

### 3 Pharmakologischer Teil

#### 3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*

Der Einfluss der dargestellten Substanzen auf die Aggregation humaner Thrombozyten wurde im Born-Test<sup>[49,50]</sup> bestimmt.

Dazu wird die Testsubstanz in einer geringen Menge (ca. 10 µl) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und plättchenreiches Plasma (PRP) zugegeben, so dass man ca. 2 ml einer  $1.25 \cdot 10^{-3}$  molaren Lösung erhält. Niedriger konzentrierte Probenlösungen erhält man durch 1:n (n=0,1,2,...) Verdünnung dieser Stammlösung mit PRP.

Die Aggregation wird durch Zugabe eines Induktors zu dem gerührten Plasma ausgelöst und die Änderung der Lichttransmission in einem 2-Kanal Photometer registriert. Die Zunahme der Lichttransmission lässt sich mit der erhöhten Anzahl von Aggregaten in dem Plasma korrelieren<sup>51</sup>. Es ergeben sich die in Abb. 72 schematisch dargestellten Transmissions/Zeit-Kurven. Die maximale Transmission  $h$  wird für jede Konzentration der getesteten Substanz ermittelt. Durch Vergleich mit einer Probe, die mit einer maximal hemmenden Konzentration eines für die verschiedenen Induktoren spezifischen Aggregationshemmers (siehe nachfolgende Kapitel) versetzt wurde, lässt sich die Hemmung der Aggregation in % bestimmen.

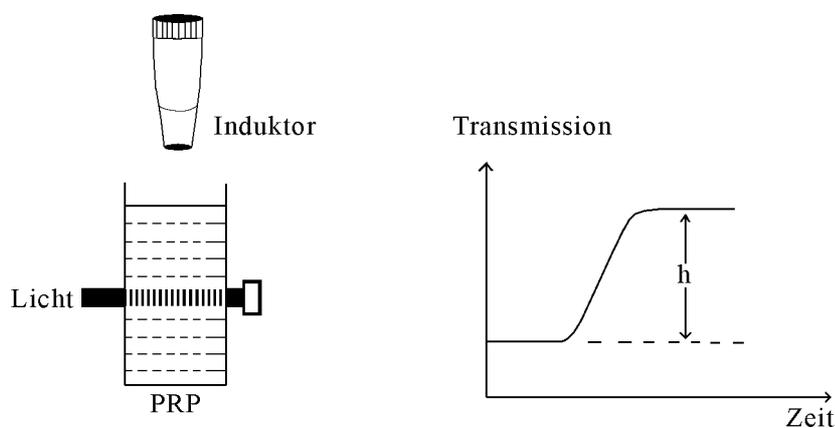


Abb. 72 : Born-Test

Das zum Lösen der Testsubstanz verwendete DMSO hemmt in Konzentrationen oberhalb 10 mM die Aggregation der Thrombozyten<sup>[52]</sup>. Da die Konzentration des DMSO in der Probenlösung maximal 0.6 mM beträgt, sind die aggregationshemmenden Wirkungen spezifisch für die jeweilige Testsubstanz.

Um die Aktivität der Verbindungen miteinander vergleichen zu können, wird der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt. Dazu wird die Konzentration logarithmisch gegen die Hemmung aufgetragen. Man erhält einen S-förmigen Kurvenverlauf. Die weit über 50 % Hemmung liegenden Punkte werden zu einer Geraden verbunden, ebenso verfährt man mit den Punkten im Bereich geringer Hemmung. Diese beiden Geraden verbindet man und fällt vom Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der 50 %-Marke das Lot auf die Konzentrations-Achse. Die so erhaltenen Werte geben die Konzentration der Testsubstanz an, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt.

Alle Versuche wurden mit dem Gerät APACT2 der Fa. Labor Fibrintimer durchgeführt.

### **3.1.1 Kollageninduzierte Thrombozytenaggregation**

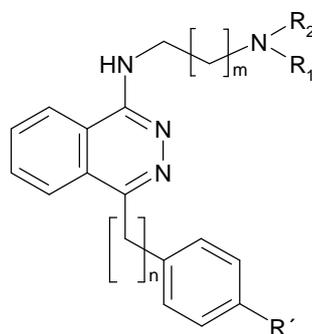
Der Kontakt von Blut mit subendotheliale Kollagen führt zu Aggregation von Thrombozyten. Der Mechanismus ist noch nicht völlig gesichert, doch einige wichtige Schritte konnten schon geklärt werden<sup>[53]</sup>. Zunächst bindet im Plasma gelöster von Willebrand Faktor (vWF) an die Kollagenoberfläche, dann binden Thrombozyten über das Glykoprotein Ib (Gp Ib) an den vWF. Die so fixierten Thrombozyten binden über die Glykoproteine Ia-IIa (Gp Ia-IIa) und Glykoprotein VI (Gp VI) an das Kollagen, was zur Aktivierung der Thrombozyten führt. Die Signaltransduktion, die zur Aktivierung führt, ist noch wenig erforscht. Wahrscheinlich bewirkt die Kollagen-Bindung eine Aktivierung der Phospholipase  $C_{\gamma 2}$ <sup>[54,55]</sup> ( $PLC_{\gamma 2}$ ), woraufhin Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) gebildet wird welches zur Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen führt und damit die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration erhöht<sup>[55]</sup>. Bei der, nun im niedrigen micromolaren Bereich liegenden,  $Ca^{2+}$ -Konzentration kann die Kalzium- und Calmodulin-abhängige Myosin light chain kinase (MLCK) das cytoskeletale Myosin phosphorylieren. Dieses interagiert mit Actin in einem spannungsaufbauenden Prozess, der der Muskelkontraktion ähnelt<sup>[56]</sup>. So kommt es zu der „shape change“ genannten

Veränderung der Thrombozytenform. Sie gehen von einer Scheibchen- in eine irreguläre Sphäroidenform mit einer erheblich vergrößerten Oberfläche über.

Da kein für die kollageninduzierte Aggregation spezifischer Hemmstoff (mit Ausnahme gegen Gp Ia-IIa gerichteter Antikörper) bekannt ist, wird Acetylsalicylsäure (ASS) als Referenzsubstanz verwendet. Dieses wird in Form einer Lösung von 6.48 g/L des Lysinates in 1 mM HEPES<sup>5</sup>-Puffer (Aspisol<sup>®</sup>) verwendet. Eine Zugabe von 20 µl dieser Lösung zu einem Probenvolumen von 220 µl führt zu einer ASS-Konzentration von 1.6 mM, was zur vollständigen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt.

Die Aggregation wird durch Zugabe von 20 µl einer Kollagen-Lösung (Kollagen Reagenz Horm, Fa. Nycomed), die 8 µg/ml Kollagenfibrillen enthält, ausgelöst.

### 3.1.1.1 *N*-(Alkylamino)alkyl-1-phthalazinamine



---

<sup>5</sup> 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure

Verbindung	n	R'	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	m	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>10 a</b>	0	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	76
<b>10 b</b>	0	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	100
<b>10 c</b>	0	H	CH <sub>3</sub>	H	2	95
<b>10 d</b>	0	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	70
<b>10 e</b>	0	F	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	180 *
<b>10 f</b>	0	F	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	92
<b>10 g</b>	0	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	120
<b>10 h</b>	0	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	100 *
<b>10 i</b>	0	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	150
<b>10 j</b>	0	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	190
<b>10 k</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	160
<b>10 l</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	160
<b>10 m</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	H	2	140
<b>10 n</b>	1	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	100
<b>10 o</b>	1	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	100

Tab. 53: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 10

\*: Die Substanzen sind in DMSO schlecht löslich; es bleibt nach PRP-Zugabe ein feiner Niederschlag

Die Verbindungen dieser Klasse sind nur in geringem Maß aggregationshemmend. Die Dimethylaminoethyl-Verbindung **10 a** und das Diethylaminopropyl-Derivat **10 d** sind mit einem IC<sub>50</sub> von ca. 70 μM noch am aktivsten.

Eine Vergrößerung des Abstandes der Dialkylamino-Gruppe zu dem Phthalazinyl-Rest führt bei allen Verbindungen außer den 4-Fluor- und 4-Chlorphenyl-Derivat **10 f** bzw. **10 h** zu einer Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes.

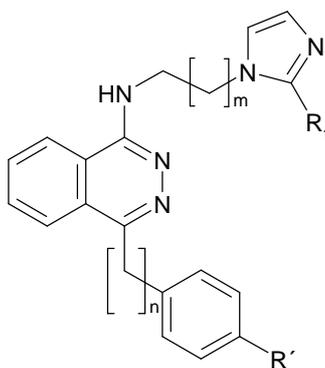
Ist der endständige Stickstoff mit Ethyl- statt mit Methyl-Gruppen substituiert, findet man bei der Phenylmethyl-Verbindung **10 n** eine geringe Steigerung der Wirkung von 160 μM auf 100 μM. Dieser Effekt lässt sich anhand der entsprechenden Phenyl-Derivate **10 a, d**, die gleich stark wirken, nicht reproduzieren.

Die beiden mit nur eine Methylgruppe substituierten Verbindungen **10 c** und **10 m** zeigen die gleiche Aktivität wie die entsprechenden Dimethyl-Derivate.

Eine Substitution am Phenylring (**10 e-j**) oder das Einbringen eines Methylen-Spacers zwischen Phthalazin und Phenylring (**10 k-o**) führt zu einer Verringerung der Aktivität. Dabei

scheint die Substitution am Phenylmethyl-System weniger stark aktivitätsmindernd zu sein, da die 4-Methoxyphenylmethyl-Verbindung **10 o** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 100  $\mu M$  um den Faktor 1.5 stärker wirkt als die Phenylmethyl-Verbindung **10 l**.

### 3.1.1.2 *N*-[ $\omega$ -(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine



**11 a-m**

Verbindung	n	R'	R <sub>1</sub>	m	IC <sub>50</sub> [ $\mu M$ ]
<b>11 a</b>	0	H	H	1	80
<b>11 b</b>	0	H	H	2	45
<b>11 c</b>	0	H	CH <sub>3</sub>	2	44
<b>11 d</b>	0	H	H	3	18
<b>11 e</b>	0	H	H	4	24
<b>11 f</b>	0	F	H	2	> 300 *
<b>11 g</b>	0	Cl	H	2	> 300 *
<b>11 h</b>	0	OCH <sub>3</sub>	H	2	> 300 *
<b>11 i</b>	1	H	H	1	170
<b>11 j</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	1	140
<b>11 k</b>	1	H	H	2	70
<b>11 l</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	2	78
<b>11 m</b>	1	OCH <sub>3</sub>	H	2	160 *

Tab. 54: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 11

\*: Die Substanzen sind in DMSO schlecht löslich; es bleibt nach PRP-Zugabe ein feiner Niederschlag

Eine Verlängerung der Kette zwischen Phthalazin und Imidazol führt bis zu einer Länge von vier Methylenruppen bei jedem Schritt zu einer Halbierung der zur halbmaximalen

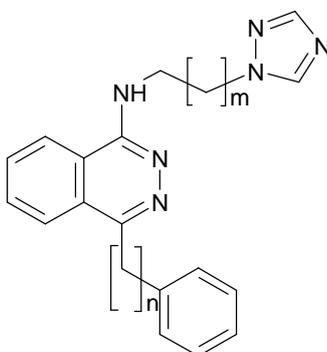
Hemmung benötigten Konzentration (**11 a**→**b**→**d**; **11 i**→**k**; **11 j**→**l**). Eine weitere Kettenverlängerung erhöht die  $IC_{50}$  wieder geringfügig (**11 d**→**e**).

Eine Methyl-Gruppe als Substituent in 2-Stellung des Imidazols hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Verbindungen.

Da alle am Phenylring substituierten Verbindungen (**11 f-h**) unter den Testbedingungen schlecht löslich sind, lässt sich leider keine Aussage über deren Wirkstärke treffen.

Wie auch schon bei den Aminoalkyl-Verbindungen vom Typ **10** bewirkt das Einbringen einer Methylengruppe zwischen Phthalazin und Phenylring (**11 i-m**) eine Verringerung der Aktivität.

### 3.1.1.3 *N*-[ $\omega$ -(1*H*-1,2,4-Triazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine



**12 a-f**

Verbindung	n	m	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
<b>12 a</b>	0	1	140
<b>12 b</b>	0	2	60
<b>12 c</b>	0	3	8.4
<b>12 d</b>	0	4	31
<b>12 e</b>	1	2	210
<b>12 f</b>	1	4	36

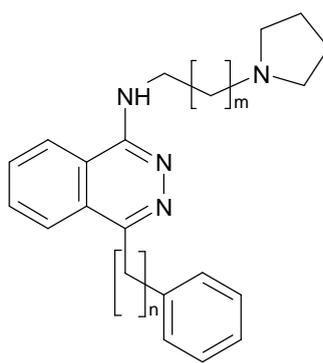
**Tab. 55: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 12**

Auch bei dieser Verbindungsklasse findet man eine Abhängigkeit der Wirkstärke von Anzahl der Methylengruppen zwischen Phthalazin und basischem Heterocyclus. Wiederum ist die Verbindung mit vier Methylengruppen (**12 c**) die aktivste Verbindung. Besonders auffällig ist die starke Zunahme an Wirkung, geht man von einem Propyl-Spacer (**12 b**) zu einem Butyl-Spacer (**12 c**) über. Die zur halbmaximalen Hemmung benötigte Konzentration erniedrigt sich

bei diesem Übergang um den Faktor sieben (von 60  $\mu\text{M}$  auf 8.4  $\mu\text{M}$ ). Eine weitere Kettenverlängerung bewirkt einen Rückgang der Wirkstärke um den Faktor 3.5.

Die Phenylmethyl-Derivate **12 e,f** zeigen wiederum eine geringere Aktivität als die Phenylderivate **12 a-d**.

### 3.1.1.4 *N*-[ $\omega$ -(Pyrrolidin-1-yl)alkyl]-1-pthtalazinamine



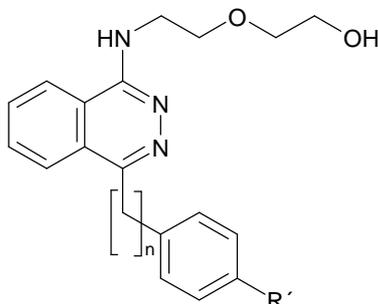
**13 a-c**

Verbindung	n	m	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
<b>13 a</b>	0	1	100
<b>13 b</b>	0	2	78
<b>13 c</b>	1	1	100

**Tab. 56: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 13**

Diese Verbindungen wirken recht schwach, eine deutliche Verstärkung der Wirkung bei Verlängerung der Alkylkette lässt sich nicht erkennen. Die Wirkstärke der Phenyl- (**13 a**) und der Phenylmethyl-Verbindung (**13 c**) ist, anders als bei den zuvor beschriebenen Substanzen, gleich.

### 3.1.1.5 *N*-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]-1-phthalazinamine<sup>6</sup>



14 a-f

Verbindung	n	R'	IC <sub>50</sub> [μM]
14 a	0	H	96
14 b	0	F	70
14 c	0	Cl	82
14 d	0	OCH <sub>3</sub>	> 300
14 e	1	H	180
14 f	1	OCH <sub>3</sub>	140

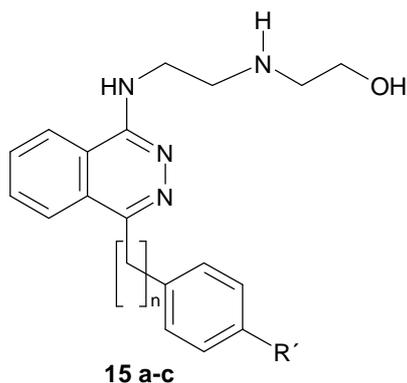
Tab. 57: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 14

Hier findet man eine von den vorherigen Befunden abweichende Struktur-Wirkungs-Beziehung. Waren bei den zuvor beschriebenen Verbindungen die am Phenylring substituierten Substanzen schlechter wirksam als die unsubstituierte, nimmt hier die Wirkstärke mit Abnahme der Elektronendichte im Phenylring zu. Die 4-Methoxy-Verbindung **14 d** wirkt am schwächsten, die 4-Fluor-Verbindung **14 b** am stärksten. Es ergibt sich also die Reihe OCH<sub>3</sub><H<Cl<F.

Der Einfluss der Substitution am Phenylmethyl-Rest ist gegenläufig, da hier die 4-Methoxy-Verbindung **14 f** etwas stärker wirkt als die unsubstituierte. Ein ähnlicher Effekt war auch schon bei den Alkylamino-Verbindungen vom Typ **11** (siehe Kapitel 3.1.1.1, Seite 79) aufgefallen.

<sup>6</sup> Diese Nomenklatur weicht von der nach IUPAC geforderten ab. Die korrekte Nomenklatur wird im experimentellen Teil verwendet.

### 3.1.1.6 2-(2-Hydroxyethylamino)ethyl-1-phthalazinamine<sup>7</sup>

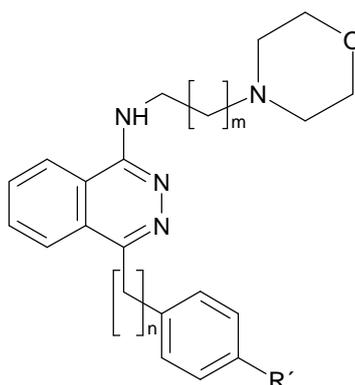


Verbindung	n	R'	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>15 a</b>	0	H	160
<b>15 b</b>	0	Cl	250
<b>15 c</b>	1	H	150

**Tab. 58: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 15**

Substitution des Ether-Sauerstoffes der zuvor beschriebenen Verbindungen durch eine Aminogruppe bewirkt eine Verringerung der Wirkung, insbesondere bei der 4-Chlorphenyl-Verbindung **15 b**. Diese wirkt um den Faktor 3 schlechter als der korrespondierende Ether **14 c**. Die Minderung der Wirkung ist bei der unsubstituierten Verbindung **15 a** weniger stark ausgeprägt (Faktor 1.6), die Phenylmethyl-Verbindung **15 c** wirkt in etwa gleich schwach.

<sup>7</sup> Diese Nomenklatur weicht von der nach IUPAC geforderten ab. Die korrekte Nomenklatur wird im experimentellen Teil verwendet.

3.1.1.7 *N*-[ $\omega$ -(Morpholin-4-yl)alkyl]-1-phthalazinamine (16)

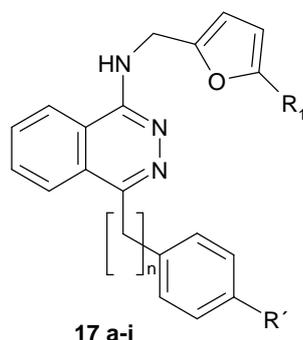
16 a-f

Verbindung	n	R'	m	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>16 a</b>	0	H	1	70
<b>16 b</b>	0	H	2	120
<b>16 c</b>	0	F	2	> 300 *
<b>16 d</b>	0	OCH <sub>3</sub>	2	180
<b>16 e</b>	1	H	1	> 300 *
<b>16 f</b>	1	OCH <sub>3</sub>	2	160 *

Tab. 59: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 16

\*: Die Substanz ist in DMSO schlecht löslich; es bleibt nach PRP-Zugabe ein feiner Niederschlag

Die meisten dieser Substanzen zeigen eine nur mäßige Hemmwirkung. Die beiden Phenyl-Verbindungen **16 a,b** wirken mit einer IC<sub>50</sub> von 70  $\mu$ M bzw. 120  $\mu$ M. Da die Verbindung mit dem kleinerem Abstand zwischen Phthalazin und basischem Substituenten in geringerer Konzentration hemmend wirkt, findet man hier eine Umkehr des bei den Imidazol- und Triazol-Derivaten gefundenen Trends.

3.1.1.8 *N*-(Furan-2-yl-methyl)-1-phthalazinamine

Verbindung	n	R'	R <sub>1</sub>	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>17 a</b>	0	H	H	28
<b>17 b</b>	0	H	CH <sub>3</sub>	10
<b>17 c</b>	0	F	H	> 300 *
<b>17 d</b>	0	F	CH <sub>3</sub>	33 *
<b>17 e</b>	0	Cl	H	51
<b>17 f</b>	0	OCH <sub>3</sub>	H	51 *
<b>17 g</b>	1	H	H	68
<b>17 h</b>	1	H	CH <sub>3</sub>	31
<b>17 i</b>	1	OCH <sub>3</sub>	H	50

Tab. 60: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 17

\*: Die Substanz ist in DMSO schlecht löslich; es bleibt nach PRP-Zugabe ein feiner Niederschlag

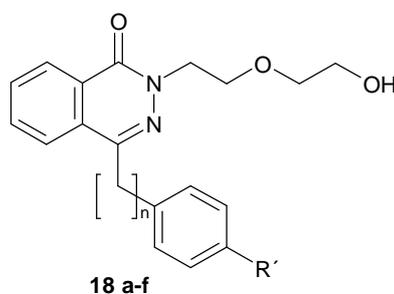
Von den im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Substanzen zeigen die Furfurylamin-substituierten Phthalazine **17 a-i** die ausgeprägtesten Effekte auf die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation.

Die am Phenylring substituierten Verbindungen **17 c-f** wirken schwächer als die unsubstituierten, was auch schon für die zuvor beschriebenen Substanzklassen **10-16** mit Ausnahme des Typs **14** zu beobachten war.

Eine Substitution mit einer Methyl-Gruppe am Furan-Ring in Position 5 ergibt eine Steigerung der Wirkung um den Faktor 2 (**17 a**→**b**, **17 g**→**h**). Aufgrund der überraschend schlechten Löslichkeit der Verbindung **17 c** wird diese aus dieser Betrachtung ausgeschlossen.

Erstaunlich ist die niedrige Hemmkonzentration der Verbindungen **17 d** und **f**, die schlecht löslich sind. Eine Erklärung dafür wäre, dass die ungelöste Substanz an die Thrombozyten adsorbiert und dann dank hoher Lipophilie durch die Membran aufgenommen wird. Um diese These zu überprüfen, wurde die Verbindung **17 f** für 20 min in PRP inkubiert. Durch die längere Kontaktzeit sollte eine Aufnahme der Substanz durch die Membran begünstigt sein und somit in höherer Konzentration intrazellulär zur Verfügung stehen. Bei diesem Versuch wurde eine geringfügige Linksverschiebung der Kurve gefunden, die  $IC_{50}$  erniedrigt sich von 51  $\mu\text{M}$  auf 39  $\mu\text{M}$ . Aufgrund des recht geringen Effektes ist eine Untermauerung der These so nicht möglich.

### 3.1.1.9 2-[2-(Hydroxyethoxy)-ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one



Verbindung	n	R'	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>18 a</b>	0	H	56
<b>18 b</b>	0	F	200
<b>18 c</b>	0	Cl	> 300
<b>18 d</b>	0	$\text{OCH}_3$	> 300
<b>18 e</b>	1	H	> 300
<b>18 f</b>	1	$\text{OCH}_3$	> 300

Tab. 61 : Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungsklasse 18

Von diesen Verbindungen zeigt nur **18 a** eine nennenswerte Hemmung der Thrombozytenaggregation. Sie wirkt halbmaximal in geringerer Konzentration (56  $\mu\text{M}$ ) als das strukturell verwandte Phthalazinamin **14 a** (96  $\mu\text{M}$ ). Im Gegensatz dazu wirken die am Phenylring substituierten Phthalazinamine **14 b-d** stärker als die entsprechenden Phthalazinone **18 b-d**.

### 3.1.1.10 Derivate der 2-[2-(Hydroxyethoxy)-ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one

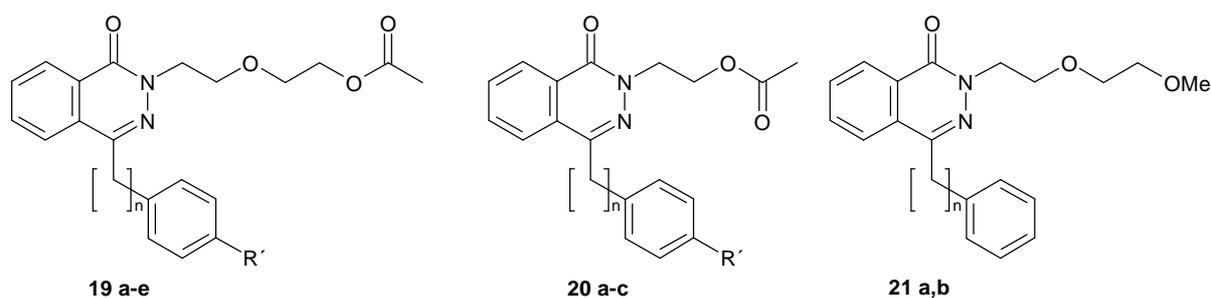


Abb. 73 :Derivate der 2-[2-(Hydroxyethoxy)-ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one

Sämtliche Verbindungen dieser Klasse (siehe Abb. 73) zeigten keine Hemmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*.

Da die Verbindungen vom Typ **21**, keine Wirkung *in vitro* zeigen ist anzunehmen, dass die endständige Hydroxyl-Gruppe essentiell ist.

Die acetylierten Alkohole **19 a-e** wurden der Vollständigkeit halber auch *in vitro* getestet, eine Wirkung wurde nicht erwartet. Vielmehr wurden sie in der Hoffnung dargestellt, die schlechte *in vivo* Wirkung der Verbindungen vom Typ **18** im Sinne einer verbesserten Resorption nach p.o. Gabe zu verbessern.

### 3.1.1.11 Weitere 4-Phenyl-(2H)-phthalazin-1-one

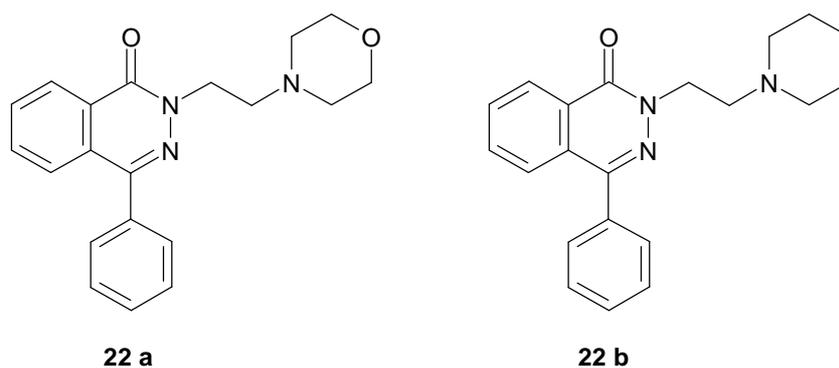


Abb. 74 : Weitere 4-Phenyl-(2H)-phthalazin-1-one

Diese Verbindungen, die hergestellt wurden um festzustellen ob ein heterocyclischer Substituent zu einer Verstärkung der Wirkung führt. Jedoch zeigen beide Substanzen keine Wirkung.

### 3.1.1.12 Amide der 3-(Arylalkyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäuren

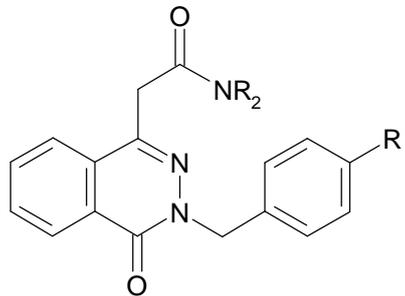


Abb. 75 : Amide der 3-(Arylalkyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäuren

Sämtliche Verbindungen dieser Klasse zeigen keine Hemmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*.

### 3.1.1.13 1-Alkylamino-6-phenyl-pyridazine

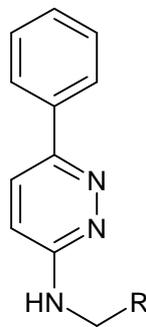


Abb. 76 : 1-Alkylamino-6-phenyl-pyridazine

Auch die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Vertreter dieser Verbindungsklasse zeigen keine Inhibition der Thrombozytenaggregation *in vitro*.

### 3.1.2 ADP-induzierte Aggregation

Nach heutigem Kenntnisstand wird die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation über zwei purinerge Rezeptoren vermittelt<sup>[57]</sup>.

Die Aktivierung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors führt Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und damit, wie im Kapitel 3.1.1 (Seite 78) beschrieben, zur Aktivierung der Thrombozyten. Der Mechanismus, nach dem die PLC aktiviert wird, ist noch umstritten. Die eine These geht von einer über ein G $\alpha$ q-Protein vermittelten PLC-Aktivierung aus<sup>[58]</sup>, andere Autoren diskutieren die Möglichkeit, dass die Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert wird und nachfolgend gebildetes Thromboxan A<sub>2</sub> die PLC aktiviert<sup>[59]</sup>.

Der erst vor kurzem geklonte P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor<sup>[60]</sup> (vormals auch mit P2<sub>T</sub> oder P2<sub>AC</sub> beziffert) inhibiert, nach dessen Aktivierung, über ein G $\alpha$ i2-Protein vermittelt<sup>[61]</sup>, die Adenylylcyclase. Die dadurch verringerte intrazelluläre Konzentration von cyclischem Adenosin-3,5-monophosphat (cAMP) hat vielfältige, teilweise noch nicht gesicherte Effekte. Beschrieben sind u.a. die Phosphorylierung und daraus resultierende Inhibierung von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren<sup>[62]</sup> durch von cyclischen Nucleotiden aktivierte Proteinkinase. Eine erniedrigte cAMP-Konzentration verhindert diese Reaktion und erleichtert somit die Freisetzung Ca<sup>2+</sup>-Ionen in das Cytoplasma. Auch die Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, die den Transport des Ca<sup>2+</sup> aus dem Cytosol bewerkstelligen, können durch die o.g. Protein-Kinasen aktiviert werden<sup>[63,64]</sup>. Auch gibt es Hinweise darauf, dass die durch cAMP stimulierte Proteinkinase den  $\beta$ -Strang des Gp Ib-Rezeptors durch Phosphorylierung inaktiviert<sup>[65]</sup>, was zu verminderter kollageninduzierter Aggregation führt.

Der Einfluss des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Thrombozytenaggregation ist noch wenig geklärt, zumal erst vor kurzem aufgeklärt wurde, dass ATP, welches meist als Verunreinigung in kommerziell erhältlichem ADP vorhanden ist, diesen Rezeptor stimuliert<sup>[66]</sup>. Stimulation mit ATP führt zu einem rasch abklingenden Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in den Thrombozyten, begleitet von einer Veränderung der Zellform<sup>[67]</sup> (siehe auch Kapitel 3.1.1, Seite 78). Da dieser Rezeptor von ADP inhibiert wird<sup>[56]</sup>, dieses aber in der Regel bei der Gewinnung von PRP freigesetzt wird, ist mit einem Einfluss dieses Rezeptors in unserem Testsystem nicht zu rechnen<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> Durch Zugabe von Apyrase zu mit Hirudin antikoaguliertem Blut lässt sich diese Inhibition verhindern.

Als Referenzsubstanz dient der für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation spezifische Hemmstoff 5′-(N-Ethylcarboxamido)-adenosin (NECA). Dieser hemmt in eine Konzentration von 1.6  $\mu$ M die Aggregation halbmaximal.

### **3.1.2.1 Auswahl der Testsubstanzen**

Es wurden Substanzen, die in besonders niedrigen Konzentrationen die kollageninduzierte Aggregation hemmen, ausgewählt.

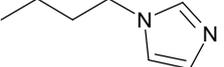
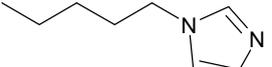
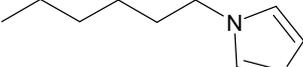
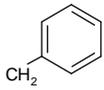
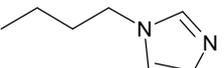
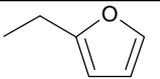
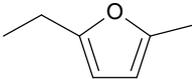
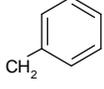
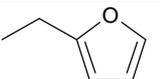
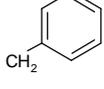
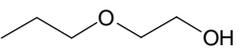
Von den N-[ $\omega$ -(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinaminen (Kapitel 3.1.1.2, Seite 81) wurde die Reihe der 4-Phenyl-Derivate **11 b,d,e** getestet, bei der die Kettenlänge zwischen Imidazol und Phthalazin variiert wurde. Als Vertreter der Phenylmethyl-Verbindungen wurde die Verbindung **11 k** in die Auswahl aufgenommen.

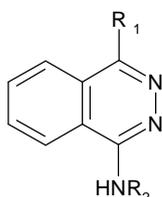
Von den dargestellten N-(Furan-2-yl-methyl)-1-phthalazinaminen (Kapitel 3.1.1.8, Seite 87) wurden die beiden Pheny-Derivate **17 a,b** sowie das Phenylmethyl Derivat **17 g** ausgewählt.

Mit der Verbindung **14 e** wurde auch eine Substanz mit offenkettigem Substituenten ausgewählt.

In der Tab. 62 im nachfolgenden Kapitel sind die getesteten Verbindungen strukturell zusammengefasst.

## 3.1.2.2 Vergleichende Testergebnisse

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> Koll / μm	IC <sub>50</sub> ADP / μm
<b>11 b</b>			45	45
<b>11 d</b>			20	25
<b>11 e</b>			24	65
<b>11 k</b>	 CH <sub>2</sub>		70	85
<b>17 a</b>			28	14
<b>17 b</b>			10	12
<b>17 g</b>	 CH <sub>2</sub>		68	120
<b>14 e</b>	 CH <sub>2</sub>		180	32



Tab. 62 : Vergleich der Testergebnisse

Es zeigt sich ein recht uneinheitliches Bild. Man findet niedrigere, höhere und auch unveränderte Hemmkonzentrationen.

Von den Imidazol-Derivaten nimmt das 5-(Imidazol-1-yl)pentyl Derivat **11 e** eine Sonderstellung ein (siehe Abb. 77). Sie zeigt bei der ADP-induzierten Aggregation eine um den Faktor drei erhöhte  $IC_{50}$ . Die beiden 3-(Imidazol-1-yl)propyl-Derivate **11 b** und **11 k** sowie die 4-(Imidazol-1-yl)butyl-Verbindung **11 d** sind unter beiden Versuchsbedingungen in etwa äquipotent.

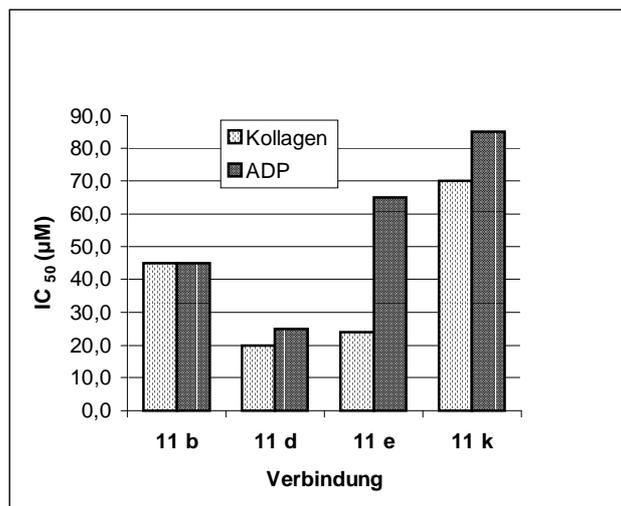


Abb. 77 : Vergleich der  $IC_{50}$  bei Induktion mit Kollagen oder ADP; Imidazol-Derivate

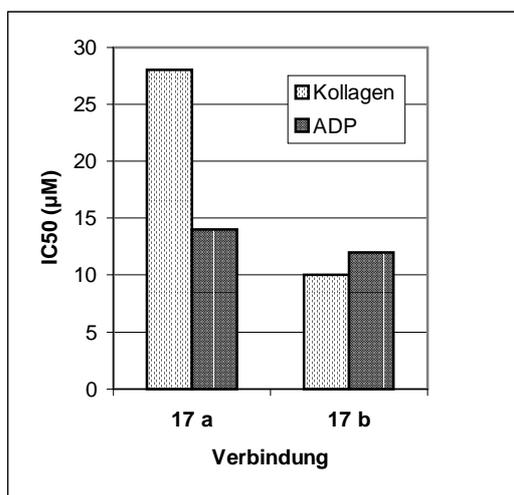


Abb. 78 : Vergleich der  $IC_{50}$  bei Induktion mit Kollagen oder ADP; Furan-Derivate

Das Furan-2-yl-methyl-Derivat **17 a** zeigt bei der ADP-induzierten Aggregation, verglichen mit Kollagen als Agens, schon bei einer um Faktor zwei niedrigeren Konzentration eine halbmaximale Hemmung. Das 5-Methyl-furan-2-ylmethyl-Derivat **17 b** ist in beiden Testmodellen äquipotent. Die Phenylmethyl-Verbindung **17 g** zeigt dagegen eine geringere Aktivität. Die  $IC_{50}$  steigt um den Faktor 2 wenn ADP statt Kollagen verwendet wird. Da die Hemmkonzentrationen dieser Verbindung in einem anderem Bereich (68 bzw. 120 µM) liegen, sind sie der Übersicht halber nicht mit in das Diagramm aufgenommen.

Die 2-(Hydroxyethoxy)ethyl-substituierte Verbindung **14 e** ist unter den Bedingungen der ADP-induzierten Aggregation um den Faktor 5.5 wirksamer. Das ist besonders bemerkenswert, wirken doch die beiden anderen Phenylmethyl-Verbindungen **11 k** und **17 g** unter diesen Bedingungen erst in relativ höheren Konzentrationen aggregationshemmend.

### **3.1.3 Serotonin-induzierte Aggregation**

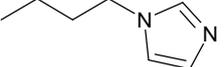
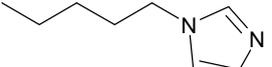
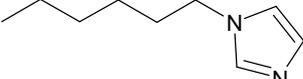
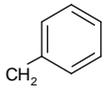
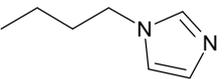
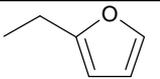
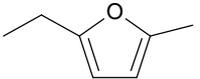
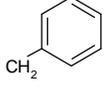
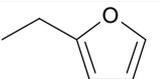
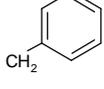
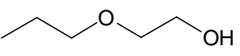
Auf der Oberfläche der Thrombozyten befinden sich Rezeptoren für Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) vom Subtyp 2A. Bindet Serotonin an diesen Rezeptor wird intrazellulär ein Gq-Protein aktiviert, welches wiederum die Phospholipase C aktiviert<sup>[68]</sup>. Die darauf folgenden pro-aggregatorischen Reaktionen sind bereits in Kapitel 3.1.1 (Seite 78) beschrieben worden.

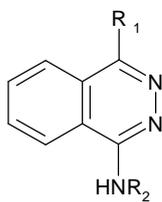
Als Vergleichssubstanz dient der für den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor spezifische Hemmstoff Imipramin Hydrochlorid. Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen hat dieser eine IC<sub>50</sub> von 1.2 µM.

#### **3.1.3.1 Auswahl der Testsubstanzen**

Es wurden die selben Substanzen wie für die ADP-induzierte Aggregation auch mit Serotonin als Aggregationsauslöser getestet.

## 3.1.3.2 Vergleichende Testergebnisse

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> Koll / μm	IC <sub>50</sub> 5-HT/ μm
<b>11 b</b>			45	12
<b>11 d</b>			20	<b>4.5</b>
<b>11 e</b>			24	37
<b>11 k</b>	 CH <sub>2</sub>		70	15
<b>17 a</b>			28	<b>2.5</b>
<b>17 b</b>			10	<b>6.5</b>
<b>17 g</b>	 CH <sub>2</sub>		68	17
<b>14 e</b>	 CH <sub>2</sub>		180	63



Tab. 63 : Vergleich der Testergebnisse

Mit Ausnahme der Verbindung **11 e** wirken alle Verbindungen mit Serotonin als Agens in geringerer Konzentration als mit Kollagen als Aggregationsstarter.

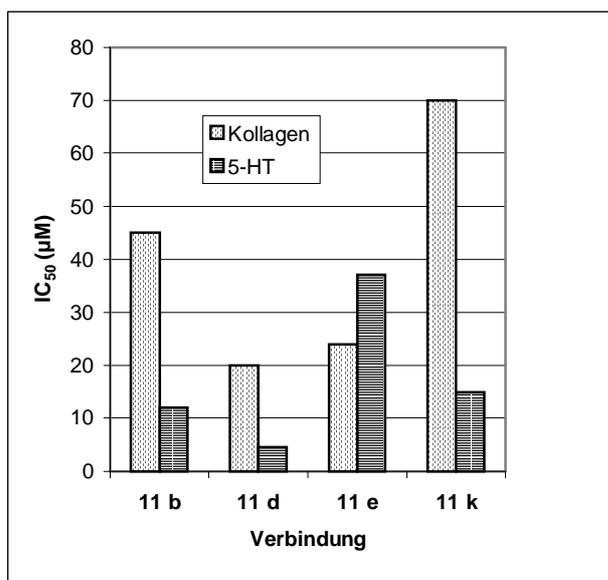


Abb. 79 : Vergleich der IC<sub>50</sub> bei Induktion mit Kollagen oder 5-HT, Imidazol-Derivate

Besonders auffällig ist die sehr niedrige IC<sub>50</sub> der Verbindung **17 a**, die um den Faktor 11 niedriger ist als in dem Kollagen-Test (2.5 µM versus 28 µM). Dieser Unterschied ist bei den beiden anderen Furan-Derivaten weniger stark ausgeprägt. Die IC<sub>50</sub> erniedrigt sich für **17 b** um den Faktor 1.5, für die Phenylmethylverbindung **17 g** um den Faktor 4.

Das offenkettige 2-(Hydroxyethoxy)ethyl-Derivat **14 e** zeigt, wie auch im ADP-Test, eine höhere Potenz im Vergleich zur Kollagen-Induktion. Es ist eine um den Faktor 3 niedrigere Konzentration nötig.

Die Imidazol-Derivate wirken mit 5-HT als Aggregationsinduktor schon in erheblich geringeren Konzentrationen halbmaximal. Die IC<sub>50</sub> erniedrigt sich um den Faktor vier Eine Ausnahme macht, wie schon bei der ADP-induzierten Aggregation, die Verbindung **11 e**. Für diese Verbindung erhöht sich die IC<sub>50</sub> auf das Eineinhalbfache.

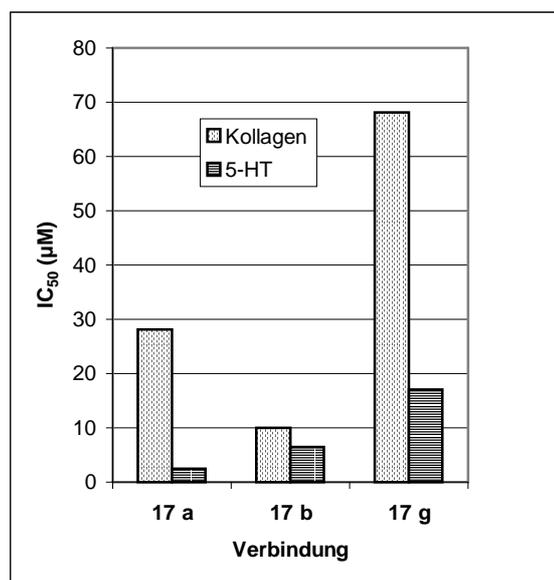


Abb. 80 :Vergleich der IC<sub>50</sub> bei Induktion mit Kollagen oder 5-HT, Furan-Derivate

Die besonders niedrige  $IC_{50}$  des N-(Furan-2-yl-methyl)-4-phenyl-1-pthtalazinamins (**17 a**) bei 5-HT-induzierter Thrombozytenaggregation spricht für eine Blockade des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors. Diese Verbindung wurde daher auch auf einen Rezeptor-Antagonismus getestet (siehe Kapitel 3.4, Seite 104). Da auch das am Furanring in 5-Stellung mit Methyl substituierte Derivat **17 b** eine Verringerung des  $IC_{50}$ -Wertes zeigt, scheint bei dieser Substanzklasse eine Modifikation dieses Restes toleriert zu sein. Die Hemmung ist also unspezifischer Natur. Um diese These zu untermauern, wäre allerdings noch eine Reihe weiterer Substituentenvariationen durchzuführen.

### 3.1.4 Bewertender Vergleich der Wirkung der Substanzen in den drei Testsystemen

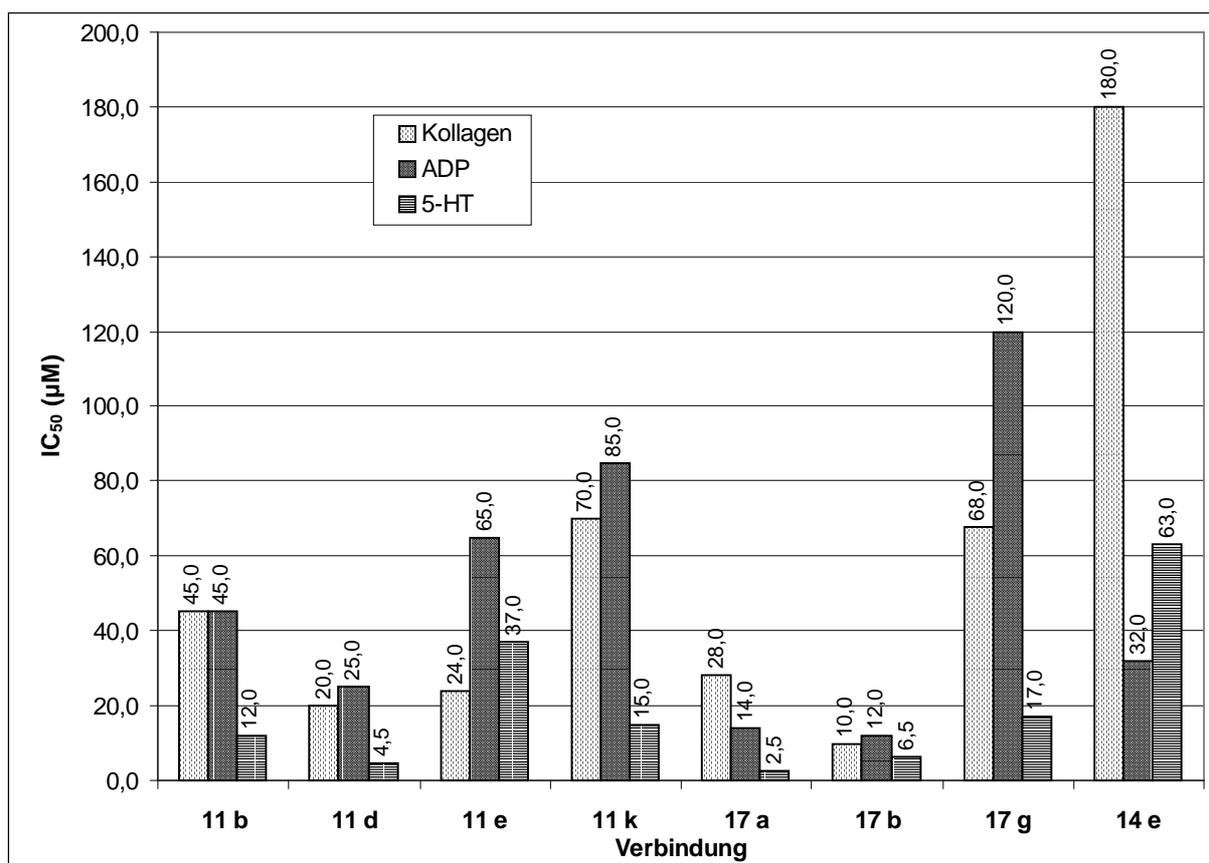


Abb. 81 : Vergleich der  $IC_{50}$  Werte bei Start der Aggregation mit verschiedenen Induktoren

Mit Ausnahme der Verbindungen **11 e** und **14 e** haben alle getesteten Substanzen die niedrigste halbmaximal wirkende Konzentration, wenn Serotonin als Auslöser der

Aggregation verwendet wird. Dies deutet darauf hin, dass der Eingriff der Substanzen in den Aggregationsmechanismus in der von Serotonin angestoßenen Kaskade liegt. Jedoch ist auch eine Tendenz der höheren Aktivität bei der von ADP-ausgelösten Aggregation zu erkennen, wenn auch nicht so konsistent.

Von den Imidazolderivaten nimmt die Verbindung **11 e** eine Sonderstellung ein. Sie hat die niedrigste  $IC_{50}$  in dem kollageninduzierten Test und zeigt mit den beiden anderen Induktoren erheblich weniger Wirkung als die beiden anderen Phenyl-Verbindungen **11 b**, **d**. Die in allen Tests potenteste Verbindung ist die mit vier Methylengruppen zwischen Phthalazin und Imidazol (Verbindung **11 d**). Die Phenylmethyl-Verbindung **11 k** zeigt ein dem Phenyl-Analogon **11 b** ähnliches Verhalten. Beide sind in dem 5-HT-induzierten Test ungefähr um den Faktor 4 potenter als in den beiden anderen Modellen, wobei jedoch von der Phenylmethyl-Verbindung jeweils ca. die doppelte Menge für gleiche Wirkung eingesetzt werden muss.

Eine Methyl-Substitution in 5-Stellung des Furan-Restes wirkt sich nur auf die kollageninduzierte Aggregation aus. Die entsprechend substituierte Verbindung **17 b** hat eine um den Faktor 2 niedrigere  $IC_{50}$  als die unsubstituierte. Das gleiche Verhältnis findet man auch für die Phenylmethyl-Verbindungen **17 g** und **17 h** (siehe Kapitel 3.1.1.8, Seite 87). Unerwartet ist die mit  $120 \mu\text{M}$  recht hohe  $IC_{50}$  von **17 g** bei der ADP induzierten Aggregation. Würde diese Verbindung sich ähnlich wie **17 a**, **b** verhalten würde man einen Wert  $<70 \mu\text{M}$  erwarten.

Erstaunlich ist die ADP-Spezifität der Aggregationshemmung der Verbindung **14 e**. Wird ADP zur Auslösung der Thrombozytenaggregation verwendet, benötigt man von dieser Substanz nur  $32 \mu\text{M}$  zur halbmaximalen Hemmung. Das ist, verglichen mit der von Kollagen ausgelösten Aggregation ( $180 \mu\text{M}$ ), ein Sechstel; ein Drittel im Vergleich mit Serotonin ( $63 \mu\text{M}$ ).

Aus den Testergebnissen lässt sich somit kein gemeinsamer Wirkmechanismus erkennen. Ich möchte jedoch einige Möglichkeiten ansprechen.

Denkbar wäre eine Inhibierung oder rasche Deaktivierung der Phospholipase C, die bei allen drei Wegen aktiviert wird. Auch eine Blockade der durch  $IP_3$  (welches von der PLC gebildet wird) aktivierten  $Ca^{2+}$ -Ionenkanäle wäre ein möglicher Wirkmechanismus.

Auch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die verschiedenen Substanzklassen über unterschiedliche Wege zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen können. So hat sich Substanz **17 g** als schwacher Aktivator der sGC erwiesen (siehe Kapitel 3.2). Die Verbindungen **17 a** und **17 g** zeigen auch eine Hemmung der PDE 5 (siehe Kapitel 3.3).

## 3.2 Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC)

YC-1 (siehe Abb. 5) ist ein Aktivator der sGC<sup>[14]</sup>, der über Bindung an einen regulatorischen Bereich dieses Enzyms wirkt<sup>[69,70]</sup>. Dieses Enzym wandelt Guanosinriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) um. Das cGMP ist ein second messenger-Molekül, das eine Vielzahl von Funktionen innehat. In den Thrombozyten bewirkt es u.a. über die Aktivierung der Protein Kinase G eine verringerte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  in das Cytosol<sup>[71]</sup>. Durch Inhibition der PLC<sup>[72]</sup> vermindert cGMP die Bildung von  $IP_3$  und bewirkt somit indirekt eine Erniedrigung des intracellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels (siehe auch Kapitel 3.1.1, Seite 78). Die Inhibierung der PDE 3 durch cGMP<sup>[64]</sup> führt, über Hemmung des Abbaus, zu einer Erhöhung der intracellulären cAMP-Spiegel.

Zusammengefasst führt eine Erhöhung der cGMP-Konzentration in den Thrombozyten zu einer Hemmung der Aggregation.

### 3.2.1.1 Testmethode

Die Substanzen wurden im Institut für Cardiovasculäre Forschung der Bayer AG getestet<sup>[73]</sup>. Dazu wurde rekombinante sGC für 10 min mit oder ohne Testsubstanz in einem Puffer inkubiert. Dieser Puffer enthält u.a.  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  als Substrat für die sGC. Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von Zinkacetat und Natriumcarbonat beendet. Nach Zentrifugation wird das im Überstand enthaltene  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$  durch Chromatographie über neutralem Aluminiumoxid gereinigt und die enthaltene Menge an  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$  durch Scintillationsmessungen bestimmt. Durch Vergleich mit dem Basalwert

kann die Stimulation der sGC bestimmt werden. Es wurden jeweils zwei Bestimmungen mit einer Testsubstanzkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Für die 100  $\mu\text{M}$  Konzentration der Testsubstanz wurde zusätzlich die Stimulation in Gegenwart von 0.1  $\mu\text{M}$  2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid (DEA/NO) einem NO-Donor getestet. NO ist der endogene Aktivator der sGC, so dass eine eventuelle Additivität der Stimulation beobachtet werden kann.

### 3.2.1.2 Auswahl der Testsubstanzen

Es wurden drei Imidazolylalkyl-substituierte und zwei Furfurylmethyl-substituierte Phthalazinamine ausgewählt. Als Vertreter der Phthalazinone wurde das 2-[(2-Hydroxyethoxy)ethyl]-4-phenyl-phthalazin-1(2H)-on (**18 a**) ausgewählt. Mangels antiaggregatorischer Wirkung wurden weder Amide der 3-(Arylalkyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäuren noch Pyridazinamine getestet. Die nachfolgende Abb. 82 veranschaulicht die Struktur der Testverbindungen.

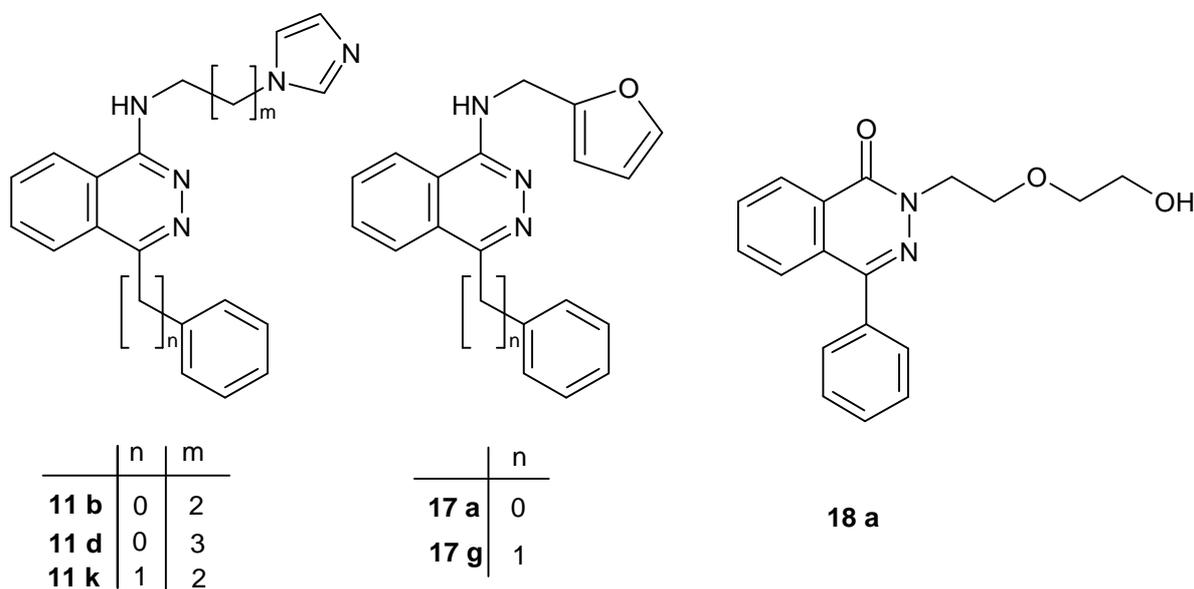


Abb. 82 : Ausgewählte der Testsubstanzen

### 3.2.1.3 Ergebnisse

Von den getesteten Substanzen zeigt nur **17 g** eine Stimulation der sGC.

Diese Stimulation ist von der Konzentration abhängig. Liegt die Substanz in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vor, ist die Aktivität der sGC lediglich um den Faktor 5 erhöht. In der niedrigeren Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) ist die Stimulation nur 2-fach. In Gegenwart von DEA/NO findet man eine 83-fache Stimulation, DEA/NO alleine bewirkt eine Erhöhung der Basal-Aktivität um den Faktor 47.

Unter den gleichen Testbedingungen bewirkt 100  $\mu\text{M}$  YC-1 eine Erhöhung der Aktivität um den Faktor 93, in Gegenwart von DEA/NO um den Faktor 550.

Eine über die Aktivierung dieses Enzyms vermittelte Hemmung der Aggregation ist also eher unwahrscheinlich.

### **3.3 Hemmung der Phosphodiesterasen (PDEs)**

Phosphodiesterasen katalysieren den Abbau von cyclischen Nucleotiden zu den entsprechenden Monophosphaten. Eine Hemmung der PDEs erhöht also die Konzentration der cyclischen Nucleotide. Es sind eine Vielzahl von PDEs bekannt, die sich durch ihre Substratspezifität, Cofaktoren und Gewebsverteilung unterscheiden. Zur Zeit sind elf Familien der PDEs (PDE 1-11) bekannt<sup>[74]</sup>.

Von diesen ist die cGMP bindende cGMP abbauende PDE 5 von besonderem Interesse, da diese in Thrombozyten in großer Menge vorhanden ist<sup>[75]</sup>.

Die Effekte, die mit einer Erhöhung der Konzentration von cGMP einhergehen, sind schon im vorigen Kapitel 3.2 beschrieben.

#### **3.3.1 Testmethode**

Die Substanzen wurden im Institut für Cardiovasculäre Forschung der Bayer AG getestet<sup>[76]</sup>.

Dazu wurde das von Amersham Bioscience angebotene PDE-Assay-Kit (TRKQ7100) nach Produktbroschüre verwendet. Es handelt sich hierbei um einen „scintillation proximity assay“ (SPA). Dieser beruht auf der spezifischen Bindung des 5'-GMP an mit entsprechenden Antikörpern beschichteten Mikropartikeln (Perlen mit einem Durchmesser von ca. 2.2  $\mu\text{m}$ ). Diese bestehen aus Yttrium-Silikat, einem gängigen Szintillations-Agens. Als Substrat für die eingesetzte humane rekombinante PDE 5 wurde mit Tritium markiertes 3',5'-[<sup>3</sup>H]cGMP verwendet, welches nicht an die PSA-Perlen bindet. Das an die SPA-Perlen gebundene, durch PDE-vermittelte Hydrolyse gebildete, 5'-[<sup>3</sup>H]GMP, erzeugt bei Zerfall  $\beta$ -Strahlen, die bei Auftreffen auf das Yttriumsilikat einen Szintillations-Blitz hervorrufen. Diese Szintillations-



wäre. Jedoch spricht das recht unterschiedliche Verhalten der beiden Substanzen in den Born-Test gegen eine solchermaßen vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation (siehe auch Kapitel 3.5, Seite 107).

### 3.4 Blockade des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors

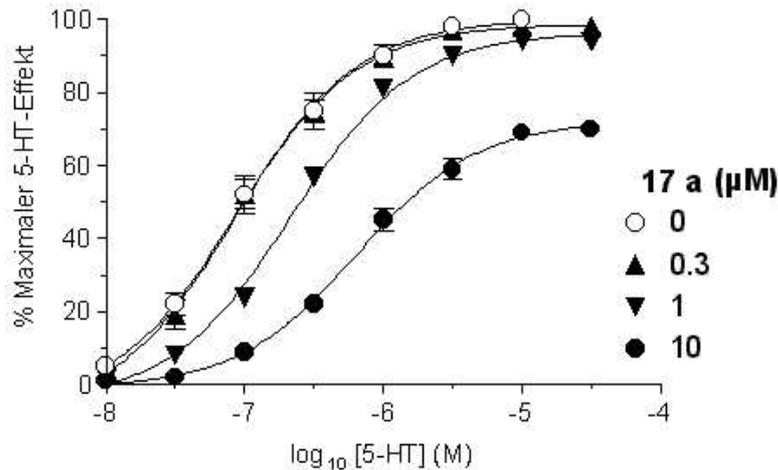
Bindet Serotonin an den dafür spezifischen Rezeptor an der Thrombozytenoberfläche (5-HT<sub>2A</sub>), führt dies zu proaggregatorischen Reaktionen im Zellinneren (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 95). Diese können durch Blockade des Rezeptors unterdrückt werden. Ein bekannter, über diesen Mechanismus wirkender Stoff, ist das Sarpogrelat<sup>[78]</sup>. In Kapitel 3.1.3.2 (Seite 96) konnte gezeigt werden, dass sieben von acht getesteten Verbindungen mit Serotonin als Induktor - im Vergleich mit Kollagen - in geringerer Konzentration die Thrombozytenaggregation hemmen. Besonders die Verbindung **17 a** tat sich dabei hervor, da sie mit Serotonin als Induktor eine IC<sub>50</sub> von 2.5 µM aufzeigt. Dies ist die niedrigste im Rahmen dieser Arbeit gefundene IC<sub>50</sub>. Wird Kollagen als Auslöser verwendet, ist eine Konzentration von 28 µM zur halbmaximalen Hemmung nötig. Dieser Befund lässt eine Hemmung der Aggregation über Blockade des Serotonin-Rezeptors vermuten. In einem *in vitro*-Modell lässt sich die Fähigkeit einer Substanz zur Blockade des Rezeptors überprüfen.

#### 3.4.1 Durchführung

Die Versuche wurden von Dr. Pertz im Institut für Pharmazie der FU Berlin durchgeführt<sup>[78]</sup>. Männliche *Wistar*-Ratten (280 – 350 g) wurden durch Dekapitieren getötet und die Schwanzarterie (ventrale Kaudalarterie) nach dem Entbluten der Tiere unverzüglich herauspräpariert. Die Arterie wurde sorgfältig von anhaftendem Bindegewebe befreit und vorsichtig auf einen stumpfen Edelstahldraht ( $d = 0,3$  mm) aufgezogen, um das Endothel zu zerstören. Nach Entfernen des Drahtes wurde die Arterie in 4 zylindrische Segmente von 4 – 5 mm Länge zerteilt, die zwischen je zwei stumpfe L-förmige Edelstahlhäkchen ( $d = 0,15$  mm) horizontal positioniert wurden, indem diese vorsichtig in das Lumen eingeführt wurden, um die Registrierung von kontraktile Effekten zu ermöglichen. Die Präparate wurden in Organbäder von 20 mL Fassungsvermögen eingehängt, die mit modifizierter *Krebs-Henseleit*-Lösung der folgenden Zusammensetzung (in mM) gefüllt waren: NaCl 118, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> 2,5, MgSO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25 und *D*-Glucose x H<sub>2</sub>O 10. Die Lösung wurde

kontinuierlich mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast und auf eine konstante Temperatur von 37 °C erwärmt. Die Präparate wurden mit einem elektromechanischen Druckwandler (Transducer TF6V5, W. Fleck, Mainz) sowie einem Verstärker (TSE Transducer Coupler 4711) und einem Schreiber (Siemens Kompensograph C1016) zur kontinuierlichen Aufnahme isometrischer Spannungsänderungen verbunden. Eine Ruhekraft von 5 mN wurde zu Beginn des Experiments eingestellt. Während einer nachfolgenden Stabilisierungsperiode von 30 min wurden die Organe zweimal jeweils nach 15 min nachgespannt. Nach Ende der Stabilisierungsperiode wurde die Ruhekraft von 5 mN nicht mehr manuell verändert. Anschließend wurden die Präparate für weitere 90 min äquilibriert. Während dieser Phase erfolgte nach 30 min eine Vorstimulation der Organe mit 1 µM 5-HT. Die Badflüssigkeit wurde regelmäßig (alle 30 min) ausgetauscht. Drei Konzentrations-Wirkungskurven für 5-HT wurden im Abstand von 70 min an jedem arteriellen Segment in kumulativer Technik aufgenommen, wobei die Badkonzentration von 10 nM 5-HT bis zur Maximalkontraktion in geometrischen Schritten gesteigert wurde. Die nächsthöhere Konzentration an 5-HT wurde erst nach Ausbildung eines stabilen Effekts als Folge der vorausgegangenen Konzentration vorgelegt. **17 a** wurde 30 min vor der zweiten bzw. dritten Konzentrations-Wirkungskurve inkubiert. Die Experimente wurden in ständiger Gegenwart von Prazosin (0.1 µM) zur Blockade von α<sub>1</sub>-Adrenozeptoren und Cocain (6 µM) zur Hemmung des neuronalen 'uptakes' durchgeführt.

### 3.4.2 Ergebnis



**Abb. 84 : Antagonismus der 5-HT-induzierten Kontraktion durch 17 a an der Rattenschwanzarterie. Gezeigt werden kumulativ aufgenommene Konzentrations-Wirkungskurven für 5-HT in Abwesenheit und Anwesenheit von 17 a. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 4 Experimenten.**

Die Verbindung bewirkte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  einen konzentrationsabhängigen Antagonismus der kontraktile Effekte von 5-HT. In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führte **17 a** zu einer Rechtsverschiebung der Agonisten-Konzentrations-Wirkungskurve, wobei die maximale Wirkungsstärke um 30% vermindert wurde. Da der maximale Effekt von Serotonin nicht durch entsprechend höhere Konzentrationen erzeugt werden konnte, ist die Hemmung als nicht-kompetitiv zu bezeichnen.

Für **17 a** wurde die Antagonisten-Dissoziationskonstante bzw. deren negativer Logarithmus ( $\text{pA}_2$ -Wert) bestimmt. Der  $\text{pA}_2$ -Wert wurde nach der Methode von Furchgott<sup>[79]</sup> nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{pA}_2 = -\log_{10} c(\text{B}) + \log_{10} (r - 1)$$

wobei man unter  $c(\text{B})$  die Konzentration des verwendeten Antagonisten und unter  $r$  ("concentration-ratio") den Quotienten aus den  $\text{EC}_{50}$ -Werten des Agonisten in Anwesenheit und Abwesenheit des Antagonisten versteht. Dabei ist hier aufgrund der auf 70 % verminderten Maximalwirkung für die  $\text{EC}_{50}$  in Anwesenheit des Antagonisten die zur 35 %-igen Hemmung nötige Konzentration von 5-HT einzusetzen.

Der  $pA_2$ -Wert betrug  $5.78 \pm 0.08$  ( $n = 4$ ). Bei den angegebenen Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler der Mittelwerte).

Dies bedeutet, dass eine Konzentration von  $1.7 \mu\text{M}$  **17 a** benötigt wird, um die Konzentrations-Wirkungs-Kurve um den Faktor zwei nach rechts zu verschieben.

Somit erwies sich **17 a** als nicht-kompetitiver Antagonist von 5-HT am  $5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptor der Rattenschwanzarterie. Jedoch ist es kein klassischer nicht-kompetitiver Antagonist, da neben der Depression der maximalen Wirkstärke auch eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu finden ist. Dies deutet auf eine erschwerte Verdrängung des Antagonisten (**17 a**) durch den Agonisten (5-HT) hin, die in der Fachliteratur mit „unsurmountable“ bezeichnet wird.

### 3.5 Zusammenfassung und Bewertung der *in vitro* Testergebnisse

Viele der im Rahmen diese Arbeit dargestellten Verbindungen zeigen nur mäßige ( $IC_{50} > 150 \mu\text{M}$ ; Kollagen als Auslöser) oder keine Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Nennenswerte Wirkung zeigen jedoch zahlreiche Vertreter der Substanzklassen **11**, **12**, **14**, **17** und **18** (siehe Abb. 85).

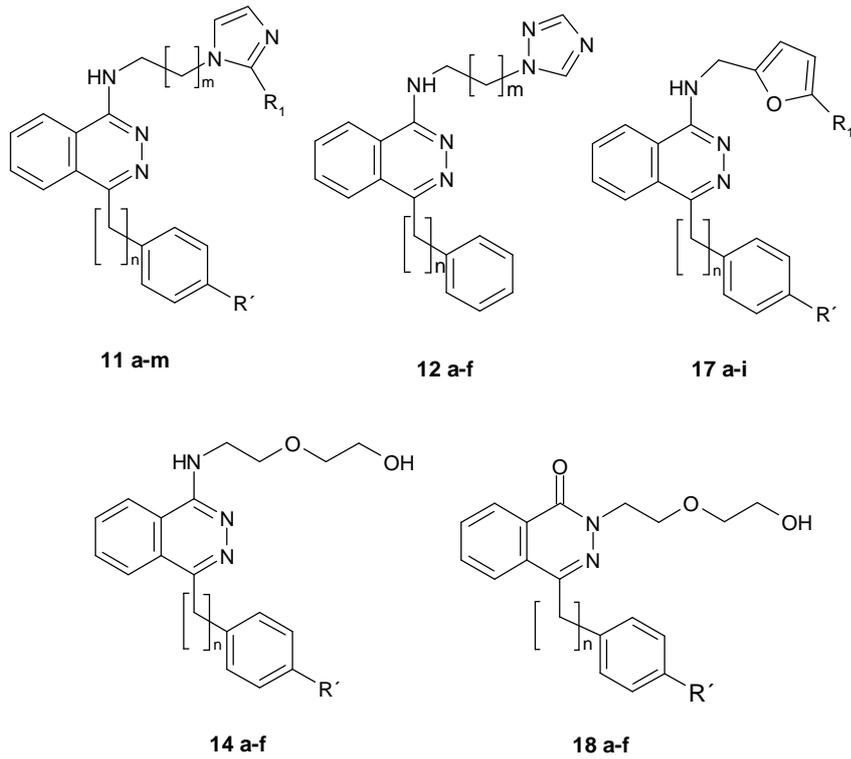


Abb. 85 : Aggregationshemmende Verbindungen

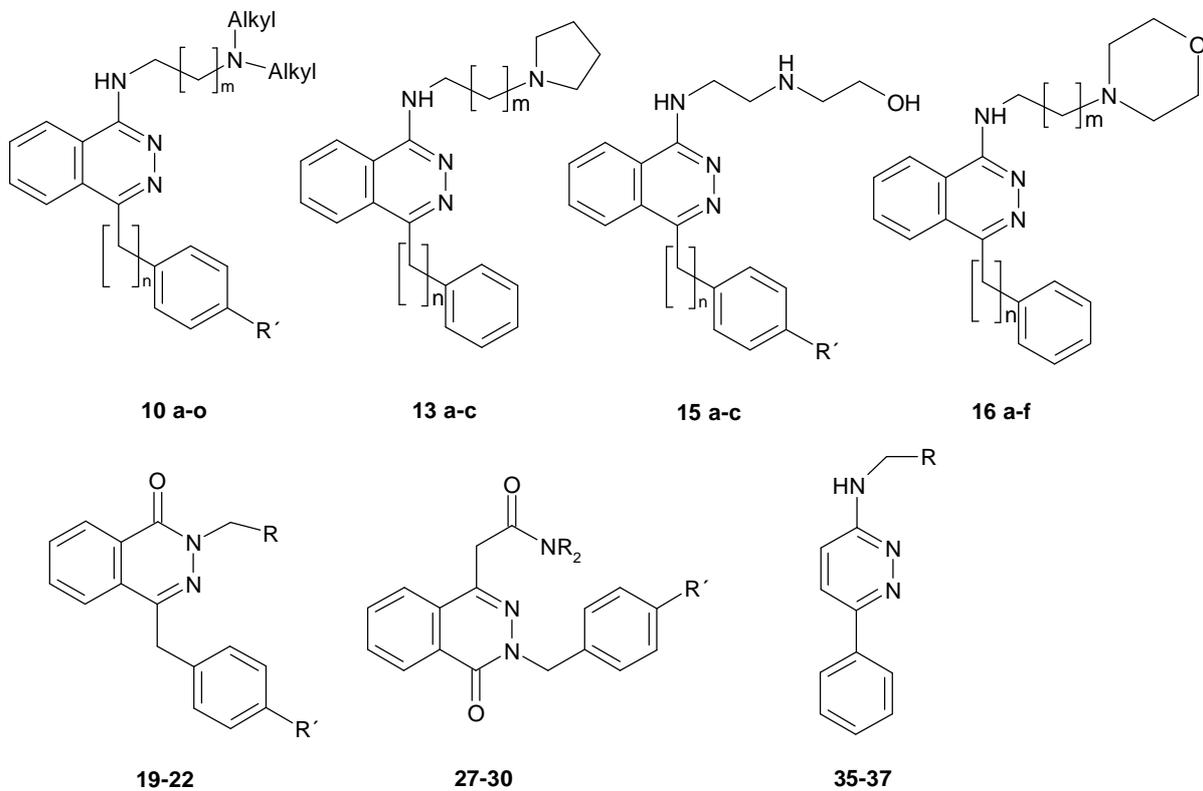


Abb. 86 : Verbindungen ohne Hemmwirkung

Keine oder nur eine schwach ausgeprägte ( $IC_{50} > 150 \mu M$ ) Hemmung der Thrombozytenaggregation zeigen die zu den 1-Phthalazinaminen zugehörigen Verbindungsklassen **10**, **13**, **15** und **16**. Mit Ausnahme der 2-(2-Hydroxyethoxy)-

substituierten 4-Arylphthalazin-1-one (**18 a-f**) sind alle weiteren 4-Aryl- und 4-Arylalkylphthalazin-1-one **19-22** gerinnungsphysiologisch inaktiv. Weder die Amide der 3-(Arylalkyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäuren **27-30** noch die 6-Phenyl-3-pyridazinamine **35-37** hemmten die Aggregation von Thrombozyten *in vitro* (siehe Abb. 86).

Die von Kollagen ausgelöste Aggregation wird von Verbindungen der Klassen **11**, **14** und **17** in besonders niedrigen Konzentrationen gehemmt (siehe Kapitel 3.1.1 ff). Einige Vertreter dieser Verbindungsklasse wurden auch auf ihre Hemmwirkung bei von ADP- und Serotonin- ausgelöster Aggregation untersucht. Dabei fanden sich einige erstaunliche Antagonisten-Spezifitäten (siehe Kapitel 3.1.4). Hervorheben möchte ich hier noch einmal die ADP-Spezifität der Hemmung von **14 e**. Auffällig ist auch die bei den meisten Verbindungen stark verringerte  $IC_{50}$ , wenn Serotonin als Auslöser der Aggregation verwendet wurde. Besonders stark ist diese Verminderung bei der Verbindung **17 a**, hier findet man eine Abnahme der  $IC_{50}$  um den Faktor 11 (von 28  $\mu$ M auf 2.5  $\mu$ M).

Die beiden Furanylmethyl-substituierten Verbindungen **17 a,g** zeigen eine Hemmung der PDE 5 in gleicher Konzentration ( $IC_{50} = 10 \mu$ M). Ihr Verhalten in den Born-Tests spricht jedoch gegen eine über die Hemmung dieses Enzyms vermittelte Hemmung der Aggregation. Zwar ist eine unterschiedliche  $IC_{50}$  der beiden Verbindungen bei verschiedenen Induktoren (aufgrund unterschiedlicher Aktivierungswege) durchaus nachvollziehbar, doch sollte die Veränderung der  $IC_{50}$  bei Variation des Induktors für beide Verbindungen dann in der gleichen Größenordnung zu finden sein. Jedoch verändert sich die  $IC_{50}$  für **17 a** beim Übergang von Kollagen auf ADP um den Faktor 0.5 (von 28  $\mu$ M auf 14  $\mu$ M) für **17 g** findet man einen Faktor von 1.8 (von 68  $\mu$ M auf 120  $\mu$ M). Übergang von ADP als Aggregationsstarter zu Serotonin äußert sich bei Verbindung **17 a** in einer Abnahme der  $IC_{50}$  um den Faktor 5.6, für **17 g** findet man eine Abnahme um den Faktor 7. Auch eine unterschiedliche Plasmaprotein-Bindung, und damit unterschiedliche Verfügbarkeit für die PDE 5, sind aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Verbindungen **17 a** und **17 g** eher unwahrscheinlich.

Da sich eine Blockade des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors durch die Verbindung **17 a** in der gleichen Konzentration wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation zeigen ließ, ist es recht wahrscheinlich, dass die antiaggregatorische Wirkung dieser Substanz auf diese Weise vermittelt wird. Die strukturellen Ähnlichkeiten lassen vermuten, dass die anderen Vertreter der Substanzklasse **17** auch über eine Blockade des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors wirken. Für die

Verbindungsklasse **11** lässt sich, aufgrund der recht großen strukturellen Unterschiede, eine solche Vermutung ohne weitere Tests nicht begründen.

### 3.6 Bestimmung der Thrombusbildung *in vivo*

Die *in vitro* Testmodelle haben den großen Nachteil, dass physiologische Faktoren nicht berücksichtigt werden. Im Allgemeinen sind das Resorption, Distribution, Metabolismus und Bioverfügbarkeit. Für die Blutgerinnung sind aber noch speziellere Einflüsse wie Blutdruck, Gefäßdurchmesser, Endothelbeteiligung, Scherströmungen und Viskosität des Blutes von Bedeutung. Deshalb ist es nötig, die Substanzen in einem *in vivo* Modell zu testen, in dem all diese Faktoren berücksichtigt werden. In dem Arbeitskreis Rehse ist dazu ein Laser-Thrombose-Modell etabliert (siehe Abb. 87). Dieses basiert auf Versuchen von Weichert<sup>[80]</sup> und Seiffge<sup>[81]</sup>. Etabliert wurde es von Kesselhut<sup>[82]</sup> und Schein<sup>[83]</sup>. Ciborski<sup>[84]</sup> standardisierte die Meßmethode und entwickelte neue Verfahren zur statistischen Auswertung.

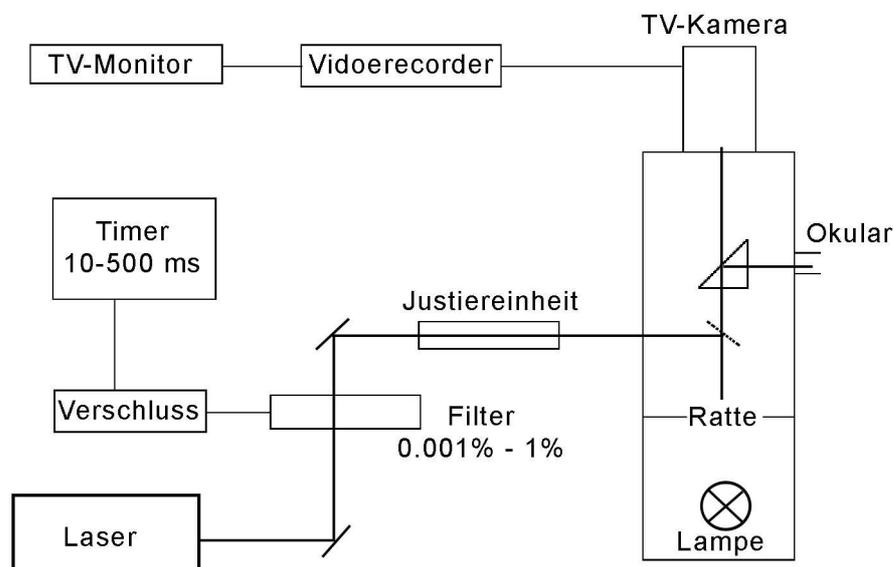


Abb. 87 : Schematischer Aufbau des Laser-Thrombose-Modells

**Methode :**

Mesenterialgefäße von jungen männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-180 g werden freigelegt und durch Beschuss mit einem Argon-Laser geschädigt. In Folge des Laserbeschusses werden Kollagenfasern des subendothelialen Gewebes freigelegt und ADP von zerstörten Zellen freigesetzt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Thrombozytenaggregation und es bildet sich ein hauptsächlich aus Thrombozyten bestehender sog. weißer Thrombus. Dessen Bildung lässt sich durch das Mikroskop verfolgen.

**Versuchdurchführung :**

Die Verbindungen werden durch eine Kanüle per os appliziert. Die Substanzen werden mit 1% Gummi Arabicum zu einer Suspension verarbeitet. Die Dosis beträgt 60 mg/kg Körpergewicht. Nach zwei Stunden wird das Mesenterium freigelegt und die laserinduzierte Thrombusbildung beobachtet.

**Auswertung :**

Die pro Gefäßstelle (Arteriolen bzw. Venolen) benötigte Anzahl an Laserschüssen, die zur Bildung eines Thrombus nötig waren, wurden gezählt. Ein Thrombus lag dann vor, wenn er wenigstens die Größe eines Leukozyten (10-12  $\mu\text{M}$ ), also den 10-fachen Durchmesser eines einzelnen Thrombozyten, erreichte. Konnte auch nach fünf Laserschüssen noch keine Bildung eines Thrombus beobachtet werden, wurde die Untersuchung an dieser Gefäßstelle beendet und eine Expositionszahl von sechs notiert. Die Testsubstanzen wurden an fünf Tieren untersucht, pro Tier wurde an jeweils sechs Stellen der Arteriolen und der Venolen ein Laserbeschuss vorgenommen. Zur Kontrolle dienten jeweils neun Tiere.

**Thrombusbildungsindex (TBI) :**

Der TBI ist das Maß für die Wirkstärke einer Substanz. Er berechnet sich aus dem Quotient aus der Summe der benötigten Laserschüsse und der Anzahl der untersuchten Gefäßstellen je Tier und Gefäßart. Er gibt also die durchschnittliche Anzahl an Laserschüssen an, die zu Thrombenbildung je Tier und Gefäßart nötig waren.

**Mittlerer Thrombusbildungsindex (mTBI) :**

Der mTBI ist das arithmetische Mittel aus einer Messreihe mit einer bestimmten Anzahl von Tieren. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse verschiedener Experimentatoren

wird der mTBI in den Thrombusbildungsindex umgerechnet. Dieser gibt dann die zu erwartende prozentuale Hemmung der Thrombusbildung an. Dazu wird je Gefäßart der mTBI des Kontrollwertes auf 0 % gesetzt und der maximale mTBI auf 100 % festgelegt. Es ergibt sich somit folgende Rechnung<sup>[84]</sup> :

$$\text{Hemmung der Thrombusbildung (\%)} = \frac{\text{mTBI (Test)} - \text{mTBI (Kontrolle)}}{6 - \text{mTBI (Kontrolle)}} \times 100$$

Die Standardabweichung  $s$  und der Standardfehler  $s_x$  berechnen sich nach den üblichen Gleichungen<sup>[85]</sup>.

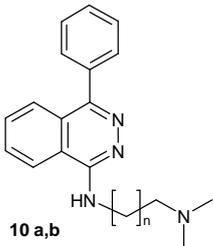
Die Signifikanz der durchgeführten Messreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-Tests nach Wilcoxon, Mann und Whitney<sup>[86]</sup> überprüft. Ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $P$ ) größer 0.1, wird das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.) gewertet.

In aller Regel findet man nur bei Hemmung der Thrombusbildung von mehr als 5 % eine signifikante Wirkung.

Aufgrund der großen Anzahl im Arbeitskreis synthetisierter Verbindungen und geringer Kapazität des Testmodells, konnte nur eine Auswahl von Verbindungen *in vivo* getestet werden.

### 3.6.1 4-Aryl- und 4-Arylalkyl-1-phthalazinamine

#### 3.6.1.1 [N- $\omega$ -(Dimethylamino)alkyl]-4-phenyl-1-phthalazinamine

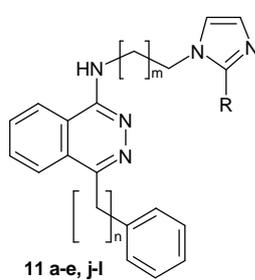
	Verbindung	n	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$	% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$
<b>10 a</b>	1	76	<b>7</b> $\pm$ 2	0.01	<b>0</b> $\pm$ 1	<b>n.s.</b>	
<b>10 b</b>	2	100	<b>6</b> $\pm$ 1	0.05	<b>0</b> $\pm$ 1	<b>n.s.</b>	

Tab. 64 : Hemmung der Thrombusbildung durch [N- $\omega$ -(Dimethylamino)alkyl]-4-phenyl-1-phthalazinamine

Beide Verbindungen zeigen eine geringe Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen, in den Venolen sind beide unwirksam. Die Unterschiede in der Wirkung sind so gering, dass sich daraus keine Strukturabhängigkeit erkennen lässt.

#### 3.6.1.2 N-[ $\omega$ -(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine

Da die *in vitro* Ergebnisse recht vielversprechend waren (siehe Kapitel 3.1.1.2 , Seite 81; Kapitel 3.1.4, Seite 98) wurde eine etwas größere Anzahl von Verbindungen diesen Typs getestet.

 <b>11 a-e, j-l</b>	Ver-				IC <sub>50</sub> [μM] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
	bin-	n	m	R		Arteriolen		Venolen	
	dung					% ±s <sub>x</sub>	P ≤	% ±s <sub>x</sub>	P ≤
<b>11 a</b>	0	1	H		80	2 ± 1	n.s.	1 ± 1	n.s.
<b>11 b</b>	0	2	H		45	7 ± 1	0.01	4 ± 1	0.05.
<b>11 c</b>	0	2	CH <sub>3</sub>		44	8 ± 1	0.01	4 ± 1	0.05.
<b>11 d</b>	0	3	H		18	7 ± 1	0.01	2 ± 1	n.s.
<b>11 e</b>	0	4	H		24	4 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
<b>11 j</b>	1	1	CH <sub>3</sub>		140	6 ± 1	0.02	1 ± 1	n.s.
<b>11 k</b>	1	2	H		70	2 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
<b>11 l</b>	1	2	CH <sub>3</sub>		78	3 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.

Tab. 65 : Hemmung der Thrombusbildung durch N-[ω-(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine

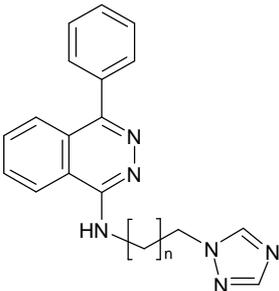
Die maximale Wirkung dieser Substanzklasse zeigt die (2-Methyl-imidazol-1-yl)propyl-substituierte Verbindung **11 c** mit einer Hemmung der arteriellen Thrombusbildung von 8 %. Die am Imidazol unsubstituierte Verbindung **11 b** wirkt mit 7 %-iger Hemmung nur geringfügig schlechter. Eine Kettenverlängerung von drei auf vier Methylengruppen (**11 b** → **11 d**) bewirkt keine Änderung der *in vivo*-Aktivität. Sowohl eine Verkürzung auf zwei (**11 a**) als auch eine Verlängerung auf fünf (**11 e**) Methylengruppen führt zu einer Verringerung der Hemmung, so dass die Wirkung dieser Substanzen nicht als signifikant angesehen werden kann.

Von den getesteten Phenylmethyl-Verbindungen **11 j-l** zeigt nur die (2-Methyl-imidazol-1-yl)ethyl-substituierte Verbindung **11 j** mit 6 % Hemmung in den Arteriolen eine signifikante Wirkung. Dies ist besonders bemerkenswert, wirkt doch das nahe verwandte (Imidazol-1-yl)ethyl-4-phenyl-Derivat **11 a** nicht signifikant.

Die *in vivo* Ergebnisse für diese Substanzklasse korrelieren gut mit den *in vitro* gefundenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (siehe auch Kapitel 3.1.1.2, Seite 81).

### 3.6.1.3 N-[ $\omega$ -(1H-Triazol-1-yl)alkyl]-4-phenyl-1-phthalazinamine

Die Vertreter dieser Verbindungsklasse zeigen eine recht ausgeprägte Hemmung der Thrombozytenaggregation *in vitro* (siehe Kapitel 3.1.1.3, Seite 82). Mit Ausnahme der 2-(Triazol-1-yl)ethyl-Verbindung **12 a** wurden alle Verbindungen *in vivo* getestet.

 12 b-d	Ver- bin- dung	n	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$	% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$
<b>12 b</b>		2	60	9 $\pm$ 2	0.01	2 $\pm$ 1	n.s.
<b>12 c</b>		3	<b>8.4</b>	10 $\pm$ 2	0.01	2 $\pm$ 1	n.s.
<b>12 d</b>		4	31	12 $\pm$ 1	0.002	7 $\pm$ 1	0.01.

Tab. 66 : Hemmung der Thrombusbildung durch N-[ $\omega$ -(Triazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine

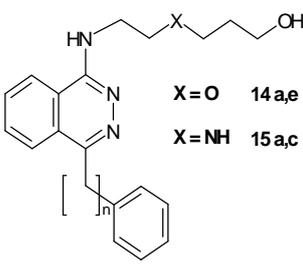
Man findet, abweichend von den *in vitro*-Ergebnissen, eine Zunahme der Hemmwirkung mit Verlängerung der Alkylkette. Die chemisch eng verwandten N-[ $\omega$ -(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamine (**11 a-e,j-l**) zeigten eine Korrelation der *in vitro* Hemmung mit den Effekten *in vivo*.

Von allen im Rahmen dieser Arbeit getesteten Verbindungen hemmt das N-[5-(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)pentyl]-4-phenyl-1-phthalazinamin (**12 d**) die Thrombusbildung sowohl in den Arteriolen (12 %) als auch den Venolen (7 %) am stärksten.

### 3.6.1.4 N-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]- und 2-(2-Hydroxyethylamino)ethyl-1-phthalazinamine<sup>9</sup>

Von diesen Substanzklassen wurden nur die Phenyl- (**14 a**, **15 a**) und die Phenylmethyl-Derivate **14 e** und **15 c** *in vivo* getestet, keine zeigte eine signifikante Wirkung.

<sup>9</sup> Diese Nomenklatur weicht von der nach IUPAC geforderten ab. Die korrekte Nomenklatur wird im experimentellen Teil verwendet.

 X=O 14 a,e X=NH 15 a,c	Ver- bin- dung	n	IC <sub>50</sub> [μM] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ±s <sub>x</sub>	P ≤	% ±s <sub>x</sub>	P ≤
<b>14 a</b>		0	96	2 ± 2	n.s.	1 ± 2	n.s.
<b>14 e</b>		1	180	0 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
<b>15 a</b>		0	160	0 ± 2	n.s.	0 ± 1	n.s.
<b>15 c</b>		1	150	1 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.

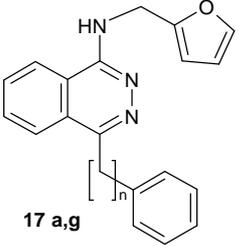
Tab. 67 : Hemmung der Thrombusbildung durch N-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]- und 2-(2-Hydroxyethylamino)ethyl-1-phthalazinamine

### 3.6.1.5 N-[3-(Morpholin-4-yl)propyl]-4-phenyl-1-phthalazinamin (16 b)

Es wurde nur die oben genannte Verbindung aus der Serie der Morpholin-4-ylalkyl substituierten Phthalazinamine getestet. Die Wirkung ist mit 7 % Hemmung in Arteriolen (s<sub>x</sub>=0.01) und 2 % in den Venolen (n.s.) recht gering.

### 3.6.1.6 N-(Furan-2-yl-methyl)-1-phthalazinamine

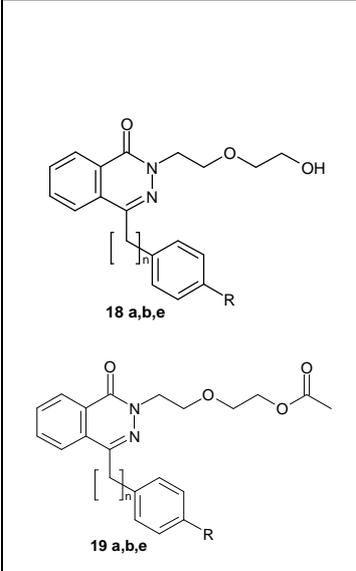
Diese Verbindungen sind in den *in vitro* Testmodellen in sehr geringen Konzentration aggregationshemmend (siehe Kapitel 3.1.1.8, Seite 87, Kapitel 3.1.4, Seite 98). Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche zeigen deutlich deren Notwendigkeit, da die Substanzen nur unerhebliche antithrombotische Eigenschaften besitzen.

 17 a,g	Verbindung	n	IC <sub>50</sub> [μM] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ±s <sub>x</sub>	P ≤	% ±s <sub>x</sub>	P ≤
<b>17 a</b>		0	28	4 ± 1	0.2	2 ± 1	0.2
<b>17 g</b>		1	68	4 ± 1	0.1	0 ± 1	n.s.

Tab. 68 : Hemmung der Thrombusbildung durch N-(Furan-2-yl-methyl)-1-phthalazinamine

### 3.6.1.7 2-[2-(Hydroxyethoxy)-ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one (18) und 2-[2-(Acetoxyethoxy)ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one<sup>10</sup>(19)

Der Übersicht halber werden hier die beiden Substanzklassen zusammen behandelt, da letztere als Prodrug der zuerst genannten gedacht waren.

	Ver- bin- dung	n	R	IC <sub>50</sub> [μM] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
					Arteriolen		Venolen	
					% ±s <sub>x</sub>	P ≤	% ±s <sub>x</sub>	P ≤
<b>18 a</b> , <b>18 b</b> , <b>18 e</b>		0	H	56	<b>1 ± 2</b>	<b>n.s.</b>	<b>0 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
<b>19 a</b> , <b>19 b</b> , <b>19 e</b>		0	H	> 300	<b>5 ± 1</b>	0.05	<b>2 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
<b>18 b</b> , <b>19 b</b>		0	F	200	<b>3 ± 1</b>	<b>n.s.</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
<b>19 b</b> , <b>18 e</b>		0	F	> 300	<b>3 ± 2</b>	<b>n.s.</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
<b>18 e</b> , <b>19 e</b>		1	H	> 300	<b>2 ± 1</b>	<b>n.s.</b>	<b>0 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
<b>19 e</b>		1	H	> 300	<b>3 ± 1</b>	<b>n.s.</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>n.s.</b>

**Tab. 69 : Hemmung der Thrombusbildung durch 2-[2-(Hydroxyethoxy)-ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one und 2-[2-(Acetoxyethoxy)ethyl]-(2H)-phthalazin-1-one**

Die Acetylierung der Hydroxy-Gruppe führt nur bei der Phenyl-Verbindung zu einer, wenn auch geringen, Steigerung der *in vivo* Aktivität. Dies deutet auf ungünstige Resorptions- und/oder Metabolisierungseigenschaften der ungeschützten Hydroxy-Gruppe hin.

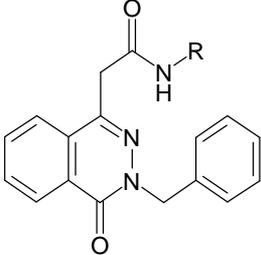
Die Acetylierung der OH-Gruppe der 4-Fluorphenyl-Verbindung **18 b**, welche *in vitro* und *in vivo* etwas stärker wirkt als **18 a**, führt jedoch zu keiner Verstärkung der antithrombotischen Eigenschaften *in vivo*.

Auch bei der Phenylmethyl-Verbindung **18 e** ist kein Vorteil durch Acetylierung der Hydroxygruppe festzustellen.

<sup>10</sup> Diese Nomenklatur weicht von der nach IUPAC geforderten ab. Die korrekte Nomenklatur wird im experimentellen Teil verwendet.

### 3.6.1.8 Amide der 3-(Phenylmethyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäure

Trotz fehlender *in vitro* Aktivität dieser Verbindungsklasse wurden einige Vertreter dieser Klasse auch *in vivo* getestet. Es gibt in der Literatur zahllose Beispiele für Wirkstoffe die erst durch Metabolisierung in ihre aktive Form überführt werden. Im Bereich der Antithrombotika ist Clopidrogel das wohl bekannteste Beispiel, der aktive Metabolit ist erst kürzlich identifiziert worden<sup>[87]</sup>.

	Ver- bin- dung	R	IC <sub>50</sub> [μM] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ±s <sub>x</sub>	P ≤	% ±s <sub>x</sub>	P ≤
	<b>27 b</b>	3-(Dimethylamino)- propyl	> 300	<b>1 ± 1</b>	<b>n.s.</b>	<b>1 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
	<b>28 a</b>	2-(2-Hydroxy- ethoxy)ethyl	> 300	<b>0 ± 1</b>	<b>n.s.</b>	<b>0 ± 1</b>	<b>n.s.</b>
	<b>29 a</b>	2-(Morpholin-4-yl) ethyl	> 300	<b>12 ± 1</b>	0.002	<b>3 ± 1</b>	0.2.
	<b>29 b</b>	3-(Morpholin-4-yl) propyl	> 300	<b>6 ± 1</b>	0.05	<b>0 ± 1</b>	<b>n.s.</b>

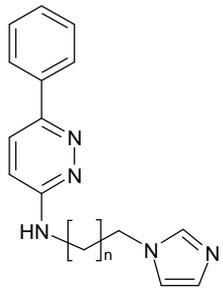
Tab. 70 : Hemmung der Thrombusbildung durch Amide der 3-(Phenylmethyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäure

Überraschend und ohne weitere pharmakologische Untersuchungen nicht erklärlich ist die Hemmung der Thrombusbildung durch die Verbindungen **29 a,b**.

Denkbar wäre eine Aktivierung durch Metabolisierung oder eine Einflussnahme auf Enzyme und Rezeptoren (insbesondere des *in vivo* für die Thrombogenese wichtigen Endothels), die das *in vitro*-Modell nicht simulieren kann.

### 3.6.1.9 N-[( $\omega$ -Imidazol-1-yl)alkyl]-6-phenyl-3-pyridazinamine

Auch diese Verbindungen wurden, trotz mangelnder Aktivität *in vitro*, in diesem Testmodell getestet.

 <b>35 a-c</b>	Verbindung	n	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (Koll.)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$	% $\pm$ s <sub>x</sub>	P $\leq$
<b>35 a</b>	1	> 300	<b>1</b> $\pm$ 2	<b>n.s.</b>	<b>0</b> $\pm$ 1	<b>n.s.</b>	
<b>35 b</b>	2	> 300	<b>4</b> $\pm$ 1	0.1	<b>0</b> $\pm$ 1	<b>n.s.</b>	
<b>35 c</b>	3	> 300	<b>5</b> $\pm$ 1	0.05	<b>0</b> $\pm$ 1	<b>n.s.</b>	

Tab. 71 : Hemmung der Thrombusbildung durch N-[( $\omega$ -Imidazol-1-yl)alkyl]-6-phenyl-3-pyridazinamine

Hier lässt sich eine Tendenz zu verstärkter Hemmung der Thrombusbildung mit zunehmender Kettenlänge n erkennen. Eine Erklärung ist auch in diesem Fall nicht ohne weitere pharmakologische Tests möglich.

## 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen zeigen keine oder eine sehr geringe Hemmung der Thrombusbildung *in vivo*.

Die stärkste Wirkung zeigt das N-[5-(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)pentyl]-4-phenyl-1-phthalazinamin (**12 d**) mit einer Hemmung von 12 % in den Arteriolen und 7 % in den Venolen. In den *in vitro* Versuchen wurde für diese Substanz eine IC<sub>50</sub> von 31  $\mu$ M festgestellt.

Die Substanz mit der zweitstärksten Wirkung ist das N-[3-(Morpholin-4-yl)propyl]-[3-(phenylmethyl)-(4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)]-essigsäureamid (**29 a**) mit einer 12 %-igen Hemmung in den Arteriolen und 3 % Hemmung in den Venolen. Dies war ein überraschendes Ergebnis, zeigt die Verbindung doch keine Effekte auf die Thrombozytenaggregation *in vitro*.

Die erhoffte Verstärkung der *in vivo*-Wirkung der N-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl]-(2*H*)-phthalazin-1-one **18 a,b,e** durch Acetylierung der Hydroxy-Gruppe findet man nur für die Verbindung **18 a**. Doch auch die so erreichte Steigerung der Hemmwirkung von 2 % auf 5 % in den Arteriolen ist recht enttäuschend.

Die von den getesteten Verbindungen gezeigten antithrombotischen Eigenschaften sind bei weitem nicht für eine sinnvolle Thromboseprophylaxe ausreichend. Die oft als schwaches Antithrombotikum angewandte Acetylsalicylsäure hemmt unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen die Thrombusbildung in den Arteriolen zu  $48 \pm 10$  % und in den Venolen zu  $20 \pm 5$  % <sup>[88]</sup>.