

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Inhibitoren der Phosphodiesterase **5** (PDE-5), wie z.B. **Sildenafil** (Viagra®), bzw. direkte Aktivatoren der löslichen Guanylatcyclase (sGC), wie z.B. **YC-1**, herzustellen. Das Grundgerüst der neuen Substanzen sollte ein Imidazolring sein. Die neuen Verbindungen sollten sich von dem selektiven cGMP-Phosphodiesteraseinhibitor **A**, einem von der Arbeitsgruppe um *Booth*^[42] entwickelten Imidazolderivat, ableiten. In einem weiteren Schritt sollten Strukturelemente wie die 4-Chlorphenylsulfonylamino-Gruppe und eine Amidfunktion in Anlehnung an den sGC-Aktivator **B**, ein von der Arbeitsgruppe um *Schindler*^[43] patentiertes 2-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-benzamidderivat, am Imidazolring eingeführt werden. Anhand der beiden Verbindungen **A** und **B** sollten Leitstrukturen entwickelt werden, bei denen folgende Strukturelemente n , R^1 , R^2 und R^3 folgendermaßen variiert werden sollten:

- Zuerst sollte der Einfluß des lipophilen Elementes R^2 auf pharmakologische Effekte untersucht werden. Dies führte zu den Verbindungen **5a**, **5b**, **6a-6j**.
- Danach sollte die Lipophilie an Position 1 des Imidazoles verändert werden. Der Substituent R^1 , ein Halogen, erhielt die Position 2, 3 oder 4 an der Phenylmethylgruppe.
- In einem weiteren Schritt wurde die Methylengruppe des Phenylmethylrestes um 1 bis 3 CH_2 -Gruppen verlängert.
- Zum Schluß sollten neutrale und basische Aminkomponenten an R^3 als Carboxamide eingeführt werden.

Die dargestellten Substanzen sollten auf gerinnungsphysiologische Aktivitäten überprüft und gegebenenfalls Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden.

Abb. 52 auf Seite 234 faßt das Arbeitsschema zur Entwicklung der neuen Verbindungen zusammen.

Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit hergestellten Strukturen war die Synthese der unterschiedlichen 5-Amino-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester **4a-l**. In einer Sandmeyer-Reaktion wurden die Aminoreste der Edukte **4i** und **4k** in Chlorreste der Produkte **5a** und **5b** umge-

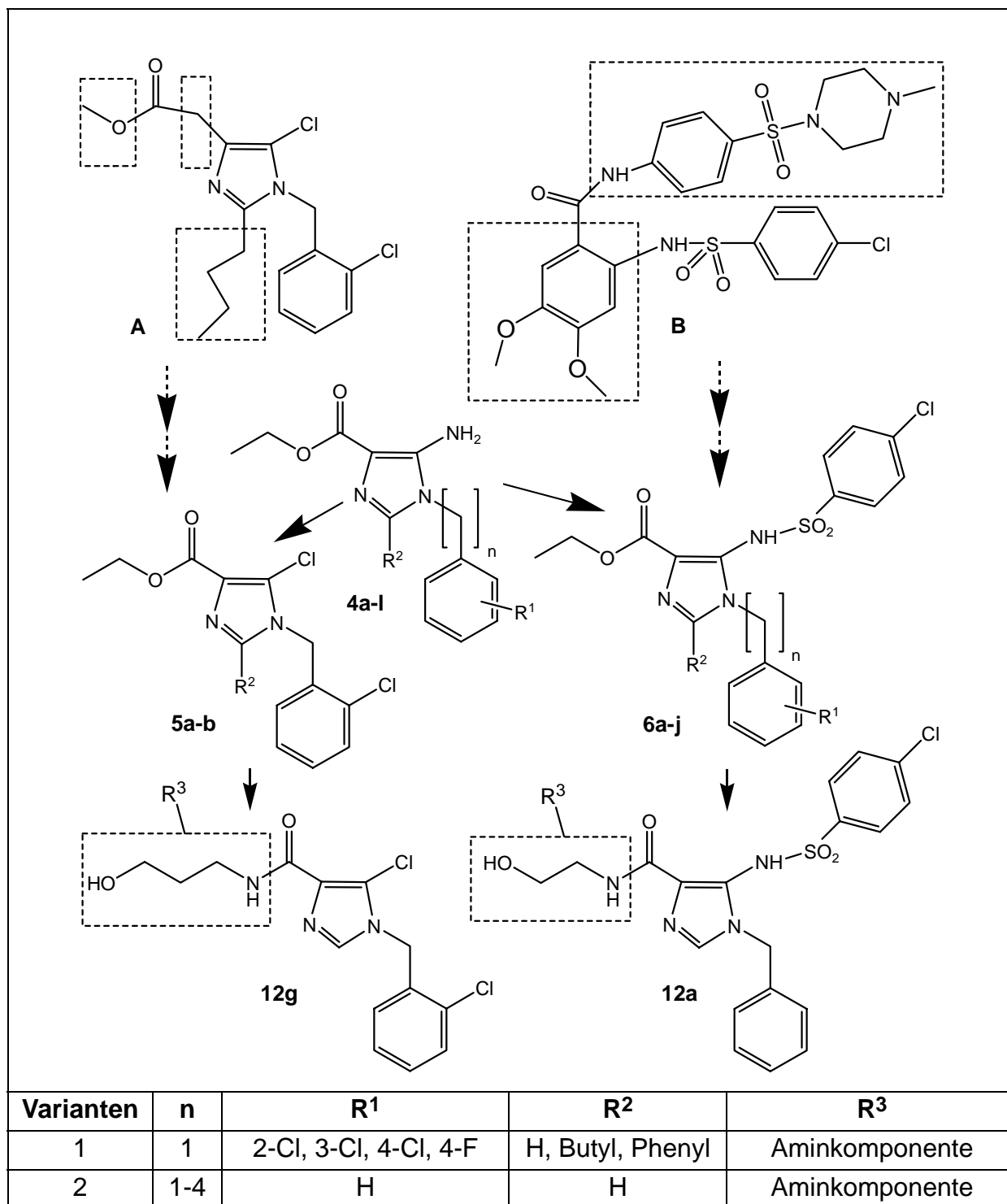


Abb. 52: Strukturverwandtschaft der 1-H-Imidazole **5**, **6** und **12** mit den bekannten Verbindungen **A** und **B**

wandelt. Im nächsten Schritt wurden sie mit verschiedenen basischen und neutralen Aminen zu den entsprechenden Carbonsäureamiden umgesetzt.

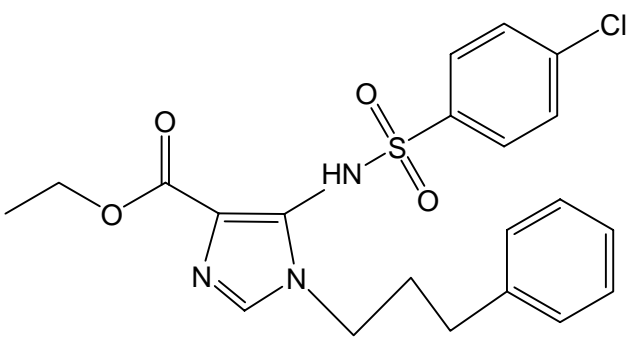
Der zweite Weg war die Chlorbenzolsulfonierung der Edukte **4a-l** zu den Verbindungstypen **6-7**. Anschließend wurden die entsprechenden Carboxamide (Substanzklassen **12-20**) durch die Reaktion der Substanzklasse **6** mit neutralen und basischen Aminen hergestellt.

Zuerst wurden die 1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester der Verbindungsklassen **4, 5, 6** und **7** ebenso wie die Dinatrium-5-(4-chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carboxylate der Substanzklasse **8** im Born-Test, bei dem die Thrombozytenaggregation mit Kollagen ausgelöst wurde, untersucht. Dabei wurde bei den Verbindungstypen **4, 5, 7** und **8** keine antiaggregatorische Wirkung festgestellt.

Die 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester des Typs **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 mmol/L bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten (vgl. Tabelle 63).

Tab. 63: IC_{50} -Werte der aktivsten Verbindung **6c** der Substanzklassen **4-8** bei kollageninduzierter Thrombozytenaggregation im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

 <p style="text-align: center;">6c</p>		
Nr.	IC_{50} [μ mol/L]	IC_{50} [μ 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 antiag-

gregatorisch wirkenden Verbindungen ($150 \mu\text{mol/L} < \text{IC}_{50}\text{-Wert} < 300 \mu\text{mol/L}$). Die Verbindungen **6e**, **6g** und **6j** werden als wirkungslose Substanzen eingestuft ($\text{IC}_{50}\text{-Wert} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Anhand der Substanzklassen **4-8** konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazol-4-carbonsäure-ethylester für die Wirkung im Born-Test 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 $\text{IC}_{50}\text{-Wert}$ von $260 \mu\text{mol/L}$ sowie die Substanz **15e** mit einem $\text{IC}_{50}\text{-Wert}$ von $250 \mu\text{mol/L}$ wirken schwach antiaggregatorisch.

Tabelle 64 auf Seite 237 faßt die besten antiaggregatorisch wirkenden Verbindungen der Substanzklassen **12-20** zusammen.

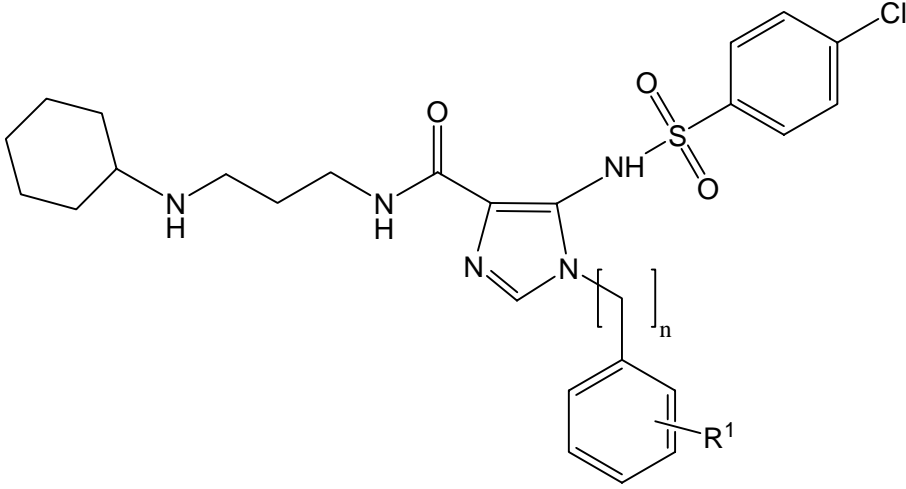
Die aktivsten Verbindungen im Born-Test sind in der Substanzklasse **16** zu finden. Dennoch ist sie differenziert zu betrachten (vgl. detaillierte Ausführungen im Kapitel 3.1.2.5.5 auf Seite 109 ff):

Hervorzuheben sind die Cyclohexylaminoderivate **16c**, **16g** und **16i**, die mit einem $\text{IC}_{50}\text{-Wert}$ von $2.5 \mu\text{mol/L}$ (**16g**) und einem $\text{IC}_{50}\text{-Wert}$ 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 ($10 \mu\text{mol/L} < \text{IC}_{50}\text{-Wert} < 150 \mu\text{mol/L}$). Eine schwache Hemmung

Tab. 64: IC₅₀-Werte der besten 1H-Imidazol-4-carboxamide bei kollageninduzierter 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

der Plättchenaggregation ($150 \mu\text{mol/L} < \text{IC}_{50}\text{-Wert} < 300 \mu\text{mol/L}$) bewirken die Substanzen **17e**, **17f**, **18e**, **18h** und **19e**.

Anhand der Substanzklassen **12-20** konnten folgende Strukturelemente der 1H-Imidazol-4-carboxamide für die Wirkung im Born-Test 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 einen 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 vom 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 zeigt mit einem IC_{50} -Wert von $4 \mu\text{mol/L}$ auch einen PAF-antagonistischen Effekt.

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 weitgehend auf Untersuchungen von Verbindungen im Laser-Thrombose-Modell verzichtet, die schon im Born-Test wirkungslos waren.

Es wurde erwartet, daß die antiaggregatorisch aktiven Verbindungen im Born-Test ihre inhibitorische Wirkung im Laser-Thrombose-Modell bestätigen.

Die im Laser-Thrombose-Modell untersuchten 1H-Imidazole zeigen geringe bis keine antithrombotischen Effekte. Bei der Hemmung der Thrombusbildungen in den Venolen liegt die antithrombotische Wirkung bei $\leq 5 \%$ und in den Arteriolen bei $\leq 10 \%$ bei den untersuchten Verbindungen. 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 auf die geringere Blutfließgeschwindigkeit in den Venolen und die damit erleichterte Thrombusbildung zurückzuführen (vgl. ausführliche Diskussion im Kapitel 3.2.1 auf Seite 129 ff).

Die aktivste Verbindung der Substanzklassen **6-8** im Laser-Thrombose-Modell wird in Tabelle 65 gezeigt.

Tab. 65: Zusammenfassende Darstellung der aktivsten Verbindung der Substanzklasse **6-8** im Laser-Thrombose-Modell

Nr.	Venolen		Arteriolen	
	% ± S _x	α	% ± S _x	α
6c	5 ± 1	0.02	10 ± 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 µmol/L gefunden.

Die anderen Vertreter der Substanzklasse **6-8** besitzen im Vergleich zu der Substanz **6c** 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 Verbindungsklassen **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 Substanzklassen **12-19** im Laser-Thrombose-Modell faßt Tabelle 66 auf Seite 241 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 IC₅₀-Werte (vgl. Tabelle 49 auf Seite 122). Mit einem IC₅₀-Wert von ca. 13 µmol/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 (IC₅₀ < 1 µmol/L, vgl. Tabelle 49 auf Seite 122).

Die Substanz **16n** wirkt *in vitro* bei der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation mit einem IC₅₀-Wert von 43 µmol/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- und ADP-Antagonist wirkt (vgl. Kapitel 3.1.2.5.5 auf Seite 109 ff und Kapitel 3.1.2.6 auf Seite 120 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. 66: Zusammenfassende Darstellung der aktivsten Verbindungen der Substanzklasse **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 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 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 für die Wirkung im Laser-Thrombose-Modell 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 CH₂-Einheiten zur Amidfunktion
- Entweder ein Chlorsubstituenten in Ortho- bzw. Para-Stellung der Phenylmethylgruppe oder ein 2-Phenylethylrest an Position 1 des Imidazolringes als weiteres lipophiles Element

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten wegen der *in vitro* und *in vivo* beobachteten inhibitorischen Effekte auf die Thrombozytenaggregation bzw. Thrombusbildung Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchgeführt werden. Für die Untersuchungen wurden die Verbindungen **6c**, **16c**, **16i** und **19a** mit antiaggregatorischer und antithrombotischer Aktivität ausgewählt.

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

- antiaggregatorische Wirkung: IC₅₀-Wert < 100 µmol/L im Born-Test
- antithrombotische Wirkung: Hemmung der Thrombusbildung ≥ 5 %

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.

Die festgestellten antiaggregatorischen und antithrombotischen Eigenschaften der untersuchten Testsubstanzen **6c**, **16c**, **16i** und **19a** sind nicht auf eine Stimulation der löslichen Guanylatcyclase zurückzuführen (vgl. ausführliche Darstellungen im Kapitel 3.3.1 auf Seite 151 ff). Auch sind die antiaggregatorischen und antithrombotischen Aktivitäten nicht durch die Inhibition der PDE-5 vermittelt (siehe detaillierte Ausführungen im Kapitel 3.3.2 auf Seite 152 f).

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

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

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

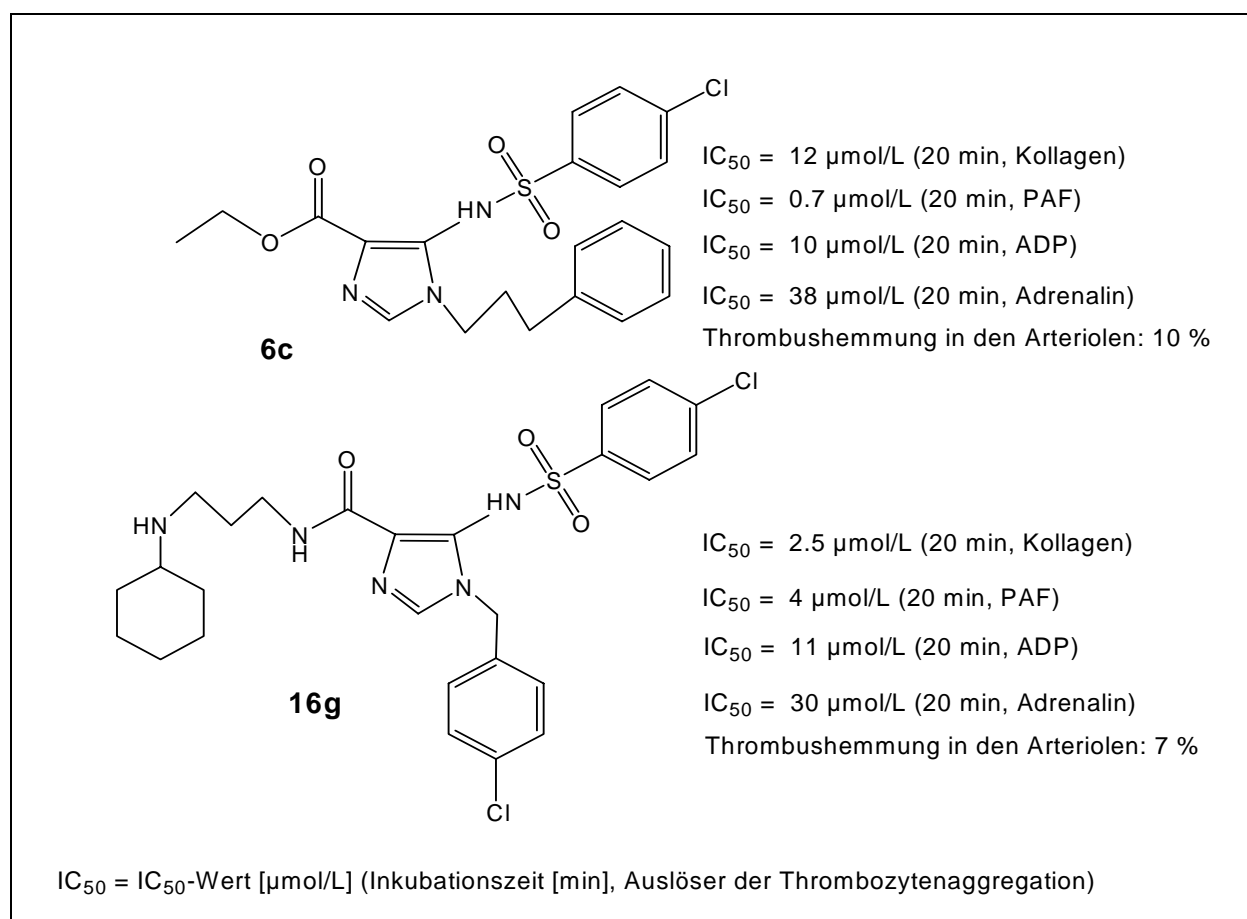


Abb. 53: Strukturformeln von **6c** und **16g** mit ihren gerinnungsphysiologischen Daten

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

Anhand der Testergebnisse ließ sich Folgendes ableiten (vgl. ausführliche Diskussion im Kapitel 3.3.3 auf Seite 154 ff):

- 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 Acetylsalicylsäure, analgetisch und anti-thrombotisch.