

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Substanzen gemäß dem in der Einleitung erläuterten Schema (siehe Abb. 2, Seite 3) dargestellt und auf antithrombotische Eigenschaften getestet.

Dabei lag der Schwerpunkt der Arbeit auf den 4-Aryl- und 4-Arylalkyl-1-phthalazinaminen **10** – **17**, da diese teilweise recht ausgeprägte Effekte auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* zeigten (Born Test).

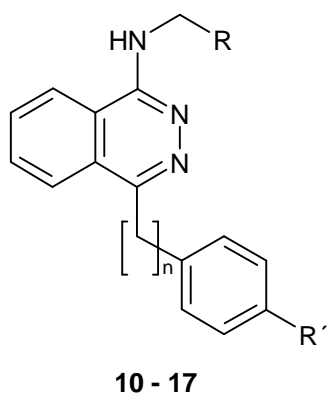


Abb. 88 : Verbindungs-
klassen 10 - 17

Bis auf wenige Ausnahmen (einige Vertreter der Verbindungsklasse **10**, **13** und **15**) zeigen 4-Aryl-1-phthalazinamine ($n=0$) eine um den Faktor 2 – 3 niedrigere IC_{50} als die 4-Arylalkyl-1-phthalazinamine ($n=1$).

Der Substituent R' wurde eingebracht, um die Elektronendichte im aromatischen System zu verändern. Es kamen Fluor- und Chlor-Substituenten zur Erniedrigung, die Methoxygruppe zur Erhöhung der Elektronendichte zum Einsatz. Da die 4-Arylalkyl-1-phthalazinamin-Derivate in der Regel weniger potent sind, wurde die Variation des Substituenten R' bei dieser Klasse nur exemplarisch durchgeführt.

In den meisten Fällen führt die Substitution am Aromaten (R') zu einer verringerten Wirkstärke der Verbindungen. Eine interessante Ausnahme davon bildet die Substanzklasse **14**. Diese 2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl-substituierten 1-Phthalazinamine zeigen eine – wenn auch geringe – Abhängigkeit der Wirkstärke von der Elektronendichte im Aromaten. Das 4-Fluorphenyl-Derivat wirkt am stärksten, das Methoxy-Derivat am schwächsten. Es ergibt sich eine Reihe $F > Cl > H > OCH_3$.

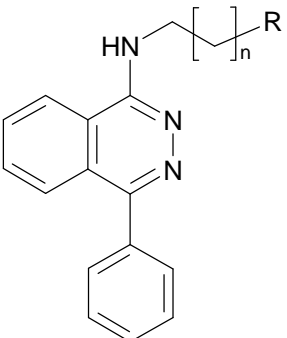
Da, wie oben dargestellt, eine Variation des Substituenten am Aromaten oder des Abstandes des Aromaten vom Phthalazin nur mäßig erfolgversprechend waren, wurde der Schwerpunkt auf das Auffinden geeigneter Substituenten R verlagert.

Als Arbeitsthese wurden, aufgrund der gewünschten Ähnlichkeit zu bekannten Aktivatoren der Guanylylcyclase und Hemmstoffen der PDE 5, die Reste folgendermaßen ausgewählt :

- Einbringen eines oder mehrerer basischen Zentren
- Variation der Kettenlänge zwischen Phthalazin und basischem Zentrum

- Einfügen eines hydrophilen Restes
- Kombination der obigen Parameter

Sowohl Imidazol als auch 1,2,4-Triazol haben sich als besonders geeignete basische Substituenten ausgezeichnet. Die entsprechend substituierten Phthalazinamine zeigen ausgeprägte antiaggregatorische Wirkung *in vitro*. Ausgehend von dem primär dargestellten 3-(Imidazol-1-yl)propyl-Derivat wurde der Abstand zwischen Phthalazin und Heterocyclus optimiert.

		Verbindung	n	IC ₅₀ [μM] (Kollagen)	Hemmung der Thrombusbildung <i>in vivo</i> / %	
					Arteriolen	Venolen
11	Imidazol-1-yl	11 a	1	80	n.s.	n.s.
		11 b	2	45	7	4
		11 d	3	18	7	n.s.
		11 e	4	24	n.s.	n.s.
12	1,2,4-Triazol-1-yl	12 a	1	140	---*	---*
		12 b	2	60	9	n.s.
		12 c	3	8.4	10	n.s.
		12 d	4	31	12	7

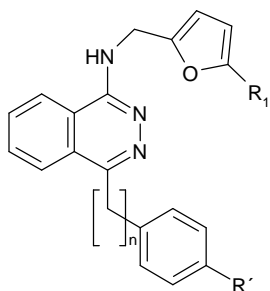
Tab. 73 : Optimierung der Kettenlänge der Verbindungsklassen 11 und 12

* : nicht getestet

Für beide Verbindungsklassen findet man einen optimalen Abstand von vier Methylengruppen zwischen Phthalazin und Heterocyclus. Dabei sind die Veränderungen der Wirkstärke bei Variation der Kettenlänge bei den Triazol-Derivaten ausgeprägter.

Die *in vivo* Versuche mit diesen Verbindungen zeigen jedoch ein anderes Bild. Die Triazolderivate bewirken – teilweise trotz höherer IC₅₀ *in vitro* - eine stärkere Hemmung der Thrombusbildung. Auch nimmt die Wirkung beim Übergang von vier auf fünf Methylengruppen als Spacer nicht ab, sondern zu. Die Verbindung **12 d** zeigt die stärkste Hemmung der Thrombusbildung aller in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen.

Aufgrund der Ähnlichkeit zu YC-1 wurde auch ein Furan-2-ylmethyl-Rest eingeführt. Die entsprechend substituierten Verbindungen vom Typ **17** zeigen ein interessantes pharmakologisches Profil.



**Abb. 89 : Verbindungs-
klasse 17**

Hier findet man sehr niedrige IC_{50} -Werte für die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation. Das N-(5-Methyl-furan-2-ylmethyl)-4-phenyl-1-phthalazinamin (**17 b**) ist mit einer IC_{50} von nur 10 μM die unter diesen Testbedingungen zweitaktivste Verbindung dieser Arbeit (für **12 c** findet man eine IC_{50} von 8.4 μM , s.o.). Zwar bewirkt auch in dieser Substanzklasse eine Substitution am Phenylring einen Rückgang der Aktivität, doch ist dieser nicht so ausgeprägt, so dass man auch bei solchermaßen substituierten Verbindungen IC_{50} -Werte um 50 μM findet. Auch das Einbringen einer Methylengruppe zwischen Phenylring und Phthalazin wird besser toleriert.

Von den im frühen Stadium dieser Arbeit dargestellten Phthalazin-1-onen zeigen nur wenige Verbindungen antiaggregatorische Eigenschaften *in vitro*.

Erwähnenswert sind nur die Verbindungen **18 a** ($n=0$, $R'=H$) und **18 b** ($n=0$, $R'=F$) mit einer IC_{50} von 56 μM beziehungsweise 200 μM . Die Hemmung der Thrombusbildung *in vivo* ist bei beiden Verbindungen nicht signifikant. Die Acetylierung der Hydroxy-Gruppe im Sinne eines Prodrugs (\rightarrow **19 a,b**) führte nur zu einer geringen

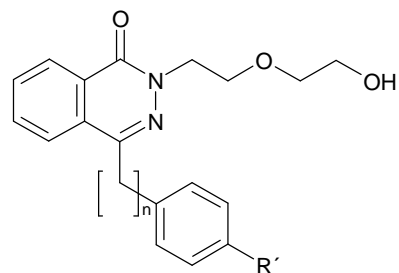


Abb. 90 : Verbindungsklasse 18

Steigerung der Hemmwirkung. Für **19 a** wird eine 5 %-ige Hemmung in den Arteriolen gemessen ($P < 0.05$). Weitere 4-Phenyl-phthalazin-1-one mit basischen Substituenten zeigten keine Effekte.

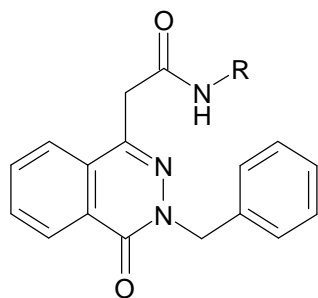


Abb. 91 : Amide der 3-(Phenylmethyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäure

Die ebenfalls im frühen Stadium dieser Arbeit dargestellten, auch zu den Phthalazin-1-onen zurechenbaren, Amide der 3-(Phenylmethyl)-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)-essigsäure sind allesamt *in vitro* ohne Wirkung. Überraschenderweise hemmt aber das N-[2-(Morpholin-4-yl)ethyl]-Derivat **29 a** die Thrombusbildung *in vivo* relativ stark. Mit 12 % Hemmung in den Arteriolen und 3 % in den Venolen ist es die zweitpotenteste Verbindung dieser Arbeit.

Als drittes heterocyclisches stickstoffreiches Ringsystem, gemäß des in der Einleitung erläuterten Schemas (siehe Abb. 2, Seite 3), wurde das Pyridazin ausgewählt. In Analogie zu den Verbindungsklassen **10 – 17**, wurden 6-Phenyl-3-amino-pyridazine dargestellt und auf ihre gerinnungsphysiologischen Eigenschaften geprüft. *In vitro* zeigte jedoch keine dieser Verbindungen eine nennenswerte Hemmung der Thrombozytenaggregation. Das N-[4-(Imidazol-1-yl)butyl]-6-phenyl-3-pyridazinamin (**35 c**) hemmt, trotz mangelnder Aktivität *in vitro*, die Thrombusbildung *in vivo* in den Arteriolen zu 5 % ($P < 0.05$).

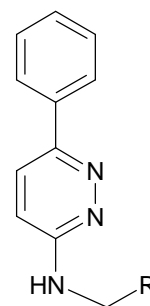


Abb. 92 : 6-Phenyl-3-amino-pyridazine

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus wurde eine Auswahl von *in vitro* potenten Verbindungen weiteren pharmakologischen Tests unterzogen.

Im Vordergrund standen dabei, gemäß dem Ziel der Arbeit (siehe Einleitung), die Prüfung auf Aktivierung der sGC, beziehungsweise Hemmung der PDE 5.

Von den getesteten Substanzen zeigt nur das N-(Furan-2-yl-methyl)-4-phenylmethyl-1-phthalazinamin **17 g** in einer Konzentration von 100 μM eine 5-fache Stimulation der Guanylylcyclase. Diese geringe Aktivierung, noch dazu in so hoher Konzentration, spricht gegen eine über die Aktivierung dieses Enzyms vermittelte Wirkung dieser Substanz.

Die PDE 5 wird von den Verbindungen **17 a** und **17 g** bei einer Konzentration von jeweils 10 μM halbmaximal gehemmt. Wäre die Hemmung der Thrombozytenaggregation von diesen Verbindungen durch die Hemmung dieses Enzyms vermittelt, würde man im Born-Test erwarten dass beide Substanzen ähnliche IC_{50} -Werte haben. Allerdings findet man für **17 a** eine IC_{50} von 28 μM , für **17 g** ergibt sich eine IC_{50} von 68 μM . Auch sollte eine Veränderung der IC_{50} bei Variation des Aggregationsauslösers bei beiden Verbindungen in ähnlichem Maße ausfallen. Bei dem Übergang von Kollagen zu ADP verändert sich die IC_{50} von **17 a** um den Faktor 0.5; für **17 g** findet man dagegen einen Faktor von 1.8 (!).

Die Verbindung **17 a** hemmt die Thrombozytenaggregation *in vitro* in einer um den Faktor 11 niedrigeren Konzentration (2.5 μM statt 28 μM), wenn Serotonin (5-HT) statt Kollagen als Induktor der Aggregation verwendet wird. Dies ließ vermuten, dass die Wirkung dieser Verbindung - und strukturell ähnlicher Substanzen – durch Blockade des 5-HT_{2A}-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt wird. In einem etablierten *in vitro*-Modell konnte eine nicht-kompetitive Blockade des Rezeptors in der Rattenschwanzarterie gezeigt werden. Da diese Blockade in dem selben Konzentrationsbereich stattfand, der auch zur Hemmung der Thrombozytenaggregation nötig war, ist es wahrscheinlich, dass diese Substanz über eine Blockade des 5-HT_{2A}-Rezeptors wirkt.