

## 3 Pharmakologischer Teil

### 3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*

#### 3.1.1 Allgemeines

Der Einfluß der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* wurde mit Hilfe des Born-Tests untersucht<sup>33</sup>. Humanes plättchenreiches Plasma (PRP) wird mit definierten Konzentrationen der Testsubstanz in Dimethylsulfoxid (DMSO) vier Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zusatz eines Induktors, zumeist Kollagen, wird die Thrombozytenaggregation ausgelöst, deren Ausmaß durch photometrische Messung der veränderten Lichttransmission bestimmt wird. Dabei gilt eine direkte Proportionalität zwischen Aggregatanzahl und Zunahme der Lichttransmission.

Durch graphische Auswertung ergibt sich so für jede Konzentration einer Substanz eine Transmissions/ Zeit-Kurve, deren maximale Transmission  $h$  (Abb. 34) bestimmt wird. Als Vergleich sowie zur Überprüfung des Testmodells dient eine Acetylsalicylsäurelösung in HEPES\*-Puffer.

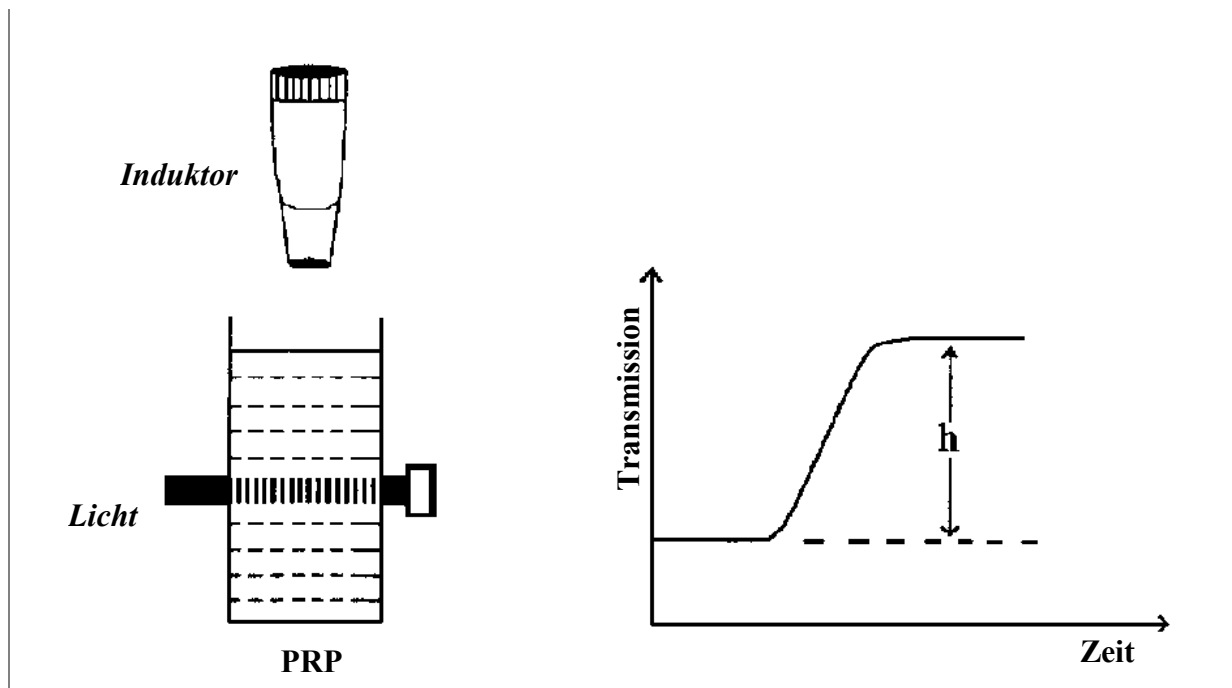


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Born-Tests

\* 1 mM wässrige 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure-Lösung

Um einen Vergleich der einzelnen Aktivitäten zu ermöglichen, wird der jeweilige  $IC_{50}$ -Wert ermittelt. Hierzu wird die Konzentration der Substanz logarithmisch gegen die Hemmung der Aggregation linear (%) aufgetragen. Aus der resultierende Kurve kann der  $IC_{50}$ -Wert abgelesen werden, indem man vom Schnittpunkt mit dem 50%-Wert das Lot auf die Konzentrationsachse fällt. Der so erhaltene Wert gibt die halbmaximale Hemmkonzentration der getesteten Verbindung an.

Die Lösung der Testsubstanzen in HEPES-Puffer war im Rahmen dieser Arbeit wegen der unzureichenden Wasserlöslichkeit nicht durchführbar. Stattdessen wurde als Lösungsmittel eine geringe Menge (10  $\mu$ L) DMSO verwendet. Auch hierbei löste sich ein Großteil der Verbindungen nicht oder nur wenig, und bei Zugabe des PRP fielen die gelösten Anteile häufig wieder aus. Aufgrund der aggregationshemmenden Eigenschaften des DMSO in Konzentrationen über 125  $\mu$ M war es jedoch nicht möglich, den Anteil des Lösungsmittels zu erhöhen.

Nach Testreihen unter Zugabe verschiedenartiger Lösungsvermittler, welche zu keiner merklichen Verbesserung der Löslichkeiten führten, wurde schließlich die Inkubationszeit der Verbindungen in PRP von vier auf zwanzig Minuten verlängert (s. Kap. 3.1.2). Zusätzlich wurde die Lösung bzw. Suspension während der Inkubationszeit gerührt.

Die Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen nach zwanzigminütiger Inkubationszeit wurde im Vergleichsversuch gesichert. Auch die antiaggregatorische Wirkung der ASS-Vergleichslösung zeigte keine Veränderung gegenüber dem Wert, der nach vierminütiger Inkubationszeit erhalten wurde.

### **3.1.2 Versuche zur Löslichkeitsverbesserung**

Die schlechte Löslichkeit der meisten im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzen stellte ein großes Problem bei der Ermittlung der antithrombotischen Aktivitäten dar. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Mehnert von der Pharmazeutischen Technologie der FU Berlin wurden Verfahren zur Löslichkeitsverbesserung diskutiert und erprobt. Zunächst wurden flüssige Polyethylenglykole (PEG) verschiedener molekularer Massen anstelle des DMSO als Lösungsmittel verwendet. Im Referenzversuch beeinflussten die Lösungen von 10  $\mu$ L PEG 300/ 400 im reinen PRP die Aggregation nicht. Es konnten jedoch wie beim DMSO keine höheren Konzentrationen des jeweiligen PEGs verwendet werden. Diese Methode brachte weder eine sichtbare Verbesserung der Löslichkeit noch eine Verbesserung

der *in vitro*-Wirkung der Verbindungen ein. Auch eine Mischung von 4T Macrogol 300 mit 1T Propylenglykol führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Die lösungsvermittelnde und damit aktivitätssteigernde Wirkung von 10%iger wässriger Polysorbat 80-Lösung wurde daraufhin im Born-Test nicht mehr überprüft, da bereits optisch keine Verbesserung der Löslichkeit erkennbar war.

Da mit gängigen, materialunaufwändigen Methoden zur Löslichkeitsvermittlung kein Erfolg erzielt werden konnte, wurde mit Versuchen begonnen, die die Bestimmung der antiaggregatorischen Eigenschaften der Verbindungen erst nach längeren Inkubationszeiten vorsahen. Obwohl sich die Verbindungen selbst nach zwanzigminütiger Inkubationszeit in 10  $\mu$ L DMSO/ 200  $\mu$ L PRP nicht erkennbar besser lösten, zeigte sich doch in den Messergebnissen eine deutliche Verbesserung der pharmakologischen Wirkung. Dies deutet darauf hin, dass der limitierende Faktor für die Wirkungsentfaltung der betreffenden Verbindungen die Diffusion der geringen, tatsächlich gelösten Menge an ihren Wirkort, d. h.

**Tabelle 32:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **14h**, **15b**, **15f** und **17c** nach Zugabe verschiedener Lösungsvermittler und nach verlängerten Inkubationszeiten

Verbindung	IC <sub>50</sub> -Werte [ $\mu$ mol/L] nach Zugabe von					
	DMSO/ PRP (4 min)	DMSO/ PRP (10 min)	DMSO/ PRP (20 min)	PEG 300/ PRP	PEG 400/ PRP	PEG 300/ Propylen- glykol/ PRP
<b>14h</b>	190	<b>90</b>	<b>17</b>	-	-	-
<b>15b</b>	>300	-	<b>44</b>	>300	>300	-
<b>15f</b>	>300	-	<b>110</b>	-	>300	>300
<b>17c</b>	>300	-	<b>94</b>	>300	>300	>300

die Thrombozytenmembran, ist. Es kann jedoch auch angenommen werden, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Konzentration der gelösten Substanz steigt oder sich sogar ein Sättigungsgleichgewicht einstellt und somit ausreichende Stoffmengen am Wirkort erreicht werden können.

Der Effekt einer weiteren Verlängerung der Inkubationszeit wurde nicht überprüft, da die Thrombozyten *in vitro* nur eine geringe Lebensdauer besitzen und deshalb der Aggregationstest keine zuverlässigen Werte mehr liefern kann.

Tab. 32 veranschaulicht die Ergebnisse einiger Versuche, die zur Verbesserung der Löslichkeit der Proben während der Testdurchführung unternommen wurden. Die Strukturformeln der tabellierten Verbindungen sind dem folgenden Kapitel 3.1.3 zu entnehmen.

### 3.1.3 Kollageninduzierte Thrombozytenaggregation

Kollagen ist ein unspezifischer, partikulärer Induktor der Plättchenaggregation, der aus unverzweigten Proteinfibrillen besteht. Bei Schädigung des Gefäßendothels löst der Kontakt zwischen Blutstrom und Kollagenfasern die Thrombusbildung aus (vgl. Kap. 1.1). Im Blut zirkulierender von Willebrand-Faktor bindet an die dem Blutstrom exponierten Kollagenfasern und initiiert Glycoprotein Ib-vermittelt die Thrombozytenadhäsion<sup>34</sup>. Über die Aktivierung von Proteinkinasen und vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und –mobilisation innerhalb der Zelle kommt es zu einer Veränderung der Thrombozytenform und der Aktivierung von Actinfilamenten, welche eine Aggregation der Blutplättchen zur Folge haben<sup>35, 36, 37</sup>.

Im Testmodell wird die Aggregation durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  Kollagenlösung (Kollagen-Reagens Horm, Fa. Nycomed), die 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kollagenfasern enthält, ausgelöst.

Tab. 33 definiert die Begrifflichkeiten für die Bewertung der gemessenen antiaggregatorischen Wirkungen.

**Tabelle 33:** Beurteilung der antiaggregatorischen Wirkung der dargestellten Verbindungen in Abhängigkeit von der Konzentration der Probenlösung

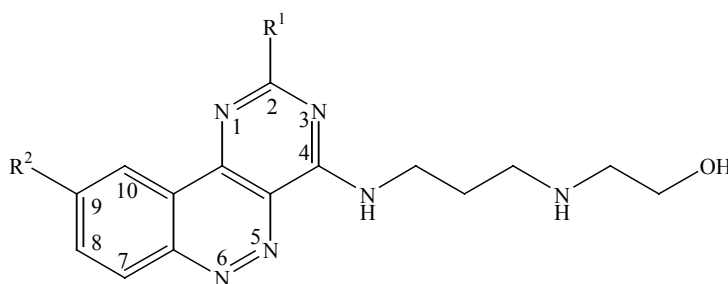
Konzentration ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	Beurteilung der Wirkung
<1	sehr gut
1 – 10	gut
10 – 150	mäßig
150 -300	schwach
>300	wirkungslos

Die in den folgenden Tabellen angegebenen  $IC_{50}$ -Werte beziehen sich auf die Messung nach den jeweils angegebenen Inkubationszeiten. Aufgrund des hohen Aufwandes bei der Durchführung der Messungen und daraus resultierenden Kapazitätsproblemen wurden nicht alle dargestellten Verbindungen nach beiden Inkubationszeiten getestet.

### 3.1.3.1 (Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)alkohole mit basischem oder neutralem Zentrum in der Seitenkette

#### 3.1.3.1.1 2-[3-(Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl-amino)propylamino]ethanole (6)

Die Verbindungen des Typs **6** weisen in einigen Teilen Strukturähnlichkeiten mit dem sGC-Aktivator **YC-1** auf (vgl. Abb. 3, S. 4). An einen stickstoffhaltigen Heterocyclus ist über einen Spacer eine OH-Funktion gebunden. In 2- bzw. 9-Position des Heterocyclus befindet



**Abbildung 35:** Verbindungstyp **6**

sich ein lipohiler Substituent. Die Verbindungen dieses Typs waren trotz des hydrophilen Restes in 4-Position in dem geringen Volumen DMSO meist schlecht löslich. Dennoch zeigten sie nach zwanzigminütiger Inkubationszeit mit plättchenreichem Plasma mäßige antiaggregatorische Potenz mit  $IC_{50}$ -Werten im Bereich zwischen 16 und 150  $\mu\text{mol/L}$  (Tab. 34).

Mit Ausnahme von **6d** waren die Verbindungen, bei denen sich der lipophile Rest in 2-Position des Heterocyclus befindet, besser wirksam als die in 9-Position substituierte

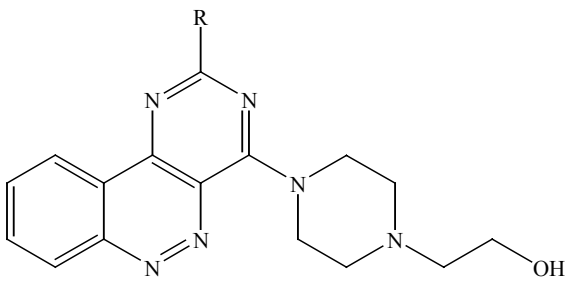
**Tabelle 34:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **6a - g**

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μmol/L]	
			4 min	20 min
<b>6a</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	105	62
<b>6b</b>	Phenyl	H	-	16
<b>6c</b>	4-Methoxyphenyl	H	95	26
<b>6d</b>	4-Ethoxyphenyl	H	-	150
<b>6e</b>	4-Propoxyphenyl	H	80	20
<b>6f</b>	4-Butoxyphenyl	H	-	28
<b>6g</b>	2-Furyl	H	-	19

Verbindung **6a**. Bei den Verbindungen **6a**, **c**, **e**, die zuvor bereits nach vierminütiger Inkubationszeit gemessen wurden, konnte durch die verlängerte Kontaktzeit eine Wirkungssteigerung um den Faktor 1.7 – 4 erreicht werden.

### 3.1.3.1.2 2-(4-Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)piperazin-1-yl-ethanole (**7**)

Die Verbindungen des Typs **7** unterscheiden sich strukturell vom Typ **6** durch die Einführung eines Piperazinringes anstelle des Propan-1,3-diamins in die Seitenkette. Dies führt stereochemisch zu einer relativen Rigidisierung des Substituenten.



**Tabelle 35:** IC<sub>50</sub>-Werte des Verbindungstyps **7**

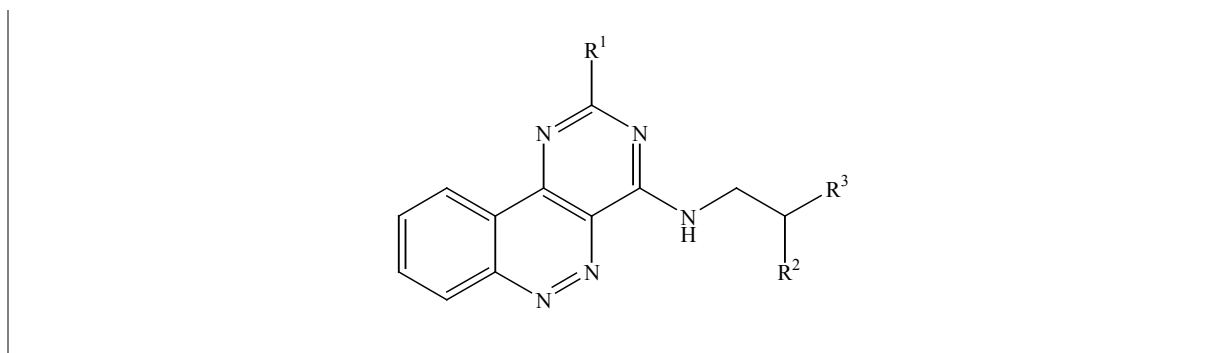
Verbindung	R	IC <sub>50</sub> [μmol/L] 20 min
<b>7a</b>	Phenyl	38
<b>7b</b>	2-Furyl	>300

**Abbildung 36:** Verbindungstyp **7**

Die Substanzen **7a**, **b** wiesen mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 38 und >300  $\mu\text{mol/L}$  eine wesentlich schwächere Wirkung als die entsprechenden offenkettigen Verbindungen **6b**, **g** auf. Aus diesem Grund wurde auf die Synthese von weitere Substanzen dieses Typs verzichtet.

### 3.1.3.1.3 Sonstige Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl-alkohole (8 – 11)

Es wurden weitere Strukturvariationen an der Seitenkette vorgenommen und deren Auswirkung auf die gerinnungsphysiologischen Eigenschaften der Pyrimido[5,4-c]cinnoline



**Abbildung 37:** Verbindungstypen **8 – 11**

überprüft. So wurde die Länge des Spacers variiert und an verschiedenen Positionen Sauerstofffunktionen eingefügt. In der Seitenkette befindliche Hydroxygruppen sollten die Wirkung durch Verbesserung der Löslichkeit steigern. Dieser Effekt ließ sich im Testmodell

**Tabelle 36:**  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Verbindungen **8 - 11**

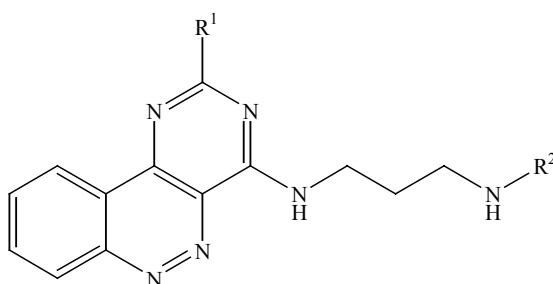
Verbindung	$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	$\text{R}^3$	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	
				4 min	20 min
<b>8</b>	H	H	OH	>300	-
<b>9</b>	H	H	$\text{OC}_2\text{H}_4\text{OH}$	>300	-
<b>10</b>	Phenyl	H	$\text{NHC}_2\text{H}_4\text{OH}$	-	13
<b>11</b>	Phenyl	$\text{CH}_2\text{OH}$	OH	>300	-

jedoch nicht erkennen. Die Wirkung der Verbindungen **8**, **9**, **11** fiel nach vierminütiger Inkubationszeit mit PRP so gering aus, dass z.T. kein  $IC_{50}$ -Wert ermittelt werden konnte. Substanz **10** dagegen erreichte nach verlängerter Inkubationszeit einen  $IC_{50}$ -Wert von 13  $\mu\text{mol/L}$  und gehört damit zu den bestwirksamen Verbindungen dieser Arbeit. Dies bestätigt erneut die bereits in vorausgegangenen Dissertationen im Arbeitskreis Rehse gemachte Beobachtung, dass für den Eintritt der antiaggregatorischen Wirkung ein basisches Zentrum in der Seitenkette benötigt wird. Zudem wird augenscheinlich eine Kettenlänge der als Spacer fungierenden Seitenkette von mehr als drei Bindungen benötigt.

### 3.1.3.2 (Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine

#### 3.1.3.2.1 N-Alkyl-N'-(pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine (**12**)

Um zu überprüfen, ob die terminale Hydroxygruppe der Seitenkette für eine antiaggregatorische Wirkung benötigt wird, wurden Verbindungen synthetisiert, bei denen die hydrophile Gruppierung des Verbindungstyps **6** durch einen Methyl- oder Propylrest ersetzt wurde. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass unter physiologischen Bedingungen die Aminfunktion protoniert ist, so dass sowohl die Hydrophilie wie auch die Protonendonatoreigenschaften der Hydroxylfunktion erhalten bleiben. Die Einführung eines Alkylsubstituenten in die Seitenkette führte zu einer Wirkungssteigerung gegenüber den vergleichbaren Verbindungen des Typs **6**, die eine terminale OH-Gruppe besitzen. Die  $IC_{50}$ -



**Abbildung 38:** Verbindungstyp **12**



**Tabelle 37:** IC<sub>50</sub>-Werte des Verbindungstyps **12**

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μmol/L] (20 min)
<b>12a</b>	Phenyl	CH <sub>3</sub>	7
<b>12b</b>	2-Furyl	CH <sub>3</sub>	7
<b>12c</b>	Phenyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	9
<b>12d</b>	4-Methoxyphenyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4
<b>12e</b>	4-Propoxyphenyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	13
<b>12f</b>	2-Furyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	40
<b>12g</b>	2-Thienyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	19

Werte der Methylverbindungen verbesserten sich etwa um den Faktor 2.5, die Propylverbindungen etwas uneinheitlicher um den Faktor 1.5 – 5.8. Eine Ausnahme bildete **12f**. Hier zeigte die propylierte Verbindung mit einer IC<sub>50</sub> von 40 μmol/L eine schwächere Wirkung als der entsprechende Alkohol **6g** (19 μmol/L).

Der Wirkungsvergleich mit dem entsprechenden endständig nicht alkylierten Propan-1,3-diamin war nicht möglich, da sich diese Verbindung nicht in ihrer Reinform darstellen ließ.

### 3.1.3.2.2 N-Cyclohexyl-N'-(pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine (**13**)

Aufgrund der beobachteten Wirkungssteigerung durch den Ersatz der OH-Gruppe der Seitenkette durch einen Alkylrest wurde nun versucht, durch das Einfügen des wesentlich größeren und lipophileren Cyclohexylrestes eine weitere Verbesserung der *in vitro*-Testergebnisse zu erreichen. Tab. 38 zeigt die Ergebnisse des *in vitro*-Tests nach zwanzigminütiger Inkubationszeit. Zum Vergleich wurde für **13c** auch der IC<sub>50</sub>-Wert nach vierminütiger Inkubationszeit ermittelt.

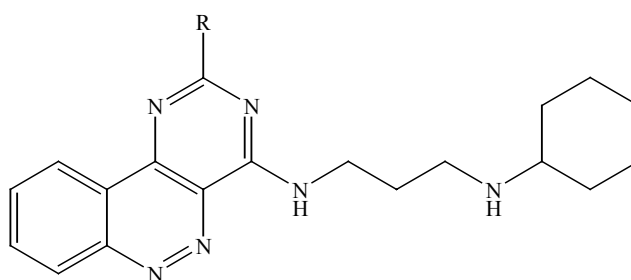


Abbildung 39: Verbindungstyp 13

Tabelle 38: IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen 13a - j

Verb.	R	IC <sub>50</sub> [μmol/L]		Verb.	R	IC <sub>50</sub> [μmol/L]	
		4 min	20 min			4 min	20 min
<b>13a</b>	Phenyl	-	48	<b>13f</b>	4-Butoxyphenyl	-	75
<b>13b</b>	2-Methoxyphenyl	-	8	<b>13g</b>	4-Cyanophenyl*	-	38
<b>13c</b>	4-Methoxyphenyl	68	3	<b>13h</b>	2-Furyl	-	3
<b>13d</b>	4-Ethoxyphenyl	-	29	<b>13i</b>	2-Thienyl	-	3
<b>13e</b>	4-Propoxyphenyl	-	180	<b>13j</b>	Phenylvinyl	-	42

Die Ergebnisse des Born-Test fielen hier etwas uneinheitlich aus, was in der Sache liegen oder aber auf die schlechte Löslichkeit der Substanzen in DMSO zurückgeführt werden kann. Es befinden sich in dieser Gruppe jedoch einige der besten antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen dieser Arbeit.

Die am besten wirkenden Vertreter dieser Substanzklasse waren die in 2-Position 4-Methoxyphenyl- und 2-Thienyl-substituierten Verbindungen **13c**, **i** sowie die 2-Furyl-substituierte Verbindung **13h** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von jeweils 3 μmol/L. Die Verlängerung der Alkoxygruppe führte zu einer Wirkungsverschlechterung, wobei der Propylrest die ungünstigste Kettenlänge zu sein scheint.

\* S. Fußnote S. 38

Auch hier bestätigte sich der positive Effekt der Verlängerung der Inkubationszeit mit PRP von vier auf zwanzig Minuten. Am Beispiel **13c** konnte eine Wirkungssteigerung von 68  $\mu\text{mol/L}$  (4 min) auf 3  $\mu\text{mol/L}$  (20 min), d. h. mehr als 20-fach, festgestellt werden.

### 3.1.3.2.3 N,N-Dialkyl-N'-(pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine (**14**)

Neben den *in vitro* gut wirkenden Propan-1,3-diaminen vom Typ **12** und **13** wurden weitere Propan-1,3-diamine dargestellt, die endständig eine tertiäre anstelle einer sekundären Aminfunktion tragen. Dies führt neben einer geringfügig verminderten Basizität auch zu einer verminderten Löslichkeit, was die Uneinheitlichkeit der Testergebnisse erklären könnte. Tab. 39 veranschaulicht die Ergebnisse. Die Diskussion der Resultate bezieht sich auf die Werte, die nach zwanzigminütiger Inkubationszeit erhalten wurden.

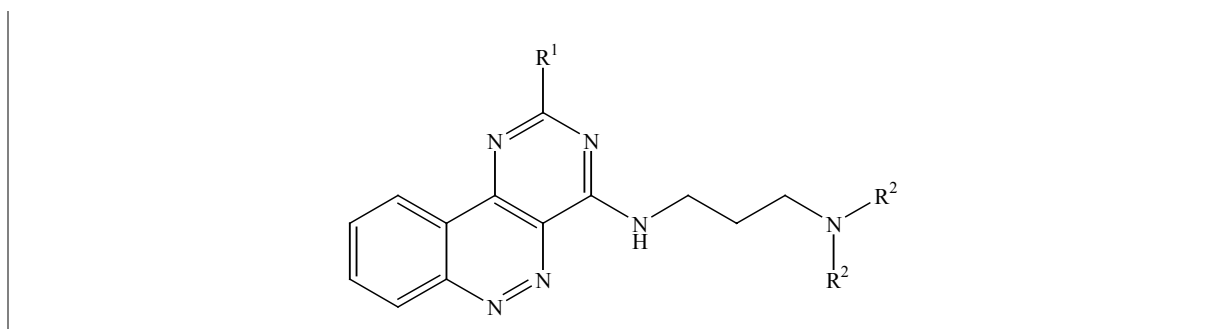


Abbildung 40: Verbindungstyp **14**

Die am stärksten wirkende Verbindung dieses Typs stellt **14d** dar, die mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 5  $\mu\text{mol/L}$  auch zu den besten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen gehört. Hier konnte eine vergleichsweise hohe, 35-fache Steigerung der Wirkung durch Verlängerung der Inkubationszeit in PRP festgestellt werden. Die homologe Dimethyl-Verbindung **14a** zeigte wesentlich schwächere antiaggregatorische Potenz (71  $\mu\text{mol/L}$ ). Die weiteren Verbindungen mit aromatischer Ether-Partialstruktur, welche in Anlehnung an die Ethoxy-Gruppierung des Sildenafil eingefügt wurde, wirkten mit halbmaximalen Hemmkonzentrationen von 43 bis  $>300 \mu\text{M}$  nur mäßig bis gar nicht. Gute Wirkung dagegen zeigten die Furylderivate **14b, l**, bei denen kein nennenswerter Wirkungsunterschied zwischen Dimethyl- und Diethylvariante festgestellt werden konnte ( $\text{IC}_{50}$ : 15 bzw. 13  $\mu\text{mol/L}$ ). Gleichermassen gut inhibierte auch das Thienylderivat **14m** die Thrombozytenaggregation, was wegen der quasiaromatischen Eigenschaften dieser Gruppe in der medizinischen Chemie

häufiger beobachtet wird. Die Substanzen **14h**, **i**, **j**, die einen Halogenphenylsubstituenten in 2-Stellung tragen, wirkten mäßig bis gut. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen zwischen 19 und 96 µmol/L, wobei eine Wirkungsabnahme in der Reihenfolge 4-Cl- > 4-F- > 2-F-Phenyl erkennbar ist.

**Tabelle 39:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **14a - n**

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [µmol/L]		
			4 min	20 min	-fache Steigerung
<b>14a</b>	4-Methoxyphenyl	CH <sub>3</sub>	>300	71	-
<b>14b</b>	2-Furyl	CH <sub>3</sub>	-	15	-
<b>14c</b>	Phenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	160	7	23
<b>14d</b>	4-Methoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	190	5	35
<b>14e</b>	4-Ethoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	>300	-
<b>14f</b>	4-Propoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	43	-
<b>14g</b>	4-Butoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	200	-
<b>14h</b>	2-Fluorphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	190	19	3.3
<b>14i</b>	4-Fluorphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	220	82	2.7
<b>14j</b>	4-Chlorphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	470	96	4.9
<b>14k</b>	4-Cyanophenyl*	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	33	-
<b>14l</b>	2-Furyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	96	13	7.4
<b>14m</b>	2-Thienyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	15	-
<b>14n</b>	Phenylvinyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	41	-

Die Wirkungsverbesserung durch das zwanzigminütige Inkubieren mit PRP bewegte sich bei den meisten Verbindungen des Typs **14** um einen Faktor von ca. 3 – 7, im Falle von **14d** war

\* s. Fußnote S. 38

sogar eine 35-fache Steigerung zu erkennen sowie bei **14c** eine 23-fache Steigerung. Die Ergebnisse zeigen, dass die tertiären Propan-1,3-diamine vom Typ **14** zwar eine deutliche antiaggregatorische Wirkung aufweisen, die jedoch insgesamt etwas schwächer ausfällt als die der sekundären Propan-1,3-diamine (**12**, **13**).

### **3.1.3.3 Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine mit basischem oder neutralem Heteroaromaten in der Seitenkette**

#### **3.1.3.3.1 (N-Furylmethyl)pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine (**15**)**

Die 4-Furfuryl-substituierten Pyrimido[5,4-c]cinnoline vom Typ **15** zeichneten sich bereits bei der Synthese durch eine extrem schlechte Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln (u.a. DMSO, DMF bei Raumtemperatur) aus. Diese Eigenschaft verhindert auch im *in vitro*-Testmodell die erwünschte Lösung der Substanzen, so dass die schlechten Ergebnisse des Born-Tests nicht unbedingt auf mangelnde antiaggregatorische Potenz, sondern wahrscheinlich eher auf unzureichende Substanzkonzentrationen am Wirkort zurückzuführen sind. Die Verbindungen **15a – i** wurden teilweise nach vier-, teilweise nach zwanzigminütiger Inkubationszeit in PRP untersucht. Die Verbindungen **15e**, **f** wurden exemplarisch nach beiden Methoden getestet. Obwohl sich hier eine Wirkungsverbesserung zeigte, sind die Ergebnisse der Messung nach verlängerter Inkubationszeit mit  $IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$  nur als mäßig einzustufen. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Untersuchung der übrigen Substanzen abgesehen. Eine Ausnahme unter den schwach wirksamen Verbindungen des Typs **15** bildet die 4-Chlorphenyl-substituierte Substanz **15e**, die mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $41 \mu\text{mol/L}$  eine antiaggregatorische Wirkung aufweist, die in der Größenordnung der bereits besprochenen Verbindungsklassen **12**, **13** und **14** liegt.

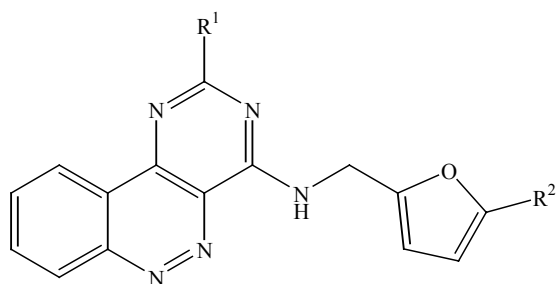


Abbildung 41: Verbindungstyp 15

Tabelle 40: IC<sub>50</sub>-Werte des Verbindungstyps 15

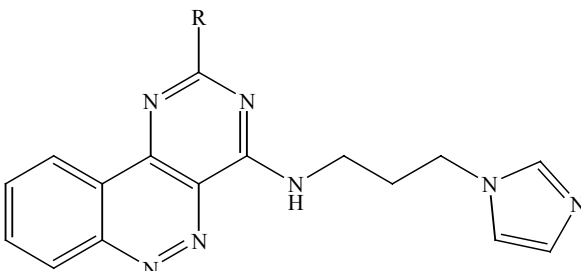
Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μmol/L]	
			4 min	20 min
<b>15a</b>	H	H	>300	-
<b>15b</b>	Phenyl	H	>300	44
<b>15c</b>	2-Fluorphenyl	H	-	160
<b>15d</b>	4-Fluorphenyl	H	>300	-
<b>15e</b>	4-Chlorphenyl	H	>300	41
<b>15f</b>	4-Methoxyphenyl	CH <sub>3</sub>	>300	110
<b>15g</b>	4-Fluorphenyl	CH <sub>3</sub>	>300	-
<b>15h</b>	2-Furyl	CH <sub>3</sub>	-	105
<b>15i</b>	Phenylvinyl	CH <sub>3</sub>	-	110

Die Verbindungen **15a** und **15g** wirkten so schwach antiaggregatorisch, dass unter den Bedingungen des Born-Tests kein IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden konnte.

### 3.1.3.3.2 N-[3-(1H-imidazol-1-yl)propyl]pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine (16)

Die Einführung einer 3-(Imidazol-1-yl)propan-1-amin-Partialstruktur in die 4-Position des Pyrimido[5,4-c]cinnolins führte zu keiner Wirkungsverbesserung im *in vitro*-Testmodell. Als wirkungsstärkste Verbindung dieses Typs zeigte sich **16d** ( $IC_{50} (20 \text{ min}) = 19 \mu\text{mol/L}$ ). Überraschenderweise war die gerinnungshemmende Wirkung der strukturell sehr ähnlichen Verbindung **16c**, die sich von **16d** nur durch einen Furyl- statt eines Thienylrestes

**Tabelle 41:**  $IC_{50}$ -Werte des Verbindungstyps **16**



Verb.	R	$IC_{50} [\mu\text{mol/L}]$	
		4 min	20 min
<b>16a</b>	Phenyl	>300	-
<b>16b</b>	4-Fluorphenyl	>300	-
<b>16c</b>	2-Furyl	>300	175
<b>16d</b>	2-Thienyl	-	19

**Abbildung 42:** Verbindungstyp **16**

unterscheidet, mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 175  $\mu\text{mol/L}$  wesentlich schwächer. Hier kann ebenfalls wieder die schlechte Löslichkeit unter den Testbedingungen, die zu einer ungleichmäßigen und nicht voraussagbaren Diffusion der Substanzen an den Wirkort führt, die Ursache sein.

### 3.1.3.4 Sonstige Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine mit basischem Heterocyclus in der Seitenkette

#### 3.1.3.4.1 N-Morpholinoalkyl-pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine (17)

Von den zehn dargestellten Verbindungen dieses Typs zeigte auch nach zwanzigminütiger Inkubationszeit lediglich **17j** einen  $IC_{50}$ -Wert von 24  $\mu\text{mol/L}$ . Die Werte der weiteren Morpholinoalkyl-Verbindungen lagen über 50  $\mu\text{mol/L}$ . Die in 2-Stellung unsubstituierten Substanzen **17a**, **d** ( $R^1 = \text{H}$ ) waren gerinnungsphysiologisch inaktiv. Dies entspricht der Beobachtung, die auch bei der Verbindung **15a** gemacht werden konnte (S. 69).

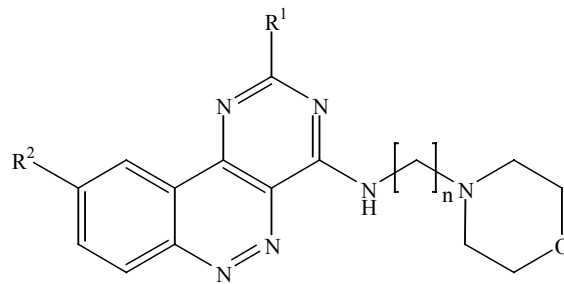


Abbildung 43: Verbindungstyp 17

Die in 9-Position des Pyrimido[5,4-c]cinnolins hexylsubstituierte Verbindung **17b** war nach vierminütiger Inkubationszeit unwirksam. Die ebenfalls in 9-Position hexylsubstituierte Verbindung **17e** erreichte jedoch nach verlängerter Inkubationszeit einen überraschend guten  $IC_{50}$ -Wert von 51  $\mu\text{mol/L}$ .



**Tabelle 42:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **17a - j**

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	IC <sub>50</sub> [μmol/L]	
				4 min	20 min
<b>17a</b>	H	H	2	>300	-
<b>17b</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	2	>300	-
<b>17c</b>	Phenyl	H	2	-	94
<b>17d</b>	H	H	3	>300	-
<b>17e</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	3	>300	51
<b>17f</b>	4-Methoxyphenyl	H	3	>300	94
<b>17g</b>	2-Fluorphenyl	H	3	>>300	-
<b>17h</b>	4-Fluorphenyl	H	3	>>300	60
<b>17i</b>	4-Chlorphenyl	H	3	>>300	-
<b>17j</b>	Phenylvinyl	H	3	-	24

Die Verlängerung der als Spacer fungierende Alkylkette zeigte keinen interpretierbaren Einfluss auf die antiaggregatorische *in vitro*-Aktivität des Typs **17**.

Auch hier zeigt sich wieder im Falle der Verbindungen, die nach beiden Inkubationszeiten gemessen wurden, eine deutliche Verbesserung der Resultate. Da die halbmaximalen Hemmkonzentrationen nach vierminütiger Inkubationszeit größtenteils deutlich >300 μM lagen und z. T. nach dieser Testmethode nicht bestimmbar waren, wurde der Faktor der jeweiligen Wirkungsverbesserung nicht errechnet.

### 3.1.3.4.2 4-(Heteroarylpiperazino)pyrimido[5,4-c]cinnoline (18)

Die Einführung der basischen Heterocyclen in die Seitenkette führte zu keiner Wirkungssteigerung gegenüber den bisher besprochenen Verbindungstypen.

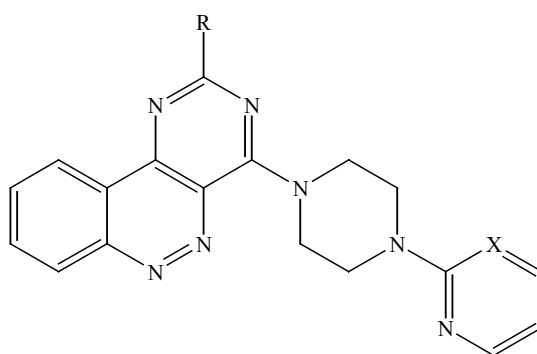


Abbildung 44: Verbindungstyp 18

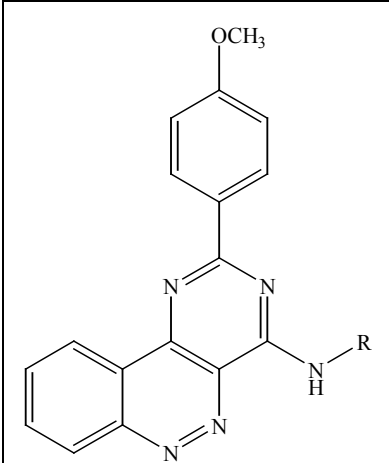
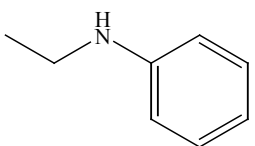
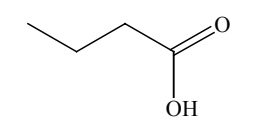
Tabelle 43: IC<sub>50</sub>-Werte des Verbindungstyps 18

Verbindung	R	X	IC <sub>50</sub> [μmol/L]	
			4 min	20 min
<b>18a</b>	Phenyl	CH	-	105
<b>18b</b>	4-Methoxyphenyl	CH	-	175
<b>18c</b>	Phenyl	N	-	>300
<b>18d</b>	2-Fluorphenyl	N	>300	25

Die Verbindung **18d** war mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 25 μmol/L nach 20 min Inkubationszeit die am stärksten wirkende Substanz des Typs **18**. Hier war eine extreme Wirkungssteigerung nach Verlängerung der Inkubationszeit zu erkennen, so dass sich die uneinheitlichen Werte auch dieser Substanzklasse durch unzureichende Löslichkeit bei der Testdurchführung erklären lassen.

### 3.1.3.5 Sonstige in 4-Stellung substituierte Pyrimido[5,4-c]cinnoline (19, 20)

Die exemplarisch dargestellten Verbindungen **19** und **20** wurden ebenfalls auf ihre antithrombotische Potenz untersucht. Verbindung **19** wies mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 62  $\mu\text{mol/L}$  eine mäßige Aktivität auf. Da diese wesentlich geringer ausfiel

	Verb.	R	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ] (20 min)
	<b>19</b>		62
<b>20</b>		>300	

als die der vergleichbaren Cyclohexyl-substituierten Verbindungen des Typs **13**, wurden keine weiteren aromatische Amine als Substituenten ausgewählt. Die Einführung einer Carbonsäurefunktion in die Seitenkette führte sogar zu einem völligen Verlust der antiaggregatorischen Wirkung. Dies zeigt erneut, dass das basische Zentrum der Seitenkette für die gerinnungshemmende Potenz von großer Bedeutung ist.

Auch die Einführung der Carbonsäurefunktion führte zu keiner merklichen Verbesserung der Löslichkeit im Testmodell.

### 3.1.4 Andere Induktoren der Thrombozytenaggregation

#### Adrenalin

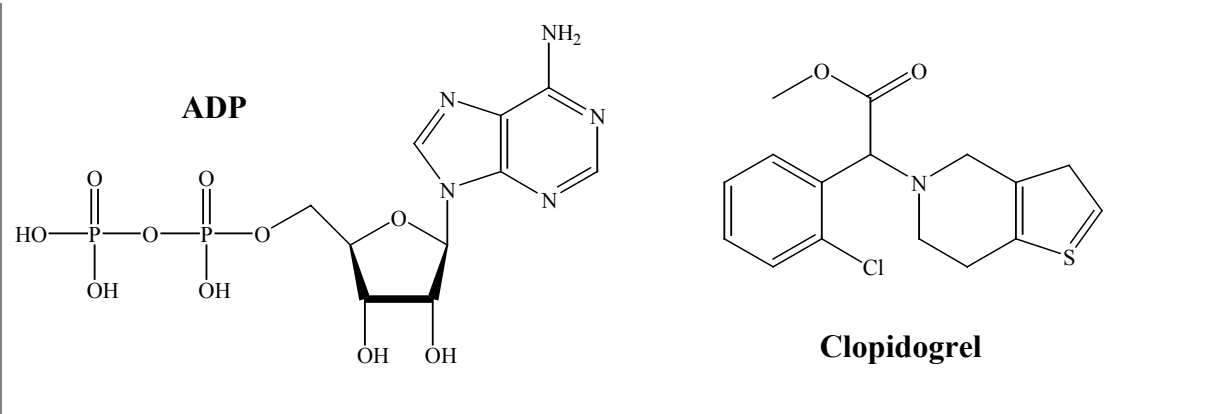
Auf der Thrombozytenmembran befindliche  $G_i$ -Protein-gekoppelte  $\alpha_2$ -Rezeptoren vermitteln die adrenerge Plättchenaggregation<sup>38</sup>. Durch die Unterdrückung der  $PGI_2$ -stimulierten Bildung von cAMP kommt es zu einer erhöhten cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration und der Aktivierung von Phospholipase  $A_2$ . Der Mechanismus der aggregationsauslösenden Wirkung besteht in der Potenzierung der Effekte anderer prokoagulatorischer Substanzen wie ADP, PAF und  $TXA_2$ <sup>39,40</sup>.

#### ADP

Bindet ADP an bestimmte Purin-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, kommt es ebenfalls zur Aktivierung der Blutgerinnung. Vermittelt wird dies über G-Protein-gekoppelte P2-Rezeptoren der Subtypen  $P2Y_1$  und  $P2Y_{12}$ . Die Beteiligung eines weiteren, Ionenkanal-gesteuerten P2X-Rezeptors wird noch diskutiert. Während der  $P2Y_1$ -Rezeptor schon länger bekannt war, gelang die Klonung und Strukturaufklärung des  $P2Y_{12}$ -Rezeptors erst vor kurzem<sup>41</sup>. Der  $P2Y_1$ -Subtyp vermittelt über Aktivierung der Phospholipase C die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und eine Veränderung der Plättchenoberfläche. Zur Bildung eines stabilen Aggregats ist jedoch die gleichzeitige Stimulierung des  $P2Y_{12}$ -Rezeptors nötig, der seinerseits die Adenylatcyclase hemmt und die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GP IIb/ IIIa auslöst<sup>42,43</sup>.

Obwohl ADP selbst ein relativ schwacher Aggregationsauslöser ist, übt es durch die Verstärkung der Wirkung anderer gerinnungsaktiver Substanzen wie  $TXA_2$  und Thrombin eine wichtige Funktion bei der Thrombozytenaggregation aus.

Die Blockade der genannten P2Y-Rezeptoren stellt somit einen wichtigen Ansatz für die Entwicklung von Antithrombotika dar. Ein Vertreter dieser Substanzklasse ist das Thienopyridin **Clopidogrel** (Abb. 45), welches  $P2Y_{12}$ -vermittelt aggregationshemmende Wirkung zeigt und mit guten Ergebnissen in der Postinfarkttherapie eingesetzt wird.

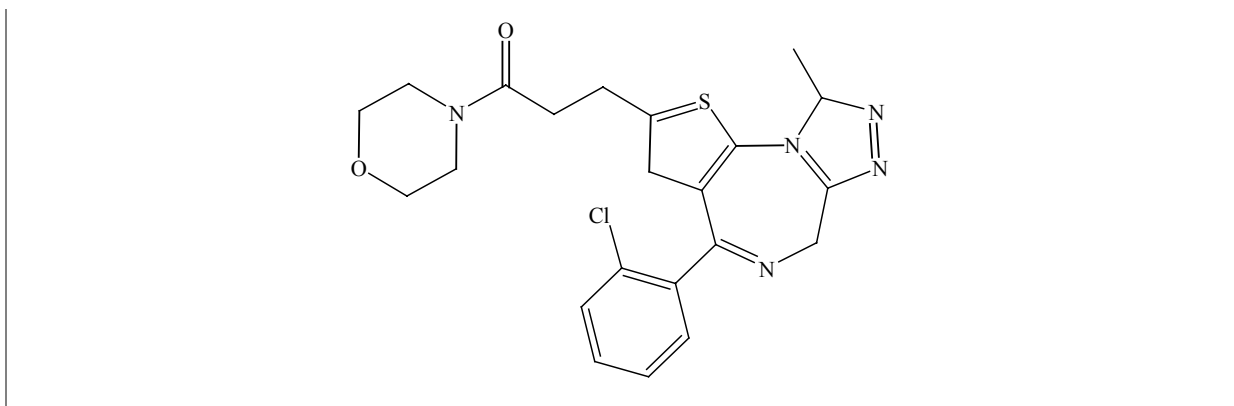


**Abbildung 45:** Struktur von ADP und Clopidogrel, einem P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten

Thienopyridine hemmen über die Blockade des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors die ADP-induzierte Inhibition der Adenylatcyclase und verhindern die ebenfalls ADP-induzierte Hemmung der Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulated Phosphoprotein (VASP). Durch die Kopplung der ADP-induzierten Aggregation mit der Freisetzung anderer Aggregationsauslöser führt die ADP-antagonistische Wirkung der Thienopyridine zusätzlich zur Hemmung der TXA<sub>2</sub>-, PAF- und thrombininduzierten Plättchenaktivierung<sup>44</sup>. Die P2Y<sub>1</sub>-gesteuerte Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sowie das „shape change“ der Thrombozytenoberfläche werden nicht beeinflusst<sup>45</sup>.

### Plättchenaktivierender Faktor (PAF)

PAF, ein durch Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranlipiden mobilisiertes Phosphorylcholin, ist ein Entzündungsmediator mit stark gefäßerweiternder und bronchokonstriktorischer Wirkung. Es aktiviert die Thrombozyten über den G-Protein-gekoppelten PAF-Rezeptor und stimuliert die Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub>.



**Abbildung 46:** Strukturformel des PAF-Antagonisten Apafant

Tabelle 44 gibt die verschiedenen Aggregationsinduktoren mit ihren Referenzsubstanzen und deren halbmaximalen Hemmkonzentration wieder.

Die Messung der Proben wurde analog zu der beschriebenen Born-Test-Methode, in der Kollagen als Aggregationsauslöser verwendet wurde, durchgeführt. Nach Suspension der Verbindungen in 10  $\mu$ L DMSO/ 2 mL PRP wurden die Proben 20 min unter Rühren bei 37 °C inkubiert. Mit den genannten Aggregationsauslösern wird die Thrombusbildung initiiert und

**Tabelle 44:** Verwendete Aggregationsinduktoren mit ihren Referenzsubstanzen und deren IC<sub>50</sub>-Werten

Induktor	Referenzsubstanz	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ mol/L]
Adrenalin	Phentolaminmesilat	2
ADP	5-(N-Ethylcarboximido)-adenosin	1
PAF	Apafant	0.6

die Hemmung der Thrombusbildung photometrisch bestimmt. Tabelle 45 gibt die Resultate der Messungen wieder. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit ist die halbmaximale

**Tabelle 45:** IC<sub>50</sub>-Werte bereits im Kollagen-Versuch sehr gut wirkender Verbindungen mit verschiedenen anderen Aggregationsauslösern

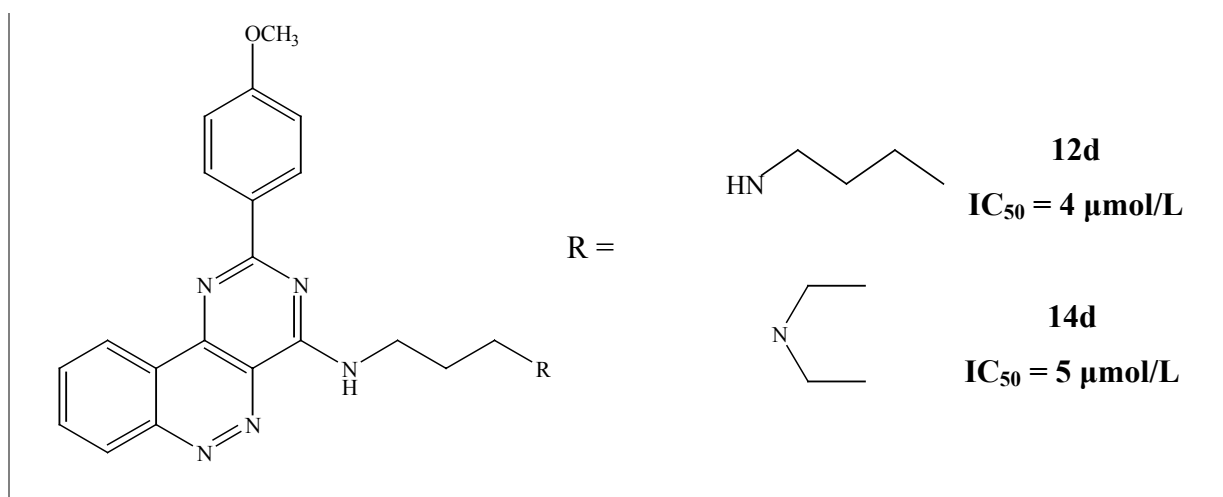
Verbindung	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ mol/L]			
	Adrenalin	ADP	PAF	Kollagen
<b>12a</b>	25	15	48	7
<b>12b</b>	<b>0.15</b>	16	<b>0.15</b>	7
<b>12d</b>	17	120	30	4
<b>13c</b>	14	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	3
<b>13i</b>	7	21	<b>0.18</b>	3
<b>14d</b>	3	16	40	5

Hemmkonzentration der Verbindungen bei Verwendung von Kollagen als Aggregationsinduktor ebenfalls in der Ergebnistabelle angegeben. Für die Messungen ausgewählt wurden sechs Verbindungen, die im Versuch mit Kollagen die niedrigsten  $IC_{50}$ -Werte erreicht hatten. Herauszuheben sind hier besonders die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindung **12b**, die sowohl bei Adrenalin- als auch bei PAF-induzierter Aggregation bei 150 nmol/L und damit etwa um den Faktor 50 unter dem entsprechenden mit Kollagen gemessenen Wert liegen. Die etwa gleiche antiaggregatorische Aktivität zeigt **13i** ( $IC_{50} = 180$  nmol/L) bei PAF-induzierter Aggregation. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der Substanz **13c** bei Verwendung von ADP und PAF als Aggregationsinduktoren liegt mit jeweils 800 nmol/L ebenfalls unter dem Kollagen-Wert. Auch Verbindung **14d** zeigt bei adrenalininduzierter Plättchenaggregation mit 3  $\mu$ M eine niedrigeren  $IC_{50}$ -Wert als bei kollageninduzierter (5  $\mu$ mol/L).

### 3.1.5 Bewertung der *in vitro*-Testergebnisse

#### 3.1.5.1 Bewertung der Hemmwirkung auf die durch Kollagen induzierte Aggregation

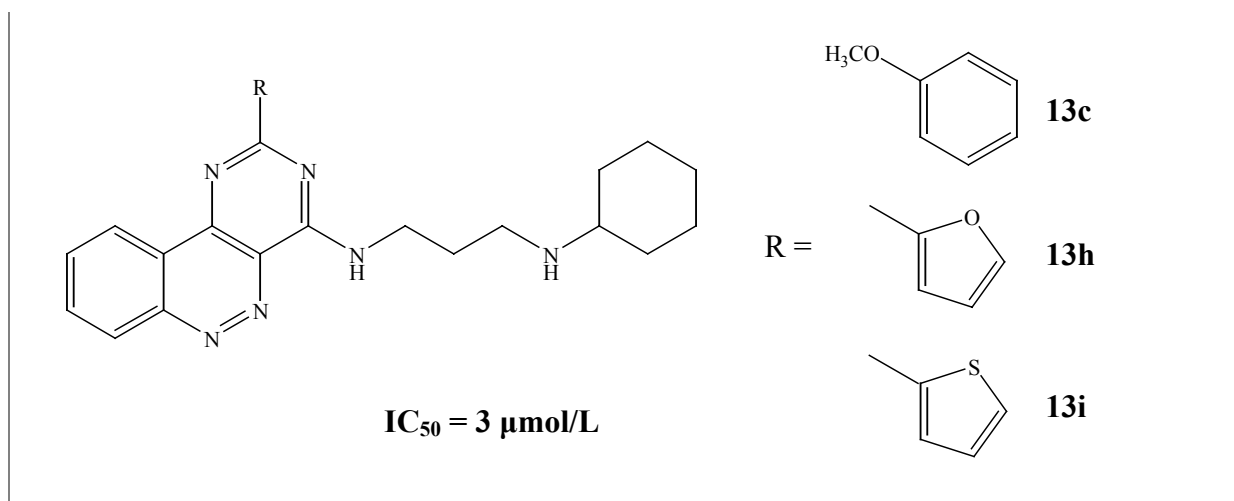
Die Ergebnisse des Born-Tests, bei dem die Thrombozytenaggregation unspezifisch mit einer Kollagenlösung ausgelöst wurde, zeigen deutlich, dass die antiaggregatorische Potenz der dargestellten Pyrimido[5,4-c]cinnoline hauptsächlich durch die Aminkomponente in der Seitenkette bestimmt wird. Der Substituent in 2-Stellung scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, jedoch erwies sich generell eine Substitution in dieser Position als notwendig, um eine nennenswerte Wirkung erzielen zu können. Die bereits aufgestellte These, dass die Seitenkette ein basisches Zentrum aufweisen muss, bestätigte sich. Besonders die Propan-1,3-diamine, die am N<sup>3</sup> aliphatisch mono- oder dialkylsubstituiert sind (Verbindungstypen **12**, **13**, **14**), wirkten z. T. sehr gut antiaggregatorisch. Herauszuheben sind hier vor allem die Substanzen **12a - d**, **13b**, **c**, **h**, **i** und **14c**, **d**, die alle eine halbmaximale Hemmkonzentration von unter 10 µmol/L aufweisen. Als Substituent in 2-Position ist hier offensichtlich eine



**Abbildung 47:** Struktur der Verbindungen **12d** und **14d** mit ihren IC<sub>50</sub>-Werten

4-Methoxyphenylgruppe vorteilhaft. Eine Verlängerung der Alkylkette des Ethers führt jedoch wieder zu einer Wirkungsabschwächung. So steigt der IC<sub>50</sub>-Wert der Verbindungen **13c**, **d** im Vergleich zu **13b** von 3 auf 29 und 180 µmol/L an, was einer Verschlechterung um den Faktor 9 bzw. 6 pro Methylengruppe entspricht.





**Abbildung 48:** Struktur der Verbindungen **13c, h, j**, die mit einem  $IC_{50}$ -Wert von jeweils  $3 \mu\text{mol/L}$  die am stärksten wirkenden Substanzen der Arbeit darstellen

Weitaus weniger gut wirkten die Verbindungen **15a - i**, **16a - d** und **17 a - j**, die in der Seitenkette heteroaromatisch substituiert sind. Vereinzelt herausragende  $IC_{50}$ -Werte von  $19 \mu\text{mol/L}$  (**16d**, 2-(2-Thienyl)-substituiert) und  $24 \mu\text{mol/L}$  (**17j**, 2-Phenylvinyl-substituiert) lassen den Schluss zu, dass es in diesen Substanzgruppen hauptsächlich durch uneinheitliches Lösungsverhalten der Verbindungen während der Testdurchführung zu einem heterogenen Erscheinungsbild der Testergebnisse kommt.

Anhand der besprochenen Werte für die aggregationshemmende Wirkung der dargestellten Verbindungen lässt sich keine eindeutige Reihenfolge für die Wirkungsverbesserung/-verschlechterung durch die unterschiedlichen Substituenten in 2-Position des Pyrimido[5,4-c]cinnolins festlegen. Wie erwähnt, scheint eine Methoxyphenyl-Gruppierung mit einer relativ guten Wirkung innerhalb eines Substanztyps zu korrelieren. Dies trifft auch auf den Furyl- und Thienylrest zu, doch scheint generell die Art und die Elektronenverteilung des Heterocyclus weitaus geringeren Einfluss auf die physiologische Aktivität der Verbindung zu haben als die in 4-Position befindliche Aminkomponente. Es wird deutlich, dass bei gleicher Aminkomponente in 4-Stellung des Pyrimido[5,4-c]cinnolins keine einfache Korrelation zwischen der Elektronendichte des Aromaten in 2-Position und der gerinnungshemmenden Wirkung der Verbindungen gegeben ist. Tabelle 46 veranschaulicht diese Beobachtung. Ein elektronenreicher Phenylring scheint zwar in etwa um den Faktor 10 niedrigeren Konzentrationen wirksam zu sein als die entsprechende Substanz mit elektronenarmer Nitril-Partialstruktur, eine klare Aussage ist hier aber wegen der geringen Anzahl an Testsubstanzen mit (-)-M-Substitution nicht zu treffen. Beim Vergleich der elektronenreichen 4-Methoxyphenyl-substituierten Verbindungen mit den eine

Zwischenstellung einnehmenden Phenylderivaten bietet sich ein uneinheitliches Bild. Unter Berücksichtigung von Messungenauigkeiten und der mehrfach erwähnten Löslichkeitsproblematik kann davon ausgegangen werden, dass die Einführung der beiden genannten Substituenten zu etwa gleichen antithrombotischen Aktivitäten führt.

**Tabelle 46:** Abhängigkeit der *in vitro*-Wirkung von der Substitution in 2-Stellung des Pyrimido[5,4-c]cinnolins

Substituent in 2-Stellung	IC <sub>50</sub> [µmol/L] (20 min) bei Verbindungstyp						
	6	12	13	14	15*	17	18
Phenyl	16	9	48	7	>300	94	105
4-Methoxyphenyl	26	4	3	5	>300	94	175
4-Cyanophenyl	-	-	38	33	-	-	-

Um halbmaximale Hemmkonzentrationen der Größenordnung von <100 µM erreichen zu können, wird also offenbar ein lipophiler Rest benötigt, dessen Struktur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Die Amin-Partialstruktur bestimmt in wesentlich größerem Maße die gerinnungshemmende Wirkung der Verbindungen.

IC<sub>50</sub>-Werte unter 30 µM konnten mit wenigen Ausnahmen nur dann erreicht werden, wenn sich in der Seitenkette eine Ethan-1,2- oder eine Propan-1,3-diamin-Partialstruktur befand (Verbindungstypen **10**, **12**, **13**, **14**). Ein sekundäres Amin am N<sup>3</sup> ist hierbei tendenziell wirkungsstärker als ein tertiäres. Auch der Verbindungstyp **17**, der mit seiner Morpholin-Partialstruktur im weiteren Sinne zu den tertiären Propan-1,3-diaminen gehört, kann mit halbmaximalen Hemmkonzentrationen zwischen 24 und 94 µmol/L noch zu den deutlich antiaggregatorisch wirksamen Verbindungsklassen dieser Arbeit gezählt werden. Es wird also auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit die eingangs erwähnte Theorie bestätigt, dass ein basisches Zentrum in der Seitenkette für eine Hemmung der Thrombozytenaggregation wichtig ist.

Eine Grenzstellung zwischen den deutlich wirkungsvollen und den als unwirksam angesehenen Verbindungstypen nimmt die Substanzklasse **15** mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 41 und 160 µmol/L nach zwanzigminütiger Inkubationszeit ein. Da aber eben dieser

\* Hier wird davon ausgegangen, dass zwischen den 2-Furyl- und den 2-(5-Methyl)furyl-substituierten Verbindungen kein signifikanter Wirkunterschied zu erwarten ist.

Verbindungstyp bereits bei der Synthese durch ausgesprochen schlechte Lösungseigenschaften auffiel, kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass die optimale Wirkung der Verbindungen wegen unzureichender Lösung während des *in vitro*-Tests nicht erreicht werden konnte.

Die Verbesserung der Testergebnisse nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 min bewies, dass die gerinnungshemmende Aktivität der hier getesteten Verbindungen wesentlich höher ist als zu Beginn der Testreihen angenommen. In fast allen Fällen konnten durch die modifizierte Methode  $IC_{50}$ -Werte im als wirkungsvoll eingestuften Bereich von unter 300  $\mu\text{mol/L}$  bestimmt werden. Trotz der verlängerten Verweildauer der Substanzen im PRP blieb jedoch fast immer ein Teil der Probe ungelöst, so dass die Vermutung nahe liegt, dass durch eine weiter verlängerte Inkubationszeit noch größere Wirkungssteigerungen möglich sind und die „echten“  $IC_{50}$ -Werte deutlich unter den bisher gemessenen liegen dürften. Leider ist diese Modifizierung des Tests wegen der begrenzten Lebensdauer der Thrombozyten im PRP nicht ohne weiteres durchführbar.

Der Faktor der Wirkungssteigerung war je nach Substanz sehr unterschiedlich. In den meisten Fällen lag er im Bereich von 3 – 7, in Einzelfällen konnte sogar eine Verbesserung um das 23-fache (**13c**, **14c**) bzw. das 35-fache (**14d**) beobachtet werden.

Zu vermuten ist, dass sämtliche durch den Born-Test erhaltenen Werte u. a. wegen der uneinheitlichen Kristallgrößen der eingewogenen Substanzproben schwanken können. Bei der Einwaage von Substanzmengen im Bereich von 0.2 mg und darunter ist es nur sehr begrenzt möglich, eine einheitliche Größe der eingewogenen Partikel zu gewährleisten, so dass es über die resultierende unterschiedliche Oberfläche und Oberflächenstruktur zu einer unterschiedlichen Geschwindigkeit des Lösungsprozesses kommen kann. Diese Problematik kann besonders im Falle der hier getesteten, fast durchweg schwerlöslichen Verbindungen eine relativ große Fehlerquelle darstellen. Zur Vermeidung dieses Problems könnte der Versuch unternommen werden, eine Mikronisierung der Substanzkristalle vorzunehmen, um einheitlichere Lösungsbedingungen zu schaffen. Im Rahmen dieser Arbeit war dies jedoch nicht zu leisten.

### 3.1.5.2 Bewertung der Hemmwirkung auf die Aggregation durch andere Induktoren

Es wurden sechs der am stärksten wirkenden Substanzen dieser Arbeit auf ihre aggregationshemmende Wirkung gegenüber anderen Induktoren getestet. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Hemmung nicht kollageninduzierter Thrombozytenaggregation stellte sich heraus, dass einige Testsubstanzen besonders bei ADP-, PAF- und Adrenalin-induzierter Aggregation deutliche inhibitorische Eigenschaften bewiesen.

So konnten für Verbindung **13c** halbmaximale Hemmkonzentrationen von 800 nmol/L erreicht werden, wenn ADP und PAF als Aggregationsauslöser verwendet werden. Dies deutet auf einen antipurinergen und PAF-antagonistischen Wirkmechanismus hin. Noch niedrigere  $IC_{50}$ -Werte konnten für Verbindung **12b** mit Adrenalin und PAF als Aggregationsinduktoren erreicht werden. Es ließ sich hier jeweils der herausragende Wert von 150 nmol/L bestimmen, was wahrscheinlich auf einen Wirkmechanismus über  $\alpha_2$ - bzw. PAF-Rezeptoren zurückzuführen ist. Spezifisch am PAF-Rezeptor scheint Verbindung **13i** zu wirken. Der  $IC_{50}$ -Wert von 180 nmol/L liegt hier etwa um den Faktor 15 niedriger als der Kollagen-Wert. Verbindung **14d** zeigte bei adrenalininduzierter Thrombozytenaggregation ebenfalls noch eine etwas niedrigere halbmaximale Hemmkonzentration als bei der mit Kollagen induzierten (3  $\mu$ mol/L gegenüber 5  $\mu$ mol/L). Man kann also davon ausgehen, dass die antiaggregatorische Wirkung der getesteten Substanzen über einen antiadrenergen, PAF- oder ADP-antagonistischen Wirkmechanismus erreicht wird, wobei auch eine Kombination der Mechanismen möglich ist. Aus Kapazitätsgründen konnten nicht mehr der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf ihre spezifische Wirkung gegenüber diesen Aggregationsauslösern getestet werden. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen untereinander ist jedoch anzunehmen, dass auch die antiaggregatorische Wirkung weiterer Pyrimido[5,4-c]cinnoline durch diese Mechanismen zustande kommt.

### 3.2 Bestimmung der Thrombusbildungshemmung *in vivo*

Der Nachteil sämtlicher *in vitro*-Testmodelle besteht darin, dass physiologische Faktoren wie Resorption, Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Toxizität bei der Testung einer Substanz nicht berücksichtigt werden können. Häufig haben diese Faktoren jedoch entscheidenden Einfluss auf die Wirkung einer Substanz. Im speziellen Fall der gerinnungsphysiologischen Untersuchungen sind zudem viele weitere, z.T. physikalische Mechanismen von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählen die Fließeigenschaften des Blutes, die gerinnungsregulierende Funktion des intakten Gefäßendothels, Scherkräfte innerhalb der Gefäße, Gefäßdurchmesser, sowie der Blutdruck. Zudem muss beim *in vitro*-Test beachtet werden, dass die Thrombozyten nur eine geringe Lebensdauer besitzen. Um diese Faktoren in

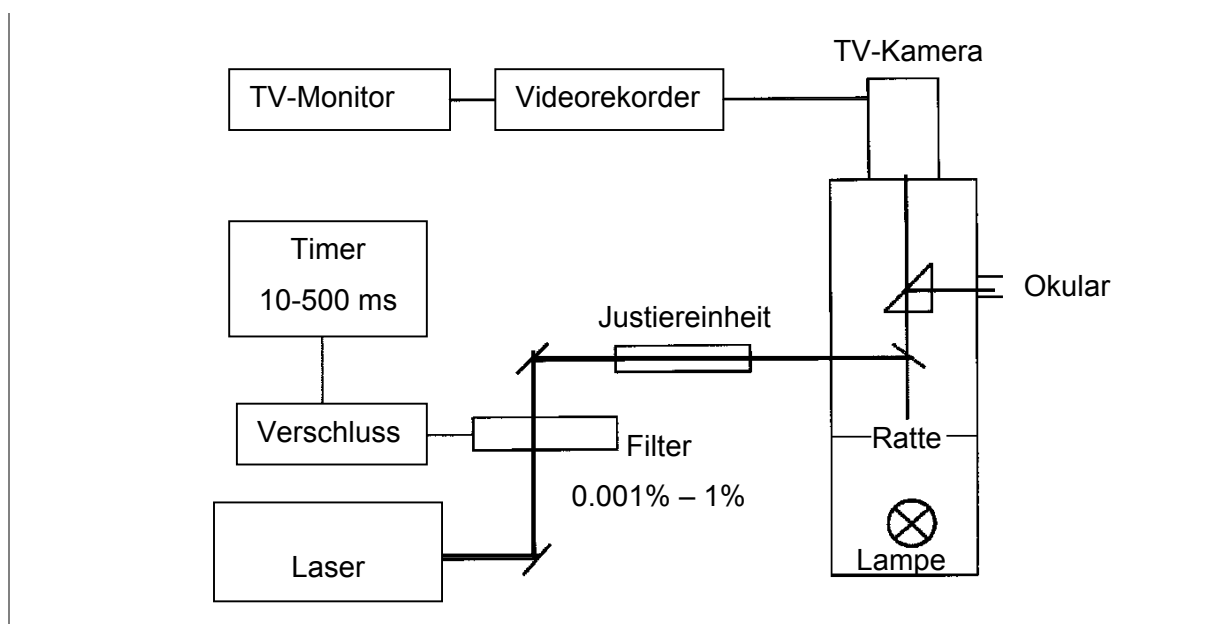


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Laser-Thrombose-Modells

die Beurteilung der physiologischen Wirkung einer Testsubstanz einfließen lassen zu können, ist es unerlässlich, *in vivo*-Tests durchzuführen. Im Arbeitskreis Prof. Rehse wird dazu ein Laser-Thrombose-Modell eingesetzt (Abb. 49). Dieses basiert auf Versuchen von Weichert<sup>46</sup> und Seiffge<sup>47</sup>. Etabliert wurde es von Kesselhut<sup>48</sup> und Schein<sup>49</sup>. Ciborski<sup>50</sup> standardisierte die Messmethode und entwickelte neue Verfahren zur statistischen Auswertung.

**Methode:**

Mesenterialgefäße männlicher Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150 – 180 g werden freigelegt und mit einem Argon-Laser beschossen. Die Gefäßläsionen führen zur Freilegung subendothelialer Kollagenfasern, deren Kontakt mit den im Blutstrom befindlichen Thrombozyten die Aggregation initiiert. Es bildet sich ein Thrombus, dessen Bildungsprozess sich durch ein Mikroskop verfolgen lässt.

**Versuchsdurchführung:**

Nach der Suspendierung in einer 1%igen Gummi arabicum-Lösung werden die Substanzen in einer Dosierung von 60 mg/ kg Körpergewicht durch eine Knopfkanüle per os verabreicht. Nach zwei Stunden wird das Mesenterialgewebe der narkotisierten Ratten freigelegt und die laserinduzierte Thrombusbildung beobachtet.

**Auswertung:**

Die zur Bildung eines Thrombus benötigte Anzahl der Laserschüsse pro Gefäßstelle wird sowohl für Arteriolen als auch für Venolen gezählt. Als Thrombus wird hier ein Gerinnsel von wenigstens 10 – 12 µm Durchmesser definiert. Wird nach fünf Laserschüssen auf die gleiche Stelle keine Thrombusbildung beobachtet, wird die Untersuchung an dieser Gefäßstelle beendet und eine Expositionszahl von sechs festgehalten.

Die Substanzen werden an fünf Tieren getestet. Pro Tier wird an jeweils sechs Stellen beider Gefäßarten ein Laserbeschuss vorgenommen. Zur Kontrolle dienten jeweils neun Tiere.

**Thrombusbildungsindex (TBI):**

Der TBI ist ein Maß für die Wirkung einer Substanz. Er berechnet sich aus dem Quotienten aus der Summe der benötigten Laserschüsse und der Anzahl der untersuchten Gefäßstellen je Tier und Gefäßart. Er gibt demnach die durchschnittliche Anzahl an Laserschüssen an, die zur Thrombusbildung je Tier und Gefäßart nötig waren.

**Mittlerer Thrombusbildender Index (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 TBI umgerechnet. Dieser gibt dann die zu erwartende prozentuale Hemmung der Thrombusbildung an. Dazu wird je nach Gefäßart der mTBI des

Kontrollwertes auf 0% und der maximale mTBI auf 100% festgelegt. Es ergibt sich folgende Gleichung:

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

Die Standardabweichung  $s$  und der Standardfehler  $s_x$  werden nach den üblichen Gleichungen berechnet<sup>51</sup>. Die Signifikanz der durchgeführten Messreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-Tests nach Wilcoxon, Mann und Whitney<sup>52</sup> überprüft. Ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $P$ )  $> 0.1$ , wird das Ergebnis als nicht signifikant (n. s.) gewertet.

**Acetylsalicylsäure** führt unter diesen Testbedingungen zu einer  $48 \pm 10\%$ igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer  $20 \pm 5\%$ igen Hemmung in den Venolen ( $P \leq 0.002$ )<sup>53</sup>.

Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen, die bereits dem *in vitro*-Test unterzogen wurden, wurde nun auch im Laser-Thrombose-Modell auf ihre gerinnungsphysiologische Aktivität überprüft. Da die Ergebnisse meist weit hinter denen des Born-Tests zurückblieben und da die Kapazität des Testmodells begrenzt ist, wurde nur eine kleine Auswahl der dargestellten Verbindungen auch im *in vivo*-Modell getestet.

Zum besseren Vergleich mit den *in vitro*-Testergebnissen sind diese jeweils mit in den Tabellen aufgeführt.

### 3.2.1 2-[3-(Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl-amino)propylamino]ethanole

#### (6)

Von den sechs getesteten Verbindungen des Typs **6** zeigten nur die in 2-Position 4-Methoxy- und 4-Propoxyphenyl-substituierten (**6c**, **e**) mit 4 bzw. 5%iger Hemmung der arteriellen Thrombusbildung eine signifikante antithrombotische Aktivität. Die im Born-Test mit **6c**, **e** vergleichbar wirksame Substanzen **6b**, **g** vermochten die Gerinnung nicht zu beeinflussen. Eine gerinnungshemmende Wirkung in den Venolen war nur bei **6e** erkennbar (4%).

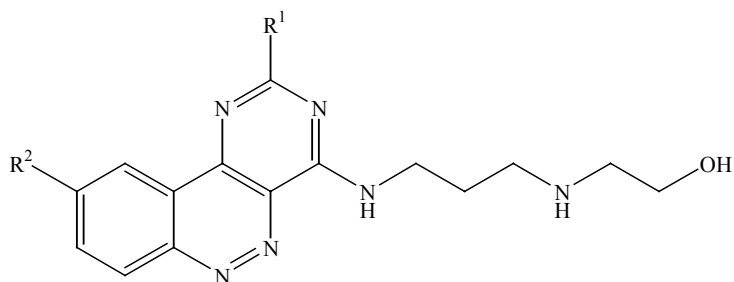


Abbildung 50: Verbindungstyp 6

Tabelle 47: Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*- Testergebnisse des Verbindungstyps 6

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (20 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ± x	P ≤	% ± x	P ≤
<b>6a</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	62	0 ± 1	0.20	0 ± 1	n. s.
<b>6b</b>	Phenyl	H	16	0 ± 1	n. s.	0 ± 1	n. s.
<b>6c</b>	4-Methoxyphenyl	H	26	4 ± 1	0.20	0 ± 1	n. s.
<b>6d</b>	4-Ethoxyphenyl	H	150	5 ± 2	n. s.	1 ± 1	n. s.
<b>6e</b>	4-Propoxyphenyl	H	20	5 ± 1	0.05	4 ± 1	0.05
<b>6g</b>	2-Furyl	H	19	0 ± 2	n. s.	0 ± 1	n. s.

Die Ergebnisse verdeutlichen, welchen Einfluss die erwähnten physiologischen Parameter wie Resorption, Metabolismus und andere auf die Wirkung einer Verbindung haben können.

### 3.2.2 Sonstige Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl-alkohole (8 – 11)

Es wurden die Verbindungen **8**, **9** und **11** getestet. Wie bereits im *in vitro*-Testsystem festgestellt, zeigen alle drei Verbindung keine aggregationshemmende Wirkung.



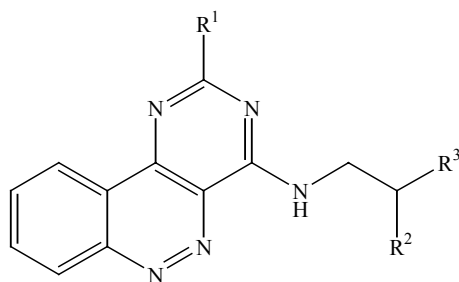


Abbildung 51: Verbindungstypen 8 - 11

Tabelle 48: Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*- Testergebnisse der Verbindungen 8, 9, 11

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (4 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
					Arteriolen		Venolen	
					% ± s <sub>x</sub>	P ≤	% ± s <sub>x</sub>	P ≤
8	H	H	OH	>300	0 ± 1	n. s.	0 ± 1	n. s.
9	H	H	OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH	>300	0 ± 1	n. s.	0 ± 1	n. s.
11	Phenyl	CH <sub>2</sub> OH	OH	>300	1 ± 1	n. s.	0 ± 1	n. s.

Da diese Verbindungen bereits im *in vitro*-Testmodell als wirkungslos eingestuft wurden, überraschen die *in vivo*-Resultate nicht.

### 3.2.3 N-Alkyl-N'-(pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine (12, 13)

Die Monoalkyl-substituierten Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-ylpropan-1,3-diamine waren bereits im Born-Test durch sehr gute antiaggregatorische Wirkung aufgefallen. Der Tierversuch bestätigte diese Ergebnisse insofern, als die Verbindungen 13c mit 10%-iger Hemmwirkung auf die Thrombusbildung in den Arteriolen auch zu den besten *in vivo* wirksamen Verbindungen zählt. Die Testung einiger weiterer Verbindungen des Typs 12

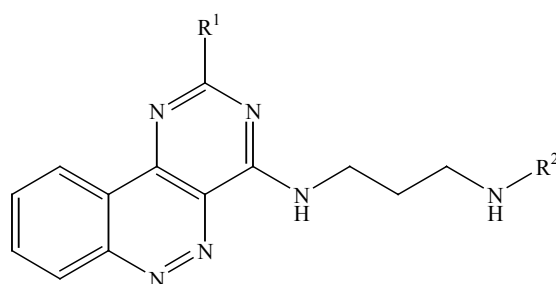


Abbildung 52: Verbindungstypen 12, 13

Tabelle 49: Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*- Testergebnisse des Verbindungstypen 12 und 13

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (20 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ± s <sub>x</sub>	P ≤	% ± s <sub>x</sub>	P ≤
<b>12d</b>	4-Methoxyphenyl	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4	4 ± 2	0.20	2 ± 1	0.20
<b>13c</b>	4-Methoxyphenyl	Cyclohexyl	3	<b>10 ± 1</b>	0.002	5 ± 1	0.001
<b>13i</b>	2-Thienyl	Cyclohexyl	3	6 ± 1	0.05	2 ± 1	n. s.

war wegen unzureichender Ausbeuten leider nicht durchführbar. Die Verbindungen **13c** und **i** zeigten mit 4 bzw. 6%iger Hemmung der Thrombusbildung etwas schwächere Aktivität. Es bestätigt sich jedoch auch im Tierversuch, dass eine 2-(4-Methoxyphenyl)-Gruppierung für das Erreichen einer gerinnungshemmenden Aktivität günstig ist. Gemessen an der 48%igen Hemmwirkung von Acetylsalicylsäure unter den gleichen Bedingungen sind die Verbindungen jedoch als relativ schwach wirkend einzustufen.

### 3.2.4 N,N-Dialkyl-N'-(pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-yl)propan-1,3-diamine (14)

Der Verbindungstyp **14** hatte bereits im Born-Test vielversprechende Ergebnisse gezeigt, die im Laser-Thrombose-Modell auf ihre *in vivo*-Übertragbarkeit geprüft wurden.

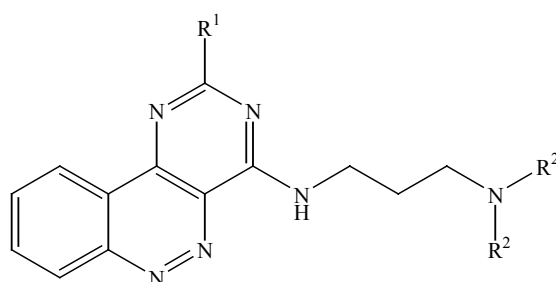


Abbildung 53: Verbindungstyp 14

Die Substanzen dieses Typs zeigten auch *in vivo* fast alle signifikante antithrombotische Aktivitäten, die allerdings hinter den durch den Born-Test geweckten Erwartungen zurückblieben. Tab. 50 veranschaulicht die Ergebnisse des Laser-Thrombose-Modells.

Tabelle 50: Hemmung der Thrombusbildung *in vivo* durch Verbindungstyp 14

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (20 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ± s <sub>x</sub>	P ≤	% ± s <sub>x</sub>	P ≤
<b>14c</b>	Phenyl	CH <sub>3</sub>	7	4 ± 2	0.20	0 ± 1	n. s.
<b>14d</b>	4-Methoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	5	7 ± 1	0.01	4 ± 1	0.05
<b>14e</b>	4-Ethoxyphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	>300	3 ± 2	n. s.	0 ± 1	n. s.
<b>14i</b>	4-Fluorphenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	82	5 ± 2	0.10	4 ± 1	0.05
<b>14k</b>	4-Cyanophenyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	33	7 ± 3	0.05	2 ± 2	n. s.
<b>14l</b>	2-Furyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	13	4 ± 2	0.20	4 ± 1	0.05
<b>14m</b>	2-Thienyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	15	4 ± 2	0.20	1 ± 2	n. s.
<b>14n</b>	Phenylvinyl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	41	6 ± 1	0.02	5 ± 2	0.05

Die wirkungsstärksten Verbindungen dieser Gruppe waren **14d** und **14k** mit jeweils 7%iger Hemmung der Thrombusformation im arteriellen Schenkel. Da jedoch die Unterschiede innerhalb der Gruppe recht gering sind, lassen sich keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der

Strukturabhängigkeit ziehen. Wie im Born-Test lässt sich allerdings auch hier die Tendenz erkennen, dass an die zunehmende Kettenlänge des Phenylethers in 2-Position eine Verschlechterung der Wirkung gekoppelt ist (7% (**14d**) gegenüber 3% (**14e**)).

### 3.2.5 Pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine mit basischem oder neutralem Heteroaromaten in der Seitenkette (15, 16)

Mit Ausnahme von **15b** zeigten alle furylsubstituierten Verbindungen des Typs **15** eine signifikante antithrombotische Wirkung. Die bestwirkende Verbindung war **15f**, die einen

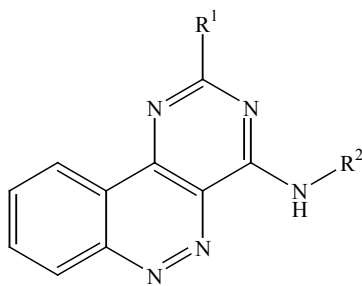
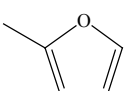
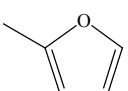
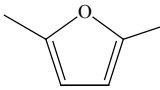
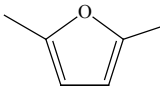
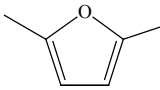
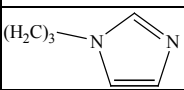


Abbildung 54: Verbindungstypen 15, 16

Tabelle 51: Hemmung der Thrombusbildung *in vivo* durch die Verbindungstypen 15, 16

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (4 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ± s <sub>x</sub>	P ≤	% ± s <sub>x</sub>	P ≤
<b>15b</b>	Phenyl		>300	2 ± 1	n. s.	1 ± 1	n. s.
<b>15d</b>	4-Fluorphenyl		>300	4 ± 2	0.20	2 ± 1	0.20
<b>15f</b>	4-Methoxyphenyl		110 (20')	<b>10 ± 2</b>	0.002	5 ± 1	0.05
<b>15g</b>	4-Fluorphenyl		>>300	6 ± 2	0.10	1 ± 2	n. s.
<b>15h</b>	2-Furyl		105 (20')	4 ± 1	0.10	1 ± 1	n. s.
<b>16a</b>	Phenyl		>300	7 ± 1	0.01	1 ± 1	n. s.

Methylfurylsubstituenten trägt und in 2-Position Methoxyphenyl-substituiert ist (10%ige Hemmung in den Arteriolen). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den relativ schwachen Ergebnissen im Born-Test. In Kapitel 3.2.7. wird näher auf diese Problematik eingegangen.

### 3.2.6 N-Morpholinoalkyl-pyrimido[5,4-c]cinnolin-4-amine (17)

Drei der fünf getesteten Verbindungen des Typs **17** zeigten signifikante antithrombotische Wirkung. Verbindung **17d** war mit 10%iger Hemmwirkung in den Arteriolen eine der potentesten *in vivo* getesteten Substanzen dieser Arbeit.

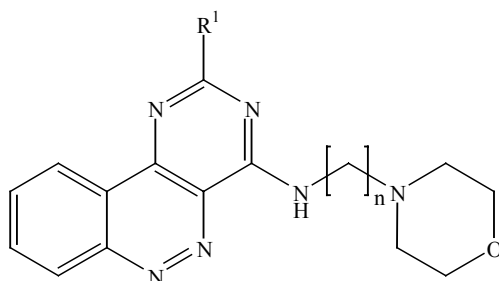


Abbildung 55: Struktur des Verbindungstyps **17**

Tabelle 52: Hemmung der Thrombusbildung *in vivo* durch den Verbindungstyp **17**

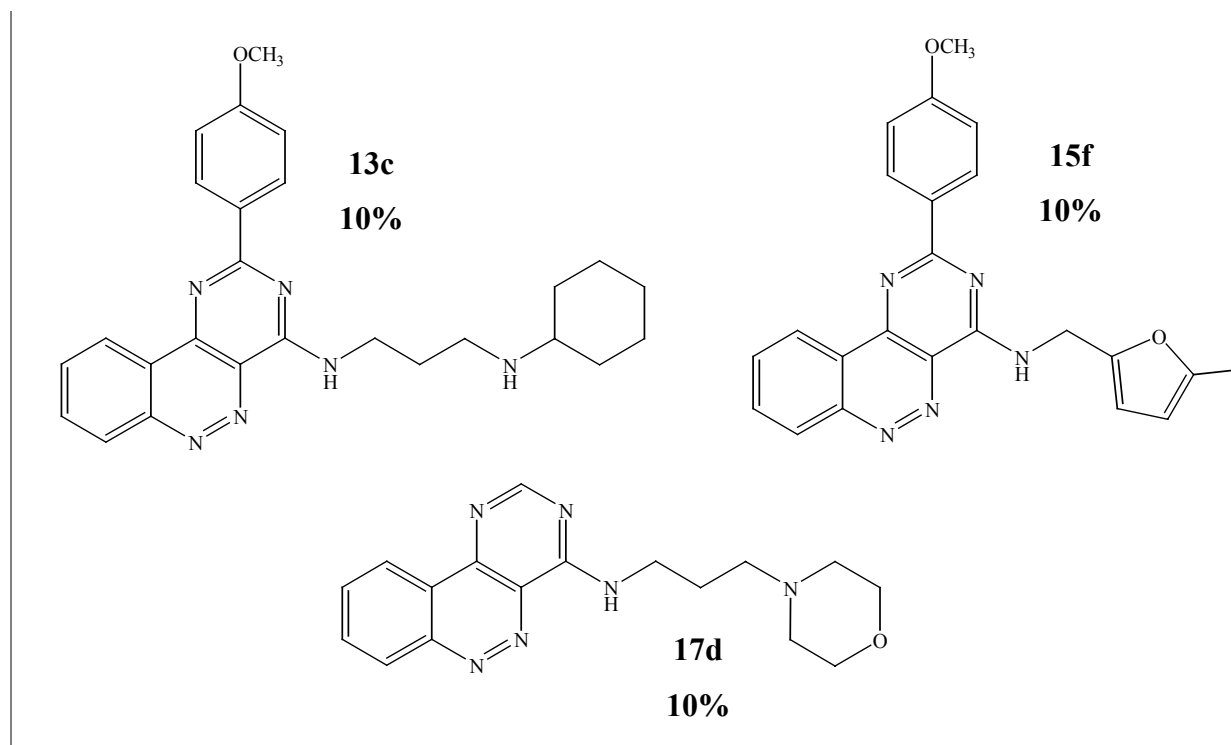
Verb.	n	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> [μM] (4 min)	Hemmung der Thrombusbildung			
				Arteriolen		Venolen	
				% ± s <sub>x</sub>	P ≤	% ± s <sub>x</sub>	P ≤
<b>17d</b>	3	H	>300	<b>10 ± 2</b>	0.002	2 ± 1	0.20
<b>17f</b>	3	4-Methoxyphenyl	>300	4 ± 2	0.2	2 ± 1	n. s.
<b>17h</b>	3	4-Fluorphenyl	60 (20')	0 ± 2	n. s.	0 ± 1	n. s.
<b>17i</b>	3	4-Chlorphenyl	>300	5 ± 3	0.20	2 ± 1	0.20
<b>17j</b>	3	Phenylvinyl	24 (20')	6 ± 1	0.05	1 ± 1	0.50

Der Verbindungstyp **18** wurde wegen als unzureichend angesehender *in vitro*-Hemmwirkung nicht auf die antithrombotische *in vivo*-Aktivität überprüft. Gleiches gilt für die exemplarisch dargestellten Verbindungen **19** und **20**.

### 3.2.7 Bewertung der *in vivo*-Testergebnisse

Im Gegensatz zu den überwiegend guten Ergebnissen im Born-Test konnte für viele der dargestellten Verbindungen im Tierversuch keine signifikante oder nur eine sehr schwache antithrombotische Potenz festgestellt werden. Der Effekt war in den Arteriolen meist deutlicher zu erkennen als in den Venolen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die gerinnungshemmende Potenz der synthetisierten Verbindungen wahrscheinlich auf einer Hemmung der Plättchenaktivierung beruht und dadurch weniger in die wesentlich thrombinabhängigere venöse Thrombusbildung eingreift. In die folgende Diskussion werden daher nur die Resultate der Mesenterialarteriolen einbezogen.

Die Verbindungen **8**, **9**, und **11**, die bereits im Born-Test als wirkungslos eingestuft worden waren, vermochten auch *in vivo* keine Hemmung der Thrombusbildung zu bewirken. Beim Verbindungstyp **6** wurde eine signifikante Wirkung nur durch Substanzen mit einer



**Abbildung 56:** Strukturformeln der *in vivo* wirkungsvollsten Verbindungen **13c**, **15f** und **17d** mit ihren prozentualen Hemmwirkungen in Mesenterialarteriolen von Ratten

Alkoxygruppe in 2-Position hervorgerufen (**6c**, **e**). Die Hemmwirkung auf die arterielle Blutgerinnung lag bei 5% bzw. 4%. Diese Tendenz bestätigte sich auch bei der Betrachtung weiterer Substanzklassen. Die Verbindung **12d**, die mit 10%iger Hemmwirkung in den Arteriolen zu den drei potentesten dieser Arbeit gehört, weist ebenfalls einen 4-Methoxyphenylrest in 2-Stellung auf. Die Verbindung **13i**, bei der der Methoxyphenylsubstituent durch einen Thienylrest ersetzt ist, hemmt die Thrombusbildung in den Arteriolen nur noch zu 6%.

Bei den Verbindungen des Typs **15** zeigte sich überraschenderweise, dass es sich, mit Ausnahme von **15b**, bei den 4-Furylmethylamin-substituierten Pyrimido[5,4-c]cinnolinen um *in vivo* gerinnungshemmende Verbindungen handelt. Im *in vitro*-Modell hatten diese sich mit  $IC_{50}$ -Werten von  $>300 \mu\text{M}$  (4 min Inkubationszeit) als wirkungslos erwiesen. Eine verlängerte Inkubationszeit hatte dort jedoch zu deutlich verbesserten Resultaten der Gerinnungshemmung geführt. Bringt man diese Beobachtung in Verbindung mit der schlechten Löslichkeit der Substanzen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich in den meisten Fällen um potente Aggregationshemmer handelt, die allerdings nicht in ausreichender Konzentration an ihren Wirkort gelangen können. So kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Substanzen durch ihre zweistündige Verweildauer im Gastrointestinaltrakt der Versuchstiere zu einem wesentlich größeren Teil gelöst und resorbiert werden. Dieser physiologische Vorteil könnte dazu führen, dass die Verbindungen des Typs **15** eine *in vivo*-Aktivität aufweise, die vor dem Hintergrund der Resultate des Born-Tests überraschend gut erscheinen.

Eine weitere Ursache für die beobachtete *in vivo*-Aktivität könnte auch darin bestehen, dass es sich bei den Verbindungen **15d**, **f**, **g** und **h** um Prodrugs handelt, die erst durch Metabolisierung im Rattenorganismus in ihre aktive Form umgewandelt werden. In Frage kommen hierfür Reaktionen wie die Hydroxylierung des Aromaten oder eine N-Oxidation in der Seitenkette<sup>54</sup>.

Die beste Wirkung innerhalb des Typs **15** konnte wieder für die 2-(4-Methoxyphenyl)-substituierte Verbindung **15f** (Abb. 56) mit einer 10%igen Hemmung der Thrombozytenaggregation im arteriellen Bereich festgestellt werden. Die übrigen Substanzen des Typs **15** zeigten Werte zwischen 4% und 7% Hemmung.

Den erstaunlich guten *in vivo*-Aktivitäten der Verbindungsklassen **16** und **17** liegen vermutlich ähnliche Mechanismen zugrunde wie denen des Typs **15**. Zwar zeigten die Verbindungen kein so ausgeprägt schlechtes Lösungsverhalten wie die zuvor besprochene

Gruppe, doch sprechen die Differenzen zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Resultaten für die genannte Theorie.



### 3.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

#### 3.3.1 Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC)

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) einen wirksamen Mechanismus zur Thrombozytenaggregationshemmung dar.

Guanylatcyclasen kommen sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form ubiquitär im Säugetierorganismus vor. Sie katalysieren die Umwandlung von Guanosinmonophosphat (GMP) in seine cyclische Form (cGMP). Für die Blutgerinnung von besonderer Bedeutung ist die lösliche Form der Guanylatcyclase, da sie in den Thrombozyten deren Aktivierung und damit die Thrombusbildung hemmt. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration in den Blutplättchen beeinflusst inhibitorisch viele komplexe Mechanismen der Thrombozytenaktivierung, wie die Veränderung des Zytoskeletts, Aktivierung von Fibrinogenrezeptoren, Degranulierung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren<sup>55</sup>.

Die sGC ist ein heterodimeres Enzym mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit sowie einem Häm als prosthetischer Gruppe<sup>56</sup>. Bei Aktivierung durch den physiologischen Stimulus NO, welcher an das Häm des Enzyms bindet, kommt es nach einer Konformationsänderung zu einer Aktivierung von cGMP-abhängiger Proteinkinase, die ihrerseits über eine Phosphorylierung des Inositoltriphosphat- (IP<sub>3</sub>)-Rezeptors zu einem verminderten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle führt<sup>57, 58</sup>.

#### Testmethode

Die Substanzen wurden im Institut für Cardiovasculäre Forschung der Bayer AG getestet. Rekombinante sGC wird dazu mit der Testsubstanz in einem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP-haltigen Puffer inkubiert. In einem Radioimmunassay katalysiert die sGC die Bildung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]cGMP aus dem vorgegebenen [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP. Entstandenes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]cGMP wird anschließend mittels Szintillationsmessung bestimmt. Durch Vergleich mit dem Basalwert kann so die Stimulation der sGC bestimmt werden. Alle Messungen wurden mit Testkonzentrationen von je 10 und 100  $\mu$ mol durchgeführt. Um einen eventuellen überadditiven Effekt feststellen zu können, wie

er von dem sGC-Aktivator in Verbindung mit dem NO-Donor DEA/NO\* erreicht wird, wurden auch die hier ausgewählten Substanzen in Gegenwart von DEA/NO getestet.

## Ergebnisse

Keine der ausgewählten Substanzen **6a**, **13c** und **15g** vermochte in einer Konzentration von 100 µmol/L die Basalaktivität der sGC zu steigern. Auch in Kombination mit 0.1 µmol/l DEA/NO konnte im Vergleich zum Referenzwert keine erhöhte Katalyseaktivität festgestellt werden. Die im Born-Test bzw. im Laser-Thrombosemodell manifestierte aggregationshemmende Wirkung der Verbindungen kommt also nicht über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zustande.

### 3.3.2 Hemmung der Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen katalysieren den Abbau von cyclischen Nucleotiden zu den entsprechenden Monophosphaten. Zur Zeit sind die PDE-Familien 1 – 11 bekannt, die sich in Funktion, Gewebeverteilung und Substrataffinität (cGMP/ cAMP) unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist die PDE5, da diese vermehrt in Blutplättchen nachzuweisen ist und deren Hemmung über eine Erhöhung des intrathrombozytären cGMP-Spiegels zu einer Aggregationshemmung führen kann<sup>59</sup>. Die PDE5 ist ein Homodimer mit einer katalytischen Domäne mit einer cGMP-Bindungsstelle am carboxyterminalen Ende jeder Untereinheit. Das aminoterminalen Ende beinhaltet eine Phosphorylierungsstelle (Ser<sup>92</sup>), die als Substrat für die Proteinkinasen A und G dient. Beide Untereinheiten des Enzyms besitzen zwei allosterische Bindungsstellen für cGMP, deren Besetzung zur Phosphorylierung des Serin nötig ist<sup>60</sup>.

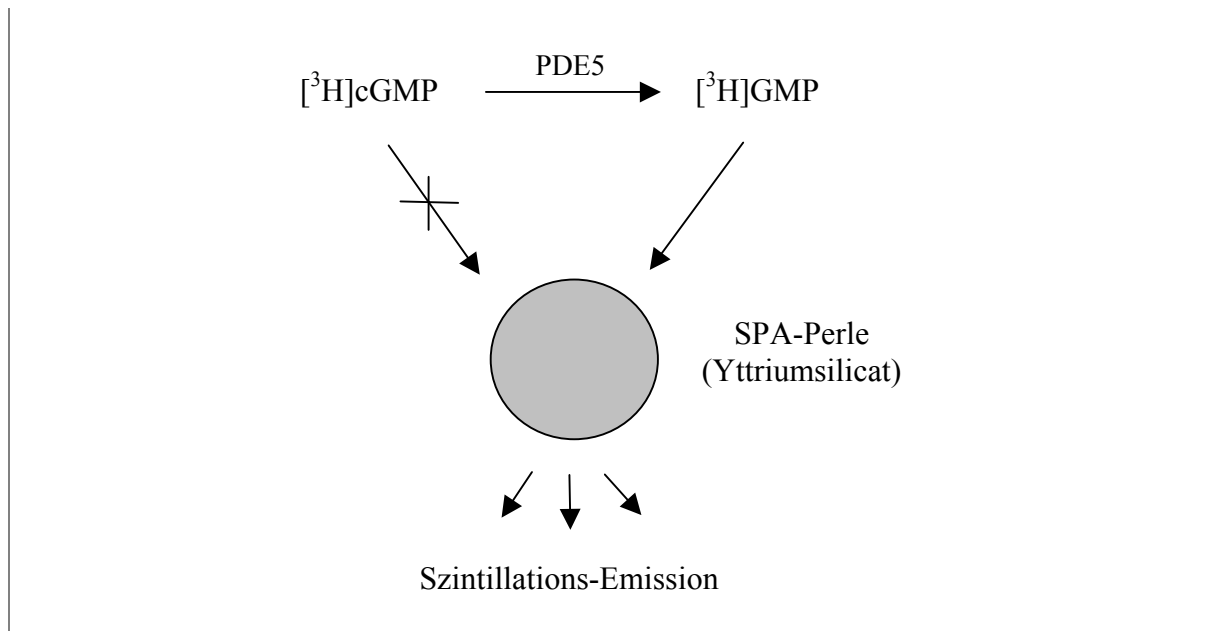
## Testmethode

Die Bestimmung der PDE5-Hemmung der ausgewählten Substanzen wurde ebenfalls von der Bayer AG durchgeführt. Dazu wurde das PDE-Assay-Kit (TRKQ7100) der Firma Amersham

---

\* N,N-Diethylaminodiazennitrat-2-oxid, ein spontan NO-freisetzender sGC-Aktivator

Biosciences verwendet. Es handelt sich hierbei um ein „scintillation proximity assay“ (SPA). Dieser beruht auf der spezifischen Bindung von [ $^3\text{H}$ ]GMP an mit entsprechenden Antikörpern beschichteten Mikropartikeln. Diese bestehen aus Perlen von ca. 2.2  $\mu\text{m}$  Durchmesser, die mit Yttriumsilikat beschichtet sind. Als Substrat für die eingesetzte rekombinante humane PDE5 wurde Tritium-markiertes [ $^3\text{H}$ ]cGMP verwendet, welches nicht an die Perlen gebunden wird. Das durch PDE-vermittelte Hydrolyse gebildete [ $^3\text{H}$ ]GMP erzeugt beim Zerfall  $\beta$ -



**Abbildung 57:** Schematische Darstellung des SPA-PDE-Essays

Strahlen, die beim Auftreffen auf das Yttriumsilicat Szintillationsblitze hervorrufen. Diese werden in einem Szintillationszähler registriert und quantifiziert.

Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden die Substanzen in Konzentrationen von 1, 10 und 100  $\mu\text{mol/L}$  verwendet. Es zeigte sich keine nennenswerte Inhibition des Enzyms, so dass anzunehmen ist, dass die antiaggregatorische Wirkung der Verbindungen auch nicht PDE5-vermittelt ist.