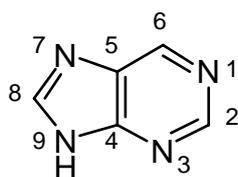


5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, in Anlehnung an die Strukturen von **YC-1**, einem direkten Aktivator der löslichen Guanylatcyclyase (sGC) und unspezifischen Inhibitor der Phosphodiesterasen (PDE) und **Sildenafil** (Viagra[®]), einem Inhibitor der Phosphodiesterase vom Typ 5 (PDE 5), neue Substanzen mit Purin-Grundgerüst zu synthetisieren und auf ihre gerinnungsphysiologische Aktivität zu untersuchen (siehe auch das Arbeitsschema in Abb. 4 auf Seite 6). Die Substanzen sollten über eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat), die durch Aktivierung der sGC und/oder Hemmung der PDE 5 ausgelöst werden kann, die Thrombozytenaggregation hemmen.

Purin und deren Derivate wie z. B. **Harnsäure** werden seit dem 18. Jahrhundert erforscht. Der Grundkörper setzt sich aus einem Pyrimidin- und einem Imidazol-Ring zusammen. Die Struktur von Purin und ihre unsystematische Zählweise werden in Abb. 40 angegeben.



(9H)-Purin

(9H)-Imidazo[4,5-d]pyrimidin

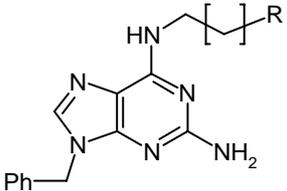
Abb. 40: Strukturformel und Zählweise von **(9H)-Purin**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuerst 7- bzw. 9-Phenylmethylpurin-2,6-diamine mit basischen, neutralen und sauren Substituenten in der N⁶-Alkylseitenkette dargestellt. Zusammenfassend besitzen diese Derivate nur geringe bis keine blutgerinnungshemmende Eigenschaften.

Die Position des lipophilen Restes scheint eine Rolle bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation zu spielen, da die 9-Phenylmethyl-Derivate meistens aktiver als die entsprechenden 7-Benzyl-Isomere sind. Tendenziell zeigen die Derivate mit basischem Zentrum in der Seitenkette vor allem *in vitro* im Born-Test stärkere antiaggregatorische Effekte.

Die Ergebnisse der aktivsten Substanzen wurden in Tabelle 48 zusammengefasst.

Tab. 48: Zusammenfassung der aktivsten Purin-2,6-diamine mit basischen Resten und ihre halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

	Nr.	n	R	IC ₅₀ [μmol/L]
	6c	2		NHCH ₃
6g	2		NHC ₆ H ₁₁	210*
7b	2		Pyrrolidinyll	180
8e	1		(4H)-Piperazinyll	180

Sildenafil (Viagra®) sowie cGMP besitzen eine Carbonyl-Gruppe am Heterocyclus zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Daher wurden einige Purin-2,6-diamine überwiegend mit basischem aber auch mit neutralem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette mittels Diazotierung und Verkochung zu den Purin-2-onen (**16-18**) umgesetzt. Diese zeigen weder im *in vitro*- noch im *in vivo*-Test gerinnungshemmende Eigenschaften.

Die Darstellung der 4-Chlor-N-(purin-2-yl)benzolsulfonamide mit verschiedenen Substituenten in 6-Position (**20,21**) führte ebenfalls im Born-Test zum Wirkungsverlust. Nur die Substanzen **20c** und **21** besitzen IC₅₀-Werte unter 300 μmol/L (siehe Abb. 41).

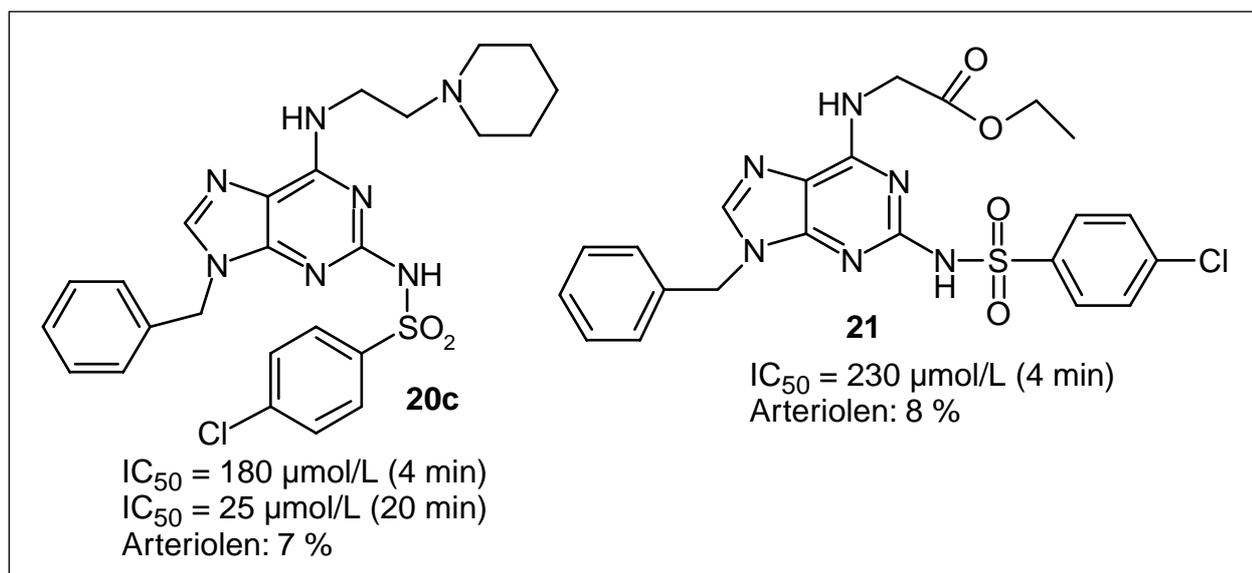


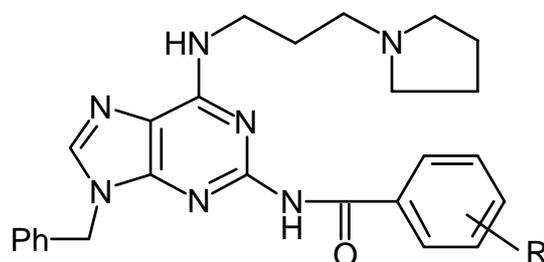
Abb. 41: Strukturen von **20c** und **21** und ihre gerinnungsphysiologischen Daten

Da fast alle Substanzen aufgrund ihrer hohen Lipophilie unter den Testbedingungen als feiner Niederschlag ausfielen, wurde **20c** mit einer verlängerten Inkubationszeit von 20 min untersucht. Dadurch wurde die halbmaximale Hemmkonzentration von 180 $\mu\text{mol/L}$ auf 25 $\mu\text{mol/L}$ gesenkt. Im Laser-Thrombose-Modell *in vivo* zeigen die Substanzen vom Typ **20** und **21** vor allem in den Arteriolen signifikante Hemmeffekte auf die Thrombusbildung, was bei **20c** und **21** mit 7 bzw. 8% Hemmung in den Arteriolen besonders deutlich war.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Benzolcarbonsäureamide mit (**25,26**) und ohne (**27,28**) weitere Sulfonamid-Partialstruktur synthetisiert. Dies führte zu einer deutlichen Steigerung der thrombozytenaggregationshemmenden Aktivität im Born-Test. Auch hier fielen die Substanzen unter den Testbedingungen als feiner Niederschlag aus. Daher wurden die aussichtsreichsten Substanzen mit einer verlängerten Inkubationszeit von 20 min untersucht. Die Substanzen mit den stärksten antiaggregatorischen Effekten und ihren halbmaximalen Hemmkonzentrationen nach 4 und 20 min werden in Tabelle 49 zusammengefaßt.

Tab. 49: Zusammenfassung der aktivsten Substanzen vom Typ **25-28** mit ihren halbmaximalen Hemmkonzentrationen nach 4 und 20 min Inkubationszeit im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

Nr.	Pos.	R	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]	
			4 min	20 min
25h	3	4-Methylpiperazinylsulfonyl	43*	10
25j	3	4-(Pyrimidin-2-yl)piperazinylsulfonyl	58*	35
26c	3	N,N-Diethylaminosulfonyl	56*	25
26f	4	N-(2-Methoxyethyl)aminosulfonyl	220*	5
26h	4	N-(3-Methoxypropyl)aminosulfonyl	180*	3
27a	4	COOCH ₃	100*	3
27d	3	CN	90*	3
27e	4	OCH ₃	90*	19



Die Derivate mit Sulfonamid-Partialstruktur besitzen antiaggregatorische Eigenschaften. Hier ist die Substanz **26h** mit einem IC_{50} -Wert von 3 $\mu\text{mol/L}$ am aktivsten. Die Sulfonamid-Struktur ist aber nicht essentiell, da auch mit anderen funktionellen Gruppen mit Elektronenakzeptoreigenschaften die Aktivität beibehalten werden kann.

Die im Born-Test beobachteten Ergebnisse der Substanzen vom Typ **25-28** konnten *in vivo* im Laser-Thrombose-Modell nicht bestätigt werden. Die Substanz **27a** zeigt mit 7 % Hemmung in den Arteriolen den stärksten antithrombotischen Effekt in dieser Reihe. Ihre Aktivität ist aber als moderat einzustufen. Eine mögliche Ursache für die fehlende *in vivo*-Aktivität kann die schlechte Löslichkeit der Substanzen und damit ungenügende Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt sein.

Um den Wirkmechanismus näher zu untersuchen, wurden im Born-Test spezifischere Aggregationsauslöser wie Adenosindiphosphat (ADP), Adrenalin und PAF („platelet activating factor“) anstatt Kollagen verwendet. Für diese Untersuchungen wurden das Purin-2,6-diamin **6g** (siehe Tabelle 48 auf Seite 150), das Benzolcarboxamid mit Sulfonamid-Partialstruktur **25h** (siehe Tabelle 48 auf Seite 150) und das Benzolcarboxamid ohne Sulfonamid-Partialstruktur **27a** (siehe Tabelle 49 auf Seite 151) ausgewählt. Die Substanz **6g** zeigte bei Zusatz von Kollagen einen IC_{50} -Wert von 11 $\mu\text{mol/L}$ nach 20 min. Diese Aktivität konnte nach Zusatz von ADP bzw. PAF um das Dreifache gesteigert werden. Die durch **25h** gehemmte Thrombozytenaggregation konnte mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 1.4 $\mu\text{mol/L}$ auf einen PAF-Rezeptor-Antagonismus zurückgeführt werden. Die Substanz **27a** zeigte unter Zusatz von Kollagen mit einem IC_{50} -Wert von 3 $\mu\text{mol/L}$ nach 20 minütiger Inkubationszeit die höchste Aktivität.

Für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus wurden die in Abb. 42 dargestellten Substanzen ausgewählt und von der Fa. Bayer in zwei Enzym-Assays getestet. Dabei stellte sich

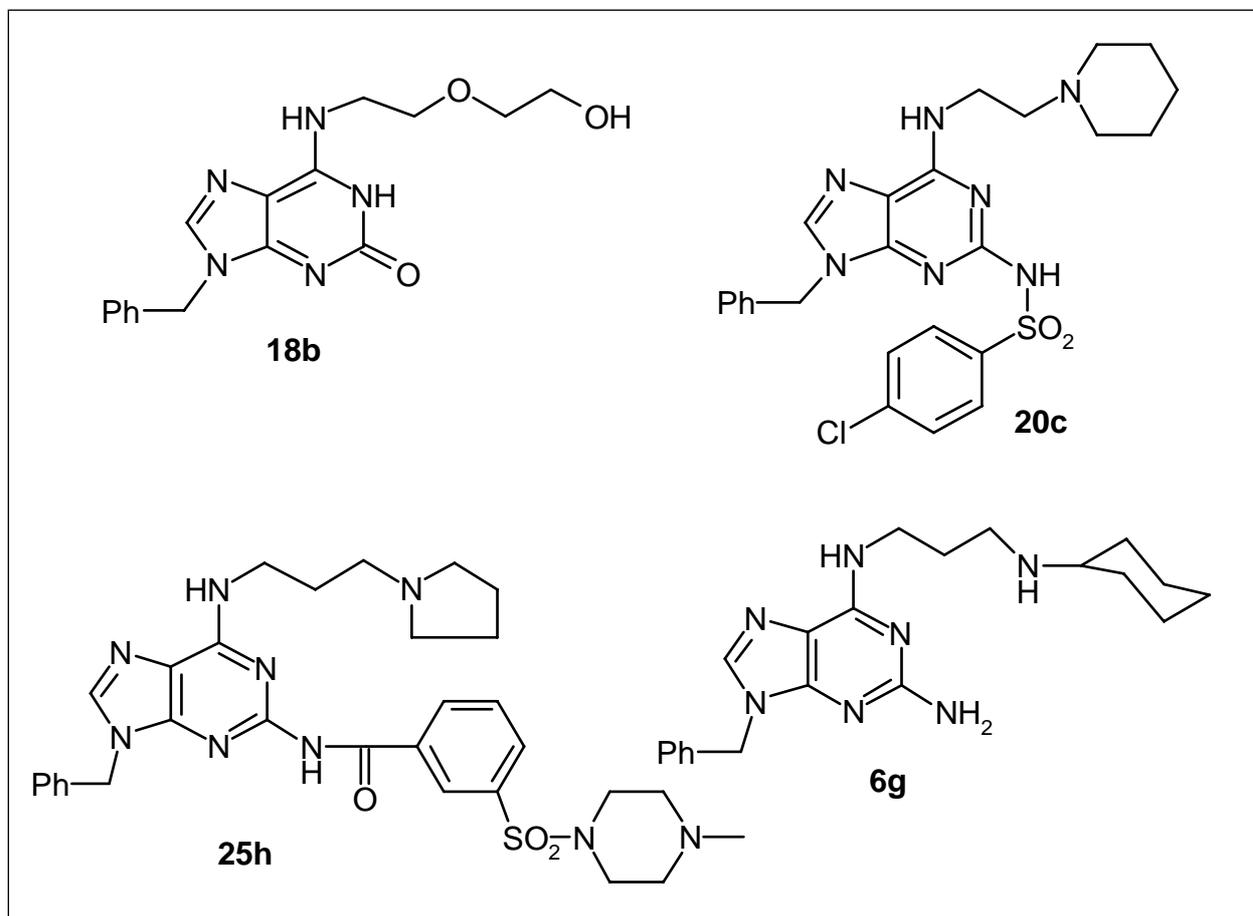


Abb. 42: Strukturformeln von 6g, 18b, 20c und 25h

heraus, daß die beobachteten antiaggregatorischen und/oder antithrombotischen Effekte weder auf die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase noch auf eine Hemmung der Phosphodiesterase vom Typ 5 zurückzuführen sind. Die Hemmeffekte vor allem auf die Thrombozytenaggregation der untersuchten Substanzen werden anscheinend durch andere Mechanismen verursacht, die in weiteren Untersuchungen zu klären sind.

