

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^[51] nach der von Seuter^[52] modifizierten Methode bestimmt (siehe Abb.29). Humanes plättchenreiches Plasma wird mit definierten Konzentrationen der Testsubstanz vier Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe der Aggregationsauslöser Kollagen wird die Thrombozytenaggregation ausgelöst. Das Ausmaß der Thrombozytenaggregation wird photometrisch gemessen. Die Zunahme der Transmission verläuft dabei proportional zur Zunahme der Thrombozytenaggregation und ist damit umgekehrt proportional zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Für jede Konzentration einer Substanz wird eine Transmission-Zeit-Kurve erstellt mit der maximalen Höhe h . Die maximale Höhe h wird mit Referenzprobe verglichen, und so die prozentuale Hemmung der Thrombozytenaggregation ermittelt. Als Referenz und zur Funktionsprüfung der Plättchen dient eine 1.6 mmolare Acetylsalicylsäurelösung (Aspi-sol)[®] in HEPES-Puffer. Sie besitzt unter den angegebenen Testbedingungen in einer Konzentration von 175 µmol/L eine 50%ige Hemmung.

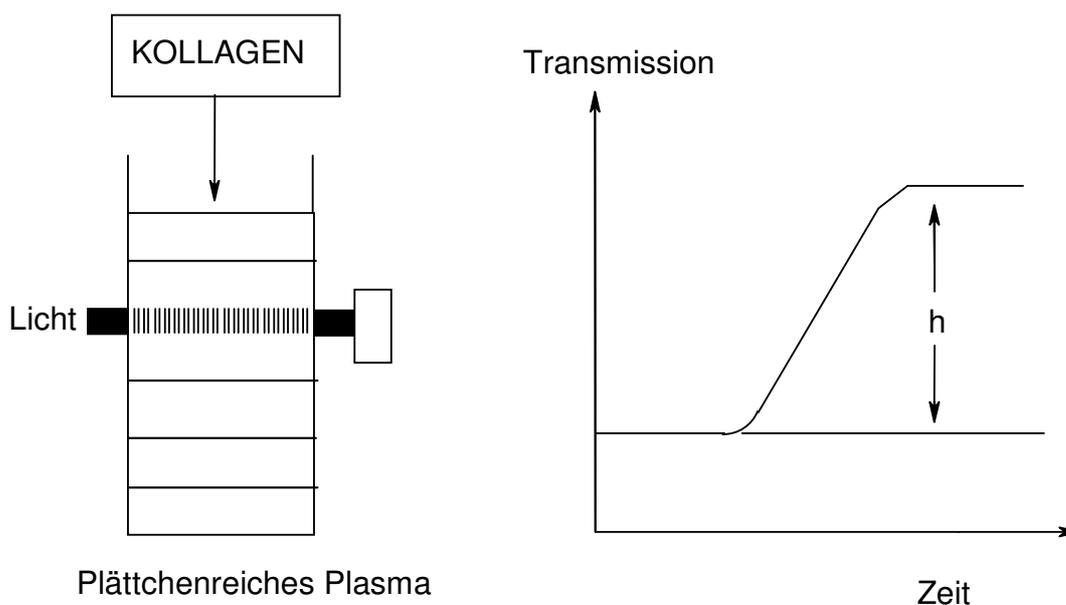


Abb. 29: Schematische Darstellung des Born-Tests

Zum Vergleich der Aktivitäten der getesteten Substanzen werden die IC_{50} -Werten der Substanzen graphisch ermittelt. Dabei wird die Konzentration logarithmisch gegen die prozentuale Hemmung in einem Diagramm aufgetragen. Der IC_{50} -Wert lässt sich aus der resultierende Kurve ermitteln. Dabei wird die Konzentration an der 50%-Marke abgelesen.

Dieser Wert entspricht der Konzentration der Testsubstanz, die zur halbmaximalen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt.

Die Probe wird während der Messung gleichmäßig durch einen Magnetrührer bewegt, um die Sedimentation der Thrombozyten zu vermeiden. Als Lösungsmittel für die Testsubstanzen dienen DMSO/HEPES bzw. DMSO/PRP. Der DMSO-Anteil in dem Lösungsmittel muß unter 0.3% bleiben, da DMSO eine eigene Hemmwirkung auf die Thrombozytenaggregation hat.

In diesem Testmodell führt eine 1.25%ige DMSO-Lösung zu einer Hemmung der Aggregation um 40%^[53]. Einige Substanzen fallen in dem Lösungsmittelgemisch als feiner Niederschlag aus. Der Anteil an DMSO kann nicht erhöht werden (s.o.). Andere Lösungsvermittler z.B. PEG 300, PEG 400 und Polysorbat 80, die von Gonska^[54] untersucht wurden, zeigen entweder eigene Hemmeffekte oder verbessern die Löslichkeit der getesteten Substanzen in dem Lösungsmittel nicht. Damit die Wirkstoffe die Möglichkeit haben trotz schlechter Löslichkeit an die Thrombozytenmembran zu gelangen, wurde die Inkubationszeit von 4 min auf 20 min verlängert. Wegen der geringeren Lebensdauer der Thrombozyten *in vitro* als *in vivo*, darf die Inkubationszeit auf maximal 20 min verlängert werden.

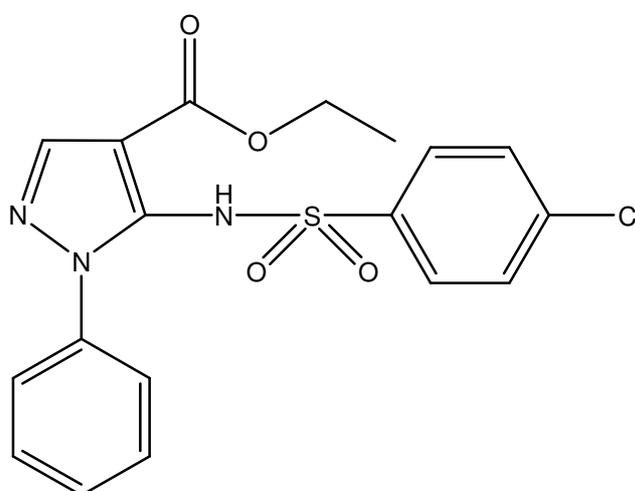
Angaben zu der Versuchsdurchführung, Auswertung und den verwendeten Geräten sind bei Ernst^[55], Claus^[56] und Rehse^[57] zu finden.

Substanzen mit einer $IC_{50} > 300$ werden als wirkungslos betrachtet.

3.1.2 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbonsäureethylester(2)

Aufgrund der Strukturähnlichkeiten zwischen der von *Steege*^[40] dargestellten Substanz **6c** mit antiaggregatorische Eigenschaften und dem von Schindler patentierten sGC-Aktivator **A**^[39] war die Darstellung von Substanz **2** von Interesse. Tabelle 46 zeigt die halbmaximale Hemmkonzentration der Substanz **2** im Born-Test.

Tab. 46: Halbmaximale Hemmkonzentration der Substanz **2**



Nr.	IC ₅₀ [μmol/L]
2	>300

Substanz **2** zeigt keine antiaggregatorische Wirkung.

3.1.3 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide

Als nächstes sollte die Substanz **2** zu den entsprechenden Carboxamiden weiterentwickelt werden. Anlass zu diesem Schritt gaben die von *Cwiklicki*^[43], *Steege*^[40] und *Yildiz*^[44] dargestellten Carboxamide mit gerinnungsphysiologische Aktivitäten sowie Substanz **A**^[39]. Die dargestellten Substanzen sollten auf eine antiaggregatorische Wirkung im Born-Test untersucht werden, weil zahlreiche sGC-Aktivatoren und PDE 5-Inhibitoren Carboxamidteilstrukturen enthalten.

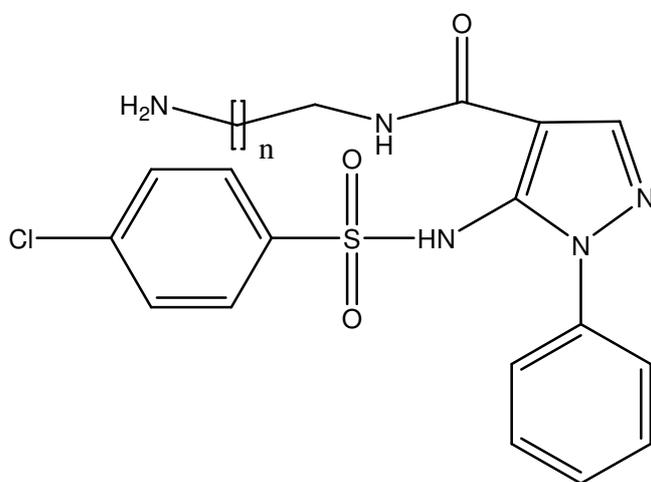
3.1.3.1 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit basischem Zentrum in der Seitenkette

Die Arbeitsgruppen um *Straub*^[47], *Steeger*^[40] und *Johnsen*^[48] beobachteten eine Steigerung der gerinnungsphysiologische Effekte, nachdem sie in ihre Verbindungen basische Zentren eingeführt hatten. Daher wurde in den folgenden Substanzklassen eine basische Gruppe in der Seitenkette eingefügt und die so erhaltenen Substanzen auf antiaggregatorische Eigenschaften untersucht.

3.1.3.2 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit primärer Aminoalkyl-Partialstruktur(3)

In der Tabelle 47 werden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test der Verbindungen der Substanzklasse **3** angegeben. Diese Substanzen zeigen bei Standardmeßbedingungen keine antiaggregatorische Effekte.

Tab. 47: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **3**

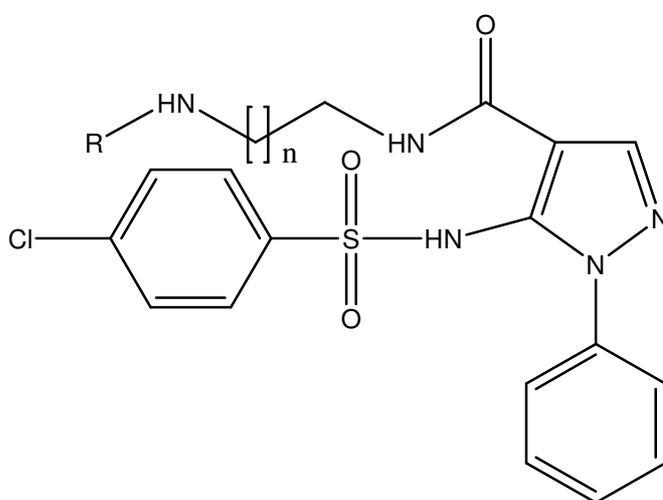


Nr.	n	IC ₅₀ [μmol/L]
3a	1	>300
3b	2	>300

3.1.3.3 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit unverzweigter Alkylamino-Partialstruktur(4)

Die Verbindungen der Substanzklasse **4** wurden synthetisiert, um nach Einführen eines lipophilen Restes in der Seitenkette den Effekt auf die Thrombozytenaggregation zu untersuchen. Das primäre Amin der Seitenkette der Verbindungen der Substanzklasse **3** wurde zu einem sekundären Amin modifiziert. Die IC_{50} -Werte sind zusammen mit den Strukturen der Substanzen **4a-4g** in der Tabelle 48 angegeben.

Tab. 48: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **4** (n.t.nichtgetestet; *fällt als feiner Niederschlag aus)



Nr.	n	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
			4 min	20 min
4a	1	n-Methyl	>300*	110
4b	1	n-Ethyl	>300*	>300
4c	1	n-Propyl	>300*	249
4d	1	n-Butyl	>300*	95
4e	1	n-Hexyl	>300	>300
4f	2	n-Methyl	>300	n.t.
4g	2	n-Propyl	>300	n.t.

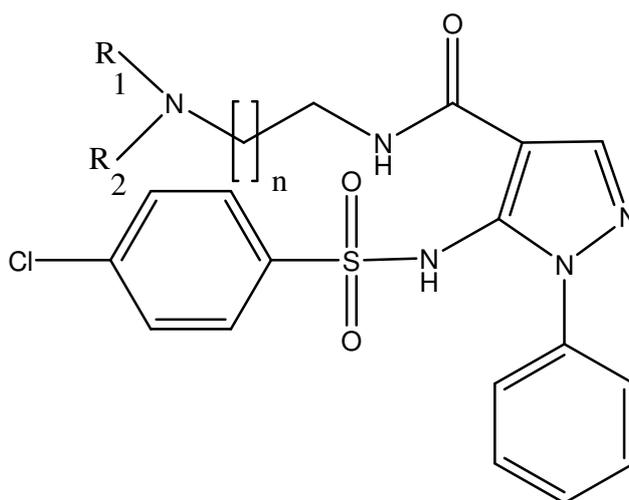
Da die Substanzen **4a-4e** bei Standardmessbedingungen ausgefallen sind, wurde die Inkubationszeit auf 20 min verlängert. Durch diese Inkubationszeitverlängerung erwartete man eine Wirkungssteigerung der Substanzen.

Bei der Substanzen **4a** und **4d** führt die Inkubationszeitverlängerung zu einer ca. 3-fachen Steigerung der Hemmaktivität von 300 $\mu\text{mol/L}$ auf 110 und 90 $\mu\text{mol/L}$. Bei der Substanz **4b** bringt die Verlängerung der Inkubationszeit keine Wirkungssteigerung mit sich.

3.1.3.4 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Dimethyl und Diethylpartialstruktur(5)

Als nächstes sollte der Einfluß eines weiteren lipophilen Restes in der Seitenkette untersucht werden. Dadurch wurde das sekundäre Amin der Seitenkette der Verbindungen der Substanzklasse **4** zu einem tertiären Amin modifiziert. Die *in vitro* Ergebnisse und die Strukturen der Verbindungen der Substanzklasse **5** sind in der Tabelle 49 aufgeführt.

Tab. 49: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **5**



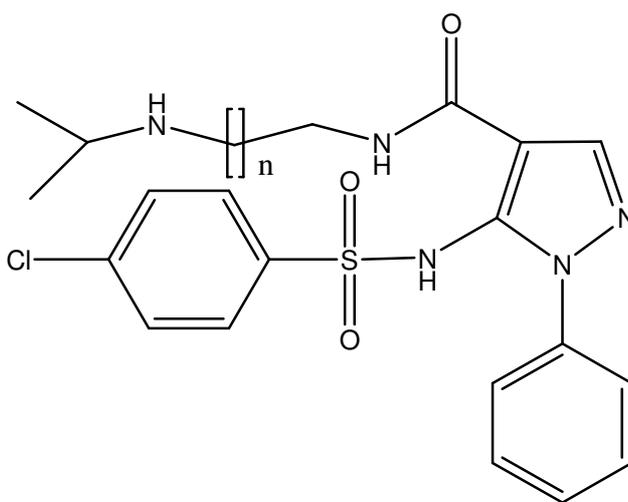
Nr.	n	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/L}$]
5a	1	CH ₃	CH ₃	>300
5b	2	CH ₃	CH ₃	>300
5c	2	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	>300

Wie aus der Tabelle 49 zu entnehmen ist, wird bei keiner Verbindung der Substanzklasse **5** antiaggregatorische Aktivität festgestellt.

3.1.3.5 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1-H-pyrazol-4- carboxamide mit verzweigte Alkylamino-Partialstruktur(6)

Als nächstes sollte der Einfluß eines lipophilen voluminösen Restes in der Seitenkette untersucht werden. In der Tabelle 50 sind die Strukturen und die Borntest-Ergebnisse der Verbindungen der Substanzklasse **6** dargestellt.

Tab. 50: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **6** (n.t.nichtgetestet)



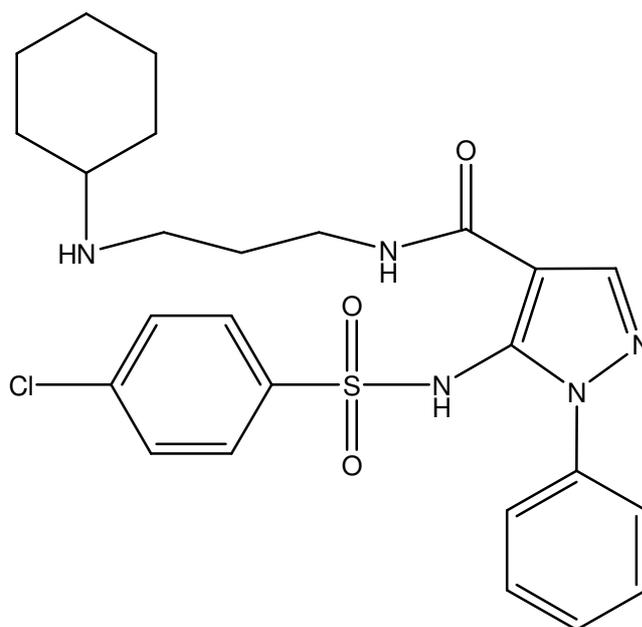
Nr.	n	IC ₅₀ [µmol/L]	
		4min	20min
6a	1	>300	>300
6b	2	>300	n.t.

Diese Strukturänderung brachte keinen Anstieg der antiaggregatorische Wirkung mit sich. Auch nach 20 minütiger Inkubationszeit könnte keine antiaggregatorische Aktivität festgestellt werden.

3.1.3.6 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Cycloalkylamin-Partialstruktur(7)

Als nächstes sollte der Einfluß einer Cyclohexylgruppe als voluminöse lipophile Gruppe in der Seitenkette anstelle der Isopropylgruppe untersucht werden. In der Tabelle 51 wird die halbmaximale Hemmkonzentration im Born-Test der Verbindung **7** angegeben.

Tab. 51: Halbmaximale Hemmkonzentration der Verbindungen **7** (*fällt als feiner Niederschlag aus)



Nr.	IC ₅₀ [µmol/L]	
	4min	20min
7	>300*	28

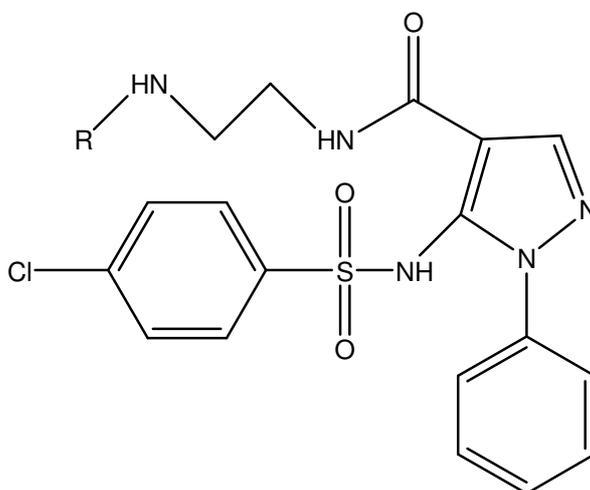
Bei der Substanz **7** kam es nach Verlängerung der Inkubationszeit zu einer 10-fachen Wirkungssteigerung von IC₅₀-Wert 300 auf 28 µmol/L.

3.1.3.7 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Phenyl und Phenylmethyl-Partialstruktur(8)

Bei den Carboxamiden vom Typ **8** (mit Phenyl oder Phenylmethylgruppe in der Seitenkette), deren IC₅₀-Werte in der Tabelle 52 auf Seite 86 zusammengefasst wurden, sind keine

antiaggregatorische Aktivitäten bei Standardmeßbedingungen festzustellen. Bei der Substanz **8a** wurde nach 20 minütiger Inkubationszeit eine mäßige Aktivität festgestellt.

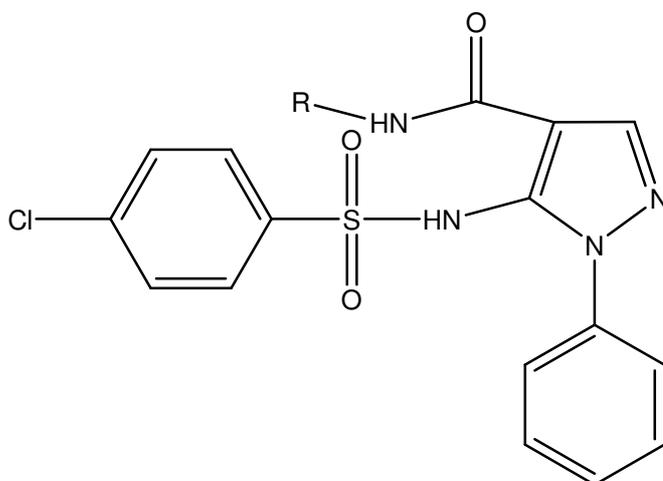
Tab. 52: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **8** (n.t.nichtgetestet)



Nr.	R	IC ₅₀ [µmol/L]	
		4min	20min
8a	Phenyl	>300	120
8b	Phenylmethyl	>300	n.t.

3.1.3.8 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit gesättigtem Heterocyclus in der Seitenkette(9)

Straub et al^[47] beobachteten eine Aktivitätssteigerung der löslichen Guanylatcyclyase (sGC) durch die Variation an **YC-1** durch die Einführung basischer Heterocyclen in der Seitenkette. Daher sollte bei dieser Substanzklasse das basische Zentrum durch gesättigte N-Heterocyclen gebildet werden. Es sollte untersucht werden, wie diese Strukturvariation die antiaggregatorische Aktivität der Substanzen beeinflusst. In Tabelle 53 auf der Seite 87 sind die Ergebnisse des Born-Tests der Verbindungen der Substanzklasse **9** zusammengefasst.

Tab. 53: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **9** (*fällt als feiner Nieder schlag aus)

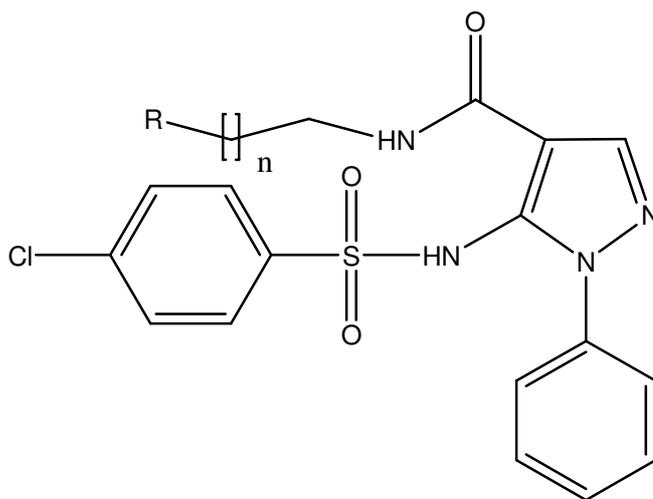
Nr.	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
		4min	20min
9a	2-Pyrrolidin-1-yl-ethyl	>300	n.t.
9b	3-Pyrrolidin-1-yl-propyl	>300*	n.t.
9c	1-Piperidin-4-yl-methyl	>300	n.t.
9d	2-Piperidin-1-yl-ethyl	>300	n.t.
9e	1-Phenylmethyl-4- piperidinyl	63*	125

Substanz **9e** ist die einzige Substanz unter der dargestellten Verbindungen dieser Substanzklasse mit antiaggregatorische Eigenschaften. Der IC₅₀-Wert der Substanz **9e** wird nach 20 minütiger Inkubationszeit von 63 auf 125 μmol/L erhöht.

3.1.3.9 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit ungesättigtem Heterocyclus in der Seitenkette(10)

Als nächstes sollte der Einfluß eines ungesättigten Heterocyclus in der Seitenkette anstelle des gesättigten Heterocyclus untersucht werden. In der Tabelle 54 sind die Born-Test Ergebnisse der Verbindungen der Substanzklasse **10** zusammengefasst.

Tab. 54: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **10**



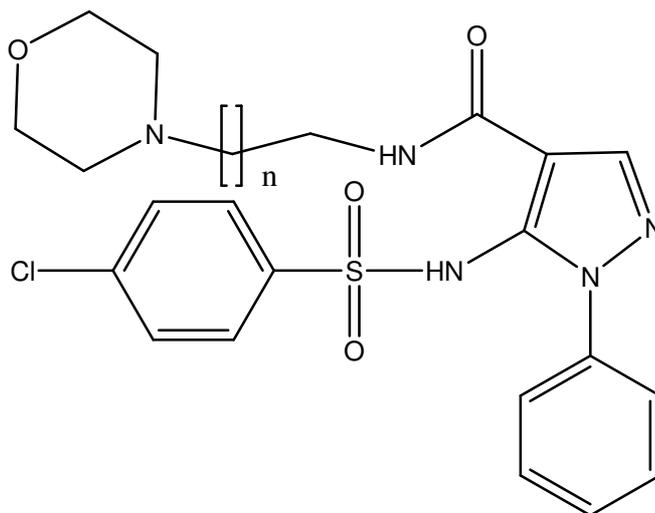
Nr.	n	R	IC ₅₀ [μmol/L]
10a	1	2-Pyridyl	>300
10b	2	(Imidazol-1-yl)	>300
10c	2	1- Pyrrolidinyl	>300

Bei allen dargestellten Verbindungen konnte kein IC₅₀-Wert unter 300 μmol/L erreicht werden.

3.1.3.10 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Morpholin-Partialstruktur(11)

Es sollte untersucht werden, wie die Einführung von weiteren Heteroatomen in den Cyclus die antiaggregatorische Eigenschaften der Substanzen beeinflusst.

Tab. 55: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **11** (n.t.nichtgetestet)

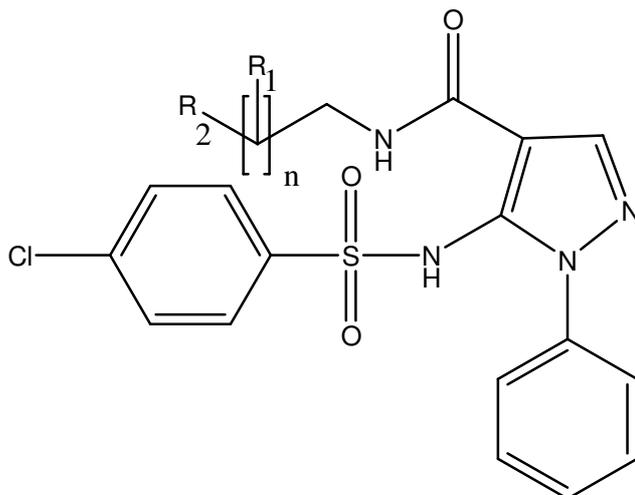


Nr.	n	IC ₅₀ [μmol/L]	
		4min	20min
11a	1	>300	>300
11b	2	>300	n.t.

Diese Strukturabwandlung brachte keinen Anstieg der antiaggregatorische Wirkung mit sich.

3.1.3.11 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Alkohol-Partialstruktur(12)

Um die Strukturähnlichkeit zu der **YC1**, einem Guanylatcyclaseaktivator zu erhöhen, wurden die Carboxamide von Typ **12** dargestellt. In der Tabelle 56 auf der Seite 90 sind die Born-Test Ergebnisse der Verbindungen der Substanzklasse **12** zusammengefasst.

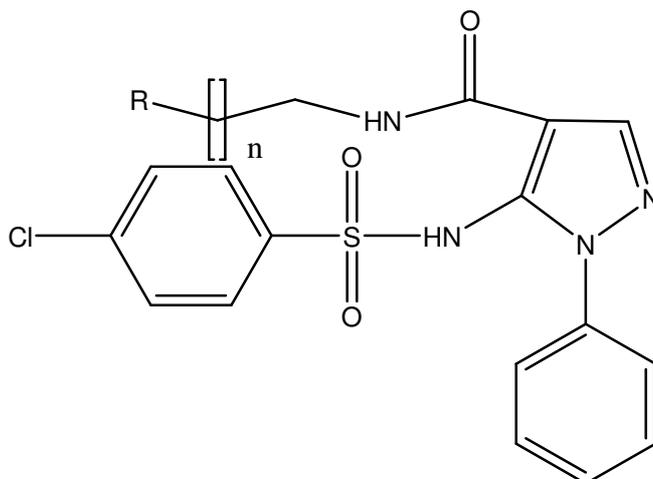
Tab. 56: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **12**

Nr.	n	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μmol/L]
12a	2	H	OH	>300
12b	2	OH	OH	>300
12c	1	H	O-CH ₂ -CH ₂ -OH	>300
12d	1	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	>300
12e	2	H	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	>300

Bei den Verbindungen der Substanzklasse **12** sind keine antiaggregatorische Effekte festzustellen.

3.1.3.12 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Ether-Partialstruktur(13)

Die Verbindungen der Substanzklasse **13** wurden synthetisiert, um nach Einführen eines lipophilen Ether-Partialstruktur anstelle der hydrophilen Alkohol-Partialstruktur den Effekt auf Thrombozytenaggregation zu untersuchen.

Tab. 57: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Verbindungen der Substanzklasse **13** (n.t.nichtgetestet)

Nr.	n	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
			4 min	20 min
13a	1	OCH ₃	249	105
13b	2	OCH ₃	190	50
13c	2	OC ₂ H ₅	>300	n.t.
13d	2	OC ₃ H ₇	>300	>300

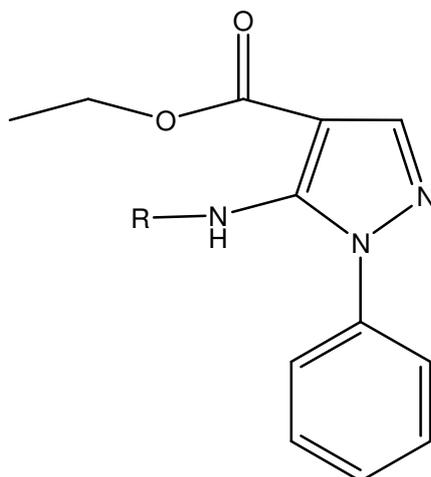
Die Verbindungen **13a** und **13b** zeigen mit 4 minütiger Inkubationszeit mit den IC₅₀-Werten von 190 und 249 μmol/L schwache antiaggregatorische Aktivität. Die Verlängerung der Inkubationszeit führt bei der Substanz **13a** zu einer 2-fachen Steigerung der Hemmaktivität auf 105 μmol/L und bei der Substanz **13b** zu einer 4-fachen Steigerung der Hemmaktivität auf 50 μmol/L. Die Substanzen **13c** und **13d** sind mit den IC₅₀-Werten >300 als wirkungslos eingestuft.

3.1.4 Weitere Carbonsäureethylester und Carboxamide mit Ether-Partialstruktur

Die Substanz **13b** mit Ether-Partialstruktur zeigte in dem Laser-Thrombose-Modell die beste antithrombotische Aktivität unter der dargestellte Verbindungen (s. Seite 106, Tab. 68). Außerdem zeigten die Verbindungen **13a** und **13b** von der Substanzklasse **13** nach 20 min. Inkubationszeit mäßige antiaggregatorische Eigenschaften. Daher sollten die Verbindungen der Substanzklassen **14-29** synthetisiert werden, um der Einfluß von anderenen Substituenten an der exocyclischen Aminogruppe auf die Thrombozytenaggregation zu untersuchen.

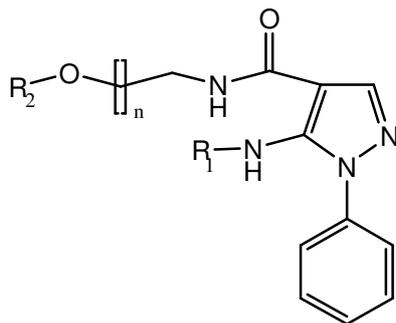
In der Tabellen 58 und 59 sind die Born-Test Ergebnisse dieser Substanzklassen zusammengefasst.

Tab. 58: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Carbonsäureethylesters



Nr.	R	IC ₅₀ [µmol/L]
14	Phenylsulfonyl	>300
16	3,4-Dichlorphenylsulfonyl	>300
18	Benzoyl	>300
20	4-Chlorbenzoyl	>300
22	2,4-Dichlorbenzoyl	>300
24	3,4-Dichlorbenzoyl	>300
26	2-Naphthylsulfonyl	>300
28	1-Biphenylcarbonyl	>300

Tab. 59: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Carboxamiden



Nr.	n	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μmol/L]
15	2	Phenylsulfonyl	CH ₃	>300
17a	1	3,4-Dichlorphenylsulfonyl	CH ₃	>300
17b	2	3,4-Dichlorphenylsulfonyl	CH ₃	>300
17c	2	3,4-Dichlorphenylsulfonyl	C ₂ H ₅	>300
19a	1	Benzoyl	CH ₃	>300
19b	2	Benzoyl	CH ₃	>300
21a	1	4-Chlorbenzoyl	CH ₃	>300
21b	2	4-Chlorbenzoyl	CH ₃	>300
21c	2	4-Chlorbenzoyl	C ₂ H ₅	>300
23a	1	2,4-Dichlorbenzoyl	CH ₃	>300
23b	2	2,4-Dichlorbenzoyl	CH ₃	>300
23c	2	2,4-Dichlorbenzoyl	C ₂ H ₅	>300
25a	1	3,4-Dichlorbenzoyl	CH ₃	>300
25b	2	3,4-Dichlorbenzoyl	CH ₃	>300
25c	2	3,4-Dichlorbenzoyl	C ₂ H ₅	>300
27a	1	2-Naphthylsulfonyl	CH ₃	>300
27b	2	2-Naphthylsulfonyl	CH ₃	>300
27c	2	2-Naphthylsulfonyl	C ₂ H ₅	>300
29a	1	1-Biphenylcarbonyl	CH ₃	>300
29b	2	1-Biphenylcarbonyl	CH ₃	>300

Alle Verbindungen der Substanzklasse **14-29** zeigten keinen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation. Weder der Austausch der 4-Chlorphenylsulfonylgruppe durch eine lipophilere Gruppe noch durch eine andere stärker elektronenziehende Gruppe z.B. durch weitere Chlorsubstituenten an dem Phenylring der Phenylsulfonamidgruppe erzielen eine antiaggregatorische Wirkung.

3.1.5 Andere Aggregationsinduktoren

Die Aktivität einiger Substanzen im Born-Test sollte durch Verwendung von anderen spezifischeren Induktoren als Kollagen näher untersucht werden. Als Aggregationsinduktoren wurden Adenosindiphosphat (ADP)^[58], Adrenalin^[59,60] bzw. PAF („platelet activating factor“)^[61,62] zugesetzt. Die entsprechenden Referenzsubstanzen und ihre IC₅₀-Werte sind in der Tabelle 60 aufgelistet^[43].

Tab. 60: Weitere Aggregationsinduktoren mit ihren Referenzsubstanzen und deren halbmaximalen Hemmkonzentrationen im Born-Test

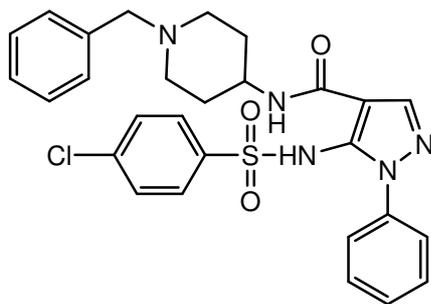
Induktor	Referenzsubstanz	IC ₅₀ [µmol/L]
Kollagen	Acetylsalicylsäure	175
ADP	5-(N-Ethylcarboxamido)-adenosin (NECA)	1
Adrenalin	Phentolaminmesylat	2
PAF	Apafant (WEB-2086)	0.6

Garder et al.^[63] identifizierten 1961 ADP als ersten Plättchen-Agonisten. Nach Aktivierung der Thrombozyten wird ADP aus den elektronendichten Granula freigesetzt. ADP 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}-Rezeptoren) diese Effekte. Durch die Blockade dieser Rezeptoren wird die Thrombozytenaggregation gehemmt. PAF aktiviert hoch potent über spezifische Rezeptoren die Thrombozyten und löst dabei die Thrombozytenaggregation aus.

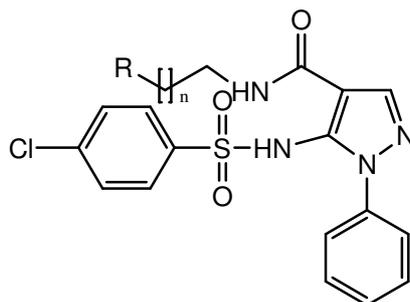
PAF, Thromboxan A₂ und ADP verstärken zusammen die durch Thrombin und Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation. PAF spielt nicht nur bei der Hämostase eine bedeutende Rolle, sondern auch bei vielen physiologischen Vorgängen wie z.B. allergischen Reaktionen^[62]. Adrenalin bindet an α₂-adrenerge Rezeptoren, die sich auf der Thrombozyten-

oberfläche befinden, und stimuliert die Aggregation^[60]. Vor allem potenziert Adrenalin die aggregatorischen Effekte der Plättchen-Agonisten wie ADP, Thromboxan A₂ (TXA₂) und PAF. In der Tabelle 61 werden die ausgewählten Substanzen vorgestellt. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 min führte bei den meisten Substanzen nach Zusatz von Kollagen zu einer Steigerung der Aktivität. Diese Inkubationszeit wird daher für die anderen Induktoren beibehalten.

Tab. 61: Strukturformeln der Substanzen **4a, 4b, 4d, 4e, 7, 8a, 9e, 13a** und **13b**



9e



4a, 4b, 4d, 4e, 7, 8a, 13a und **13b**

Nr.	n	R
4a	1	NH-CH ₃
4b	1	NH-C ₂ H ₅
4d	1	NH-C ₄ H ₉
4e	1	NH-C ₆ H ₁₃
7	2	NH-C ₆ H ₁₁
8a	1	NH-C ₆ H ₅
13a	1	O-CH ₃
13b	2	O-CH ₃

Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen der ausgewählten Substanzen mit dem entsprechenden Aggregationsinduktor sind in der Tabelle 62 angegeben.

Tab. 62: IC₅₀-Werte von **4a**, **4b**, **4d**, **4e**, **7**, **8a**, **9e**, **13a** und **13b** nach 20 min Inkubationszeit mit verschiedenen Aggregationsauslösern im Born-Test

Nr.	IC ₅₀ [μmol/L]			
	Kollagen	ADP	Adrenalin	PAF
4a	110	0.5	10	>300
4b	>300	0.094	0.58	240
4d	95	215	1.25	7.5
4e	>300	30	30	55
7	28	94	14	0.00045
8a	120	45	75	56
9e	125	65	0.12	56
13a	105	125	1.05	32
13b	50	0.54	0.0058	12.5

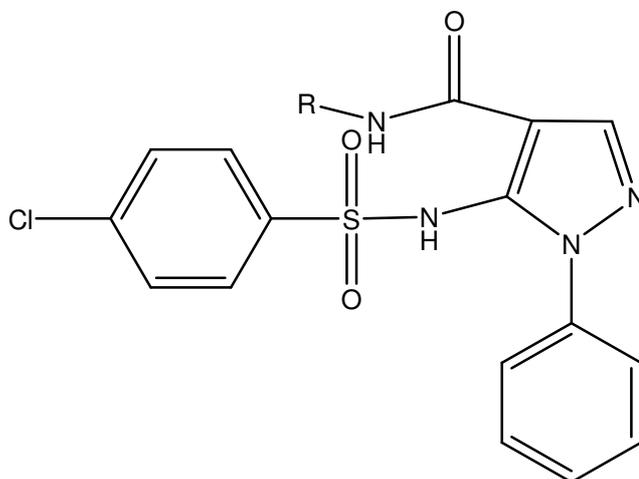
Die meisten getesteten Substanzen zeigen bei Zusatz anderen Aggregationsauslöser als Kollagen niedrigere IC₅₀-Werte. Herauszuheben sind hier besonders die IC₅₀-Werte der Substanzen **7** (IC₅₀ = 0.45 nmol/L bei PAF-induzierter Aggregation), **13b** (IC₅₀ = 5.8 nmol/L, durch Adrenalin induzierter Aggregation und 540 nmol/L bei ADP-induzierter Aggregation), **4b** (IC₅₀ = 94 nmol/L, bei ADP-induzierter Aggregation und IC₅₀ = 580 nmol/L durch Adrenalin induzierter Aggregation), **9e** (IC₅₀ = 120 nmol/L durch Adrenalin induzierter Aggregation) und **4a** (IC₅₀ = 500 nmol/L, bei ADP-induzierter Aggregation).

3.1.6 Zusammenfassung der *In vitro* Testergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Ester mit elektronenziehender Gruppe an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Pyrazolgrundgerüsts zeigen keine antiaggregatorische Eigenschaften. Unter den dargestellten Carboxamiden mit 4-Chlorphenylsulfonamidgruppe als elektronenziehender Gruppe an der Position 5 der Pyrazolgrundgerüsts (Substanzklasse **3-13**) besitzen nur einige Verbindungen der Substanzklassen **4**, **7** und **13** mäßige bis schwache antiaggregatorische Aktivität. Dabei zeigt die Struktur

der Amidkomponente eine erhebliche Variationsbreite. Die aktivsten Verbindungen dieser Substanzklassen sind in der Tabelle 63 zusammengefasst.

Tab. 63: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der Substanzen **4a**, **4d**, **7**, **13a** und **13b**



Nr.	R	IC ₅₀ [μmol/L]	
		4 min	20 min
4a	CH ₃ -NH-CH ₂ -CH ₂ -	>300	110
4d	C ₄ H ₉ -NH-CH ₂ -CH ₂ -	>300	95
7	C ₆ H ₁₁ -NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	>300	28
13a	CH ₃ O-CH ₂ -CH ₂ -	249	105
13b	CH ₃ O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	190	50

Der Austausch der 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Pyrazolgrundgerüsts gegen eine andere elektronenziehende Gruppe führt bei den dargestellten Carboxamiden zum Wirkungsverlust. Aus den Ergebnissen des Born-Tests lässt sich Folgendes schließen:

- Die 4-Chlorphenylsulfonylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Pyrazolgrundgerüsts ist für die antiaggregatorische Aktivität der Verbindungen notwendig.

- Die Amidkomponente in der Seitenkette spielt für die antiaggregatorische Eigenschaften der Substanzen eine wichtige Rolle.

- Als Substituent der Amidfunktion in 4-Position führen sowohl Aminoalkyl- (**4a**, **4d**, **7**) als auch Alkoxyalkylsubstituenten (**13a**, **13b**) zu den Verbindungen mit der ausgeprägtesten antiaggregatorischen Aktivität gegenüber Kollagen als Induktor.

Die Substanzen **4a**, **4b**, **4d**, **4e**, **7**, **8a**, **9e**, **13a** und **13b** wurden mit anderen Aggregationsinduktoren wie ADP, Adrenalin und PAF untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Substanz **7** mit einem IC_{50} -Wert von 0.45 nmol/L sehr gute PAF-antagonistische Eigenschaften besitzt. Bei der Substanz **13b** werden auch herausragende IC_{50} -Werte von 5.8 nmol/L bei Adrenalin-induzierter Aggregation und 540 nmol/L bei ADP-induzierter Aggregation gemessen. Dies deutet auf einen antiadrenergen und ADP-antagonistische Wirkmechanismus hin. Substanz **4b**, die bei Kollageninduzierter Thrombozytenaggregation $IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$ zeigte und damit als wirkungslos eingestuft war, zeigte bei ADP- und Adrenalin-induzierter Aggregation viel niedrigere halbmaximale Hemmkonzentrationen ($IC_{50} = 94 \text{ nmol/L}$, bei ADP-induzierter Aggregation und $IC_{50} = 580 \text{ nmol/L}$ bei Adrenalininduzierter Aggregation), was auf einen Wirkmechanismus über α_2 -bzw ADP-Rezeptoren zurückzuführen ist. Sehr niedrige halbmaximale Hemmkonzentration von 120 nmol/L konnte auch bei der Substanz **9e** erreicht werden, wenn Adrenalin als Aggregationsinduktor verwendet wurde. ADP-antagonistische Eigenschaften wurde auch bei der Substanz **4a** ($IC_{50} = 500 \text{ nmol/L}$) festgestellt.

Die Substanzen **4d**, **4e**, **8a** und **13a** zeigen bei den anderen Induktoren meistens niedrigere halbmaximale Hemmkonzentrationen als bei Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation. (siehe Tabelle 62).

Aus diesen Born-Test Ergebnisse mit anderen Induktoren kann man zu dem Schlussfolgerung kommen, dass die antiaggregatorische Wirkung der getesteten Substanzen über verschiedene Wirkmechanismen nämlich über antiadrenerge, ADP-antagonistische und/oder PAF-antagonistische Wirkmechanismen erreicht wird.

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. Eine Untersuchung der vielversprechendsten Substanzen auf ihre antithrombotischen Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen sollte daher auch *in vivo* durchgeführt werden.

Im Arbeitskreis Rehse^[64] wird für diese Untersuchungen ein Laser-Thrombose-Modell (Abb. 30) eingesetzt, das auf Versuchen von Weichert^[65] und Seiffge^[66] basiert und von Kesselhut^[67] und Schein^[68] etabliert wurde. Ciborski^[69] standardisierte die Methode und entwickelte statistische Verfahren zur Auswertung.

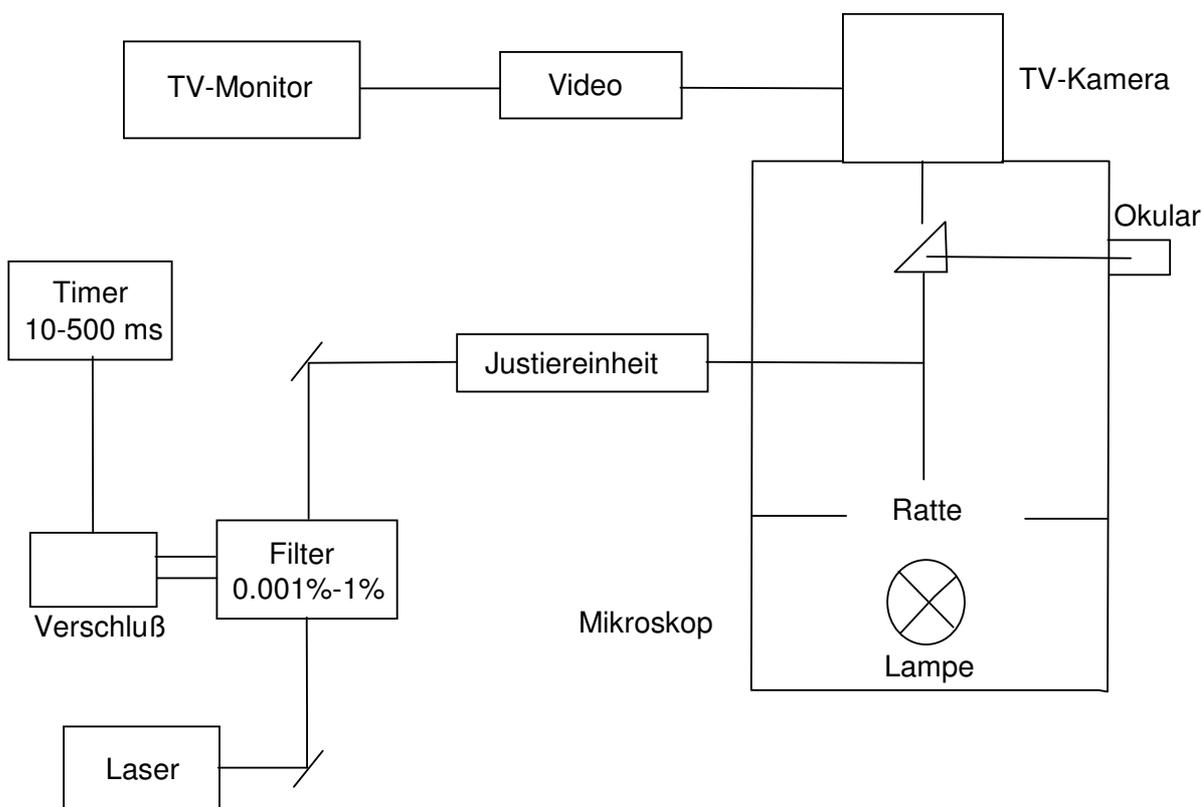


Abb. 30: Schematischer Aufbau des Laser-Thrombose-Modells

Methode:

Die freigelegten Mesenterialgefäße von männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 130-150g werden mit einem Laser beschossen. Durch die Schädigung der Gefäßinnenwand werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt und aggregationsauslösende Substanzen wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP) aus zerstörten Erythrozyten abgegeben. Durch diese Faktoren werden die Thrombozyten aktiviert, und lagern sich an der verletzten Gefäßwand an. Weitere aggregationauslösende und vasokonstriktorische Substanzen werden freigesetzt. Schließlich entsteht an der geschädigten Gefäßwand ein Thrombus, der hauptsächlich 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. 30)

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^[69] standardisierten Methode. Ein Thrombus liegt dann vor, wenn er die Größe eines Leukozyten (10-12 μ m) 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. Aus einem TBI von 6 ergibt sich, dass keine Thrombusbildung erfolgt. Der mittlere Thrombusbildungsindex (mTBI) ist das arithmetische Mittel der TBIs aus einer Messreihe mit einer bestimmten Anzahl von Tieren. Die Angabe als prozentuale Hemmung der Thrombusbildung dient zum besseren Vergleich der antithrombotische Wirkung der Substanzen. Dazu wird folgendermaßen umgerechnet:

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

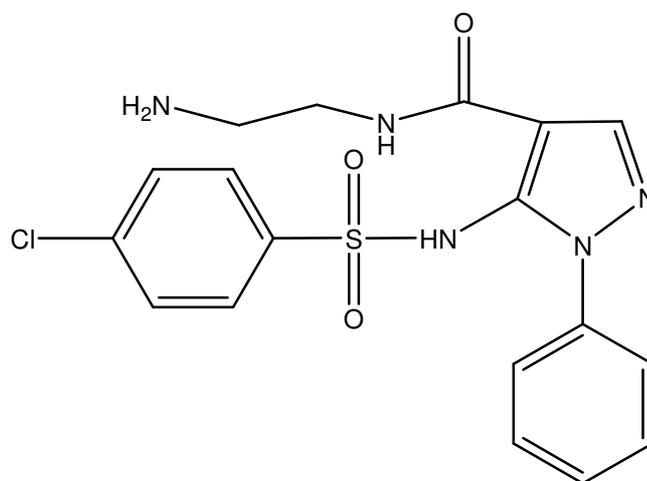
Bei $\text{mTBI}(\text{Test}) = 6$ beträgt die Hemmung der Thrombusbildung 100%, der Kontrollwert entspricht 0% Hemmung.

Die Standardabweichung s und der Standardfehler des Mittelwertes s_x errechnen sich nach den allgemein üblichen Gleichungen^[70]. Die Signifikanz der durchgeführten Messreihen wird mit Hilfe des Rangsummen-Testes nach *Wilcoxon*, *Mann* und *Whitney*^[71] überprüft. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \geq 0.1$ wird das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.) gewertet. Unter diesen Testbedingungen führt **Acetylsalicylsäure** (ASS) bei einer Dosierung von 60 mg/kg zu einer $48 \pm 10\%$ igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen und zu einer $20 \pm 5\%$ igen Hemmung in den Venolen ($\alpha \leq 0.002$)^[72]. Die Hemmwirkung bei einer Dosierung von 10 mg/kg ASS beträgt 18% in den Arteriolen und 3% in den Venolen. Bei 5mg/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 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit primäre Aminoalkyl-Partialstruktur(3)

Die Beiden Verbindungen der Substanzklasse **3** wurden im Born-Test als wirkungslos eingestuft, daher sollte nur die Substanz **3a** auf gerinnungsphysiologische Aktivität untersucht werden. Das Ergebnis der Untersuchung ist in der Tabelle 64 aufgeführt.

Tab. 64: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanz **3a**

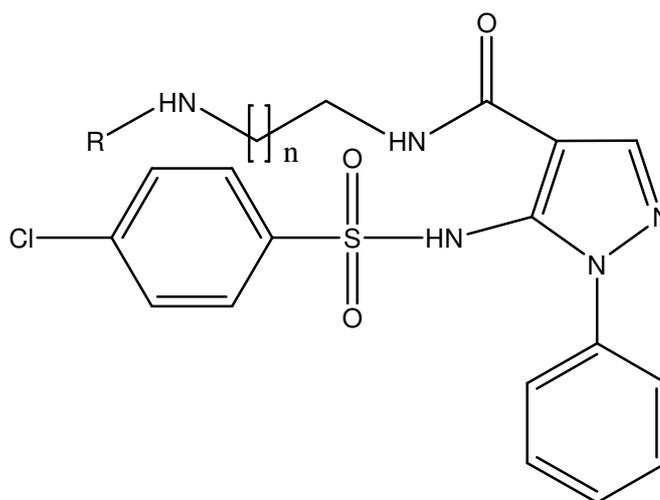


Nr.	Hemmung der Thrombusbildung			
	Venolen		Arteriolen	
	$\% \pm s_x$	α	$\% \pm s_x$	α
3a	2 ± 1	n.s.	5 ± 1	0.05

Die Substanz **3a**, die im Born-Test als wirkungslos eingestuft ist, zeigt mit einer 5%igen Hemmung der Thrombusbildung eine schwache antithrombotische Aktivität. Sie bestätigt ihre Wirkungslosigkeit in den Venolen (Hemmung der Thrombusbildung <5%).

3.2.3 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit unverzweigter Alkylamino-Partialstruktur(4)

Die Ergebnisse der untersuchten Verbindungen der Substanzklasse **4** sind in der Tabelle 65 auf der Seite 103 zusammengefasst.

Tab. 65: Hemmung der Thrombusbildung durch die Verbindungen **4a-d**

Nr.	n	R	Hemmung der Thrombusbildung			
			Venolen		Arteriolen	
			% ± s _x	α	% ± s _x	α
4a	1	n-Methyl	4 ± 1	0.02	4 ± 1	0.1
4b	1	n-Ethyl	2 ± 1	n.s.	5 ± 1	0.05
4c	1	n-Propyl	4 ± 2	0.1	4 ± 2	0.2
4d	1	n-Butyl	2 ± 1	n.s.	5 ± 1	0.05

Von den getesteten Substanzen zeigen nur die Substanzen **4b** und **4d** in den Arteriolen schwache antithrombotische Aktivität. Nur bei der Substanz **4d** wird eine Korrelation zwischen beiden Testmodellen festgestellt. Substanz **4d** mit einem IC₅₀-Wert von 110 μmol/L zeigt im Born-Test schwache antiaggregatorische Aktivität, die durch das Ergebnis im Laser-Thrombose-Modell (Hemmung der Thrombusbildung von 5%) bestätigt wird.

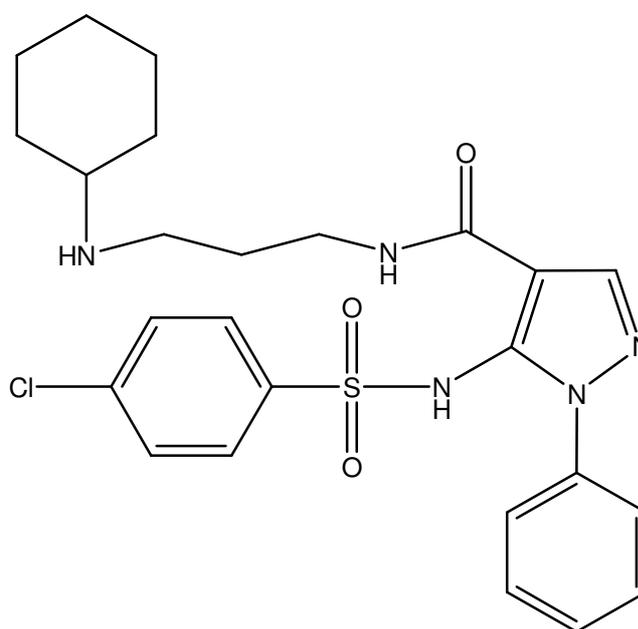
Substanz **4b** zeigt mit einer 5%igen Hemmung der Thrombusbildung in den Arteriolen auch eine schwache antithrombotische Aktivität, die das Ergebnis im Born-Test nicht bestätigen kann (IC₅₀-Wert > 300 μmol/L).

Die Unterschiede zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen können verschiedene Gründe haben z.B. Resorption der Substanz aus dem Magen-Darm-Trakt, Verteilung der Substanz im Blut und Gewebe, Plasmaeiweißbindung.

3.2.4 -(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Cycloalkylamin-Partialstruktur(7)

Substanz **7** hatte im Born-Test bei Kollagen induzierte Aggregation mäßige (IC_{50} -Wert = $28\mu\text{mol/L}$) und bei PAF-induzierte Aggregation sehr gute (IC_{50} -Wert = 0.45nmol/L) anti-aggregatorische Effekte gezeigt. Die Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanz **7** ist in der Tabelle 66 zusammengefaßt.

Tab. 66: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanz **7**



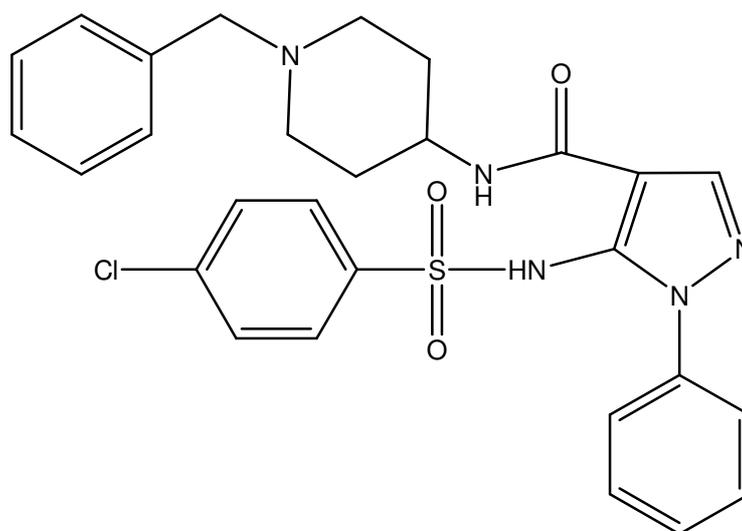
Nr.	Hemmung der Thrombusbildung			
	Venolen		Arteriolen	
	$\% \pm s_x$	α	$\% \pm s_x$	α
7	3 ± 1	0.2	4 ± 1	0.1

Gegen alle Erwartungen zeigt Substanz **7** keinen Effekt auf die Hemmung der Thrombusbildung. Die fehlende *in vivo* Aktivität der Substanz **7** kann verschiedene Ursachen haben, wie z.B. schlechte Löslichkeit der Substanz und damit verbundene schlechte Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt oder schnelle Metabolisierung der Substanz zu inaktiven Verbindungen.

3.2.5 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1-H-pyrazol-4-carboxamide mit gesättigtem Heterocyclus in der Seitenkette(9)

Aus der Substanzklasse **9** sollte die Substanz **9e** *in vivo* getestet werden, weil diese Substanz im Born-Test mäßige Effekte zeigte. In Tabelle 67 werden die Ergebnisse des *in vivo* Tests der Substanz **9e** zusammengefaßt.

Tab. 67: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanz **9e**

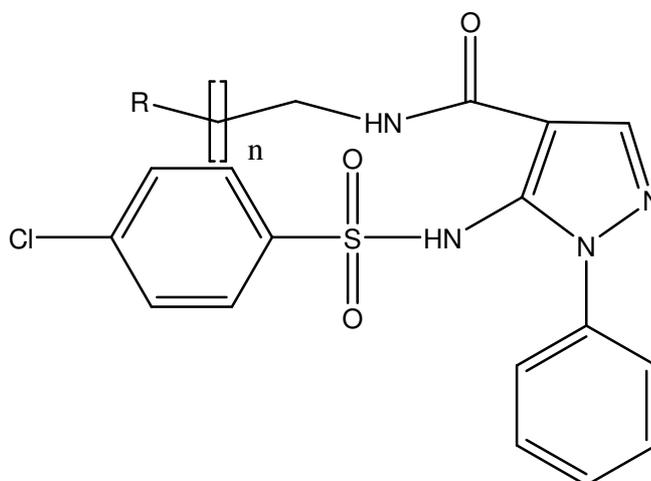


Nr.	Hemmung der Thrombusbildung			
	Venolen		Arteriolen	
	$\% \pm s_x$	α	$\% \pm s_x$	α
9e	4 ± 1	0.05	4 ± 1	0.1

Substanz **9e** zeigt keinen Effekt auf die Hemmung der Thrombusbildung, obwohl bei der im Born-Test antiaggregatorische Effekte beobachtet wurde. Die Laser Thrombose Modell bestätigt nicht die antiaggregatorische Eigenschaften der Substanz **9e**.

3.2.6 5-(4-Chlorphenylsulfonylamino)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carboxamide mit Ether-Partialstruktur(13)

Die Ergebnisse des *in vivo*-Tests der Verbindungen der Substanzklasse **13** sind in der Tabelle 68 auf der Seite 106 zusammengefaßt.

Tab. 68: Hemmung der Thrombusbildung durch die Substanz **13a-c**

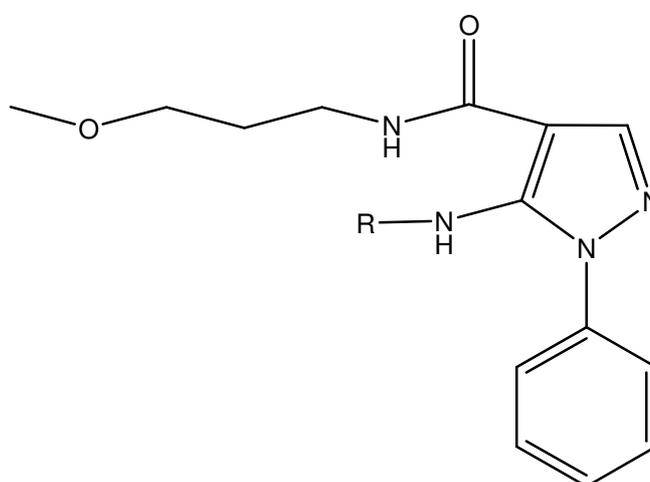
Nr.	n	R	Hemmung der Thrombusbildung			
			Venolen		Arteriolen	
			% ± s _x	α	% ± s _x	α
13a	1	O-CH ₃	2 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.2
13b	2	O-CH ₃	2 ± 2	n.s.	7 ± 2	0.05
13c	2	O-C ₂ H ₅	0 ± 1	n.s.	1 ± 1	n.s.

Von den untersuchten Verbindungen der Substanzklasse **13** zeigt nur die Substanz **13b** anti-thrombotische Aktivität. Im Born-Test zeigte diese Substanz bei Kollageninduzierter Aggregation nach 20 minütiger Inkubationszeit einen IC₅₀-Wert von 50 µmol/L und bei Adrenalin-induzierter Aggregation sehr gute IC₅₀-Wert von 5.8 nmol/L. Substanz **13a** zeigte im Born-Test mit einem IC₅₀-Wert von 105 µmol/L nach 20 minütiger Inkubationszeit mäßige anti-aggregatorische Eigenschaften. Dieses Ergebnis konnte bei dem Laser-Thrombose-Modell nicht bestätigt werden. Substanz **13c**, die exemplarisch für die im Born-Test wirkungslose Substanz der Substanzklasse **13** auch im Laser-Thrombose-Modell getestet wurde, bestätigt ihre Wirkungslosigkeit *in vivo*.

3.2.7 Weitere Carbonsäureethylester und Carboxamide mit Ether-Partialstruktur

Die beste antithrombotische Aktivität unter den bisher dargestellten Verbindungen wurde bei der Substanz **13b** gemessen. Daher sollten die Verbindungen der Substanzklassen **14-29** dargestellt und auf ihre gerinnungsphysiologische Aktivität getestet werden. Die Ergebnisse der Hemmung der Thrombusbildung durch die Verbindungen dieser Substanzklassen sind in der Tabelle 69 zusammengefasst.

Tab. 69: Hemmung der Thrombusbildung durch die Verbindungen der Substanzklassen **14-29**



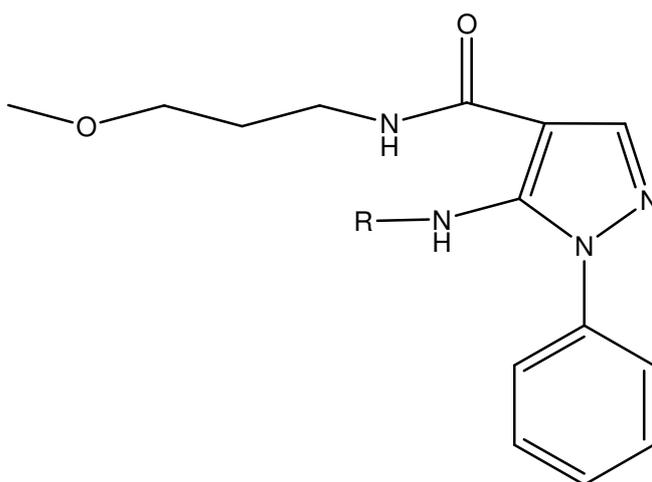
Nr.	R	Hemmung der Thrombusbildung			
		Venolen		Arteriolen	
		$\% \pm s_x$	α	$\% \pm s_x$	α
17b	3,4-Dichlorphenylsulfonyl	2 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
19b	Benzoyl	0 ± 1	n.s.	6 ± 1	0.05
21b	4-Chlorbenzoyl	0 ± 1	n.s.	3 ± 1	n.s.
25b	3,4-Dichlorbenzoyl	1 ± 1	n.s.	4 ± 1	0.1
27b	2-Naphthylsulfonyl	1 ± 1	n.s.	7 ± 2	0.02

Von den untersuchten Verbindungen zeigen die Substanzen **21b** und **27b** antithrombotische Aktivität. Im Born-Test wurden die beiden Substanzen mit einem IC_{50} -Wert > 300 als wirkungslos eingestuft.

3.2.8 Zusammenfassung der *in vivo* Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit im Laser-Thrombose-Modell untersuchten Substanzen zeigen schwache bis keine antithrombotische Aktivität. Die Substanz **13b** mit Ether-Partialstruktur zeigt mit 7%iger Hemmung in den Arteriolen und 2%iger Hemmung in den Venolen (n.s.) die *in vivo* stärkste antithrombotische Aktivität. Zweitaktivste Substanz unter den getesteten Verbindungen ist die Substanz **27b** mit 7%iger Hemmung in den Arteriolen und 1%iger Hemmung in den Venolen (n.s.). Die Substanz **19b** mit 6%iger Hemmung in den Arteriolen, ist unter den untersuchten Substanzen die dritte Substanz mit antithrombotischer Aktivität. In den Venolen ist diese Substanz ebenfalls wirkungslos. In der Tabelle 70 sind die Strukturformel und die Hemmung der Thrombusbildung durch diese drei Substanzen zusammengefasst.

Tab. 70: Hemmung der Thrombusbildung durch die Verbindungen **13b**, **19b** und **27b**



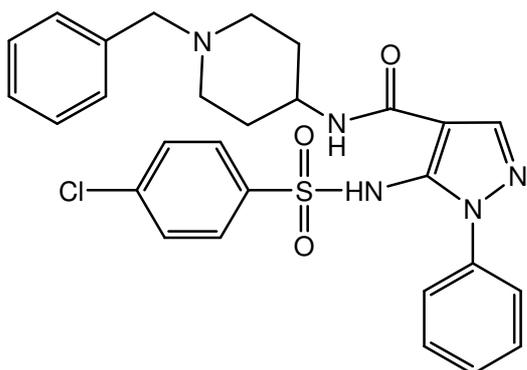
Nr.	R	Hemmung der Thrombusbildung			
		Venolen		Arteriolen	
		$\% \pm s_x$	α	$\% \pm s_x$	α
13b	4-Chlorphenylsulfonyl	2 ± 2	n.s.	7 ± 2	0.05
19b	Benzoyl	0 ± 1	n.s.	6 ± 1	0.05
27b	2-Naphthylsulfonyl	1 ± 1	n.s.	7 ± 2	0.02

Anhand der Strukturformel der Substanzen **13b**, **21b** und **27b** können folgende Strukturelemente der Substanzen für die antithrombotische Aktivität verantwortlich gemacht werden:

- Eine Methoxygruppe in der Seitenkette, deren Abstand zu der Amidfunktion drei CH_2 -Einheiten beträgt.
- Elektronenziehende Gruppe an der exocyclischen Aminogruppe in Position 5 des Pyrazolgrundkörpers, die einen Chlorsubstituenten in para-Stellung des aromatischen Ringes der Benzoyl oder Phenylsulfonylgruppe trägt.

3.3 Untersuchung zum Wirkmechanismus

Einige der im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Pyrazol-Derivate zeigen antiaggregatorische bzw. antithrombotische Eigenschaften. Die Substanzen wurden in Anlehnung an die Strukturen von **Sildenafil** (Viagra[®]), einem PDE 5-Inhibitor und **YC-1**, einem NO-unabhängigen sGC-Aktivator dargestellt. Deshalb sollte überprüft werden, ob die antiaggregatorischen bzw. antithrombotischen Effekte der getesteten Substanzen durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclasen und/oder durch die Hemmung der Phosphodiesterase vom Typ 5 ausgelöst werden. Drei strukturell unterschiedliche Substanzen mit antiaggregatorischer und/oder antithrombotischer Aktivität wurden für die Untersuchung ausgewählt. Die untersuchten Substanzen sind in der Abbildung 31 auf der Seite 110 angegeben.

**9e**

$IC_{50} = 63 \mu\text{mol/L}$ (4 min, Kollagen)

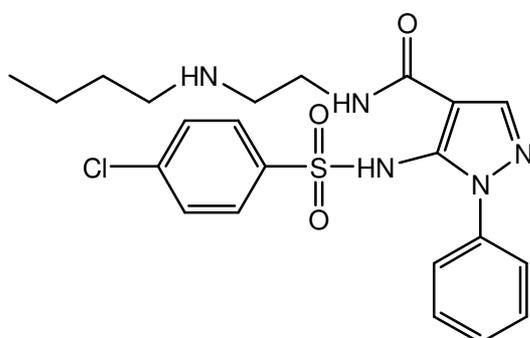
$IC_{50} = 125 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Kollagen)

$IC_{50} = 65 \mu\text{mol/L}$ (20 min, ADP)

$IC_{50} = 0.12 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Adrenalin)

$IC_{50} = 56 \mu\text{mol/L}$ (20 min, PAF)

Arteriolen: 4%

**4d**

$IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$ (4min, Kollagen)

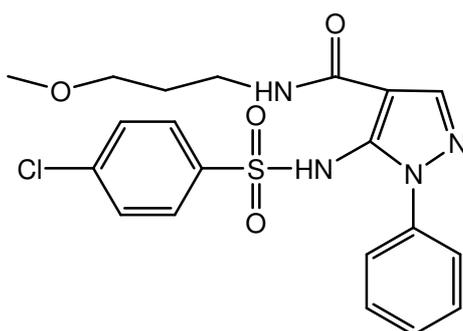
$IC_{50} = 95 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Kollagen)

$IC_{50} = 215 \mu\text{mol/L}$ (20 min, ADP)

$IC_{50} = 1.25 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Adrenalin)

$IC_{50} = 7.5 \mu\text{mol/L}$ (20 min, PAF)

Arteriolen: 5%

**13b**

$IC_{50} = 190 \mu\text{mol/L}$ (4 min, Kollagen)

$IC_{50} = 50 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Kollagen)

$IC_{50} = 0.54 \mu\text{mol/L}$ (20 min, ADP)

$IC_{50} = 0.0058 \mu\text{mol/L}$ (20 min, Adrenalin)

$IC_{50} = 12.5 \mu\text{mol/L}$ (20 min, PAF)

Arteriolen: 4%

Abb. 31: Strukturformeln von **9e**, **4d** und **13b** und ihre gerinnungsphysiologischen Daten

3.3.1 Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (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 Guanylatcyclase. Mittlerweile sind auch direkte NO-unabhängige Aktivatoren, wie **YC-1** bekannt. Der second messenger cGMP senkt über cGMP-abhängige Proteinkinase intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Thrombozyten. Dadurch kommt zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die ausgewählten Substanzen wurden im Testverfahren nach Hoenicka et al. [73] von der Fa. Bayer auf eine mögliche Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase untersucht.

In einem Radioimmunoassay wurde dabei die Bildung von $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ aus α $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gemessen. Der $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ -Gehalt wurde durch Szintillationsmessung bestimmt. Alle Messwerte wurden doppelt und die Messungen mindestens dreimal wiederholt. Eine ausführliche Beschreibung zum Versuchsaufbau und zur Methodik des Testverfahrens ist bei *Hoenicka et al.* [73] und *Stasch et al.* [74,75] zu finden. Da **YC-1** zusammen mit NO die lösliche Guanylatcyclase überadditiv aktiviert, wurden die ausgewählten Substanzen auch in Kombination mit dem NO-Donor **DEA/NO** (N,N -Diethylaminodiazemat-2-oxid, siehe Abb.32), der spontan NO freisetzt, getestet.

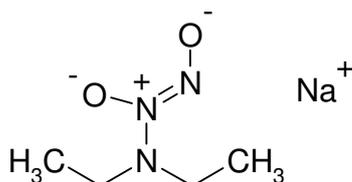


Abb. 32: Strukturformel von **DEA/NO**

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 und 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 [73] zu einer ca. 90fachen 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 bzw. antithrombotischen Eigenschaften der getesteten Substanzen sind daher nicht auf eine Stimulation der löslichen Guanylatcyclase zurückzuführen.

3.3.2 Hemmung der Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen katalysieren den Abbau von cGMP und cAMP zu den entsprechenden Monophosphaten GMP und AMP. In den Thrombozyten kommt hauptsächlich die Phosphodiesterase vom Typ 5 vor. Eine Hemmung der PDE 5 kann in den Thrombozyten über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen. Daher sind die in Abbildung 31 dargestellten Substanzen 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 Abbildung 33 schematisch dargestellt und beruht laut Produktinformation auf der Bindung von GMP an Mikroteilchen (SPA-Perlen), die aus Yttriumsilicat bestehen und mit den entsprechenden Antikörpern beschichtet sind. Dabei wird Tritiummarkiertes cGMP ($[^3\text{H}]$ -cGMP) von humaner rekombinater PDE 5 zu $[^3\text{H}]$ GMP abgebaut. Nur die nicht cyclische Form bindet an die SPA-Perlen. Die beim Zerfall von gebundenem $[^3\text{H}]$ GMP freigesetztem β -Strahlen treffen aufgrund der Nähe zu den SPA-Perlen auf das Yttriumsilicat, einem Szintillationagens und setzen Szintillation-Blitze frei, die mit einem Szintillationszähler registriert werden können. Daraus läßt sich die Konzentration an gebundenem $[^3\text{H}]$ GMP und dem zu Folge auch die Aktivität der PDE 5 bestimmen.

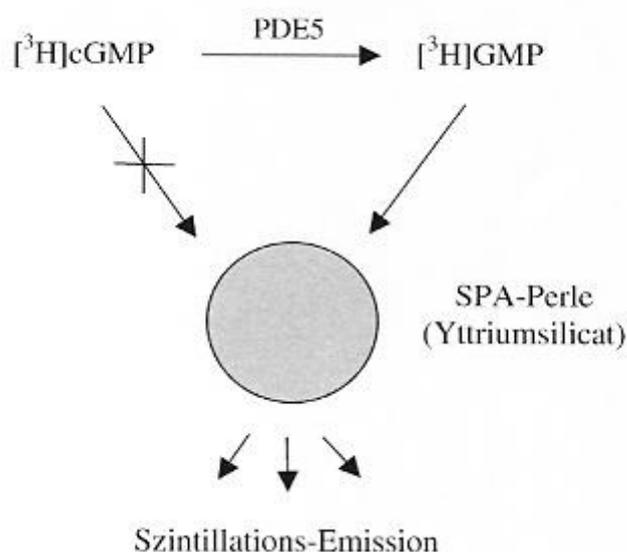


Abb. 33: Schematische Darstellung des SPA-Systems zur Bestimmung der PDE 5-Aktivität

Die ausgewählten Substanzen wurden in Konzentrationen von 1, 10, und 100 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ ^[26]. Vardenafil (Levitra)[®], einem von der Fa. Bayer entwickelten PDE 5 – Inhibitor zeigt unter den Testbedingungen einen IC_{50} -Wert von 0.7 nmol/L ^[76].

Die antiaggregatorischen bzw. antithrombotischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen sind also auch nicht auf eine Hemmung der Phosphodiesterase vom Typ 5 zurückzuführen.