.

Unten: Diazoxid gilt als niederaffiner KCO. Die pK_D -Werte liegen unterhalb von 5.0.

Hierbei zeigte sich, dass BPDZ79 an der Rattenaorta eine $pEC_{50} = 5.88$ (91% des Maximaleffektes) aufweist. An der Trachea zeigt die Substanz eine geringere Wirkung mit $pEC_{50} = 5.31$ (94.2% Maximaleffektes, Tab. 4.10, S. 141). Somit stimmt das Ergebnis für BPDZ79 an der Aorta qualitativ mit den Ergebnissen aus der Radioligandbindung an Aortenzellen überein, wobei quantitativ ein $\Delta pEC_{50} \approx 0.7$ resultiert. Hingegen zeigte BPDZ44 ein anderes Bild. An der Rattenaorta wäre nach den Ergebnissen der Radioligandbindung ein pEC_{50} -Wert von etwa 6.2 zu erwarten gewesen.

Tatsächlich konnte im Relaxationsexperiment mit kumulativer Zugabe der Testsubstanz keine typische Dosis-Wirkungskurve und keine typische pEC_{50} ermittelt werden. So wurden die Messdaten nach der Einfachzugabe (single dosages) ermittelt. Dabei wird dem Gewebe nur eine Dosis der Testsubstanz hinzugefügt und die folgende Relaxation gemessen. Diese Versuchsmethode ist zwar aufwendiger, jedoch sind die Relaxationswerte wegen der kürzeren Versuchsdauer (ca. 30 min) pro Einzeldosis (180 min für eine kumulative Dosis-Wirkungskurve) wesentlich zuverlässiger zu bestimmen (Reliabilität) Gewebe wegen der kurzen Testdauer nicht so stark gestresst. Die Ergebnisse sind somit eher verlässlich. Mit dieser Versuchsmethode konnte an der Aorta der Ratte ein pEC_{50} -Wert von etwa 4.0 gemessen werden (Abb. 4.39). Somit ist im Funktionstest eine 100fache höhere Konzentration als in der Radioligandbindung nötig, um einen halbmaximalen Relaxationseffekt zu erzielen. An der Trachea konnte keine signifikante Relaxation ermittelt werden (Abb. 4.39).

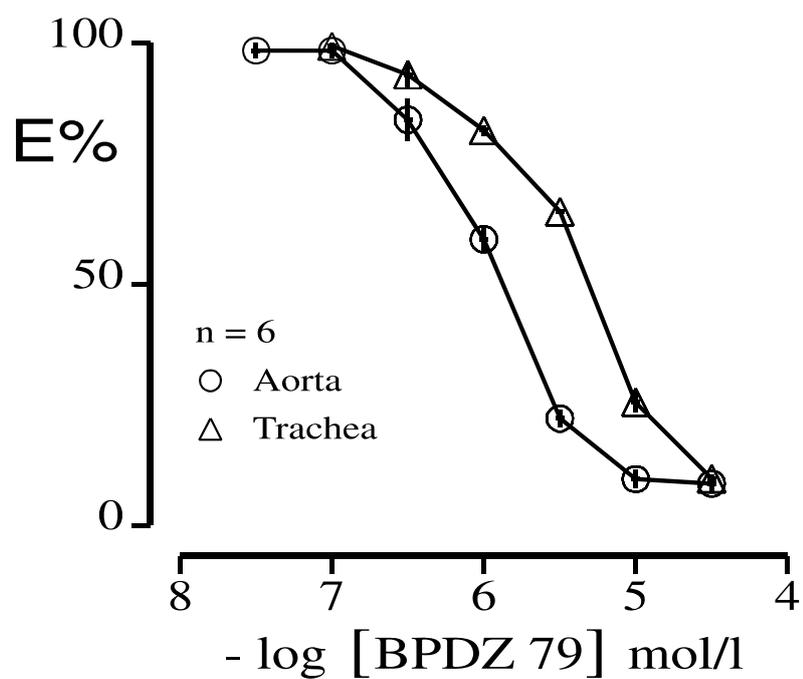
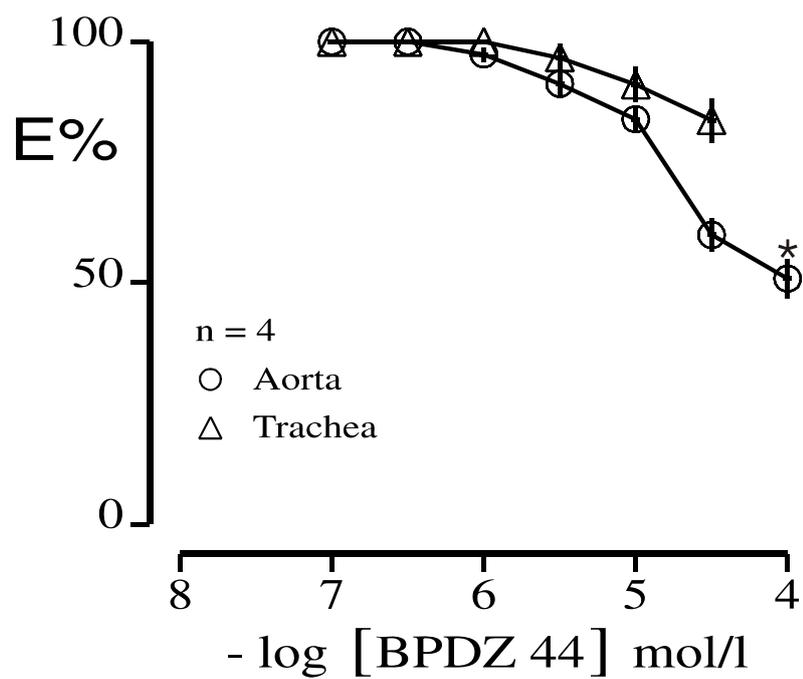


Abb. 4.38: Vergleich der Relaxationswirkung von BPDZ44 und BPDZ79 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte

Oben: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven erhalten nach der kumulativen Dosierung und Einzeldosierung an der Rattenaorta. Bei einer Konzentration von ca. 10^{-4} M wird die EC_{50} erreicht.

Unten: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von BPDZ79 an Aorta und Trachea.

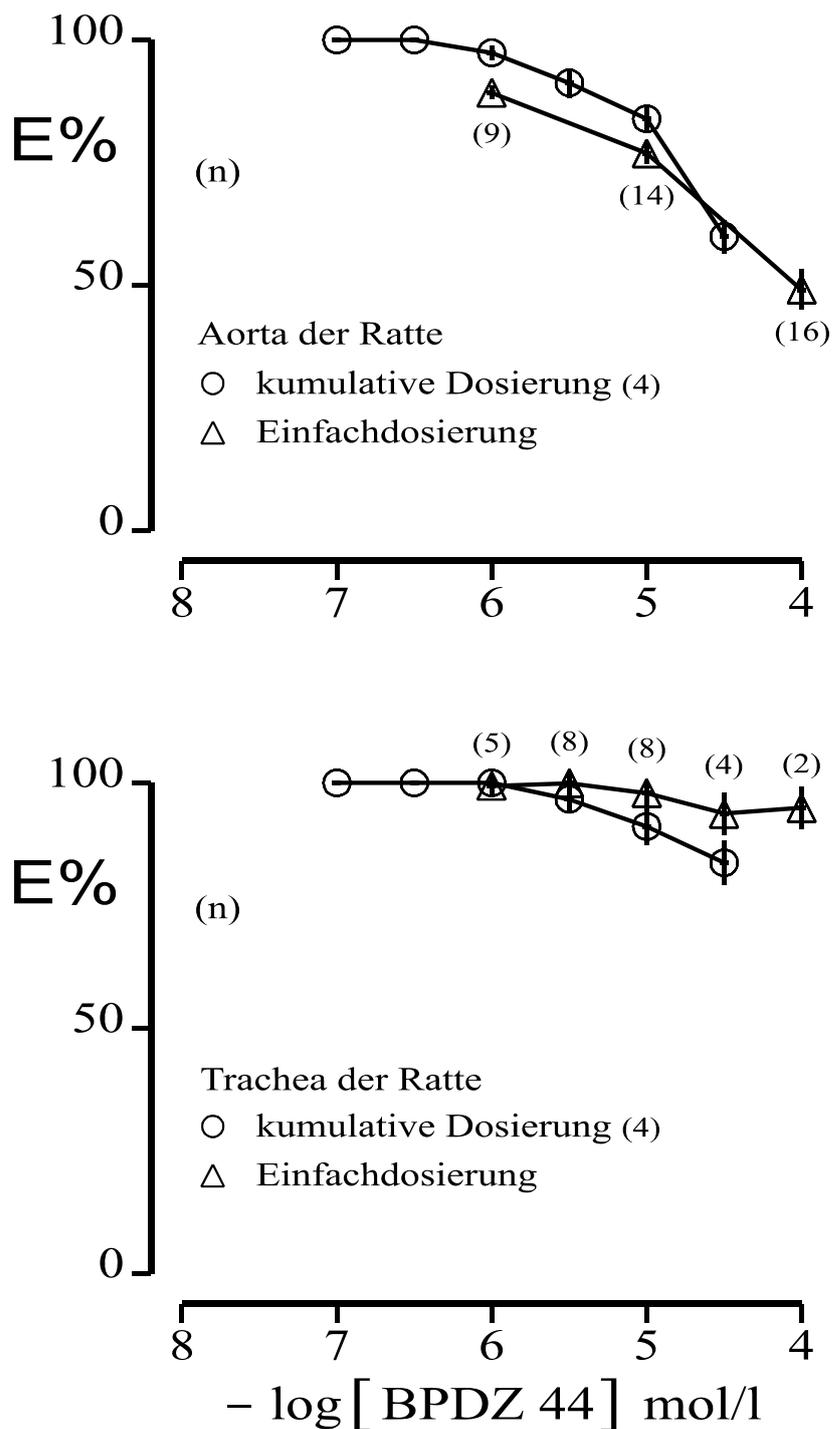


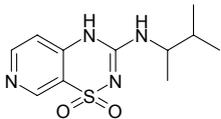
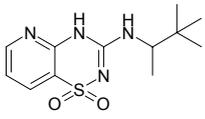
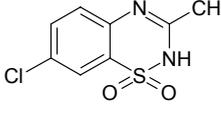
Abb. 4.39: Vergleich der Relaxationswirkung von BPDZ44 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte

Oben: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven erhalten nach der kumulativen Dosierung und Einzeldosierung an der Rattenaorta. Bei einer Konzentration von ca. 10^{-4} M wird die EC_{50} erreicht.

Unten: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven erhalten nach der kumulativen Dosierung und Einzeldosierung an der Rattentrachea. Die Substanz zeigt an der Trachea kaum relaxierende Eigenschaften.

In der Abb. 4.40 werden die Ergebnisse aus dem kumulativen und der Einzelgabe nebeneinander dargestellt. Da die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Radioligandbindung und funktionellem Experiment sehr groß war, wurde vermutet, dass ein non-K_{ATP}-Kanal-vermittelter Effekt zur Relaxation beiträgt oder dass die Testsubstanz BPDZ44 partiell antagonistisch wirkt. Um diese Frage zu testen, wurden in einer weiteren Versuchsserie die K_{ATP}-Kanal-vermittelte Wirkungen durch Ausgleich von intra- und extrazellulärer Kaliumkonzentration (136 mM KCl) eliminiert (Abb. 4.42). Diese ergaben eine ähnliche Relaxationskurve wie im physiologischen Puffer. BPDZ44 unterdrückte die Kontraktion der Aortenringe im Experiment der calciuminduzierten Kontraktur bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M um mehr als 50 % (Abb. 4.40). Somit kann ein nicht-K_{ATP}-Kanal-vermittelter Relaxationsmechanismus von BPDZ44 in Erwägung gezogen werden, der evtl. über den Calciumkanal ausgelöst wird.

Tab. 4.10: Vergleich von pK_D-Werten aus der Radioligandbindung an isolierten Rattenherzzellen und RASCM sowie der pEC₅₀-Wert für die Relaxation an isolierten Organpräparaten

	BPDZ44	BPDZ79	Diazoxid
			
Radioligandbindung mit [³ H]-P1075 an Organpräparaten der Ratte			
	pK _D ± ASD	pK _D ± ASD	pK _D ± ASD
RASCM	6.06 ± 0.07	6.54 ± 0.05	4.96 ± 0.06
Herzzellen	6.16 ± 0.05	6.27 ± 0.06	4.69 ± 0.06
Radioligandbindung mit [³ H]-(+)-PN 200,110			
KLV	pK _D < 3.00	pK _D < 3.00	pK _D < 3.00
Relaxationsexperimente an isolierten Rattengewebe pEC ₅₀			
Aorta	< 4.00; ≈ 4.00 ^a	5.88 ± 0.02	4.76 ± 0.06 ^b
E% max	< 50 %	91.0 %	79.8 ± 0.2 ^b
Trachea	< 4.00, nicht wirksam ^a	5.31 ± 0.02	3.83 ± 0.11 ^b
E% max	< 10 %	94.2 %	50% bei 3.83 ^b

a single dosage-Methode

b Jaspert, 2001

* extrapoliert

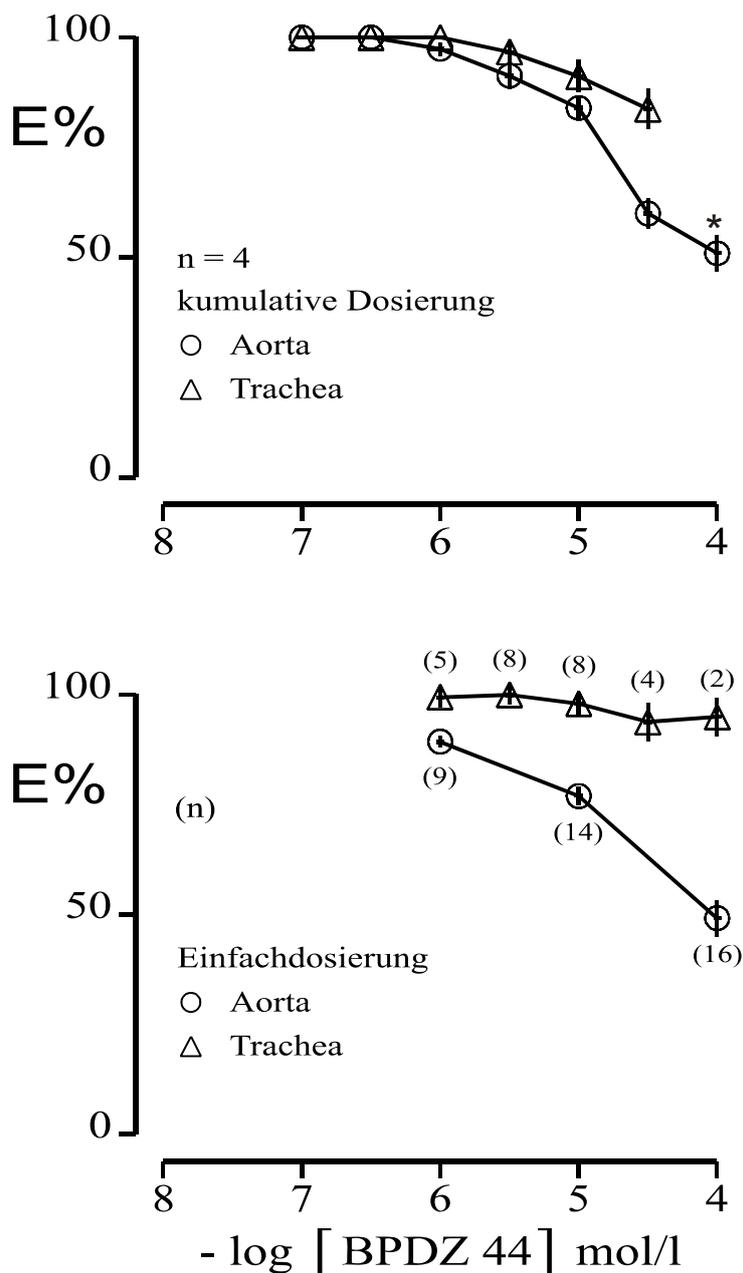


Abb. 4.40: Vergleich der Relaxationswirkung von BPDZ44 an isolierten Geweben von Aorta und Trachea der Ratte nach unterschiedlichen Dosierungsmethoden

Oben: Die Dosis-Wirkungskurven wurden an Aorta und Trachea ermittelt. Die Testsubstanz wurde nach dem kumulativen Dosierungsverfahren hinzugegeben. Der Messpunkt bei 10^{-4} M wurde aus den Relaxationsexperimenten der Abb. 4.35 berechnet. An der Aorta wird die halbmaximale Relaxation bei etwa 10^{-4} M erreicht, während die Substanz an der Trachea kaum Wirkung zeigt.

Unten: Die Dosis-Wirkungskurven wurden an Aorta und Trachea ermittelt. Die Testsubstanz wurde nach dem Einzeldosierungsverfahren hinzugegeben. Der Messpunkt bei 10^{-4} M wurde aus den Relaxationsexperimenten der Schildplotanalyse berechnet. An der Aorta wird die halbmaximale Relaxation bei etwa 10^{-4} M erreicht, während die Substanz an der Trachea kaum Wirkung zeigt.

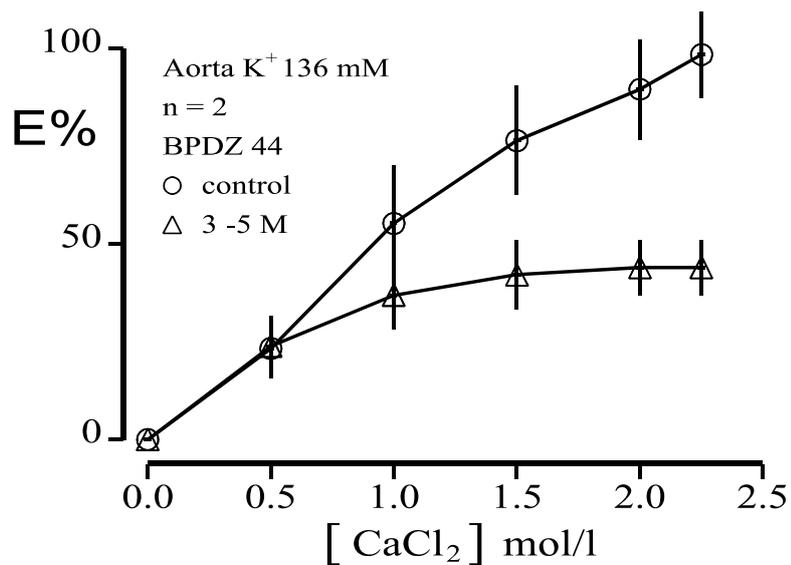


Abb. 4.41: Hemmung der Calcium-Dosis-Wirkungskurve für BPDZ44

Bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M hemmt BPDZ44 die Calcium-Dosis-Wirkungskurve um mehr als 50 %.

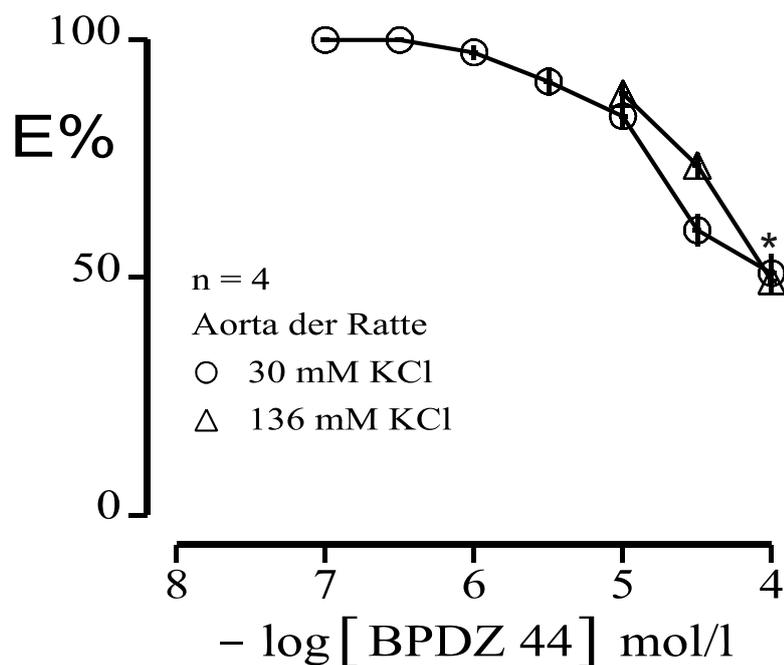


Abb. 4.42: Dosis-Wirkungskurven von BPDZ44 bei „eingeschaltetem“ (30 mM KCl) und „ausgeschaltetem“ (136 mM KCl) K_{ATP} -Kanal

Bei „ausgeschaltetem“ K_{ATP} -Kanal zeigt BPDZ44 gleiche Relaxationseigenschaften wie bei eingeschaltetem K_{ATP} -Kanal.

5 DISKUSSION

In den letzten Jahren fokussierte sich die Forschung auf dem Gebiet der K_{ATP} -Kanalöffner ($K_{ATP}CO$) auf ihre kardioprotektive Wirkung. Schon lange erforscht ist die mannigfaltige Wirksamkeit vieler KCO auf andere Gewebe. Es wurde schon eine Vielzahl von KCO entwickelt, die durch Modulation der K_{ATP} -Kanäle die funktionelle Wirkung auf die glatte Muskulatur diverser Organe entfalten. Der Fokus lag dabei auf Substanzen, die auf das kardiovaskuläre System, die β -Zellen des Pankreas oder die Harnblase Einfluss nehmen. Wenig bekannt ist dagegen die Wirkung auf die Atemwegsmuskulatur. Ein therapeutischer Einsatz solcher organspezifischer Substanzen setzt ein günstiges Verhältnis zwischen erwünschter Haupt- und unerwünschter Nebenwirkung voraus. Im Fall einer angestrebten Kardioprotektion wäre eine solche unerwünschte Nebenwirkung die Absenkung des Blutdrucks, die durch die Vasorelaxation ausgelöst wird. Deshalb ist die Aufdeckung und Weiterentwicklung von KCO mit hoher Organspezifität ein vorrangiges Ziel der aktuellen KCO-Forschung.

Es war schon lange bekannt, dass KCOs neben der hypotensiven Wirkung auch eine antiischämische (kardioprotektive) Wirkung besitzen. Diese kardioprotektive Wirkung trat unabhängig von der Stärke der vasodilatierenden Eigenschaft auf (Grover et al., 1989). Deshalb war der Einsatz dieser Kaliumkanalöffner zur Kardioprotektion wegen der stark vasodilatierenden Eigenschaft stark eingeschränkt. Die Forschung konzentrierte sich deshalb auf solche KCO, die antiischämische und kardioprotektive Eigenschaften besitzen, ohne gleichzeitig vasodilatierend und somit blutdrucksenkend zu wirken. Aus einer KCO-Serie vom Cyanoguanidintyp von Atwal et al. (1993) stach (3S,4R)-BMS-180448 hervor. In einem komplexen wirkortfernen Test wurde die Verlängerung der „time of contracture“ des isolierten ischämischen Herzens der Ratte gemessen, als ein Maß für die kardioprotektive Eigenschaft. Im Vergleich dazu wurde im Relaxationsmodell an der Rattenaorta die EC_{50} zur Bestimmung der blutdrucksenkenden Wirkung bestimmt. Der Vergleich beider Messungen ergab eine geringe Selektivität zugunsten der kardioprotektiven Wirkung für (3S,4R)-BMS-180448.

Jahre später synthetisierte und untersuchte die Gruppe von Atwal (Rovnyak et al., 1997) die Substanz (3R,4S)-BMS-191095, deren Konfiguration in den Positionen 3 und 4 des Chromanol-Grundgerüsts umgekehrt zu (3S,4R)-BMS-180448 ist. Diese Substanz zeichnete sich angeblich durch eine noch verbesserte Selektivität aus. Sie zeigte laut Angabe der Erstautoren (Rovnyak et al., 1997) eine gute kardioprotektive Wirkung bei kaum ausgeprägter vasorelaxierender Wirkung. Seitdem gilt (3R,4S)-BMS-191095 als Standardsubstanz für einen selektiven, kardioprotektiven KCO vom Benzopyrantyp. Das (3S,4R)-Enantiomer von BMS-191095 ist ebenfalls synthetisiert

worden, jedoch zeigte dieses nur schwache kardioprotektive Wirkung und ist seinerzeit von der Gruppe Atwals (Rovnyak et al., 1997) nicht näher charakterisiert worden. Es war deshalb von großem Interesse, beide Substanzen zu untersuchen, allerdings gab die Firma Bristol-Myers Squibb die Substanz nicht heraus. Wir waren deshalb gezwungen, die in Frage kommenden Substanzen im Labor selbst zu synthetisieren. BMS-191095 diente in dieser Arbeit als Leitsubstanz für die Synthese strukturähnlicher Verbindungen. Die Idee bestand darin, die Cyanogruppe in Position 6 und die Methylgruppe in Position 2 des Benzopyrangrundgerüsts gegen andere Substituenten auszutauschen, um die Affinität am K_{ATP} -Kanal zu verändern.

Zwar gelten BMS-180448 und BMS-191095 bisher als selektiv kardioprotektive KCO, unerforscht blieben jedoch die Eigenschaften dieser Verbindungen bezüglich ihrer Bindungsaffinität zu den K_{ATP} -Kanälen der Herzzellen und glatten Muskelzellen. Zur Aufdeckung dieser Eigenschaften wurden in Kompetitionsstudien mit [3H]-P1075 die kardioprotektiven KCO der neuen Generation und ihre Analoga hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten am SUR2A und SUR2B des K_{ATP} -Kanals an Herzzellen (Heart cells) und Aortenzellen (RASCM) der Ratte untersucht.

Ebenfalls ungeklärt blieb die Wirkspezifität der kardioprotektiven KCO: Greifen diese KCO ausschließlich am K_{ATP} -Kanal an, oder üben sie relaxierende Effekte über andere Mechanismen aus. Die Gruppe von Pirotte (Ouedraogo et al., 2002) und Park et al. (2003) geben Hinweise darauf, dass einige K_{ATP} -Kanal-Agonisten ebenfalls den Calciumkanal beeinflussen. Park et al. untersuchten genauer die vasorelaxierende Wirkung von (3S,4R)-BMS-180448. Sie fanden heraus, dass die Substanz über die Blockade des Calciumeinstroms in die Zelle, eine Vasorelaxation verursachte. Es stellte sich nun die Frage, ob alle KCO diese Zusatzwirkung haben oder nur die so genannten kardioprotektiven KCO. Ein Modellsystem, das über eine hohe Kaliumkonzentration (136 mM) den K_{ATP} -Kanal ausschaltet, sollte Klarheit schaffen.

Wie später noch genauer diskutiert wird, konnte mit den kardioprotektiven KCO keine Selektivität zwischen dem SUR2A der Herzzellen und dem SUR2B der Aortenzellen gefunden werden. Stattdessen wurde mit dieser Substanzklasse ein Verlust der Relaxationswirksamkeit an der Trachea gefunden. Durch die Modifizierung der Position 2 und 6 von (3R,4S)-BMS-191095 konnten Substanzen erhalten werden, die eine höhere Affinität zum K_{ATP} -Kanal zeigten als die Muttersubstanz. Zudem konnte eine Zusatzwirkung am Calciumkanal für die kardioprotektiven KCO nachgewiesen werden.

5.1 Untersuchung der Bindungsaffinität und Wirkung der am K_{ATP} -Kanalöffner

Die erhöhte Kardioselektivität des 4-Chloranilino-Derivats(3R,4S)-BMS-191095 resultierte laut Angabe der Erstautor (Rovnyak et al., 1997) weniger aus einer verstärkten Zunahme auf die Wirkung des „time of contracture“-Modell, sondern aus der Abnahme der vasorelaxierenden Eigenschaft an der Rattenaorta.

In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Bindungsaffinität und Wirkung der 4-Chloranilinoderivate (3R,4S)-BMS-191095 und seiner Analoga auf den K_{ATP} -Kanal untersucht werden, sowie eventuelle Selektivitäten zwischen sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen der Herzzelle und der Aortenzelle (RASCAM) aufgedeckt werden.

5.1.1 Bindungsaffinität zu den K_{ATP} -Kanälen an Aorten- und Herzzellen der Ratte

Für alle 4-Chloranilinoderivate und das Cyanoguanidin-Derivat (3S,4R)-BMS-180448 wurden Kompetitionsstudien mit [3 H]-P1075 an Aorten- und Herzzellen der Ratte durchgeführt. Interessanterweise zeigte keine der so genannten kardioprotektiven Verbindungen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen der Herz- und Aortenzellen. Die ermittelten Dissoziationskonstanten (pK_D) der 4-Chloranilinoderivate lagen zwischen 5 und 6. Das Nitroderivat (3R,4S)-JS09 war dabei 3-fach affiner am K_{ATP} -Kanal ($pK_D = 6.06$) als die Muttersubstanz (3R,4S)-BMS-191095 ($pK_D = 5.79$, s. Tab. 4.1, S. 81). Damit ist sie die affinste Substanz aus dieser Reihe und wurde als Leitsubstanz der 4-Chloranilinoderivate für spezielle Experimente (u.a. Schildplotanalyse) eingesetzt.

Eine weitere Optimierung der Affinität sollte durch Einführung eines Propylrestes an C-2 des Benzopyranringes erreicht werden. Auf ähnliche Weise konnte die Wirksamkeit von Thioamiden der Benzopyran-Reihe (Koga et al., 1993) am K_{ATP} -Kanal deutlich gesteigert werden. Aus diesem Grund wurde durch die Substitution eines Methylrestes gegen einen Propylrest an C-2 von (3R,4S)-JS09 die Substanz (3R,4S)-JS16 erhalten, für die jedoch lediglich ein pK_D -Wert von 5.67 (Tab. 4.1) ermittelt werden konnte. Demnach führte die Strukturveränderung nicht zu einer Verstärkung der Wirksamkeit.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass der Ersatz des kleinen, elektronegativen 6-Cyansubstituenten im Bimakalim durch einen N-Phenyl-Sulfonamid-Rest zu einer hohen Wirkstärke am K_{ATP} -Kanal beiträgt (Salamon et al., 2002). Aus dieser neuen Erkenntnis heraus wurde die Substanz (3R,4S)-JS33 synthetisiert. Diese Veränderung brachte jedoch keine Affinitätserhöhung über $pK_D >$

6.0 hinaus. (3R,4S)-JS33 hat mit $pK_D = 5.97$ in etwa die gleiche Dissoziationskonstante wie (3R,4S)-JS09 (Tab. 4.1).

Insgesamt haben alle (3R,4S)-4-Chloranilinoderivate eine höhere Bindungsaffinität zum K_{ATP} -Kanal als die (3S,4R)-Enantiomere. Deutlich erkennt man dies an den enantiomerischen Quotienten (EQ). Für die Enantiomere von JS09 wurde ein EQ von 1.18 an RASCM (Tab. 4.4) ermittelt. Die Selektivität zugunsten des SUR2B des K_{ATP} -Kanals ist für das (3R,4S)-Enantiomer demnach etwa 15-fach höher, d.h. die Affinität zum K_{ATP} -Kanal des (3R,4S)-Enantiomers war etwa 15-fach höher als die des (3S,4R)-Enantiomers. An Herzzellen wurde ein EQ von etwa 0.79 (etwa 6-fach höhere Affinität; Tab. 4.4, S. 87) ermittelt.

Die Enantiomere von BMS-191095 zeigen eine geringere Selektivität am K_{ATP} -Kanal. An RASCM erreichen sie einen EQ von 0.70 (etwa 5-fach höhere Affinität) und an den Herzzellen einen EQ von etwa 0.50 (3-fach höhere Affinität; Tab. 4.4)

Es gilt in dieser Arbeit noch zu diskutieren, ob mit dem wirksameren (3R,4S)-Enantiomer von JS09 evtl. Rezeptorunterschiede aufgedeckt werden können.

Interessant ist, dass die Verbindungen (3S,4R)-BMS-180448 und (3R,4S)-JS09 an der Asymmetriezentren in Position 3 und 4 des Benzopyrangrundgerüsts eine umgekehrte Konfiguration. Trotzdem ist es möglich mithilfe eines Molekülmodells die Reste in Position 4 annähernd zur Deckung zu bringen. So haben die Moleküle ähnlich raumerfüllende Reste. So ist die nahezu gleiche pharmakologische Wirksamkeit beider Substanzen zu erklären ist.

5.1.2 Wirksamkeit der so genannten kardioprotektiven 4-Chloranilinobenzopyrane an der Aorta der Ratte

Mit den Kompetitionsbindungsstudien konnte für die 4-Chloranilinobenzopyrane eine Affinität zum K_{ATP} -Kanal nachgewiesen werden. Prinzipiell kann jedoch bei diesem Versuchsmodell nicht zwischen Agonisten und Antagonisten differenziert werden. Aufschluss gab das funktionelle Experiment, bei dem die präparierte Rattenaorta durch Zugabe der Testsubstanzen relaxiert werden sollte. Qualitativ korrelieren die Ergebnisse aus den funktionellen Experimenten mit den Kompetitionsstudien. Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt (Salamon et al., 2002) liegen auch hier die pEC_{50} -Werte etwa eine halbe log-Einheit über den pK_D -Werten (Tab. 4.5, S. 101).

Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass wir für (3R,4S)-BMS-191095 eine EC_{50} von etwa $1.7 \mu M$ (Tab. 4.5) für die Relaxation der Rattenaorta gemessen haben, während Rovnyak et al. (1997) einen EC_{50} -Wert von $> 30 \mu M$ angeben. Diese Autoren begründeten die erhöhte Kardioselektivität mit dem Fehlen der Vasorelaxation ($EC_{50} >$

30 μM). Mit den Daten aus unserem Labor wäre die Selektivität von (3R,4S)-BMS-191095 zugunsten einer Kardioprotektion allerdings nicht mehr gegeben. Gestützt wird dieses Ergebnis durch die Daten aus der Radioligandbindung an Aortenzellen der Ratte ($\text{pK}_D=5.79$; Tab. 4.1). So kann ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden. Diese Unterschiede sind auch nicht damit zu erklären, dass Rovnyak (1997) zur Vorstimulierung der Aortengewebe anstatt Kaliumchlorid den α -Rezeptoragonist Methoxamin (0.3 μM) eingesetzt hat. Mit dieser Methode ergibt sich nämlich für (3S,4R)-BMS-180448 eine pEC_{50} von 5.74 (Atwal et al., 1993), die sehr gut mit dem von uns an dieser Substanz mit Kaliumchlorid ermittelten pEC_{50} -Wert von 5.53 übereinstimmt (Tab. 4.5, S. 101).

Tab. 5.1: Verhältnis der EC_{50} für die Vasorelaxation zur EC_{25} für den „time of contracture“-Wert in μM

Substanz	EC_{50} μM^1	EC_{25} μM^2	$\text{EC}_{50}/\text{EC}_{25}$
			Berechnung der Erstautoren ^{a, b}
BMS-180448	1.8 ^a	6.1 ^a	0.29
(3R,4S)-BMS-191095	>30 ^b	1.4 ^b	21.4
Cromakalim	0.032 ^a	8.9 ^a	0.0036
			Berechnung dieser Arbeit
BMS-180448	3.0 ^c	6.1 ^a	= 0.49
(3R,4S)-BMS-191095	1.7 ^c	1.4 ^b	= 1.21
Cromakalim	0.200 ^d	8.9 ^a	= 0.0225

Je größer der Quotient $\text{EC}_{50}/\text{EC}_{25}$, desto stärker ist die kardioselektive Wirkung

1 als EC_{25} wird aus der der Zunahme der Zeit ermittelt, die nötig ist, um das Herz der Ratte bei globaler Ischämie zu kontrahieren

2 die IC_{50} bezeichnet die Dosis, die den halbmaximalen Relaxationseffekt an der Rattenaorta ergibt

a Atwal et al., 1993

b Rovnyak et al., 1997

c vorliegende Arbeit

d Jaspert, 2001 (errechnet aus der pEC_{50} von 7.0 für Lemakalim)

Aussagen zur Kardioprotektion der KCOs können jedoch nur dann gemacht werden, wenn die ermittelten pEC_{50} -Werte zur Vasorelaxation und zum „time of contracture“-Wert verlässlich sind (s. Tab. 5.1). Unstrittig ist die Tatsache, dass Cromakalim als nicht kardioselektiv gilt ($\text{EC}_{50}/\text{EC}_{25} = 0.0036$ bzw. 0.0225). Bei (3S,4R)-BMS-180448 ergibt sich ein Konsens hinsichtlich einer geringen Kardioselektivität ($\text{EC}_{50}/\text{EC}_{25} = 0.29$ vs. 0.49). Bei (3R,4S)-BMS-191095 weichen die eigenen Daten aber erheblich von

den in der Literatur gegebenen Werten ab, sodass die beanspruchte hohe Kardioselektivität (Rovnyak et al., 1997) in Frage gestellt werden muss.

Die Frage war, ob mit diesem Enantiomerenpaar Rezeptorunterschiede am K_{ATP} -Kanal aufgedeckt werden könnten. In diesem Zusammenhang rücken auch die enantiomerischen Quotienten (EQ) von JS09 aus der Radioligandbindung (EQ = 1.18; Tab. 4.4) und aus dem funktionellen Experimenten (EQ = 0.55; Tab. 5.2) ins Blickfeld. Grund für diese Unterschiede ist die hohe Wirksamkeit von (3S,4R)-JS09 an der Aorta ($pK_D=5.76$, Tab. 4.6) im Vergleich zur Kompetitionsstudie ($pK_D = 4.88$, Tab. 4.1). Dieser kleine EQ deutet auf eine Zusatzwirkung der 4-Chloranilinobenzopyrane hin, die nicht auf Rezeptorunterschiede am K_{ATP} -Kanal, sondern auf andere Effekte zurückzuführen sind.

5.1.3 Wirksamkeit der so genannten kardioprotektiven 4-Chloranilinobenzopyrane an der Trachea der Ratte

Tab. 5.2: Vergleich der pEC_{50} aus den Relaxationsversuchen von Aorta und Trachea. Zur Bestimmung der pEC_{50} wurde die Trachea mit 0.2 μ M Carbachol vorstimuliert, die Aorta mit 25 mM KCl

Substanz	Trachea ¹ $pEC_{50} \pm SEM$ (-log mol/l)	Aorta ¹ $pEC_{50} \pm SEM$ (-log mol/l)	ΔpEC_{50} (Trachea – Aorta) (-log mol/l)
(3R,4S)-JS09	4.86 \pm 0.03	6.31 \pm 0.03	- 1.45 \pm 0.04
(3S,4R)-JS09	4.02 \pm 0.01	5.76 \pm 0.03	- 1.74 \pm 0.03
<i>enantiomerischer Quotient</i>	<i>0.84 \pm 0.03</i>	<i>0.55 \pm 0.04</i>	
(3R,4S)-BMS-191095	4.43 \pm 0.09	5.77 \pm 0.08	- 1.34 \pm 0.12
(3S,4R)-BMS-191095	4.67 \pm 0.04	5.06 \pm 0.05	- 0.39 \pm 0.06
<i>enantiomerischer Quotient</i>	<i>-0.24 \pm 0.10</i>	<i>0.71 \pm 0.09</i>	
(3S,4R)-BMS-180448	4.14 \pm 0.04	5.53 \pm 0.06	- 1.39 \pm 0.07
(3R,4S)-JS33	4.50 \pm 0.02	6.33 \pm 0.03	- 1.83 \pm 0.04
Bimakalim ^a	6.80 \pm 0.07	7.79 \pm 0.07	- 0.99 \pm 0.10
ES-150 ^a	8.01 \pm 0.02	8.76 \pm 0.06	- 0.75 \pm 0.06

1 Daten aus Tab. 4.5
a Salamon et al., 2002

Aus den funktionellen Experimenten an der Rattenaorta und den Kompetitionsbindungsstudien mit [³H]-P1075 an Rattenaortenzellen kann gefolgert werden, dass die Relaxationswirkung an der Rattenaorta tatsächlich über den K_{ATP} -Kanal vermittelt wird. Für eine Vielzahl früher charakterisierter Kaliumkanalöffner wird im Allgemeinen ein Unterschied der pEC_{50} -Werte zwischen Trachea und Aorta von etwa 0.7 bis 1.0 log-Einheiten zugunsten der Aorta gefunden (Salamon et al., 2002), was in dieser Testreihe ebenfalls zu erwarten war. Zur großen Überraschung zeigte (3R,4S)-BMS-191095 und seine Derivate einen deutlichen Verlust der Relaxationswirksamkeit (EC_{50}) an der glatten Muskulatur der Trachea. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass das für den Vorstimulus an der Trachea verwendete Carbachol für die Unterdrückung des relaxierenden Effektes, der über den K_{ATP} -Kanal vermittelt wird, verantwortlich ist. Es wurde eine Carbacholkonzentration gewählt, die geringfügig unter der EC_{50} -Konzentration liegt (s. Kap. 4.1.2) und die eine hocheffektive Wirkung des KCO am K_{ATP} -Kanal der glatten Muskelzelle der Trachea ermöglicht (Lemoine et al., 1999).

Die Differenz der ΔpEC_{50} (-log mol/l) zwischen der Trachea und der Aorta war umso größer, je stärker wirksam die Substanz an der Aorta war, ohne dass gleichzeitig die Trachea-Wirkung zunahm. Dies konnte vor allem an den Verbindungen (3R,4S)-JS33 ($\Delta pEC_{50} = -1.83$), (3R,4S)-JS09 ($\Delta pEC_{50} = -1.45$) und (3R,4S)-BMS-191095 ($\Delta pEC_{50} = -1.34$) beobachtet werden (Tab. 5.2).

Danach konnte man erwarten, dass die an der Aorta weniger wirksamen (niederaffinen) (3S,4R)-Verbindungen eine deutlich geringere ΔpEC_{50} aufweisen würden. Tatsächlich zeigte (3S,4R)-BMS-191095 eine Differenz der pEC_{50} von nur noch $\Delta pEC_{50} = -0.39$.

Erstaunlich war allerdings, dass der ΔpEC_{50} -Wert zwischen Trachea und Aorta von (3S,4R)-JS09 mit $\Delta pEC_{50} = 1.74$ deutlich größer war als bei (3S,4R)-BMS-191095 und sogar höher als beim Enantiomer (3R,4S)-JS09 ($\Delta pEC_{50} = 1.45$, s. Tab. 5.2). Dieses Phänomen der kaum vorhandenen Trachealwirkung konnte bislang an keiner der vielen Testsubstanzen der Benzopyranreihe gezeigt werden (Mannhold et al., 1999; Lemoine et al., 1999; Salamon et al., 2002; Uhrig et al., 2002). Hinzu kommt, dass der pEC_{50} -Wert von 5.76 für die Aorten-Relaxation von (3S,4R)-BMS-191095 deutlich höher lag als der pK_D für die Bindung an kultivierten Aortenzellen (RASCM) der Ratte ($pK_D = 4.88$, Tab. 4.1, S. 81).

Daraus lässt sich insgesamt ableiten, dass die im Experiment gezeigte starke Relaxation der Rattenaorta überschätzt werden könnte, weil evtl. ein weiterer Effekt, der nicht über den K_{ATP} -Kanal vermittelt wird, zur Relaxation beiträgt.

Dies könnte erklären, weshalb (3S,4R)-JS09 gegenüber (3S,4R)-BMS-191095 den größeren ΔpEC_{50} aufweist. Legt man allerdings die Bindungsdaten zugrunde, die nur den K_{ATP} -Effekt beinhalten, so würde man einen pEC_{50} -Wert von ca. 5.10 statt 5.76 erwarten. Damit reduziert sich die Differenz zur Trachea-Wirkung, die ihrerseits wegen des geringen $pEC_{50} = 4.02$ nur unsicher ist, da dieser durch Extrapolation ermittelt werden musste.

Betrachtet man die Wirkung an Aorta und Trachea, so kann zusammengefasst werden:

Für die (3R,4S)-Enantiomere zeigt sich am Beispiel von (3R,4S)-JS09 folgendes Wirkprofil:

- die Daten aus der Radioligandbindung mit [³H]-P1075 (RASCM) korrelieren mit denen aus der Relaxationsstudie an der Aorta ($pK_D = 6.06 \approx pEC_{50} = 6.31$)
- die physiologische Wirkung an der Aorta kann dem K_{ATP} -Kanal-Effekt zugeschrieben werden
- starker „Wirksamkeitsverlust“ an der Trachea im Vergleich zur Aorta ($\Delta pEC_{50} = 1.45$).

Es bleibt folgendes Wirkprofil für die Substanz (3S,4R)-JS09 festzuhalten:

- geringe Bindungsaffinität am K_{ATP} -Kanal kultivierten RASCM (Aortenzellen) ($pK_D = 4.88$)
- starke Wirkung an der isolierten Rattenaorta ($pEC_{50} = 5.76$) infolge der gleichzeitigen L-Typ Calciumkanal-Blockade
- starker „Wirksamkeitsverlust“ an der Trachea im Vergleich zur Aorta ($pEC_{50} = 4.02$).

5.1.4 Bindungs- und Wirkungseigenschaften von (3S,4R)-BMS-180448

Interessanterweise konnte der weitgehende Verlust an Trachealwirksamkeit nicht nur an den so genannten kardioprotektiven KCO aus der BMS-191095-Reihe beobachtet werden, sondern auch an (3S,4R)-BMS-180448 (Atwal et al., 1993), einen kardioselektiven KCO der ersten Generation. Dieser ist durch eine Benzopyran-Cyanoguanidin-Struktur gekennzeichnet und weist eine (3S,4R)-Konfiguration auf. Seine Kardioselektivität ist im Vergleich zu Cromakalim deutlich erhöht (Tab. 5.1, S. 150). Der Verlust an Wirksamkeit an der Rattentrachea lag bei 1.39 ± 0.07 (ΔpEC_{50}) und war mit den ΔpEC_{50} -Werten der BMS-191095-Reihe vergleichbar (s. Tab. 5.2, S. 152)

Die halbmaximale Relaxation (pEC_{50}) der Aortenringe, die mit 25 mM K^+ vorstimuliert wurden, lag für (3S,4R)-BMS-180448 in den Versuchen bei $pEC_{50} = 5.53$. Dies stimmt gut mit dem $pEC_{50} 5.74$ überein, der von Atwal et al. (1993) angegeben wurde. Die

Autoren benutzten zur Vorstimulierung des Gewebes nicht KCl wie in dieser Arbeit, sondern den α -Rezeptoragonist Methoxamin (0.3 μ M), was die Ergebnisse offensichtlich nicht grundsätzlich beeinflusst.

Hinsichtlich der Kompetitionsbindung mit [3 H]-P1075 konnten wir bei (3S,4R)-BMS-180448 ähnlich wie bei (3R,4S)-BMS-191095 keine Selektivität zwischen Aorten und Herzzellen feststellen. Überraschend war, dass die Bindungsaffinität mit $pK_D = 6.29$ (s. Tab. 4.1, S. 81), viel höher lag als die $pEC_{50} = 5.53$, (s. Tab. 4.5; S. 101). Dieser Befund ist auffällig, weil die Werte der Bindungsaffinität (pK_D), die für eine Vielzahl von Benzopyranen bestimmt wurden, stets um 0.3 – 0.5 (-log mol/l) kleiner waren, als die halbmaximale Relaxation (pEC_{50}) an der Rattenaorta im physiologischen Experiment (Mannhold et al., 1999; Lemoine et al., 1999; Salamon et al., 2002, Uhrig et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen machten Atwal et al., (1998) mit anderen Cyanoguanidinderivaten. Aus molekularbiologischer Sicht ist es nicht möglich, dass die Dosis-Wirkungs-Kurve zu 10-fach höheren Konzentrationen im Vergleich mit der Rezeptorbesetzung verschoben wird. Es stellt sich die Frage, ob (3S,4R)-BMS-180448 besondere Bindungseigenschaften besitzt, oder ob dieses Phänomen mit dem Versuchsdesign zusammenhängt. Chemisch gesehen stellt (3S,4R)-BMS-180448 ein cyanoguanidinsubstituiertes Benzopyran dar und besitzt somit Strukturähnlichkeit mit dem eingesetzten Radioliganden [3 H]-P1075, der ebenfalls eine Cyanoguanidinpartialstruktur aufweist. Sollte diese Partialstruktur Ursache für die 10-fach stärkere Bindungsaffinität sein, so muss davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Bindungsstellen für Liganden mit Benzopyranstruktur und Cyanoguanidinstruktur am K_{ATP} -Kanal existieren. Diese Frage wurde auch von U. Quast aufgegriffen, der nicht nur den Radioligand [3 H]-P1075 am K_{ATP} -Kanal entwickelt hat, sondern kürzlich auch über einen neuen Radioliganden vom Benzopyrantyp ([3 H]-PKF217-744; Manley et al., 2001) berichtet hat. Dieser neue Radioligand hat die Eigenschaft, an den SUR2B zu binden. Trotzdem lieferten Bindungsversuche mit [3 H]-P1075 und [3 H]-PKF217-744 gleiche Ergebnisse in Verdrängungsstudien mit KCO unterschiedlicher Strukturklassen. Deshalb kann zurzeit nicht geklärt werden, warum die Bindungsaffinität (pK_D) von BMS-180448 höher liegt als der pEC_{50} -Wert aus dem physiologischen Relaxationsexperiment.

Der Wirksamkeitsverlust von (3S,4R)-BMS-180448 an der Trachea wurde während der Standardrelaxationsexperimente entdeckt.

5.1.5 Molekularbiologische Gründe für die Aortenselektivität

Bei der Diskussion über die Gründe zum Wirksamkeitsverlust an der Trachea wurde zunächst davon ausgegangen, dass es sich um eine unterschiedliche

Ausdifferenzierung der K_{ATP} -Kanäle in den beiden Organen (Trachea und Aorta) handeln könnte, die auf verschiedene SUR-Untereinheiten (SUR2A vs. SUR2B) zurückzuführen ist.

Allerdings bestand der Unterschied zwischen SUR2A und SUR2B nur darin, dass sich die letzten 28 Aminosäuren im C-Terminus des Kanals unterscheiden (Isomoto et al., 1996). Dieser geringe Unterschied kann nicht der Grund für die unterschiedliche Bindungseigenschaft sein, da das SUR2-Segment die transmembranäre Domäne II (TMDII) mit den Helices 12-17 besitzt, die für die Bindung der KCO vom Benzopyrantyp **und** Pinacidil-Typ entscheidend ist (Babenko et al., 1996). Ähnliche Entdeckungen sind von Uhde et al. (1999) gemacht worden. Dieser verwendete Chimären von SUR1 – SUR2B, in denen die Helices 16 und 17 und die intrazelluläre Schleife zwischen den Helices 13 und 14 genauer spezifiziert waren, welche essentiell für die Bindung von Pinacidil sein soll. Diese Bindungsstelle konnte von Moreau et al. (2000) durch Punktmutation der Chimäre von SUR1 – SUR2A auf zwei Aminosäuren eingegrenzt werden: L1249/T1253 im SUR2A. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass sich die Bindungsaffinitäten für (3R,4S)-BMS-191095 und seine Derivate, die in der glatten Muskelzelle der Aorta und an Herzzellen der Ratten bestimmt wurden, sich nicht sehr stark voneinander unterscheiden ($\Delta pK_D = 0.1 - 0.2$). Wie auch immer, die Bindung an SUR-Isoformen SUR2B (human) und SUR2A (Ratte), die auf COS-7-Zellen übertragen wurden, zeigten eine 5-fach höhere Bindungsaffinität (0.7 log-Einheiten) zugunsten des 2B-Subtypes (Schwanstecher et al., 1998). Die deutlich höhere Bindungsaffinität der KCO an Zellen, die mit SUR2A transfiziert waren (Hambrock et al., 1999) oder mit SUR2B, die sich überwiegend in Zellen der glatten Muskulatur zeigte (Lemoine et al., 1999; Salamon et al., 2002; Uhrig et al., 2002) war deutlich höher, als die geringe Differenz ($\Delta pK_D = 0.1 - 0.2$) der kardioselektiven Verbindungen (BMS-191095 und seine Derivate). Die höhere Differenz der Bindungsaffinität von SUR2B gegenüber SUR2A beruht auf einer Interaktion mit dem Ende des C-Terminals des SUR mit der Helix 17 (Moreau et al., 2000).

All diese Betrachtungen können jedoch nicht erklären, warum die hier untersuchten so genannten kardioselektiven KCO ihre relaxierende Wirkung an der Trachea verloren haben. Wie aus der Analyse der Gewebe (Inagaki et al., 1996) und den pharmakologischen Untersuchungen (Fujita et Kurachi, 2000) hervorgeht, bildet die SUR2B-Untereinheit den K_{ATP} -Kanal an der glatten Muskelzelle. Es gibt aber noch keinen direkten Hinweis, welche SUR-Untereinheit den K_{ATP} -Kanal der Trachea bildet.

Für die vaskulären K_{ATP} -Kanäle konnte gezeigt werden, dass die Coexpression von Kir6.2 mit SUR2B einen K_{ATP} -Kanal bildet, welcher die gleichen pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften aufweist, wie manche K_{ATP} -Kanäle der

glatten Muskelzellen (Isomoto et al., 1996). Allerdings konnte in Kir6.2-„knockout“ Mäusen keine bedeutende Rolle von Kir6.2 gezeigt werden (Suzuki et al., 2002). Es ist somit wahrscheinlich, dass K_{ATP} -Kanäle die aus SUR2B und Kir6.1 gebildet werden, und dem K_{NDP} -Kanal (Nukleosiddiphosphat-sensitive Kaliumkanäle) ähneln, eine große Rolle in den vaskulären glatten Muskelzellen spielen (Fujita et Kurachi, 2000). So muss noch geklärt werden, welche SUR-Untereinheit und welche Kir-Untereinheit die K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur der Trachea bilden, welche weniger empfindlich auf BMS-191095 und seine Derivate reagiert.

5.2 Non- K_{ATP} -Kanal-Wirkung der 4-Chloranilinobenzopyrane (BMS-191095-Analoga)

In den vorangegangenen Kapiteln wurde eingehend die Wirkung der 4-Chloranilinobenzopyrane auf den K_{ATP} -Kanal von Aorta und Trachea der Ratte diskutiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Vasorelaxation, die durch die Testsubstanzen ausgelöst wurde, K_{ATP} -Kanal-vermittelt ist. Aus den Ergebnissen der Radioligandbindungsstudien mit [3H]-P1075 an Aortenzellen der Ratte (s. 4.1.4.1) und den Relaxationsexperimenten (s. 4.3) erwuchs jedoch auch die Vermutung, dass insbesondere für (3S,4R)-JS09 keine reine K_{ATP} -Kanal-Wirkung für die Relaxation verantwortlich sein konnte. Die Bindungsaffinität für die Substanz (3S,4R)-JS09 mit [3H]-P1075 an RASCM lag bei $pK_D = 4.88$ (Tab. 4.1, S. 81), der pEC_{50} -Wert im physiologischen, funktionellen Versuch lag jedoch bei wesentlich höheren 5.76 (Tab. 4.5, S. 101). Ein weiteres Indiz für einen zusätzlichen Wirkmechanismus ist die Tatsache, dass der enantiomerische Quotient (EQ) für (3R,4S)-JS09 in der Radioligandbindung (Tab. 4.4; S. 87) größer ist als im funktionellen Versuch (Tab. 5.2, S. 152).

Es wurde deshalb in dieser Arbeit weiter untersucht, ob diese Verbindungen neben der Hauptwirkung noch einen weiteren Wirkmechanismus besitzen, der von der Öffnung der K_{ATP} -Kanäle abgekoppelt (non- K_{ATP} -Kanal-Effekt) ist und ebenfalls zur Relaxation des Aortengewebes an der Ratte führt.

Um Belege für die Beteiligung eines non- K_{ATP} -Effekts an der Relaxation des Aortengewebes zu finden, wurden exemplarisch Dosis-Wirkungskurven mit dem 4-Chloranilinobenzopyran (3R,4S)-JS09 in Anwesenheit des K_{ATP} -Kanal-Blockers Glibenclamid und auch BPDZ44 erstellt und nach Arunlakshana und Schild (1959) sowie Lemoine et al., (1983) ausgewertet (s. Kap. 4.6). Dass auch BPDZ44 als K_{ATP} -Kanal-Blocker eingesetzt werden konnte, wird im Kapitel 5.4 „Pharmakologische Charakterisierung von BPDZ44 und BPDZ79“ ausführlich diskutiert.

Als Ergebnis wurde dabei festgestellt, dass die Dosiswirkungskurven bei zunehmender Konzentration der K_{ATP} -Blocker Glibenclamid und BPDZ44 zu höheren Agonistenkonzentrationen verschoben werden. Jedoch schwächte sich die Verschiebung immer weiter ab und blieb ab einer Konzentration von 10^{-5} M Glibenclamid konstant. Im nicht-linearen Schildplot war dies durch ein Abknicken der Kurve bei einer Glibenclamidkonzentration von 10^{-5} M deutlich zu erkennen (**Abb. 4.33**). Die Auswertung mit BPDZ44 als Blocker und (3R,4S)-JS09 als Agonist ergab ähnlich Ergebnisse. Dies war der erste Hinweis darauf, dass hier ein non- K_{ATP} -Kanal-Effekt die Relaxation der Aortenringe mit verursacht. Denn bei einem

homogenen Rezeptorsystem mit kompetitivem Hemmmechanismus ist die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven von der Konzentration und Affinität des Blockers abhängig. Somit können die Ergebnisse des Schildplots wie folgt erklärt werden: bei niedriger Agonistenkonzentration ((3S,4R)-JS09) wird der K_{ATP} -Kanal-Effekt durch Glibenclamid antagonisiert, weshalb die Dosis-Wirkungskurven bei einer Glibenclamid Konzentration von 10^{-7} M stark verschoben ist. Bei hoher Agonistenkonzentration könnte die Relaxation der Aortenringe zusätzlich über den non- K_{ATP} -Kanal-Effekt ausgelöst werden, somit kann der K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid, auch in hohen Konzentrationen, keine Wirkung mehr zeigen. Dementsprechend erreicht die Steigung in der Analyse nach Arunlakshana und Schild (1959) nur einen Wert von 0.40 (Tab. 4.9, S. 134). Bei einem homogenen Rezeptorsystem und kompetitivem Hemmmechanismus müsste die Steigung bei 1.0 liegen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass (3R,4S)-JS09 als reiner Kaliumkanalöffner fungiert. Die Analyse der Daten als nichtlineare Schildplots (Lemoine et al., 1983), bestätigt diese Vermutung. Bei geringer Glibenclamidkonzentration kann die KCO-Wirkung von (3R,4S)-JS09 antagonisiert werden. Die Kurve zeigt eine Steigung von annähernd 1 (**Abb. 4.33**). Mit steigender Glibenclamidkonzentration flacht die Steigung ab, bis sie den Wert von annähernd 0 erreicht. Eine Steigung von 0 konnte nicht erreicht werden, da hierfür die Konzentration von (3R,4S)-JS09 bis zu einem toxischen Konzentrationsbereich hätte gesteigert werden müssen.

Nach der Entdeckung dieses non- K_{ATP} -Kanaleffektes wurde untersucht, ob die 4-Chloranilinobenzopyrane quasi „am K_{ATP} -Kanal vorbei“ direkt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration Einfluss nehmen. In einer vorangegangenen Arbeiten war bereits festgestellt worden, dass der kardioprotektive KCO der ersten Generation (3S,4R)-BMS-180448 die Vasorelaxation u.a. auch durch die Blockade des Calciumeinstroms in die Zelle verursacht (Park et al., 2003).

Um eine Blockade des Calciumeinstroms in die Zelle mit den oben genannten Verbindungen nachzuweisen, wurden die calciuminduzierten Kontraktionen in Gegenwart unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen von 30 mM bzw. 136 mM KCl gemessen, um so den K_{ATP} -Kanal entweder ein- oder durch den Ausgleich von intra- und extrazellulärer Kaliumkonzentration auszuschalten.

Arbeitet man im Relaxationsversuch an der Rattenaorta mit einer Kaliumchloridkonzentration von 30 mM und inkubiert vor der Calciumzugabe $3 \mu\text{M}$ (3R,4S)-JS09, so bleibt bei Zugabe steigender Calcium-Konzentrationen (0.125 bis 2.25 mM) eine Kontraktion der Aorta aus (Abb. 4.18; S. 105)

Im Vergleich dazu zeigte die Versuchsdurchführung bei 136 mM KCl im Puffer bei Zugabe von Calcium eine partielle Unterdrückung der Kontraktion bis auf etwa 60 % der Maximalwirkung (Abb. 4.19, S. 106).

Daraus lässt sich eindeutig ableiten, dass zwei Wirkmechanismen die Kontraktion der glatten Aortenmuskulatur der Ratte hemmen: eine K_{ATP} -Kanal-abhängige (30 mM KCl) und eine non- K_{ATP} -Kanal abhängige (136 mM KCl) Wirkkomponente.

Bimakalim als klassischer Vertreter der K_{ATP} -Kanalöffner vom Benzopyrantyp hatte keinen Einfluss auf die Hemmung der calciuminduzierten Kontraktion bei der funktionellen Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals durch eine hohe Kalium-Konzentration (136 mM KCl) (Abb. 4.19). Weitere Ergebnisse sind in (Tab. 4.6, S. 117) aufgeführt. Für alle Verbindungen der so genannten kardioprotektiven Chromanole gilt, dass diese die calciuminduzierte Kontraktion an Aortenringen hemmen (Abb. 4.26; S. 116).

Die Substanz (3S,4R)-JS09, die am K_{ATP} -Kanal eine geringere (niederaffine) Wirkung hatte, zeigte in dieser Versuchsreihe den stärksten blockierenden Effekt ($pEC_{50} = 5.92$, Tab. 4.6; S. 88). So ergibt sich ein „cross over“ mit dem am K_{ATP} -Kanal wirksameren Enantiomer (3R,4S)-JS09, welches in diesem Versuchsmodell lediglich eine $pEC_{50} = 5.25$ zeigte (Tab. 5.3). Demnach ist die calciumblockierende Wirkung von (3S,4R)-JS09 nicht signifikant verschieden von der Gesamtwirkung (Relaxation mit 25 mM KCl). Im Vergleich hatte (3R,4S)-JS09 einen stärkeren K_{ATP} -Effekt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Stereochemie einen großen Einfluss auf die Aktivität hinsichtlich der calciumblockierenden und der KCO-Wirkung hat. Die (3S,4R)-Konfiguration zeigt eine höhere Aktivität am Calciumkanal, die (3R,4S)-Konfiguration eine höhere Aktivität am K_{ATP} -Kanal.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die relaxierende Wirkung, die von den so genannten kardioprotektiven KCO ausgeht, nicht oder nicht ausschließlich über eine K_{ATP} -Kanalöffnung bewirkt wird. Hierbei scheinen auch andere Wirkmechanismen eine Rolle zu spielen.

Um zu belegen, dass die non- K_{ATP} -Kanal-bedingte Relaxation über Calciumkanäle moduliert wird, wurden Bindungsexperimente an Katzenherzmembranen und Kälbertrachealzellen mit dem Radioliganden [3H]-(+)-PN 200,110, einem Isradipinderivat mit hoher Bindungsaffinität zum L-Typ Calciumkanal, durchgeführt. Dabei konnte tatsächlich belegt werden, dass die so genannten kardioprotektiven Chromanole an den L-Typ Calciumkanal binden.

Die Standardsubstanz der KCO vom Benzopyrantyp Bimakalim konnte dabei, wie zu erwarten war, [3H]-(+)-PN 200,110 nicht aus der Bindung verdrängen. (Abb. 4.27). Die so genannten kardioprotektiven KCO jedoch verdrängten in mikromolarer

Konzentration [^3H]-(+)-PN 200,110. Die pK_D -Werte korrelierten in etwa dabei mit den pEC_{50} -Werten aus den calciuminduzierten Kontraktionen (Tab. 5.3). Alle Ergebnisse finden sich in Tab. 4.7(S. 119f). Dabei hatten die (3S,4R)-Enantiomere von JS09 und JS09-Ac einen höheren pK_D -Wert als die (3R,4S)-Enantiomere (Tab. 4.7) Die Sulfonamidverbindung (3R,4S)-JS33 zeigt in der Radioligandbindung mit [^3H]-(+)-PN 200,110 eine höhere Affinität zum L-Typ Calciumkanal ($\text{pK}_D = 5.53$, Abb. 4.30), als (3R,4S)-JS09 ($\text{pK}_D = 5.07$), was dafür spricht, dass die Sulfonamidstruktur in Position 6 eine erhöhte Bindung an den L-Typ Calciumkanal verursacht.

Tab. 5.3: Vergleich der Ergebnisse aus der Hemmung der calciuminduzierten Kontraktion und der Bindung mit [^3H]-(+)-PN 200,110 an KLV

Substanz	pEC_{50}^a	pK_D^b
(3R,4S)-JS09	5.25 ± 0.13	5.07 ± 0.04
(3S,4R)-JS09	5.92 ± 0.07	5.66 ± 0.03
(3R,4S)-BMS-191095	4.59 ± 0.07	5.10 ± 0.03
(3R,4S)-JS33	5.10 ± 0.11	5.53 ± 0.04
BMS-180448	4.73 ± 0.05	4.62 ± 0.05

a Daten aus Tab. 4.6 (Hemmung der calciuminduzierten Kontraktion)

b Daten aus Tab. 4.7 (Radioligandbindung)

Die Enantiomere von JS09 zeigten qualitativ in der Radioligandbindung die gleichen Ergebnisse wie in der Hemmung der calciuminduzierten Kontraktion. Für (3S,4R)-JS09 konnte tatsächlich eine stärkere Bindung am L-Typ Calciumkanal nachgewiesen werden als am K_{ATP} -Kanal. Dagegen hatte (3R,4S)-JS09 eine geringere Affinität zum Calciumkanal (Abb. 4.28). Damit konnte auch in der Radioligandbindung gezeigt werden, dass das (3S,4R)-Enantiomer eine höhere Affinität zum Calciumkanal aufweist als zum K_{ATP} -Kanal. Man kann sogar davon ausgehen, dass die Hauptwirkung eine nicht- K_{ATP} -Kanal-vermittelte Ursache (Calciumblockade) hat, sodass sich beide Teilwirkungen synergistisch auf die Relaxation auswirken.

Die durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass die Relaxation des glatten Muskelgewebes der Rattenaorta nicht nur auf eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle zurückzuführen ist, sondern auch auf eine Blockade des Calciumeinstroms über Calciumkanäle vom L-Typ .

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die so genannten kardioprotektiven KCO noch eine deutlich ausgeprägte relaxierende Wirkung am glatten Muskel der Rattenaorta zeigen. Diese Wirkung ist nicht nur auf die Öffnung des K_{ATP} -Kanals zurückzuführen, sondern auch auf die Blockade des Calciumeinstroms in die glatte

Muskelzelle. Dabei verhält sich (3R,4S)-JS09 bei mikromolarer Konzentration wie ein Kaliumkanalöffner. Erst bei einer 10-fach höheren Konzentration wird die calciumkanalhemmende Wirkung ausgelöst. Umgekehrt verhält es sich bei (3S,4R)-JS09. Bei dieser Substanz wird die calciumkanalhemmende Wirkung schon bei geringerer Konzentration erreicht als die K_{ATP} -Kanal-vermittelte Wirkung. Die Substanz kann so nicht als KCO eingestuft werden, da die Hauptwirkung über die Hemmung der Calciumkanäle erzielt wird. Die Enantiomere von BMS-191095 zeigten, dass die Gesamtwirkung mit den Bindungsdaten aus der Calciumkanalbindung K_{ATP} -Kanalbindung korrelierte.

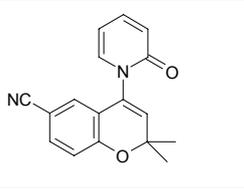
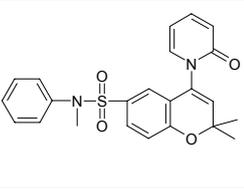
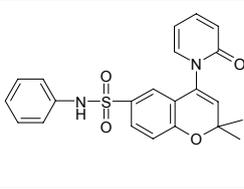
Aus diesen Zusammenhängen kann man folgern, dass sich (3R,4S)-JS09 bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich wie ein KCO verhält, bei 10-fach höheren Konzentrationen spielt die calciumkanalhemmende Wirkung ebenfalls eine Rolle bei der Relaxation des Gewebes.

Dagegen müsste (3R,4S)-BMS-191095 in ein anderes Licht gerückt werden. Diese Verbindung gilt als Prototyp eines kardioselektiven KCO (hohe kardioprotektive Wirksamkeit neben kaum vorhandener vasorelaxierender Wirkung). Jedoch konnte mit den vorstehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass die Substanz in der Tat eine stark vasorelaxierende Eigenschaft besitzt. Dies hat zur Folge, dass die hohe selektive Wirkung zugunsten der Kardioprotektion verloren geht. Zum anderen wurden weitere Wirkmechanismen, die von dieser Substanz ausgehen, seither gänzlich außer Acht gelassen. So muss die Frage gestellt werden, ob nicht nur die KCO-Wirkung, sondern auch die Blockade des Calciumeinstroms in die glatte Muskelzelle ebenfalls einen protektiven Effekt auf das Herz im ischämischen Zustand ausüben kann.

5.3 Acyclische Phenoether als neue Kandidaten für K_{ATP} -Kanalöffner: Pyridone, Amide und Thioamide

In früheren Arbeiten (s. u.) konnte gezeigt werden, dass der Ersatz der kleinen, elektronegativen Nitrilgruppe im Bimakalim durch voluminöse Phenylsulfonamid-Substituenten zu einer ähnlich guten, wenn nicht sogar besseren Wirkung der Substanz ES-44 und ES-150 am K_{ATP} -Kanal führt. Man versuchte dies dadurch zu erklären, dass neben der Bindungsstelle für kleine elektronegative Substituenten in der 6-Position, eine neue „interaction-site“ existiert, die über π -Wechselwirkung zu einer deutlichen Verstärkung der KCO-Bindung beiträgt (Salamon et al., 2002).

Tab. 5.4: Vergleich der Daten aus der Kompetitionsbindung und den funktionellen Experimenten von Bimakalim und seinen N-Phenylsulfonamid-Abkömmlingen

			
	Bimakalim	ES-150	ES-44
pK _D (RASCM)	7.98 ± 0.04	7.87 ± 0.12	8.05 ± 0.04
pEC ₅₀ Rattenaorta	7.79 ± 0.07	8.76 ± 0.06	8.51 ± 0.04

Daten aus Dissertation Salamon, 2001

Basierend auf diesem Postulat einer neuen „interaction-site“, wurde die Idee entwickelt, durch „Aufschneiden“ des Pyranringes im Chromen eine bewegliche Molekülstruktur (acyclische Phenoether) zu erhalten, die über die Sulfonamidstruktur diese neue „interaction-site“ bedient, während der übrige Molekülteil sich dem Rezeptor besser anpassen kann. Mit derartigen acyclischen Phenoethern könnte evtl. eine höhere biologische Wirksamkeit an der Aorta und Trachea der Ratte erzielt werden.

Zu diesem Zweck wurden Verbindungen synthetisiert, die wichtige chemische Strukturmerkmale der in Tab. 5.4 gezeigten Wirkstoffe (N-Phenylsulfonamid und Pyridonring) aufweisen und eine Variation in der Alkoxystruktur ermöglichen. Zuerst galt es zu untersuchen, ob diese neue Verbindungsklasse der acyclischen Phenoether überhaupt eine Affinität zu den K_{ATP} -Kanälen aufweist. Dazu wurden zunächst mit den Testsubstanzen Kompetitionsbindungen mit [³H]-P1075 an RASCM und Herzzellen durchgeführt. Tatsächlich konnte belegt werden, dass diese an den

K_{ATP} -Kanal binden. Die höchsten Affinitäten zeigten dabei die Verbindungen JS43 (Propyl-Rest) und JS48 (1-Methylbutyl-Rest) mit pK_D -Werten um 6.2 (Tab. 4.2, S. 84). Die Substanzen mit kürzerer Alkylkette als Ethyl hatten einen stärkeren Affinitätsverlust (JS45 und JS-39 $pK_D < 5.0$). Somit zeigte sich, dass für diese neue Substanzklasse ein größerer Alkylrest (\geq Ethyl) am Phenoylether wichtig ist, um die Wirkung am SUR des K_{ATP} -Kanals zu erzielen. Bei den übrigen Verbindungen zeigen die unterschiedlichen Reste nur eine marginale Änderung der Bindungsstärke ($pK_D \approx 5.70$, Tab. 4.2).

An den Herzzellen der Ratte lag die Bindungsaffinität der Testsubstanzen meist um etwa eine halbe log-Einheit niedriger (Tab. 4.2). Dass die Affinität an Herzzellen geringer ist als an RASCM konnte schon früher (Salamon et al., 2002) für Bimakalimabkömmlinge gezeigt werden. Somit können die Pyridone aus der Reihe der acyclischen Phenoylether zu den K_{ATP} -Kanal-Liganden gerechnet werden.

Um zu zeigen, dass diese Wirkstoffe agonistische Wirkung am K_{ATP} -Kanal ausüben, also tatsächlich Kaliumkanalöffner sind, wurden exemplarisch die Substanzen JS-26 und JS-43 herausgegriffen, um damit die Standardrelaxationsexperimente an der Rattenaorta und -trachea durchzuführen. Die biologische Wirksamkeit der Substanzen entspricht qualitativ den Ergebnissen der Kompetitionsbindung mit [3 H]-P1075. JS43 zeigte an der Aorta eine $pEC_{50} = 6.25$ und an der Trachea 5.64. JS26 hatte eine halbmaximale Relaxationswirkung von 6.17 ± 0.01 an der Aorta und 5.66 (Tab. 4.5, S. 101) an der Trachea (Abb. 4.12). Die Ergebnisse der Kompetitionsbindung und die aus den physiologischen Experimenten belegen, dass die physiologischen Effekte der Relaxationsversuche auf eine Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal zurückzuführen sind. Daher kann festgestellt werden, dass die Pyridone aus der Reihe der acyclischen Phenoylether eine neue chemische Verbindungsklasse von Kaliumkanalöffnern darstellen, die ähnliche biologische Aktivität wie die 4-Chloranilinoderivate der Chromanol-Reihe zeigen. Allerdings konnten die pEC_{50} -Werte von ES44, ES150 und Bimakalim nicht erreicht werden. Ursache dafür scheint die relativ starre Ausrichtung der Alkylgruppen in Position 2 des fixierten Chromengrundgerüsts zu sein, die eine optimale Ausrichtung in die Bindungstasche des Rezeptors ermöglicht.

Dagegen können beide Substituenten in den acyclischen Phenoylethern um ihre Bindungsachse rotieren und so eine energiearme Konformation einnehmen, die jedoch die sterische Anforderung in der Bindungstasche nicht mehr erfüllt. Dadurch nimmt die Bindungsaffinität ab.

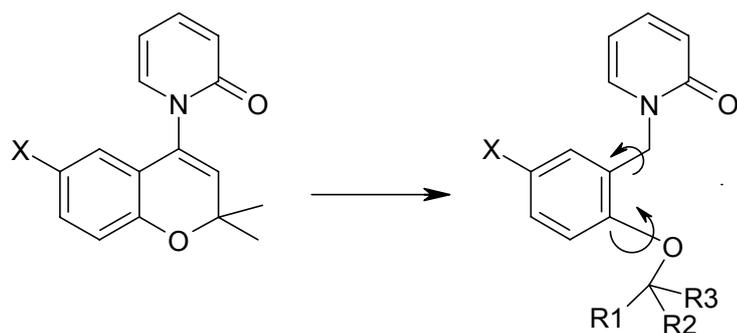


Abb. 5.1: Mögliche Rotation der Substituenten der acyclischen Phenoether (Pyridone) um ihre Bindungsachsen

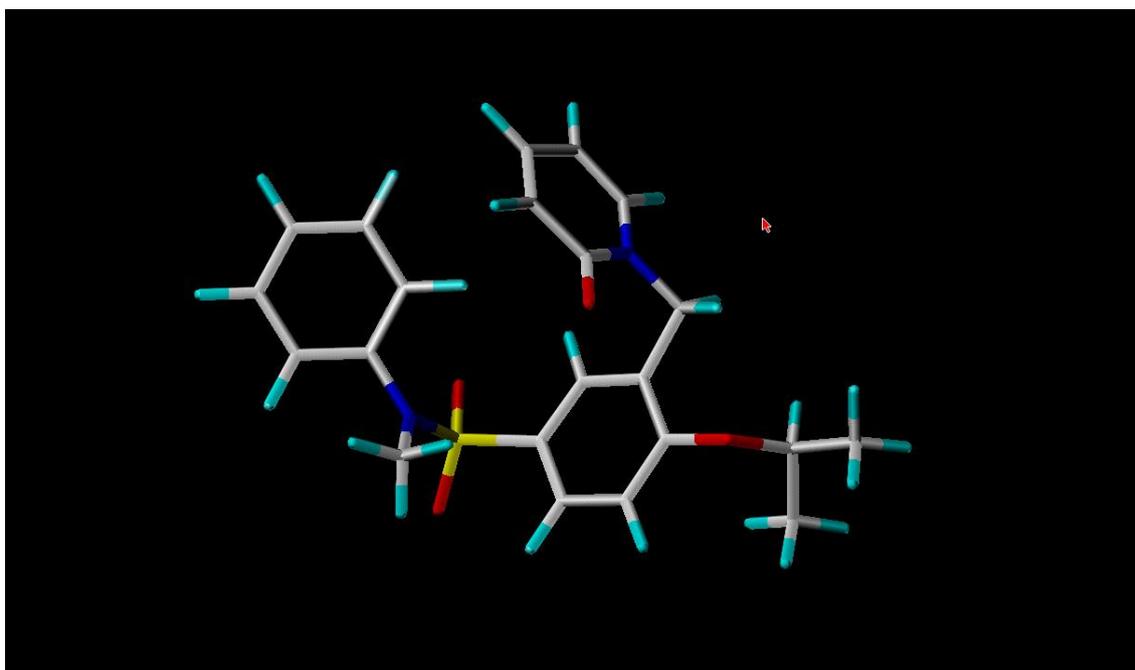


Abb. 5.2: Darstellung einer energiearmen Konformation am Beispiel des Phenoethers JS26

Berechnet mit SYBYL Tripod

In ähnlicher Weise sollten Amide oder Thioamide der acyclische Phenoether auf ihre Wirkung am K_{ATP} -Kanal untersucht werden. Sie stellen ebenfalls „aufgeschnittene“ Chromene dar, die bei geeigneter Substitution eine sehr hohe Affinität zum K_{ATP} -Kanal aufweisen (Sato und Koga et al., 1993)

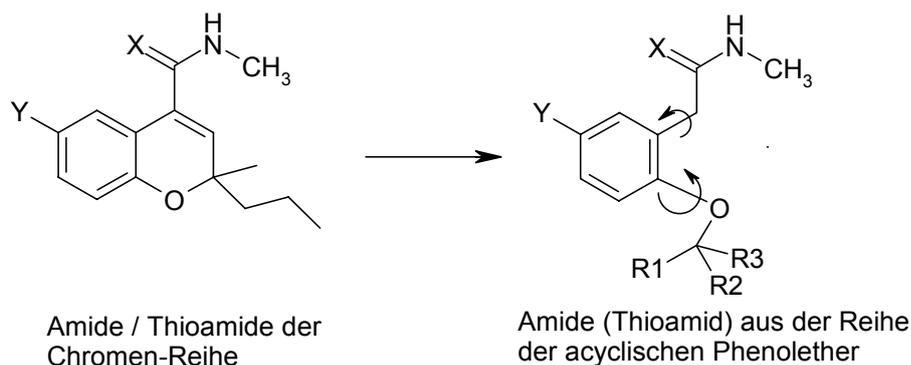


Abb. 5.3: Mögliche Rotation der Substituenten der acyclischen Phenoether (Amide/Thioamide) um ihre Bindungsachsen

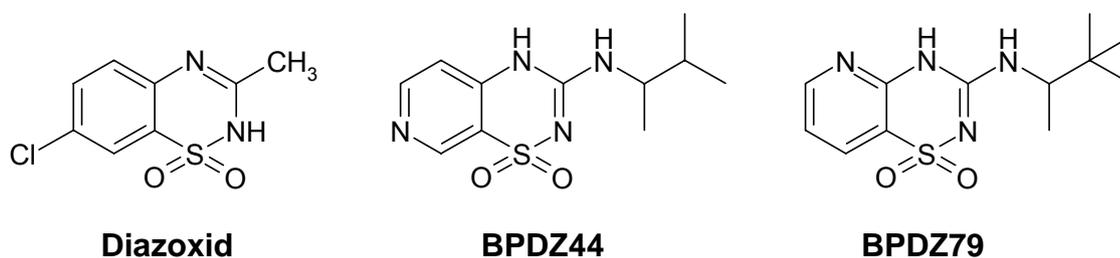
Auch sie binden an den K_{ATP} -Kanal, was durch die Kompetitionsbindung mit [3H]-P1075 gezeigt werden konnte. Dabei zeigte das Thioamid JS69 die höchste Affinität von $pK_D = 5.83$ (Tab. 4.3, S. 86). Die Vorstufen des Thioamids, die Amide (JS67, JS71 und JS68) zeigten geringere Affinitäten unter $pK_D < 5.5$. Ob es sich um K_{ATP} -Kanalöffner handelt, wurde nicht näher untersucht.

Dagegen war es von Interesse, ob diese Verbindungen eine Affinität zum L-Typ Calciumkanal aufweisen. Die Radioligandbindung mit [3H]-(+)-PN 200,110 ergab, dass die Substanzen nur eine geringe Affinität zum Calciumkanal aufweisen. Die Substanzen JS47 und JS48 hatten die höchste Affinität (etwa $pK_D = 4.80$, Tab. 4.7, S. 119). Sie zeigen damit eine höhere Selektivität für den K_{ATP} -Kanal als die 4-Chloranilinochromanole.

Abschließend kann gesagt werden, dass die acyclischen Phenoether eine neue Klasse von Kaliumkanalöffnern darstellen. Hervorzuheben ist, dass im Vergleich zu den 4-Chloranilinoderivaten, die Pyridone eine hohe Selektivität zum K_{ATP} -Kanal aufweisen. Ähnliches gilt auch für die Amide und Thioamide. Sie wirken dort wahrscheinlich agonistisch. Entsprechende Versuche müssen dies noch belegen, wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

5.4 Pharmakologische Charakterisierung von BPDZ44 und BPDZ79 als Abkömmlinge von Diazoxid

Die chemische Strukturvielfalt der Kaliumkanalöffner ist sehr breit. Es wurden unter anderem Wirkstoffe beschrieben, die die chemischen Strukturmerkmale sowohl von Diazoxid als auch von Pinacidil besitzen. Der Austausch des Chlor-substituierten Benzolringes im Diazoxid gegen Pyridin führte zu den Verbindungen BPDZ44 (Pirotte et al., 1993) und BPDZ79 (Pirotte et al., 2000). Dabei zeigte sich, dass die Verbindung BPDZ44 einen stark hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas hat, jedoch nur eine geringere (niederaffine) Wirkung an Aortenringen der Ratte aufweist ($EC_{50} = 154.4 \mu\text{M}$; Pirotte et al., 2000). Dagegen zeigt die Substanz BPDZ79 (Pirotte et al., 2000), eine stärkere Erschlaffung der Rattenaorta ($EC_{50} = 7.5 \mu\text{M}$) als BPDZ44, dagegen ist eine Wirkung auf die Hemmung der Insulinsekretion selbst bei einer hohen Konzentration [$50 \mu\text{M}$] nicht nachweisbar. Somit hemmt BPDZ44 stärker die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas, während BPDZ79 eher die glatte Muskulatur der Rattenaorta relaxiert. Beide Wirkungen werden auf die Interaktion der Substanzen mit den entsprechenden K_{ATP} -Kanälen in diesen Organen zurückgeführt.



In weiteren Untersuchungen mit BPDZ44 konnten Schwanstecher und Mitarbeiter (2001; Kongressmitteilung) an rekombinanten Systemen zeigen, dass BPDZ44 eine höhere Affinität zum vaskulären SUR2B aufweist als zum SUR1 der Pankreaszelle. Erstaunlicherweise schien BPDZ44 ein Aktivator des SUR1/ $K_{IR6.2}$ der β -Zellen des Pankreas zu sein ($pEC_{50} = 4.38$ M). Jedoch zeigte die Substanz am SUR2B/ $K_{IR6.2}$ (vaskuläres System) praktisch keinen Effekt ($pEC_{50} > 3.70$). Auch Pirotte et al. (1993) bestimmten die halbmaximale Relaxation der Rattenaorta bei $pEC_{50} \approx 4.0$. Sie schlossen daraus, dass BPDZ44 eine agonistische Wirkung auf die β -Zellen des Pankreas ausübt, während die Substanz am vaskulären SUR2B ein Blocker ist.

Es bestand daher großes Interesse, die Substanzen BPDZ44 und BPDZ79 näher zu charakterisieren. Insbesondere sollte untersucht werden, ob mit BPDZ44 als potentiell selektivem Antagonisten mögliche Präferenzen der in dieser Arbeit hergestellte Substanzen zu SUR-Untereinheiten aufgedeckt werden können. Aus diesem Grund wurden Experimente mit Bimakalim als Agonisten und BPDZ44 als potentiell K_{ATP} -Kanal-Antagonisten zur Messung von Dosis-Wirkungskurven mit anschließender Analyse nach Schild und Arunlakshana (1959) (s. Kap. 4.6) durchgeführt.

Außerdem wurden Kompetitionsbindungsversuche mit [3 H]-P1075 mit den Verbindungen BPDZ44 und BPDZ79 durchgeführt, um eventuelle unterschiedliche Affinitäten für die K_{ATP} -Kanäle der Herzzellen und der Aortenzellen der Ratte (RASCN) herauszufinden. Die Ergebnisse für BPDZ44 und BPDZ79 sind in Tab 5.5 aufgelistet. Sowohl BPDZ44 ($pK_D = 6.06 \pm 0.07$) als auch BPDZ79 ($pK_D = 6.54 \pm 0.07$) zeigten in der Radioligandbindung in etwa die gleiche Bindungsaffinität an den Aortenzellen wie an disaggregierten Herzzellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl BPDZ44 als auch BPDZ79 in etwa gleiche Bindungsaffinitäten am SUR2B der Rattenaorta und dem SUR2A der Rattenherzzellen aufweisen. Damit kann allerdings noch keine Aussage über ihre Funktion getroffen werden. Es musste deshalb noch untersucht werden, ob die Substanzen den K_{ATP} -Kanal blockieren oder aktivieren.

Tab. 5.5: Vergleich der Daten aus Radioligandbindung und funktionellen Versuchen für BPDZ44 und BPDZ79

	BPDZ44	BPDZ79	
Radioligandbindung			
Aortenzellen, (RASCM) [³ H]-P 1075	6.06 ± 0.07	6.54 ± 0.05	diese Arbeit
Herzzellen [³ H]-P 1075	6.16 ± 0.05	6.27 ± 0.06	diese Arbeit
funktioneller Versuch			
Aorta	partielle Effekte	5.88 ± 0.02	diese Arbeit
Trachea	unwirksam	5.32 ± 0.02	diese Arbeit
Aorta	3.70 ± 0.04	5.12 ± 0.24	Pirotte et al., 1993, Pirotte et al., 2000
Ratte β-Zellen	ca. 5.3	unwirksam	Pirotte et al., 1993, Pirotte et al., 2000
SUR1 patch clamp	4.4	-----	Schwanstecher et al., 2001
SUR2B patch clamp	unwirksam	-----	Schwanstecher et al., 2001
SUR2B, [³ H]-P 1075	6.25	-----	Schwanstecher et al., 2001

Aorta und Trachea für die funktionellen Experimente wurden aus der Ratte isoliert

Aus diesem Grund wurden Dosis-Wirkungskurven an der Rattenaorta und an der Rattentrachea von BPDZ44 und BPDZ79 durchgeführt. Wenn es sich um eine K_{ATP} -Kanal-vermittelte Relaxation der Gewebe handelt, so müsste für die halbmaximale Wirkung für beide Substanzen der pEC_{50} -Wert dem pK_D entsprechen. Diese Übereinstimmung konnte nur mit BPDZ79 erzielt werden (Tab 5.5). Der ermittelte pEC_{50} -Wert für BPDZ79 an der Rattenaorta stimmt dabei mit dem von de Tullio et al. (1996) angegebenen Wert in etwa überein (Tab 5.5). An der Trachea war eine etwa 3-fach höhere Konzentration nötig ($pEC_{50} = 5.32$). Abb. 4.38 (S. 139) zeigt eindrucksvoll, dass BPDZ79 mit steigender Konzentration die Relaxation in beiden Experimenten verstärkt.

Ganz anders verhielt sich der Wirkstoff BPDZ44 (s. Abb. 4.38 oben). Die Bestimmung der pEC_{50} an Aorta und Trachea der Ratte war wegen der geringen Wirkung nicht

möglich ($pEC_{50} < 4.0$). Diese Tatsache überrascht deshalb, weil sich für die Bindung an Aortenzellen (RASCM, SUR2B) ein Wert von $pK_D = 6.06$ ergab (Tab. 5.5). Berechnet man danach die Wirkstoff-Konzentration von ca. $10 \mu M$ ($10 \cdot K_D$), bei der eine Rezeptorbesetzung von ca. 90 % resultiert, so müsste daraus eine deutliche Relaxation der Aorta folgen.

Tatsächlich stellte man jedoch nur eine relativ schwache Relaxation von $<20\%$ fest (Abb. 4.38 und Abb. 4.39, S. 140). Aus dieser Diskrepanz ergaben sich verschiedene Fragen:

1. Besitzen die für die Bindungsexperimente gezüchteten glatten Muskelzellen der Rattenaorta (RASCM) der P_2 -Generation andere Eigenschaften als die glatte Muskulatur der intakten Rattenaorta?
2. Wird der relaxierende Effekt an der Aorta nicht über den K_{ATP} -Kanal vermittelt, sondern evtl. über eine Blockade des Calciumeinstroms oder über andere Kaliumkanäle?
3. Sind die Bindungsstellen für $[^3H]$ -P1075 und BPDZ44 identisch?

Deshalb sollte untersucht werden, ob die Aortenzellen (RASCM) eventuell über die lange Anzuchtdauer von 3.5 Wochen die K_{ATP} -Kanäle veränderten. Um Frage 1 zu klären, wurden Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart und Abwesenheit eines Blockers an isolierten Aortenringen der Ratte gemessen und in Form eines Schildplots (Arunlakshana et Schild, 1959) ausgewertet. Dabei wurde die Standardsubstanz Bimakalim als Agonist eingesetzt und BPDZ44 als Antagonist. Die Konzentration von BPDZ44, mit der das Gewebe inkubiert wurde, lag zwischen 1 und $100 \mu M$. Für den Fall, dass BPDZ44 als Antagonist wirkt, so sollte die Dosis-Wirkungskurve von Bimakalim zu höheren Konzentrationen verschoben werden, wobei die Erhöhung der Konzentration um das 3-fache eine Verschiebung um eine halbe log-Einheit induziert. Die Verschiebung wäre somit konzentrationsabhängig. Tatsächlich war dieser Effekt zu beobachten. Die pEC_{50} -Werte für Bimakalim wurden zu höheren Konzentrationen verschoben, je mehr BPDZ44 inkubiert wurde. Die Auswertung wurde dadurch erschwert, dass BPDZ44 bei Konzentrationen $> 10 \mu M$ eine Relaxation des Aortengewebes auslöste. Nichtsdestotrotz konnte die Schildplotanalyse durchgeführt werden. Der pK_B -Wert lag für BPDZ44 bei 5.64 mit einer Steigung des Schildplots von 0.79 (s. Abb. 4.36, S. 135).

Die nichtlineare Analyse (Lemoine et al., 1983) untermauerte diese Ergebnisse. Hier konnte ein pA_2 -Wert für die Blockade am K_{ATP} -Kanal von 5.76 ermittelt werden (Abb. 4.35). Demnach besitzen die kultivierten Rattenaortenzellen in Bezug auf die Bindung von BPDZ44 die gleichen Eigenschaften wie die isolierte glatte Muskulatur

der Rattenaorta in Bezug auf die Blockade durch BPDZ44 ($pK_D \approx pK_B$). Zudem kann gesagt werden, dass BPDZ44 am K_{ATP} -Rezeptor als „echter“ Blocker wirkt.

Um einen nicht K_{ATP} -vermittelten Effekt auszuschließen (Frage 2), wurden weitere Relaxationsexperimente mit erhöhter Kalium-Konzentration durchgeführt. Dazu wurden Versuche in Anwesenheit von 30 mM und 136 mM KCl im extrazellulären Puffer durchgeführt. Mit der hohen Kalium-Konzentration wird dieser Kalium-Ionengradient zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum beseitigt und eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle bewirkt keine Veränderung des Membranpotentials mit der Folge, dass keine Relaxation ausgelöst wird. Sollte die Relaxation durch andere Mechanismen (z.B. Blockade der Calciumkanäle) ausgelöst werden, so muss auch bei einer KCl-Konzentration von 136 mM im Puffer eine Reaktion beobachtet werden. Das Experiment mit hoher Kaliumkonzentration zeigte, dass der relaxierende Effekt von BPDZ44 bei „High-Kalium“ nicht unterdrückt werden konnte (s. Abb. 4.42, S. 143). Daraus kann geschlossen werden, dass die Relaxation über einen anderen Weg erfolgt, der nicht in Zusammenhang mit dem K_{ATP} -Kanal steht.

Versuche zur calciuminduzierten Muskelkontraktion bei hoher Kaliumkonzentration ergaben, dass eine Hemmung bis zu 50 % beobachtet wird (Abb. 4.41). BPDZ44 hemmt demnach bei hohen Konzentrationen den Calciumeinstrom in die Muskelzelle. Diese Hemmung wird jedoch nicht über den L-Typ-Calciumkanal vermittelt, da BPDZ44 in der Radioligandbindung mit [3 H]-(+)-PN 200,110 keinen Effekt zeigte (Tab. 4.10, S. 141).

Die Frage 3, ob [3 H]-P1075 an einer anderen Bindungsstelle des K_{ATP} -Kanals bindet, als an der Stelle, an der BPDZ44 die Relaxation auslöst, kann nicht beantwortet werden, da für die Substanzen BPDZ79 und BPDZ44 kein strukturverwandter Radioligand zur Verfügung steht. Jedoch konnten bislang solche Effekte bei anderen Kaliumkanalöffnern noch nie beobachtet werden.

Somit können die gefundenen Ergebnisse wie folgt interpretiert werden: Das Diazoxidanalogon BPDZ44 kann als Antagonist des K_{ATP} -Kanals am SUR2B der Rattenaorta angesehen werden. Die Rezeptoraffinität liegt bei $pK_D \approx 6$. Eine Relaxation der Aorta konnte erst bei wesentlich höheren Konzentrationen von BPDZ44 ($\approx 30 - 100 \mu\text{M}$) beobachtet werden. Die Calciumexperimente zeigen, dass dieser Zusatzeffekt mit der Blockade des Calciumeinstroms in Zusammenhang steht, der allerdings nicht von Kanälen des L-Typs bewirkt wird, was die Radioligandbindung mit [3 H]-(+)-PN 200,110 zeigt. Die schwache Relaxation der Rattenaorta bei 10^{-6} M BPDZ44 könnte Hinweise auf eine partialagonistische Wirkung geben, die auf eine K_{ATP} -Kanal-Wirkung zurückzuführen ist, was mit der Kompetitionsbindung an RASCM ($pK_D = 6.15$, Tab. 5.5) korreliert. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser vorliegenden

Arbeit nicht untersucht. So ist die Wirkung der Substanz vom Status des Gewebes bzw. der K_{ATP} -Kanäle abhängig. Somit muss BPDZ44 vorläufig als Antagonist des vaskulären K_{ATP} -Kanals (SUR2B) angesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Selektivität von BPDZ44 nicht aufgrund unterschiedlicher Affinität zu den Subtypen (SUR1 und SUR2) zum K_{ATP} -Kanal entsteht, sondern durch unterschiedliche agonistische Eigenschaften erklärt werden kann. Somit steht ein Substanzpaar (BPDZ44 und BPDZ79) zur Verfügung, welches sich entgegengesetzt am SUR1/Kir 6.2 des Pankreas und am SUR2B/Kir 6.2 verhält und somit Rezeptorunterschiede aufdecken kann.

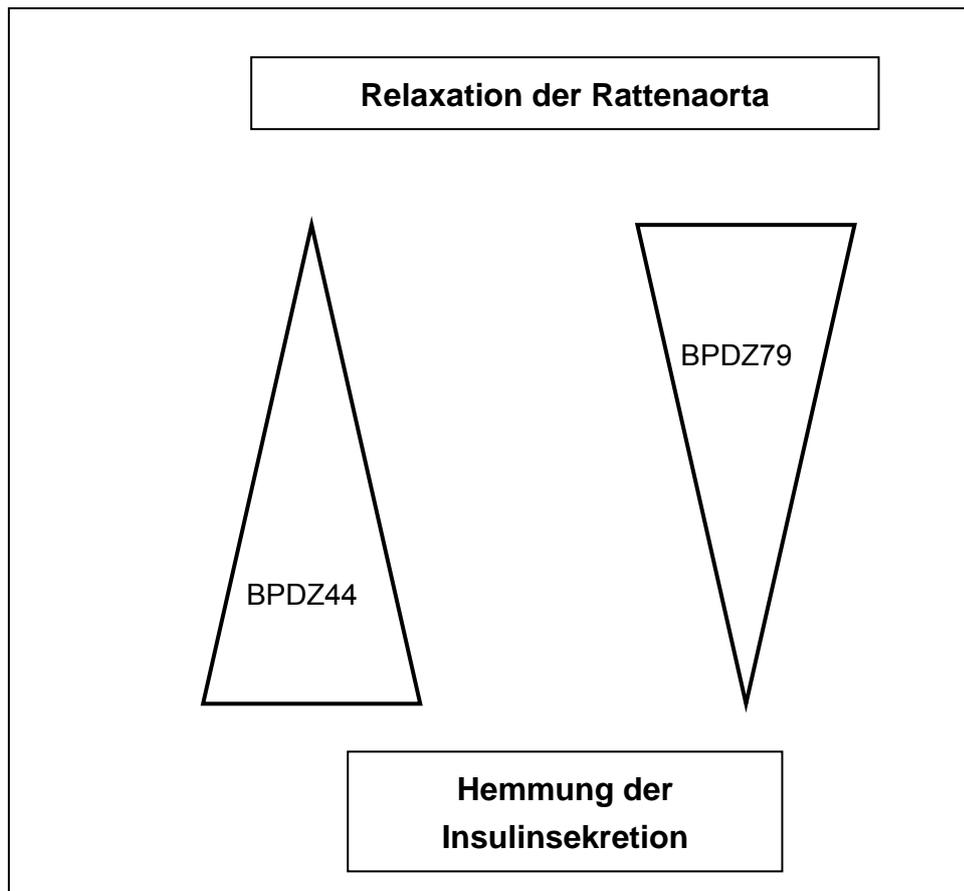


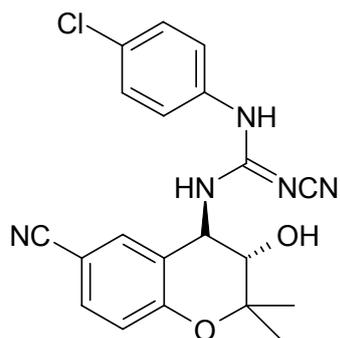
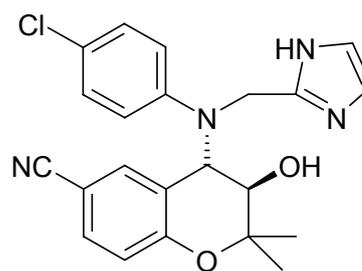
Abb. 5.4: Unterschiedliche Funktion von BPDZ44 und BPDZ79 bei gleicher Bindung am SUR2A/SUR2B-System

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kaliumkanalöffner (KCO) stellen eine chemisch heterogene Wirkstoffklasse dar, der u.a. Benzopyrane, Cyanoguanidine, Thioformamide und Thiadiazine angehören. Durch Öffnung ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) bewirken sie eine Hyperpolarisation der Zellmembran und führen damit zu einer verminderten Erregbarkeit der Zellen. Die Kaliumkanalöffner wurden in einer Vielzahl von Geweben identifiziert, u.a. in glatten Muskelzellen, Herzzellen, β -Zellen des Pankreas und in Neuronen. Der K_{ATP} -Kanal wird aus zwei Untereinheiten gebildet, dem porenbildenden Kalium-Inward-Rectifyer (Kir) und dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), die sich zu einem Octamer (Kir + SUR)₄ assoziieren. Der Sulfonylharnstoffrezeptor trägt die Bindungsstelle sowohl für die Kaliumkanalöffner als auch für Wirkstoffe, die den Kaliumkanal blockieren, wie z.B. Glibenclamid. Je nach Gewebetyp werden drei verschiedene Isoformen des SUR exprimiert, die als SUR1 (β -Zellen des Pankreas), SUR2A (Herz) und SUR2B (Aorta, Trachea) bezeichnet werden. Reguliert wird der K_{ATP} -Kanal über das Verhältnis von ADP und ATP innerhalb der Zelle. Somit verknüpfen die K_{ATP} -Kanäle die elektrische Aktivität der Zelle mit ihrem metabolischen Status und können somit die Verkürzung der Aktionspotentiale des Herzens, die Relaxation des glatten Muskels sowie die Hemmung der Insulinsekretion und der Neurotransmitterfreisetzung vermitteln.

Innerhalb der Gruppe der Kaliumkanalöffner besitzen die Benzopyrane große Bedeutung, weshalb sie am besten untersucht sind. Sie zeichnen sich durch eine hohe biologische Aktivität aus. Die Vertreter der ersten Generation, wie z.B. Cromakalim, induzieren die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle der glatten Muskulatur des vaskulären Systems, wodurch sie stark blutdrucksenkend wirken. Daneben besitzen sie eine so genannte kardioprotektive, antiischämische Wirkung, die über die Öffnung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle ($mitoK_{ATP}$) vermittelt werden soll. Allerdings waren diese ersten KCO wegen der starken Blutdrucksenkung nicht zur Therapie der Ischämie des Herzens geeignet.

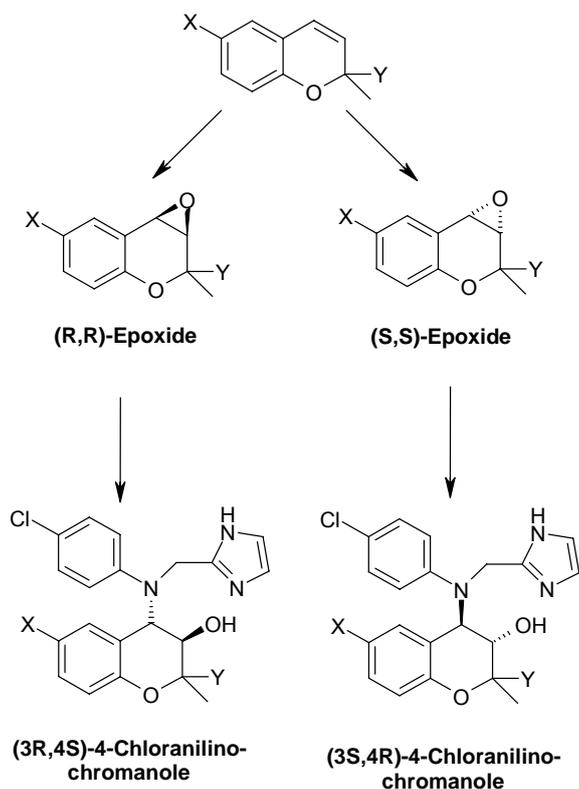
Die Substanz **(3S,4R)-BMS-180448 (8)** vereinigt in ihrer Struktur ein Benzopyran mit einem Cyanoguanidin. Diese Verbindung wurde als erster kardiolselektiver KCO beschrieben. Allerdings konnte ihre Kardioselektivität nur in aufwändigen Tierexperimenten belegt werden, in denen sie eine in etwa 200-fach höhere Wirkung bei der Kardioprotektion im Vergleich zur Vasorelaxation aufwies. Somit gilt BMS-180448 als erster Wirkstoff, der eine ausreichende protektive Wirkung zeigte, ohne den Blutdruck maßgeblich zu beeinflussen.

**(8)****(3S,4R)-BMS-180448****(9)****(3R,4S)-BMS-191095**

Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet stellte die Verbindung **(3R-4S)-BMS-191095 (9)** dar, die im Vergleich zu (3S,4R)-BMS-180448 allerdings die umgekehrte Konfiguration aufweist, und die als erster kardioselektiver Kaliumkanalöffner mit einer hohen funktionellen Selektivität für $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle des Herzens im Vergleich zu sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen des Herzens gilt. Damit besitzt die Substanz eine kardioprotektive Wirkung bei einer Konzentration, bei der die blutdrucksenkende Wirkung praktisch völlig ausbleibt. Jedoch ist bislang nicht bekannt, mit welcher Selektivität BMS-191095 an den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal des Herzens (SUR2A) im Vergleich zu dem der Aorta (SUR2B) bindet. BMS-191095 wurde bereits an verschiedenen Versuchsmodellen untersucht. So wurde die blutdrucksenkende Wirkung am Ganztier und die Vasorelaxation an Aortenringen der Ratte untersucht. Außerdem wurden Experimente zur kardioprotektiven Wirkung am isolierten Langendorff-Herz durchgeführt, bei der durch kardioselektive KCOs eine Verlängerung der Zeit bis zur Kontraktur des Herzens nach Unterbrechung der Durchblutung bewirkt wird. Jedoch gibt es noch keine wirkortnahen Tests, die Aufschluss über den Mechanismus des kardioprotektiven Effektes geben könnten. Bislang unerforscht geblieben sind ebenfalls die Relaxationseigenschaften der Substanz an der Trachea.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Substanz (3R,4S)-BMS-191095 und weitere Analoga synthetisiert werden, um damit die Bindungsaffinität und die Selektivität für K_{ATP} -Kanäle verschiedenen Ursprungs zu untersuchen. Um eventuelle Unterschiede zwischen den Enantiomeren zu erkennen, sollten die Wirkstoffe stereospezifisch zugänglich gemacht werden. So gelang in Anlehnung an Literaturmethoden durch Verwendung der enantiomerenreinen Jacobsen-Katalysatoren, die Darstellung der (R,R)- bzw. (S,S)-Epoxide verschiedener Chromene. Zudem war es möglich, aus dem Racemat eines 2-unsymmetrisch substituierten Chromens (Y = n-Propyl) über die enantioselektive Epoxidierung ein Gemisch diastereomerer Epoxide

zu synthetisieren, das nach präparativer Säulenchromatographie abgetrennt und spektroskopisch charakterisiert werden konnte. Von dieser Verbindung konnten geeignete Einkristalle gezüchtet werden, so dass durch eine Röntgenstrukturanalyse die absolute Konfiguration bestimmt werden konnte. An Hand dieser Daten konnte die bevorzugte Konformation dieser beiden Epoxide in Lösung durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt werden.



(3R,4S)	X	Y	(3S,4R)	X	Y
JS09	-NO ₂	-CH ₃	JS09	-NO ₂	-CH ₃
BMS-191095	-CN	-CH ₃	BMS-191095	-CN	-CH ₃
JS33	-SO ₂ -NCH ₃ -C ₆ H ₅	-CH ₃			
JS16	-NO ₂	C ₃ H ₇			

Schema 15 Enantiospezifische Darstellung der 4-Chloranilinochromanole

Die biologisch funktionelle Wirkung der oben genannten Substanzen und von (3S,4R)-BMS-180448 wurde anhand von Radioligandbindungsstudien mit dem Agonisten [^3H]-P1075 stellvertretend für die Rezeptorsubtypen SUR2A und SUR2B an enzymatisch desaggregierten intakten Herzzellen und kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta (RASCM) der Ratte untersucht. Dabei ergaben sich Dissoziationskonstanten der (3R,4S)-Enantiomere von BMS-191095 und JS09 von $\text{pK}_D = 5.62$ bzw. 5.89 an

den Herzzellen. Die Bindungsaffinitäten an den Muskelzellen der Rattenaorta lagen nur 1.5fach höher. Für das niederaffine Enantiomer (3S,4R)-JS09 wurden Bindungsaffinitäten von $pK_D = 5.10$ an Herzzellen (SUR2A) und 4.88 an Aortenzellen (RASCM, SUR2B) gemessen (Tab. 6.1). Mit keiner der Substanzen konnte demnach eine Selektivität zwischen den K_{ATP} -Kanälen der Herzmuskelzellen und denen der Aortenzellen der Ratte, die durch die Rezeptorsubtypen SUR2A und SUR2B charakterisiert sind, gefunden werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die kardioprotektive Wirkung über SUR2A oder SUR2B vermittelt wird.

Tab. 6.1: Dissoziationskonstanten (pK_D) aus Radioligandbindungsstudien mit dem K_{ATP} -Kanalagonisten [3H]-P1075 und dem L-Typ Calciumkanal-Radioliganden [3H]-(+)-PN 200,110 an glattmuskulären Aortenzellen (RASCM), Herzzellen und ventrikulären Herzmuskelzellmembranen der Katze (KLV)

	Bindung pK_D				
	[3H]-P1075 K_{ATP} -Kanal			[3H]-(+)-PN 200,110 L-Typ Calciumkanal	
	RASCM [-log M]	ΔpK_D [-log M]	Herzzellen [-log M]	ΔpK_D [-log M]	KLV [-log M]
(3R,4S)-JS09	6.06 ± 0.08	0.17 ± 0.09	5.89 ± 0.04	0.82 ± 0.06	5.07 ± 0.04
(3S,4R)-JS09	4.88 ± 0.06	-0.22 ± 0.10	5.10 ± 0.08	-0.56 ± 0.09	5.66 ± 0.03
(3R,4S)-BMS-191095	5.79 ± 0.04	0.17 ± 0.08	5.62 ± 0.07	0.52 ± 0.08	5.10 ± 0.03
(3S,4R)-BMS-191095	5.09 ± 0.05	-0.03 ± 0.09	5.12 ± 0.07	0.05 ± 0.07	5.07 ± 0.02
(3R,4S)-JS16	5.48 ± 0.13	-0.05 ± 0.15	5.53 ± 0.07	1.05 ± 0.15	4.48 ± 0.13
(3R,4S)-JS33	5.97 ± 0.06	0.23 ± 0.09	5.74 ± 0.07	0.19 ± 0.06	5.53 ± 0.04
(3S,4R)-BMS-180448	6.29 ± 0.03	0.06 ± 0.06	6.23 ± 0.05	1.05 ± 0.15	4.62 ± 0.04
Bimakalim	7.98 ± 0.04	0.47 ± 0.06	7.51 ± 0.05	> 4.5	< 3.0

Da die Radioligandbindung nicht zwischen agonistisch und antagonistisch wirkenden Liganden unterscheidet, wurde die funktionelle Wirkung der Verbindungen als Relaxation an der Aorta und Trachea der Ratte untersucht. Hierbei wurden kumulative Dosiswirkungskurven für die Testsubstanz an mit 30 mM Kaliumchlorid vorkontrahierten Aortenringen und mit 0.2 μ M Carbachol vorkontrahierten Trachealmuskelstreifen erstellt (Tab. 6.2). Der Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Aorta und Trachea liegt bei einer Fülle von verschiedenen Benzopyranen

aus früheren Arbeiten bei etwa 0.5 log-Einheiten. Jedoch zeigten (3R,4S)-BMS-191095 und seine Analoga bis auf (3S,4R)-BMS-191095 deutlich größere Differenz von über 1.3 bis über 1.8 log-Einheiten. Daraus kann geschlossen werden, dass es bei den SUR-Subtypen, die den K_{ATP} -Kanal von Aorta und Trachea bilden, Unterschiede geben muss, die pharmako-therapeutisch genutzt werden könnten.

Tab. 6.2: Geweberelaxierende Wirkung der Verbindungen in verschiedenen Testmodellen

	pEC ₅₀ -Werte für die Relaxation der glatten Muskulatur				
	pEC ₅₀ Trachea	Δ pEC ₅₀ ¹	pEC ₅₀ Aorta	Δ pEC ₅₀ ²	pEC ₅₀ ³ Aorta
Wirkung :	K_{ATP}		K_{ATP}		non- K_{ATP}
(3R,4S)-JS09	4.86 ± 0.03	1.45 ± 0.04	6.31 ± 0.03	1.06 ± 0.13	5.25 ± 0.13
(3S,4R)-JS09	4.02 ± 0.01	1.74 ± 0.03	5.76 ± 0.03	-0.16 ± 0.08	5.92 ± 0.07
(3R,4S)-BMS-191095	4.43 ± 0.09	1.34 ± 0.12	5.77 ± 0.08	1.18 ± 0.11	4.59 ± 0.07
(3S,4R)-BMS-191095	4.67 ± 0.04	0.39 ± 0.06	5.06 ± 0.05	-	-
(3R,4S)-JS33	4.50 ± 0.02	1.83 ± 0.04	6.33 ± 0.03	1.23 ± 0.08	5.10 ± 0.11
(3S,4R)-BMS-180448	4.14 ± 0.04	1.39 ± 0.07	5.53 ± 0.06	0.80 ± 0.11	4.73 ± 0.05

¹ Differenz der pEC₅₀-Werte für die K_{ATP} -Wirkung an Aorta und Trachea
² Differenz der pEC₅₀-Werte für die K_{ATP} - und die non- K_{ATP} -Wirkung
³ In Gegenwart von 136 mM K^+ ist der K_{ATP} -Kanal inaktiviert (non- K_{ATP} -Wirkung)

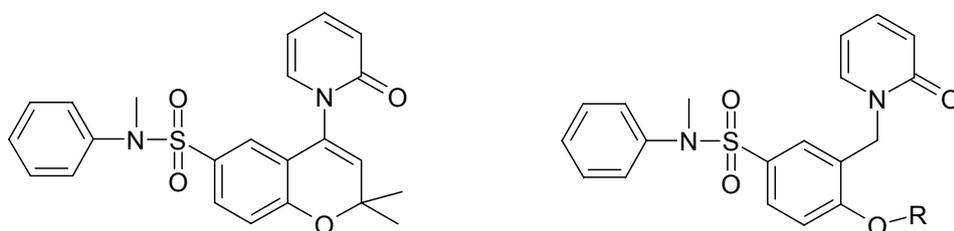
Die pEC_{50} -Werte für die Relaxation an der Aorta (Tab. 6.2) stimmen für fast alle Substanzen in der Größenordnung mit den pK_D -Werten aus den Kompetitionsbindungen (s. Tab. 6.1) an Aortenzellen überein. Dies gilt nicht für das weniger wirksame (3S,4R)-JS09, welches schon mit 8-fach geringerer Konzentration ($pEC_{50} = 5.76$) als für die Bindung ($pK_D = 4.88$), eine relaxierende Wirkung zeigte. Nach Auswertung dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob hier eine Wirkung zur Relaxation des Aortengewebes beiträgt, die nicht über den K_{ATP} -Kanal vermittelt wird (non- K_{ATP} -Wirkung). Ein möglicher Kandidat für diese Zusatzwirkung ist der L-Typ Calciumkanal, der wesentlich in die Regulation der glatten Muskulatur eingreift. Der L-Typ Calciumkanal kann effektiv mit [3H]-(+)-PN 200,110 markiert werden, um die Affinität von Testsubstanzen im Kompetitionsbindungsassay zu bestimmen. Die in diesem Bindungsmodell ermittelten Affinitäten lagen mehr oder weniger deutlich unterhalb der pK_D -Werte für den K_{ATP} -Kanal der Herzzellen (s. Tab. 6.1; Herzmembranen (KLV) vs. intakte Herzzellen: $\Delta [-\log M] = 0.05$ bis 1.05). Eine Ausnahme bildete nur die Verbindung (3S,4R)-JS09, die mit $\Delta [-\log M] = -0.56$ einen umgekehrten Effekt aufweist, bei der also die Bindung am Calciumkanal effektiver ist als am K_{ATP} -Kanal.

Zur Bestätigung dieser Radioligandbindungsexperimente wurden Dosiswirkungskurven für die Calcium-induzierte Kontraktion untersucht. Dazu wurden Aortenringe der Ratte nach Entzug von extrazellulärem Calcium mit 136 mM Kaliumchlorid versetzt, um eine K_{ATP} -vermittelte Wirkung zu unterdrücken. Die Gewebe wurden mit der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, und anschließend wurde mit sukzessiver Calciumgabe eine Kontraktur ausgelöst. Das als Kontrollsubstanz eingesetzte Bimakalim zeigt in diesem Modell keinerlei Effekt: d.h. die Calcium-Dosiswirkungskurve war in An- und Abwesenheit von Bimakalim gleich. Die 4-Chloranilinochromanole hemmten jedoch die Calcium-induzierte Kontraktur der Aorta, allerdings bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen (s. Tab. 6.2). Während das am K_{ATP} -Kanal wirksame (3R,4S)-JS09 mit ca. 6 μM ($pK_D = 5.25$) die Calcium-Dosiswirkungskurve halbmaximal hemmt, wirkte das am K_{ATP} -Kanal niederaffine (3S,4R)-JS09 schon mit ca. 1.2 μM ($pK_D = 5.92$). Infolgedessen kehrten sich die enantiomerischen Quotienten (E.Q.) als wichtiges Charakteristikum „rezeptiver Strukturen“ um (Vergleich der Bindungsdaten s. Tab. 6.1): während am K_{ATP} -Kanal ein E.Q. von 15-fach ($\approx 1.2 \log$) zugunsten von (3R,4S)-JS09 gemessen wurde, betrug dieser am L-Typ Calciumkanal 4-fach ($\approx 0.6 \log$) zugunsten von (3S,4R)-JS09

Auf Grund der zusätzlichen Wirkung der Kaliumkanalöffner auf den L-Typ Calciumkanal müsste man vorhersagen, dass nach Blockade der KCO-Wirkung durch einen spezifischen Antagonisten (Glibenclamid) ein nicht-linearer Schildplot zur

Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Glibenclamidblockade resultiert. Für die diesbezüglichen Experimente wurde das höher wirksame Enantiomer (3R,4S)-JS09 als Agonist ausgesucht und mit Bimakalim verglichen. Während der Schildplot für Bimakalim nahezu linear war und eine Glibenclamid-Affinität mit einem pK_D -Wert von ca. 7.2 ergab, knickte der Schildplot bei Verwendung von (3R,4S)-JS09 bei Konzentrationen $\geq 10^{-6}$ M Glibenclamid ab, was dafür spricht, dass bei einer Konzentration $> 10^{-5}$ M ein zweiter Wirkmechanismus am L-Typ Calciumkanal die relaxierende Wirkung vermittelt, die naturgemäß nicht mehr mit Glibenclamid antagonisiert werden kann.

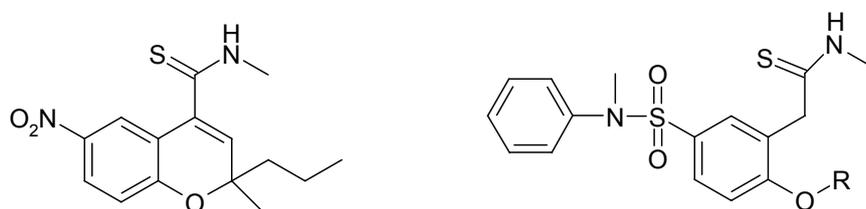
Für die in einer früheren Arbeit entwickelte, am K_{ATP} -Kanal hochwirksame Substanz ES150 (Salamon et al., 2002) wurde seinerzeit eine neue „interaction-site“ am Rezeptor für die aromatisch substituierte Sulfonamidstruktur postuliert, die über π -Wechselwirkung zu einer deutlich erhöhten Wirkstärke beiträgt. Basierend auf dieser Erkenntnis sollten durch ein formales „Aufschneiden“ des Benzopyrangrundgerüsts ringoffene Analoga synthetisiert werden, die noch die übrigen Strukturmerkmale von ES150 aufweisen. Ziel dieser Überlegung war es zu untersuchen, ob die Wechselwirkungen der Sulfonamidstruktur mit der postulierten „interaction-site“ stark genug sind, um eine gute oder sogar bessere Bindung am Rezeptor zu erreichen, da die übrigen Strukturelemente (Phenoether und Pyridon) jetzt beweglicher sind als bei ES150.



ES-150	Acyclische Phenoether vom Pyridon-Typ
---------------	--

Diese neuen acyclischen Phenoether wurden in den oben vorgestellten biologischen Testsystemen parallel mit den so genannten kardioselektiven BMS-191095-Analoga untersucht. In der Radioligandbindung zeigten sie mikromolare Affinitäten mit pK_D -Werten < 6.2 , wobei die Affinität mit der Größe des O-Alkylsubstituenten (R) variierte. Sie besaßen keine unterschiedliche Affinität für die K_{ATP} -Kanäle von Herz- und Aortenzellen, die über die Affinitätsunterschiede der so genannten kardioselektiven Wirkstoffe wie (3R,4S)-BMS-191095 und seine Analoga hinausgingen. Zwei der höheraffinen Liganden (JS26 und JS43) wurden auch im Funktionstest untersucht und übten dort eine relaxierende Wirkung aus. So liegt die Vermutung nahe, dass es sich

bei den acyclischen Phenoletthern um eine neue Klasse von Kaliumkanalöffnern handelt, deren Affinität durch eine weitere Variation der Substituenten noch verbessert werden könnte. Beim Vergleich der K_{ATP} -Kanal-Bindung dieser Reihe mit ihrer Calciumkanalbindung konnten deutlich höhere Selektivitäten (20- bis 100-fach) zugunsten der K_{ATP} -Kanäle gefunden werden.



**6-Nitro-Chromene-
4-carbothioamid-Reihe**

**Acyclische Phenoletther
vom Thioamid-Typ**

Eine ähnliche Strategie wurde mit den Amid und Thioamidderivaten verfolgt, die sich von sehr potenten Kaliumkanalöffnern der 6-Nitrochromen-Reihe ableiten (Koga et al., 1993). Auch in diesem Fall konnte ein K_{ATP} -Kanalligand mit mikromolarer Affinität gefunden werden, der allerdings nur eine geringe Selektivität (3-fach) gegenüber dem Calciumkanal aufwies.

In einem letzten Kapitel der Arbeit wurde ein K_{ATP} -Kanal-Ligand, das Benzothiadiazin BPDZ44 eingesetzt, das an einem artifiziellen, SUR2B exprimierenden HEK-Expressionssystem als Antagonist beschrieben worden war, um durch eine selektive Blockade die Wirkung von (3R,4S)-JS09 weiter zu analysieren. Diese Blockade-Experimente, die in nicht-linearen Schild-Plots untersucht wurden, ergaben allerdings keine anderen Ergebnisse als die Glibenclamidstudie. Jedoch erwies sich BPDZ44, entgegen der Vorhersage, nur an der Trachealmuskulatur nicht aber an der Aorta als einfacher Antagonist. An der Aorta übte es partial agonistische Wirkungen aus, allerdings erst mit wesentlich höheren Konzentrationen als von einer parallelen durchgeführten Bindungsstudie ($pK_D = 6.1$) vorhergesagt. Der pK_D -Wert der Bindung trifft in etwa den pK_B -Wert (5.6) der Schild-Plot-Analyse und ist ein Äquivalent für die Blockade des K_{ATP} -Kanals durch BPDZ 44. Die agonistische (relaxierende) Eigenschaft von BPDZ 44 tritt erst bei hohen Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ auf und ist zum Teil Folge einer Calcium-Kanal-Blockade (neuere Untersuchungen; nicht in dieser Arbeit). Als selektiver Antagonist des K_{ATP} -Kanals ist BPDZ44 damit nicht geeignet.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse der Arbeit festgehalten werden:

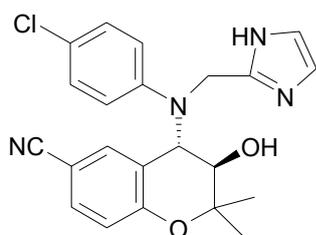
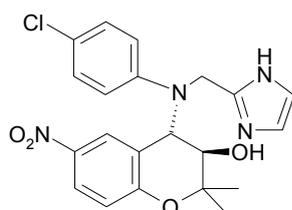
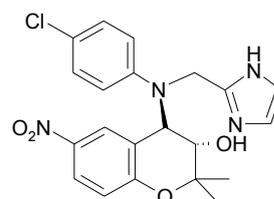
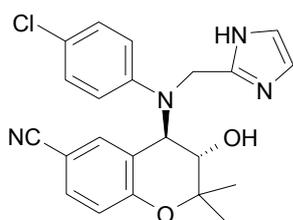
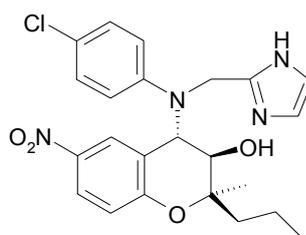
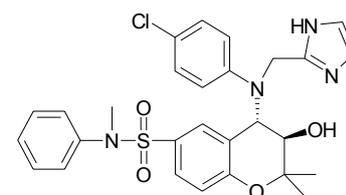
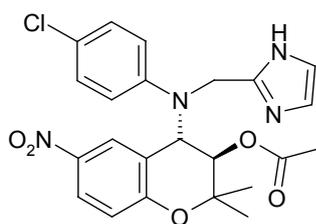
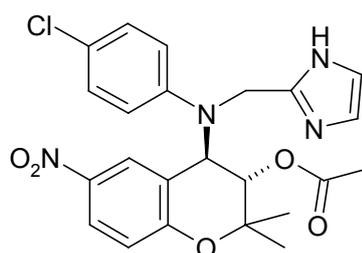
1. Es wurden Strukturabkömmlinge der so genannten kardioselektiven Kaliumkanalöffner aus der BMS-191095-Reihe synthetisiert und untersucht, ob diese Substanzreihe tauglich ist, zwischen den verschiedenen Subtypen der K_{ATP} -Kanäle vom SUR2-Typ in isolierten Herzzellen (SUR2A) sowie in der glatten Muskulatur von Aorta (SUR2B) und Trachea (SUR2B) zu unterscheiden. Hierzu wurde eine stereospezifische Synthesestrategie gewählt, um nicht nur die wirksameren (3R,4S)-, sondern auch die weniger wirksamen (3S,4R)-Enantiomeren zugänglich zu machen.
2. Die neuen, in der Literatur noch nicht beschriebenen nitro- und amidosulfonyl-substituierten Strukturen sind 2- bis 3-mal affiner als die bekannte, cyanosubstituierte Modellsubstanz BMS-191095. Mit Hilfe der dargestellten Substanzen konnten deutliche Unterschiede bei der Wirkung auf die K_{ATP} -Kanäle der glatten Muskulatur von Trachea und Aorta der Ratte dargestellt werden. Dagegen zeigten die Wirkstoffe dieser Reihe überraschenderweise keine Unterschiede bei den K_{ATP} -Kanälen am Herzen (SUR2A) und an der Aorta (SUR 2B).
3. Bei der Suche nach alternativen, nicht über den K_{ATP} -Kanal-vermittelten Wirkungen konnte erstmals in einer Bindungsstudie gezeigt werden, dass BMS-191095 und seine Analoga an Rezeptoren des L-Typ Calciumkanals binden.
4. In einer funktionellen Studie an Aortenringen konnte gezeigt werden, dass diese nicht über den K_{ATP} -Kanal vermittelten Wirkungen funktionell bedeutsam sind. So wurde die Wirkung des höchstaffinen Vertreters dieser Reihe, (3R,4S)-JS09, mit Glibenclamid dosisabhängig blockiert. Die resultierenden Schildplots waren nicht-linear und belegten, dass schon bei einer Konzentration von 10^{-5} M ein erheblicher Teil der Wirkung dieser so genannten kardioselektiven KCO über den Calciumkanal vermittelt wird.
5. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, dass auch die in der Literatur als kardioselektiv bezeichnete Wirkung dieser Substanzreihe nicht nur über Kaliumkanäle, sondern zu einem erheblichen Teil auch über eine gleichzeitige Hemmung kardialer Calciumkanäle zustande kommt.
6. Die Entwicklung acyclischer Phenoether vom Typ der Pyridone (abgeleitet von Bimakalim) oder der Thioamide (abgeleitet von Derivaten der 6-Nitrochromen-Reihe) führte zu moderat wirksamen K_{ATP} -Kanalöffnern mit ähnlich geringer Selektivität an Herz- und Aortenzellen wie in der so genannten kardioselektiven

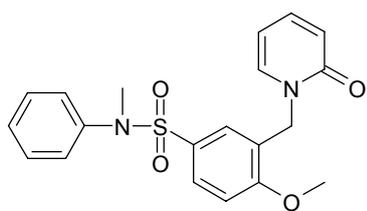
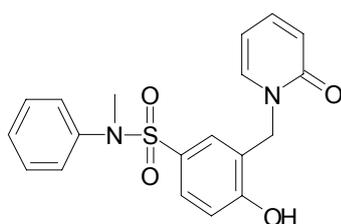
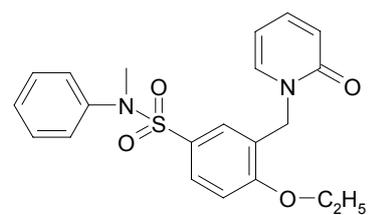
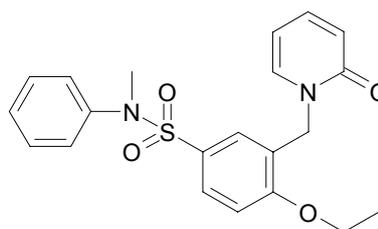
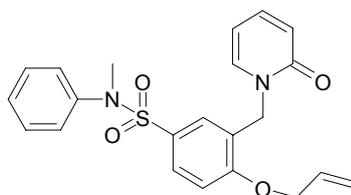
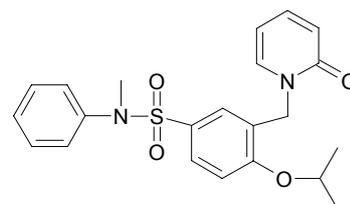
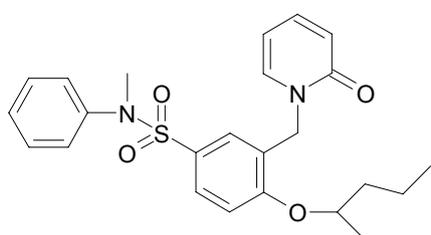
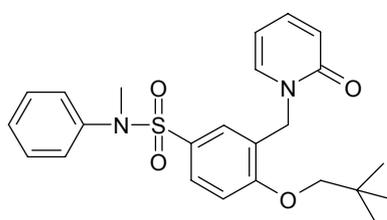
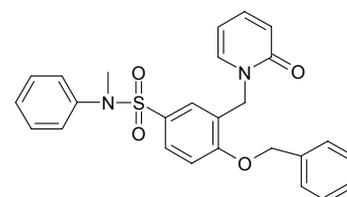
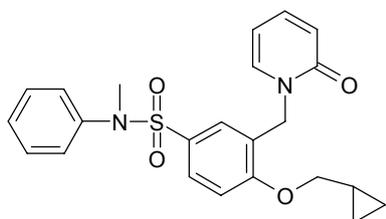
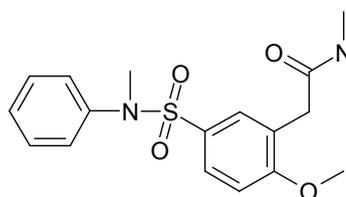
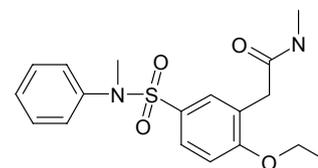
BMS-191095-Reihe. Durch ihre vergleichsweise höhere Selektivität zugunsten der K_{ATP} -Kanäle im Vergleich zum Calciumkanal könnten sie als Leitstrukturen für die Weiterentwicklung kardioselektiver K_{ATP} -Öffner dienen

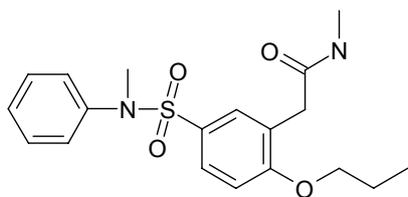
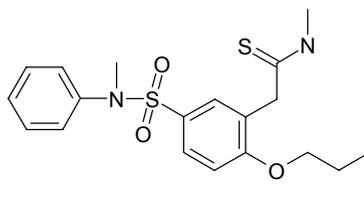
7. Untersuchungen zu nichtlinearen Schildplots mit einem Benzothiadiazin-Derivat BPDZ44, das als Antagonist für den SUR2B beschrieben worden war, ergaben die gleichen Resultate wie eine Glibenclamid-Studie. Jedoch erwies sich BPDZ44 nur an der Trachea als einfacher Antagonist. Dort treten bei höheren Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) agonistische Eigenschaften zu Tage, dessen Ursache derzeit in weiteren Experimenten untersucht werden. Damit ist BPDZ44 als selektiver Antagonist des K_{ATP} -Kanals nicht geeignet.

7 KONKORDANZ

7.1 Strukturformeln und Bezeichnungen

**9****((3R,4S)-BMS 191095)****32****((3R,4S)-JS-09)****33****((3S,4R)-JS-09)****34****((3S,4R)-BMS 191095)****35****((3R,4S)-JS-16)****36****((3R,4S)-JS-33)****37****((3R,4S)-JS-09-Ac)****38****((3S,4R)-JS-09-Ac)**

**53****(JS45)****54****JS39****55****(JS42)****56****(JS43)****57****(JS49)****58****(JS26)****59****(JS48)****60****(JS47)****61****(JS44)****62****(JS46)****70****(JS67)****71****(JS71)**

**72****(JS68)****73****(JS69)**

(3S,4R)-BMS-180448

8

(Formel S. 20)

(3R,4S)-BMS-191095

9

(3S,4R)-BMS-191095

34

(3R,4S)-JS-09

32

(3S,4R)-JS-09

33

(3R,4S)-JS-09-Ac

37

(3S,4R)-JS-09-Ac

38

(3R,4S)-JS-16

35

JS-26

58

(3R,4S)-JS33

36

JS39

54

JS42

55

JS43

56

JS44

61

JS45

53

JS46

62

JS47

60

JS48

59

JS49	<u>57</u>
JS67	<u>70</u>
JS68	<u>72</u>
JS69	<u>73</u>
JS71	<u>71</u>

8 CHEMISCH-EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
ax	axial
ber.	berechnet
br	breit (IRF/NMR)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR)
Δ	Differenz
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DBU	Diazabicycloundecen
dd	Dublett eines Dubletts
d.h.	das heißt
dt	Dublett eines Triplets (NMR)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. Th.	der Theorie
E	Effekt
EC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % Wirkung erreicht wird
EGTA	Ethylenglycol-bis-amino-ethylether
EI	Elektronenstoßionisation
eq	equatorial
f	folgende
FM	Fließmittel
gef.	gefunden
Gl.	Gleichung
Hz	Hertz
IR	Infrarotspektroskopie
i. Vak.	im Vakuum
J	Betrag der Kopplungskonstanten
(RR)-JK	Jacobsenkatalysator (R,R)-(-)-N,N'-Bis(3,5-di- <i>tert</i> -butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid
(SS)-JK	Jacobsenkatalysator (S,S)-(+)-N,N'-Bis(3,5-di- <i>tert</i> -butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KCO	Kaliumkanalöffner
K _D	Dissoziationskonstante
Kir	einwärtgleichrichtender Kaliumkanal
l	Liter
LM	Lösungsmittel
m	milli, Multiplett (NMR), medium (IR)
M ⁺	Molekülion

μ	mikro
min	Minute
MHz	Megahertz (NMR)
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
v	Wellenzahl in cm ⁻¹
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NBF	Nucleotidbindungsstelle
NDP	Nucleotidphosphat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
o	ortho
org.	organisch
p	para
p.A.	zur Analyse
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der EC50
Phe	Phenyl
pK _D	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
ppm	parts per million
Pyr	Pyridon
q	Quartett (NMR)
Rf	Retentionswert
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR), strong (IR), standard error of the estimate
s.	siehe
S.	Seite
SC	Säulenchromatographie
sh	shoulder (IR)
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SEM	Standardabweichung der Mittelwertes
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
t	Triplet (NMR)
T	Teil(e), Temperatur
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
u.a.	unter anderem
vs	very strong (IR), versus
vw	very weak (IR)
w	weak (IR)
z.B.	zum Beispiel
z.S.	zur Synthese
""	erscheint als...

8.2 Allgemeine Angaben zu Material und Methoden

Schmelzpunkte: Apotec® Kleinfeld Labortech., Angaben in °C, unkorrigiert

IR-Spektren: Perkin Elmer 1600-Series FT-IR
Angaben der Wellenzahl in ν (cm^{-1})
Schwingungen werden wie folgt charakterisiert

		<i>Transmission [%]</i>
vw	(very weak)	90 – 70
w	(weak)	70 - 50
m	(medium)	50 – 30
s	(strong)	30 – 10
vs	(very strong)	10 – 0

Massenspektren (EI): Finnigan MAT 3500, Finnigan 4000, Ionisierungsenergie 70 eV. Die Werte werden als m/z angegeben, die relative Intensität als % in Klammern angegeben

¹H-NMR-Spektren: Bruker AC 200, Messfrequenz 200 MHz; Chemische Verschiebung in δ (ppm) gegen TMS; Kopplungskonstanten in Hz

Elementaranalyse: Zentrale Einrichtung der Chemie/Pharmazie „Mikroanalyse“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyser, Mikrowaage Perkin Elmer AD-6 Auto Balance

Dünnschichtchromatographie: DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F254 (Merck Nr. 5545), Laufstrecke betrug 7 cm; Kammersättigung

Säulenchromatographie: Kieselgel 60, Korngröße 0.040 – 0.063 mm; Elution mit FM 1 – 6.

CD-Spektrum Jasco Spektrometer

Fließmittel: (Vol/Vol) DC und SC

FM 1:	Toluol 80T / Aceton 20T
FM 2:	Toluol 85T / Ethylacetat 15T
FM 3:	Toluol 100T
FM 4:	Methanol 1T / Chloroform 9T
FM 5:	n-Hexan 8T/ Ethylacetat 2T
FM 6:	Toluol 83T/ Isopropanol 15/ Ammoniak 3T
FM 7:	Toluol 50T / Ethylacetat 50 T
FM 8:	Toluol 90T / Ethanol 20 T
FM 9 :	Toluol 70 T / Ethanol 30 T
FM10:	Ethylacetat 70 T / Petrolether 30 T

8.3 Chemikalien:

Alle Lösungsmittel wurden in technischer Qualität aus dem Zentralen Chemikalienlager der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen und vor Gebrauch über ein 50 cm lange Viegreaux-Kolonne destilliert bzw. -falls erforderlich- nach den herkömmlichen Verfahren absolutiert.

Acetonitril	Merck, p.a.
Acetylchlorid	Aldrich
Aluminiumoxid, neutral	Fluka, für SC
Benzylbromid	Merck z. S.
(R,R)-(-)-N,N'-Bis(3,5-di- <i>tert</i> -butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid 30	Aldrich
(S,S)-(+)-N,N'-Bis(3,5-di- <i>tert</i> -butylsalicyliden)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)-chlorid 31	Aldrich
Bortribromid	Merck, z.S
1-Brom-2,2-dimethylpropan	Fluka, purum >97 %
2-Brompentan	Aldrich, 99%
1-Brom-2-propen	Aldrich, z.S
2-Brompropan	Acros, 99%
4-Chloranilin 40	Merck, z.S.
Chlorsulfonsäure	Aldrich, 99%
4-Cyanophenol	Janssen, 95 %
(3S,4S)-6-Cyano-3,4-epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran 27	Arbeitskreis Weber
Cyclopropylmethylbromid	Acros, 99 %
DBU	Fluka
1,2-Dichlorbenzol	Acros, 99%

1,2-Dichlorethan	Acros, 99,8+ %
Ethylbromid	Merck, z.S
2-Hydroxyacetophenon 13	Fluka, 97%
Hydroxy-benzolsulfonsäure Natriumsalz Dihydrat 46	Fluka, purum >97 %
2-Hydroxypyridin	Janssen, 97%
Imidazol	Acros, 99 %
2-Imidazolcarboxaldehyd 41	Fluka
Isopropylbromid	Aldrich, 95%
Kaliumcarbonat, wasserfrei .	Baker, p.A
Kieselgel 60, 0.04-0.063 mm	Merck, für SC
Lawessons Reagenz	Aldrich
2-Methoxybenzylchlorid 50	Aldrich 98%
2-Methoxyphenylessigsäure 63	Aldrich, 98%
3-Methyl-1-hexin-3-ol	Lancaster, 98 %
2-Methyl-3-butin-2-ol	Fluka
Methylamin, 40 %ige Lösung .	Fluka, z.S
N,N-Diethylanilin	Acros, 99%
N,N-Dimethylformamid	Merck, p.a.
Natriumchlorid	Baker
4-Nitrophenol 43	Fluka, 97%
2-Pentanon	Merck
Phosphorpentachlorid	Merck
n-Propylbromid	Merck, z.S.
Pyrrolidin	Merck
Salpetersäure	Merck, rauchend
Triethylamin	Riedel de
Trifluoressigsäureanhydrid	Haen
	Merck-Suchardt, z.S.

8.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Darstellung der Propargylether

Lösung 1:

Eine Lösung von 2-Methyl-3-butin-2-ol (4.88 g, 58.0 mmol) und DBU (11.2 ml, 74.9 mmol) in 30 ml wasserfreiem Acetonitril wird unter Argon auf -5°C in einem Eis/Kochsalz-Bad gekühlt. Dazu wird Trifluoressigsäureanhydrid (8,2 ml, 58.0 mmol) über einen Zeitraum von 25 Minuten hinzuge tropft. Dabei sollte die Temperatur nicht über 2°C steigen. Die Lösung wird 30 min bei 0°C gerührt und bis zur Verarbeitung bei dieser Temperatur aufbewahrt.

Lösung 2:

Das entsprechende Phenol (50.4 mmol) wird in 30 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst und in einem Eis/Kochsalz-Bad auf -4°C gekühlt. DBU (9.7 ml, 64.9 mmol) und Kupfer(II)-chlorid-dihydrat, (9.3 mg, 55 μmol) werden hinzugegeben.

Die Lösung 1 wird zur Lösung 2 über 40 Minuten so hinzuge tropft, dass dabei die Temperatur nicht über 0°C ansteigt. Anschließend wird noch 5 h bei 0°C weitergerührt.

So dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. abgezogen. Das verbleibende Öl wird in Toluol (300ml) gelöst und 50 ml Wasser werden hinzugegeben. Die organische Phase wird sukzessiv mit 1N HCl (3 x 50 ml), 1N NaOH (2 x 50 ml) und dann mit gesättigter Kochsalzlösung (neutral) gewaschen. Die organische Phase trocknet man mit Magnesiumsulfat. Das Toluol wird i. Vak. abgezogen. Das verbleibende Öl wird im Kugelrohrföfen destilliert.

AAV2: Darstellung der Epoxide

Der entsprechende Benzopyran (2.5 mmol) sowie Imidazol (46 mg, 0.68 mmol) und der entsprechende Jacobsenkatalysator werden in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Dichlormethan (40 ml, 3:1) gelöst und die Lösung auf 0°C gebracht. 30% Wasserstoffperoxid (1.5 ml, 13.3 mmol) wird zum Ansatz hinzu getropft. Danach wird noch 1 h bei gleicher Temperatur weiter gerührt.

Im Scheidetrichter wird der Ansatz mit Dichlormethan verdünnt und zwei Mal mit Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels SC über Kieselgel unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat (FM 2).

AAV3: Darstellung der 4-Anilinochromanole

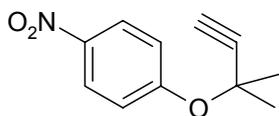
Ein Gemisch aus dem entsprechenden Epoxid (2.0 mmol), N-(4-Chlorophenyl)-1H-imidazol-2-yl-methanamin (415mg, 2.0 mmol) und wasserfreiem Cobalt(II)-chlorid (260 mg, 2.0 mmol) in wasserfreiem Acetonitril wird unter Argon auf 60°C erhitzt und anschließend der Ansatz über 16 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird auf RT abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wird in einen Schütteltrichter überführt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Der dabei entstehende Niederschlag wird mit Hilfe einer Glasfritte abgetrennt. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis sich kein Niederschlag mehr bildet. Die organische Phase wird mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 ml Ethylacetat aufgenommen und das Rohprodukt mit 10 ml n-Hexan ausgefällt. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels SC über Kieselgel mit dem entsprechenden Elutionsmittel (FM).

AAV4: Darstellung der Phenoether

Zu einer Mischung aus 0.3 mmol des entsprechenden Phenols und 2.5 mmol K_2CO_3 in 40 ml trockenem DMF wird 1 mmol des jeweiligen Alkylhalogenids hinzugegeben. Der Ansatz wird für 3 h auf 80 °C gebracht. Nach Beendigung der Reaktion wird mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wird zuerst mit 0.1 N NaOH geschüttelt, danach mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das LM wird i. Vak. abgezogen, der Rückstand umkristallisiert.

8.5 Substanzen

3-Methyl-3-(4-nitrophenoxy)-1-butin



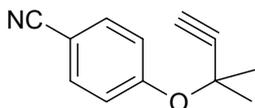
Darstellung: AAV1 mit p-Nitrophenol

Ausbeute: 7.0 g (68 % d. Th.) gelbliches Öl

Rf-Wert: 0.57 (FM 5)

Schmp...: < 30 °C Petrolether

3-Methyl-3-(4-cyanophenoxy)-1-butin



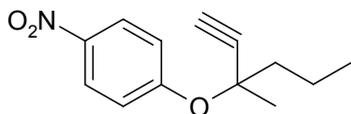
Darstellung: AAV1 mit 6.0g (50.4 mmol) 4-Cyanophenol

Ausbeute: 2.4 g (25 % d. Th) farbloses Öl

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d6, [ppm]:

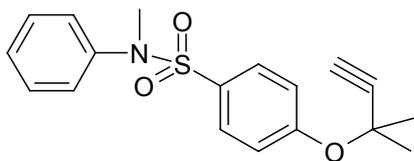
1.67	s	6H	2 x -CH ₃
3.85	s	1H	-C ≡ H
7.36	d	2H	H-1, H-6
8.22	d	2H	H-3, H-5

3-Methyl-3-(4-nitrophenoxy)-1-hexin



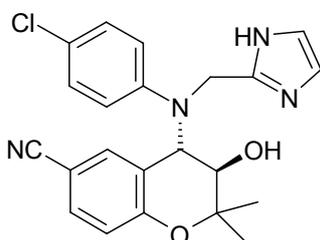
Darstellung: AAV1 mit Nitrophenol und 3-Methyl-1-hexin-3-ol

Rf-Wert: 0.5 (FM 3)

4-(1,1-Dimethyl-2-propinoxy)-N-methyl-N-phenyl-benzolsulfonamid

Darstellung: AAV1 mit 4-Hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid **45**

Rf-Wert: 0.43 (FM 3)

(3R)-trans-4-[(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethylamino)]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitril 9

Darstellung: AAV3 mit **26**

Ausbeute: 30 mg (15 % d. Th) fast weißes Pulver

Rf-Wert: 0.38 (FM 6)

Schmp.: 267 °C (Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3303 (m), 2974 (m); 2236 (m), 1596 (m), 1498 (s), 1282 (m), 1104 (m), 813 (w), 742 (w)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 390 (1) [M⁺ -18]; 256 (12); 160 (5); 127 (11); 111 (18); 82 (48); 53 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.35	s, (br)	3H	-CH ₃	
1.48	s	3H	-CH ₃	
3.81	„d“	1H	H-3	
4.31	m	2H	-CH ₂ -	(AB)
5.00	„d“	1H	H-4	
6.86	m	3H	aromatisch	

6.98	d	1H	H-8	$^3J = 8.6 \text{ Hz}$
7.14	m	3H	aromatisch	
7.31	s, (br)	1H	H-5	
7.63	dd	1H	H-7	$^3J = 8.6 \text{ Hz}$
8.36	s	1H	-OH	austauschbar
12.22	s, (br)	1H	-NH-	austauschbar

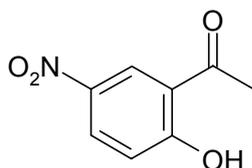
Elementaranalyse:

ber.: %C 64.62 gef.: %C 64.40

C₂₂H₂₁ClN₄O₂ (408.89)

%H 5.18 %H 5.43

%N 13.70 %N 13.35

2-Hydroxy-5-nitroacetophenon 13a

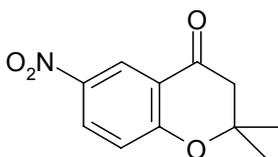
Darstellung: In eine Lösung von 8.17 g (60 mmol) 2-Hydroxyacetophenon in 70 ml Eisessig werden 4 ml rauchende Salpetersäure eingebracht. Die Lösung wird in einem Dreihalskolben mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) 40 min bei RT gerührt. Anschließend wird 16 h bei 45 – 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird vorsichtig i. Vak. abrotiert und der Rückstand auf Eis gegeben. Dabei entsteht ein gelber NS. Die wässrige Phase wird mit Na₂CO₃ auf pH 6 gebracht und der NS abfiltriert. Zur Aufreinigung bedient man sich der SC (FM 1) oder der Wasserdampfdestillation.

Ausbeute: 2.4 g (22 % d. Th) blass gelbe KristalleRf-Wert: 0.73 (FM 1)Schmp.: 99 °C (Ethanol) (Lit. 99.5)¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2.69	s	3H	-CH ₃	
7.18	d	1H	H-3	$^3J = 9.10 \text{ Hz}$
8.34	dd	1H	H-4	$^3J = 9.10 \text{ Hz}, ^4J = 3.21 \text{ Hz}$
8.56	d	1H	H-6	$^4J = 3.21 \text{ Hz}$
12.45	s, (br)	1H	-OH	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	53.04	gef.: %C	53.12
C ₈ H ₇ NO ₄ (181.2)	%H	3.90	%H	4.08
	%N	7.73	%N	7.52

3,4-Dihydro-2,2-dimethyl-6-nitro-2H-benzopyran-4-on 14a



Darstellung: 1g (5.5 mmol) 2-Hydroxyacetophenon wird mit 500 mg Aceton und 0.1 ml Pyrrolidin unter Rückfluss in 20 ml absolutem Toluol 2 h gekocht. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abrotiert und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die Etherphase wird mit 0.1 M HCl mehrfach ausgeschüttelt und danach mit Wasser neutral gewaschen. Die org. Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet. Aufreinigung erfolgt mittels SC (FM 1).

Ausbeute: 453 mg (37 % d Th.) gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.53 (FM 1)

Schmp.: > 300 °C (Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3388 (m), 2977 (s), 1706 (vs), 1614 (vs), 1581 (vs), 1514 (vs), 1473 (vs), 1337 (vs), 1291 (vs), 1210 (s), 1121 (vs), 925 (s), 902 (m),

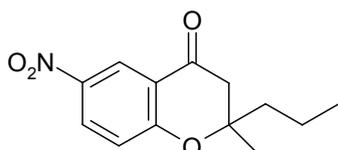
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 221 (22), 206 (100), 166 (48), 149 (15), 120 (19), 107 (6), 91 (10), 63 (8), 55 (10)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CD₂Cl₂, [ppm]:

1.49	s	6H	2 x -CH ₃	
2.80	s	2H	H-3	
7.07	d	1H	H-8	³ J = 9.10 Hz
8.31	dd	1H	H-7	³ J = 9.10 Hz, ⁴ J = 2.68 Hz
8.68	d	1H	H-5	⁴ J = 2.68 Hz

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	59.73	gef.: %C	59.68
$C_{11}H_{11}NO_4$ (221.21)	%H	5.01	%H	4.88
	%N	6.33	%N	6.25

3,4-Dihydro-2-methyl-6-nitro-2-propyl-2H-benzopyran-4-on 14b



Darstellung: 1g (5.5 mmol) 2-Hydroxyacetophenon wird mit 500 mg 2-Pentanon und 0.1 ml Pyrrolidin unter Rückfluss in 20 ml absolutem Toluol 2 h gekocht. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abrotiert und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die Etherphase wird mit 0.1 M HCl mehrfach ausgeschüttelt und danach mit Wasser neutral gewaschen. Die org. Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet. Aufreinigung erfolgt mittels SC (FM 1)

Ausbeute: 337 mg (26 % d. Th.) gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.40 (FM2)

Schmp.: 62°C n-Hexan

IR-Spektrum, KBr, $[cm^{-1}]$: 3080 (s), 2974 (s), 2958 (s), 2938 (s), 2875 (m), 1689 (vs), 1611 (vs), 1584 (vs), 1522 (vs), 1474 (vs), 1439 (vs), 1386 (s), 1340 (vs), 1289 (vs), 1266 (vs), 908 (s), 845 (s), 750 (s)

Massenspektrum, EI 70 mV, $[m/z]$ (%): 249 (18) $[M^{+}]$; 234 (12); 206 (93); 166 (100); 160 (17); 120 (40); 92 (13); 69 (21); 55 (34)

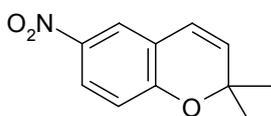
1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, $CDCl_3$, [ppm]:

0.95	t	3H	$-CH_2-CH_2-CH_3$
1.45	s	3H	$-CH_3$
1.49	m	2H	$-CH_2-CH_2-CH_3$
1.74	m	2H	$-CH_2-CH_2-CH_3$
2.72	d	1H	H-3 J = 16.60 Hz
2.86	d	1H	H-4 J = 16.60 Hz

7.05	d	1H	H-8	$^3J = 9.10 \text{ Hz}$
8.32	dd	1H	H-7	$^3J = 9.10 \text{ Hz}, ^4J = 2.94 \text{ Hz}$
8.75	d	1H	H-5	$^4J = 2.94 \text{ Hz}$

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	62.64	gef.: %C	62.74
C ₁₃ H ₁₅ NO ₄ (249.26)	%H	6.07	%H	6.03
	%N	5.62	%N	5.48

2,2-Dimethyl-6-nitro-2H-1-benzopyran 20



Darstellung: 2, 0 g (ca. 20 mmol) 3-Methyl-3-(4-nitrophenoxy)-1-butin werden 10 ml o-Dichlorbenzol gelöst und 12 h unter Rückflusskühlung gekocht. Nach Abbruch der Reaktion wird das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen und mittels SC aufgereinigt (FM 2).

Ausbeute: 1.5 g (75% d. Th.) gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.57 (FM 5)

Schmp.: 63°C (Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3419 (m), 3109 (m), 3049 (m), 2977 (s), 2936 (m), 1646 (m), 1611 (s), 1578 (s), 1513 (vs), 1481 (s), 1362 (s), 1342 (vs), 1327 (vs), 1284 (vs), 1126 (s), 1115 (vs), 1086 (s), 1014 (w), 963 (s), 939 (m), 898 (s), 819 (m), 774 (m), 746 (s), 703 (m), 617 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 205 [M+•] (11), 191 (16), 190 (100), 144 (91), 115 (32), 91 (16), 63 (40), 51 (97)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

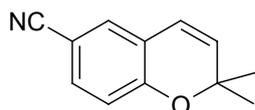
1.44	s	6H	2 x (2 -CH ₃)	
5.95	d	1H	H-3	$^3J = 9.64$
6.59	d	1H	H-4	$^3J = 9.64$
6.92	d	1H	H-8	$^3J = 8.57$
7.98	dd	1H	H-7	$^3J = 8.57; ^4J = 3.21$

8.04 m 1H H-5 $^4J = 3.21$

Elementaranalyse:

	ber.:	%C 64,38	gef.:	%C 64,22
$C_{11}H_{11}NO_3$ (205.21)		%H 5,40		%H 5,38
		%N 6,83		%N 6,77

2,2-Dimethyl-2H-benzopyran-6-carbonitril 21

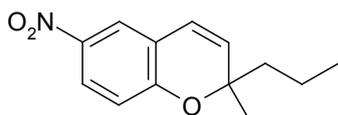


Darstellung: 2.4 g (13 mmol) 3-Methyl-3-(4-cyanophenoxy)-1-butin werden in 25 ml N,N-Diethylanilin gelöst und unter Stickstoff 12 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wird i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mehrfach mit 1 N HCl gewaschen. Die org. Phase wird neutral gewaschen und getrocknet. Nach Entfernung des LM wird in Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 1.3 g (58 % d. Th.) gelbliche Kristalle

Schmp.: 47 °C

2-Methyl-6-nitro-2-propyl-2H-1-benzopyran 22



Darstellung: 0.6 g (2.6 mmol) 3-Methyl-3-(4-nitrophenoxy)-1-butin werden in 25 ml N,N-Diethylanilin gelöst und unter Stickstoff 12 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wird i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mehrfach mit 1 N HCl gewaschen. Die org. Phase wird neutral gewaschen und getrocknet. Nach Entfernung des LM wird in Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert

Ausbeute: 489 mg (81 % d. Th.) gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.5 (FM 3)

Sdp._{.7mbar}: 165 °C

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3075 (s), 2983 (m), 1653 (w), 1592 (m), 1590 (s), 1345 (vs), 1279 (s), 1263 (s), 1230 (s), 1210 (s), 1158 (s), 1130 (m), 1086 (s), 1040 (m), 953 (s), 743 (s), 611 (s)

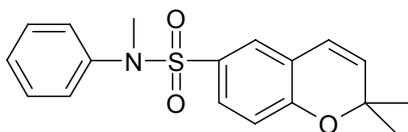
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 233 (16) [M⁺], 218 (30), 190 (100), 172 (25), 144 (94), 128 (17), 115 (53), 77 (19)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

0.86	t	3H	-CH ₂ -CH ₃	
1.33	m	2H	-CH ₂ -CH ₃	
1.39	s	3H	-CH ₃	
1.68	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	
5.89	d	1H	H-3	³ J = 9.63 Hz
6.63	d	1H	H-4	³ J = 9.63 Hz
6.90	d	1H	H-8	
7.98	dd	1H	H-7	
8.03	d	1H	H-5	

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	66.94	gef.: %C	67.13
C ₁₃ H ₁₅ NO ₃ (233.26)	%H	6.48	%H	6.55
	%N	6.00	%N	5.89

2,2-Dimethyl-N-methyl-N-phenyl-2H-benzopyran-6-sulfonamid 23



Darstellung: 340 mg (1.03 mmol) 4-(1,1-Dimethyl-2-propinoxy)-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid werden in 5 ml N,N-Diethylanilin gelöst und unter Stickstoff 12 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wird i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mehrfach mit 1 N HCl gewaschen. Die org. Phase wird neutral gewaschen und getrocknet. Nach Entfernung des LM wird in Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 212 mg (62 % d. Th) gelbliches Pulver
Rf-Wert: 0.34 (FM 3)
Schmp.: 112 °C (Ethylacetat/Petrolether)

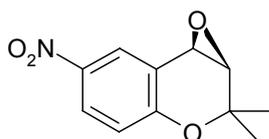
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 329 (9) [M⁺], 314 (100), 158 (16), 144 (71), 115 (11), 77 (15), 51 (6)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.41	s	6H	2x(-CH ₃)	
3.12	s	3H	N-CH ₃	
5.86	d	1H	H-3	³ J = 9.36 Hz
6.46	d	1H	H-4	³ J = 9.36 Hz
6.84	d	1H	H-8	
7.09 – 7.18	m	3H	H-7; H-2',6'	
7.27 – 7.40	m	4H	H-5; H-3', 4', 5'	

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	65.63	gef.: %C	65.28
C ₁₈ H ₁₉ NO ₃ S (329.42)	%H	5.81	%H	5.72
	%N	4.25	%N	4.34

(3R,4R)-3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-6-nitro-2H-1-benzopyran 24



Darstellung: AAV2 mit 20 u. 30

Ausbeute: 447 mg (81 % d. Th.) weiße Nadeln

Rf-Wert: 0.56 (FM 1)

Schmp.: 81 °C (Lit. 81 – 83 °C) (Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3452 (m), 2983 (m), 1618 (s), 1590 (s), 1590 (s), 1527(vs), 1346 (vs), 1278 (s), 1256 (m), 1209 (s), 1157 (s), 952 (s), 901 (s), 873 (s), 743 (s), 688 (s)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 221 (24) [M⁺], 206(16), 193 (16), 166 (100), 146 (10), 132 (26), 107 (12), 77 (19), 55 (45)

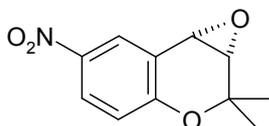
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.33	s	3H	2 -CH ₃	
1.62	s	3H	2 -CH ₃	
3.55	d	1H	H-3	³ J= 4.82
3.98	d	1H	H-4	³ J= 4.82
6.87	d	1H	H-8	³ J= 9.10
8.14	dd	1H	H-7	³ J= 9.10, ⁵ J= 2.68
8.29	d	1H	H-5	⁵ J= 2.68

Elementaranalyse:

C ₁₁ H ₁₁ NO ₄ (221.21)	ber.:	%C 59.73	gef.:	%C 59.63
		%H 5.01		%H 5.03
		%N 6.33		%N..6.13

(3S,4S)-3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-6-nitro-2H-1-benzopyran 25



Darstellung: AAV2 mit **20** u. **31**

Ausbeute: 478 mg (86 % d. Th.) weiße Nadeln

Rf-Wert: 0.56 (FM 1)

Schmp.: 81°C (Lit. 81 – 83°C)¹ (Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3452 (m), 2983 (m), 1618 (s), 1590 (s), 1590 (s), 1527(vs), 1346 (vs), 1278 (s), 1256 (m), 1209 (s), 1157 (s), 952 (s), 901 (s), 873 (s), 743 (s), 688 (s)

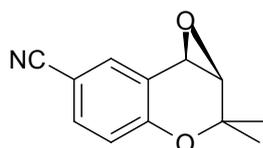
¹Sun H. et al.; Bull. Soc. Chim. Belg; 1997, 106, 47 - 49

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 221 (24) [M⁺], 206(16), 193 (16), 166 (100), 146 (10), 132 (26), 107 (12), 77 (19), 55 (45)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.33	s	3H	2 -CH ₃	
1.62	s	3H	2 -CH ₃	
3.55	d	1H	H-3	³ J= 4.82
3.98	d	1H	H-4	³ J= 4.82
6.87	d	1H	H-8	³ J= 9.10
8.14	dd	1H	H-7	³ J= 9.10, ⁵ J= 2.68
8.29	d	1H	H-5	⁵ J= 2.68

(3R,4R)-6-Cyano-3,4-epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran 26



Darstellung: AAV2, mit 21, 30

Ausbeute: (77 % d. Th.) weiße Nadeln

Rf-Wert: 0.45 (FM 1)

Schmp.: 143 °C (Lit. 144°C)¹ (Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 2980 (m), 2226 (s), 1616 (m), 1580 (m), 1491 (vs), 1347 (w), 1280 (vs), 1210 (m), 1158 (s), 1046 (m), 957 (m), 912 (s), 868 (s), 725 (m), 634 (m), 524 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 201 (15) [M⁺]; 173 (32); 159 (72); 132 (34); 117 (18); 104 (22); 76 (43); 63 (43); 50 (100)

¹ Sun H et al.; Bull. Soc. Chim. Belg; 1997, 106, 47 - 49

$^1\text{H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl}_3$, [ppm]:

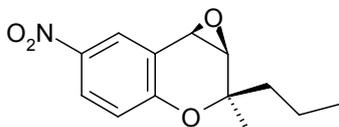
1.30	s	3H	2-CH ₃	
1.61	s	3H	2-CH ₃	
3.51	d	1H	H-3	$^3\text{J} = 4.4 \text{ Hz}$
3.91	d	1H	H-4	$^3\text{J} = 4.4 \text{ Hz}$
6.85	d	1H	H-8	$^3\text{J} = 8.3 \text{ Hz}$
7.52	dd	1H	H-7	$^3\text{J} = 8.3 \text{ Hz}, ^4\text{J} = 2.2 \text{ Hz}$
7.65	d	1H	H-5	$^4\text{J} = 2.2 \text{ Hz}$

Elementaranalyse:

	ber.: %C	71.63	gef.: %C	71.50
C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ (201.23)	%H	5.51	%H	5.65
	%N	6.96	%N	6.99

(3S,4S)-6-Cyano-3,4-epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran 27 s. S. 197

(2R,3R,4R)-3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2-methyl-6-nitro-2-propyl-2H-1-benzopyran 28



Darstellung: AAV2 mit 300mg Benzopyran 22 und 30

Ausbeute: 120 mg (38 % d. Th) blass gelbe Kristalle; in der Mutterlauge reichert sich 28a (2S,3R,4R) an

Rf-Wert: 0.32 (FM 3)

Schmp.: 77.4 °C (PE 60/80)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 249 (29) [M⁺]; 220 (30); 206 (25); 190 (63); 166 (100); 144 (22); 132 (21); 55 (77); 43 (55)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.06	t	3H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.27	s	3H	-CH ₃
1.65	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.93	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3.59	d	1H	H-3
3.94	d	1H	H-4
6.88	d	1H	H-8
8.13	dd	1H	H-7
8.30	d	1H	H-5

Elementaranalyse:

	ber.: %C	62.64	gef.: %C	62.81
C ₁₃ H ₁₅ NO ₄ (249.27)	%H	6.07	%H	6.31
	%N	5.67	%N	5.61

Daten der Röntgenstrukturanalyse

Empirische Formel	$C_{13}H_{15}NO_4$
M_r	249.26
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterkonstanten	
a [Å]	7.2200(14)
b [Å]	10.920(2)
c [Å]	17.050(3)
V, Z, D_x	1344.3(5) Å ³ , 4, 1.232 g/cm ³
Intensitätsdatensammlung	
Messtemperatur	k. A.
λ (Mo-K α)	0.71073 Å
μ	0.092 mm ⁻¹
θ -Bereich	3.38 – 25.90°
h, k, l -Bereich	-8 → 8, -13 → 13, -20 → 20
Gem. Reflexe	13163
Unabh. Reflexe	2591 [$R_{int} = 0.0469$]
Beob. Reflexe	1751 ($F_o^2 > 2 \sigma(F_o^2)$)
Korrekturen	Lp
Verfeinerung	
Verfahren	kleinste Fehlerquadratsumme nach F^2 , volle Matrix
Daten / Parameter	2591 / 195
Anpassungsgüte	$S = 1.041^a$
R -Werte	$R1 = 0.0347,$

$[F_o^2 > 2 \sigma(F_o^2)]$	$wR2 = 0.0924^a$
$\Delta\rho_{\max}/\Delta\rho_{\min}$	0.099 / -0.093 eÅ ⁻³
$(\Delta\sigma)_{\max}$	0.000

^a $S = [\Sigma(w(F_o^2 - F_c^2)^2)/(N_{hkl} - N_{Parameter})]^{1/2}$; $R1 = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$;
 $wR2 = [\Sigma(w(F_o^2 - F_c^2)^2) / \Sigma w (F_c^2)^2]^{1/2}$ mit $w = 1 / [\sigma^2 (F_o^2) + (0.0500 ((F_o^2 + 2F_c^2)/3))^2]$.

Ausgewählte intramolekulare Abstände [Å] und Winkel [°]

O1-C2	1.475(2)	C8A-O1-C2	119.22(12)
O1-C8A	1.3691(19)	C3-O2-C4	60.51(14)
O2-C3	1.433(3)	O1-C2-C3	110.79(15)
O2-C4	1.469(2)	O1-C2-CM	107.74(16)
C2-C3	1.516(3)	C3-C2-CM	108.34(17)
C2-CM	1.530(3)	O1-C2-CP1	104.71(15)
C2-CP1	1.536(3)	C3-C2-CP1	111.42(17)
C3-C4	1.462(3)	CM-C2-CP1	113.75(18)
C4-C4A	1.489(2)	O2-C3-C4	60.95(14)
C4A-C5	1.393(2)	O2-C3-C2	117.98(17)
C4A-C8A	1.407(2)	C4-C3-C2	120.22(17)
C5-C6	1.393(2)	C3-C4-O2	58.53(13)
C6-C7	1.395(2)	C3-C4-C4A	117.16(16)
C7-C8	1.387(3)	O2-C4-C4A	114.80(15)
C8-C8A	1.403(2)	C5-C4A-C8A	118.82(15)
N1-O3	1.230(2)	C5-C4A-C4	122.50(14)
N1-O4	1.229(3)	C8A-C4A-C4	118.67(14)
N1-C6	1.472(2)	C4A-C5-C6	119.56(14)
CP1-CP2	1.521(4)	C7-C6-C5	121.98(14)
CP2-CP3	1.521(3)	C7-C6-N1	119.10(16)
		C5-C6-N1	118.92(15)
		C8-C7-C6	118.75(16)
		C7-C8-C8A	119.95(16)
		O1-C8A-C8	117.09(14)

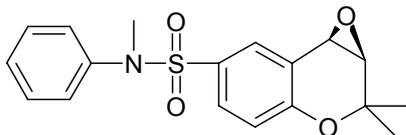
		O1-C8A-C4A	121.89(14)
		C8-C8A-C4A	120.94(14)
		O4-N1-O3	122.60(16)
		O4-N1-C6	118.55(18)
		O3-N1-C6	118.80(18)
		CP2-CP1-C2	116.09(19)
		CP1-CP2-CP3	113.8(3)
C3-H3	0.9800	CM-HM1/2/3	0.9600
C4-H4	0.9800	CP1-HP11/12	0.9700
C5-H5	0.9300	CP2-HP21/22	0.9700
C7-H7	0.9300	CP3-HP31/32/33	0.9600
C8-H8	0.9300		
		C2-CM-HM1/2/3	109.5
O2-C3-H3	118.8	HM1/2/3-CM-HM1/2/3	109.5
C4-C3-H3	120.1	C2-CP1-HP11	108.0
C2-C3-H3	110.8	C2-CP1-HP12	104.9
C3-C4-H4	120.2	CP2-CP1-HP11	108.3
O2-C4-H4	113.3	CP2-CP1-HP12	111.7
C4A-C4-H4	118.1	HP11-CP1-HP12	107.4
C4A-C5-H5	120.4	CP1-CP2-HP21	109.1
C6-C5-H5	120.0	CP1-CP2-HP22	109.9
C8-C7-H7	120.4	CP3-CP2-HP21	110.1
C6-C7-H7	120.9	CP3-CP2-HP22	106.0
C7-C8-H8	120.2	HP21-CP2-HP22	107.7
C8A-C8-H8	119.7	CP2-CP3-HP31/32/33	109.5
		HP31/2/3-CP3-HP31/2/3	109.5

Ausgewählte Torsionswinkel [°]

C8A-O1-C2-C3	41.2(2)	C4A-C5-C6-C7	-0.2(3)
C8A-O1-C2-CM	-77.17(19)	C4A-C5-C6-N1	179.97(17)
C8A-O1-C2-CP1	161.42(15)	C5-C6-C7-C8	0.2(3)
C4-O2-C3-C2	-110.91(19)	N1-C6-C7-C8	179.97(17)
O1-C2-C3-O2	43.3(2)	C6-C7-C8-C8A	-0.3(3)

CM-C2-C3-O2	161.27(17)	C2-O1-C8A-C8	153.08(15)
CP1-C2-C3-O2	-72.9(2)	C2-O1-C8A-C4A	-30.1(2)
O1-C2-C3-C4	-27.6(3)	C7-C8-C8A-O1	177.44(15)
CM-C2-C3-C4	90.3(2)	C7-C8-C8A-C4A	0.5(2)
CP1-C2-C3-C4	-143.8(2)	C5-C4A-C8A-O1	-177.35(16)
C2-C3-C4-O2	107.3(2)	C4-C4A-C8A-O1	2.1(2)
O2-C3-C4-C4A	-103.82(19)	C5-C4A-C8A-C8	-0.6(2)
C2-C3-C4-C4A	3.5(3)	C4-C4A-C8A-C8	178.82(18)
C3-O2-C4-C4A	107.86(19)	O4-N1-C6-C7	-2.2(3)
C3-C4-C4A-C5	-169.9(2)	O3-N1-C6-C7	175.2(2)
O2-C4-C4A-C5	124.30(19)	O4-N1-C6-C5	177.6(2)
C3-C4-C4A-C8A	10.7(3)	O3-N1-C6-C5	-5.0(3)
O2-C4-C4A-C8A	-55.1(2)	O1-C2-CP1-CP2	55.5(3)
C8A-C4A-C5-C6	0.4(3)	C3-C2-CP1-CP2	175.3(2)
C4-C4A-C5-C6	-178.96(18)	CM-C2-CP1-CP2	-61.9(3)
		C2-CP1-CP2-CP3	179.8(2)

(3R,4R)-3,4-Epoxy-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-N-methyl-N-phenyl-2H-1-benzopyran-6-sulfonamid 29



Darstellung: AAV2 mit Benzopyran 23 u. 30

Schmp.: 152 °C (Ethylacetat/Petrolether)

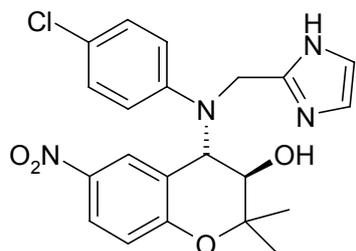
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 435 (18) [M⁺], 314 (19), 281 (62), 239 (49), 175 (32), 144 (23), 106 (100), 77 (63)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.23	s	3H	2-CH ₃
1.49	s	3H	2-CH ₃
3.14	s	3H	N-CH ₃
3.76	d	1H	H-3 ³ J = 4.28 Hz
4.19	d	1H	H-4 ³ J = 4.28 Hz
6.89	d	1H	H-8 ³ J = 8.57 Hz
7.11	dd	1H	H-7 ³ J = 8.57 Hz; ⁴ J = 2.14 Hz
7.32	m	5H	H-2',3',4',5',6'
7.75	d	1H	H-5 ⁴ J = 2.14 Hz

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	62.59	gef.: %C	63.01
C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ S (345.42)	%H	5.54	%H	5.72
	%N	4.05	%N	3.77

(3R)-trans-4-[N-(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-nitro-2H-1-benzopyran 32



Darstellung: AAV3 mit **24**

Ausbeute: 214 mg (25 % d. Th.) gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.32 (FM6)

Schmp.: 252°C (Ethylacetat/Toluol)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]:

3347 (m), 3186 (m), 3092 (m), 2977 (m), 1583 (s), 1498 (s), 1384 (s), 1361 (s), 1274 (s), 1126 (m), 749 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 428 (7) [M⁺]; 410 (20); 347 (40); 315 (26); 277 (58); 206 (35); 127 (45); 81 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

22°C

1.37	s	3H	2-CH ₃	ax	(br)
1.52	s	3H	2-CH ₃	eq	
3.84	„s“	1H	H-3		
4.36	„m“	2H	-CH ₂ -	(AB)	br
5.02	„d“	1H	H-4		
6.87	m	3H	aromatisch		
7.03	d	1H	H-8	³ J = 8.6 Hz	
7.16-7.20	m	3H	aromatisch		
7.74	s	1H	H-5	(br)	
8.07	dd	1H	H-7	³ J = 8.6 Hz	
8.43	s	1H	-OH	austauschbar	
12.20	s	1H	NH	austauschbar	

37°C

1.37	s	3H	2-CH3	ax
1.52	s	3H	2-CH3	eq
3.93	„s“	1H	H-3	
4.45	„m“	2H	-CH2-	(AB) br
5.05	d	1H	H-4	
6.87	„m“	3H	aromatisch	
7.01	d	1H	H-8	$^3J = 9.1 \text{ Hz}$
7.17	m	4H	aromatisch	
7.80	„s“	1H	H-5	
8.07	dd	1H	H-7	$^3J = 9.1 \text{ Hz}, ^4J = 2.7$
8.32	s	1H	-OH	austauschbar (br)
12.16	s	1H	NH	austauschbar (br)

50°C

1.37	s	3H	2-CH3	ax
1.52	s	3H	2-CH3	eq
3.92	d	1H	H-3	
4.45	m	2H	-CH2-	(AB)
5.05	d	1H	H-4	
6.82	„d“	3H	aromatisch	
7.03	d	1H	H-8	$^3J = 9.1 \text{ Hz}$
7.10	m	4H	aromatisch	
7.81	d	1H	H-5	$^4J = 2.6$
8.05	dd	1H	H-7	$^3J = 9.1 \text{ Hz}, ^4J = 2.6$
8.21	s	1H	-OH	austauschbar (br)
12.08	s	1H	NH	austauschbar (br)

60°C

1.37	s	3H	2-CH3	ax
1.52	s	3H	2-CH3	eq
3.93	d	1H	H-3	
4.45	„m“	2H	-CH2-	(AB)
5.05	d	1H	H-4	
6.79	„d“	3H	aromatisch	
6.99	d	1H	H-8	$^3J = 9.0 \text{ Hz}$

7.10	m	4H	aromatisch	
7.81	d	1H	H-5	$^4J = 2.6$
8.03	dd	1H	H-7	$^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.6$
8.13	s	1H	-OH	austauschbar (br)
12.03	s	1H	NH	austauschbar (br)

80°C

1.37	s	3H	2-CH3	ax
1.52	s	3H	2-CH3	eq
3.93	d	1H	H-3	
4.45	„m“	2H	-CH2-	(AB)
5.05	d	1H	H-4	
6.79	„d“	3H	aromatisch	
6.99	d	1H	H-8	$^3J = 9.1$ Hz
7.10	m	4H	aromatisch	
7.81	d	1H	H-5	$^4J = 2.6$
8.03	dd	1H	H-7	$^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.6$
8.0	s	1H	-OH	austauschbar (br)
12.0	s	1H	NH	austauschbar (br)

Elementaranalyse:

ber.: %C 58.81

gef.: %C 58.64

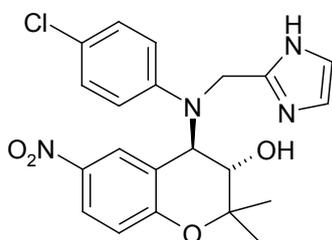
C₂₁H₂₁ClN₄O₄ (428.88)

%H 4.94

%H 5.07

%N 13.00

%N 12.72

(3S)-trans-4-[(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethylamino)]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-nitro-2H-1-benzopyran 33Darstellung: AAV3 mit **25**Ausbeute: 274 mg (32 % de. Th.) gelbe KristalleRf-Wert: 0.32 (FM6)

Schmp.: 255°C (Ethylacetat/Toluol)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]:

3347 (m), 3186 (m), 3090 (m), 2977 (m), 1583 (s), 1498 (s), 1384 (s), 1361 (s), 1274 (s), 1126 (m), 749 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 428 (1) [M⁺]; 410 (4); 347 (13); 315 (11); 276 (100); 126 (47); 82 (70)

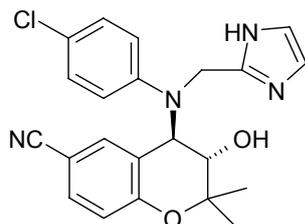
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.37	s	3H	2-CH ₃	(br)
1.50	s	3H	2-CH ₃	
3.87	„s“	1H	H-3	
4.33	„m“	2H	-CH ₂ -	(AB)
5.07	„d“	1H	H-4	
6.86	m	3H	aromatisch	
7.15-7.19	m	3H	aromatisch	
7.05	d	1H	H-8	³ J = 8.6 Hz
7.74	s	1H	H-5	(br)
8.08	dd	1H	H-7	³ J = 8.6 Hz
8.43	s	1H	-OH	austauschbar
12.20	s	1H	NH	austauschbar

Elementaranalyse:

	ber.:	%C 58.81	gef.:	%C 58.70
C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₄ (428.88)		%H 4.94		%H 5.12
		%N 13.00		%N 13.07

(3S)-trans-4-[N-(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitril 34



Darstellung: AAV3 mit **27**

<u>Ausbeute:</u>	49 mg (24 % d. Th.)	fast farblose Kristalle
<u>Rf-Wert:</u>	0.38	(FM 6)
<u>Schmp.:</u>	269 °C	(Ethylacetat/Toluol)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3303 (s), 2974 (w), 2238 (w), 1597 (m), 1498 (s), 1280 (m), 1104 (m), 808 (w), 741 (w)

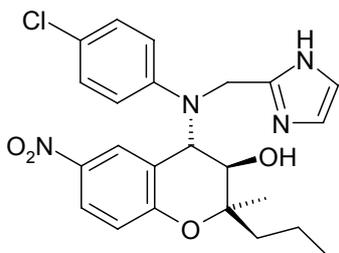
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 390 (1) [M⁺ -18]; 256 (12); 160 (5); 127 (11); 111 (18); 82 (48); 53 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.35	s, (br)	3H	-CH ₃	
1.48	s	3H	-CH ₃	
3.81	„d“	1H	H-3	
4.31	m	2H	-CH ₂ -	(AB)
5.00	„d“	1H	H-4	
6.86	m	3H	aromatisch	
6.98	d	1H	H-8	³ J = 8.6 Hz
7.14	m	3H	aromatisch	
7.32	s, (br)	1H	H-5	
7.63	dd	1H	H-7	³ J = 8.6 Hz
8.34	„d“	1H	-OH	austauschbar
12.22	s, (br)	1H	-NH-	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C 64.62	gef.: %C 64.44
C ₂₂ H ₂₁ ClN ₄ O ₂ (Mr. 408.89)	%H 5.18	%H 5.19
	%N 13.70	%N 13.30

(3R)-trans-4-[N-(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-6-nitro-2(R)-propyl-2H-1-benzopyran 35



Darstellung: AAV3 mit 28

Ausbeute: 55 mg (15% d. Th.) orangefarbenes Pulver

Rf-Wert: 0.42 (FM 6)

Schmp.: 275°C Ethylacetat/Toluol

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3372 (m), 3095 (w), 2960 (m), 1560 (m), 1582 (m), 1506 (m), 1499 (m), 1276 (m), 1253 (w), 1072 (w), 750 (w)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 456 (1) [M⁺]; 439 (1); 375 (16); 277 (49); 206 (8); 127 (17); 82 (100); 43 (30)

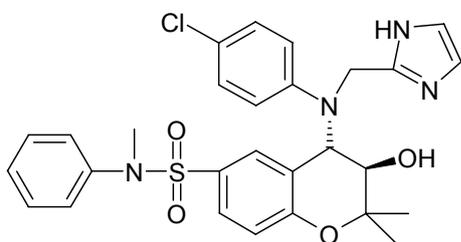
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

0.89	t	3H	-CH ₂ -CH ₃
1.47	„s“	5H	-CH ₂ -CH ₃ ; -CH ₃
1.74	m	2H	-CH ₂ -CH ₃
3.90	“s”, br	1H	H-3
4.32	m	2H	-N-CH ₂ - (AB)
5.12	„d“	1H	H-4
6.86	m	3H	aromatisch
7.03	d	1H	H-8 ³ J = 9.1 Hz
7.05-7.15	m	3H	aromatisch

7.76	s, br	1H	H-5
8.08	dd	1H	H-7 $^3J = 9.1 \text{ Hz}$
8.33	"d"	1H	-OH austauschbar
12.20	s, br	1H	-NH- austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C 60.46	gef.: %C 60.31
C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₄ (456.93)	%H 5.51	%H 5.50
	%N 12.26	%N 12.35

(3R)-trans-4-[N-(4-Chlorphenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]]-3,4-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-(N-methylphenylaminosulfonyl)-2H-1-benzopyran 36



Darstellung: AAV3 mit 29

<u>Ausbeute:</u>	50 mg (16 % d. Th.)	gelbes Pulver
<u>Rf-Wert:</u>	0.32	(FM 6)
<u>Schmp.:</u>	115 – 117 °C	(Ethylacetat/Petrolether 60/80)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3393 (w), 1598 (w), 1495 (m), 1349 (w), 1275 (w), 1121 (w), 696 (w)

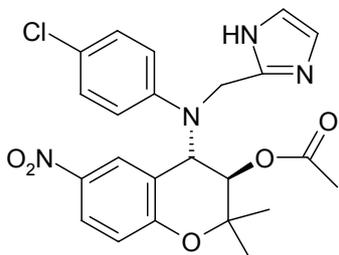
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 472 (4) [M⁺-81], 401 (5); 336 (6); 230 (5); 127 (10); 107 (65), 77 (56); 53 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.36	s, br	3H	-CH ₃
1.51	s	3H	-CH ₃
3.12	s	3H	-N-CH ₃
3.80	„s“	1H	H-3
4.29	„m“	2H	-CH ₂ - (AB)
4.98	„d“	1H	H-4
6.87	m	4H	H-8, aromatisch
7.13-7.31	m	10H	H-5; H-2“, 3“, 4“, 5“, 6“; aromatisch
8.29	s	1H	-OH austauschbar
12.20	s, br	1H	-NH- austauschbar

Elementaranalyse:

	ber.: %C 60.81	gef.: %C 61.15
C ₂₈ H ₂₉ ClN ₄ O ₄ S (553.08)	%H 5.29	%H 5.68
	%N 10.13	%N 9.88

(3R)-trans-3-Acetoxy-4-[(4-chlorphenyl)-2,2-dimethyl-N-(1H-imidazol-2-ylmethylamino)]-3,4-dihydro-6-nitro-2H-1-benzopyran 37

Darstellung: 50 mg (116 µM) 32 werden mit 1 Tropfen Triethylamin in 5 ml Dichlormethan gelöst. 9.16 mg Acetylchlorid werden in 2 ml Dichlormethan gelöst und langsam zum Ansatz gegeben. Es wird 30 min bei RT gerührt und anschließend der Ansatz auf Eis gegeben und mit Dichlormethan verdünnt. Die org. Phase wird mehrfach mit einer weinsauereren wässrigen Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde getrocknet. Das LM wird entfernt und der Rückstand umkristallisiert.

Ausbeute: 24 mg (44 % d. Th.) blass gelbes Pulver

Schmp.: 136 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3437 (m), 2979 (m), 2341 (w), 1742 (s), 1616 (s), 1582 (m), 1515 (s), 1498 (m), 1399 (m), 1341 (s), 1140 (m), 813 (w), 759 (w)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 470 (1) [M+•], 355 (2), 310 (19), 276 (66), 208 (43), 178 (19), 127 (45), 82 (100), 52 (43)

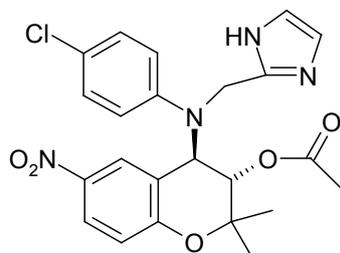
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.35	s	3H	-CH ₃	
1.53	s	3H	-CH ₃	
2.62	s	3H	-O-CO-CH ₃	
3.53	„d“	1H	H-3	
4.20	m	2H	-CH ₂ -	
5.05	d	1H	H-4	
6.91	m	3H	aromatisch	
6.96	d	1H	H-8	³ J = 9.10 Hz
7.12	m	3H	aromatisch	
7.99	s, (br)	1H	H-5	
8.09	dd	1H	H-7	³ J = 9.10 Hz
11.98	s, (br),	1H	NH	austauschbar

Elementaranalyse:

	ber.: %C	58.66	gef.: %C	58.79
C ₂₃ H ₂₃ ClN ₄ O ₅ (470.92)	%H	4.92	%H	5.33
	%N	11.90	%N	11.72

(3S)-trans-3-Acetoxy-4-[(4-chlorphenyl)-2,2-dimethyl-N-(1H-imidazol-2-ylmethylamino)]-3,4-dihydro-6-nitro-2H-1-benzopyran 38



Darstellung: 50 mg (116 µM) **33** werden mit 1 Tropfen Triethylamin in 5 ml Dichlormethan gelöst. 9.16 mg Acetylchlorid werden in 2 ml Dichlormethan gelöst und

langsam zum Ansatz gegeben. Es wird 30 min bei RT gerührt und anschließend der Ansatz auf Eis gegeben und mit Dichlormethan verdünnt. Die org. Phase wird mehrfach mit einer weinsauren wässrigen Lösung gewaschen. Die org. Phase wird getrocknet. Das LM wird entfernt und der Rückstand umkristallisiert.

Ausbeute: 33 mg (60 % d. Th.) blass gelbes Pulver

Schmp.: 139 °C (Ethylacetat/Petrolether)

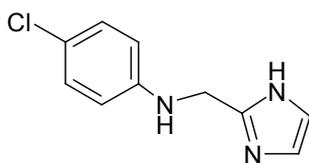
IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3437 (m), 2979 (w), 2343 (w), 1742 (m), 1616 (m), 1583 (m), 1515 (s), 1498 (m), 1400 (m), 1341 (s), 1140 (m), 813 (w), 759 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 470 (1) [M⁺], 455 (2), 310 (10), 276 (43), 208 (64), 178 (32), 126 (43), 82 (100), 52 (21)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.35	s	3H	-CH ₃
1.53	s	3H	-CH ₃
2.62	s	3H	-O-CO-CH ₃
3.53	„d“	1H	H-3
4.20	m	2H	-CH ₂ -
5.05	d	1H	H-4
6.91	m	3H	aromatisch
6.96	d	1H	H-8 ³ J = 9.10 Hz
7.12	m	3H	aromatisch
7.99	s, (br)	1H	H-5
8.09	dd	1H	H-7 ³ J = 9.10 Hz
11.98	s, (br),	1H	NH austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	58.66	gef.: %C	58.53
C ₂₃ H ₂₃ ClN ₄ O ₅ (470.92)	%H	4.92	%H	5.23
	%N	11.90	%N	11.43

N-(4-Chlorophenyl)-1H-imidazol-2-yl-methanamin 39

Darstellung: 4-Chloranilin (6,7g, 52,5 mmol) und 2-Imidazolcarboxaldehyd (5,0 g, 45,0 mmol) werden in 100 ml 16 h Methanol bei 60 °C gerührt. Danach wird das Gemisch auf 0°C gebracht und vorsichtig Natriumborhydrid (2,3 g, 60.8 mmol) hinzu gegeben. Es wird 2 Stunden bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend abgezogen. Die entstehende weiße Emulsion wird mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 120 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Kochsalz neutral gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. eingengt und das Produkt mit n-Hexan gefällt.

Ausbeute: 8,3 g (83 % d. Th.) leicht braunes Pulver

Rf-Wert: 0.25 (FM 4)

Schmp.: 162.5°C Ethylacetat/n-Hexan

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3387 (m), 3055 (m), 2903 (m), 2815 (m), 1601 (s), 1582 (m), 1497 (vs), 1469 (s), 1311 (s), 1242 (m), 1180 (m), 990 (m), 821 (s), 810 (s), 747 (s), 682 (m)

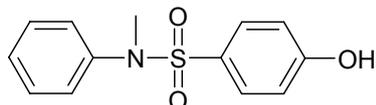
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 209 (7), 207 (19) [M⁺], 140 (3), 127 (69), 111 (7), 81 (100), 69 (21), 54 (28), 42 (13)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

4.20	d	2H	-CH ₂ -	
6.20	t	1H	-NH-	
6.66	m	2H	H-2,6	AA'BB'-System
6.8-6.90	m	2H	-CH ₂ N-	
7.1	m	2H	H-3,5	AA'BB'-System
11.85	s	1H	-NH-CH=N-	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: 57.84 %C	gef.: 57.60 %C
C ₁₀ H ₁₀ ClN ₃ (207.66)	4.85 %H	4.97 %H
	20.23 %N	20.05 %N

4-Hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 45



Darstellung: 2.0 g (1.0 mmol) 4-Hydroxybenzolsulfonsäurechlorid 47 werden mit der dreifach molaren Menge von N-Methylanilin (ca. 3 g) in einer Reibschale verrieben. Nach Zusatz von 1 ml Triethylamin und 2 ml Dioxan lässt man 30 min bei RT stehen. Anschließend gibt man den Ansatz auf 50 ml 2%ige Schwefelsäure, extrahiert mit Methylenchlorid und schüttelt die organische Phase mit 1N HCl aus. Anschließend wird neutral gewaschen, und man trocknet über Magnesiumsulfat und engt im Vakuum zu Trockne ein. Das Produkt wird in heißem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 92 %

Schmp.: 150°C (H₂O)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3335 (s), 1636 (w), 1602 (s), 1587 (s), 1540 (w), 1500 (m), 1490 (s), 1463 (m), 1281 (m), 1143 (s), 1125 (m), 1090 (s), 916 (m), 871 (m), 846 (s), 724 (s), 711 (m), 556 (s)

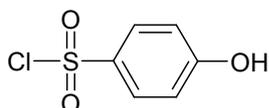
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 249 (12) (M⁺-14), 184 (5), 157 (5), 109 (5), 94 (12), 93 (76), 65 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,08	s	3H	-CH ₃
6,85	m	2H	H-2, 6
7,08	m	2H	H- 2', 6'
7,25-7,40	m	5H	H- 3, 5; H-3'; H-4'; H-5'
10,51	s	1H	-OH austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	59,30	gef.: %C	59,09
$C_{13}H_{13}NO_3S$ (263,32)	%H	4,98	%H	4,89
	%N	5,32	%N	5,39

4-Hydroxybenzolsulfonsäurechlorid 47

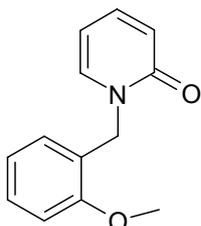


Darstellung: 11.6 g (0.05 mol) 4-Hydroxybenzolsulfonat-Natrium-dihydrat 46 werden in einen 3-Halskolben gegeben. Eine Lösung aus 30 g Thionylchlorid (0.25 mol) und 0.3 g DMF wird rasch zum Feststoff gegeben. Es entsteht dabei eine heftige Gasbildung. Nach Abklingen der Gasbildung wird der Ansatz auf 60°C gebracht und 3 h gerührt. Während der Reaktion geht der Feststoff nach und nach in Lösung. Es bildet sich ein violett schimmerndes Öl. Anschließend wird das Öl vorsichtig auf 100 g Eis gegossen, um das überschüssige Thionylchlorid zu hydrolysieren. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit 20 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abrotiert und das Rohprodukt ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte weiter verarbeitet.

Ausbeute: 7.7 g (79 % d. Th.) farbloses Öl

Rf-Wert: 0.66 (FM 1)

1-(2-Methoxybenzyl)pyridin-2(1H)-on 51



Darstellung: 3.12 g (0.02 mmol) 2-Methoxybenzylchlorid und 1.9 g (0.02 mmol) 2-Hydroxypyridin werden mit 10 g K_2CO_3 in 200 ml getrocknetem Toluol 4 h bei 110°C unter Rückfluss gekocht. Der Ansatz wird filtriert und überschüssiges 2-Hydroxypyridin mit 0.25% NaOH durch Ausschütteln entfernt. Das Produkt wird mittels SC aufgereinigt (FM 10).

Ausbeute: 70 %

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 215 (35) [M⁺], 184 (13), 149 (3), 121 (72), 91 (100), 78 (19), 65 (24), 51 (18)

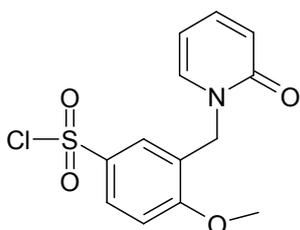
IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3020 (s), 1662 (vs), 1587 (vs), 1540 (s), 1494 (s), 1247 (vs), 1145 (m), 761 (vs), 664 (vs)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.83	s	3H	O-CH ₃
5.02	s	2H	-CH ₂ -
6.29	„dt“	1H	H-5'
6.41	„dd“	1H	H-3'
6.99 – 7.31	m	8H	aromatisch
7.43	„dt“	1H	H-4'
7.63	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	72,54	gef.: %C	72,77
C ₁₃ H ₁₃ NO ₂ (215,25)	%H	6,09	%H	6,22
	%N	6,51	%N	6,34

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-4-methoxybenzolsulfonsäurechlorid 52



Darstellung: Eine Lösung von 250 mg **51** in 5 ml Chloroform wird im Salz/Eisbad auf -10 °C gebracht und dazu 1 ml eiskalte Chlorsulfonsäure vorsichtig unter Kühlung bei -10 °C zugetropft. Bei dieser Temperatur wird ca. 30 min weiter gerührt und danach weitere 2 h bei RT. Der Ansatz wird auf Eis gegeben und die Chloroformphase abgetrennt. Mit 2.5 % Na₂HCO₃ wird die Chloroformphase mehrfach geschüttelt. Nach Entfernen des LM i. Vak. wird in Aceton/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 53 % weiße Nadeln

Schmp.: 162 °C (Aceton/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3425 (w, br), 3115 (w), 1659 (vs), 1593 (s), 1493 (s), 1373 (s), 1190 (s); 900 (m), 772 (m), 515 (m)

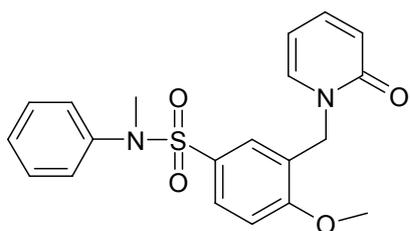
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 315 (35), 313 (100) [M⁺], 282 (25), 219 (77), 119 (34), 96 (62), 83 (91)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.84	s	3H	-O-CH ₃	
5.03	s	2H	-CH ₂ -	
6.27	„dt“	1H	H-5'	
6.44	“dd”	1H	H-3'	
6.96	d	1H	H-6	
7.14	dd	1H	H-3	⁴ J = 8.5 Hz
7.48	m	2H	H-5, H-4'	
7.68	“dd”	1H	H-6'	

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	49.77	gef.: %C	49.32
C ₁₃ H ₁₂ ClNO ₄ S (313.76)	%H	3.86	%H	4.01
	%N	4.46	%N	4.28

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-4-methoxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 53



Darstellung: 100 mg 52 werden mit der dreifachen Menge N-Methylanilin in einer Reibschale verrieben. Nach Zugabe von 1.5 ml Triethylamin und 3 ml Dioxan wird der Ansatz 30 min stehen gelassen. Anschließend wird dieser auf 75 ml 2 % H₂SO₄ gegossen und das Produkt mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die org. Phase wird neutral gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Der Rückstand wird umkristallisiert.

Ausbeute: 64 % weiße Kristalle

Rf-Wert: 0.62 (FM 7)

Schmp.: 141 °C (Chloroform/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (w), 3076 (m), 2938 (m), 1665 (vs), 1596 (s), 1492 (s), 1261 (s), 1342 (s), 1261 (s), 1183 (m), 1166 (m), 1081 (m), 871 (m), 756 (m), 705 (m)

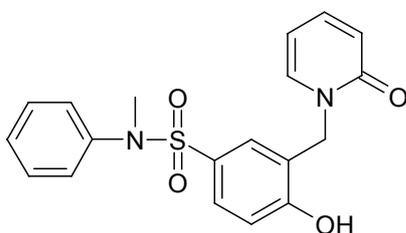
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 384 (61) [M⁺⁺+1], 307 (13), 290 (37), 276 (8), 215 (39), 176 (16), 154 (100), 156 (80), 120 (29), 107 (40), 89 (40), 77 (45),

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.02	s	3H	N-CH ₃
4.92	s	3H	-OCH ₃
5.02	s	2H	-CH ₂ -
6.23	„dt“	1H	H-5'
6.41	„dd“	1H	H-3'
6.99 – 7.31	m	8H	aromatisch
7.43	„dt“	1H	H-4'
7.62	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	62.48	gef.: %C	62.30
C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ S (384.46)	%H	5.24	%H	5.27
	%N	7.29	%N	7.09

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-4-hydroxy-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 54



Darstellung: etwa 200 mg (0.005 mol) 53 werden in trockenem CH₂Cl₂ gelöst u. die dreifache Menge BBr₃ zugegeben. Nach 4 h Rühren wird der Ansatz auf Eiswasser gegossen und der NS in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird

neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird diese i. Vak. einrotiert und der Rückstand in Chloroform/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

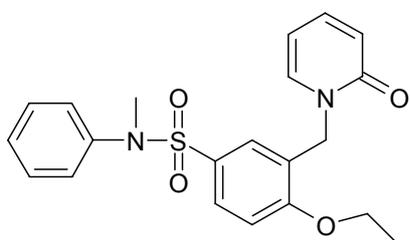
Ausbeute: 83 % weiße Nadeln
Rf-Wert: 0.32 (FM 7)
Schmp.: 133.4 °C (Chloroform/Petrolether)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

3.02	s	3H	N- CH_3	
5.01	s	2H	- CH_2 -	
6.27	„dt“	1H	H-5'	
6.44	„d“	1H	H-3'	
6.93-7.33	m	8H	aromatisch	
7.46	„dt“	1H	H-4'	
7.68	„dd“	1H	H-6'	
11.12	s	1H	-OH	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>		ber.: %C	61.61	gef.: %C	61.64
$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	(370.43)	%H	4.90	%H	5.01
		%N	7.56	%N	7.34

3-(1,2-dihydro-2-oxo-pyridyl)-4-ethoxy-N-methyl-N-phenyl-4-benzolsulfonamid **55**



Darstellung: AAV4 mit Ethylbromid

Ausbeute: 47 mg (29 % d. Th.) gelbliche Nadeln
Rf-Wert: 0.65 (FM 7)

Schmp.: 158 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (w), 3073 (w), 2981 (m), 2343 (w), 1660 (vs), 1578 (s), 1492 (s), 1346 (s), 1263 (s), 1169 (m), 772 (m), 699 (m), 584 (m)

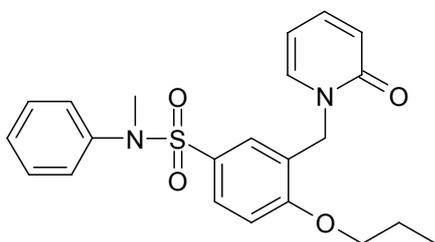
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 353 (1) [M⁺-45], 293 (6), 229 (81), 227 (22), 136 (29), 108 (33), 78 (100), 50 (95)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.76	t	3H	-CH ₂ -CH ₃
3.05	s	3H	-N-CH ₃
4.05	q	2H	-CH ₂ -CH ₃
5.04	s	2H	-CH ₂ -
6.27	„dt“	1H	H-5'
6.44	„d“	1H	H-3'
6.99 – 7.31	m	8H	aromatisch
7.43	„dt“	1H	H-4'
7.63	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	63.30	gef.: %C	62.92
C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S (398.48)	%H	5.56	%H	5.60
	%N	7.03	%N	6.82

3-(1,2-dihydro-2-oxo-pyridyl)-N-methyl-N-phenyl-4-propoxybenzolsulfonamid 56



Darstellung: AAV4 mit n-Propylbromid

Ausbeute: 32 mg (19 % d. Th) weiße Nadeln

Rf-Wert: 0.66 (FM 7)

Schmp.: 96 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3428 (w), 2967 (w), 2344 (w), 1654 (s), 1585 (m), 1492 (m), 1351 (m), 1259 (m), 1132 (m), 1065 (w), 770 (w), 703 (m), 558 (w)

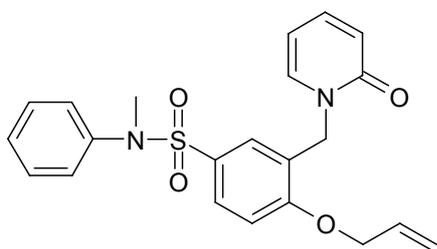
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 412 (10) [M⁺], 307 (4), 234 (84), 200 (5), 149 (29), 133 (11), 108 (47), 78 (85), 49 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.01	t	3H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.79	sex	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3.04	s	3H	-N-CH ₃
4.07	t	2H	-O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
5.03	s	2H	-CH ₂ -
6.27	„dt“	1H	H-5'
6.44	„d“	1H	H-3'
6.99 – 7.31	m	8H	aromatisch
7.43	„dt“	1H	H-4'
7.62	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	64.06	gef.: %C	64.15
C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄ S (412.51)	%H	5.86	%H	5.98
	%N	6.79	%N	6.69

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-N-methyl-4-(2-propenoxy)-N-phenylbenzolsulfonamid 57



Darstellung: AAV4 mit 1-Brom-2-propen

Ausbeute: 56 mg (37 % d. Th) weißes Pulver

Rf-Wert: 0.64 (FM 7)

Schmp.: 138 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3430 (m), 3061 (w), 2961 (m), 1654 (vs), 1598 (s), 1540 (m), 1355 (s), 1273 (s), 1153 (m), 1140 (m), 771 (m), 602 (m)

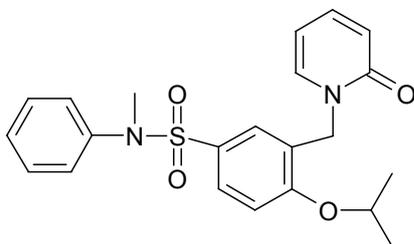
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 410 (11) [M⁺], 354 (2), 263 (4), 241 (10), 200 (18), 172 (39), 145 (68), 131 (62), 91 (63), 78 (74), 41 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.03	s	3H	-N-CH ₃
4.73	d	2H	-O-CH ₂ -
5.05	s	2H	-CH ₂ -Pyr
5.34	m	2H	=CH ₂
6.06	m	1H	-CH=CH ₂
6,23	„dt“	1H	H-5'
6,38	„d“	1H	H-3'
7,01-7.29	m	4H	aromatisch
7.28-7.46	m	5H	aromatisch, H-4'
7.60	dd	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	64.37	gef.: %C	64.42
C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ S (410.50)	%H	5.40	%H	5.31
	%N	6.82	%N	6.80

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-4-(1-methylethoxy)-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 58



Darstellung: AAV4 mit Isopropylbromid

Ausbeute: 63 mg (37 % d. Th.) schwach gelbe Kristalle

Rf-Wert: 0.69 (FM 7)

Schmp.: 89.5 °C (Chloroform/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3424 (w), 3075 (w), 3026 (w), 2958 (w), 1653 (s), 1598 (m), 1574 (s), 1494 (s), 1336 (m), 1261 (s), 1135 (s), 772 (m), 694 (m)

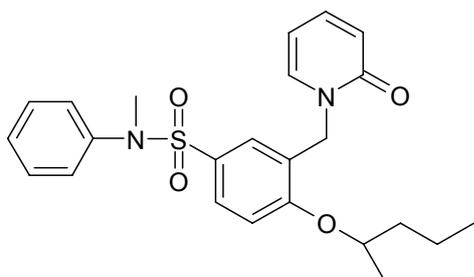
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 412 (4) [M⁺], 327 (4), 243 (45), 201 (48), 184 (34), 149 (18), 133 (32), 120 (13), 96 (100), 77 (64), 65 (43)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.29	d	6H	-CH-(CH ₃) ₂
3.05	s	3H	-N-CH ₃
4.78	sep	1H	-CH-(CH ₃) ₂
4.98	s	2H	-CH ₂ -
6.23	„dt“	1H	H-5'
6.38	„d“	1H	H-3'
7.01-7.39	m	8H	aromatisch
7.46	m	1H	H-4'
7.60	dd	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	64.06	gef.: %C	64.32
C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄ S (412.15)	%H	5.86	%H	5.96
	%N	6.79	%N	6.63

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-N-methyl-N-phenyl-4-(2-propoxy)-benzolsulfonamid 59



Darstellung: AAV4 mit 2-Brompentan

Ausbeute: 44 mg (25 % de Th) weißes Pulver

Rf-Wert: 0.72 (FM 7)

Schmp.: 134 °C (Chloroform/Petrolether)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 440 (2) [M⁺], 369 (3), 307 (15), 271 (72), 214 (4), 178 (27), 108 (64), 78 (100), 49 (92)

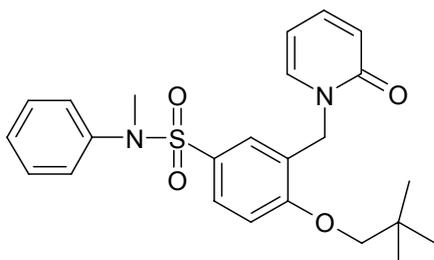
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.03	t	3H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.23	d	3H	-CH-CH ₃
1.31	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.62	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3.04	s	3H	-N-CH ₃
4.75	m	1H	-CH-
5.02	s	2H	-CH ₂ -Pyr
6,23	„dt“	1H	H-5'
6,38	„d“	1H	H-3'
6.93-7.37	m	8H	aromatisch
7.46	„dt“	1H	H-4'
7.68	„dd“	1H	H-6'

Elementaranalyse:

	ber.: %C	65.43	gef.: %C	65.63
C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₄ S (440.57)	%H	6.41	%H	6.31
	%N	6.36	%N	6.27

3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-4-(2,2-dimethylpropoxy)-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 60



Darstellung: AAV4 mit 1-Brom-2,2-dimethylpropan

Ausbeute: 29 mg (16 % d. Th.) weißes Pulver

Rf-Wert: 0.68 (FM 7)

Schmp.: 143° C (Ethylacetat/Petrolether)

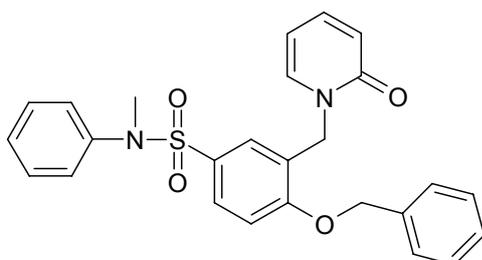
IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3440 (w), 3065 (w), 2983 (w), 1656 (s), 1595 (s), 1490 (s), 1372 (m), 1343 (s), 1132 (m), (771) (m), 697 (m), 602 (m)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.01	s	9H	3 x -CH ₃
3.03	s	3H	N-CH ₃
4.11	s	2H	O-CH ₂ -
5.02	s	2H	-CH ₂ -Pyr
6,23	„dt“	1H	H-5'
6,38	„d“	1H	H-3'
6.92-7.34	m	8H	aromatisch
7.46	„dt“	1H	H-4'
7.68	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	65.43	gef.: %C	65.70
C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₄ S (440.57)	%H	6.41	%H	6.52
	%N	6.36	%N	6.06

4-Benzyloxy-3-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-N-methyl-N-phenylbenzolsulfonamid 61



Darstellung: AAV4 mit Benzylchlorid

Ausbeute: 13 mg (7 % d. Th.) weiße Nadeln

Rf-Wert: 0.53 (FM 4)

Schmp.: 120 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3429 (m), 2364 (vw), 1658 (m), 1596 (m), 1492 (w), 1347 (w), 1258 (m), 1169 (m), 1134 (m), 698 (w), 604 (w)

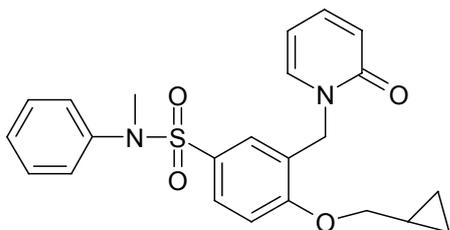
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 460 (2) [M⁺], 455 (3), 243 (11), 229 (5), 108 (32), 92 (20), 78 (63), 56 (35), 50 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.02	s	3H	-N-CH ₃
5.01	s	2H	-CH ₂ -
5.11	s	2H	-CH ₂ -Phe
6.22	„dt“	1H	H-5'
6.40	„dd“	1H	H-3'
6.93 – 7.36	m	13H	aromatisch
7.49	„dt“	1H	H-4'
7.70	„dd“	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	67.81	gef.: %C	67.75
C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₄ S (460.53)	%H	5.25	%H	5.18
	%N	6.08	%N	6.12

4-(Cyclopropylmethoxy)-3-(1,2-dihydro-2-oxo-1-pyridylmethyl)-N-methyl-N-phenyl-benzolsulfonamid 62



Darstellung: AAV4 mit Cyclopropylmethylbromid

Ausbeute: 63 mg (37 % d. Th.) weißes Pulver

Rf-Wert: 0.68 (FM7)

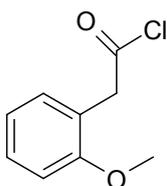
Schmp.: 114.7 °C (Ethylacetat/Chloroform)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3436 (w), 3064 (m), 2884 (w), 2343 (vw), 1655 (s), 1580 (s), 1492 (m), 1346 (s), 1264 (s), 1129 (m), 771 (m), 584 (m)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

0.36	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -
0.61	m	2H	-CH ₂ -CH ₂ -
1.28	m	1H	-CH-(CH ₂) ₂ -
3.03	s	3H	-N-CH ₃
3.96	d	2H	-CH ₂ -CH-
5.02	s	2H	-CH ₂ -
6.23	„dt“	1H	H-5'
6.39	„d“	1H	H-3'
7,01-7.29	m	4H	aromatisch
7.28-7.35	m	4H	aromatisch
7.46	m	1H	H-4'
7.65	dd	1H	H-6'

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	65.07	gef.: %C	64.79
C ₂₃ H ₂₄ NO ₄ S (424.52)	%H	5.70	%H	5.82
	%N	6.60	%N	6.51

2-Methoxyphenylessigsäurechlorid 64

Darstellung: 10,0 g (0.06 mol) 2-Methoxyphenylessigsäure **63** werden in 40 ml trockenem Diethylether aufgeschlämmt. Der Ansatz wird im Eisbad auf 0 °C gebracht, um dann nach und nach 15 g Phosphorpentachlorid hinzuzufügen. Dabei färbt sich die Lösung zitronengelb. Es wird noch 1 h bei RT gerührt. Der Ether wird i. Vak. abrotiert. Das Säurechlorid wird durch Destillation gewonnen.

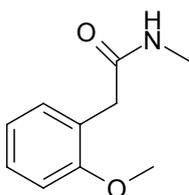
Ausbeute: 78 %

Rf-Wert: 0.6 (FM 8)

Sdp._{0.045bar}: 77 °C

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3.75	s	5H	-O-CH ₃ , -CH ₂ -
6.91	m	2H	H-3, H-5
7.25	m	2H	H-4, H-6

2-Methoxy-N-methyl-phenylacetamid 65

Darstellung: 3 g des Säurechlorids **64** werden zusammen mit getrocknetem Dioxan in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Die Lösung wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Vorsichtig werden 5 ml einer wässrigen 40 %igen Methylaminlösung hinzugefügt und der Ansatz kräftig geschüttelt. Die Lösung wird 10 min stehen gelassen und dann auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird mit 0.1 N HCl auf pH 4-5 gebracht und danach mit Ethylacetat ausgeschüttelt.

Ausbeute: 93 %

Rf-Wert: 0.63 (FM 1)

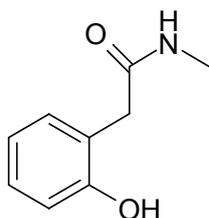
Schmp.: 87.6 °C (Ethylacetat/ Petrolether)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d6, [ppm]:

2.58	s	3H	NH-CH ₃	
3.37	s	2H	-CH ₂ -	
3.75	s	3H	-OCH ₃	
6.92	m	2H	H-3, H-5	
7.26	m	2H	H-4, H-6	
7.69	br	1H	-NH-	austauschbar

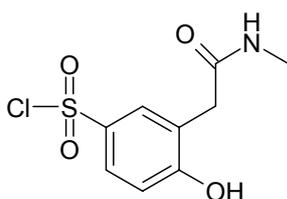
<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	67.02	gef.: %C	67.24
C ₁₀ H ₁₃ NO ₂ (179.22)	%H	7.31	%H	7.42
	%N	7.82	%N	7.67

2-Hydroxy-N-methyl-phenylacetamid 66



Darstellung: 200 mg (\approx 1.1 mmol) 2-Methoxy-N-methylphenylacetamid **65** werden in trockenem Dichlormethan gelöst und die dreifache BBr₃ zugetropft. Nach 4 h rühren bei RT wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben. Die Wasserphase wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt und neutral gewaschen. Die org. Phase wird getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in Chloroform/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 74 %

5-Chlorsulfonyl-2-hydroxy-N-methyl-phenylacetamid 67

Darstellung: 250 mg 2-Hydroxy-N-methylphenylacetamid **66** werden in 5 ml getrocknetem Chloroform gelöst und in 1 ml Chlorsulfonsäure, welche im Salz/Eisbad auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht wird, zugetropft. Es wird 30 min bei gleicher Temperatur gerührt und danach weitere 2 h bei RT. Der Ansatz wird auf Eis gegeben und die Chloroformphase abgetrennt. Mit 2.5 % Na_2HCO_3 wird die Chloroformphase mehrfach geschüttelt. Nach Entfernen des LM i. Vak. wird in Aceton/Petrolether umkristallisiert

Ausbeute: 63 %

Schmp.: $154.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Chloroform/Petrolether)

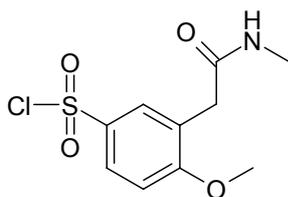
IR-Spektrum, KBr, $[\text{cm}^{-1}]$: 3316 (vs), 3122 (s), 2745 (m), 1579 (vs), 1611 (vs), 1497 (s), 1434 (s), 1375 (vs), 1293 (vs), 1078 (s), 906 (s), 826 (s), 674 (s), 589 (vs), 509 (s)

Massenspektrum, EI 70 mV, $[\text{m/z}]$ (%): 214 (1) $[\text{M}^{+-49}]$, 166 (3), 136 (15), 108 (10), 79 (99), 64 (58), 50 (100)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

2.60	s	3H	-NH-CH ₃	
3.37	s	2H	-CH ₂ -	
6.71	d	1H	H-5	$^3\text{J} = 8.03\text{ Hz}$
7.31	dd	1H	H-6	$^3\text{J} = 8.03\text{ Hz}$, $^4\text{J} = 2.14\text{ Hz}$
7.35	dd	1H	H-2	$^4\text{J} = 2.14\text{ Hz}$
7.99	br	1H	-NH-	austauschbar
11.97	br	1H	-OH	austauschbar

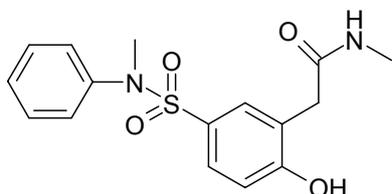
$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}_4\text{S}$ (263.70)

5-Chlorsulfonyl-2-methoxy-N-methyl-phenylacetamid 68

Darstellung: 250 mg 2-Methoxy-N-methylphenylacetamid 65 werden in 5 ml getrocknetem Chloroform gelöst und in 1 ml Chlorsulfonsäure, welche im Salz/Eisbad auf -10 °C gebracht wird, zugetropft. Es wird 30 min bei gleicher Temperatur gerührt und danach weitere 2 h bei RT. Der Ansatz wird auf Eis gegeben und die Chloroformphase abgetrennt. Mit 2.5 % Na₂HCO₃ wird die Chloroformphase mehrfach geschüttelt. Nach Entfernen des LM i. Vak. wird in Aceton/Petrolether umkristallisiert.

Auf eine Reinigung des Rohprodukts kann für die weitere Umsetzung verzichtet werden.

Ausbeute: 54 %

[2-Hydroxy-5-(N-methyl-N-phenyl-sulfamoyl)]-phenyl-N-methyl-acetamid 69

Darstellung: 300 mg 5-Chlorsulfonyl-2-hydroxy-N-methylphenylacetamid 67 werden mit der dreifachen Menge N-Methylanilin in einer Reibschale verrieben. Nach Zugabe von 1.5 ml Triethylamin und 3 ml Dioxan wird der Ansatz 30 min stehen gelassen. Anschließend wird dieser auf 75 ml 2 % H₂SO₄ gegossen und das Produkt mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die org. Phase wird neutral gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Der Rückstand wird umkristallisiert.

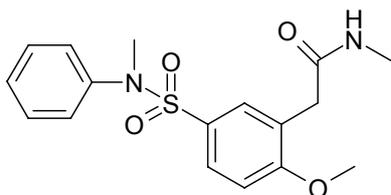
Schmp.: 177 °C (Ethylacetat/Petrolether)

$^1\text{H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d}_6, [\text{ppm}]:$

2.57	d	3H	-NH-CH ₃	
3.10	s	3H	N-CH ₃	
3.39	s	2H	-CH ₂ -	
7.10	m	3H	H-3, H-2'6'	
7.35	m	5H	H-4, H-6, H-3',4',5'	
7.97	br	1H	-NH-	austauschbar
11.87	br	1H	-OH	austauschbar

Elementaranalyse:

	ber.: %C	57.47	gef.: %C	57.52
C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S (334,40)	%H	5.43	%H	5.23
	%N	8.38	%N	8.41

[2-Methoxy-5-(N-methyl-N-phenyl-sulfamoyl)-phenyl]-N-methyl-acetamid 70

Darstellung: 250 mg 5-Chlorsulfonyl-2-methoxy-N-methylphenylacetamid **68** werden mit der dreifachen Menge N-Methylanilin in einer Reibschale verrieben. Nach Zugabe von 1.5 ml Triethylamin und 3 ml Dioxan wird der Ansatz 30 min stehen gelassen. Anschließend wird dieser auf 75 ml 2 % H₂SO₄ gegossen und das Produkt mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die org. Phase wird neutral gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Der Rückstand wird umkristallisiert.

Ausbeute: 59 %

Schmp.: 162 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3287 (m), 3084 (w), 2942 (w), 1647 (s), 1580 (m), 1493 (s), 1348 (vs), 1263 (s), 1131 (s), 1022 (m), 856 (m), 558 (m)

Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 348 (7) [M⁺], 284 (13), 242 (11), 212 (5), 179 (25), 122 (15), 108 (37), 78 (88), 57 (100), 50 (86)

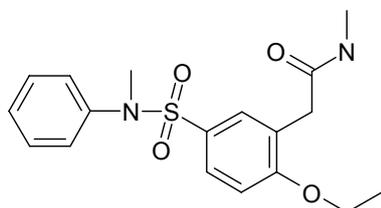
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2.56	d	3H	-CO-NH-CH ₃
3.09	s	3H	-NH-CH ₃
3.41	s	2H	-CH ₂ -
3.84	s	3H	-OCH ₃
7.10	m	3H	H-3, H-2'6'
7.35	m	5H	H-4, H-6, H-3',4',5'
7.82	br	1H	-NH

Elementaranalyse:

	ber.: %C	58.60	gef.: %C	58.54
C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄ S (348.42)	%H	5.79	%H	5.88
	%N	8.04	%N	7.80

[2-Ethoxy-5-(N-methyl-N-phenyl-sulfamoyl)-phenyl]-N-methyl-acetamid 71



Darstellung: AAV4 mit 1mmol Phenol 69 und Ethylbromid

Ausbeute: 120 mg

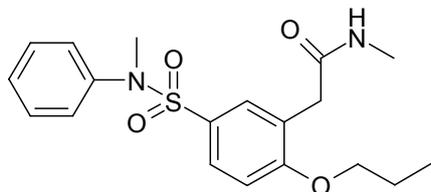
gelbliche Kristalle

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

1.75	t	3H	-CH ₂ -CH ₃	
2.56	d	3H	-NH-CH ₃	
4.06	q	2H	-CH ₂ -CH ₃	
3.09	s	3H	-N-CH ₃	
3.41	s	2H	-CH ₂ -	
3.98	t	2H	-O-CH ₂ -CH ₂	
7.04-7.34	m	8H	aromatisch	
7.81	d, (br)	1H	-NH-	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	59.65	gef.: %C	59.77
C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄ S (322.45)	%H	6.12	%H	6.20
	%N	7.73	%N	7.80

[5-(N-methyl-N-phenyl-sulfamoyl)-2-propoxy-phenyl]-N-methyl-acetamid 72



Darstellung: AAV4 mit 1mmol Phenol 69 und Propylbromid

Ausbeute: 153 mg (44 % d. Th.) gelbliche Kristalle

Rf-Wert: 0.23 (FM 7)

Schmp.: 166 °C (Ethylacetat/Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3412 (w), 3276 (s), 3011 (w), 2968 (m), 2876 (w), 1646 (s), 1594 (s), 1493 (s), 1348 (s), 1264 (s), 1156 (s), 1127 (s), 974 (m), 714 (m), 598 (m)

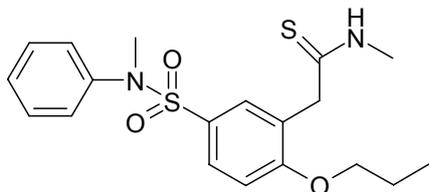
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z] (%): 376 (12) [M⁺], 361 (5), 310 (15), 224 (23), 177 (41), 108 (66), 78 (100), 57 (87)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

0.97	t	3H	-CH ₂ -CH ₃	
1.72	sex	2H	-CH ₂ -CH ₃	
2.56	d	3H	-NH-CH ₃	
3.09	s	3H	-N-CH ₃	
3.41	s	2H	-CH ₂ -	
3.98	t	2H	-O-CH ₂ -CH ₂	
7.04-7.34	m	8H	aromatisch	
7.81	d, (br)	1H	-NH-	austauschbar

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	58.14	gef.: %C	58.07
C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄ S (376.48)	%H	6.16	%H	6.17
	%N	7.14	%N	6.89

[5-(N-Methyl-N-phenyl-sulfamoyl)-2-propoxy-phenyl]-N-methyl-thioacetamid 73



Darstellung: 100 mg **72** werden in 15 ml Toluol gelöst. Es wird nach Zugabe einer Spatelspitze Lawessons-Reagenz bei 100 °C unter Rückfluss 2 h gekocht. Das Fließmittel wird i. Vak. abrotiert und das Produkt mittels SC gereinigt (Toluol und anschließend Diisopropylether).

<u>Ausbeute:</u>	110 mg	(96 % d. Th.)	beiges Pulver
<u>Rf-Wert:</u>	0.56	(FM 9)	
<u>Schmp.:</u>	162 °C	(Ethylacetat/Petrolether)	

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

1.06	t	3H	-CH ₂ -CH ₃
1.87	sex	2H	-CH ₂ -CH ₃
3.12	d	2H	-CH ₂ -NH-
3.17	s	3H	-N-CH ₃
3.99	t	2H	O-CH ₂ -CH ₂
6.87-7.48	m	8H	aromatisch
7.49	s	1H	-NH-

<u>Elementaranalyse:</u>	ber.: %C	57.12	gef.: %C	56.92
C ₁₈ H ₂₁ N ₂ O ₃ S ₂ (Mr.378.52)	%H	5.86	%H	5.82
	%N	7.40	%N	7.29

9 LITERATURVERZEICHNIS

Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Towards understanding the assembly and structure of K_{ATP} -channels. *Physiol Rev* 78: 227-245

Arunlakshana O, Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonist. *Br J Pharmacol* 14: 48-58

Ashcroft FM, Kakei M (1989) ATP-sensitive K^+ -channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP, Mg^{2+} -ions. *J Physiol* (416): 349-367

Ashcroft FM, Gribble M (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci* (21): 288-294

Ashcroft SJH, Ashcroft FM (1990) *Cell Signalling* 2: 197-214

Atwal KS (1996) Myocardial protection with the ATP-sensitive potassium channel openers. *Curr Med Chem* (3): 227-238

Atwal KS, Grover GJ, Syed ZA, Ferrara FN, Harper TW (1993) Cardioslektive Anti-Ischemic ATP-Sensitive Potassium Channel Openers. *J Med Chem* (36): 3971-3973

Atwal KS, Grover GJ, Lodge NJ, Normandin DE, Traeger SC, Sleph PG, Cohen RB, Bryson CC, Dickinson KEJ (1998) Binding of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers to cardiac membranes: Correlation of binding affinities with cardioprotective and smooth muscle relaxing properties. *J Med Chem* (41): 271-275

Auchampach J, Grover GJ, Gross G (1991) Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* (69): 949-958

Babenko A, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1998) Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels: Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* (83):1132-1143

Babenko AP, Samoilov VO (1992) Potassium channel in the cardiomyocyte sarcolemma; initial opening under influence of hypoxia. *Basic Appl Myology* (2): 316-323

Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (2000) Pharmacology of sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* (275): 717-720

Baukowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg, JP, Fakler B, (1998) PIP_2 and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} -channels. *Science* (282): 1141-1144

Bernadi H, Fosset M, Lazdunski M (1988) Characterization, purification, and affinity labelling of the brain [3H]glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K^+ -channel. *Proc Natl Acad Sci USA* (85): 9816-9820

Boverie S, Antoine MH, Somers F, Becker B, Sebille S, Quedraogo R (2005) Effect on $K(ATP)$ channel activation properties and tissue selectivity of the nature of the substituent in the 7- and the 3-position of 4-H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J Med Chem* 48(10): 3492-503

Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF (1996) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* 45:1439-1445

Cook DL, Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ -channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 271-273

Derix A Dissertation (1998), 6-Substituierte Benzopyrane als Modulatoren des K_{ATP} -Kanals. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5: 268-277
- Dunne MJ, (1986) Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insuline secreting cell line. *FEBS Lett* 208: 59-62
- Ehle B, Lemoine H, Kaumann AJ (1985) Improved evaluation of binding o ligands to membranes containing several receptor-subtypes Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 331: 52-59
- Englert HC, Gerlach U, Goegelein H, Hartung J, Heitsch H, Mania D, Scheidler S (2001) Cardioselective K_{ATP} Channel Blockers Derived from a New Series o m-Anisamidoethylbenzenesulfonylthioureas. *J Med Chem* 44: 1085-1098
- Escande D, Thuringer D , Leguern S (1988) The potassium channel opener cromakalim (BRL 34915) activates ATP-dependent Kalium+-channels in isolated cardiac mocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 620-625
- Evans JM, Fake CS, Hamilton TC, Poyser RH, Watts EA (1983) Synthesis and antihypertensive activity of substituted *trans*-4-amino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-3-ols. *J Med Chem* 26:1582-1589
- Foster CD, Fujii K ,Kingdon J ,Brading AF (1989) The effects of cromakalim on the smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* 97: 281-291
- Fujita A, Kurachi Y (2000) Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol and Ther* 85:39-53
- Gabbutt CD, Hepworth JD, Heron BM Reactions of some 2H-chromenes and 2H-thiochromenes with triazolinediones *Tetrahedron Vol* 51,1995, No 48: 13277-132190
- Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM (1995) Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 77: 611-621
- Gribble FM, Ashcroft FM, Reimann F (2000) Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Parmacol* 58: 1318-1325
- Gross GJ, Auchampach JA (1992) Blockade of ATP-sensitive potassium channels perverts myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 1310-1316
- Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Grover GJ, Gross JG (2003) K_{ATP} opener induced delayed cardioprotection: involvement of sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP}channels, free radicals and MEK1/2. *J of Mol and Cell Card* 35: 985-992
- Gross GJ, Auchampach J (1992) Blockade of ATP-sensitive potassium channel prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 223-233
- Gross GJ, Fryer RM (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 84: 973-979
- Grover G 1997) Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 309-315
- Grover GJ, McCullogh JR, Henry DE, Conder ML, Sleph PG (1989) Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburid. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 98-104
- Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32: 677-695

Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y, Quast, U (1999) ATP-sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* 55: 832-840

Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, Osswald H (2004) Effect of two amino acids in TM17 of sulfonylurea receptor SUR1 on the binding of ATP-sensitive K⁺ channel modulators. *Diabetes* 53: 128-134

Hoffman FJ Jr, Lenfers JB, Niemers E, Pleiss, U, Scriabine A, Janis RA (1993) High affinity binding of a potassium channel agonist to intact rat insulinoma cells *Biochem Biophys Res Commun* 190: 551-558

Howe BB, Haltermann TJ, Yochim CL, Do ML, Pettinger SJ, Stow RB, Ohnmacht CJ, Russel K, Empgield JR, Trainor D, Brown FJ, Kau ST (1995) ZENECA ZD6169: a novel K_{ATP} channel opener with in vivo selectivity for urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 884-890

Howlett DR, Longman SD (1992) Identification of a binding site for [³H]cromakalim in vascular and bronchial smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 107: 396

Inagaki N, Gonoï T, Clement IV JP, Wang C, Aguilar-Bryan J, Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16: 1011-1017

Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoï T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S (1995) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in a rat tissue, including pancreatic islets pituitary, skeletal and muscle and heart. *J Biol Chem* 270: 5691-5694

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higachiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 271: 24321-24324

Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y (1997) Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol* 47:11-39

Ito S, Kajikuri J, Itoh T, Kuriyama H (1991) Effects of Cromakalim on changes in Ca²⁺-concentration and mechanical activity induced by noradrenaline in the rabbit mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 104: 227-233

Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H (1992) Membrane hyperpolarisation inhibits agonist-induced synthesis of inositol-1,4,5-triphosphate in rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 451: 307-328

Jacobson EN, Zhang W, Güllr ML (1991) *J Am Chem Soc* 113: 6703

Jaspert, Dissertation (2001) Wirkung und Selektivität von K⁺-Kanalöffnern bei der Relaxation der glatten Muskulatur verschiedener Gefäßgebiete im Vergleich zur Atemwegsmuskulatur. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kabbe HJ, (1978) Eine einfache Synthese von 4-Chromanonen, *Synthesis*: 886-887

Kawase Y, Yamaguchi S, Horita H, Takeno J, Kameyama H (1982) A new preparative method of 2,2-Dimethyl-2H-chromenes. *Bull Chem Soc Jpn* 55: 1153-1155

Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE (1998) A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron* 20: 995-1005

Lemoine H, Mannhold R, Grittner D (1996) Binding studies with potassium channel openers (KCO) in smooth muscle cells of calf coronary artery as compared to rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353: R 54

Lemoine H, Küper J, Rümenapf R (1999) Opposite effects of ATP on the binding of ³H-P1075 and ³H-glibenclamide to rat heart myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359: R 74

Lemoine H, Mannhold R, Grittner D (1998) Restitution by nucleotides of the binding of the potassium channel activator ³H-P1075 after metabolic inhibition in isolated rat heart cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357: R 281

Lemoine H, Kaumann AJ (1983) A model for the interaction of competitive antagonists with two receptor-subtypes characterized by a Schild-plot with apparent slope unity Agonist-dependent enantiomeric affinity ratios for bupranolol in tracheae but not in right atria of guinea pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 322: 111-120

Lemoine H, Ehle B, Kaumann AJ (1985) Direct labelling of β_2 -adrenoceptors Comparison of binding potency of ³H-ICI 118,551 and blocking poency of ICI 118,551. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 331: 40-51

Liss B, Bruns R, Roeper J (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *J EMBO* 18: 833-846

Manley PW, Löffler-Walz C, Russ U, Hambrock A, Moenius T, Quast U (2001) Synthesis and characterization of a novel tritiated K_{ATP} channel opener with a benzopyran structure. *Br J Pharmacol* 133: 275-285

Manley PW, Quast U, Andres H, Bray KM Synthesis of and radioligand binding studies with a tritiated pinacidil analogue: receptor interactions of structurally different classes of potassium channel openers and blockers *J Med Chem* 1993;36:2004-2010

Mannhold R, Cruciani G, Weber H, Lemoine H, Derix A, Weichel C, Clementi M (1999) 6-varied benzopyrans as potassium channel activators: synthesis, vasodilator properties and multivariate analysis. *J Med Chem* 42: 981-991

Minami K, Miki T, Kadowaki T, Seino S (2004) Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: Studies of Kir6.x null mice. *Diabetes* 53: 176-80

Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'Hahan N, Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers *EMBO J* 19: 6644-6651

Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'Hahan N, Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* 19: 6644-6651

Murray C, Richard V, Reimer K, Jennings R (1990) Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 66: 913-931

Murry CE (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of letal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124

Mutschler E; Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M *Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, S 401*

Nakaya H, Miki T, Seino S, Yamada K, Inagaki N, Suzuki M, Sato T, Yamada M, Matsushita K, Kurachi Y, Arita M (2003) Molecular and functional diversity of ATP-sensitive K⁺ channels: the pathophysiological roles and potential drug targets *Nippon-Yakurigaku-Zasshi (Japanese-journal-of-pharmacology)* 122(3): 243-50

Nelson MT, Quayle JM (1995) *Am J Physiol* 268. C799 – C822

Noma A, (1983) ATP-regulated K⁺-channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148

O'Rourke B, (2000) Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol* 529 (1): 23-36

Okada Y, Yanagisawa T, Taira T (1993) BRL38227 (Levcromakalim)-induced the hyperpolarisation reduces the sensitivity to Ca^{2+} of contractile elements in the canine coronary artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347: 438-444

Ouedraogo R, Becker B, Boverie S, Somers F, Antoine MH, Pirotte B, Lebrun P, de Tullio P (2002) 2-Alkyl-3-Alkylamino-2H-Benzo- and Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides: From K^+ ATP channel openers to Ca^{++} channel blockers. *Biol Chem* 383: 1759-1768

Park YS, Yoo SE, Shin HS, Jin YR, Yun YP (2003) Pharmacological Characterization of vasorelaxant effects of BMS-180448, a novel cardioselective ATP-Sensitive potassium channel openers in rat aorta. *J Pharmacol Sci* 92: 218-227

Pirotte B, Ouedraogo R, deTullio P, Khelili S, Somers F, Boverie S, Dupont L, Fontaine J, Damas J, Lebrun P (2000) 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J Med Chem* 43: 1456-1466

Pirotte B, Schynts M, deTullio P, Lebrun P, Antoine M-H, Fontaine J, Masereel B, Dupont L, Herchuelz A, Delarge J (1993) 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine-1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic β -cells: a new class of potassium channel openers?. *J Med Chem* 36: 3211-3213

Quast U, Bray KM, Andres H, Manley PW, Baumlin Y, Dosogne J (1993) Binding of the K^+ channel opener [3H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Mol Pharmacol* 43: 474-481

Rovnyak GC, Ahmed SZ, Ding CZ, Dzwonczyk S, Ferrara FN, Humphreys LG, Grover GJ, Santafianos D, Atwal KS, Baird AJ, McLaughlin LG, Normandin DE, Sleph PG, Traeger SC (1997) Cardioselective antiischemic ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers 5 Identification of 4-(N-aryl)-substituted benzopyran derivatives with high selectivity. *J Med Chem* 40: 24-34

Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM (1995) Cloning and functional expression of cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, heart, and skeletal muscle, *FEBS Lett* 377: 338-344

Salamon E, Dissertation (2001) Neue 6-Sulfonylchromene als hochwirksame Aktivatoren des K_{ATP} -Kanals: Synthese und pharmakologische Charakterisierung. Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Salamon E, Mannhold R, Weber H, Lemoine H, Frank, W (2002) Novel 6-sulfonyl-chromenes as highly potent K_{ATP} channel activators. *J Med Chem* 45: 1086-1097

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK, Wang J, Evans BE, Orme HT (1998) A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K^+ currents. *Mol Pharmacol* 54: 220-230

Sato H, Koga H (1993) Vasorelaxant activity of 2-substituted 6-Nitro-2H-1-benzopyran-4-carbothioamid K^+ -channel opener. *Bioorg Med Chem Lett* 3: 2627-2630

Schwanstecher M, Sieverding C, Dörschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17: 5529-5535

Schwanstecher M, Sieverding C, Dörschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17: 5529-5535

Sebille S, De Tullio P, Becker B, Antoine MH, Boverie S, Pirotte B, Lebrun P (2005) 4,6 disubstituted 2,2-dimethylchromans structurally related to the K(ATP) channel opener cromakalim: design, synthesis, and effect on insulin release and vascular tone. *J Med Chem* 48(2): 614-21

Seino S, Miki T (2004) Gene targeting approach to clarification of ion channel function: studies of Kir6.x null mice. *J Physiol* 554(Pt 2): 295-300

Seino (1999) ATP-Sensitive Potassium Channels: a Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. *Annu Rev Physiol*: 337-62

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Mol Biol* 81(2): 133-76

Shyng SL, Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP}-channels. *Science* 282: 1138-1141

Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR (1985) Voltage dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316: 736-738

Srinivasan K, Michaud P, Kochi JK (1991) *J Am Chem Soc* 113: 6703

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺-channels in atrial smooth muscle. *Science*, 245: 177-180

Sun H, Hua W, Chen L, Ping S (1997) Enantioselective Synthesis and CD Assignment of absolute configuration of Epoxychromans. *Bull Soc Chim Belg* 106: 47-49

Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marbán E, Nakaya H (2002) Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion in mice. *J Clin Invest* 109: 509-516

Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T, Ueda K (1999) Direct photoaffinity labelling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺-channel by 8-azido-ATP. *J Biol Chem* 274: 3931-3933

Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, Sasayama S (1994) Superoxide dismutase and N-2-mercaptopyrionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischemic preconditioning in the rabbit. *Cardiovasc Res* 28: 980-986

Tanno M, Miura T, Tsuchida A, Miki T, Nishino Y, Ohnuma Y, Shimamoto K (2001) Contribution of both the sarcolemmal K_{ATP} and mitochondrial K_{ATP} channels to infarct size limitation by K_{ATP} channel openers: differences from preconditioning in the role of sarcolemmal K_{ATP} channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 226-232

Terzic A, (1995) Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ openers. *Am J Physiol*: C525-C545

Teschemacher A, Lemoine H (1995) Stimulation of myocardial α -adrenoceptors (α -AR) in isolated cells of rat heart causes partial inactivation of the cyclic AMP response simulated by β -adrenoceptors (β AR). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351: R 114

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulfonylurea receptor. *Nature* 387: 179-183

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺-channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387: 179-182

Tullio de P, Pirotte B, Lebrun P, Fontaine J, Dupont L, Antoine M-H, Ouedraogo R, Khelili S, Maggetto C, Masereel B, Diouf O, Podona T, Delarge J (1996) 3- and 4-substituted 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity relationships. *J Med Chem* 39: 937-948

Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C, Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* 274: 28079-28082

Uhrig U, Hölftje H-D, Mannhold R, Weber H, Lemoine H (2002) Molecular modeling and QSAR studies on K_{ATP} channel openers of the benzopyran type. *J Mol Graph Modelling* 21: 37-45

Voigt W, Romanelli MN, Scapecchi S, Gualtieri F, Budriesi R, Chiarini A, Lemoine H, Mannhold R (1995) Synthesis dependence of the allosteric interaction of semi-rigid verapamil analogues with DHP-binding in kitten heart. *Eur J Pharmacol (Mol Pharmacol Sect)* 291: 255-264

Walker JE, Saraste MJ, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthetase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1:945-951

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K^+ channel. *J Physiol* 499: 715-720

Ytrehus K, Liu Y, Downey J (1994) Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Amer J Physiol* 266: H1145-H1152

Zhang HL, Bolton TB (1996) Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 118: 105-114

Danksagung

Besonders danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. H. Weber für die Überlassung des Themas. Seine unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie seine „väterlichen“ Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit außerordentlich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. H. Lemoine für die intensive Betreuung während der physiologischen Experimente. Sein persönliches Engagement und die Diskussionsbereitschaft, auch an vielen Wochenenden und Feiertagen, haben dafür gesorgt, die komplexe Materie zu strukturieren.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Frank (Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie II) für die Aufnahme der Röntgenstruktur und Herrn Prof. Dr. M. Braun, (Institut für Organische Chemie der HHU Düsseldorf) für die Erstellung der CD-Spektren.

Danken möchte ich Dagmar Grittner (Molekulare Wirkstoff-Forschung, Institut für Lasermedizin) für die Durchführung der Radioligandbindungsversuche an Membranen kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta und desaggregierten Herzmuskelzellen, Joachim Küper (Molekulare Wirkstoff-Forschung, Institut für Lasermedizin) für die Durchführung der Radioligandbindung an Herzmuskelmembranen und Membranen enzymatisch desaggregierter Trachealmuskelzellen. Andreas Hinzmann (Molekulare Wirkstoff-Forschung, Institut für Lasermedizin) für die Auswertung der nicht-linearen Regressionsanalyse des nicht-linearen Schildplots und für die gute Unterstützung bei Computerproblemen.

Mein Dank gilt Malte Wilberg (Molekulare Wirkstoff-Forschung, Institut für Lasermedizin) für die Erstellung der Datentabellen und Zusammenstellung der experimentellen Graphiken sowie für ein sehr gutes Arbeitsklima in den vielen Stunden, die wir miteinander verbracht haben. Ich danke auch Roberto Spogli aus Perugia für die gute Zeit, die wir gemeinsam in Düsseldorf erlebten.

Allen technischen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie; Herrn H. Jansen für die schnelle Vermessung der Massenspektren. Frau G. Zerta für die prompte Erstellung der Elementaranalysen, Herrn H. Mathew für die Anfertigung der NMR-Spektren. Frau K. Christoph für die Aufnahme der IR-Spektren;

Mein besonderer Dank gilt Frau M. Janoschka für das hohe Engagement bei der Bereitstellung etlicher Synthesestufen. Sie hatte immer ein Ohr für all die Probleme, die mich in den vergangenen Jahren beschäftigten. Danken möchte ich M. Matyja für die moralische Unterstützung und die Aufmunterungen.

Danken möchte ich Dr. G. Waldheim für seine Ratschläge bei Problemen zur Nomenklatur und Fragen aus der Analytik.

Meinen Kollegen aus dem 4. Semester, Peter Sippl, Frank Sunkel, Peter v. Hoff, Christian Asche, Andrea Hombrecher, Bernd Rupp, Petra Stahlke, insbesondere Gerd Menche, Birgit Schlegel, und Ricardo Bollig für die gute Unterstützung während der Praktikumsbetreuung.

Ich danke Frank Sunkel, Julia Wessel und Dirk Welsch für eine angenehme Zeit im „Dreierlabor“ sowie Sabine Plücker, Sylvia Pesch, Ekkehart Salamon, Carsten Esser, Holger Steinmaß und Marc Heipke, der mich nie im Schach schlagen konnte, für eine schöne Zeit in der Arbeitsgruppe.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den vielen Studenten für die Synthese einiger Vorstufen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Freundin Silke, die mich immer unterstützt hat, insbesondere bei der unermüdlichen Durchsicht der „Akten“, und die immer an mich geglaubt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Joachim Schönlau
Geburtsdatum und -ort: 29.04.1970 in Mönchengladbach
Eltern: Rolf Erhard Schönlau
Asunción Schönlau, geb. García García

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1976-1981 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule in
Süchteln
1981-1990 Besuch des Humanistischen Gymnasiums in
Viersen (Abschluss Abitur)

Berufsbildung: 09.1991 - 07.1993 Pharmazeutisch Technischer Assistent
Städtische Krankenanstalten Krefeld

Praktikum: 10.1993 – 03.1994 Höhen-Apotheke, Viersen

Hochschulbildung: SS 1994 – SS 1998 Rheinische Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn

Praktikum: 11.1998 – 04.1999 Höhen-Apotheke, Viersen
05.1999 – 10.1999 HHU Düsseldorf

Pharmazeutische Prüfung: 09.11.1999

Promotion: 11.1999 – 10.2003 an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

