

3 Pharmakologischer Teil

3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*

3.1.1 Allgemeines

Der Einfluß der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* wurde im Born-Test^[108] nach der von *Seuter*^[109] modifizierten Methode untersucht (siehe Abb. 41).

Humanes plättchenreiches Plasma (**PRP**) wird mit definierten Konzentrationen der Testsubstanz vier Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zusatz eines Induktors, zumeist Kollagen, wird die Thrombozytenaggregation ausgelöst. Die Quantifizierung der Thrombozytenaggregation erfolgt durch photometrische Messungen. Dabei gilt eine direkte Proportionalität zwischen Aggregatanzahl und Zunahme der Lichttransmission. Damit ist die Zunahme der Transmission indirekt proportional zur Hemmung der Thrombozytenaggregation.

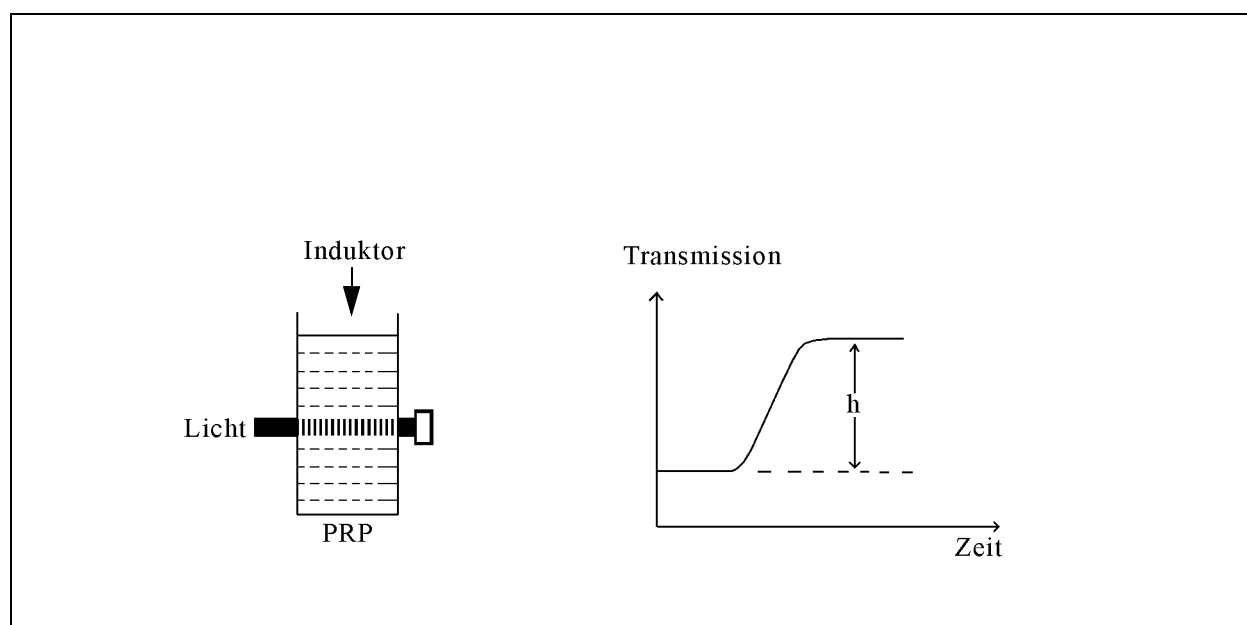


Abb. 41: Schematische Darstellung des Born-Tests

Für jede Konzentration einer Substanz wird eine Transmissions-Zeit-Kurve erstellt, die graphisch ausgewertet wird. Die maximale Veränderung wird durch den Parameter **h** (siehe Abb. 41 auf Seite 93) charakterisiert.

Als Vergleich sowie zur Überprüfung des Testmodells dient eine 1.6 mmolare Acetylsalicylsäurelösung (Aspisol®) in HEPES-Puffer¹. Sie bewirkt unter den angegebenen Testbedingungen in einer Konzentration von 175 µmol/L eine 50 %ige Hemmung. Um einen Vergleich der einzelnen Aktivitäten zu ermöglichen, wird der jeweilige IC₅₀-Wert graphisch ermittelt. Dabei wird die Konzentration der Substanz logarithmisch gegen die jeweilige Hemmung aufgetragen, wobei die Hemmung linear in % dargestellt wird. Der IC₅₀-Wert wird aus der resultierenden Kurve ermittelt, indem an dem Schnittpunkt der resultierenden Gerade mit dem 50 %-Wert das Lot auf die Konzentrationsachse gefällt wird. Der so erhaltene Wert gibt den IC₅₀-Wert an. Dieser Wert entspricht der Konzentration an Testsubstanz, die zur halbmaximalen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt (halbmaximale Hemmkonzentration).

Während der Messung wird die Probe gleichmäßig durch einen Magnetrührer bewegt, um die Sedimentation von Thrombozyten zu vermeiden. Die Lösung der Testsubstanzen erfolgte überwiegend in DMSO/PRP, selten in DMSO/HEPES-Puffer. Um die Hemmwirkung des DMSO auf die Thrombozytenaggregation auszuschließen, wird der DMSO-Anteil unter 0.3 % gewählt. In diesem Testsystem führt eine 1.25 %ige DMSO-Lösung zu einer Hemmung der Aggregation um 40 %^[111].

Einige Substanzen fallen in dem Lösungsmittelgemisch als feiner Niederschlag aus. Der Anteil an DMSO kann nicht erhöht werden (s.o.). Andere Lösungsvermittler z.B. PEG² 300, PEG 400 und Polysorbat 80, die von *Gonska*^[110] untersucht wurden, zeigen entweder eigene Hemmeffekte oder führen zu keine Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften der Substanzen.

Um die geringe, tatsächlich gelöste Menge an der Thrombozytenmembran zu erhöhen, wird die Inkubationszeit auf 20 Minuten verlängert. Sie wird deswegen auf maximal 20 Minuten limitiert, weil die Thrombozyten *in vitro* nur eine geringere Lebensdauer als *in vivo* besitzen.

Nicht intakte Thrombozyten würden in diesem Aggregationstest keine zuverlässigen Daten liefern.

1. 1mM wäßrige 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure-Lösung

2. Polyethylenglycol

Angaben zu der Versuchsdurchführung, Auswertung und den verwendeten Geräten sind bei *Ernst*^[112], *Claus*^[113] und *Rehse*^[114] zu finden.

Verbindungen mit einem Ergebnis $IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$ werden als wirkungslos betrachtet (vgl. Tabelle 32 unten).

3.1.2 Thrombozytenaggregation durch Kollagen induziert

Kollagen ist ein unspezifischer, partikulärer Induktor der Plättchenaggregation, der aus unverzweigten Proteinfibrillen besteht. Ein komplexes System aus pro- und antikoagulatorischen Vorgängen im Blut beeinflussen die Hämostase^[115]. Bei Schädigung des Gefäßendothels wird eine proteolytische Kaskade initiiert, die am Ende zur Thrombusbildung führen kann. Im Blut zirkulierender von-Willebrand-Faktor^[116] bindet an die dem Blutstrom exponierten Kollagenfasern und dem thrombozytären Glykoprotein $Ib\alpha$ (**GP $Ib\alpha$**), der somit als Brückenbildner zwischen Plättchen und Subendothel fungiert. An der aktiven Thrombozytenmembran wird der **GP $IIb/IIIa$** -Komplex aktiviert. Dieser bindet mit dem von-Willebrand-Faktor und kann mit Fibrinogen als Brückenprotein zur Aggregation der Blutplättchen führen.

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

Tabelle 32 definiert die Beurteilung der Wirkung für die Bewertung der gemessenen antiaggregatorischen Wirkungen.

Tab. 32: Beurteilung der antiaggregatorischen Wirkung der dargestellten Verbindungen in Abhängigkeit von der IC_{50}

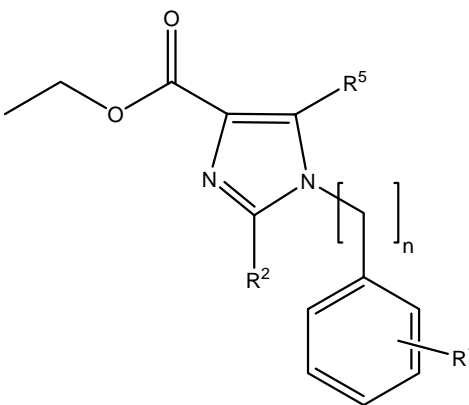
IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	Wirkung
<1	sehr gut
1-10	gut
10-150	mäßig
150-300	schwach
>300	wirkungslos

Die in den folgenden Tabellen angegebenen IC_{50} -Werte beziehen sich auf die Messung mit den jeweils angegebenen Inkubationszeiten.

3.1.2.1 Vorstufen: 5-Amino-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 4) und 5-Chlor-1-(2-chlorphenylmethyl)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 5)

In Tabelle 33 sind die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test ausgewählter Substanzen der 5-Amino-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 4) und der 5-Chlor-1-(2-chlorphenylmethyl)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 5) angegeben.

Tab. 33: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 5-Amino-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 4) und der 5-Chlor-1-(2-chlorphenylmethyl)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 5) im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

Struktur	Nr.	n	R ¹	R ²	R ⁵	IC ₅₀ [μmol/L]
						4 min
	4a	1	H	H	NH ₂	> 300
	4b	2	H	H	NH ₂	> 300
	4c	3	H	H	NH ₂	> 300
	4d	4	H	H	NH ₂	> 300
	4f	1	4-F	H	NH ₂	> 300
	4h	1	3-Cl	H	NH ₂	> 300
	4i	1	2-Cl	H	NH ₂	> 300
	4j	1	2-Cl u. 6-Cl	H	NH ₂	> 300*
	4k	1	2-Cl	Butyl	NH ₂	> 300*
	4l	1	2-Cl	Phenyl	NH ₂	> 300*
	5a	1	2-Cl	H	Cl	> 300*
	5b	1	2-Cl	Butyl	Cl	> 300*

Es sollte überprüft werden, ob die Substanzklassen 4 und 5 inhibitorische Effekte auf die Thrombozytenaggregation besitzen.

Erwartet wurde, daß die Substanzklasse 4 keine antiaggregatorischen Effekte zeigt, weil die 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminofunktion des Imidazolgrundgerüsts fehlt. Diese elektronenziehende voluminöse Gruppe ist ein entscheidendes Strukturmerkmal für den von Schindler^[43] entwickelten sGC-Aktivator **B** (vgl. Abb. 22 auf Seite 31 und Abb. 11 auf Seite 14).

Bei der Verbindung **5a** wurde auf die lipophile Butylgruppe an Position 2 des Imidazolgrundgerüsts verzichtet. Diese Modifikation bewirkte keine Wirkungssteigerung.

Dagegen wurden von der Substanz **5b** wegen ihrer Strukturähnlichkeit zu der von Booth^[42] entwickelten Substanz **A** (vgl. Abb. 18 auf Seite 25 und Abb. 11 auf Seite 14) antiaggregatorische Effekte erwartet.

Die Untersuchungen der Substanzen des Typs **4** und **5** im Born-Test zeigen, daß diese Substanzklassen nicht antiaggregatorisch wirken. Besonders überraschend ist, daß die Substanz **5b** nicht einmal einen minimal hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation verursacht.

Sie unterscheidet sich von der abgeleiteten Verbindung **A** in zwei Punkten:

- fehlende Methylengruppe zwischen Imidazolring und Carbonylfunktion
- Carbonsäure-ethylester anstatt Carbonsäure-methylester

Die Testergebnisse in Tabelle 33 auf Seite 96 zeigen, daß weder der Aminorest bei dem Verbindungstyp **4** noch der Chlorrest an Position 5 bei der Substanzklasse **5** die Aggregation der Thrombozyten im Born-Test beeinflussen. Auch das lipophile Element, wie z.B. eine Butylgruppe an Position 2, besitzt keinen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation.

Deswegen wurden als Nächstes in Anlehnung an die Verbindungen von Schindler^[43] die mit 4-Chlorphenylsulfonsäurechlorid sulfonierten 5-Amino-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester pharmakologisch untersucht.

Es wird vermutet, daß der 4-Chlorphenylsulfonylaminorest für den hemmenden Effekt im Born-Test verantwortlich ist.

3.1.2.2 **5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester** (Typ **6**)

Wegen der Strukturähnlichkeit zu dem von Schindler^[43] patentierten sGC-Aktivator **B** (vgl. Abb. 22 auf Seite 31 und Abb. 11 auf Seite 14) war die Darstellung von 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylestern (Substanzklasse **6**) interessant. Von der Einführung der 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe des Imidazolgrundgerüsts wurden, ähnlich wie bei den Substanzen von Schindler^[43], antithrombotische Effekte erwartet.

Als mögliche Leitstruktur für die Substanzklasse **6** wurde Verbindung **6j** dargestellt, die sich von der wirkungslosen Verbindung **5b** (vgl. Tabelle 33 auf Seite 96, $IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$) nur durch eine voluminöse elektronenziehende 4-Chlorphenylsulfonamidgruppe anstelle des Chlorsubstituenten an Position 5 des Imidazolgrundgerüsts unterscheidet. Die strukturelle Ähnlichkeit zu der von Booth^[42] entwickelten Substanz **A** (vgl. Abb. 18 auf Seite 25 und Abb. 11 auf Seite 14) sollte möglichst beibehalten werden. Es wurde erwartet, daß das gleiche Imidazolgrundgerüst, wie bei den Verbindungen von Booth^[42], zusammen mit der 4-Chlorphenylsulfonamidgruppe, wie bei den Substanzen von Schindler^[43], zu antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen führt.

Tabelle 34 unten faßt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 5-(4-Chlorphenylsulfonamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse **6**) zusammen.

Tab. 34: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 5-(4-Chlorphenylsulfonamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ **6**) im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. = nicht getestet),

Struktur	Nr.	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]	
					4 min	20 min
	6a	1	H	H	140	n.t.
	6b	2	H	H	230	n.t.
	6c	3	H	H	110*	12
	6d	4	H	H	54	n.t.
	6e	1	4-Phenyl	H	> 300*	n.t.
	6f	1	4-F	H	62	n.t.
	6g	1	4-Cl	H	> 300*	n.t.
	6h	1	3-Cl	H	59	n.t.
	6i	1	2-Cl	H	230	n.t.
	6j	1	2-Cl	Butyl	> 300	n.t.

Überraschenderweise zeigt die Verbindung **6j** trotz der oben genannten Erwartungen im Born-Test keine antiaggregatorische Wirkung (vgl. Tabelle 34 oben, $IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$). Deswegen wurde die Substanz **6j** weiter variiert:

Als Erstes wurde die lipophile Butylgruppe an Position 2 der Verbindung **6j** entfernt und Substanz **6i** dargestellt. Diese Modifikation zeigte eine schwache Wirkung ($IC_{50} = 230 \mu\text{mol/L}$) im Born-Test, und **6i** diente nun als Prototyp für weitere Modifikationen.

Als Nächstes wurde ausgehend von der Substanz **6i** der Chlorsubstituent in Ortho-Stellung des Phenylringes in Meta- bzw. Para-Stellung positioniert. Dabei sollte der Einfluß der Stellung des Chlorrestes am Phenylring auf mögliche antiaggregatorische Effekte untersucht werden.

Diese Veränderung führt zu der im Born-Test aktiven Verbindungen **6h** ($IC_{50} = 59 \mu\text{mol/L}$) und der wirkungslosen Verbindung **6g** ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

In einem weiteren Schritt wurde exemplarisch der in Para-Stellung befindliche Chlorsubstituent durch einen Fluorsubstituenten, einen Phenylsubstituenten bzw. ein Wasserstoffatom ersetzt. Mit dieser Variante sollte untersucht werden, ob der Ersatz des Chlorsubstituenten an dem Phenylring durch einen anderen Rest einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenaggregation verursacht.

Diese Idee führt zu den Verbindungen **6f**, **6e** bzw. **6a**. Die Substanz **6a** ($IC_{50} = 140 \mu\text{mol/L}$) und die Verbindung **6f** ($IC_{50} = 62 \mu\text{mol/L}$) zeigen eine mäßige antiaggregatorische Wirkung. Substanz **6e** ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$) fällt als feiner Niederschlag bei den Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37°C in DMSO/PRP) aus und wird als wirkungslos betrachtet.

Die Verbindung **6a** mit einem IC_{50} -Wert von $140 \mu\text{mol/L}$ zeigt eine mäßig hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation. Deshalb sollte als letzte Variation der Einfluß der CH_2 -Einheiten zwischen dem Phenylring und dem Imidazolgrundkörper auf antiaggregatorische Effekte untersucht werden.

Es zeigt sich, daß die Erweiterung der Methylengruppe um eine bis zu maximal drei CH_2 -Einheiten die inhibitorische Wirkung verbessert. Dabei führt die Verlängerung der CH_2 -Einheiten zwischen Imidazolring und Phenylgruppe ($n = 2$, $n = 3$ bzw. $n = 4$) zu einer Halbierung der IC_{50} -Werte mit jeder einzelnen CH_2 -Gruppe (vgl. Tabelle 34 auf Seite 98) bei den Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37°C in DMSO/PRP).

Der IC_{50} -Wert von $140 \mu\text{mol/L}$ der mäßig aktiven Verbindung **6a** konnte mit dieser Modifikation auf einen IC_{50} -Wert von $54 \mu\text{mol/L}$ bei der Substanz **6d** mit vier CH_2 -Einheiten zwischen Imidazolring und Phenylgruppe reduziert werden.

Da die mäßig wirkende Substanz **6c** ($IC_{50} = 110 \mu\text{mol/L}$) als feiner Niederschlag bei den Standardmeßbedingungen ausfällt, wurde die Inkubationszeit auf 20 Minuten verlängert, weil eine Wirkungssteigerung erwartet wurde (vgl. *Märschensz*^[117] und *Gonska*^[110]).

Mit der Verlängerung der Inkubationszeit wird die geringe, tatsächliche Menge der Substanz an der Thrombozytenmembran erhöht. Da die Thrombozyten *in vitro* eine geringere Lebensdauer als *in vivo* besitzen (vgl. *Gonska*^[110]), kann die Zeit auf höchstens 20 Minuten verändert werden.

Die Inkubationszeitverlängerung bewirkt bei der Verbindung **6c** eine zehnfache Wirkungssteigerung auf einen IC_{50} -Wert von 12 $\mu\text{mol/L}$.

Bei Standardmeßbedingungen zeigen die Verbindungen **6a**, **6c**, **6d**, **6f** bzw. **6h** mäßige Effekte auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation ($10 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 150 \mu\text{mol/L}$). Die Substanzen **6b** und **6i** führen zu schwach antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen ($150 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 300 \mu\text{mol/L}$). Die Verbindungen **6e**, **6g** und **6j** werden als wirkungslose Substanzen eingestuft.

Anhand der Ergebnisse der Substanzklasse **6** in Tabelle 34 auf Seite 98 kann man Folgendes schließen:

- Die 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe besitzt einen großen Einfluß auf den hemmenden Effekt, der im Born-Test bestätigt wird.
- Bei den Verbindungen **6a-d** ist die Kettenlänge der CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundkörper wichtig für die antiaggregatorische Potenz. Drei CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundkörper führen zu der antiaggregatorisch aktivsten Verbindung **6c** ($IC_{50} = 12 \mu\text{mol/L}$ bei zwanzigminütiger Inkubationszeit).
- Bei den Substanzen **6e-i** ist der Substituent und die Position des Substituenten an dem Phenylrest für die antiaggregatorische Wirkung entscheidend. 4-Fluorphenyl bei der Verbindung **6f** ($IC_{50} = 62 \mu\text{mol/L}$ bei vierminütiger Inkubationszeit) und 3-Chlorphenyl bei der Substanz **6h** ($IC_{50} = 59 \mu\text{mol/L}$ bei vierminütiger Inkubationszeit) sind wichtige Teilstrukturen für den hemmenden Effekt der Thrombozytenaggregation.
- Die lipophile Butylgruppe an Position 2 des Imidazolgrundgerüsts ist nicht verantwortlich für die inhibitorische Wirkung im Born-Test (vgl. Substanz **6j**, $IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$ bei vierminütiger Inkubationszeit).

3.1.2.3 5-[Bis- (4-chlorphenylsulfonyl)-amino]-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 7)

Die Arbeitsgruppe um *Buckle*^[74] entwickelte PDE-5-Inhibitoren, die an der exocyclischen Aminogruppe doppelt sulfoniert sind. Es wird vermutet, daß die beiden 4-Chlorphenylsulfonylgruppen für die pharmakologische Wirkung verantwortlich sind.

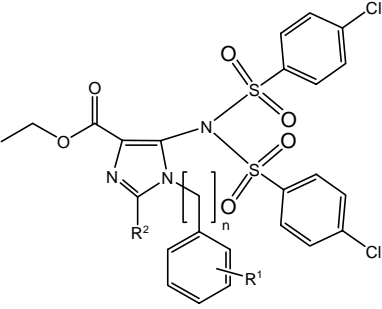
Deswegen sollte untersucht werden, inwieweit die Einführung einer weiteren 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminofunktion die Hemmung der Thrombozytenaggregation beeinflusst.

Exemplarisch wurden drei Verbindungen der 5-[Bis-(4-chlorphenylsulfonyl)-amino]-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 7) dargestellt.

Alle Verbindungen des Typs 7 fallen als feiner Niederschlag bei den Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C in DMSO/PRP) aus. Sie zeigen keinen Effekt auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

In Tabelle 35 sind die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 5-[Bis-(4-chlorphenylsulfonyl)-amino]-1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 7) zusammenfassend dargestellt.

Tab. 35: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 5-[Bis-(4-chlorphenylsulfonyl)-amino]-1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 7) im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

Struktur	Nr.	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/L]
					4 min
	7a	2	H	H	> 300*
	7b	1	2-Cl u. 6-Cl	H	> 300*
	7c	1	2-Cl	Phenyl	> 300*

Die Verbindungen **7a-c** in Tabelle 35 zeigen, daß der weitere 4-Chlorphenylsulfonylrest an der exocyclischen Aminofunktion einen Wirkungsverlust im Born-Test verursacht. Demzufolge führt diese Modifikation nicht zu den gewünschten antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen.

3.1.2.4 Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1-H-imidazol-4-carboxylate (Typ 8)

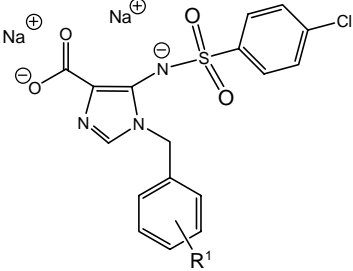
Bei der Substanzklasse 8 sollte überprüft werden, ob der Ersatz der Esterfunktion der 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Substanzklasse 6) durch die polare

Carboxylatstruktur die Hemmung der Thrombozytenaggregation beeinflusst. Exemplarisch wurden zwei Derivate der Verbindungsklasse **8** untersucht.

Tabelle 36 faßt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1-H-imidazol-4-carboxylate zusammen.

Bei Standardmeßbedingungen zeigen die Verbindungen **8a** und **8b** keinen Einfluß auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Tab. 36: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1H-Imidazol-4-carboxylate (Typ **8**) im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

Struktur	Nr.	R ¹	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]
			4 min
	8a	H	> 300
	8b	4-Cl	> 300*

In Anlehnung an den PDE-5-Hemmer **E4021**^[118] wurde erwartet, daß die Carboxylatteilstruktur und nicht die Carbonsäure-ethylesterpartialstruktur für die antiaggregatorische Wirkung verantwortlich ist.

Überraschenderweise verliert die Verbindung **8a** den hemmenden Effekt auf die Aggregation der Thrombozyten. Sie besitzt statt der Ethylesterpartialstruktur der mäßig wirkenden Verbindung **6a** ($IC_{50} = 140 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 34 auf Seite 98) eine Carboxylatgruppe.

Die Verbindung **8b**, die sich von der wirkungslosen Substanz **6g** durch die Carboxylatfunktion anstelle der Carbonsäure-ethylesterteilstruktur unterscheidet, zeigt ebenfalls keine Wirkung auf die Thrombozytenaggregation.

Anhand der beiden Verbindungen **8a** und **8b** kann man schließen, daß der Carboxylatrest nicht ausreicht für den inhibitorischen Effekt.

3.1.2.5 1H-Imidazol-4-carboxamide (Typ 12-20)

Die Weiterentwicklung der 5-Chlor-1-(2-chlorphenylmethyl)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethyl-ester (Typ **5**) und der 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ **6**) zu den entsprechenden 1H-Imidazol-4-carboxamiden (Substanzklassen **12-20**) (vgl. Abb. 11 auf Seite 14) war ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit (vgl. Abb. 32 auf Seite 47). Da zahlreiche sGC-Aktivatoren^[43] und PDE-Inhibitoren^[119,120] Carboxamidteilstrukturen enthalten, sollte diese Teilstruktur in den Verbindungsklassen **12-20** besonders intensiv auf eine antiaggregatorische Wirkung im Born-Test untersucht werden.

Ansatzpunkte waren die Substanz **B**^[43], ein sGC-Aktivator, die antithrombotisch wirksamen Carboxamide (AC) **38g** und (AC) **41f**^[83] von *Cwicklicki* und die Substanz (KY) **13f**^[84] von *Yildiz*, die die PDE-5 hemmt und antithrombotisch wirkt (vgl. Abb. 32 auf Seite 47).

Die Strukturähnlichkeit zu den oben genannten Verbindungen ließ eine Hemmung der Thrombozytenaggregation erwarten.

3.1.2.5.1 Alkoholderivate (Typ 12)

Abgeleitet von dem sGC-Aktivator **YC-1**^[84], 3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-phenylmethyl-1H-imidazol, entwickelte *Yildiz*^[84] antithrombotisch wirksame Carboxamide mit Alkoholpartialstruktur, z.B. (KY) **10d**^[84] (vgl. Abb. 36 auf Seite 56).

YC-1^[13] und (KY) **10d**^[84] mit ihrer Alkoholgruppe waren wichtige Leitstrukturen für die Synthese der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **12**, weil antiaggregatorische Effekte erwartet wurden.

In Anlehnung an die als PDE-Inhibitor bekannte Verbindung **Dipyridamol**^[121] (vgl. Abb. 42 auf Seite 104) wurden die entsprechenden 1H-Imidazol-4-carboxamide **12a-h** synthetisiert und untersucht. Die Verbindungen **12a-h** wurden durch Umsetzung von ω -Hydroxyalkylaminen, 2-Hydroxyethylamin und 3-Hydroxypropylamin mit den entsprechenden Estern **5** und **6** erhalten. Dabei sollte die terminale Hydroxygruppe der Verbindungen **12a-h** die Hydrophilie der Ester **5-6** erhöhen.

Da diese Amide nicht die gewünschte antiaggregatorische Wirkung (IC_{50} -Wert > 260 $\mu\text{mol/L}$, siehe Tabelle 37 auf Seite 105) erzielten, wurde in Anlehnung an den PDE-5-Hemmer **ONO-1505**^[122] (vgl. Abb. 42 auf Seite 104) die Seitenkette der Substanzen **12i-k** weiter variiert.

Durch den Einbau der Etherpartialstruktur wurde eine weitere Protonenakzeptorgruppe für mögliche Wasserstoffbrückenbindungen erhalten. Die Strukturähnlichkeit in der Seitenkette mit **ONO-1505**^[122] (siehe Abb. 42 unten) ließ eine antiaggregatorische Wirkung der Substanzen **12i-k** erwarten.

Auch die Verbindungen **12i-k** zeigen jedoch nicht den erhofften hemmenden Effekt im Born-Test (IC_{50} -Wert > 300 $\mu\text{mol/L}$).

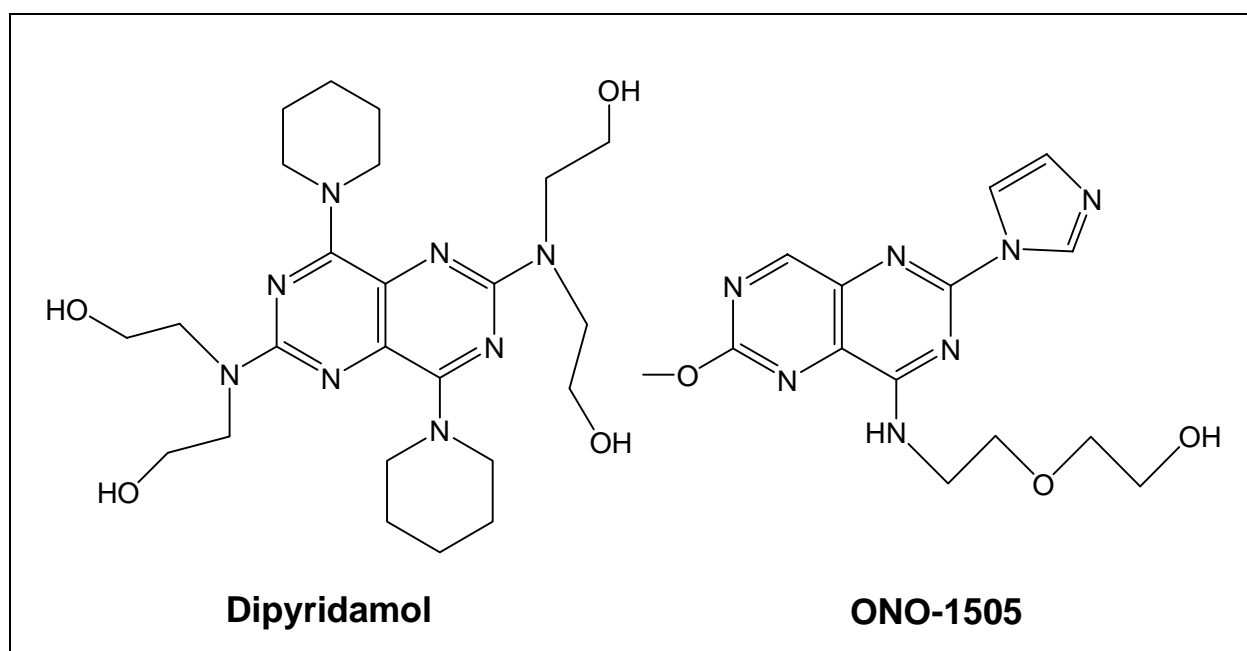


Abb. 42: Strukturen der PDE-Hemmer **Dipyridamol**^[121] und **ONO-1505**^[122]

Schließlich wurde die neutrale Etherpartialstruktur durch eine basische Aminfunktion ersetzt. Mit dieser Variation wurde eine bifunktionale Einheit erhalten. Das N-H-Proton fungierte als Protonendonator in möglichen Wasserstoffbrückenbindungen. Weiterhin stand der Stickstoff als Protonenakzeptor zur Verfügung.

Diese Modifikation führt allerdings zu den wirkungslosen Substanzen **12l-n**, wie die Ergebnisse im Born-Test zeigen (IC_{50} -Wert > 300 $\mu\text{mol/L}$).

Tabelle 37 auf Seite 105 faßt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide (Substanzklasse **12**) zusammen. Bei Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C in DMSO/PRP) zeigen alle Verbindungen des Typs **12** außer der Substanz **12c** keine antiaggregatorischen Effekte im Born-Test. Verbindung **12c** mit einer IC_{50} = 260 $\mu\text{mol/L}$ wirkt nur schwach inhibitorisch auf die Thrombozytenaggregation.

Aus den Testergebnissen (IC_{50} -Wert $\geq 260 \mu\text{mol/L}$) in der Tabelle 37 kann geschlossen werden, daß weder die Alkoholpartialstruktur noch die um eine Ethergruppe bzw. eine Aminfunktion erweiterten Teilstrukturen in der Seitenkette ein wichtiges Strukturmerkmal für die antiaggregatorische Wirkung im Born-Test sind.

Tab. 37: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Verbindungsklasse **12** im Born-Test

Nr.	m	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]
						4 min
12a	1	H	H	OH	Supham ^a	> 300
12b	1	2-Cl	H	OH	Supham ^a	> 300
12c	2	H	H	OH	Supham ^a	260
12d	2	4-Cl	H	OH	Supham ^a	> 300
12e	2	2-Cl	H	OH	Supham ^a	> 300
12f	2	2-Cl	Butyl	OH	Supham ^a	> 300
12g	2	2-Cl	H	OH	Cl	> 300
12h	2	2-Cl	Butyl	OH	Cl	> 300
12i	1	H	H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	Supham ^a	> 300
12j	1	2-Cl	H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	Supham ^a	> 300
12k	1	2-Cl	H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	Cl	> 300
12l	1	H	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	Supham ^a	> 300
12m	2	H	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	Supham ^a	> 300
12n	2	2-Cl	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	Supham ^a	> 300

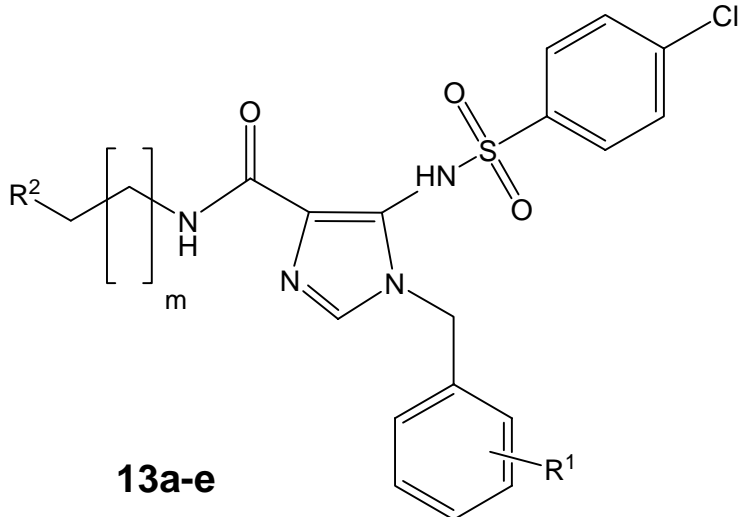
a. Supham = 4-Chlorphenylsulfonylamino

3.1.2.5.2 Etherderivate (Typ 13)

Die Substanzklasse **12**, 1H-Imidazol-4-carboxamide mit Alkoholpartialstruktur, zeigt im Born-Test keine Wirkung (IC_{50} -Wert $\geq 260 \mu\text{mol/L}$). Um antiaggregatorische Effekte zu erzielen, wurde der terminale polare Alkoholrest durch eine lipophile Etherpartialstruktur in Anlehnung des PDE-5-Inhibitors **BF-385**^[123] (vgl. Abb. 2 auf Seite 4) modifiziert. Diese Teilstruktur sollte die Membranaffinität und -durchgängigkeit erleichtern.

Tabelle 38 präsentiert die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide (Substanzklasse **13**).

Tab. 38: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **13** im Born-Test

				
Nr.	m	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/L]
				4 min
13a	1	H	O-CH ₃	> 300
13b	1	2-Cl	O-CH ₃	> 300
13c	2	H	O-CH ₃	> 300
13d	2	2-Cl	O-CH ₃	> 300
13e	2	H	O-CH ₂ -CH ₃	> 300

Bei Standardmeßbedingungen zeigen alle Verbindungen des Typs **13** keine antiaggregatorischen Effekte ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Anhand der Verbindungen **13a-e** in der Tabelle 38 auf Seite 106 ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$) kann geschlossen werden, daß die Etherpartialstruktur keinen Einfluß auf den hemmenden Effekt im Born-Test besitzt.

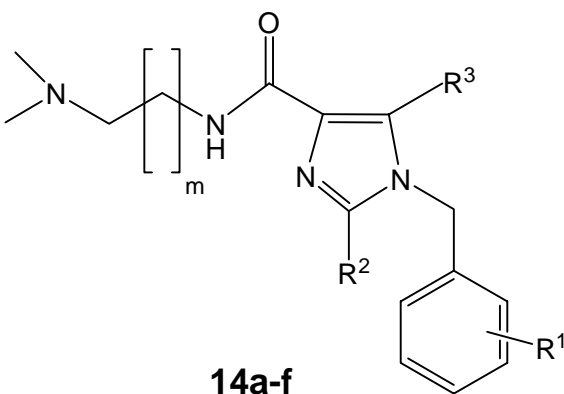
3.1.2.5.3 Dimethylaminoderivate (Typ 14)

Die Arbeitsgruppe um *Straub*^[104] beobachtete eine Steigerung der antithrombotischen Effekte, nachdem sie in ihren Verbindungen basische Zentren eingeführt hatte. In Anlehnung an diese Verbindungen (vgl. *Straub*^[104]) wurde in den folgenden Substanzklassen **14-20** eine basische Gruppe in die Seitenkette eingefügt und untersucht.

Es wurde erwartet, daß die basische Aminogruppe in der Seitenkette verantwortlich für die inhibitorische Wirkung der Thrombozytenaggregation ist.

In Tabelle 39 unten werden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide (Substanzklasse **14**) mit Dimethylaminopartialstruktur vorgestellt.

Tab. 39: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **14** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

					
Nr.	m	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μmol/L]
					4 min
14a	1	H	H	Supham ^a	> 300
14b	1	2-Cl	H	Supham ^a	> 300*
14c	1	4-Cl	H	Supham ^a	> 300*
14d	1	2-Cl	Phenyl	Supham ^a	> 300*
14e	1	2-Cl	H	Cl	> 300
14f	2	2-Cl	H	Supham ^a	> 300*

a. Supham = 4-Chlorphenylsulfonylamino

Bei Standardmeßbedingungen zeigen alle Verbindungen des Typs **14** keinen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Weder der Austausch der 4-Chlorphenylsulfonamidgruppe durch einen Chlorsubstituenten an Position 5 noch eine lipophile Phenylfunktion an Position 2 des Imidazolgrundgerüsts erzielen eine antiaggregatorische Wirkung. Auch die Verlängerung der 2-Dimethylaminoethyl- zur 3-Dimethylaminopropylgruppe in der Seitenkette bringen nicht die gewünschten Ergebnisse.

3.1.2.5.4 Amide des Typs **15** mit einem Heterocyclus in der Seitenkette

Die 1H-Imidazol-4-carboxamide mit Dimethylaminopartialstruktur in der Seitenkette (Typ **14**, IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$) brachten nicht die gewünschten hemmenden Effekte auf die Thrombozytenaggregation. Deshalb wurden abgeleitet von dem Faktor-Xa-Inhibitor (**C**), Substanz **6** ($IC_{50} = 2.0 \mu\text{M}$) der Firma 3-Dimensional Pharm., Inc.^[105, 106], und von dem antithrombotisch wirkenden N-[ω -(Imidazol-1-yl)alkyl]-1-phthalazinamin (**MJ**) **11k** von *Johnsen*^[107] exemplarisch 1H-Imidazol-4-carboxamide mit einem stickstoffhaltigen Heterocyclus in der Seitenkette synthetisiert und untersucht (vgl. Abb. 40 auf Seite 72).

Es wurde erwartet, daß der Heterocyclus in der Seitenkette verantwortlich für die Inhibition der Thrombozytenaggregation ist.

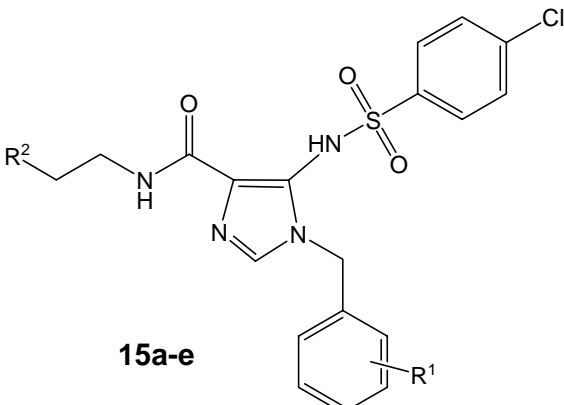
Tabelle 40 auf Seite 109 faßt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide mit einem stickstoffhaltigen Heterocyclus in der Seitenkette (Substanzklasse **15**) zusammen.

Bei Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C in DMSO/PRP) zeigen alle Verbindungen des Typs **15** außer der Substanz **15e** keine antiaggregatorischen Effekte im Born-Test. Verbindung **15e** mit einem IC_{50} -Wert von 250 $\mu\text{mol/L}$ wirkt nur schwach hemmend auf die Thrombozytenaggregation.

Weder die Pyrrolidingruppe in der Seitenkette bei der Verbindung **15a** noch die Imidazolpartialstruktur in der Seitenkette bei den Substanzen **15b-d** erzielen die antiaggregatorische Wirkung im Born-Test. Lediglich die Pyridinpartialstruktur bei der Verbindung **15e** zeigt einen schwachen IC_{50} -Wert von 250 $\mu\text{mol/L}$.

Da die IC_{50} -Werte der Verbindungsklasse **15** größer als 250 $\mu\text{mol/L}$ waren, wurde auf die Synthese weiterer Verbindungen dieses Typs verzichtet.

Tab. 40: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **15** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

			
Nr.	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/L]
			4 min
15a	4-Cl	1-Pyrolidinmethyl	> 300*
15b	H	(Imidazo-1-yl)-methyl	> 300
15c	4-Cl	(Imidazo-1-yl)-methyl	> 300*
15d	2-Cl	(Imidazo-1-yl)-methyl	> 300
15e	3-Cl	2-Pyridyl	250*

Aus den Born-Test-Ergebnissen in Tabelle 40 kann geschlossen werden, daß die Heterocyclen 1-Pyrolidinmethyl, (Imidazo-1-yl)-methyl bzw. 2-Pyridyl in der Seitenkette keinen Einfluß auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation besitzen ($IC_{50} \geq 250 \mu\text{mol/L}$).

3.1.2.5.5 Cycloalkylaminoderivate (Typ 16)

Auch die 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **15** mit einem unterschiedlichen Heterocyclus in der Seitenkette brachten nicht die gewünschten antiaggregatorische Effekte im Born-Test ($IC_{50} \geq 250 \mu\text{mol/L}$). Da der Stickstoff in der Seitenkette der Substanzklassen **14** und **15** ein tertiäres Amin war, wurde der Alkylierungsgrad des Stickstoffes zum sekundären Amin modifiziert. Durch diese Maßnahme wurde eine bifunktionelle Einheit erhalten. Das N-H-Proton fungierte als Protonendonator in Wasserstoffbrückenbindungen. Der Stickstoff dieser funktionellen Gruppe stand weiterhin als Protonenakzeptor zur Verfügung. Eine voluminöse Cycloalkylgruppe an ihm sorgte für ausreichende Lipophilie der Verbindungsklasse **16**.

Mit dieser Modifikation wurde Folgendes für die möglichen antiaggregatorischen Verbindungen erwartet:

- Mit der beweglichen voluminösen Cycloalkylgruppe sollte eine ausreichende Lipophilie für die Membranaffinität und -durchgängigkeit erzeugt werden.
- Die bifunktionelle Amineinheit mit einem Abstand von zwei bzw. drei CH₂-Einheiten zur Amidfunktion in der Seitenkette sollte sowohl als Protonendonator als auch als Protonenakzeptor in Wasserstoffbrückenbindungen fungieren.

Tabelle 41 auf Seite 111 präsentiert die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **16**.

Bei vierminütiger Inkubationszeit werden die Verbindungen **16a**, **16e**, **16i**, **16k** und **16l** entsprechend der Beurteilungskriterien (vgl. Tabelle 32 auf Seite 95) mit einem IC₅₀-Wert größer als 300 µmol/L als wirkungslos betrachtet.

Einen schwach hemmenden Effekt im Born-Test (150 µmol/L < IC₅₀-Wert < 300 µmol/L) zeigen die Substanzen **16f**, **16h**, **16j** und **16m**. Mäßig (10 µmol/L < IC₅₀-Wert < 150 µmol/L) wirken die Substanzen **16b**, **16c**, **16d**, **16g**, **16n** und **16o**.

Da bei Standardmeßbedingungen alle Verbindungen des Typs **16** außer Substanz **16b** und Verbindung **16j** ausfallen, wurde die Inkubationszeit auf 20 Minuten verlängert, weil eine Wirkungssteigerung erwartet wurde (vgl. *Märschenz*^[117] und *Gonska*^[110]). Exemplarisch wurden die Verbindungen **16a**, **16c**, **16f**, **16g**, **16i**, **16k-o** mit zwanzigminütiger Inkubationszeit untersucht.

Mit der Inkubationszeitverlängerung verbessern sich die IC₅₀-Werte bei allen untersuchten Verbindungen außer bei den Substanzen **16f** und **16k**.

Bei der Verbindung **16f** wird der IC₅₀-Wert von 190 µmol/L mit vierminütiger Inkubationszeit und mit zwanzigminütiger Inkubationszeit erhalten. Die Substanz **16f**, die man noch nach vier Minuten Inkubation als feinen Niederschlag in DMSO/PRP erkennt, liegt mit 20 Minuten Inkubation vollständig gelöst vor. Dieses Resultat unterstützt die von *Gonska*^[110] entwickelten Schlußfolgerung ihrer Inkubationszeitvergleichsstudien.

In ihren Vergleichsuntersuchungen zeigt *Gonska*^[110], daß die Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen mit einer Inkubationszeit von 4 Minuten bzw. 20 Minuten annähernd gleich ist. Auch die antiaggregatorische Wirkung der ASS-Vergleichslösung, der Referenz (IC₅₀ = 175 µmol/L),

Tab. 41: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **16** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. = nicht getestet)

16a-o

Nr.	m	n	R ¹	R ²	IC ₅₀	IC ₅₀
					[μmol/L] 4 min	[μmol/L] 20 min
16a	2	1	H	Cyclohexyl	> 300*	190
16b	2	2	H	Cyclohexyl	96	n.t.
16c	2	3	H	Cyclohexyl	37*	13
16d	2	4	H	Cyclohexyl	100*	n.t.
16e	2	1	Phenyl	Cyclohexyl	> 300*	n.t.
16f	2	1	4-F	Cyclohexyl	190*	190
16g	2	1	4-Cl	Cyclohexyl	40*	2.5
16h	2	1	3-Cl	Cyclohexyl	220*	n.t.
16i	2	1	2-Cl	Cyclohexyl	> 300*	13
16j	2	1	2-Cl u. 6 Cl	Cyclohexyl	220	n.t.
16k	1	1	4-Cl	Cyclohexyl	> 300*	> 300
16l	2	1	4-Cl	Cyclopentyl	> 300*	68*
16m	2	1	4-Cl	Cycloheptyl	165*	58
16n	2	1	4-Cl	Cyclohexylmethyl	130*	43*
16o	2	1	4-Cl	1-Adamantyl	100*	14*

zeigt keine Veränderung gegenüber dem Wert, der nach vierminütiger Inkubationszeit erhalten wird. Dieses Ergebnis bestätigt *Märschensz*^[117] an der Verbindung (**KM**) **7b**.

Die Substanz **16k** zeigt auch mit zwanzigminütiger Inkubation keine Wirkung im Born-Test (IC₅₀-Wert > 300 μmol/L).

Die Verbindungen **16c**, **16i**, **16l-o** zeigen bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten eine mäßige Aktivität. Bei einer weiteren Differenzierung fallen die Verbindungen **16c**, **16i** und **16o** auf. Mit einem IC_{50} -Wert von ca. $13 \mu\text{mol/L}$ zählen diese Substanzen eher zu den gut hemmenden Verbindungen (vgl. Tabelle 32 auf Seite 95, $1 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 10 \mu\text{mol/L}$).

Hervorzuheben ist die Verbindung **16g**, bei der der mäßige IC_{50} -Wert von $40 \mu\text{mol/L}$ mit vierminütiger Inkubationszeit auf einen guten IC_{50} -Wert von $2.5 \mu\text{mol/L}$ mit zwanzigminütiger Inkubation reduziert wird.

Anhand der Ergebnisse der Substanzklasse **16** in Tabelle 41 auf Seite 111 kann man Folgendes schließen:

- Die Cycloalkylaminoteilstruktur ist ein wichtiges Strukturmerkmal für die antiaggregatorische Wirkung im Born-Test. Alle Substanzen außer die Verbindungen **16e** und **16k** zeigen inhibitorische Effekte der Thrombozytenaggregation.
- Die Verbindung **16g** ist mit einem IC_{50} -Wert von $2.5 \mu\text{mol/L}$ bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten die aktivste Substanz. Die Modifikation der Verbindung **16g** an dem Alkylrest ($R^2 = \text{Cyclopentyl, Cycloheptyl, Cyclohexylmethyl bzw. 1-Adamantyl}$) führen zu keiner Verbesserung des IC_{50} -Wertes von $2.5 \mu\text{mol/L}$ (vgl. in Tabelle 41 auf Seite 111 die IC_{50} -Werte der Verbindungen **16l-o**). Die Verkürzung der CH_2 -Kette zwischen Cyclohexylaminorest und Carboxamidfunktion um eine CH_2 -Einheit führt zu der wirkungslosen Substanz **16k** (IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$).
- Mit einer Cyclohexylaminopartialstruktur sind besonders die drei Verbindungen **16c** (IC_{50} -Wert = $13 \mu\text{mol/L}$), **16g** (IC_{50} -Wert = $2.5 \mu\text{mol/L}$) und **16i** (IC_{50} -Wert = $13 \mu\text{mol/L}$) hervorzuheben.
- Die Position des Chlorsubstituenten am Phenylring spielt eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Blutplättchenaggregation. Bei der Veränderung des Chlorsubstituenten von der Ortho-Stellung zu der Para-Position wird der IC_{50} -Wert der Substanz **16i** von $13 \mu\text{mol/L}$ auf ein Fünftel (IC_{50} -Wert = $2.5 \mu\text{mol/L}$) bei der Verbindung **16g** reduziert.
- Weiterhin ist die Kettenlänge ($n = 1, 2, 3$ bzw. 4) der CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundkörper wichtig für die antiaggregatorische Potenz. Die Substanz **16c** mit drei

CH₂-Einheiten zwischen Phenylrest und Imidazolring ist mit einem IC₅₀-Wert von 13 µmol/L die aktivste Vertreter der Verbindungen **16a-16d**.

Wegen dieser Resultate dienen nun die beiden Verbindungen **16c** und **16g** als Leitstrukturen für die Substanzklassen **17-20**.

Tabelle 42 unten präsentiert die Substanzen **16c** und **16g**.

Tab. 42: entwickelte Leitstrukturen des Typs **16**: 1H-Imidazol-4-carboxamide **16c** und **16g**

Nr.	n	R¹
16c	3	H
16g	1	4-Cl

3.1.2.5.6 Verzweigte Alkylaminoderivate (Typ 17)

Bei den Verbindungen des Typs **17** wurde im Gegensatz zum Typ **16** die voluminöse Cycloalkylstruktur durch eine kleinere lipophile 2-Propyl- bzw. 3-Pentylgruppe ersetzt. Es sollte überprüft werden, inwieweit diese Partialstruktur die antiaggregatorische Aktivität der Substanzen beeinflusst. Weiterhin wurde das sekundäre Amin in der Seitenkette beibehalten.

Es wurde erwartet, daß die Modifikation der Cycloalkylaminoteilstruktur zu einer offenkettigen verzweigten Alkylaminopartialstruktur für die Hemmung der Blutplättchenaggregation ausreicht. Tabelle 43 auf Seite 114 zeigt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **17**.

Alle Verbindungen des Typs **17** außer die Substanzen **17d** und **17f** zeigen mit einer Inkubationszeit von 4 Minuten keinen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenaggregation (IC₅₀-Wert > 300 µmol/L).

Tab. 43: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **17** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. = nicht getestet)

17a-i

Nr.	m	n	R ¹	R ²	IC ₅₀	
					[μmol/L]	[μmol/L]
					4 min	20 min
17a	1	1	H	Isopropyl	> 300*	n.t.
17b	1	2	H	Isopropyl	> 300*	34*
17c	1	3	H	Isopropyl	> 300*	> 300*
17d	1	1	4-Cl	Isopropyl	270*	36*
17e	2	1	H	Isopropyl	> 300*	210
17f	2	2	H	Isopropyl	200	n.t.
17g	2	3	H	Isopropyl	> 300*	120
17h	2	1	4-Cl	Isopropyl	> 300*	n.t.
17i	2	1	4-Cl	3-Pentyl	> 300*	> 300

Die Verbindungen **17d** mit einem IC₅₀-Wert von 270 μmol/L und **17f** mit einem IC₅₀-Wert von 200 μmol/L wirken nur schwach hemmend auf die Aggregation der Blutplättchen.

Exemplarisch wurden die Substanzen **17b-e**, **17g** bzw. **17i** mit einer Inkubationszeit von 20 Minuten untersucht.

Die Testergebnisse in Tabelle 43 zeigen, daß die Substanzen **17b**, **17d** und **17g** nur mäßig inhibitorisch auf die Thrombozytenaggregation wirken. Die Verbindung **17e** ist schwach aktiv im Born-Test (IC₅₀-Wert = 210 μmol/L). Als wirkungslose Verbindungen (IC₅₀-Wert > 300 μmol/L) werden die Substanzen **17c** und **17i** betrachtet.

Die Born-Test-Ergebnisse in Tabelle 43 auf Seite 114 führen zu folgendem Schluß:

- Die Modifikation der Cycloalkylaminoteilstruktur zu einer offenkettige verzweigten Alkylaminopartialstruktur führt nur zu mäßig antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen **17b**, **17d** und **17g**.

3.1.2.5.7 Unverzweigte Alkylaminoderivate (Typ 18)

Bei den Verbindungen des Typs **18** wurde im Gegensatz zum Typ **17** die verzweigte Alkylstruktur durch eine langkettige unverzweigte Alkylgruppe ersetzt. Bei dieser Substanzklasse sollte überprüft werden, inwieweit diese Partialstruktur die pharmakologische Aktivität der Substanzen beeinflusst. Das sekundäre Amin in der Seitenkette wurde bei dieser Substanzklasse beibehalten.

Es wurde erwartet, daß die Modifikation der Cycloalkylaminoteilstruktur zu einer unverzweigten Alkylaminopartialstruktur für die antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen ausreicht.

Die Born-Testergebnisse der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **18** werden in Tabelle 44 auf Seite 116 vorgestellt.

Sie zeigen, daß alle Verbindungen des Typs **18** außer die Substanz **18h** mit vierminütiger Inkubationszeit wirkungslos sind (IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$). Lediglich die Verbindung **18h** erzielt einen schwach hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation (IC_{50} -Wert = $260 \mu\text{mol/L}$).

Exemplarisch wurden die Substanzen **18b**, **18e** und **18k** mit 20 Minuten Inkubation untersucht.

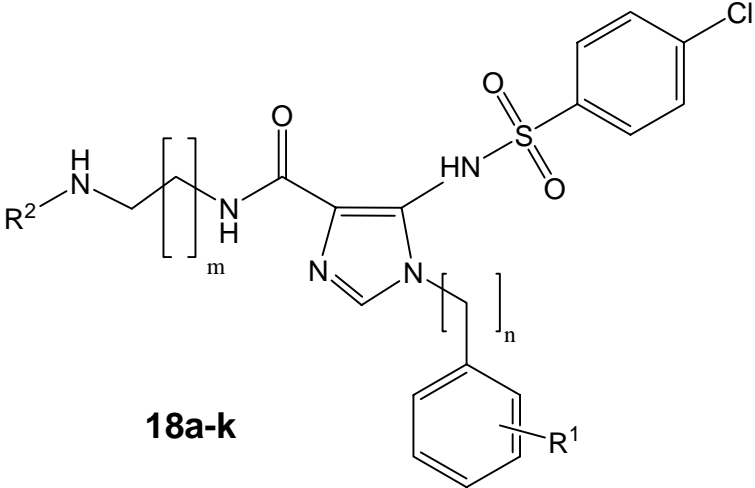
Dabei läßt sich feststellen, daß die Verbindung **18k** keine Wirkung besitzt ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Einen schwachen antiaggregatorischen Effekt wird bei der Substanz **18h** mit einem IC_{50} -Wert von $260 \mu\text{mol/L}$ gefunden. Der aktivste Vertreter der Verbindungsklasse **18** ist mit einem moderaten IC_{50} -Wert von $120 \mu\text{mol/L}$ die Substanz **18b**.

Anhand der Testergebnisse in Tabelle 44 auf Seite 116 kann Folgendes geschlossen werden:

- Die Modifikation der Cycloalkylaminoteilstruktur zu einer unverzweigten Alkylaminopartialstruktur führt nur zu der mäßig antiaggregatorisch wirkenden Verbindung **18b**.

Tab. 44: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **18** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. = nicht getestet)



18a-k

Nr.	m	n	R ¹	R ²	IC ₅₀	IC ₅₀
					[μmol/L]	[μmol/L]
					4 min	20 min
18a	1	3	H	n-Butyl	> 300*	n.t.
18b	1	1	4-Cl	n-Butyl	> 300*	120
18c	1	1	3-Cl	n-Butyl	> 300*	n.t.
18d	1	1	4-Cl	n-Hexyl	> 300*	n.t.
18e	2	3	H	Methyl	> 300*	260
18f	2	1	4-Cl	Methyl	> 300*	n.t.
18g	2	1	2-Cl	Methyl	> 300*	n.t.
18h	2	3	H	n-Propyl	260	n.t.
18i	2	1	4-Cl	n-Propyl	> 300*	n.t.
18j	2	1	3-Cl	n-Propyl	> 300*	n.t.
18k	2	1	4-Cl	n-Butyl	> 300*	> 300

3.1.2.5.8 Phenyl- und Phenylaminoderivate (Typ 19)

Bei den Verbindungen des Typs **19** wurde im Gegensatz zu den Substanzklassen **16-18** die Alkylstruktur durch eine planare voluminöse Arylpartialstruktur ersetzt. Es sollte überprüft werden, inwieweit die Arylpartialstruktur die pharmakologische Aktivität der Substanzen beeinflusst. Dabei wurde das sekundäre Amin in der Seitenkette beibehalten.

Mit dieser Variante wurde erwartet, daß die Modifikation der Alkylaminogruppe zu einer Phenyl- bzw. zu einer Phenylmethylteilstruktur zu antiaggregatorisch aktiven Verbindungen führt.

Tabelle 45 stellt die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **19** dar.

Tab. 45: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **19** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. = nicht getestet)

19a-e

Nr.	n	R ¹	R ²	IC ₅₀	IC ₅₀
				[μmol/L] 4 min	[μmol/L] 20 min
19a	2	H	Phenyl	> 300	n.t.
19b	3	H	Phenyl	> 300*	98
19c	1	4-Cl	Phenyl	> 300	n.t.
19d	3	H	Phenylmethyl	> 300*	n.t.
19e	1	4-Cl	Phenylmethyl	250*	n.t.

Alle Verbindungen des Typs **19** zeigen bei Standardmeßbedingungen entweder keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation (IC₅₀-Wert > 300 μmol/L) oder eine schwache Wirkung wie die Verbindung **19e** mit einem IC₅₀-Wert von 250 μmol/L.

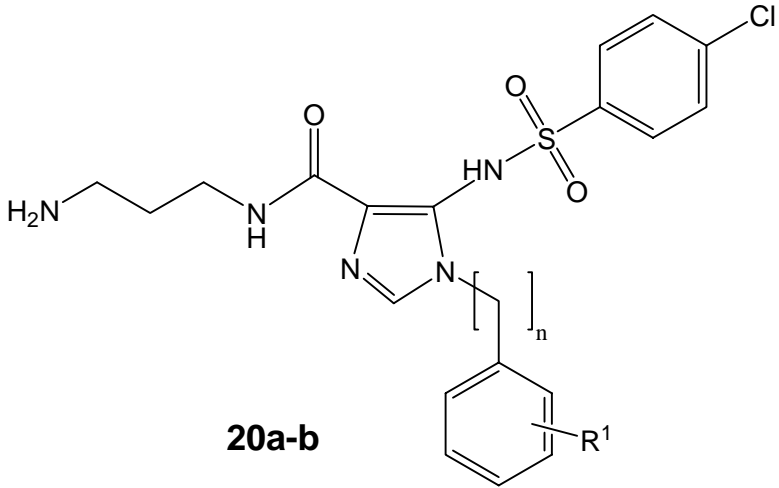
Für eine zwanzigminütigen Inkubationszeituntersuchung wurde die Verbindung **19b** ausgewählt. Der IC₅₀-Wert von größer 300 μmol/L mit vierminütiger Inkubationszeit wird deutlich reduziert. Die zwanzigminütige Inkubationszeit führt zu einer mäßigen Wirkung dieser Substanz (IC₅₀-Wert = 98 μmol/L).

Wie die Resultate in Tabelle 45 auf Seite 117 zeigen, kann die Phenyl- bzw. Phenylmethylteilstruktur die Cyclohexylaminopartialstruktur nicht ersetzen. Diese Modifikation führt nur zu einer mäßig aktiven Substanz **19b** mit einem IC_{50} -Wert von $98 \mu\text{mol/L}$ bei zwanzigminütiger Inkubationszeit.

3.1.2.5.9 Primäre Aminoalkylderivate (Typ 20)

Tabelle 46 präsentiert die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **20**.

Tab. 46: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklasse **20** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

			
Nr.	n	R¹	IC₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]
			4 min
20a	2	H	> 300*
20b	1	4-Cl	> 300*

Bei den Verbindungen des Typs **20** wurde im Gegensatz zu den Substanzklassen **16-19** auf die lipophile voluminöse Alkyl- bzw. Arylpartialstruktur verzichtet. Bei dieser Verbindungsklasse sollte überprüft werden, ob die lipophilen Teilstrukturen für die pharmakologische Aktivität der Substanzen verantwortlich sind. Das sekundäre Amin der Seitenkette bei den Verbindungstypen **16-19** wurde zu einem primären Amin modifiziert. Exemplarisch wurden die Substanzen **20a** und **20b** im Born-Test untersucht.

Es wurde angenommen, daß der Verlust des lipophilen Elementes an der Aminogruppe in der Seitenkette keinen hemmenden Einfluß auf die Thrombozytenaggregation bewirkt. Diese Erwartung läßt sich damit begründen, daß schon der Ersatz der Cyclohexylaminogruppe durch eine Methylaminogruppe (vgl. z.B. die Substanz **16g** in Tabelle 41 auf Seite 111, $IC_{50} = 40 \mu\text{mol/L}$ mit der Substanz **18f** in Tabelle 44 auf Seite 116, IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$) zu wirkungslosen Verbindungen führt.

Bei Standardmeßbedingungen wird bei den Verbindungen des Typs **20** kein inhibitorischer Effekt auf die Thrombozytenaggregation gefunden.

Aus den Resultaten des Born-Testes wird die Annahme bestätigt. Die primäre Aminogruppe in der Seitenkette der Substanzklasse **20** führt zu wirkungslosen Verbindungen.

3.1.2.6 Untersuchung anderer Induktoren auf die Thrombozytenaggregation

Die Aktivität einiger Verbindungen im Born-Test sollte durch Verwendung von weiteren Induktoren, die die Thrombozytenaggregation spezifischer als Kollagen auslösen, untersucht werden. Als Induktoren werden Adenosin-5'-diphosphat (ADP, siehe *Dionisotti*^[124]), Adrenalin (siehe *Anfossi*^[125] und *Hieble*^[126]) bzw. PAF („platelet activating factor“, siehe *Summers*^[129] und *Ishii*^[130]) zugesetzt.

Die Durchführung erfolgt wie im Kapitel 3.1.1 auf Seite 93 beschrieben. Es wird lediglich anstelle von Kollagen ein anderer oben erwähnter Aggregationsinduktor verwendet.

Die entsprechenden Referenzsubstanzen und ihren IC₅₀-Werten sind in Tabelle 47 aufgelistet (vgl. *Bethge*^[131], *Dionisotti*^[124], *Harada*^[132] und *Summers*^[129]).

Tab. 47: Ausgewählte Thrombozytenaggregationsinduktoren mit ihren Referenzsubstanzen und deren IC₅₀-Werte im Born-Test

Induktor	Referenzsubstanz (Inhibitor)	IC ₅₀ [μmol/L]
Kollagen	Acetylsalicylsäure	175
ADP	5-(N-Ethylcarboxamido)-adenosin (NECA)	1
Adrenalin	Phentolaminmesylat	2
PAF	Apafant (WEB-2086)	0.6

Die Arbeitsgruppe um *Gaarder*^[133] identifizierte 1961 ADP als ersten Plättchen-Agonisten. Nach Aktivierung der Thrombozyten wird ADP aus den elektronendichten Granula freigesetzt. Über die Inhibition der Adenylatcyclase und der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration verstärkt ADP die Thrombozytenaggregation. In den Plättchen vermitteln mindestens zwei spezifische Purin-Rezeptoren (P_{2Y1}- und P_{2T}-Rezeptor) diese Effekte. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren (vgl. *Fabre*^[134] und *Gachet*^[135]) führt zu einer Thrombozytenaggregation.

PAF aktiviert hoch potent über den G-Protein-gekoppelten-PAF-Rezeptor (vgl. *Summers*^[129]) die Thrombozyten. Dabei wird die Plättchenaggregation ausgelöst. PAF verstärkt zusammen mit Thromboxan A₂ und ADP die durch Thrombin und Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation. Weiterhin spielt PAF nicht nur bei der Hämostase eine bedeutende Rolle, sondern auch bei vielen physiologischen Vorgängen, wie z.B. allergischen Reaktionen (vgl. *Ishii*^[130]).

Adrenalin bindet an α_{2A/D}-adrenerge Rezeptoren, die sich auf der Thrombozytenoberfläche (vgl. *Kobilka*^[127] und *Docherty*^[128]) befinden, und stimuliert die Aggregation (vgl. *Hieble*^[126]). Vor

allem potenziert Adrenalin den aggregatorischen Effekt der Plättchenagonisten wie ADP, Thromboxan A_2 (TXA $_2$) und PAF.

In Tabelle 48 werden die ausgewählten Verbindungen vorgestellt. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 Minuten führt bei den Substanzen **6c**, **16c**, **16g** und **16i** nach Zusatz von Kollagen zu einer Steigerung der inhibitorischen Effekte der Thrombozytenaggregation. Diese Inkubationszeit wird daher für die anderen Induktoren beibehalten.

Tab. 48: Strukturformeln der Substanzen **6c**, **16c**, **16g**, **16i** und **19a**

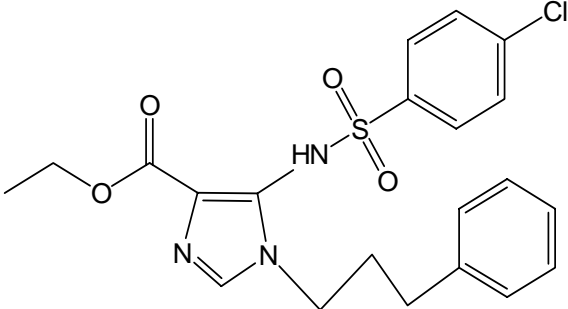
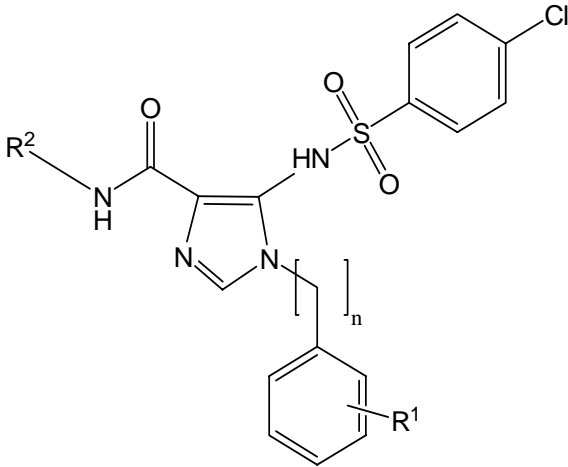
 <p style="text-align: center;">6c</p>				
 <p style="text-align: center;">16c, 16g, 16i und 19a</p>				
Nr.	n	R ¹	R ²	
16c	3	H	3-Cyclohexylamino-propyl	
16g	1	4-Cl	3-Cyclohexylamino-propyl	
16i	1	2-Cl	3-Cyclohexylamino-propyl	
19a	2	H	2-Phenylamino-ethyl	

Tabelle 49 unten zeigt die IC₅₀-Werte im Born-Test der ausgewählten 1H-Imidazole **6c**, **16c**, **16g**, **16i** und **19a** mit den Aggregationsinduktoren Kollagen, ADP, Adrenalin und PAF).

Tab. 49: IC₅₀-Werte von **6c**, **16c**, **16g**, **16i** und **19a** mit dem entsprechenden Aggregationsauslöser im Born-Test mit zwanzigminütiger Inkubationszeit (n.t. = nicht getestet)

Nr.	IC ₅₀ [µmol/L]			
	Kollagen	ADP	Adrenalin	PAF
6c	12	10	38	0.7
16c	13	1.9	7	54
16g	2.5	11	30	4
16i	13	14	< 1	n.t.
19a	> 300 ^a	> 300 ^a	> 300 ^a	48^a

a. vierminütige Inkubationszeit

Für diese Untersuchungen wurden die aktivsten Verbindungen mit Kollagen als Auslöser im Born-Test und gutem IC₅₀-Wert ausgewählt. Die Substanz **19a** wurde wegen ihres antithrombotischen Effektes (Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen = 9 %, vgl. Tabelle 59 auf Seite 143) getestet.

Bei den Substanzklassen **4** bis **8** fällt besonders die Verbindung **6c** mit einer Carbonsäure-ethyl-esterteilstruktur durch einen guten IC₅₀-Wert von 12 µmol/L (kollageninduzierten Thrombozytenaggregation) auf. Bei den Vertreter der 1H-Imidazol-4-carboxamide der Typen **12** bis **20** sind besonders die Substanzen mit 3-Cyclohexylamino-propylpartialstruktur (Verbindungsklasse **16**) mit den guten IC₅₀-Werten von 2.5 µmol/L bis 13 µmol/L mit Kollagen als Induktor der Plättchenaggregation hervorzuheben.

Der gute IC₅₀-Wert von 12 µmol/L (mit Kollagen induziert) der Verbindung **6c** wird um den Faktor 20 auf einen sehr guten IC₅₀-Wert von 0.7 µmol/L mit PAF als Aggregationsauslöser reduziert. Gegenüber ADP (IC₅₀ = 10 µmol/L) und Adrenalin (IC₅₀ = 38 µmol/L) als Induktoren der Thrombozytenaggregation verbessert sich der IC₅₀-Wert von 12 µmol/L (Kollagen) nicht.

Bei der im Born-Test (mit Kollagen als Induktor) besten Verbindung **16g** verschlechtert sich der IC₅₀-Werte von 2.5 µmol/L um den Faktor 1.6 auf einen IC₅₀-Wert von 4 µmol/L (PAF als Aggregationsauslöser), um den Faktor 4.4 auf einen IC₅₀-Wert von 11 µmol/L (ADP als Aggregationsinduktor) und um den Faktor 12 auf einen IC₅₀-Wert von 30 µmol/L (mit Adrenalin ausgelöste Thrombozytenaggregation).

Mit der gleichen 3-Cyclohexylamino-propylpartialstruktur wie die Verbindung **16g** zeigen die Substanzen **16i** und **16c** mit den IC_{50} -Wert von 13 $\mu\text{mol/L}$ andere Born-Test-Resultate.

Der IC_{50} -Wert von 13 $\mu\text{mol/L}$ (kollageninduzierte Plättchenaggregation) der Verbindung **16c** verschlechtert sich mit PAF als Aggregationsauslöser auf das Vierfache ($IC_{50} = 54 \mu\text{mol/L}$). Dagegen verbessert sich der IC_{50} -Wert von 13 $\mu\text{mol/L}$ (kollageninduzierte Plättchenaggregation) dieser Substanz auf die Hälfte ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol/L}$), wenn die Thrombozytenaggregation mit PAF ausgelöst wird. Auch wird der IC_{50} -Wert von 13 $\mu\text{mol/L}$ auf ein Siebtel ($IC_{50} = 1.9 \mu\text{mol/L}$) reduziert, wenn die Plättchenaggregation mit ADP ausgelöst wird.

Bei der Verbindung **16i** läßt sich keine Verbesserung des IC_{50} -Wertes von 13 $\mu\text{mol/L}$ durch den Austausch des Kollagen mit ADP als Induktor der Thrombozytenaggregation feststellen.

Die Substanz **19a** nimmt zu den oben genannten Verbindungen eine Ausnahmestellung ein, weil sie nicht zu den aktivsten Verbindungen (IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$, mit Kollagen als Auslöser) im Born-Test zählt. Weder mit ADP noch mit Adrenalin als Aggregationsinduktoren läßt sich eine Wirkung im Born-Test feststellen. Erst mit PAF als Auslöser der Thrombozytenaggregation zeigt die Verbindung **19a** mit einem IC_{50} -Wert von 48 $\mu\text{mol/L}$ einen mäßig hemmenden Effekt auf die Plättchenaggregation.

Aus diesen Born-Test-Resultaten mit verschiedenen Induktoren der Thrombozytenaggregation läßt sich Folgendes schließen:

- Die Substanzen zeigen unterschiedliche Wirkmechanismen bei der Inhibition der Thrombozytenaggregation.
- Die beste antiaggregatorisch wirkende Verbindung im Born-Test, bei der die Aggregation mit PAF ausgelöst wird, ist die Substanz **6c** mit einem sehr guten IC_{50} -Wert von 0.7 $\mu\text{mol/L}$.
- Die potenteste Verbindung im Born-Test, bei der die Plättchenaggregation mit ADP verursacht wird, ist die Verbindung **16c** mit einem guten IC_{50} -Wert von 1.9 $\mu\text{mol/L}$.
- Die aktivste Substanz im Born-Test, bei der die Thrombozytenaggregation mit Kollagen verursacht wird, ist die Verbindung **16g** mit einem guten IC_{50} -Wert von 2.5 $\mu\text{mol/L}$. Ein ähnlich gutes

Ergebnis erzielt diese Verbindung mit PAF als Aggregationsauslöser (IC_{50} -Wert = 4 $\mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 47 auf Seite 120).

- Die beste Verbindung im Born-Test, bei der die Aggregation der Plättchen mit Adrenalin induziert wird ist, ist die Substanz **16i**.
- Die Verbindung **19a** wirkt mit einem IC_{50} -Wert von 48 $\mu\text{mol/L}$ PAF-antagonistisch auf die Thrombozytenaggregation.

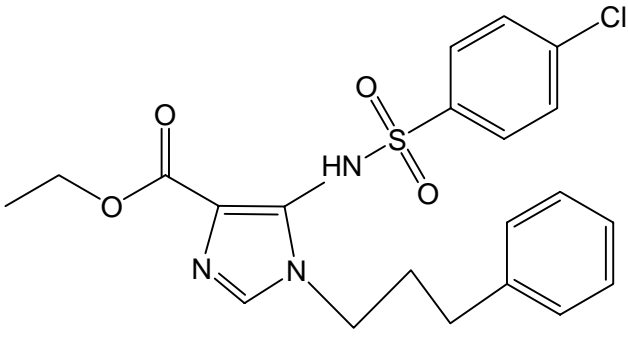
3.1.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse im Born-Test

Die im ersten Teil untersuchten 1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester der Substanzklassen **4**, **5** und **7** zeigen ebenso wie die Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carboxylate der Substanzklasse **8** keine antiaggregatorische Wirkung im Born-Test.

Die 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester der Verbindungsklasse **6** sind differenzierter zu betrachten (vgl. detaillierte Ausführungen im Kapitel 3.1.2.2 auf Seite 97 ff).

Die aktivste Verbindung im Born-Test, bei der die Thrombozytenaggregation mit Kollagen ausgelöst wird, ist die Substanz **6c** mit einem IC_{50} -Wert von 12 $\mu\text{mol/L}$ bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten (vgl. Tabelle 50).

Tab. 50: IC_{50} -Werte der aktivsten Verbindungen der Substanzklassen **4-8** mit kollageninduzierte Thrombozytenaggregation im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

 <p style="text-align: center;">6c</p>		
Nr.	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]
	4 min	20 min
6c	110*	12

Bei Standardmeßbedingungen (4 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C in DMSO/PRP) zeigen die Verbindungen **6a**, **6c**, **6d**, **6f** bzw. **6h** mäßige Effekte auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation ($10 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 150 \mu\text{mol/L}$). Die Substanzen **6b** und **6i** führen zu schwach antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen ($150 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 300 \mu\text{mol/L}$). Die Verbindungen **6e**, **6g** und **6j** werden als wirkungslose Substanzen eingestuft ($IC_{50}\text{-Wert} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Anhand der Substanzklassen **4-8** konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester, die eine Wirkung im Born-Test gezeigt haben, herausgearbeitet werden:

- 4-Chlorphenylsulfonylrest an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Imidazolgrundkörpers
- 3-Phenylpropylrest an Position 1 des Imidazolringes als lipophile Gruppe
- keine weitere lipophile Gruppe, wie z.B. Phenyl oder Butyl, an Position 2 des Imidazolgrundkörpers

Die im zweiten Teil untersuchten 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklassen **12, 13, 14, 15** und **20** zeigen keine Hemmung der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation. Nur die Verbindung **12c** mit einem IC_{50} -Wert von 260 $\mu\text{mol/L}$ sowie die Substanz **15e** mit einem IC_{50} -Wert von 250 $\mu\text{mol/L}$ wirken schwach antiaggregatorisch.

Tabelle 51 auf Seite 127 faßt die besten antiaggregatorisch wirkenden Substanzen aus den Klassen **12** bis **20** zusammen.

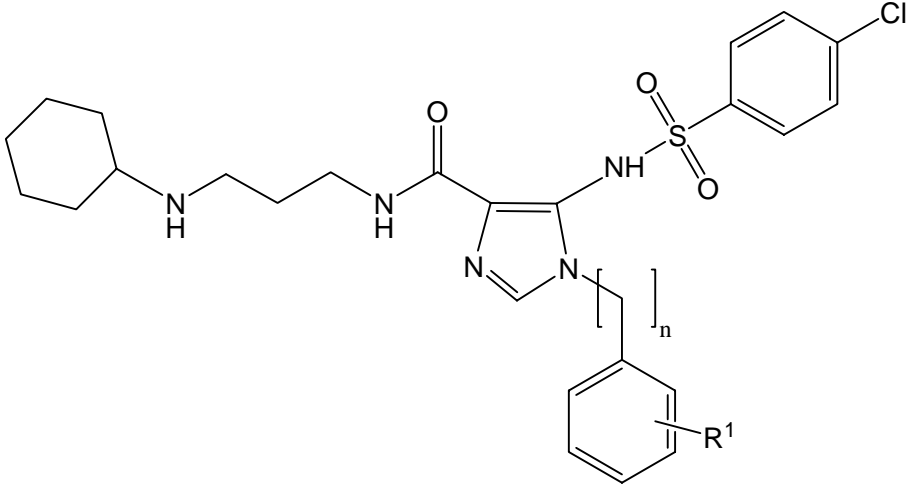
Die aktivsten Verbindungen im Born-Test sind in der Substanzklasse **16** zu finden. Dennoch ist sie differenziert zu betrachten (vgl. detaillierte Ausführungen im Kapitel 3.1.2.5.5 auf Seite 109 ff).

Hervorzuheben sind die Cyclohexylaminoderivate **16c, 16g** und **16i**, die mit dem IC_{50} -Wert von 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (**16g**) und dem IC_{50} -Wert von 13 $\mu\text{mol/L}$ (**16c** und **16i**) die besten hemmenden Effekte der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation erzielen. Dagegen zeigt die Substanz **16k** keine inhibitorische Aktivität und die Verbindungen **16l-o** präsentieren eine mäßige Wirkung im Born-Test (vgl. ausführliche Diskussion der Cycloalkylderivate im Kapitel 3.1.2.5.5 auf Seite 109 ff).

Die nachfolgenden Substanzklassen **17-20** führen zu keiner besser antiaggregatorisch wirkenden Verbindung als die oben aufgeführten Substanzen **16c, 16g** und **16i**.

Die Verbindungen **17b, 17d, 17g, 18b** und **19b** hemmen die durch Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation nur mäßig ($10 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 150 \mu\text{mol/L}$). Eine schwache Hemmung der Plättchenaggregation ($150 \mu\text{mol/L} < IC_{50}\text{-Wert} < 300 \mu\text{mol/L}$) bewirken die Substanzen **17e, 17f, 18e, 18h** und **19e**.

Tab. 51: IC₅₀-Werte der besten 1H-Imidazol-4-carboxamide mit kollageninduzierten Thrombozytenaggregation im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)



Nr.	n	R ¹	IC ₅₀ [μmol/L]	
			4 min	20 min
16c	3	H	37*	13
16g	1	4-Cl	40*	2.5
16i	1	2-Cl	> 300	13

Anhand der Substanzklassen **12-20** konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazol-4-carboxamide, die eine Wirkung im Born-Test gezeigt haben, herausgearbeitet werden:

- 4-Chlorphenylsulfonylrest an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Imidazolgrundkörpers
- 3-Cyclohexylamino-propylstruktur in der Seitenkette mit einer bifunktionalen Aminogruppe und einem lipophilen Cyclohexylrest
- Entweder ein Chlorsubstituenten in Ortho- bzw. Para-Stellung der Phenylmethylgruppe oder einen 3-Phenylpropylrest an Position 1 des Imidazolringes als weiteres lipophiles Element

Die Verbindungen **6c**, **16c**, **16g**, **16i** wurden wegen der guten antiaggregatorischen Aktivität im Born-Test, bei der die Thrombozytenaggregation mit Kollagen ausgelöst wurde, für weitere Tests ausgewählt.

Zunächst wurden sie mit den Aggregationsinduktoren Adrenalin, ADP und PAF im Born-Test weiteruntersucht.

Dabei zeigen die Substanzen unterschiedliche Wirkmechanismen bei der Inhibition der Thrombozytenaggregation (vgl. detaillierte Ausführungen im Kapitel 3.1.2.6 auf Seite 120 ff):

- Die Verbindung **6c** besitzt mit einem IC_{50} -Wert von $0.7 \mu\text{mol/L}$ PAF-Rezeptor-antagonistische Eigenschaften.
- Die Substanz **16c** wirkt mit einem IC_{50} -Wert von $1.9 \mu\text{mol/L}$ als ADP-Antagonist.
- Die Verbindung **16i** verdrängt mit einem IC_{50} -Wert $< 1 \mu\text{mol/L}$ Adrenalin am adrenergen $\alpha_{2A/D}$ -Rezeptor der Thrombozyten.
- Die Verbindung **16g** hat mit einem IC_{50} -Wert von $2.5 \mu\text{mol/L}$ eher Kollagen-antagonistische Eigenschaften und wirkt mit einem IC_{50} -Wert von $4 \mu\text{mol/L}$ nicht selektiv gegenüber PAF als Aggregationsauslöser.

Als Nächstes wurden die im Born-Test *in vitro* untersuchten Substanzen *in vivo* im Laser-Thrombose-Modell auf ihre gerinnungsphysiologische Aktivität überprüft. In diesem Modell werden physiologische Prozesse, wie z.B. Fließeigenschaften des Blutes, einbezogen.

Dabei wurde im Grundsatz auf Untersuchungen von Verbindungen im Laser-Thrombose-Modell verzichtet, die schon im Born-Test wirkungslos waren. Einige wirkungslose Substanzen wurden jedoch willkürlich ausgewählt und im Laser-Thrombose-Modell untersucht.

Als Resultat wurde erwartet, daß die antiaggregatorisch aktiven Verbindungen im Born-Test ihre inhibitorische Wirkung im Laser-Thrombose-Modell bestätigen. Die wirkungslosen Substanzen im Born-Test sollten auch im Laser-Thrombose-Modell keine antithrombotische Aktivität zeigen.

3.2 Bestimmung der Thrombusbildungshemmung *in vivo*

3.2.1 Allgemeines

In vitro-Testmodelle haben allgemein den Nachteil, daß die physiologischen Verhältnisse im lebenden Organismus nicht berücksichtigt werden können. So werden im Born-Test wichtige Einflüsse auf die Thrombozytenaggregation, wie z.B. Fließeigenschaften des Blutes, Blutdruck und Beschaffenheit des Gefäßendothels, vernachlässigt.

Im Arbeitskreis *Rehse* wird für diese Untersuchungen ein Laser-Thrombose-Modell (vgl. Abb. 43 unten) eingesetzt, das auf Versuchen von *Weichert*^[136] und *Seiffge*^[137] basiert und von *Kesselhut*^[138] und *Schein*^[139] etabliert wurde. *Ciborski*^[140] standardisierte die Methode und entwickelte neue statistische Verfahren zur Auswertung.

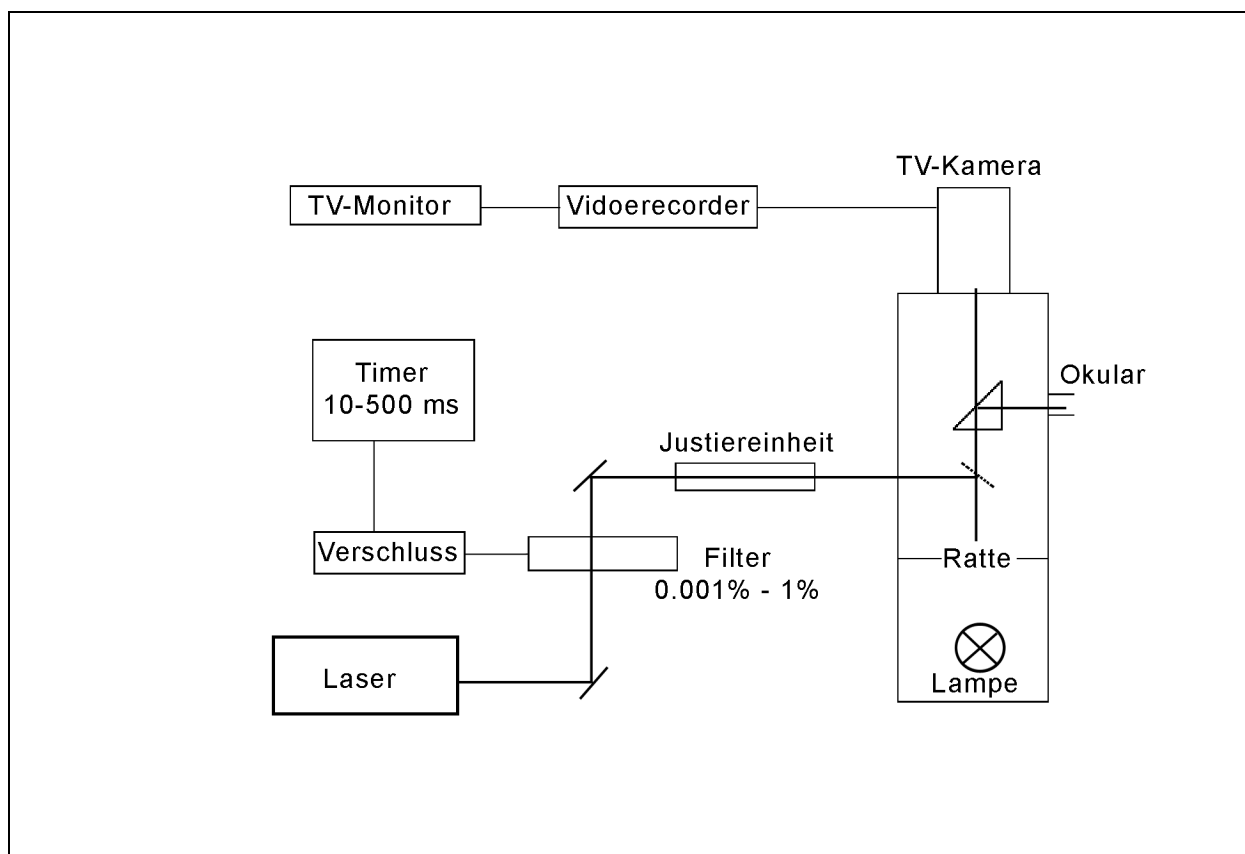


Abb. 43: Schematischer Aufbau des Laser-Thrombose-Modells

Methode:

Die freigelegten Mesenterialgefäße von männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 130 g bis 150 g werden mit einem Argon-Laser beschossen. Durch die Schädigung der Gefäßinnenwand werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt und aggregationsauslösende Substanzen wie z.B. ADP aus zerstörten Erythrozyten freigesetzt. Diese Faktoren bewirken eine Aktivierung der Thrombozyten. Diese lagern sich an der verletzten Gefäßwand, besonders an den Kollagenfasern, an. Weitere Gerinnungsaktivatoren wie Serotonin und ADP werden freigesetzt. Während Serotonin eine lokale Vasokonstriktion und eine Aktivierung anderer Thrombozyten auslöst, führt ADP aus den Blutplättchen und den zerstörten Erythrozyten zu weiteren Aggregationen der Thrombozyten. Schließlich wird ein Thrombus an der Gefäßwand gebildet, der zum größten Teil aus Plättchen besteht.

An unbehandelten Ratten wird in diesem Testmodell nach ein bis zwei Laserschüssen eine Thrombusbildung beobachtet. Mit Hilfe einer Videokamera, die mit einem Mikroskop verbunden ist, wird der Versuch verfolgt und aufgezeichnet (siehe Abb. 43 auf Seite 129).

Versuchsdurchführung:

Die Testsubstanzen werden durch eine Knopfkanüle per os appliziert. Zur Stabilisierung der wäßrigen Suspensionen wird mit 1 % Gummi Arabicum verrieben. Die Dosis beträgt 60 mg/kg Körpergewicht. Nach 2 Stunden wird bei der narkotisierten Ratte das Mesenterium freigelegt und die laserinduzierte Thrombusbildung beobachtet.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt nach der von *Ciborski*^[140] standardisierten Methode. Ein Thrombus liegt dann vor, wenn er die Größe eines Leukozyten (10 µm bis 12 µm) erreicht hat. Die Anzahl der für die Thrombusbildung benötigten Laserschüsse wird getrennt für Arteriolen und Venolen erfaßt. Kann nach fünf Laserschüssen kein Thrombus beobachtet werden, wird die Untersuchung an der Gefäßstelle beendet und mit der Anzahl von sechs Laserschüssen gerechnet. Die Testsubstanz wird an fünf Tieren jeweils an sechs Gefäßstellen arteriell und venös untersucht. Zur Kontrolle dienen neun Tiere.

Ein Maß für die antithrombotische Wirkung einer Substanz ist der **Thrombusbildungsindex (TBI)**. Er wird berechnet als Quotient aus der Summe der benötigten Laserschüsse und der Anzahl der untersuchten Gefäßstellen je Tier und Gefäßart. Der TBI stellt somit die durchschnitt-

liche Anzahl der Laserschüsse dar, die zur Thrombusbildung je Tier und Gefäßart benötigt wird. Ein TBI = 6 bedeutet keine Thrombusbildung.

Der **mittlere Thrombusbildungsindex (mTBI)** ist das arithmetische Mittel der TBIs aus einer Meßreihe mit einer bestimmten Anzahl von Tieren. Zur besseren Vergleichbarkeit der Meßergebnisse verschiedener Experimentoren wird der mTBI in den TBI umgerechnet.

Dazu wird je nach Gefäßart der mTBI des Kontrollwertes auf 0 % und der maximale mTBI auf 100 % festgelegt. Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Thrombusbildungshemmung(inProzent)} = \frac{\text{mTBI(Test)} - \text{mTBI(Kontrolle)}}{6 - \text{mTBI(Kontrolle)}} \cdot 100$$

Bei $\text{mTBI(Test)} = 6$ beträgt die Hemmung der Thrombusbildung 100 %, der Kontrollwert entspricht 0 % Hemmung.

Die Standardabweichung (s) und der Standardfehler des Mittelwertes (s_x) errechnen sich nach den allgemein üblichen Gleichungen (vgl. *Lorenz*^[141]). Die Signifikanz der durchgeführten Meßreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-Testes nach *Wilcoxon*, *Mann* und *Whitney* überprüft (vgl. *Sachs* ^[142]). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (α) größer 0.1 wird das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.) gewertet.

Unter diesen Testbedingungen führt **Acetylsalicylsäure (ASS)** bei einer Dosierung von 60 mg/kg (Körpergewicht) zu einer 48 ± 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer 20 ± 5 %igen Hemmung in den Venolen ($\alpha = 0.002$, vgl. *Camehn*^[143]). Die Hemmwirkung bei einer Dosierung von 10 mg/kg (Körpergewicht) **ASS** beträgt 18 % in den Arteriolen und 3 % in den Venolen. Bei 5 mg/kg (Körpergewicht) **ASS** wird die Thrombusbildung in den Arteriolen zu 10 % gehemmt, in den Venolen ist keine Wirkung mehr zu beobachten. Die Hemmwirkung des NO-Donators **Molsidomin** (Corvaton®) beträgt bei einer Dosierung von 10 mg/kg (Körpergewicht) in den Arteriolen 21 %.

Auffallend ist, daß die prozentuale Inhibition der Thrombusbildung für jede der untersuchten Substanzen auf der venösen Seite stets geringer als auf der arteriellen Seite ausfällt. Dies ist zum einen auf die geringere Blutfließgeschwindigkeit in den Venolen und die damit erleichterte Thrombusbildung zurückzuführen. Zum anderen sind die Thrombozyten im venösen Blutgefäßsystem weniger stark aktivierbar als im arteriellen, so daß die Hemmeffekte der Aggregationsinhibitoren im arteriellen Blut stärker ausfallen dürften. Als mögliche Erklärung für die schlechtere

Aktivierung der Thrombozyten in den Venolen wird die Beobachtung der Arbeitsgruppe um *Jia*^[144] diskutiert.

Sie stellte fest, daß das NO-Radikal von der SH-Gruppe eines Cysteinylrestes (Cys 93 β) nur im oxygenierten, nicht aber im desoxygenierten Hämoglobin gebunden wird. Demnach führt eine Zerstörung der Erythrozyten durch den Laserbeschuß zu einer NO-Freisetzung. NO bewirkt letztlich eine Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Ein weiterer Grund ist die Beteiligung der Leukozyten an der Thrombogenese (vgl. *Ciborski*^[140]). In den Venolen kann eine Margination der Leukozyten beobachtet werden. Darunter versteht man die Randstellung der Leukozyten an die Gefäßwand bzw. das langsame Wandern entlang der Gefäßwand in Richtung der Blutströmung. Der Laserschuß schädigt nicht nur das Endothel, sondern aktiviert auch die randständigen Leukozyten. Diese sezernieren z.B. PAF, einen Induktor der Thrombozytenaggregation. Somit wird die Aggregation der Blutplättchen verstärkt.

Ein großer Teil der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen, die bereits im Born-Test untersucht wurden, konnte nun auch im Laser-Thrombose-Modell auf seine gerinnungsphysiologische Aktivität überprüft werden.

Dabei wurde möglichst auf die Untersuchung von Verbindungen im Laser-Thrombose-Modell verzichtet, die schon im Born-Test als wirkungslos betrachtet wurden. Es wurde erwartet, daß die antiaggregatorisch aktiven Verbindungen im Born-Test ihre inhibitorische Wirkung im Laser-Thrombose-Modell bestätigen.

3.2.1.1 1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester (Typ 6 und Typ 7) und Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carboxylat (Typ 8)

Die Ergebnisse ausgewählter Vertreter der Substanzklassen **6**, **7** und **8** im Laser-Thrombose-Modell sind in Tabelle 52 zusammengefaßt.

Tab. 52: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanzklassen **6**, **7** und **8** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Venolen		Arteriolen	
						% ± S _x	α	% ± S _x	α
6a	1	H	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
6b	2	H	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	2 ± 2	n.s.	3 ± 1	n.s.
6c	3	H	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	5 ± 1	0.02	10 ± 2	0.002
6f	1	4-F	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	2 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
6h	1	3-Cl	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	0 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.
6i	1	2-Cl	H	O-CH ₂ -CH ₃	H	1 ± 1	n.s.	5 ± 2	0.1
6j	1	2-Cl	Butyl	O-CH ₂ -CH ₃	H	2 ± 1	n.s.	5 ± 2	0.1
7c	1	2-Cl	Ph ^a	O-CH ₂ -CH ₃	Su ^b	0 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.
8a	1	H	H	O ⁻ Na ⁺	Na ⁺	3 ± 2	n.s.	5 ± 1	0.05

a. Ph = Phenyl
b. Su = 4-Chlorphenylsulfonylamino

Von den neun getesteten Verbindungen zeigen die Substanzen **6i**, **6j** und **8a** mit einer 5 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen eine schwache antithrombotische Aktivität.

Die Substanz **6c** mit einem IC₅₀-Wert von 12 µmol/L bei einer kollageninduzierten und einem IC₅₀ von 0.7 µmol/L bei einer mit PAF ausgelösten Thrombozytenaggregation (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122) bestätigt ihre starke antiaggregatorische Potenz im Laser-Thrombose-Modell. Sie

hemmt mit 10 % die Thrombusbildung in den Arteriolen und mit 5 % die Thrombusbildung in den Venolen.

Die Hemmung von 5 % bis 10 % ist als schwache bis moderate antithrombotische Wirkung im Vergleich zu den Hemmeffekten der etablierten **Acetylsalicylsäure (ASS)** zu bewerten. Unter den gleichen Testbedingungen führt **ASS** zu einer 48 ± 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer 20 ± 5 %igen Hemmung in den Venolen ($\alpha = 0.002$, vgl. *Camehn*^[143]).

Die im Born-Test mäßig bis schwach wirkenden Substanzen **6a**, **6b**, **6f** und **6h** (vgl. Tabelle 34 auf Seite 98) zeigen keine antithrombotische Wirkung weder in den Arteriolen noch in den Venolen. Die Unterschiede zwischen den Born-Test-Ergebnissen und den Resultaten im Laser-Thrombose-Modell lassen sich mit den physiologischen Parameter wie Resorption, Metabolismus, Plasma-Eiweißbindungen und Verteilung des Wirkstoffes im Körper erklären. Es ist ferner denkbar, daß die im Born-Test aktiven Verbindungen **6a**, **6b**, **6f** und **6h** in der Leber der Ratte in inaktive Metabolite umgewandelt werden.

Die Verbindung **7c**, die exemplarisch für die im Born-Test wirkungslosen Substanzen des Typs **7** auch im Laser-Thrombose-Modell getestet wurde, bestätigt ihre Wirkungslosigkeit *in vivo*.

Die Verbindung **8a** wurde als Vertreter für die im Born-Test wirkungslose Substanzklasse **8** (mit Kollagen als Induktor der Thrombozytenaggregation) im Laser-Thrombose-Modell untersucht. Sie bestätigt ihre Wirkungslosigkeit in den Venolen (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). In den Arteriolen zeigt sie mit einer 5 %igen Hemmung der Thrombusbildung einen schwachen antithrombotischen Effekt. Diese Substanz wurde im Born-Test mit den verschiedenen Aggregationsauslöser, wie z.B. PAF, nicht weiteruntersucht, weil der antithrombotische Effekt *in vivo* zu gering war.

Anhand der Resultate der Substanzklassen **6**, **7** und **8** läßt sich Folgendes schließen:

- Die im Born-Test sehr aktive Verbindung **6c** bestätigt ihre Wirkung im Laser-Thrombose-Modell. Die 5 %ige Hemmung der Thrombusbildung in den Venolen und die 10 %ige Inhibition der Thrombusbildung in den Arteriolen sind als schwache bis moderate antithrombotische Wirkungen im Vergleich zu der etablierten **ASS** zu beurteilen.
- Bei den Substanzen **6a-c** ist die Kettenlänge der CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundkörper wichtig für die antithrombotische Potenz. Die Verlängerung auf drei CH_2 -

Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolring führt zu der potenten Verbindung **6c**. Die Substanzen **6a** und **6b** sind im Laser-Thrombose-Modell wirkungslos.

- Die Substanzen **6i**, **6j** und **8a** zeigen nur in den Arteriolen eine sehr schwache antithrombotische Aktivität mit einer 5 %igen Hemmung. In den Venolen sind sie wirkungslos.
- Die Verbindung **7c** bestätigt ihre *in vitro* Wirkungslosigkeit auch *in vivo*.

3.2.1.2 1H-Imidazol-4-carboxamide (Typ 12-18)

3.2.1.2.1 Alkoholderivate (Typ 12)

Die Laser-Thrombose-Modell-Resultate ausgewählter Alkoholderivate der Substanzklasse **12** befinden sich in Tabelle 53.

Tab. 53: Hemmung der Thrombusbildung durch die Alkoholderivate der Substanzklasse **12** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	m	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Venolen		Arteriolen	
						% ± S _x	α	% ± S _x	α
12a	1	H	H	OH	Su ^a	1 ± 1	n.s.	1 ± 1	n.s.
12b	1	2-Cl	H	OH	Su ^a	2 ± 1	n.s.	4 ± 1	n.s.
12c	2	H	H	OH	Su ^a	0 ± 1	n.s.	1 ± 1	n.s.
12d	2	4-Cl	H	OH	Su ^a	2 ± 2	n.s.	5 ± 1	0.05
12j	1	2-Cl	H	O-(CH ₂) ₂ -OH	Su ^a	0 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
12l	1	H	H	NH-(CH ₂) ₂ -OH	Su ^a	0 ± 2	n.s.	4 ± 1	n.s.
12m	2	H	H	NH-(CH ₂) ₂ -OH	Su ^a	2 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.
12n	2	2-Cl	H	NH-(CH ₂) ₂ -OH	Su ^a	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1

a. Su = 4-Chlorphenylsulfonylamino

Alle Verbindungen der Substanzklasse **12** außer der Verbindung **12d** zeigen keine hemmende Wirkung bei der laserinduzierten Thrombusbildung (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). Die Substanz **12d** hemmt mit 5 % sehr schwach die Thrombusbildung in den Arteriolen.

Die negativen Ergebnisse im Laser-Thrombose-Modell (Hemmung der Thrombusbildung \leq 5 %, vgl. Tabelle 53) bestätigen die Resultate des Born-Testes (IC_{50} -Wert > 260 $\mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 37 auf Seite 105), daß die untersuchten Verbindungen des Typs **12** mit einer Alkoholparti- alstruktur keine antithrombotische Wirkung besitzen.

3.2.1.2.2 Etherderivate (Typ 13)

Die Inhibition der Thrombusbildung durch die Etherderivate des Typs **13** wird in Tabelle 54 vorgestellt.

Tab. 54: Hemmung der Thrombusbildung durch die Etherderivate der Substanzklasse **13** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	m	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
				% ± s _x	α	% ± s _x	α
13a	1	H	O-CH ₃	2 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.
13b	1	2-Cl	O-CH ₃	0 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
13c	2	H	O-CH ₃	1 ± 1	n.s.	1 ± 2	n.s.
13d	2	2-Cl	O-CH ₃	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.

Die untersuchten Verbindungen **13a-d** zeigen keine hemmenden Effekte auf die Thrombusbildung weder in den Arteriolen noch in den Venolen (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). Sie

bestätigen die negativen Born-Test-Ergebnisse (IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 38 auf Seite 106).

Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Etherderivate des Typs **13** keine antithrombotischen Effekte besitzen.

3.2.1.2.3 1H-Imidazol-4-carboxamide des Typs **14** und des Typs **15**

Tabelle 55 faßt die Laser-Thrombose-Modell-Ergebnisse ausgewählter Vertreter der Substanzklassen **14** und **15** zusammen.

Tab. 55: Hemmung der Thrombusbildung durch die 1H-Imidazol-4-carboxamide der Substanzklassen **14** und **15** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	R ¹	R ²	R ³	Venolen		Arteriolen	
				% ± s _x	α	% ± s _x	α
14a	H	Dimethylamino	Su ^a	2 ± 1	n.s.	5 ± 2	0.1
14e	2-Cl	Dimethylamino	Cl	0 ± 1	n.s.	0 ± 2	n.s.
15e	3-Cl	2-Pyridyl	Su ^a	3 ± 1	0.1	7 ± 2	0.02

a. Su = 4-Chlorphenylsulfonylamino

Die untersuchten Verbindungen des Typs **14** und **15** hemmen nicht die laserinduzierte Thrombusbildung in den Venolen. In den Arteriolen zeigen die Verbindungen **14a** mit einer 5 %igen Inhibition und die Substanz **15e** mit einer 7 %igen Hemmung der Thrombusbildung eine schwache Wirkung. Die Verbindung **14e** bestätigt ihre *in vitro* Wirkungslosigkeit ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$) auch *in vivo* (Hemmung der Thrombusbildung $< 5 \%$).

Aus den Testergebnissen läßt sich Folgendes ableiten:

- Die Substanz **15e** untermauert ihre schwache Aktivität aus dem Born-Test ($IC_{50} = 250 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 40 auf Seite 109) mit einer 7 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Venolen.
- Die Dimethylaminoderivate der Substanzklasse **14** führen zu schwach aktiven bzw. inaktiven Substanzen im Laser-Thrombose-Modell (Hemmung der Thrombusbildung $\leq 5 \%$).

3.2.1.2.4 Cycloalkylaminoderivate (Typ 16)

Die Cycloalkylaminoderivate des Typs **16** hatten bereits im Born-Test vielversprechende Ergebnisse gezeigt, die im Laser-Thrombose-Modell auf ihre *in vivo* Aktivität überprüft werden sollten. In den Venolen zeigen alle getesteten Substanzen außer der Verbindung **16b** keinen hemmenden Effekt auf die Thrombusbildung. Die Substanz **16b** wirkt mit 5 % schwach antithrombotisch in den Venolen und mit 7 % schwach antithrombotisch in den Arteriolen.

In den arteriellen Blutgefäßsystem sind die Verbindungen **16d**, **16h**, **16j**, **16l** und **16m** mit einer Thrombusbildungshemmung von kleiner 5 % als antithrombotisch wirkungslose Vertreter des Typs **16** zu beurteilen.

Die übrigen getesteten Substanzen zeigen mit 5 % bis 10 % einen schwachen bis moderaten antithrombotischen Effekt. Die besten Verbindungen dieser Substanzklasse mit einer ca. 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen sind die Substanzen **16i** und **16n**.

Die Verbindung **16i** erzielte schon im Born-Test gute bis sehr gute IC_{50} -Werte (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122). Mit einem IC_{50} -Wert von ca. $13 \mu\text{mol/L}$ mit ADP bzw. Kollagen als Auslöser der Thrombozytenaggregation zählt diese Substanz zu den gut antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen. Mit Adrenalin als Auslöser der Thrombozytenaggregation wirkt sie sogar noch besser ($IC_{50} < 1 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 49 auf Seite 122).

Die Substanz **16n** wirkt *in vitro* bei der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation mit einem IC_{50} -Wert von $43 \mu\text{mol/L}$ mäßig. Die bessere *in vivo* Aktivität (Inhibition der Thrombusbildung = 10 %) läßt sich z.B. damit erklären, daß die Verbindung kein selektiver Kollagenantagonist ist, sondern ähnlich wie bei der Substanz **16i** als Adrenalin- oder ADP-Antagonist wirkt.

Die beste Verbindung aus dem Born-Test **16g** ($IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 49 auf Seite 122), bei der die Thrombozytenaggregation mit Kollagen ausgelöst wird, hemmt die Thrombusformation mit 7 % mäßig. Die gleiche mäßige antithrombotische Aktivität mit einer 7 %iger Inhibition der Thrombusbildung zeigen die Substanzen **16b** und **16k**.

Mit einer 5 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arterien wirken die Substanzen **16a** und **16c** marginal schlechter als die Verbindungen **16b** und **16k**.

Die Laser-Thrombose-Modell-Resultate der Substanzklasse **16** werden in Tabelle 56 zusammengefaßt.

Tab. 56: Hemmung der Thrombusbildung durch die Cycloalkylaminoderivate der Substanzklasse **16**
(n.s. = nicht signifikant)

Nr.	m	n	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
					% ± S _x	α	% ± S _x	α
16a	2	1	H	Cyclohexyl	1 ± 1	n.s.	5 ± 1	n.s.
16b	2	2	H	Cyclohexyl	5 ± 1	0.02	7 ± 2	0.02
16c	2	3	H	Cyclohexyl	2 ± 1	0.2	5 ± 2	0.1
16d	2	4	H	Cyclohexyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 2	0.2
16g	2	1	4-Cl	Cyclohexyl	3 ± 1	0.2	7 ± 2	0.05
16h	2	1	3-Cl	Cyclohexyl	2 ± 1	0.2	4 ± 1	0.1
16i	2	1	2-Cl	Cyclohexyl	3 ± 1	0.1	9 ± 2	0.01
16j	2	1	2-Cl u. 6-Cl	Cyclohexyl	2 ± 1	0.2	4 ± 1	0.1
16k	1	1	4-Cl	Cyclohexyl	2 ± 1	0.2	7 ± 2	0.01
16l	2	1	4-Cl	Cyclopentyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1
16m	2	1	4-Cl	Cycloheptyl	2 ± 1	0.2	3 ± 1	n.s.
16n	2	1	4-Cl	Cyclohexylmethyl	0 ± 1	0.05	10 ± 2	0.01

Anhand der Resultate der Verbindungsklasse **16** in Tabelle 56 auf Seite 139 kann man Folgendes schließen:

- Die Cycloalkylaminopartialstruktur ist ein wichtiges Strukturmerkmal für die antithrombotische Wirkung im Laser-Thrombose-Modell. In den Venolen zeigen alle getesteten Substanzen außer der Verbindung **16b** keinen hemmenden Effekt der Thrombusbildung. In den arteriellen Blutgefäßsystem sind die Verbindungen **16d**, **16h**, **16j**, **16l** und **16m** mit einer Thrombusbildungshemmung von kleiner 5 % als antithrombotisch wirkungslose Substanzen zu betrachten.
- Die besten Verbindungen dieser Substanzklasse mit einer ca. 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen sind die Substanzen **16i** und **16n**. Die Substanzen **16a**, **16b**, **16c**, **16g** und **16k** wirken mit 5 % bis 7 % schwach bis moderat.
- Die Modifikation der Verbindung **16g** an dem Alkylrest ($R^2 = \text{Cyclopentyl}$ bzw. Cycloheptyl) führen zu antithrombotisch wirkungslosen Vertretern **16l** und **16m** (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). Die Verkürzung der CH_2 -Kette zwischen Cyclohexylaminorest und Carboxamidfunktion um eine CH_2 -Einheit führt mit einer 7 %igen Hemmung zu der aktiven Verbindung **16k**. Die Einführung einer Methylengruppe zwischen Cyclohexylgruppe und Aminofunktion bei der Substanz **16n** bewirkt eine 10 %ige Inhibition der Thrombusbildung.
- Weiterhin ist die Kettenlänge ($n = 1, 2, 3$, bzw. 4) der CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundkörper wichtig für die antithrombotische Aktivität. Die Substanz **16d** mit vier CH_2 -Einheiten zwischen Phenylrest und Imidazolring führt zu einem wirkungslosen Vertreter (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). Die Verbindungen **16a-c** zeigen mit einer Hemmung von 5 % bis 7 % eine schwache Wirkung im Laser-Thrombose-Modell, so daß für diesen Effekt maximal drei CH_2 -Einheiten zwischen Phenylring und Imidazolgrundgerüst vorhanden sein dürfen.
- Die Position des Chlorsubstituenten am Phenylring spielt eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Thrombusbildung. Die Variation des Chlorsubstituenten von der Para-Stellung zu der Ortho-Position führt zu mäßig antithrombotisch aktiven Verbindungen **16g** und **16i**. Ist der Chlorsubstituent in Meta-Stellung (**16h**) bzw. an den Positionen 2 und 6 (**16j**), verliert die Struktur ihre Wirkung im Laser-Thrombose-Modell.

3.2.1.2.5 Verzweigte Alkylaminoderivate (Typ 17)

Die Hemmung der Thrombusbildung durch ausgewählte verzweigte Alkylaminoderivate des Typs **17** wird in Tabelle 57 vorgestellt.

Tab. 57: Hemmung der Thrombusbildung durch die verzweigten Alkylaminoderivate der Substanzklasse **17** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	m	n	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
					% ± S _x	α	% ± S _x	α
17a	1	1	H	Isopropyl	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
17c	1	3	H	Isopropyl	0 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
17d	1	1	4-Cl	Isopropyl	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
17e	2	1	H	Isopropyl	0 ± 1	n.s.	0 ± 2	n.s.
17f	2	2	H	Isopropyl	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
17h	2	1	4-Cl	Isopropyl	1 ± 1	n.s.	4 ± 2	0.2
17i	2	1	4-Cl	3-Pentyl	2 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.2

Die untersuchte Verbindungsklasse **17** führt zu keiner Substanz, die die Thrombusformation in den Arteriolen bzw. in den Venolen inhibiert (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %). Dieses negative Resultat ist sehr überraschend, weil anhand der Born-Test-Ergebnisse (vgl. Tabelle 43 auf Seite 114) eine schwach hemmende Wirkung der Thrombusbildung erwartet wurde.

Der Unterschied der Ergebnisse zwischen dem *in vitro* Test (Born-Test) und dem biologischen Modell (Laser-Thrombose-Modell) läßt sich z.B. mit den physiologischen Prozessen der Resorption und Biotransformation erklären. Es ist z.B. denkbar, daß die im Born-Test aktiven Verbindun-

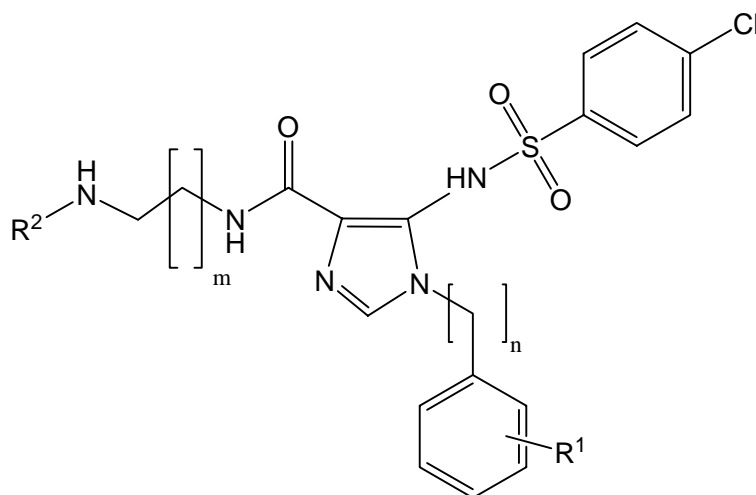
gen des Typs **17** in der Leber der Ratte in inaktive Metabolite umgewandelt werden. Somit ist keine Wirkung im Laser-Thrombose-Modell festzustellen.

Aus den negativen Ergebnissen des Laser-Thrombose-Modells läßt sich schließen, daß die Etherderivate des Typs **13** keine antithrombotischen Effekte besitzen.

3.2.1.2.6 Unverzweigte Alkylaminoderivate (Typ 18)

Tabelle 58 faßt die Ergebnisse der Inhibition der Thrombusbildung der Substanzklasse **18** zusammen.

Tab. 58: Hemmung der Thrombusbildung durch die unverzweigten Alkylaminoderivate der Substanzklasse **18** (n.s. = nicht signifikant)



Nr.	m	n	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
					% ± S _x	α	% ± S _x	α
18a	1	3	H	n-Butyl	0 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
18b	1	1	4-Cl	n-Butyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1
18c	1	1	3-Cl	n-Butyl	3 ± 1	0.1	4 ± 1	0.1
18d	1	1	4-Cl	n-Hexyl	0 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.
18e	2	3	H	Methyl	2 ± 2	n.s.	1 ± 1	n.s.
18f	2	1	4-Cl	Methyl	2 ± 1	0.2	4 ± 2	0.2
18h	2	3	H	n-Propyl	5 ± 2	0.05	6 ± 1	0.02
18i	2	1	4-Cl	n-Propyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.2
18j	2	1	3-Cl	n-Propyl	0 ± 1	n.s.	1 ± 2	n.s.
18k	2	1	4-Cl	n-Butyl	1 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.

Die unverzweigten Alkylaminoderivate des Typs **18** außer der Verbindung **18h** zeigen im Laser-Thrombose-Modell keine Wirkung (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %).

Dagegen hemmt die Substanz **18h** die Thrombusbildung sowohl in den Venolen mit 5 % als auch in den Arteriolen mit 6 %. Im Born-Test zeigt diese Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von 260 $\mu\text{mol/L}$ eine ähnlich schwache Wirkung.

Anhand der Resultate des Laser-Thrombose-Modells läßt sich für diese Substanzklasse ableiten, daß nur die Verbindung **18h** eine schwache antithrombotische Wirkung besitzt. Die anderen Vertreter dieser Substanzklasse bestätigen ihre *in vitro* Wirkungslosigkeit (IC_{50} -Wert > 300 $\mu\text{mol/L}$ bei Standardmeßbedingungen) auch *in vivo*.

3.2.1.2.7 Phenyl- und Phenylmethylaminoderivate (Typ 19)

Die Ergebnisse der Hemmung der Thrombusbildung einiger Vertreter der Phenyl- und Phenylmethylaminoderivate der Substanzklasse **19** werden in Tabelle 59 vorgestellt.

Tab. 59: Hemmung der Thrombusbildung durch die Phenyl- und Phenylaminoderivate der Substanzklasse **19** (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	n	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
				% ± S _x	α	% ± S _x	α
19a	2	H	Phenyl	2 ± 1	n.s.	9 ± 2	0.01
19b	3	H	Phenyl	1 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1
19d	3	H	Phenylmethyl	0 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
19e	1	4-Cl	Phenylmethyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 2	0.2

Die Verbindung **19a** hemmt moderat mit 9 % die Thrombusformation in den Arteriolen. In den Venolen wirkt sie nicht. Der mäßige Effekt in den Arteriolen ist nicht mit der Hemmung der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation (vgl. Tabelle 45 auf Seite 117) zu erklären, weil die Substanz mit einem IC_{50} -Wert größer als 300 $\mu\text{mol/L}$ als wirkungslos zu betrachten ist. Jedoch zeigt sie mit einem IC_{50} -Wert von 48 $\mu\text{mol/L}$ einen mäßigen PAF-antagonistischen Effekt (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122).

Die anderen untersuchten Substanzen der Substanzklasse **19** zeigen keine Hemmung bei der laserinduzierten Thrombusbildung weder in den Arteriolen noch in den Venolen. Sie bestätigen die *in vitro* Wirkungslosigkeit (IC_{50} -Wert $> 300 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 45 auf Seite 117) auch *in vivo* (Hemmung der Thrombusbildung $< 5 \%$).

An den Laser-Thrombose-Modell-Resultaten in Tabelle 59 auf Seite 143 läßt sich Folgendes ableiten:

- Die Vertreter der Substanzklasse **19** außer der Verbindung **19a** zeigen keinen antithrombotischen Effekt im Laser-Thrombose-Modell. Die Verbindung **19a** hemmt moderat mit 9 % die Thrombusformation in den Arteriolen, ist aber in den Venolen nicht aktiv.

3.2.1.2.8 Zusammenfassung der *in vivo* Resultate

Die im Laser-Thrombose-Modell untersuchten 1H-Imidazole zeigen geringe bis keine antithrombotischen Effekte. Die antithrombotische Wirkung der untersuchten Verbindungen beträgt in den Venolen $\leq 5\%$ und in den Arteriolen $\leq 10\%$.

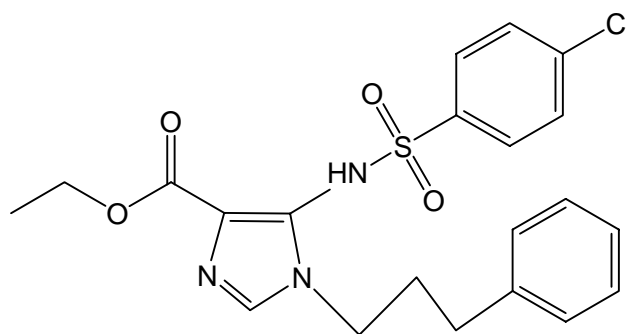
Im Vergleich dazu führt die Referenzsubstanz **Acetylsalicylsäure (ASS)** unter gleichen Testbedingungen zu einer $48 \pm 10\%$ igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer $20 \pm 5\%$ igen Hemmung in den Venolen ($\alpha = 0.002$, vgl. *Camehn*^[143]).

Auffallend ist, daß die prozentuale Inhibition der Thrombusbildung für jede der untersuchten Substanzen auf der venösen Seite stets geringer als auf der arteriellen Seite ausfällt. Ein Grund für diese Differenz ist die geringere Blutfließgeschwindigkeit in den Venolen und die damit erleichterte Thrombusbildung (vgl. ausführliche Diskussion im Kapitel 3.2.1 auf Seite 129 ff).

Die aktivste Verbindung aus den Klassen **6** bis **8** im Laser-Thrombose-Modell wird in Tabelle 60 gezeigt.

Tab. 60: Zusammenfassende Darstellung der aktivsten Substanz der Substanzklassen **6-8** im Laser-Thrombose-Modell

Nr.	Venolen		Arteriolen	
	% \pm S _x	α	% \pm S _x	α
6c	5 \pm 1	0.02	10 \pm 2	0.002



Die Substanz **6c** bestätigt ihre antiaggregatorische Potenz in diesem Modell mit einer 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und einer 5 %igen Hemmung in den Venolen. Jedoch ist der antithrombotische Effekt nicht so stark, wie anhand der gefundenen Born-Test-Ergebnisse (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122) erwartet wurde. Bei der mit PAF ausgelösten Thrombozytenaggregation wird ein IC₅₀-Wert von 0.7 $\mu\text{mol/L}$ gefunden.

Die anderen Vertreter der Substanzklasse **6-8** besitzen im Vergleich zu der Substanz **6c** in den Arteriolen und Venolen einen sehr schwachen antithrombotischen Effekt (Hemmung der Thrombusbildung = 5 %) oder sind wirkungslos (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %).

Anhand der Resultate im Laser-Thrombose-Modell konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazole der Substanzklasse **6-8** für die Wirkung im Laser-Modell identifiziert werden:

- 4-Chlorphenylsulfonylrest an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Imidazolgrundkörpers
- 3-Phenylpropylrest an Position 1 des Imidazolringes als lipophile Gruppe
- keine weitere lipophile Gruppe, wie z.B. Phenyl oder Butyl, an Position 2 des Imidazolgrundkörpers

Die aktivsten Vertreter der 1H-Imidazol-carboxamide der Verbindungsklassen **12-19** im Laser-Thrombose-Modell faßt Tabelle 61 auf Seite 147 zusammen.

Auffällig ist wieder die Substanzklasse **16** mit den aktivsten Verbindungen **16i** und **16n**. Beide Substanzen hemmen mit ca. 10 % die Thrombusbildung in den Arteriolen. In den Venolen sind sie mit einer Inhibition der Thrombusbildung < 5 % wirkungslos.

Die Verbindung **16i** erzielte schon im Born-Test gute bis sehr gute IC_{50} -Werte (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122). Mit einem IC_{50} -Wert von ca. 13 $\mu\text{mol/L}$ mit ADP bzw. Kollagen als Auslöser der Thrombozytenaggregation zählt diese Substanz zu den gut antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen. Mit Adrenalin als Auslöser der Thrombozytenaggregation wirkt sie sogar noch besser ($IC_{50} < 1 \mu\text{mol/L}$, vgl. Tabelle 49 auf Seite 122).

Die Substanz **16n** wirkt *in vitro* bei der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation mit einem IC_{50} -Wert von 43 $\mu\text{mol/L}$ mäßig (vgl. Tabelle 41 auf Seite 111). Die bessere *in vivo* Aktivität (Inhibition der Thrombusbildung = 10 %) läßt sich z.B. damit erklären, daß die Verbindung kein selektiver Kollagenantagonist ist, sondern ähnlich wie bei der Substanz **16i** als Adrenalin- oder ADP-Antagonist wirkt (vgl. Kapitel 3.1.2.5.5 auf Seite 109 ff).

Die Verkürzung der Seitenkette der Verbindung **16n** führt mit einer 7 %igen Hemmung der Thrombusformation in den Arteriolen zu den schwächer antithrombotisch wirkenden Substanzen

16g und **16k**. Die gleiche antithrombotische Aktivität mit 7 % Hemmung zeigt die Verbindung **16b**.

Die Verbindungen **16g** und **16b** bestätigen ihre antiaggregatorische Potenz in diesem Modell. Jedoch ist der antithrombotische Effekt der Substanz **16g** nicht so stark, wie anhand der gefundenen Born-Test-Ergebnisse (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122) erwartet wurde. Bei der mit Kollagen ausgelösten Thrombozytenaggregation wird ein IC_{50} -Wert von 2.5 $\mu\text{mol/L}$ gefunden. Im gleichen Bereich mit einem IC_{50} -Wert von 4 $\mu\text{mol/L}$ befindet sich der IC_{50} -Wert mit PAF als Aggregationsinduktor.

Tab. 61: Zusammenfassende Darstellung der aktivsten Verbindungen der Substanzklassen **12-19** im Laser-Thrombose-Modell (n.s. = nicht signifikant)

Nr.	m	n	R ¹	R ²	Venolen		Arteriolen	
					% ± S _x	α	% ± S _x	α
16b	2	2	H	Cyclohexyl	5 ± 1	0.02	7 ± 2	0.02
16g	2	1	4-Cl	Cyclohexyl	3 ± 1	0.2	7 ± 2	0.05
16i	2	1	2-Cl	Cyclohexyl	3 ± 1	0.1	9 ± 2	0.01
16k	1	1	4-Cl	Cyclohexyl	2 ± 1	0.2	7 ± 2	0.01
16n	2	1	4-Cl	Cyclohexylmethyl	0 ± 1	0.05	10 ± 2	0.01
19a	1	2	H	Phenyl	2 ± 1	n.s.	9 ± 2	0.01

Als weitere moderat aktive Verbindung mit einer 9 %igen Hemmung der Thrombusformation ist die Substanz **19a** näher zu betrachten.

Der mäßige Effekt in den Arteriolen ist nicht mit der Hemmung der kollageninduzierte Thrombozytenaggregation (vgl. Tabelle 45 auf Seite 117) zu erklären, weil die Substanz mit einem IC_{50} -Wert größer als 300 $\mu\text{mol/L}$ als wirkungslos zu betrachten ist. Jedoch zeigt sie mit einem IC_{50} -Wert von 48 $\mu\text{mol/L}$ einen mäßigen PAF-antagonistischen Effekt (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122). Die anderen Vertreter der Substanzklasse **12-19** besitzen im Vergleich zu den oben aufgeführten Substanzen einen sehr schwachen antithrombotischen Effekt (Hemmung der Thrombusbildung = 5 %, wie z.B. **16c** mit 5 % in Tabelle 54 auf Seite 136) oder sind wirkungslos (Hemmung der Thrombusbildung < 5 %).

Anhand der Substanzklassen **12-19** konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazol-4-carboxamide, die für die Wirkung im Laser-Thrombose-Modell verantwortlich sind, herausgearbeitet werden:

- 4-Chlorphenylsulfonylrest an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Imidazolgrundkörpers
- eine Cyclohexylmethylamino-, eine Cyclohexylamino- bzw. eine Phenylteilstruktur in der Seitenkette. Diese lipophile Gruppe an der sekundären Aminogruppe befindet sich im Abstand von zwei bzw. drei CH_2 -Einheiten zur Amidfunktion
- Entweder ein Chlorsubstituent in Ortho- bzw. Para-Stellung der Phenylmethylgruppe oder ein 2-Phenylethylrest an Position 1 des Imidazolringes als weiteres lipophiles Element

3.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

Im weiteren Verlauf der Arbeit werden wegen der *in vitro* und *in vivo* beobachteten inhibitorischen Effekte auf die Thrombozytenaggregation bzw. Thrombusbildung Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchgeführt.

Im Born-Test zeigen die Verbindungen **6c**, **16c**, **16g** und **16i** beachtliche antiaggregatorische Wirkungen (siehe Kapitel 3.1.2.7 auf Seite 125 ff).

Moderate antithrombotische Effekte werden im Laser-Thrombose-Modell bei den Verbindungen **6c**, **16i**, **16n** und **19a** gefunden (siehe Kapitel 3.2.1.2.8 auf Seite 145 ff).

Für die Untersuchungen wurden die Verbindungen **6c**, **16c**, **16i** und **19a** mit antiaggregatorischer oder/und antithrombotischer Aktivität ausgewählt. Sie sind mit ihren *in vitro*- und *in vivo*-Testergebnissen in Abb. 44 auf Seite 150 angegeben.

Auswahlkriterien für die Substanzen **6c**, **16c**, **16i** und **19a** waren:

- antiaggregatorische Wirkung: IC_{50} -Wert $< 100 \mu\text{mol/L}$ im Born-Test
- antithrombotische Wirkung: Hemmung der Thrombusbildung $\geq 5 \%$

Diese Substanzen sollten in Anlehnung an den Verbindungen **YC-1**^[84], einem NO-unabhängigen sGC-Aktivator und **Sildenafil** (Viagra®)^[145], einem PDE-5-Inhibitor weiteruntersucht werden.

Dabei sollte überprüft werden, ob die antiaggregatorischen Effekte der getesteten Substanzen durch die lösliche Guanylatcyclase und/oder durch die Inhibition der Phosphodiesterase 5 ausgelöst werden.

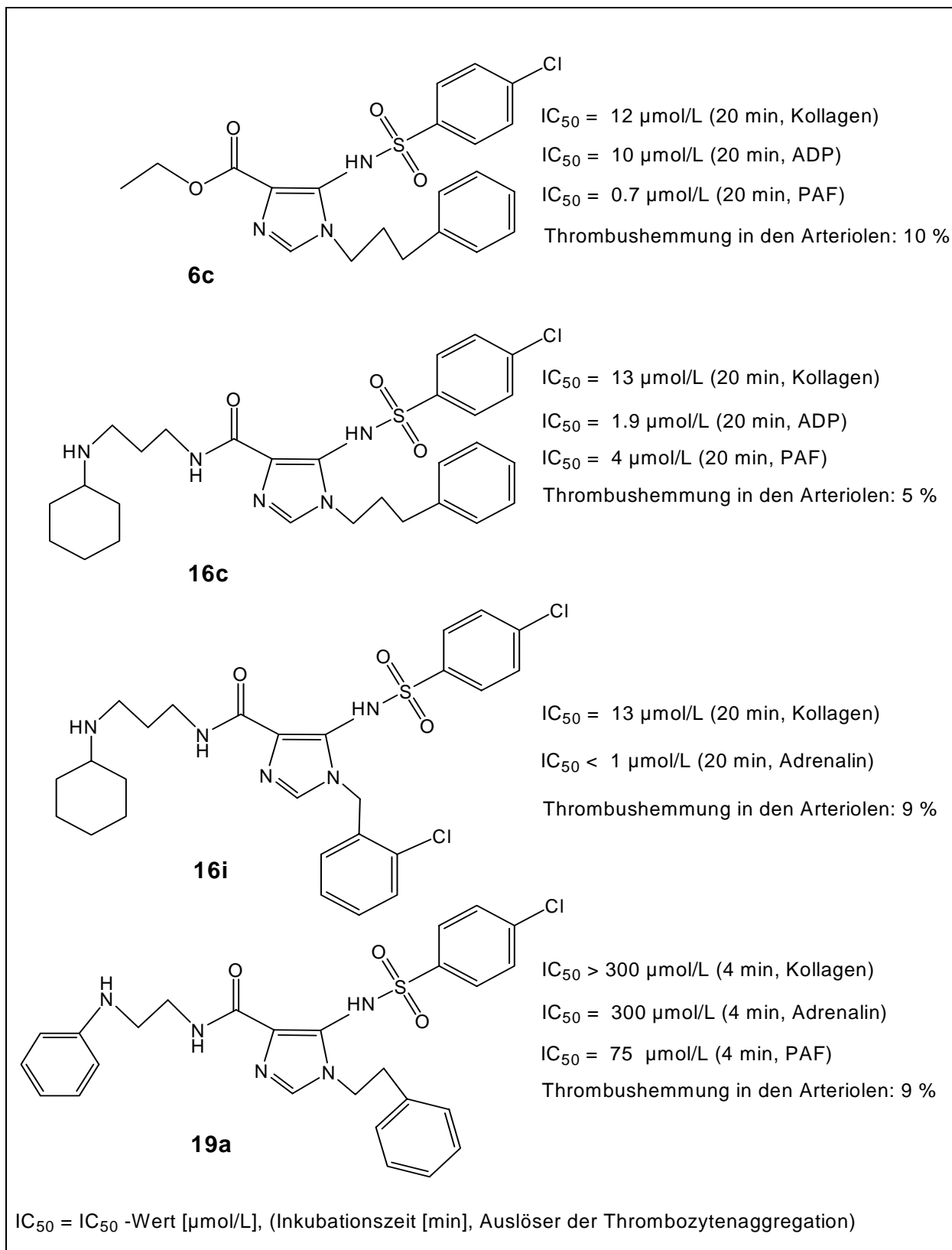


Abb. 44: Strukturformeln von **6c**, **16c**, **16i** und **19a** und ihre gerinnungsphysiologischen Daten

3.3.1 Aktivierung der löslichen Guanylatcylase (sGC)

In den Thrombozyten katalysiert sGC die Bildung von cGMP aus GTP. Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert über die Bindung an Häm als prosthetische Gruppe die lösliche Guanylatcylase. Mittlerweile sind auch direkte NO-unabhängige Aktivatoren, wie **YC-1**^[84] und **BAY 41-8543**^[147] bekannt. Der second messenger cGMP senkt über cGMP-abhängige Proteinkinasen die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in den Plättchen. Dies führt zu einer Hemmung die Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

Die in Abb. 44 auf Seite 150 dargestellten Substanzen wurden im Testverfahren nach *Hoenicke et al.*^[146] von der Firma Bayer auf eine mögliche Aktivierung der löslichen Guanylatcylase untersucht. Dabei handelt es sich um ein Radioimmunoassay. In dem Assay katalysiert hämhaltige sGC die Bildung von α [³²P]cGMP aus α [³²P]GTP. Der Gehalt an α [³²P]cGMP wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt. Alle Messungen werden doppelt bestimmt und mindestens dreimal wiederholt. Eine ausführliche Beschreibung zum Versuchsaufbau und zur Methodik des Testverfahrens ist bei *Hoenicke et al.*^[146] und *Stasch et al.* ^[147,148] zu finden.

Da **YC-1**^[84] zusammen mit NO die lösliche Guanylatcylase überadditiv aktiviert, wurden die ausgewählten Substanzen auch in Kombination mit dem NO-Donor **DEA/NO** (N,N-Diethylaminodiazemat-2-oxid, siehe Abb. 45), der spontan NO freisetzt, getestet.

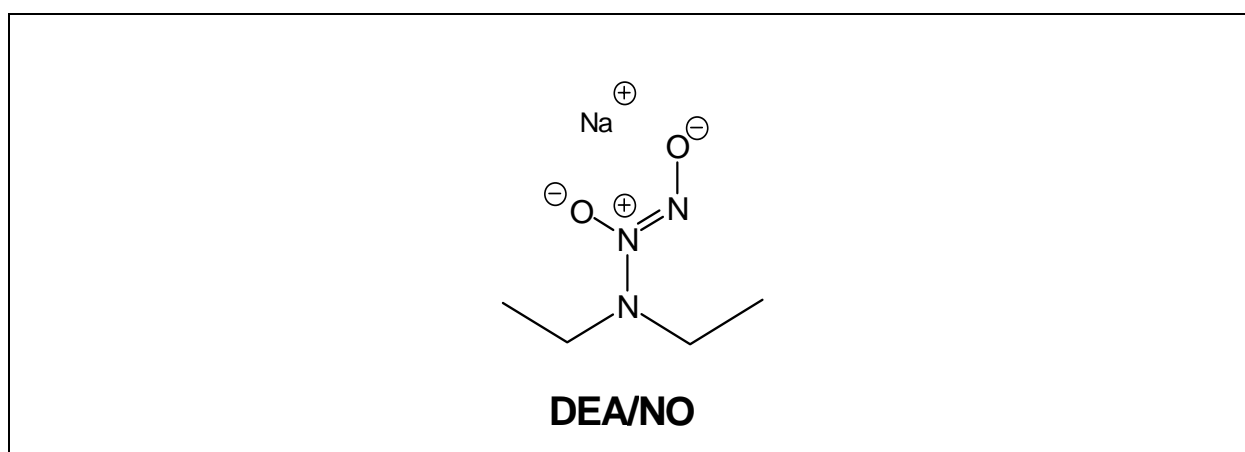


Abb. 45: Strukturformel von DEA/NO

Alle untersuchten Substanzen zeigen in einer Konzentration von 100 μ mol/L keine Steigerung der Basalaktivität. Auch in Kombination von 100 μ mol/L Testsubstanz und 0.1 μ mol/L **DEA/NO** wird die Aktivität nicht über den Anfangswert erhöht. Unter den gleichen Testbedingungen führt

eine 100 $\mu\text{mol/L}$ **YC-1**-Lösung^[146] zu einer ca. 90-fachen Steigerung der sGC-Aktivität. Das Gemisch aus 100 $\mu\text{mol/L}$ **YC-1** und 0.1 $\mu\text{mol/L}$ **DEA/NO** steigert die Aktivität um das 550-fache im Vergleich zum Basalwert.

Keine der ausgewählten Verbindungen steigert in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ die Basalaktivität der sGC. Die festgestellten antiaggregatorischen und antithrombotischen Eigenschaften der untersuchten Testsubstanzen sind nicht auf eine Stimulation der löslichen Guanylatcyclyase zurückzuführen. Auch in Kombination mit 0.1 $\mu\text{mol/L}$ **DEA/NO** wird keine erhöhte Katalyseaktivität festgestellt.

3.3.2 Hemmung der Phosphodiesterase 5 (PDE-5)

Phosphodiesterasen katalysieren den Abbau von zyklischen Nukleotiden zu den entsprechenden Monophosphaten. Zur Zeit sind die PDE-Familien 1-11 (vgl. *Conti*^[149] und *Corbin*^[150]) bekannt, die sich in Funktion, Gewebeverteilung und Substrataffinität zu cGMP bzw. cAMP unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die PDE-5 von besonderer Bedeutung, weil in den Thrombozyten die Phosphodiesterase 5 vermehrt nachzuweisen ist (vgl. *Haslam et al.*^[151]). Eine Hemmung der PDE-5 kann in den Thrombozyten über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen (siehe *Corbin*^[150]).

Die PDE-5 ist ein Homodimer mit einer katalytischen Domäne, einem Zn^{2+} -Bindungsmotiv und einer allosterischen Bindungsstelle für cGMP am carboxyterminalen Ende jeder Untereinheit (vgl. *Gibson*^[152]). Das aminoterminalen Ende beinhaltet eine Phosphorylierungsstelle (Ser⁹²), die als Substrat für die Proteinkinasen A und G dient (siehe *Corbin*^[150]). Eine Phosphorylierung führt zur Erhöhung der Enzymaktivität.

Die in in Abb. 44 auf Seite 150 dargestellten Substanzen wurden von der Firma Bayer in einem Scintillation Proximity Assay (SPA)-System von der Firma Amersham Biosciences auf eine mögliche Hemmung der PDE-5 untersucht.

3.3.3 Hemmung der Cyclooxygenase 1 (COX-1)

Die Cyclooxygenase (COX), auch Prostaglandin-H-Synthase (PGH) genannt, ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin- und Thromboxan-Biosynthese. COX kommt in fast allen humanen Zellen vor. Welche Produkte dabei bevorzugt bzw. ausschließlich gebildet werden, hängt von der weiteren Enzymausstattung der entsprechenden Zelle ab (siehe *Maclouf*^[166]).

Abbildung 47 zeigt schematisch einen Ausschnitt der Arachidonsäurekaskade (vgl. *Steinhilber*^[156] und *Schwandt*^[161]).

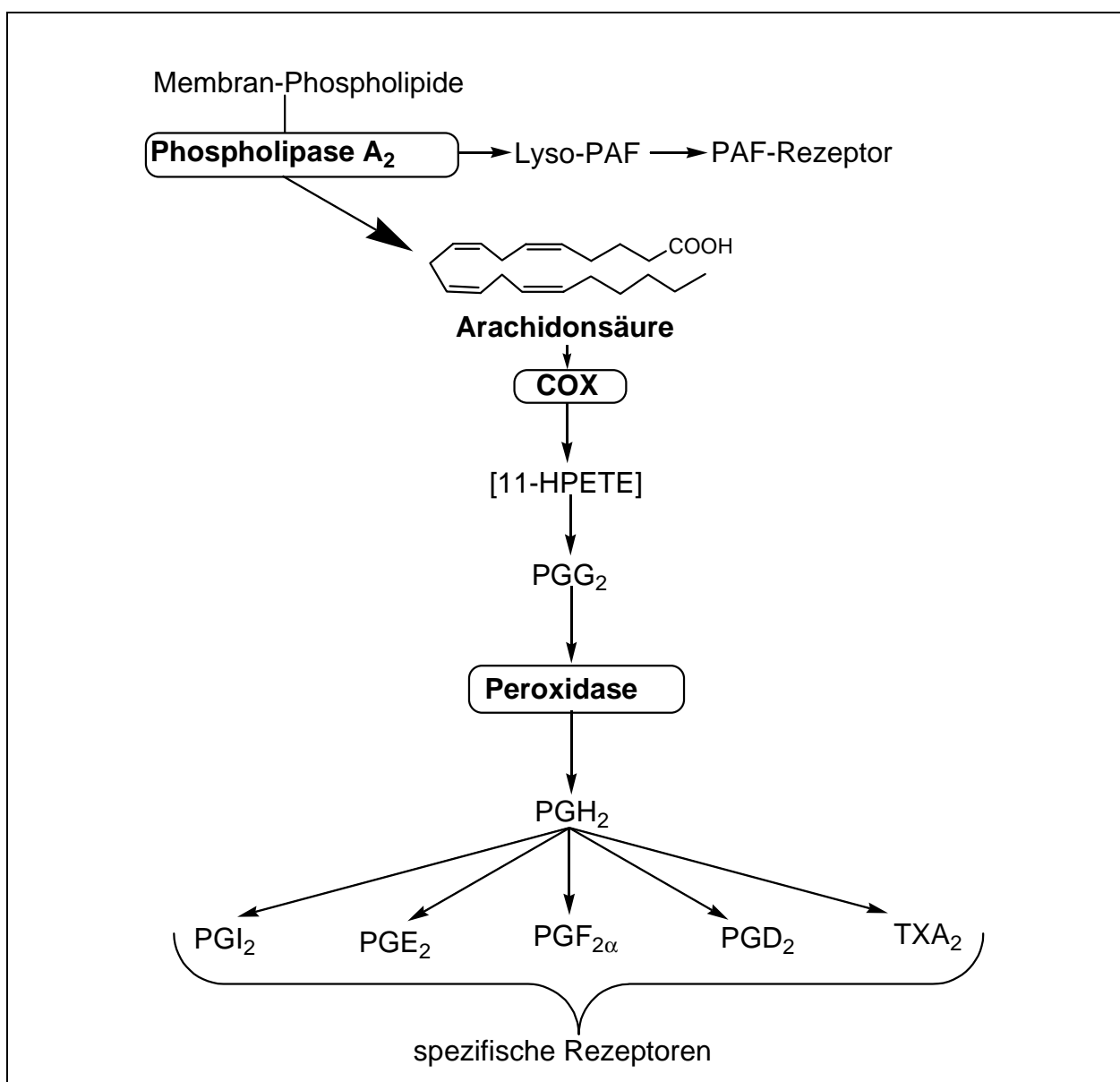


Abb. 47: Schematische Darstellung der Arachidonsäurekaskade nach *Schwandt*^[161]

In der Cyclooxygenase-Reaktion entsteht aus der Arachidonsäure (AA; 5, 8, 11, 14(all-Z)-Eicosatetraensäure) über die instabile 11-Hydroxyeicosatetraensäure (11-HPETE) zunächst das zyklische Prostaglandinendoperoxid PGG₂. In der nachfolgenden Peroxidase-Reaktion wird PGG₂ zur entsprechenden alkoholischen Verbindung PGH₂ umgesetzt. Aus dieser hochreaktiven Substanz bilden sich in zahlreichen Geweben die Prostaglandine, wie z.B. PGE₂ sowie PGF_{2α}, in den Thrombozyten **Thromboxan A₂ (TXA₂)** und im Gefäßendothel Prostacyclin (PGI₂).

Prostaglandine sind an der Entstehung von Schmerz, Fieber und entzündlichen Reaktionen wesentlich beteiligt. Im Einzelnen wurden folgende Effekte nachgewiesen (vgl. *Maclouf*^[166]):

- PGE₂ steigert die renale Durchblutung, wirkt auf die Magenschleimhaut zytoprotektiv, uteruskontrahierend und durch das Erschlaffen der Gefäßmuskulatur blutdrucksenkend.
- PGF_{2α} ist ein Gegenspieler der PGE₂ im Bezug auf die Blutdrucksenkung, kontrahiert aber wie PGE₂ den Uterus.
- TXA₂ führt zur Plättchenaggregation und zur Vasokonstriktion.
- PGI₂, der natürliche Gegenspieler des TXA₂, führt zur Inhibition der Thrombozytenaggregation und zur Vasodilatation.

Um abzuklären, ob die dargestellten Verbindungen nicht nur antiaggregatorisch und antithrombotisch wirken, sondern auch analgetisch wie die Acetylsalicylsäure, wurden zwei strukturell unterschiedliche Verbindungen untersucht.

Abb. 48 auf Seite 156 zeigt die ausgewählten Substanzen **6c** und **16g**.

Die Verbindungen **6c** und **16g** zeigen ein ähnliches gerinnungsphysiologisches Profil. Sie unterscheiden sich jedoch in zwei Strukturelementen:

- Die Substanz **16g** besitzt in Position 1 des Imidazolgrundgerüsts eine 4-Chlorphenylmethylgruppe anstelle eines 3-Phenylpropylrestes.
- Die Substanz **6c** hat eine Carbonsäure-ethylesterpartialstruktur in Position 4 des Imidazolgrundkörpers anstatt einer (3-Cyclohexylamino-propyl)-carboxamidteilstruktur.

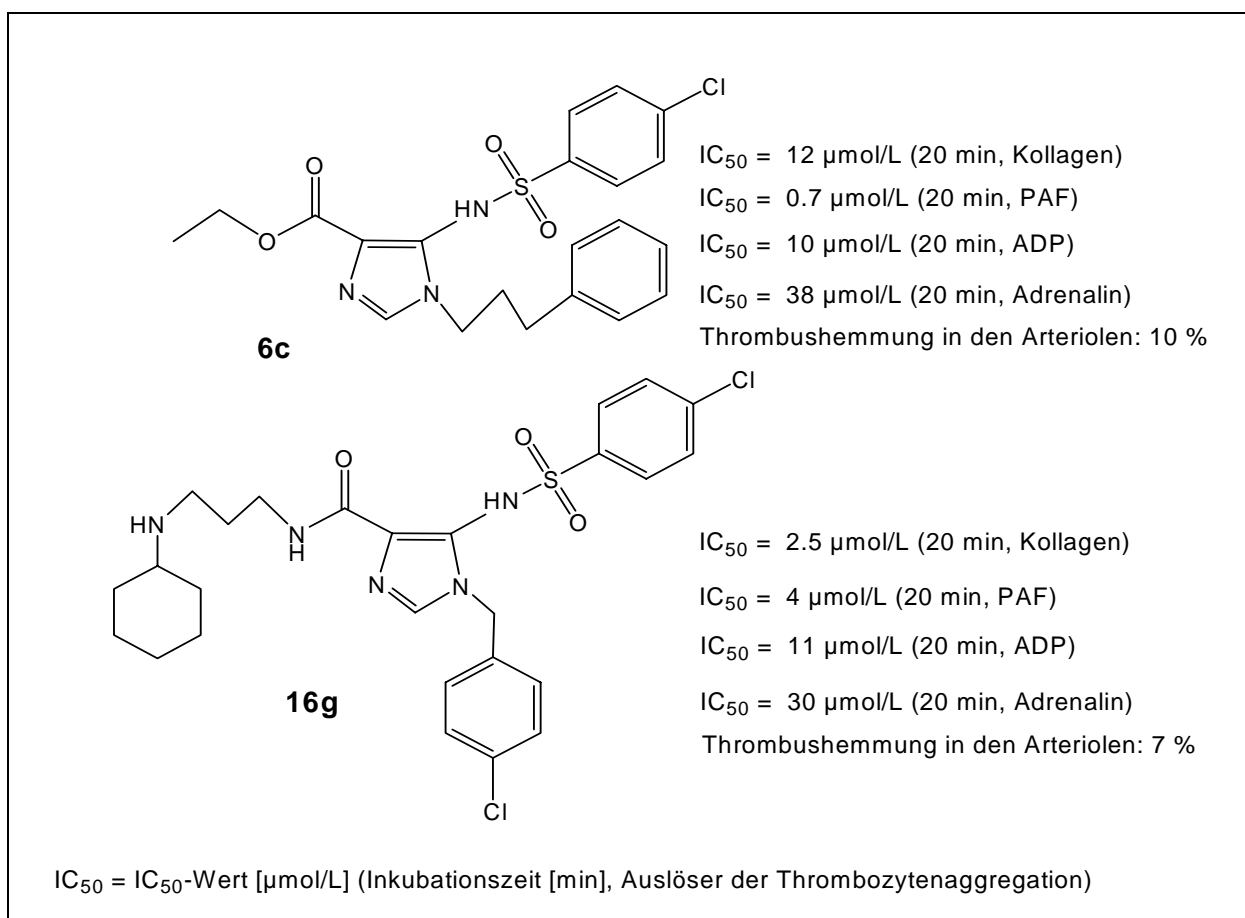


Abb. 48: Strukturformeln von **6c** und **16g** mit ihren gerinnungsphysiologischen Daten

Die Untersuchung der Verbindungen auf ihre mögliche Inhibition der COX-1 wurde mit der von *Riechwien*^[157] etablierten HPLC-Methode überprüft (siehe detaillierte Beschreibung im biochemischen-experimentellen Teil, Kapitel 5, Seite 225 ff).

Ähnlich wie im Born-Test wird zunächst humanes plättchenreiches Plasma (PRP) durch Zentrifugation aus Citrat-Blut gewonnen. Aus dem plättchenreichen Plasma (PRP) werden dann in

wenigen Arbeitsschritten die Thrombozyten isoliert (siehe ausführliche Beschreibung im biochemisch-experimentellen Teil, Kapitel 5.3.1, Seite 228 ff).

Als Meßgröße wird nicht das PGE₂, sondern 12-HHT, 12(S)-5, 8, 10 (Z, E, E)-Heptadecatriensäure, herangezogen. Es handelt sich hierbei um die einzige Verbindung des COX-Weges, die aufgrund eines konjugierten Diensystems bei höherer Wellenlänge ($\lambda = 232$ nm) detektiert werden kann. Es konnte daher eine HPLC-Methode mit UV-Detektion angewendet werden.

In Thrombozyten wird 12-HHT aus PGH₂ in einer durch Thromboxansynthase katalysierten Reaktion gebildet (vgl. *Richwien*^[157]). Neben 12-HHT entsteht das instabile ($T_{1/2} = 30$ s, vgl. *Dogne*^[158]) Epoxid Thromboxan **A₂** (**TXA₂**), das zu Thromboxan **B₂** (**TXB₂**) hydrolysiert wird, annähernd im Verhältnis 1:1 (vgl. *Richwien*^[157]).

Die Enzymreaktion wird mit einer Calciumchlorid-Lösung durch Zugabe des Calciumkanalöffners Calciumionophor A23187 gestartet. Gestoppt wird sie nach 3 Minuten Inkubationszeit mit dem Inhibitor NDGA (Nordihydroguajaretsäure, siehe *Schwandt*^[161]).

Für die quantitative Bestimmung von 12-HHT in der HPLC-Methode wird der interne Standard hinzugegeben. Dabei handelt es sich um das Prostaglandin **B₂** (**PGB₂**) (Endkonzentration: NDGA 10 µmol/L; PGB₂ 1.8 µmol/L). Danach werden die Reaktionsgefäße zwei Stunden bei -20 °C gelagert. Dabei soll sichergestellt werden, daß die Arachidonsäure nicht über andere Enzyme in Nebenreaktionen abgebaut wird. Die Aufarbeitung der Probe erfolgt nach der von *Richwien*^[157] beschriebenen Methode.

Zur Abtrennung der Zellen werden die Inkubationsgemische drei Minuten bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände werden mit 10 mL Aqua bidest. verdünnt und über eine RP₁₈-Extraktionskartusche aufgereinigt, welche zuvor mit 10 mL Methanol sowie 5 mL Aqua bidest. gereinigt wurde.

Nach zweimaligem Waschen der RP₁₈-Extraktionskartusche mit 5 mL Aqua bidest. werden die Eicosanoide mit 3 mL Methanol eluiert. Das Eluat wird dann mit 3 mL Aqua bidest. verdünnt. Anschließend wird der Gehalt an 12-HHT HPLC-analytisch bestimmt.

Zur HPLC-Bestimmung werden jeweils 2 mL Probelösung auf die RP₁₈-HPLC-Säule gegeben (siehe ausführliche Beschreibung im biochemischen-experimentellen Teil, Kapitel 5.3.2, Seite 229 ff). Mit Indometacin als Referenzsubstanz wird das Verfahren mit der Methode von *Richwien*^[157] kalibriert. Es wird ein IC₅₀-Wert von 4.9 nmol/L (3.0 nmol/L - 7.9 nmol/L) erhalten. Der Literaturwert liegt bei einem IC₅₀-Wert von 4.8 ± 1.1 nmol/L (vgl. *Riendeau*^[162]).

Wichtig für die Auswahl des internen Standards sind folgende Kriterien (vgl. *Rücker*^[163]):

- Die Retentionszeit muß so liegen, daß gleichzeitig keine andere Substanz eluiert wird.
- Der Peak sollte möglichst nahe bei dem Peak der zu untersuchenden Substanz liegen.
- Er sollte der zu untersuchenden Substanz chemisch ähnlich sein.
- Seine Anwesenheit in der ursprünglichen Analyse sollte mit Sicherheit ausgeschlossen werden können.
- Er darf auch bei höheren Temperaturen keine Reaktion mit einer anderen Komponente des Analysengemisches eingehen.

Als interner Standard wurde PGB₂ wegen folgender Überlegungen ausgesucht:

- PGB₂ ist wie 12-HHT ein Metabolit der AA-Kaskade, wird aber nicht in den Thrombozyten gebildet.
- Der Substanzpeak unterscheidet sich deutlich von den anderen Peaks (siehe Abb. 49 auf Seite 159).
- Reaktionen mit den anderen Komponenten des Analysengemisches waren nicht zu erwarten.
- Der PGB₂-Peak liegt nahe dem 12-HHT-Peak.

Als Nachteil des beschriebenen Testsystems ist anzusehen, daß eine verminderte Bildung der 12-HHT nicht unbedingt eine Hemmung der COX-1 bedeuten muß. 12-HHT ist nicht unmittelbar das Produkt der COX-Reaktion, sondern wird erst im nachfolgenden Schritt aus PGH₂ gebildet. Bei den ermittelten Hemmstoffen kann es sich also genauso gut um Inhibitoren der Thromboxansynthase handeln.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, bestände darin, anstatt 12-HHT PGE₂ quantitativ über eine HPLC-Methode mit einer UV-Detektion bei der Wellenlänge von $\lambda = 199$ nm zu bestimmen. Eine deutliche Trennung der einzelnen Komponenten im Analysengemisch wurde

nicht erhalten. Die Auflösungswert R_s (vgl. *Skoog*^[164]) war kleiner als 1.5. Deshalb wurde dieser Weg nicht weiterverfolgt.

Die Enzymhemmung wird anhand des gebildeten Mediators 12-HHT bestimmt. Die relativen Konzentrationen entsprechen den Peakflächen 12-HHT zu der Peakfläche des internen Standards PGB_2 mit bekannter Konzentration. Abbildung 49 unten zeigt exemplarisch ein RP_{18} -HPLC-Chromatogramm.

Der IC_{50} -Wert wird rechnerisch mit Hilfe der logarithmischen Regression ermittelt. Dabei wird die Konzentration der Substanz logarithmisch gegen die jeweilige Hemmung aufgetragen, wobei die Hemmung linear in % dargestellt wird. Der IC_{50} -Wert wird aus der resultierenden Geraden ermittelt, indem an dem Schnittpunkt der resultierenden Gerade mit dem 50 %-Wert das Lot auf die Konzentrationsachse gefällt wird. Der so erhaltene Wert gibt den IC_{50} -Wert an (siehe ausführliche Beschreibung im biochemischen-experimentellen Teil, Kapitel 5.3.3, Seite 230 ff),

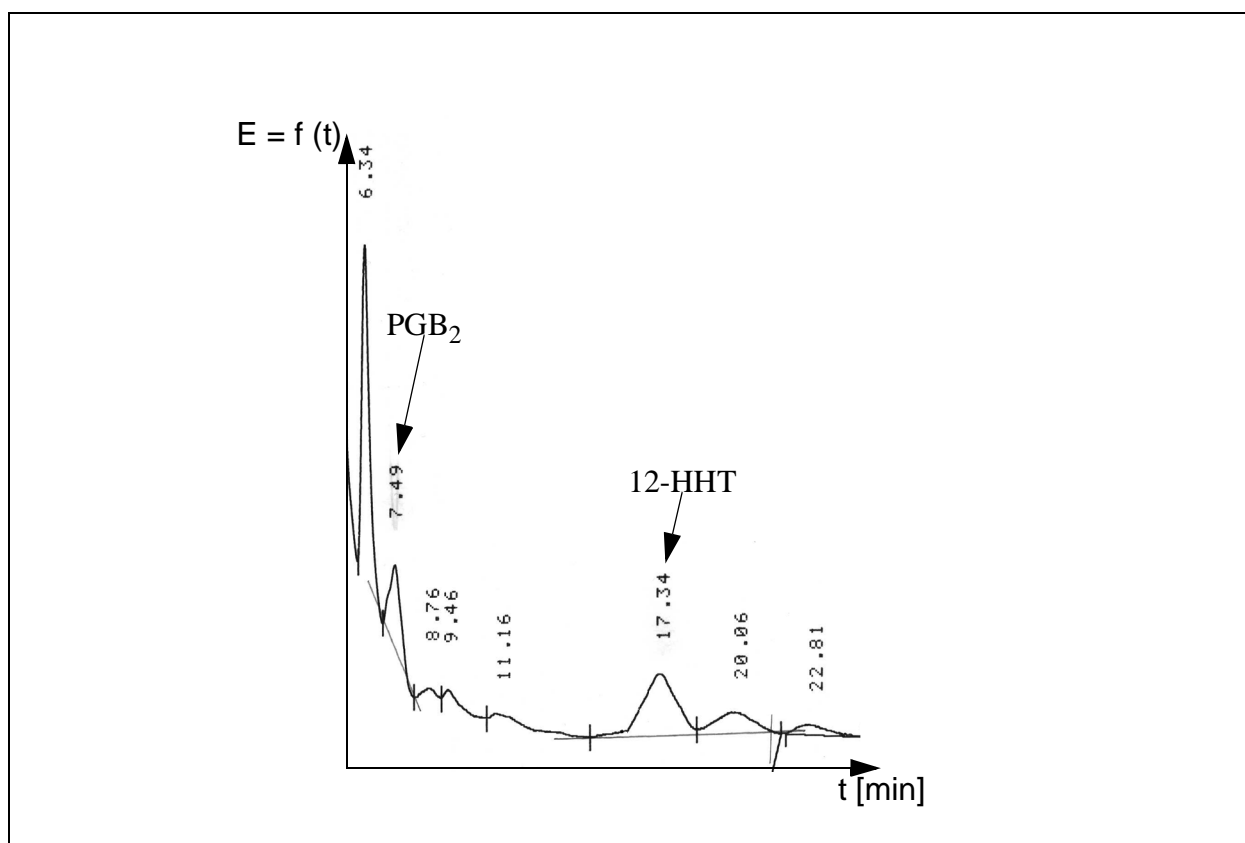


Abb. 49: RP_{18} -HPLC-Chromatogramm der von humanen Thrombozyten nach Stimulierung mit Calciumionophor produzierten Arachidonsäuremetaboliten:

Fließmittel: MeOH/ H_2O /AcOH [70:30:0.1 (V/V)] mit NH_3 -Lösung ($c = 3$ mol/L) auf pH = 5.5 eingestellt
Flußrate: 0.7 mL/min; Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 232$ nm

Für die Verbindung **6c** wird ein IC_{50} -Wert von $0.42 \mu\text{mol/L}$ und für die Verbindung **16g** ein IC_{50} -Wert von $0.94 \mu\text{mol/L}$ gefunden. Im Vergleich zu Indometacin, einem COX-1-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 4.9 nmol/L , ist die Wirkung um zwei 10er-Potenzen schwächer.

Trotzdem ist der Hemmeffekt der beiden Substanzen **6c** und **16g** auf die COX-1 beachtlich.

Daraus läßt sich Folgendes ableiten:

- Die Verbindungen **6c** und **16g** hemmen mit einem IC_{50} -Wert von $0.42 \mu\text{mol/L}$ (**6c**) und mit einem IC_{50} -Wert von $0.94 \mu\text{mol/L}$ (**16g**) die COX-1 *in vitro* beachtlich. Somit können sie ähnlich analgetisch wirken wie Flurbiprofen (IC_{50} -Wert = $0.7 \mu\text{mol/L}$, COX-1, siehe *Ulbrich*^[167] und *Saed*^[168]).
- Die Verbindungen **6c** und **16g** wirken, ähnlich wie die Acetylsalicylsäure, analgetisch und anti-thrombotisch.