

3 Pharmakologischer Teil

3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation *in vitro*

3.1.1 Allgemeines

Der Einfluß der dargestellten Substanzen auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* wurde im Born-Test^[69,70] bestimmt (siehe Abb. 33). Humanes Plättchenreiches Plasma (PRP) wird nach Zentrifugation aus Citratblut gewonnen und mit definierten Konzentrationen der Testsubstanz wird 4 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Aggregationsauslöser Kollagen wird die Änderung der Transmission langwelligigen Lichtes im Photometer registriert. Die Zunahme der Transmission verhält sich dabei proportional zur Zunahme der Thrombozytenaggregation und ist damit indirekt proportional zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. In einem Diagramm wird die Zeit gegen die Transmission aufgetragen. Es ergeben sich charakteristische, S-förmige Kurven mit der maximalen Höhe h (siehe Abb. 33). Für jede Konzentration der getesteten Substanz wird h bestimmt und durch Vergleich mit einer Referenzprobe die prozentuale Hemmung der Thrombozytenaggregation ermittelt. Als Referenz und zur Funktionsprüfung der Plättchen dient eine 1.6

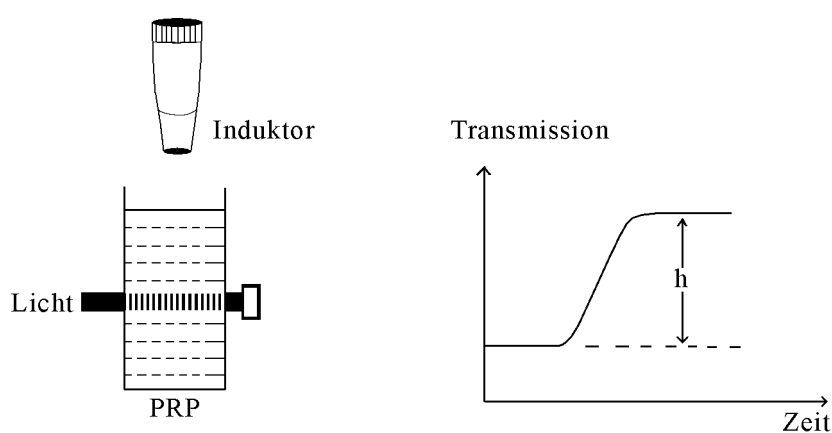


Abb. 33: Born-Test

mmolare Acetylsalicylsäurelösung (Aspisol®) in HEPES-Puffer¹. Sie besitzt unter den angegebenen Testbedingungen in einer Konzentration von 175 µmol/L eine 50 %ige Hemmung.

Um die Aktivitäten der Substanzen miteinander vergleichen zu können, wird der IC₅₀-Wert graphisch ermittelt. Dabei wird die Konzentration logarithmisch gegen die prozentuale Hemmung in einem Diagramm aufgetragen. Aus der resultierenden Kurve kann die Konzentration an der 50%-Marke abgelesen werden. Der IC₅₀-Wert einer Testsubstanz entspricht der Konzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt.

Während der Messung wurde die Probe gleichmäßig durch einen Magnetrührer bewegt, um die Sedimentation von Thrombozyten und -aggregaten zu vermeiden. Die Lösung der Testsubstanzen erfolgte überwiegend in DMSO/PRP, selten in DMSO/HEPES-Puffer. Um die eigene Hemmwirkung des DMSO auf die Thrombozytenaggregation auszuschließen, wurde der Anteil unter 0.3 % gewählt. In diesem Testsystem führt eine 1.25 %ige DMSO-Lösung zu einer Hemmung der Aggregation um 40 %^[71].

Einige Substanzen fielen aufgrund ihrer hohen Lipophilie in dem Lösungsmittelgemisch als feiner Niederschlag aus. Der Anteil an DMSO konnte nicht erhöht werden (s.o.). Andere Lösungsvermittler z.B. PEG² 300, PEG 400 und Polysorbat 80, die von Gonska^[72] untersucht wurden, zeigten entweder eigene Hemmeffekte oder verbesserten die Löslichkeitseigenschaften der Substanzen nicht. Um den Substanzen dennoch die Chance zu geben, an die Thrombozytenmembran zu gelangen, wurde die Inkubationszeit auf 20 min verlängert. Die IC₅₀-Werte bei 4 und 20 min werden dann vergleichend angegeben.

Angaben zu der Versuchsdurchführung, Auswertung und den verwendeten Geräten sind bei Ernst^[73], Claus^[74] und Rehse et al.^[75] zu finden.

Verbindungen mit einem Ergebnis IC₅₀ > 300 µmol/L werden als wirkungslos betrachtet.

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

2. Polyethylenglycol

3.1.2 Purin-2,6-diamine mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette

3.1.2.1 N⁶-Alkylaminoalkylpurin-2,6-diamine

In Tabelle 26 werden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der N⁶-Alkylaminoalkylpurin-2,6-diamine angegeben. Diese Substanzen zeigen geringe bis keine anti-

Tab. 26: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Purin-2,6-diamine vom Typ **6** im Born-Test (n.t. nicht getestet; * fällt als feiner Niederschlag aus)

	Nr.	Pos.	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/L]	
						4 min	20 min
	6a	9	1	CH ₃	CH ₃	> 300	n.t.
	6b	9	1	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	> 300	n.t.
	6c	9	2	CH ₃	H	180	n.t.
	6d	9	2	CH ₃	CH ₃	> 300	n.t.
	6e	9	2	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	> 300	n.t.
	6f	7	2	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	210	n.t.
	6g	9	2	C ₆ H ₁₁	H	210*	11
	6h	7	2	C ₆ H ₁₁	H	> 300*	23

aggregatorischen Effekte. Tendenziell führen dabei die sekundären Amine **6c** und **6g** zu niedrigeren IC₅₀-Werten. Bei den Cyclohexyl-Derivaten **6g** und **6h** kam es überraschenderweise nach Verlängerung der Inkubationszeit zu einer zehnfachen Wirkungssteigerung auf einen IC₅₀-Wert um 20 μmol/L. Die beiden Substanzen wurden erst am Ende der Arbeit synthetisiert, als der Substituent Cyclohexylaminopropylamin in Parallelarbeiten vielversprechende Hemmeffekte auf die Thrombozytenaggregation zeigte. Dies konnte für den vorliegenden Heterocyclus bestätigt werden.

3.1.2.2 Purin-2,6-diamine mit basischem Heterocyclus in der N⁶-Alkylseitenkette

Die Purin-2,6-diamine vom Typ **7** (mit Pyrrolidin- oder Piperidin-Substituenten), deren IC₅₀-Werte in Tabelle 27 zusammengefaßt wurden, besitzen nur geringe aggregationshemmende Wirkungen. Das Pyrrolidin-Derivat **7b** (IC₅₀ = 180 μmol/L) ist aus dieser Gruppe die aktivste

Verbindung. Da sie anschließend mit diversen Benzolcarbonsäuren substituiert wurde (siehe Seite 66, Kapitel 3.1.7), wurde auch der IC_{50} -Wert nach 20minütiger Inkubationszeit ermittelt. Die Aktivität nach 4 min konnte dabei bestätigt werden. Die Substanz lag unter beiden Testbedingungen anscheinend vollständig gelöst vor.

Das 9-Benzyl-Derivat **7b** hemmt die Thrombozytenaggregation stärker als das entsprechende 7-Benzyl-Isomer **7c**. Vermutlich ist eine größere räumliche Entfernung des lipophilen Restes von der basischen Aminoalkyl-Seitenkette günstig.

Tab. 27: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Substanzen **7a-e** im Born-Test (n.t. nicht getestet)

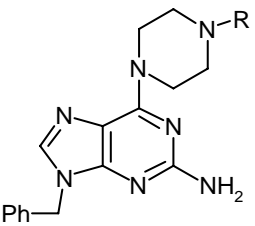
Nr.	Pos.	n	m	R	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	
					4 min	20 min
7a	9	1	1	H	> 300	n.t.
7b	9	2	1	H	180	150
7c	7	2	1	H	> 300	n.t.
7d	9	1	2	H	225	n.t.
7e	9	2	2	CH ₃	260	n.t.

Das Einführen eines weiteren Heteroatoms (O,N) in den gesättigten Heterocyclus (**8a-g**) führt zu keiner Wirkungssteigerung. Lediglich die Piperazin-Derivate **8e** ($IC_{50} = 180 \mu\text{mol/L}$) und **8f** ($IC_{50} = 210 \mu\text{mol/L}$) zeigen eine geringfügige Aktivität. Auch die Substanzen mit ungesättigtem Heterocyclus vom Typ **9** (Imidazol- und Pyridin-Derivate) besitzen nur einen bescheidenen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation. Die Verbindung mit Imidazolylpropylamin-Substituent **9b** ist mit einem IC_{50} -Wert von $210 \mu\text{mol/L}$ am aktivsten. Die Verlängerung der Alkylkette auf fünf Kohlenstoffatome (**9d**) führt zu einem Wirkungsverlust ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$). Die Strukturen der Substanzen **8a-g** sind in Tabelle 7 auf Seite 23 und **9a-e** in Tabelle 8 auf Seite 25 im chemisch-theoretischen Teil angegeben.

3.1.2.3 Purin-2-amine mit tertiärem, heterocyclischem Amin an C-6

Die Substanzen **10a-c** wurden exemplarisch synthetisiert, um nach Entfernen der Methylen-Gruppen den Effekt auf die Thrombozytenaggregation zu untersuchen. Im direkten Vergleich der Substanz **10a** ($IC_{50} = 260 \mu\text{mol/L}$) mit dem entsprechenden Propyl-Derivat **9b** ($IC_{50} = 210 \mu\text{mol/L}$) zeigt sich, daß die Wirkung nicht beeinflußt werden konnte. Die Aktivitäten sind nahezu identisch. Einen positiven Effekt auf die Hemmung der Aggregation scheint aber die Substitution mit endständiger Alkohol-Funktion (**10b**) bzw. basischem Rest (**10c**) zu bewirken.

Tab. 28: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Purin-2,6-diamine **10a-c** im Born-Test (n.t. nicht getestet; * fällt als grober Niederschlag aus)

	Nr.	R	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]	
			4 min	20 min
	10a	CH ₃	260	n.t.
	10b	CH ₂ CH ₂ OH	105	n.t.
	10c	Pyrimidin-2-yl	> 300*	80

3.1.3 Purin-2,6-diamine mit neutralen Resten in der N⁶-Alkylseitenkette

3.1.3.1 Purin-2,6-diamine mit Alkohol- und/oder Ether-Partialstruktur

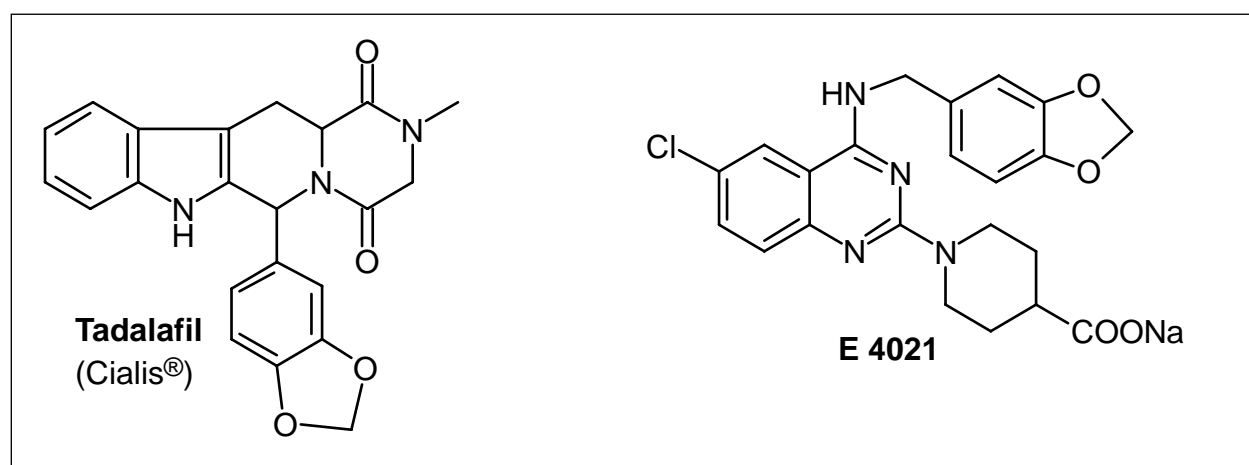
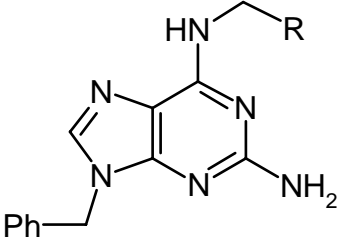


Abb. 34: Strukturformeln von **Tadalafil** (Cialis®) und **E 4021**

Um die Strukturverwandtschaft zu der Modells substanz **YC-1**, die als direkter Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und unspezifischer Inhibitor der Phosphodiesterasen (PDEs) auch die Thrombozytenaggregation^[24] hemmt, zu erhöhen, wurden die Purin-2,6-diamine vom

Typ **11** dargestellt. Ihre Untersuchungsergebnisse im Born-Test sind in Tabelle 29 aufgeführt. Der Methylenedioxybenzylamin-Substituent von **11f** wurde in Anlehnung an die PDE-5-Hemmer **Tadalafil** (Cialis®)^[76] und **E 4021**^[77] (siehe Abb. 34 auf Seite 61) ausgewählt.

Tab. 29: Halbmaximale Hemmkonzentrationen im Born-Test von den Purin-2,6-diaminen **11** (* fällt als feiner Niederschlag aus)

	Nr.	R	IC ₅₀ [μmol/L]
		11a	CH ₂ OH
	11b	CH ₂ CH ₂ OH	> 300
	11c	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	> 300
	11d	Furan-2-yl	> 300*
	11e	(5-Methyl)-furan-2-yl	> 300*
	11f	3,4-Methylenedioxyphenyl	> 300*

Die Einführung der Substituenten mit Alkohol- und/oder Ether-Partialstruktur führt zum vollständigen Verlust der aggregationshemmenden Wirkung. Daraus läßt sich schließen, daß bevorzugt basische Substituenten (s.o.) den Einfluß auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation verstärken.

3.1.3.2 Purin-2-amine mit Anilin-Derivaten an C-6

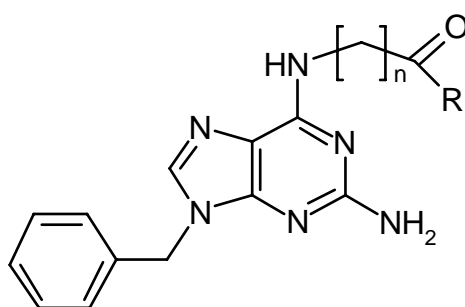
Die Purin-2-amine vom Typ **12** zeigen bis auf das Anilin-Derivat **12a** (IC₅₀ = 200 μmol/L nach 4 und 20 min) IC₅₀-Werte > 300 μmol/L und können damit als wirkungslos bezeichnet werden. Die Strukturen der Substanzen sind im theoretischen Teil in Tabelle 12 auf Seite 30 angegeben.

3.1.4 Purin-2,6-diamine mit Ester-, Säure- oder Amid-Partialstruktur

Alle im Born-Test untersuchten Purin-2,6-diamine mit Ester-, Säure- oder Amid-Partialstruktur besitzen keine aggregationshemmenden Aktivitäten. Auch nach Verlängerung der Inkubationszeit, wie am Beispiel der Säure **14b** gezeigt wurde, verändert sich das Ergebnis nicht.

Tab. 30: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Purin-2,6-diamine mit Ester-, Säure- oder Amid-Partialstruktur im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. nicht getestet)

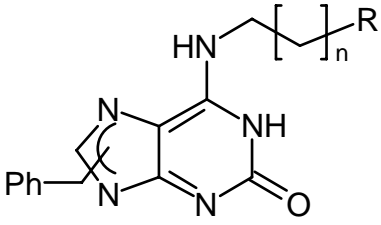
Nr.	n	m	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
				4 min	20 min
13a	1		OCH ₂ CH ₃	> 300	n.t.
13b	2		OCH ₂ CH ₃	> 300	n.t.
13c	6		OCH ₃	> 300*	n.t.
14a	1		OH	> 300	n.t.
14b	2		OH	> 300	> 300
14c	6		OH	> 300	n.t.
15a	1	3	NH(CH ₂) _m N(CH ₂ CH ₃) ₂	> 300	n.t.
15b	1	3	NH(CH ₂) _m Pyrrolidinyl	> 300*	n.t.
15c	1	2	NH(CH ₂) _m Morpholin-4-yl	> 300	n.t.
15d	1	3	NH(CH ₂) _m Imidazolyl	> 300	n.t.
15e	2	3	NH(CH ₂) _m Pyrrolidinyl	> 300*	n.t.
15f	2	2	NH(CH ₂) _m Morpholin-4-yl	> 300	n.t.
15g	2	3	NH(CH ₂) _m Imidazolyl	> 300	n.t.



3.1.5 Purin-2-one mit basischen oder neutralen Substituenten in der 6-Aminoseitenkette

Die Variation der Wasserstoffbrückenbindung durch Austausch der Amino-Gruppe gegen eine alkoholische Funktion führt bei den Substanzen mit basischem Rest in der 6-Aminoseitenkette (**16,17**) zu nicht wirksamen Verbindungen. Im Vergleich dazu zeigen die entsprechenden Purin-2,6-diamine (s.o.) moderate antiaggregatorische Aktivität. Eine Ausnahme bildet die Substanz **17e** mit einem IC_{50} -Wert von 160 $\mu\text{mol/L}$, deren zugehöriges Purin-2,6-diamin **8c** keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation besitzt. Nach Verschieben des lipophilen Restes von der 9- zu der 7-Position im Purin-Grundgerüst geht aber die Wirkung vollständig verloren. Einen Überblick über die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der Purin-2-one mit basischem Zentrum in der Seitenkette (**16,17**) im Born-Test gibt die Tabelle 31.

Tab. 31: IC_{50} -Werte der Purin-2-one vom Typ **16** und **17** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

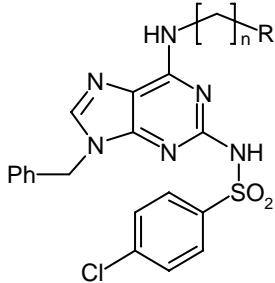
	Nr.	Pos.	n	R	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]
	16a	9	1	$N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	> 300
16b	9	2	$N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	> 300	
17a	9	1	Pyrrolidinyl	> 300	
17b	9	2	Pyrrolidinyl	> 300	
17c	9	1	Piperidinyl	> 300*	
17d	9	1	Morpholin-4-yl	> 300	
17e	9	2	Morpholin-4-yl	160	
17f	7	2	Morpholin-4-yl	> 300	
17g	9	2	Imidazolyl	> 300	
17h	9	1	Pyridinyl	> 300*	

Auch die Purin-2-one mit neutralem Rest in der Aminoseitenkette (**18a,b**) zeigen keinen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$). Die Strukturen von **18a,b** sind in Tabelle 16 auf Seite 39 im chemisch-theoretischen Teil angegeben.

3.1.6 N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamide

Da cGMP-Modulatoren mit 4-Chlorbenzolsulfonsäureamid-Partialstruktur (Struktur der Substanz **19** siehe chemisch-theoretischer Teil in Abb. 26 auf Seite 41) bekannt sind^[63], wurde dieser Substituent in 2-Position des Purin-Grundkörpers eingebaut. Aus dieser Substanzklasse besitzt nur das Piperidin-Derivat **20c** mit einem IC₅₀-Wert von 180 µmol/L moderate thrombozytenaggregationshemmende Wirkung. Die Verlängerung der Inkubationszeit bei **20c** führt zu einer Steigerung der Aktivität auf 25 µmol/L. In Tabelle 32 sind die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der Substanzen **20a-g** im Born-Test zusammengestellt.

Tab. 32: Übersicht über die IC₅₀-Werte der Verbindungen **20a-g** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. nicht getestet)

	Nr.	n	R	IC ₅₀ [µmol/L]	
				4 min	20 min
	20a	2	N(CH ₃) ₂	> 300*	n.t.
	20b	3	Pyrrolidinyl	> 300*	n.t.
	20c	2	Piperidinyl	180*	25
	20d	2	Morpholin-4-yl	> 300*	n.t.
	20e	3	Morpholin-4-yl	> 300*	n.t.
	20f	3	Imidazolyl	> 300*	n.t.
	20g	2	Pyridinyl	> 300*	n.t.

Bei dem exemplarisch dargestellten Essigsäureester mit 4-Chlorbenzolsulfonsäureamid-Partialstruktur **21** konnte die Aktivität von IC₅₀ > 300 µmol/L des Purin-2,6-diamins **13a** auf IC₅₀ = 230 µmol/L gesteigert werden. Die Strukturformel von **21** ist in Abb. 29 auf Seite 44 im theoretischen Teil angegeben.

3.1.7 N-(Purin-2-yl)benzolcarbonsäureamide mit Sulfonamid-Partialstruktur

3.1.7.1 N-(Purin-2-yl)- benzolcarbonsäureamide mit Heterocyclen am Sulfonamid

In Anlehnung an zahlreiche Inhibitoren der Phosphodiesterase vom Typ 5 (PDE 5) wie z.B. **Sildenafil** (Viagra®) und **Vardenafil** (Levitra®) wurden Purine mit in 2-Position substituierten Benzolcarbonsäureamiden dargestellt.

Die IC₅₀-Werte sind zusammen mit den Strukturen der Substanzen **25a-k** in Tabelle 33 angegeben.

Tab. 33: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Substanzen vom Typ **25** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. nicht getestet)

Nr.	Pos. (Benzyl)	Pos. (SO ₂)	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
				4 min	20 min
25a	9	3	Pyrrolidinyll	46*	19
25b	9	4	Pyrrolidinyll	> 300*	n.t.
25c	7	4	Pyrrolidinyll	> 300*	n.t.
25d	9	3	Morpholin-4-yl	170*	19
25e	9	4	Morpholin-4-yl	160*	38
25f	7	3	Morpholin-4-yl	> 300*	n.t.
25g	7	4	Morpholin-4-yl	> 300*	n.t.
25h	9	3	4-Methylpiperazinyl	43*	10
25i	9	4	4-Methylpiperazinyl	> 300*	n.t.
25j	9	3	4-(Pyrimidin-2-yl)piperazinyl	58*	35
25k	9	4	4-(Pyrimidin-2-yl)piperazinyl	> 300*	n.t.

Im Vergleich zum Edukt **7b** (IC₅₀ = 180 μmol/L) zeigen die Benzolcarbonsäureamide mit Sulfonamid-Partialstruktur (**25**) eine bis zu vierfache Steigerung der Aktivität im Born-Test (z.B. **25h**

$IC_{50} = 43 \mu\text{mol/L}$). Die aktivsten Substanzen enthalten den Pyrrolidin- oder den stärker basischen Piperazin-Ring in meta-Position. Die Verschiebung des Sulfonamid-Restes von der meta- zur para-Position bewirkt anscheinend eine Abnahme der Aktivität. Eine Ausnahme bilden die Morpholin-Derivate **25d** und **25e**. Hier bleibt die Aktivität erhalten.

Die 7-Benzyl-Isomere zeigten deutlich schlechtere Wirkung als die entsprechenden 9-Isomere. Daher wurden hiervon nur drei Derivate (**25c,f,g**) dargestellt und im Born-Test untersucht.

Alle Substanzen konnten unter den Testbedingungen zwar nicht vollständig in Lösung gebracht werden. Es zeigte sich jedoch, daß nach einer vierminütigen Inkubationszeit eine Tendenz ablesbar wird. Deshalb wurden die vielversprechendsten Substanzen mit einer verlängerten Inkubationszeit gemessen, was eine Steigerung der Aktivität bewirkte. Die Substanzen liegen nun gelöst vor und können besser an den Wirkort, die Thrombozyten gelangen. Sie zeigen nun ihre „wahre“ aggregationshemmende Wirkung *in vitro*.

3.1.7.2 N-(Purin-2-yl)benzolcarbonsäureamide mit N-Alkylsulfonamid-Partialstruktur

Die Öffnung des Pyrrolidin-Ringes am Sulfonamid von **25a,b** führt zu den vergleichbar aktiven Diethyl-Derivaten **26c** und **26d**. Um die Löslichkeit zu beeinflussen, wurden Methoxy-Gruppen in die Alkyl-Ketten eingefügt. Die Substanzen **26i** und **26j** besitzen nach 4minütiger Inkubationszeit mit einem IC_{50} -Wert von 130 bzw. 75 $\mu\text{mol/L}$ antiaggregatorische Aktivität. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 min führt bei dem meta-substituierten Derivat (**26i**) zu einer stärkeren Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die Aktivität des 4-Isomeren (**26j**) bleibt nach 20 min Inkubationszeit erhalten.

Die einfach substituierten Sulfonamide mit Methoxyalkyl- (**26e-h**) oder Benzyl-Rest (**26a,b**) besitzen nach 4 min nur moderate antiaggregatorische Eigenschaften (IC_{50} um 200 $\mu\text{mol/L}$). Durch Verlängerung der Inkubationszeit zeigen hauptsächlich die para-substituierten Methoxyalkyl-Derivate (**26f,h**) eine Steigerung der Aktivität um das 40- bis 60-fache (**26h**: IC_{50} -Wert von 180 auf 3 $\mu\text{mol/L}$).

Die IC_{50} -Werte der Substanzen vom Typ **26** befinden sich in Tabelle 34 auf Seite 68.

Tab. 34: IC₅₀-Werte der Benzolcarbonsäureamide mit N-Alkylsulfonamid-Partialstruktur (**26**) im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. nicht getestet)

Nr.	Pos.	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/L]	
				4 min	20 min
26a	3	CH ₂ Ph	H	140*	40
26b	4	CH ₂ Ph	H	> 300*	n.t.
26c	3	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	56*	25
26d	4	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	300*	n.t.
26e	3	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	220*	50
26f	4	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	220*	5
26g	3	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	230*	75
26h	4	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	180*	3
26i	3	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	130*	10
26j	4	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	75*	75

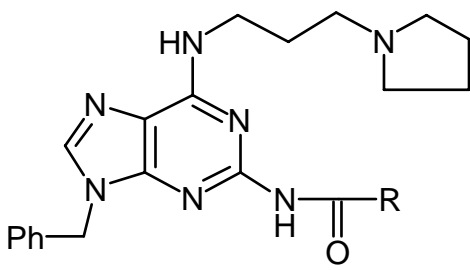
3.1.8 Weitere N-(Purin-2-yl)benzol- und N-(Purin-2-yl)furan-2-carbonsäureamide

Die Substanzen **27a,c-e** und **28** ohne Sulfonamid-Partialstruktur zeigen mit einem IC₅₀-Wert von ≈ 100 μmol/L ebenfalls hemmende Wirkungen auf die Thrombozytenaggregation. Die Verlängerung der Inkubationszeit führt bei den Substanzen **27a** und **27d** zu einer 30-fachen Steigerung der Hemmaktivität auf 3 μmol/L.

Daraus läßt sich schließen, daß Purine mit Sulfonamid-Partialstruktur in 2-Position zwar hemmende Effekt auf die Thrombozytenaggregation besitzen, aber das Sulfonamid nicht essentiell für die Wirkung ist. Andere Substituenten mit Elektronenakzeptoreigenschaften zeigen vergleichbare antiaggregatorische Aktivität.

In Tabelle 35 sind die halbmaximalen Hemmkonzentrationen von **27a-e** und **28** im Born-Test angegeben.

Tab. 35: Halbmaximale Hemmkonzentrationen von **27a-e** und **28** im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus; n.t. nicht getestet)

	Nr.	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
			4 min	20 min
	27a	Ph-4-COOCH ₃	100*	3
	27b	Ph-4-Cl	300*	50
	27c	Ph-4-CN	150*	n.t.
	27d	Ph-3-CN	90*	3
	27e	Ph-4-OCH ₃	90*	19
	28	2-Furan	80*	n.t.

3.1.9 Andere Aggregationsinduktoren

Die Aktivität einiger Substanzen im Born-Test sollte durch Verwendung von spezifischeren Aggregationsauslösern als Kollagen näher untersucht werden. Als Aggregationsinduktoren wurden Adenosindiphosphat (ADP), Adrenalin bzw. PAF („platelet activating factor“) zugesetzt. Die entsprechenden Referenzsubstanzen und ihre halbmaximalen Hemmkonzentrationen sind in Tabelle 36 aufgelistet^[78].

Tab. 36: Weitere Aggregationsinduktoren mit ihren Referenzsubstanzen und deren halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test

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

Gaarder et al.^[79] identifizierten 1961 ADP als ersten Plättchen-Agonisten. Nach Aktivierung der Thrombozyten wird ADP aus den elektronendichten Granula freigesetzt und verstärkt über die Inhibition der Adenylatcyclase und Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration die Aggregation. In den Plättchen vermitteln mindestens zwei spezifische Purin-Rezeptoren (P_{2Y1}- und P_{2T}-

Rezeptor) diese Effekte. Eine Blockade dieser Rezeptoren führt zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation.

PAF aktiviert, hoch potent, über spezifische Rezeptoren die Thrombozyten und induziert die Aggregation. Es stimuliert die Synthese von Thromboxan (TXA₂). PAF spielt nicht nur bei der Hämostase eine bedeutende Rolle, sondern auch bei vielen physiologischen Vorgängen wie z.B. bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen und bei allergischen Reaktionen.

Adrenalin bindet an α_2 -adrenerge Rezeptoren, die sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden, und stimuliert die Aggregation und Sekretion der Thrombozyten. Vor allem aber potenziert Adrenalin die aggregatorischen Effekte von Plättchen-Agonisten wie ADP, Thromboxan A₂ (TXA₂) und PAF.

In Abb. 35 werden die ausgewählten Substanzen vorgestellt. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 min führte bei diesen Substanzen nach Zusatz von Kollagen zu einer Steigerung der Aktivität. Diese Inkubationszeit wird daher für die anderen Induktoren beibehalten.

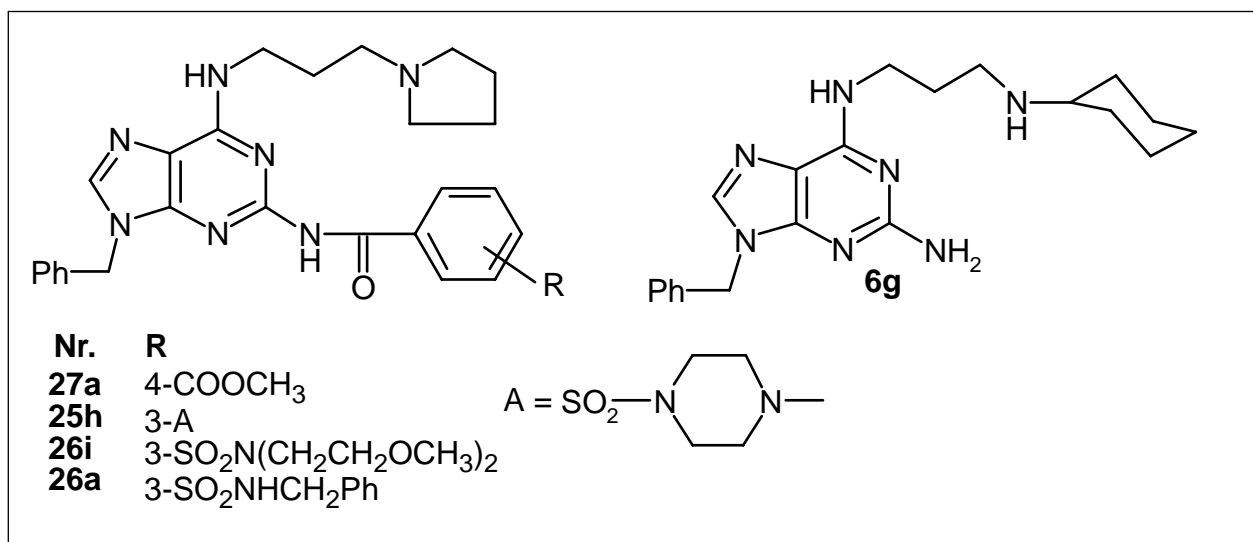


Abb. 35: Strukturformeln der Substanzen 6g, 25h, 26a, 26i und 27a

Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der ausgewählten Purine mit dem entsprechenden Aggregationsinduktor sind in Tabelle 37 angegeben.

Tab. 37: IC₅₀-Werte von **6g**, **25h**, **26a**, **26i** und **27a** nach 20 min Inkubationszeit mit verschiedenen Aggregationsauslösern im Born-Test (n.t. nicht getestet)

Nr.	IC ₅₀ [µmol/L]			
	Kollagen	ADP	Adrenalin	PAF
6g	11	3	28	3.5
25h	10	43	14	1.4
27a	3	25	7.5	7
26a	40	50	n.t.	n.t.
26i	10	15	n.t.	n.t.

Die getesteten Substanzen zeigen bei Zusatz des Aggregationsauslösers Adrenalin ähnliche bzw. höhere halbmaximale Hemmkonzentrationen als bei Kollagen. Auch ADP zeigt diese Tendenz. Eine Ausnahme bildet die Substanz **6g**. Ihre IC₅₀ beträgt mit 3 µmol/L nur etwa ein Drittel. Es könnte sich hier um einen ADP-Rezeptor-Antagonismus handeln. Die Substanz **6g** zeigt auch mit einem IC₅₀-Wert von 3.5 µmol/L PAF-Rezeptor-antagonistische Eigenschaften.

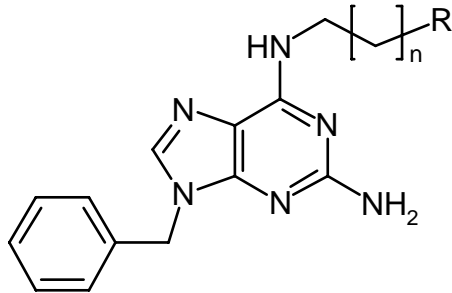
Die Substanz **25h** besitzt mit einem IC₅₀-Wert von 1.4 µmol/L ebenfalls stärkere aggregationshemmende Effekte gegenüber PAF (ca. siebenfach höhere Aktivität als bei Kollagen) und erreicht nahezu die Potenz von Apafant.

3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse im Born-Test

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Purin-2,6-diamine mit neutralen oder sauren Substituenten in der N⁶-Alkylseitenkette zeigen keine antiaggregatorische Eigenschaften. Nur die Purin-2,6-diamine mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette (**6-9**) besitzen moderate Hemmeffekte im Born-Test. Dabei zeigt die Struktur des basischen Restes eine erhebliche Variationsbreite.

Die aktivsten Purin-2,6-diamine mit basischen Resten werden in Tabelle 38 zusammengefaßt.

Tab. 38: Zusammenfassung der aktivsten Purin-2,6-diamine mit basischen Resten und ihre halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test (* fällt als feiner Niederschlag aus)

			
Nr.	n	R	IC ₅₀ [µmol/L]
6c	2	NHCH ₃	180
6g	2	NHC ₆ H ₁₁	210*
7b	2	Pyrrolidinyll	180
8e	1	(4H)-Piperazinyll	180
8f	2	(4-Methyl)-piperazinyll	210
9b	2	Imidazolyl	210

Der Austausch des primären Amins in 2-Position des Purin-Grundgerüsts gegen eine OH-Gruppe (**16-18**) führt zum vollständigen Wirkungsverlust. Auch nach dem Einbau des Benzolsulfonamids in 2-Position (**20,21**) werden nur IC₅₀-Werte > 300 µmol/L im Born-Test ermittelt. Die einzig aktiven Substanzen sind das Piperidin-Derivat **20c** (IC₅₀ = 180 µmol/L) und der Ester **21** (IC₅₀ = 230 µmol/L). Da fast alle Substanzen aufgrund ihrer hohen Lipophilie unter den Testbedingungen als feiner Niederschlag ausfielen, wurde **20c** mit einer verlängerten Inkubationszeit untersucht. Dadurch erhält die Substanz die Möglichkeit, das sich einstellende Lösungsgleichgewicht für die Anbindung an die Thrombozytenmembran besser zu nutzen. Die halbmaximale Hemmkonzentration von **20c** konnte so von 180 µmol/L auf 25 µmol/L nach 20 min gesenkt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Vielzahl an Benzolcarbonsäureamiden (**25-28**) dargestellt. Als Edukte wurden die beiden 3-Pyrrolidinylpropyl-Derivate **7b** und **7c** verwendet. Dadurch konnten die halbmaximalen Hemmkonzentrationen einiger Derivate auf < 100 µmol/L gesenkt werden. Da auch hier alle Substanzen unter den Testbedingungen als feiner Niederschlag ausfielen,

len, wurden die aussichtsreichsten Substanzen mit einer verlängerten Inkubationszeit von 20 min untersucht. Dies führt z.B. bei **27a** zu einer 30-fachen Steigerung der Aktivität.

Die Substanzen mit den stärksten antiaggregatorischen Effekten und ihren halbmaximalen Hemmkonzentrationen nach 4 und 20 min werden in Tabelle 39 zusammengefaßt.

Tab. 39: Zusammenfassung der aktivsten Substanzen vom Typ **25-28** mit ihren halbmaximalen Hemmkonzentrationen nach 4 und 20 min Inkubationszeit im Born-Test

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

Die thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften der Benzolcarboxamide mit Sulfonamid-Partialstruktur scheinen unabhängig von der Struktur des Sulfonamids zu sein, da auch andere Substituenten mit Elektronenakzeptoreigenschaften vergleichbare antiaggregatorische Aktivität besitzen.

Die Substanzen **6g**, **25h** und **27a** wurden mit anderen Aggregationsinduktoren wie ADP, Adrenalin oder PAF untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß **6g** mit einem IC₅₀-Wert um 3 µmol/L besonders die durch ADP und PAF ausgelöste Thrombozytenaggregation hemmt und **25h** (IC₅₀ = 1.4 µmol/L) PAF-Rezeptor-antagonistische Eigenschaften besitzt.

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. Daher sollten die vielversprechendsten Substanzen *in vitro* auf ihre antiaggregatorischen Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen *in vivo* getestet werden.

Im Arbeitskreis Rehse^[80] wird für diese Untersuchungen ein Laser-Thrombose-Modell (Abb. 36) eingesetzt, das auf Versuchen von Weichert^[81] und Seiffge^[82] basiert und von Kesselhut^[83] und Schein^[84] etabliert wurde. Ciborski^[85] standardisierte die Methode und entwickelte neue statistische Verfahren zur Auswertung.

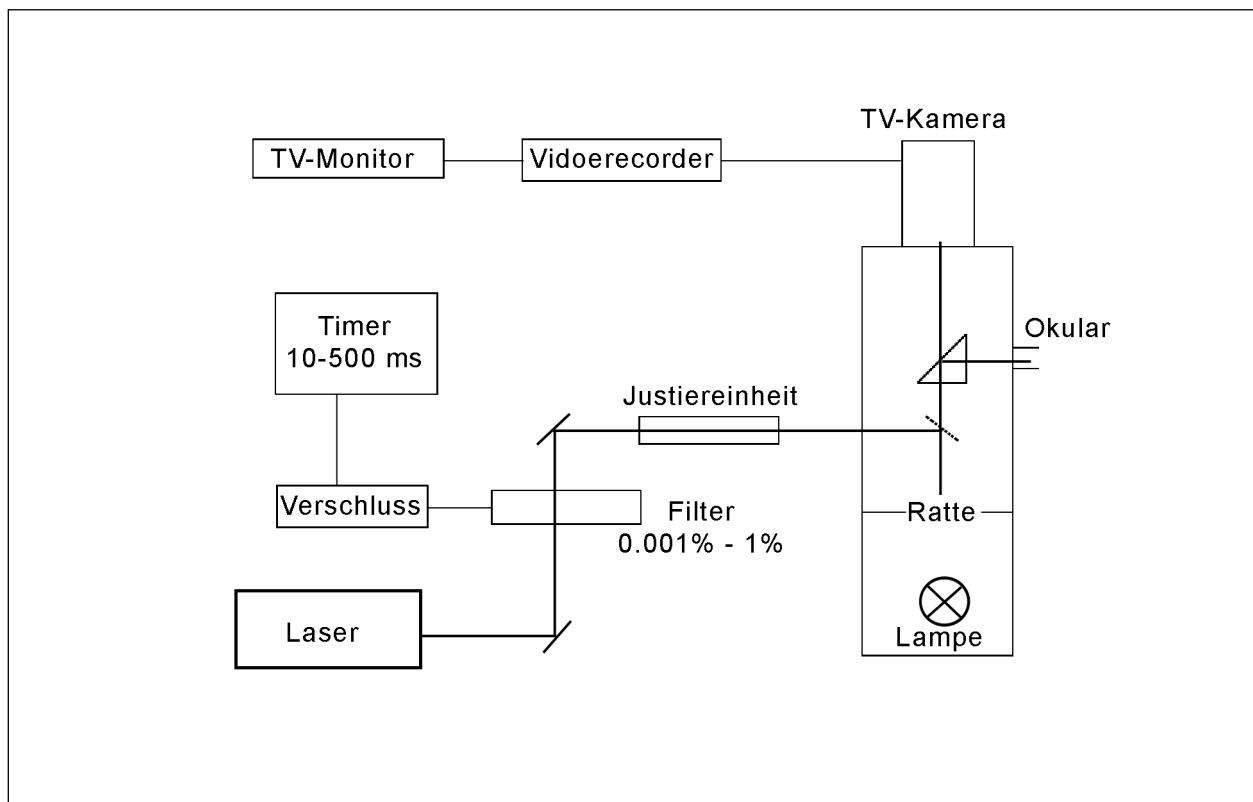


Abb. 36: Schematischer Aufbau des Laser-Thrombose-Modells

Methode:

Die freigelegten Mesenterialgefäße von männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 130-150 g werden mit einem Laser beschossen. Durch die Schädigung der Gefäßinnenwand werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt und aggregationsauslösende Substanzen aus zerstörten Erythrozyten freigesetzt. Die dadurch aktivierten Thrombozyten lagern sich an der verletzten Gefäßwand an. Weitere aggregationsauslösende und vasokonstriktorische Mediatoren werden sezerniert. 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, kann der Versuch verfolgt und aufgezeichnet werden (siehe Abb. 36 auf Seite 74).

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 das Mesenterium freigelegt und die laserinduzierte Thrombusbildung beobachtet.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte nach der von Ciborski^[85] standardisierten Methode. Ein Thrombus liegt dann vor, wenn er die Größe eines Leucozyten (10-12 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. $TBI = 6$ bedeutet demzufolge keine Thrombusbildung. Der mittlere Thrombusbildungsindex (mTBI) ist das arithmetische Mittel der TBIs aus einer Messreihe mit einer bestimmten Anzahl von Tieren.

Ein anschauliches Maß für die antithrombotische Aktivität ist die prozentuale Hemmung der Thrombusbildung. Es wird folgendermaßen umgerechnet:

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

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^[86]. Die Signifikanz der durchgeführten Meßreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-Testes nach Wilcoxon, Mann und Whitney^[87] überprüft. 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 zu einer 48 ± 10 %igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer 20 ± 5 %igen Hemmung in den Venolen ($\alpha \leq 0.002$)^[88]. Die Hemmwirkung bei einer Dosierung von 10 mg/kg ASS beträgt 18 % in den Arteriolen und 3 % in den Venolen. Bei 5 mg/kg ASS wird die Thrombusbildung in den Arteriolen zu 10 % gehemmt, in den Venolen ist keine Wirkung mehr zu beobachten. Die Hemmwirkung des NO-Donors **Molsidomin** (Corvaton[®]) beträgt bei einer Dosierung von 10 mg/kg in den Arteriolen 21 %.

3.2.2 Purin-2,6-diamine mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette

Die Ergebnisse der Purin-2,6-diamine mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette sind in Tabelle 40 zusammengefaßt.

Tab. 40: Hemmung der Thrombusbildung durch die Purin-2,6-diamine mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette (n.s. nicht signifikant; * Abbruch des Versuches)

Nr.	Pos.	n	R	Hemmung der Thrombusbildung			
				Venolen		Arteriolen	
				% ± s _x	α	% ± s _x	α
6d	9	2	N(CH ₃) ₂	2 ± 2	n.s.	4 ± 1	n.s.
6e	9	2	N(CH ₂ CH ₃) ₂	0 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
6g	9	2	NHC ₆ H ₁₁	4 ± 2	0.1	6 ± 2	0.05
6h	7	2	NHC ₆ H ₁₁	0 ± 1	n.s.	1 ± 2	n.s.
7a	9	1	Pyrrolidinyl	0 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
7b	9	2	Pyrrolidinyl	*			
7c	7	2	Pyrrolidinyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	n.s.
7d	9	1	Piperidinyl	*			
8f	9	2	4-Methylpiperazinyl	1 ± 2	n.s.	7 ± 2	0.02

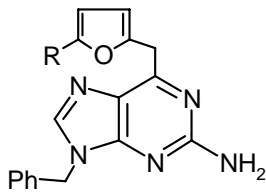
Von den getesteten Substanzen zeigen nur die Substanzen **6g** und **8f** signifikante antithrombotische Aktivität. Auch im Born-Test konnten beide Verbindungen mit einem IC₅₀-Wert von 210 μmol/L nach 4 min Inkubationszeit moderate antiaggregatorische Eigenschaften vorweisen. Bei dem Pyrrolidin-Derivat **7b**, das *in vitro* zu den aktivsten Purin-2,6-diaminen mit basischem Substituenten (IC₅₀ = 180 μmol/L) zählt, mußte der Versuch abgebrochen werden, da das Herz-Kreislauf-System der Tiere nach Gabe der Narkose zu stark beeinflußt wurde. Ähnliche Eigenschaften zeigte auch das strukturisomere Piperidin-Derivat **7d**. Nach Verschieben der Benzyl-

Gruppe (**7c**) bzw. Entfernen einer Methylene-Gruppe (**7a**) von der Substanz **7b** sind diese Effekte verschwunden.

3.2.3 Purin-2,6-diamine mit neutralem Rest in der N⁶-Alkylseitenkette

Aufgrund der Strukturverwandtschaft zu **YC-1** und zum Vergleich mit den Purin-2,6-diaminen mit basischen Substituenten in der Seitenkette wurden die Furanyl-Derivate **11d** und **11e** im Laser-Thrombose-Modell getestet. Sie zeigen, wie im Born-Test keine nennenswerten antithrombotische Aktivität.

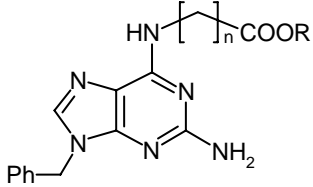
Tab. 41: Hemmung der Thrombusbildung durch die Purin-2,6-diamine **11d,e** (n.s. nicht signifikant)

	Nr.	R	Hemmung der Thrombusbildung			
			Venolen		Arteriolen	
			% ± S _x	α	% ± S _x	α
11d	H	1 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.	
11e	CH ₃	0 ± 1	n.s.	1 ± 1	n.s.	

3.2.4 Purin-2,6-diamine mit Ester- oder Säure-Partialstruktur

Purin-2,6-diamine mit Ester- oder Säure-Partialstruktur (**13,14**) wurden synthetisiert und pharmakologisch untersucht, da sGC-Aktivatoren mit Aminodicarbonsäure-Partialstruktur^[59] bekannt sind. Die Ergebnisse aus dem Laser-Thrombose-Modell der Substanzen vom Typ **13** und **14** befinden sich in Tabelle 42.

Tab. 42: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanzen vom Typ **13** und **14** (n.s. nicht signifikant)

	Nr.	n	R	Hemmung der Thrombusbildung			
				Venolen		Arteriolen	
				% ± S _x	α	% ± S _x	α
13a	1	1	CH ₂ CH ₃	4 ± 2	0.1	7 ± 2	0.05
13b	2	2	CH ₂ CH ₃	0 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
13c	6	6	CH ₃	2 ± 1	n.s.	4 ± 1	n.s.
14a	1	1	H	1 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
14b	2	2	H	3 ± 1	0.1	7 ± 1	0.01

Der Essigsäureester **13a** besitzt mit 4 % Hemmung in den Venolen und 7 % Hemmung in den Arteriolen antithrombotische Aktivität, obwohl er im Born-Test keine Effekte auf die Thrombozy-

tenaggregation zeigt. Eine Verlängerung der Alkylkette (**13b,c**) führt zu einem Verlust der Wirkung.

3.2.5 Purin-2-one mit basischen und neutralen Substituenten in der N⁶-Alkylseitenkette

Da u.a. cGMP eine Carbonyl-Gruppe enthält, sollte auch in die Purin-2,6-diamine eine OH-Gruppe eingeführt und auf gerinnungsphysiologische Aktivität getestet werden. Nur die Substanzen **17a**, **17d** und **17g** zeigen signifikante, antithrombotische Eigenschaften in den Arteriolen. Damit korrelieren die Ergebnisse der Purin-2-one mit basischen Substituenten im Laser-Thrombose-Modell mit dem fehlenden Einfluß auf die Thrombozytenaggregation im Born-Test ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$).

Die Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanzen vom Typ **16** und **17** sind in Tabelle 43 zusammengefaßt.

Tab. 43: Hemmung der Thrombusbildung durch die Purin-2-one mit basischem Zentrum in der N⁶-Alkylseitenkette (n.s. nicht signifikant)

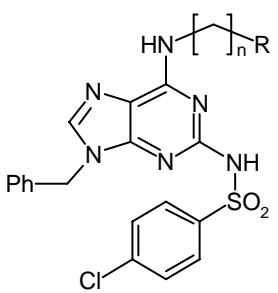
Nr.	Pos.	n	R	Hemmung der Thrombusbildung			
				Venolen		Arteriolen	
				% ± s _x	α	% ± s _x	α
16a	9	1	N(CH ₂ CH ₃) ₂	1 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
16b	9	2	N(CH ₂ CH ₃) ₂	0 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.
17a	9	1	Pyrrolidinyll	1 ± 1	n.s.	5 ± 2	0.1
17b	9	2	Pyrrolidinyll	2 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
17c	9	1	Piperidinyll	2 ± 1	n.s.	3 ± 2	n.s.
17d	9	1	Morpholin-4-yl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1
17e	9	2	Morpholin-4-yl	0 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.
17f	7	2	Morpholin-4-yl	3 ± 1	n.s.	4 ± 2	n.s.
17g	9	2	Imidazolyl	0 ± 1	n.s.	6 ± 1	0.05
17h	9	1	Pyridinyll	0 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.

Auch die beiden Purin-2-one mit neutralem Rest in der Alkylseitenkette (**18a,b**) besitzen nur schwache gerinnungsphysiologische Aktivität (**18b** 5 % Hemmung in den Arteriolen).

3.2.6 N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamide

Aufgrund der moderaten Effekte auf die Thrombozytenaggregation im Born-Test wurden nur einige N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamiden *in vivo* getestet. Die *in vitro* aktivsten Substanzen **20c** und **21** zeigen auch im Laser-Thrombose-Modell die stärkste Hemmung der Thrombusbildung in dieser Substanzklasse. Zusätzlich besitzen auch die im Born-Test unwirksamen Substanzen **20d** und **20f** antithrombotische Aktivität in den Arteriolen. Vermutlich könnte die Aktivität dieser beiden Verbindungen im Born-Test durch Verlängerung der Inkubationszeit erhöht werden. In Tabelle 44 werden die Ergebnisse der N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamide zusammengefaßt.

Tab. 44: Hemmung der Thrombusbildung durch die N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamide (n.s. nicht signifikant)

	Nr.	n	R	Hemmung d.Thrombusbildung			
				Venolen		Arteriolen	
				% ± S _x	α	% ± S _x	α
	20b	3	Pyrrolidinyll	1 ± 1	n.s.	2 ± 1	n.s.
	20c	2	Piperidinyll	2 ± 1	n.s.	7 ± 2	0.02
	20d	2	Morpholin-4-yl	1 ± 1	n.s.	6 ± 1	0.02
	20f	3	Imidazolyl	0 ± 1	n.s.	5 ± 1	0.05
	21	2	COOCH ₂ CH ₃	4 ± 2	0.1	8 ± 1	0.01

3.2.7 N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide mit Sulfonamid-Partialstruktur

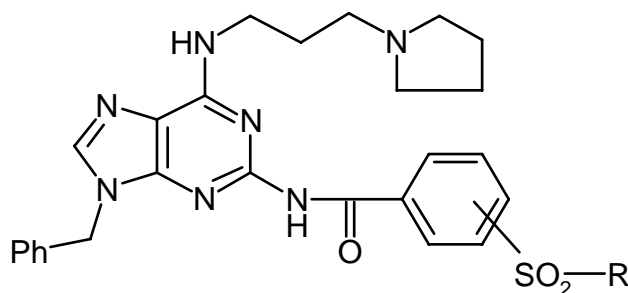
Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden diverse N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide synthetisiert. Die für das Laser-Thrombose-Modell ausgewählten N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide mit Heterocyclen am Sulfonamid zeigen, obwohl (bis auf die Substanz **25i**) im Born-Test antiaggregatorische Eigenschaften beobachtet werden konnten, keine Effekte auf die Hemmung der Thrombusbildung. Eine mögliche Ursache für die fehlende *in vivo*-Aktivität kann die schlechte Löslichkeit der Substanzen und damit ungenügende Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt sein. Außerdem könnten die Substanzen einer schnellen Metabolisierung unterliegen.

Im Gegensatz dazu besitzt das *in vitro* aktive Benzyl-Derivat **26a** auch *in vivo* antithrombotische Aktivität.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der getesteten N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide mit Sulfonamid-Partialstruktur befindet sich in Tabelle 45.

Tab. 45: Hemmung der Thrombusbildung durch die N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide mit Sulfonamid-Partialstruktur (n.s. nicht signifikant)

Nr.	Pos.	R	Hemmung der Thrombusbildung			
			Venolen		Arteriolen	
			% ± s _x	α	% ± s _x	α
25a	3	Pyrrolidinyl	0 ± 1	n.s.	0 ± 2	n.s.
25d	3	Morpholin-4-yl	2 ± 2	n.s.	4 ± 2	n.s.
25h	3	4-Methylpiperazinyl	0 ± 1	n.s.	4 ± 1	n.s.
25i	4	4-Methylpiperazinyl	0 ± 1	n.s.	0 ± 1	n.s.
26a	3	NHCH ₂ Ph	2 ± 2	n.s.	6 ± 2	0.05

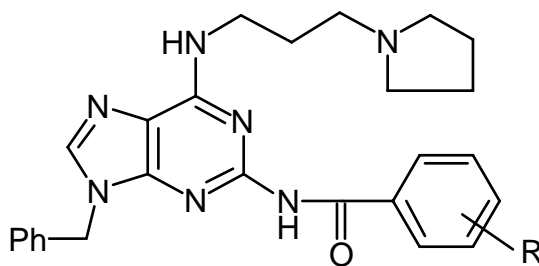


3.2.8 Weitere N-(Purin-2-yl)benzolcarbonsäureamide

Die *in vivo*-Ergebnisse der untersuchten N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide ohne Sulfonamid-Partialstruktur (**27a,c,d**) werden in Tabelle 46 vorgestellt. Sie zeigen im Gegensatz zu den

Tab. 46: Hemmung der Thrombusbildung durch die N-(Purin-2-yl)-benzolcarbonsäureamide **27a,c,d** (n.s. nicht signifikant)

Nr.	Pos.	R	Hemmung der Thrombusbildung			
			Venolen		Arteriolen	
			% ± S _x	α	% ± S _x	α
27a	4	COOCH ₃	2 ± 1	n.s.	7 ± 2	0.01
27c	4	CN	4 ± 1	0.05	5 ± 2	0.1
27d	3	CN	0 ± 1	n.s.	5 ± 1	0.05



Derivaten mit Heterocyclen am Sulfonamid im Testmodell signifikante, antithrombotische Aktivität. Die aktivste Substanz ist hier der Ester (**27a**) mit 7 % Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen. Auch im Born-Test können **27a,c,d** aggregationshemmende Eigenschaften vorweisen ($IC_{50} \approx 100 \mu\text{mol/L}$ nach 4 min und **27a,d** $IC_{50} = 3 \mu\text{mol/L}$ nach 20 min Inkubationszeit).

3.2.9 Zusammenfassung der *in vivo*-Ergebnisse

Die im Laser-Thrombose-Modell untersuchten Purine zeigen geringe bis keine antithrombotischen Effekte. Das N-(Purin-2-yl)benzolsulfonamid mit Ester-Partialstruktur (**21**) stellt mit 8 % Hemmung in den Arteriolen und 4 % Hemmung in den Venolen die *in vivo* aktivste Substanz dar. Diese Substanz zeigt auch *in vitro* moderate antiaggregatorische Eigenschaften ($IC_{50} = 230 \mu\text{mol/L}$). Acetylsalicylsäure (ASS) besitzt im Vergleich dazu in diesem Testmodell unter den gleichen Bedingungen 48 % Hemmung in den Arteriolen und 20 % Hemmung in den Venolen^[88].

Viele der getesteten Substanzen zeigen keine signifikanten Hemmungen der Thrombusbildung. Daher können nur begrenzt Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden. Einige Tendenzen lassen sich aber ablesen.

Basische Substituenten (z.B. Methylpiperazin-Derivat **8f** mit 7 % Hemmung in den Arteriolen) oder Reste mit Ester- oder Säure-Partialstruktur (z.B. Essigsäureester **13a** mit 7 % Hemmung in den Arteriolen) in der Alkylkette in 6-Position des Purin-Grundkörpers sind für die antithrombotische Aktivität vorteilhafter als neutrale Substituenten.

Die Variation vom Purin-2,6-diamin zum Purin-2-on (siehe Tabelle 43 auf Seite 79) führt *in vivo* zum Wirkungsverlust und bestätigt die *in vitro*-Ergebnisse.

Die Einführung von Benzolsulfon- (**20,21**) oder Benzolcarboxamiden (**25-27**) in 2-Position scheint die antithrombotische Wirkung zu steigern.

3.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

Einige der dargestellten Purine hemmen vor allem die Thrombozytenaggregation im Born-Test beachtlich. Hervorzuheben sind hier die Benzolcarboxamide mit (**25,26**) und ohne (**27,28**) weitere Sulfonamid-Partialstruktur. Die Substanzen wurden in Anlehnung an die Strukturen von **YC-1**, einem NO-unabhängigen sGC-Aktivator und **Sildenafil** (Viagra®), einem PDE 5-Inhibitor dargestellt (siehe auch Abb. 4 auf Seite 6). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die antiaggregatorischen Effekte der getesteten Substanzen durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und/oder durch Hemmung der Phosphodiesterase vom Typ 5 ausgelöst werden.

Für die Untersuchungen wurden vier, möglichst strukturell unterschiedliche Substanzen mit antiaggregatorischer und/oder antithrombotischer Aktivität ausgewählt. Sie sind zusammen mit ihren *in vitro*- und *in vivo*-Testergebnissen in Abb. 37 angegeben.

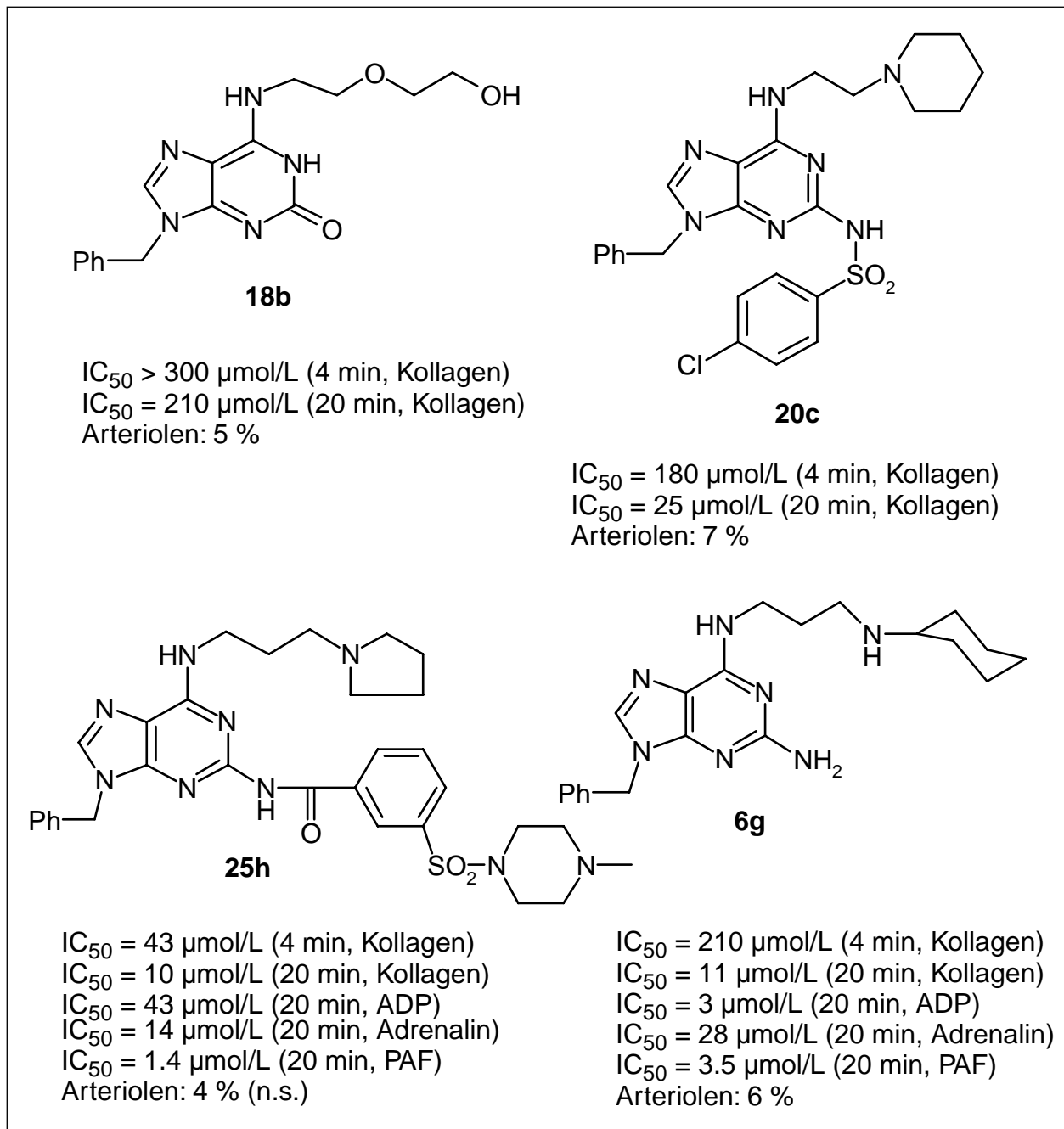


Abb. 37: Strukturformeln von **6g**, **18b**, **20c** und **25h** und ihre gerinnungsphysiologischen Daten

3.3.1 Aktivierung der löslichen Guanylatcyclyase (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 Guanylatcyclyase. Mittlerweile sind auch direkte NO-unabhängige Aktivatoren, wie **YC-1** bekannt. Der second messenger cGMP senkt über cGMP-abhängige Proteinkinasen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Plättchen. Dies führt zu einer Hemmung die Thrombozytenadhäsion und -aggregation (siehe auch Seite 2, Kapitel 1.1).

Die in Abb. 37 auf Seite 84 dargestellten Substanzen wurden im Testverfahren nach Hoenicka et al.^[21] von der Fa. Bayer auf eine mögliche Aktivierung der löslichen Guanylatcyclyase untersucht. In einem Radioimmunoassay 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 wurden doppelt bestimmt und mindestens dreimal wiederholt. Eine ausführliche Beschreibung zum Versuchsaufbau und zur Methodik des Testverfahrens ist bei Hoenicka et al.^[21] und Stasch et al.^[89] zu finden. Da **YC-1** zusammen mit NO die lösliche Guanylatcyclyase überadditiv aktiviert, wurden die ausgewählten Substanzen auch in Kombination mit dem NO-Donor **DEA/NO** (N,N-Diethylaminodiazemat-2-oxid, siehe Abb. 38), der spontan NO freisetzt, getestet.

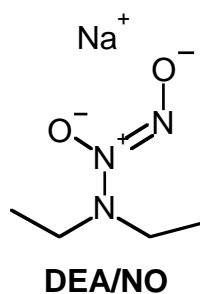


Abb. 38: Strukturformel von **DEA/NO**

Alle untersuchten Substanzen zeigen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ keine Steigerung der Basalaktivität. Auch in Kombination von 100 $\mu\text{mol/L}$ Testsubstanz + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ **DEA/NO** wurde die Aktivität nicht über den Anfangswert erhöht. Unter den gleichen Testbedingungen führt eine 100 μmolare **YC-1**-Lösung^[21] zu einer 93fachen 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 550fache im Vergleich zum Basalwert.

Die antiaggregatorischen und/oder antithrombotischen Eigenschaften der untersuchten Testsubstanzen sind anscheinend nicht auf eine Stimulation der löslichen Guanylatcyclase zurückzuführen.

3.3.2 Hemmung der Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen katalysieren, wie schon im Kapitel 1.2 auf Seite 5 vorgestellt, den Abbau von cGMP zu GMP bzw. cAMP zu AMP. In den Thrombozyten befindet sich hauptsächlich die Phosphodiesterase vom Typ 5. Dies ist ein cGMP-spezifisches Enzym. Eine Hemmung der PDE 5 kann in den Thrombozyten über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen. Die in Abb. 37 auf Seite 84 dargestellten Substanzen wurden deshalb von der Fa. Bayer in einem Scintillation Proximity Assay (SPA)-System von der Fa. Amersham Biosciences auf eine mögliche Hemmung der PDE 5 untersucht. Das Prinzip des Assay wurde in Abb. 39 schematisch dargestellt und beruht laut Produktinforma-

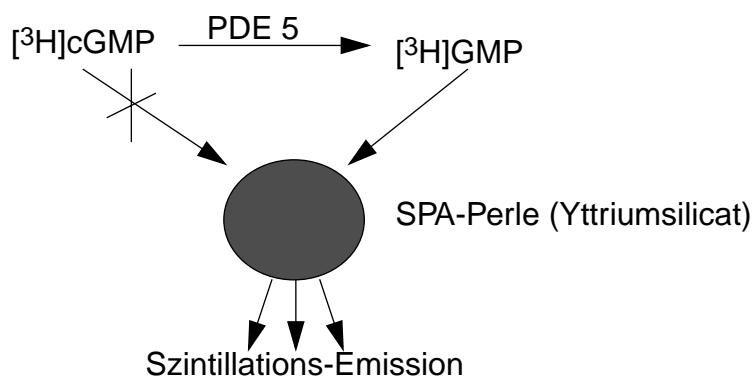


Abb. 39: Schematische Darstellung des SPA-Systems zur Bestimmung der PDE 5-Aktivität

tion auf die Bindung von GMP an Mikroteilchen (SPA-Perlen), die aus Yttriumsilicat bestehen und mit den entsprechenden Antikörpern beschichtet sind. Dabei wird Tritium-markiertes cGMP ($[^3\text{H}]\text{-cGMP}$) von humaner rekombinater PDE 5 zu $[^3\text{H}]\text{GMP}$ abgebaut. Nur die nichtcyclische Form bindet an die SPA-Perlen. Die beim Zerfall von gebundenem $[^3\text{H}]\text{GMP}$ freigesetzten β -Strahlen treffen aufgrund der Nähe zu den SPA-Perlen auf das Yttriumsilicat, einem Szintillati-

onsagens und setzen Szintillation-Blitze frei, die mit einem Szintillationszähler registriert werden können. Daraus läßt sich die Konzentration an gebundenem [³H]GMP und demzufolge auch die Aktivität der PDE 5 bestimmen.

Die ausgewählten Substanzen wurden in Konzentrationen von 1, 10 und 100 µmol/L in dem beschriebenen Testmodell untersucht. Sie zeigen keine nennenswerte PDE 5-inhibitorische Aktivität. Im Vergleich dazu besitzt **YC-1** auf die PDE 5 eine halbmaximale Hemmkonzentration von 10 µmol/L^[24]. **Vardenafil** (Levitra®), einem von der Fa. Bayer entwickelten PDE 5-Inhibitor zeigt unter den Testbedingungen einen IC₅₀-Wert von 0.7 nmol/L^[67].

Die beobachteten Hemmeffekte im Born-Test und/oder Laser-Thrombose-Modell werden damit auch nicht durch die Hemmung der Phosphodiesterase vom Typ 5 ausgelöst.

