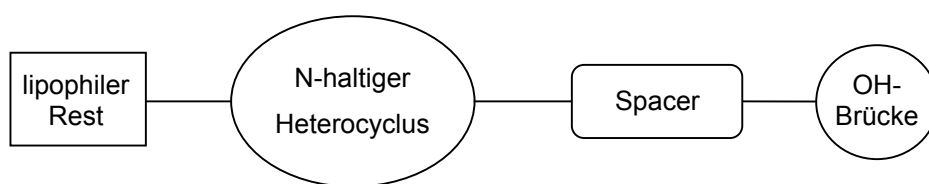


5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 73 Pyrimido[5,4-c]cinnoline synthetisiert. Die Darstellung der allesamt bisher nicht literaturbekannten Zielverbindungen verlief über eine fünfstufige Synthese, an deren Ende die Substitution des in 4-Position chlorierten Pyrimido[5,4-c]cinnolins mit einer primären oder sekundären Aminkomponente stand (vgl. Syntheschema, Abb. 4, S. 7). Die so erhaltenen Zielverbindungen wurden auf ihre antiaggregatorische bzw. antithrombotische Aktivität *in vitro* und *in vivo* getestet.

Die Syntheseplanung berücksichtigte Partialstrukturen bereits bekannter Substanzen mit gerinnungshemmenden Eigenschaften. Neben **YC-1** (Abb. 3, S. 4) wurden auch Substanzen, die im Arbeitskreis Prof. Rehse im Rahmen anderer Dissertationen antiaggregatorische Potenz gezeigt hatten, als strukturelles Raster für die hier dargestellten Substanzen genutzt.

Zielsetzung zu Beginn der Arbeit war es, eine Aggregationshemmung der Thrombozyten zu erreichen, die wie im Falle des **YC-1** über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zustande kommt. Idealerweise sollte es sich um einen dualen Mechanismus mit gleichzeitiger Hemmung der ebenfalls in Blutplättchen lokalisierten Phosphodiesterase (PDE) 5 handeln, da die PDE-Hemmung wie auch die sGC-Aktivierung zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration führt, die ihrerseits die Aktivierung von Thrombozyten verhindert. So wurde der Syntheseplanung folgende Zielstruktur zugrundegelegt:



Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungstypen **6 – 20** besitzen alle als Grundgerüst ein Pyrimido[5,4-c]cinnolin, welches in 4-Position mit einer Aminkomponente

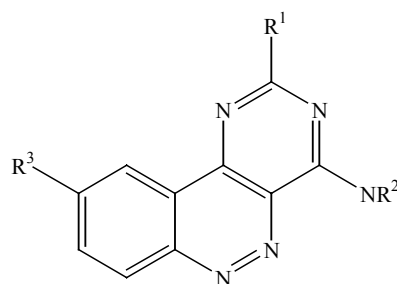


Abbildung 58: Allgemeine Struktur der Verbindungstypen **6 – 20**

substituiert ist, sowie meist einen weitere Substituenten in 2- oder 9-Stellung trägt. Die pharmakologische Untersuchung führte zu recht unterschiedlichen Ergebnissen, die im Folgenden zusammengefasst werden. Zur Bestimmung der antiaggregatorischen Potenz bzw.

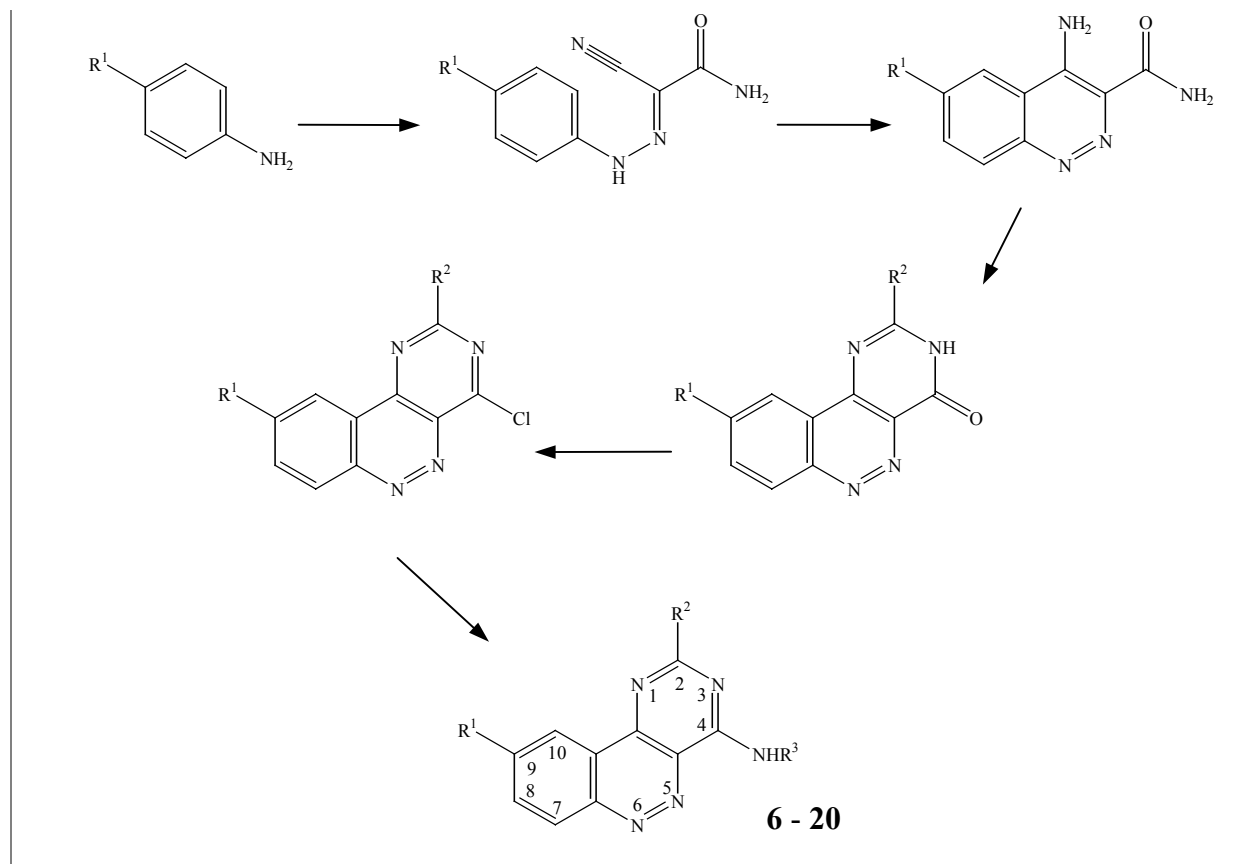


Abbildung 59: Syntheschema der 2,4,9-substituierten Pyrimido[5,4-c]cinnoline **6 – 20** (zum ausführlichen Schema s. Abb. 4, S. 7)

der antithrombotischen Eigenschaften der Verbindungen standen ein *in vitro* und ein *in vivo*-Modell zur Verfügung. Das *in vitro*-Modell (Born-Test) beruht auf der Messung der Hemmung kollageninduzierter Thrombozytenaggregation in plättchenreichem Plasma. Die *in vivo*-Tests wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, bei denen das Ausmaß der Laser-induzierten Thrombusbildung in Mesenterialgefäßen beobachtet wurde. Die in einem frühen Stadium der Arbeit entstandenen Pyrimido[5,4-c]cinnoline, die weder in 2- noch in 9-Position eine lipophile Partialstruktur tragen (**8, 9, 15a, 17a, b, d, e**) zeigten unter den *in vitro*-Testbedingungen so schwache antiaggregatorische Aktivität, dass z. T. nicht einmal ein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte ($>300 \mu\text{mol/L}$). So wurden nun in 2- und 9-Position lipophile Reste eingefügt, die auch tatsächlich zu einer deutlichen Wirkungssteigerung führten.

Ein großes Problem bei der *in vitro*-Untersuchung der Substanzen stellte deren überwiegend sehr schlechte Löslichkeit dar. Nach verschiedenen fehlgeschlagenen Versuchen zur Erhöhung der gelösten Probenkonzentration durch lösungsvermittelnde Zusätze wurde schließlich die Inkubationszeit der zu messenden Substanz in PRP von vier auf zwanzig Minuten verlängert. Dies führte in den meisten Fällen zu einer erheblichen Verbesserung der gerinnungsphysiologischen Aktivität.

Die im Folgenden angegebenen IC_{50} -Werte beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die Messung nach zwanzigminütiger Inkubationszeit. Substanzen mit einem IC_{50} -Wert über 300 μM werden als wirkungslos angesehen.

Im Laufe der Testreihen stellte sich heraus, dass die antiaggregatorische Potenz der Verbindungen hauptsächlich von der Aminkomponente der Seitenkette bestimmt wird. Die lipophile Substitution in 2- oder 9-Stellung wird zwar für das Erreichen von halbmaximalen Hemmkonzentrationen $<100 \mu M$ benötigt, Art und Position der Substitution scheinen dabei jedoch variabel zu sein. Auch die Elektronendichte eines Phenylringes in 2-Position spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Die Verbindungen **6a** – **g** tragen eine terminale Hydroxygruppe in der Seitenkette und einen lipophilen Rest in 2- oder 9-Position. Damit entsprechen sie der ursprünglichen Vorgabe der Synthesepipeline, die eine Substitution des Pyrimido[5,4-c]cinnolins mit einem lipophilen Rest, einem Spacer mit basischem Zentrum und eine OH-Brücken-bildende Domäne im Molekül vorsah. So konnte auch bei allen Verbindungen eine deutliche antiaggregatorische Aktivität gemessen werden, die bei **6b**, **c**, **e**, **f**, **g** unter 30 $\mu mol/L$ lag. Bestwirksame Substanz dieser Gruppe war **6b** mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 16 $\mu mol/L$. Mit dem Ersatz

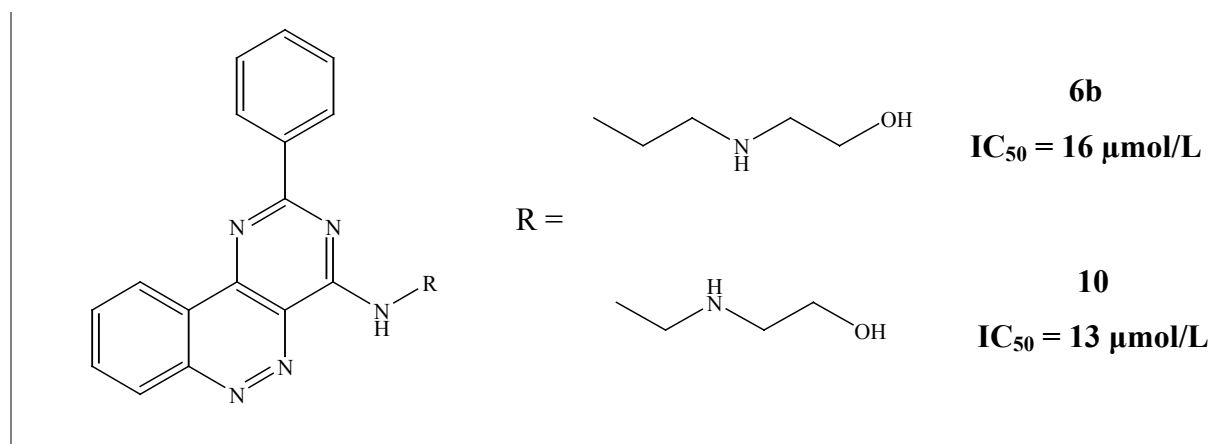


Abbildung 60: Struktur und IC_{50} -Werte der Verbindungen **6b** und **10**

der die Propan-1,3-diamin-Partialstruktur durch den wesentlich starreren Piperazinning (Verbindungstyp 7) konnte keine Verbesserung der Wirkung erzielt werden.

Die Darstellung und Testung der Verbindungen **8** – **11** bestätigte die innerhalb des Arbeitskreises schon mehrfach aufgestellte These, dass für die antiaggregatorische Wirkung ein basisches Zentrum in der Seitenkette benötigt wird. Lediglich Verbindung **10**, die ein solches aufweist, zeigt mit $IC_{50} = 13 \mu\text{mol/L}$ eine bemerkenswerte Aktivität, während die weiteren drei Verbindungen wirkungslos waren.

Im Rahmen anderer Dissertationen des Arbeitskreises konnte gezeigt werden, dass die Hydroxyethyl-Partialstruktur der Seitenkette ohne Wirkungsverlust durch lipophilere Gruppen wie z. B. Alkylreste, aber auch basische Heteroaromaten ersetzt werden kann. Diese

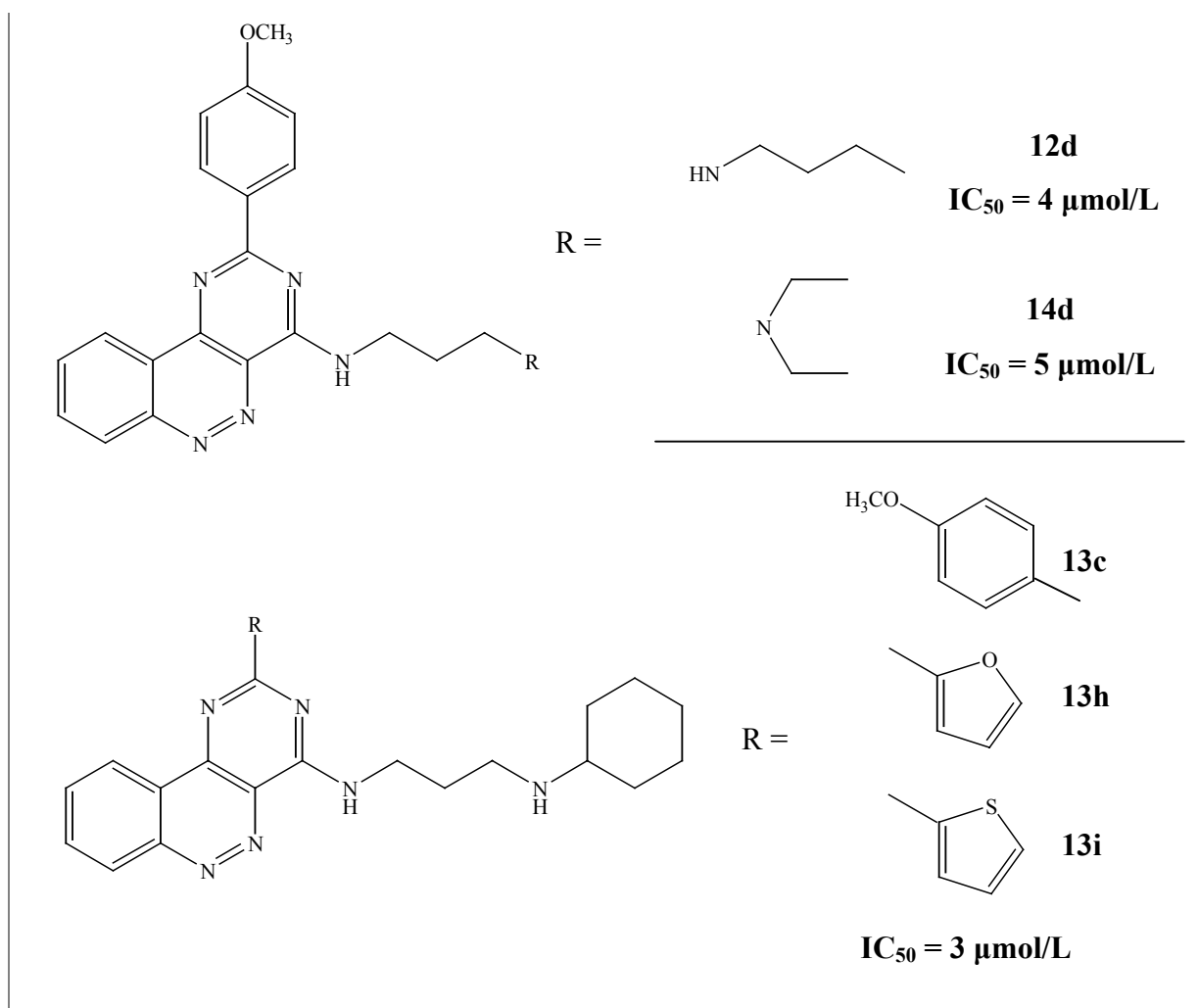


Abbildung 61: Strukturformeln der *in vitro* wirkungsvollsten Verbindungen dieser Arbeit mit ihren halbmaximalen Hemmkonzentrationen

Beobachtung sollte nun auch für die Pyrimido[5,4-c]cinnoline überprüft werden. Die Substanztypen **12**, **13**, und **14** weisen alle eine Propan-1,3-diamin-Struktur auf, die am N^3

mono- oder dialkylsubstituiert ist. Dies führte meist sogar zu deutlichen Wirkungssteigerungen gegenüber dem hydroxyethylierten Typ **6**. Von den N³-monoalkylierten Substanzen wiesen **12b** (methyliert) mit einem IC₅₀-Wert von 7 µmol/L sowie **12d** (propyliert) mit 4 µmol/L die höchste *in vitro*-Aktivität auf. Die Verbindungen des Typs **13**, die alle am N³ Cyclohexyl-substituiert sind, stellten sich ebenfalls als gut antiaggregatorisch wirkend heraus. Mit einem IC₅₀-Wert von jeweils 3 µmol/L erwiesen sich die Substanzen **13c**, **h** und **i** als die potentesten Aggregationshemmer, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden. Die N³-Dialkyl-substituierten Substanzen vom Typ **14** zeigten insgesamt eine etwas schwächere Antiplättchenwirkung. Die am stärksten wirkende Substanz **14d** zeigte jedoch mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 5 µM fast ebensogute gerinnungshemmende Eigenschaften wie die besten Vertreter der vorhergehenden beiden Substanzklassen.

Durch die Einführung heterocyclischer Partialstrukturen in die Seitenkette konnte die antiaggregatorische Aktivität der Pyrimido[5,4-c]cinnoline nicht mehr weiter gesteigert werden. Innerhalb des Verbindungstyps **15** lagen die IC₅₀-Werte bei >100 µmol/L. Lediglich die 2-(4-Chlorphenyl)-substituierte Verbindung **15e** hemmte die Thrombozytenaggregation in einer Konzentration von 41 µmol/L halbmaximal. Die IC₅₀-Werte der Verbindungstypen **16**, **17** und **18** liegen bis auf wenige Ausnahmen im Bereich >50 µmol/L und erreichten damit bei weitem nicht die antiaggregatorische Potenz der Propan-1,3-diamine. Ausnahmen bilden hier die Substanzen **16d** (19 µmol/L), **17j** (24 µmol/L) und **18d** (25 µmol/L). Die exemplarisch dargestellten Verbindungen **19** und **20** führten ebenfalls zu keiner Wirkungssteigerung gegenüber den bisher besprochenen Propan-1,3-diaminen. Bei Verbindung **18** wurde anstelle eines Alkyl- bzw. Cyclohexylrestes ein Phenylring in die Seitenkette eingefügt, was zu einer Wirkungsverschlechterung führte, und die Einführung von 4-Aminobutansäure anstelle der basischen Seitenkette führte sogar zu einem völligen Wirkungsverlust der Substanz.

Als wichtige Beobachtung für die Bewertung der *in vitro*-Testergebnisse ist anzumerken, dass auch nach verlängerter Inkubationszeit meist ungelöste Rückstände der geringen Probenmengen verblieben. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass es sich bei den erreichten IC₅₀-Werten um Maximalwerte handelt, bei deren Ermittlung die tatsächliche gelöste Wirkstoffmenge nicht berücksichtigt werden kann. Es ist anzunehmen, dass die „echten“ IC₅₀-Werte in weitaus niedrigeren Konzentrationsbereichen liegen.

Im *in vivo*-Testmodell zeigte sich eine vom Born-Test differierende Ergebnisreihe, allerdings wurde nur eine Auswahl der *in vitro* getesteten Substanzen im Tiermodell überprüft. Aufgrund der höheren Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Arteriolen zeigten sämtliche Verbindungen dort eine stärkere gerinnungshemmende Wirkung als im venösen Bereich. Die Resultate des Tierversuchs fielen insgesamt sehr uneinheitlich aus, so dass sich keine klare Struktur-Wirkungsbeziehung definieren lässt. Eine 2-(4-Methoxyphenyl)-Gruppierung scheint allerdings auch im *in vivo*-Test vorteilhaft zu sein, ebenso wie ein basisches Zentrum in der Seitenkette. Überraschend gut wirkte die Verbindungsklasse **15**, deren *in vitro*-Ergebnisse wenig erfolgversprechend ausgefallen waren. Fünf der sechs getesteten Verbindungen bewirkten eine signifikante Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen (4 – 10%). Bestwirksame Verbindung war **15f** (Abb. 62). Mit 10%iger Hemmung ebensogute antiaggregatorische Wirkung zeigten die Verbindungen **13c** und **17d**.

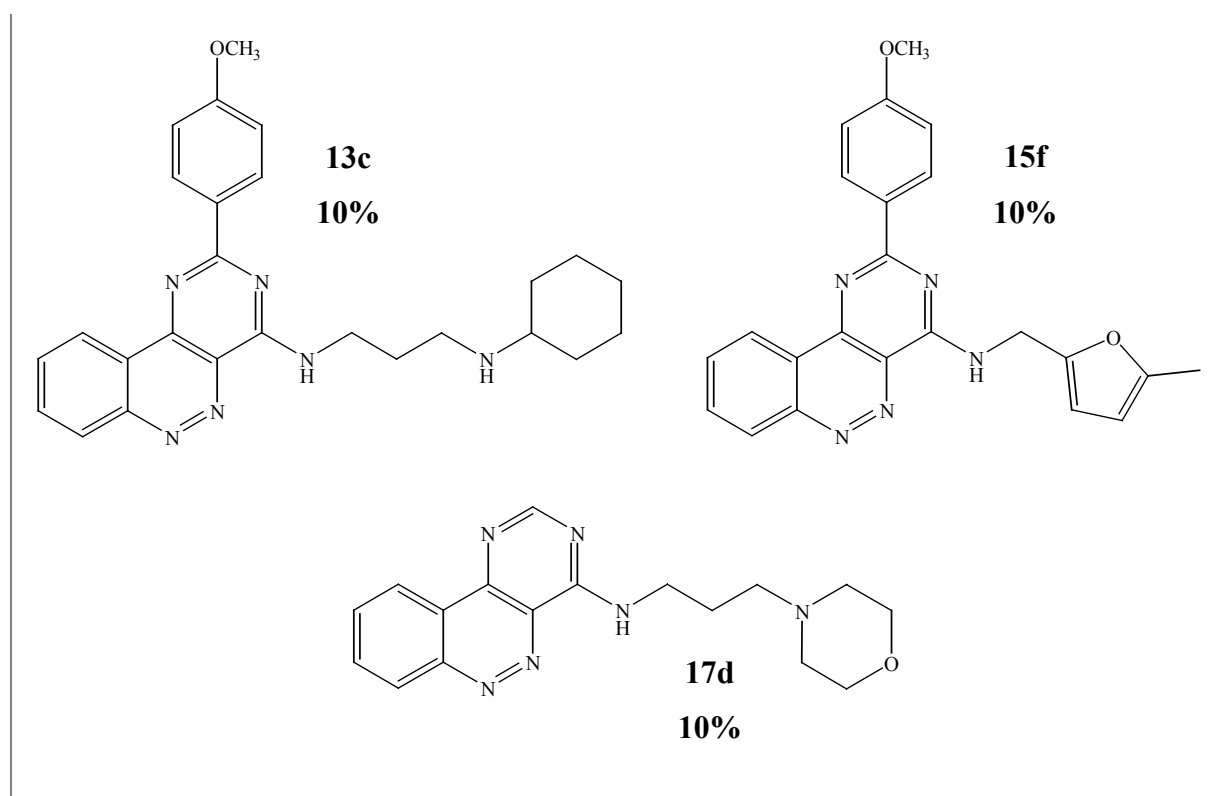


Abbildung 62: Strukturen der *in vivo* wirksamen Verbindungen **13c**, **15f**, **17d**

Da die Ergebnisse des Tierversuchs nicht eindeutig mit denen des Born-Test korrelieren, kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei den *in vivo* wirksamen Verbindungen um Prodrugs handelt, die im Körper zu ihrer Wirkform metabolisiert werden. Eine andere Erklärung für die Uneinheitlichkeit der beobachteten gerinnungshemmenden Potenz ist jedoch eng mit der schlechten Löslichkeit der Substanzen verbunden. Im Born-Test

wurde gezeigt, dass viele der Substanzen trotz unzureichender Löslichkeit antiaggregatorisch wirken. Dies bedeutet, dass eventuell wesentlich geringere als die angenommenen Konzentrationen zu der gemessenen Wirkung führen. So besteht die Möglichkeit, dass die relativ lange Verweildauer der Verbindungen im Gastrointestinaltrakt der Ratte dazu führt, dass ein großer Teil der verabreichten Verbindung resorbiert wird und an ihren Wirkort gelangen kann. Dies kann zu der Abweichung zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Testergebnissen führen.

Die Untersuchung einiger ausgewählter *in vitro*- oder *in vivo*-wirksamer Substanzen zum Wirkmechanismus verdeutlichte, dass die aggregationshemmende Wirkung nicht PDE5-vermittelt ist. Auch eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von ADP, PAF und Adrenalin anstelle von Kollagen als Aggregationsauslöser im Born-Test stellte sich jedoch deutlich die spezifische Hemmwirkung einiger Substanzen heraus. So hemmt Verbindung **12b** die Adrenalin- und PAF-induzierte Thrombozytenaggregation in einer Konzentration von jeweils 150 nmol/L halbmaximal, d. h. etwa 50-fach stärker als die unspezifische, kollageninduzierte Aggregation. Eine 15-fache Steigerung der Hemmwirkung von kollagen- zu PAF-induzierter Aggregation ist für **13i** zu beobachten (IC_{50} -Werte 3 $\mu\text{mol/L}$ (Kollagen) bzw. 0.18 $\mu\text{mol/L}$ (PAF)). Diese herausragenden Ergebnisse zeigen, dass an der beobachteten Aggregationshemmung mit Sicherheit PAF-antagonistische, aber auch antiadrenerge Mechanismen beteiligt sind. Verbindung **13c** zeigte bei der Hemmung sowohl ADP- als auch PAF-induzierter Plättchenaggregation einen sehr guten IC_{50} -Wert von 800 nmol/L, so dass hier eine antagonistische Wirkung an Purinrezeptoren und PAF-Rezeptoren anzunehmen ist. Verbindung **14d** hemmte die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit 3 $\mu\text{mol/L}$ ebenfalls noch etwas stärker als die mit Kollagen induzierte (5 $\mu\text{mol/L}$) und weist somit auch auf einen antipurinergen Wirkmechanismus hin. Aus Kapazitätsgründen konnten nicht mehr Substanzen auf ihre spezifische Plättchenaggregationshemmung getestet werden. Aufgrund der Strukturähnlichkeiten ist jedoch anzunehmen, dass auch die antiaggregatorische Wirkung weiterer Substanzen dieser Arbeit über die beschriebenen Mechanismen zustande kommt.