

# 1 Einleitung und Problemstellung

Ein komplexes System aus pro- und antikoagulatorischen Vorgängen im Blut beeinflusst die Hämostase (vgl. *Ries*<sup>[1]</sup>). Bei Schädigung des Gefäßendothels wird eine proteolytische Kaskade initiiert, die am Ende zur Thrombusbildung führen kann. Im Blut zirkulierender von-Willebrand-Faktor (vgl. *Ruggeri*<sup>[2]</sup>) bindet an die dem Blutstrom exponierten Kollagenfasern und dem thrombozytären Glykoprotein **Ib $\alpha$**  (**GP Ib $\alpha$** ), der somit als Brückenbildner zwischen Plättchen und Subendothel fungiert. An der aktiven Thrombozytenmembran wird der **GP IIb/IIIa**-Komplex aktiviert. Dieser bindet mit dem von-Willebrand-Faktor und kann mit Fibrinogen als Brückenprotein zur Aggregation der Blutplättchen führen. Danach werden weitere Agonisten der Thrombozytenaggregation, wie Adenosin-5'-diphosphat (**ADP**), Thromboxan und „platelet activating factor“ (**PAF**) freigesetzt. Weitere Thrombozyten werden angelockt und lagern sich an der defekten Gefäßstelle an.

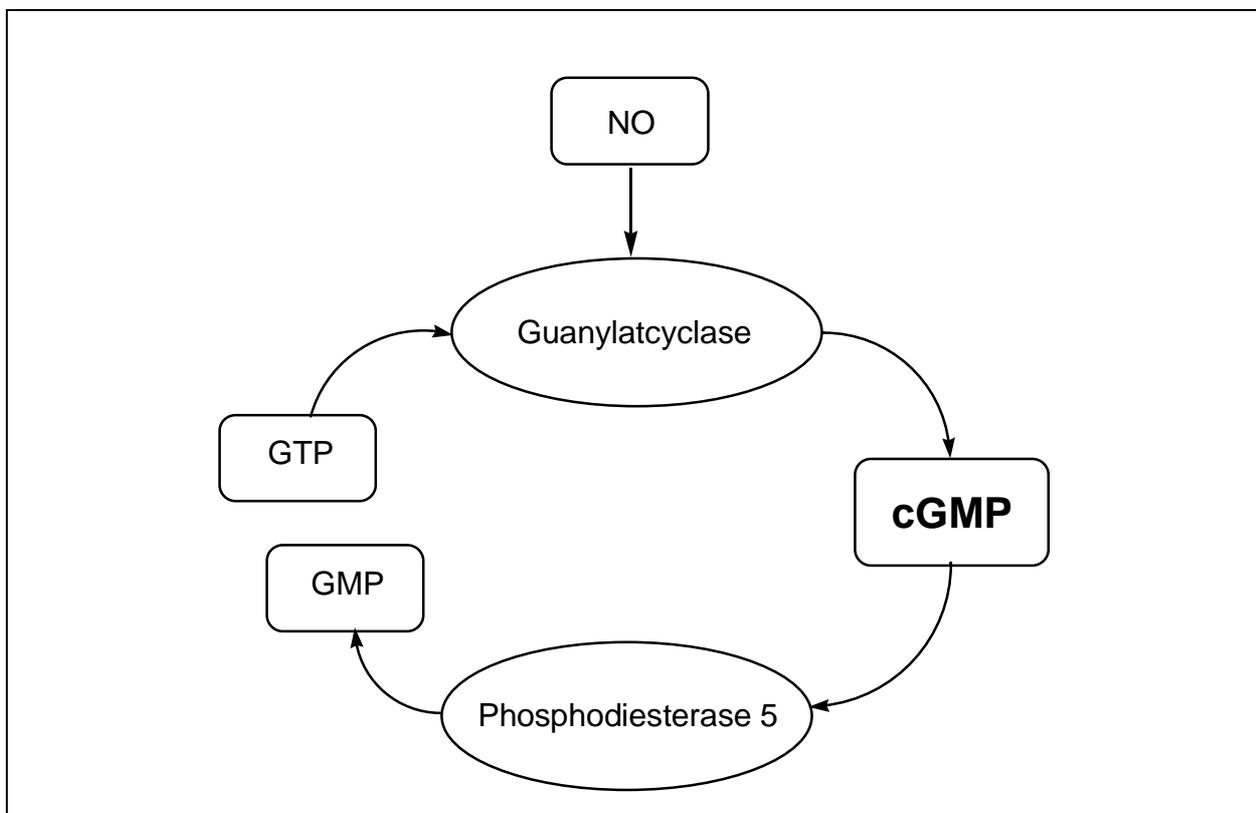
Eine pathologisch erhöhte Aktivität der Blutgerinnung wird bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie Myokardinfarkt, Apoplex und nicht stabile Angina pectoris, gefunden. Die Thrombusbildung in großen Gefäßen, z.B. durch eine Ruptur einer atherosklerotischen Plaque oder bei großen Operationen, ist gefürchtet, weil sie zu schweren thromboembolischen Ereignissen, wie Lungenembolie, führen kann. Thromboembolische Erkrankungen sind in den Industrieländern die häufigste Todesursache. Daher wird es immer wichtiger, durch geeignete Therapiemaßnahmen Thrombosen vorzubeugen und sie zu behandeln.

Von großer Bedeutung für die Entwicklung vieler Arzneistoffe war 1980 die Entdeckung des **Endthelium Derived Relaxing Factor (EDRF)** durch *Furchgott* und *Zawadski*<sup>[3]</sup>. EDRF wurde im intakten Endothel der Blutgefäße als physiologischer Faktor nachgewiesen. Er vermittelt den vasodilatierenden Effekt des Acetylcholins (vgl. *Schmidt*<sup>[4]</sup>). Wegen seiner kurzen Halbwertszeit gelang es erst 1987 *Palmer, Ferrige* und *Moncada*<sup>[5]</sup>, die Struktur mittels Chemilumineszenz als Stickstoffmonoxid (**NO**) zu identifizieren.

Stickstoffmonoxid erhöht über die Aktivierung der löslichen **Guanylatcyclase (sGC)** die Konzentration des cyclischen **Guanosin-3',5'-monophosphates (cGMP)**. Diese Reaktion ist in Abbildung 1 auf Seite 2 dargestellt.

Durch die erhöhte cGMP-Konzentration nimmt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zielzelle ab. Diese Abnahme bewirkt u.a. eine Vasodilatation und Verminderung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (vgl. *Büchler*<sup>[6]</sup> und *Shah*<sup>[7]</sup>).

Die Effekte des cGMP werden durch cGMP-abhängige **Proteinkinasen (PKG)** vermittelt (vgl. *Haslam*<sup>[8]</sup>). Ein NO-Mangel, der u.a. durch funktionseingeschränkte Endothelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen verursacht wird, kann durch Gabe von NO-Donatoren (**Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat**) teilweise oder vollständig ausgeglichen werden. NO-Donatoren werden seit Jahren bei der Behandlung von Angina pectoris verwendet (vgl. *Lehmann*<sup>[9]</sup>). Die Bildung von Nitrat-Toleranzen (vgl. *Ahlner*<sup>[10]</sup> und *Feelisch*<sup>[11]</sup>) machte aber die Suche nach NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren unverzichtbar.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Erhöhung des cGMP-Spiegels in den Thrombozyten nach *Haslam*<sup>[8]</sup>

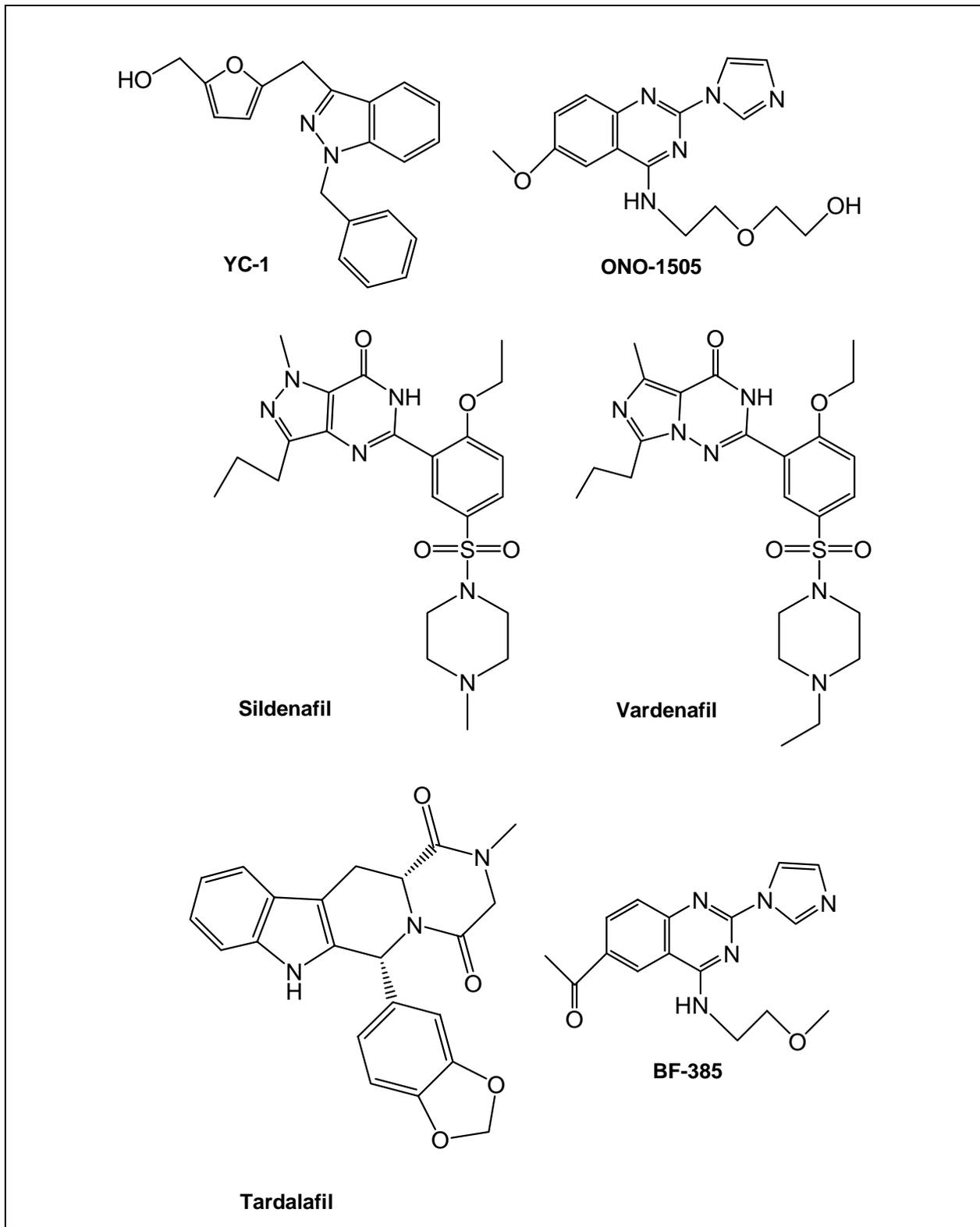
Eine wichtige Leitstruktur der NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren ist die Verbindung **YC-1**<sup>[13]</sup>. Abbildung 2 auf Seite 4 zeigt die Struktur von **YC-1**, 3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-phenylmethyl-1H-indazol. Sie wurde von der Arbeitsgruppe um *Ko*<sup>[13]</sup> 1994 entdeckt. **YC-1** aktiviert unabhängig von NO die lösliche Guanylatcyclase. Sie führt über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation (vgl. *Wu*<sup>[98]</sup>). Zudem zeigt diese Verbindung bei Mäusen antithrombotische Eigenschaften (vgl. *Teng*<sup>[99]</sup>).

Mittlerweile sind neben **YC-1** eine Reihe weiterer NO-unabhängiger sGC-Aktivatoren entwickelt worden (vgl. *Schindler*<sup>[43]</sup>, *Stasch*<sup>[101,147]</sup>). Jedoch ist keine der Verbindungen als Arzneimittel zugelassen.

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung des cGMP-Spiegels in den Blutplättchen besteht in der Hemmung des Abbaus von cGMP zu **Guanosin-5'-monophosphat (GMP)**. Von besonderer Bedeutung ist hier die cGMP-spezifische PDE-5 (siehe Abb. 1 auf Seite 2). Sie katalysiert die Hydrolyse des cGMP zu GMP.

Die Hemmung der PDE-5 durch Substanzen wie **ONO-1505**<sup>[14]</sup> oder **BF-385**<sup>[123]</sup> führt über die Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (siehe *Laight*<sup>[14]</sup>). Derzeit sind die drei Inhibitoren der PDE-5 **Sildenafil** (Viagra®)<sup>[15]</sup>, **Tadalafil** (Cialis®)<sup>[17]</sup> und **Vardenafil** (Levitra®)<sup>[16]</sup> zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt zugelassen.

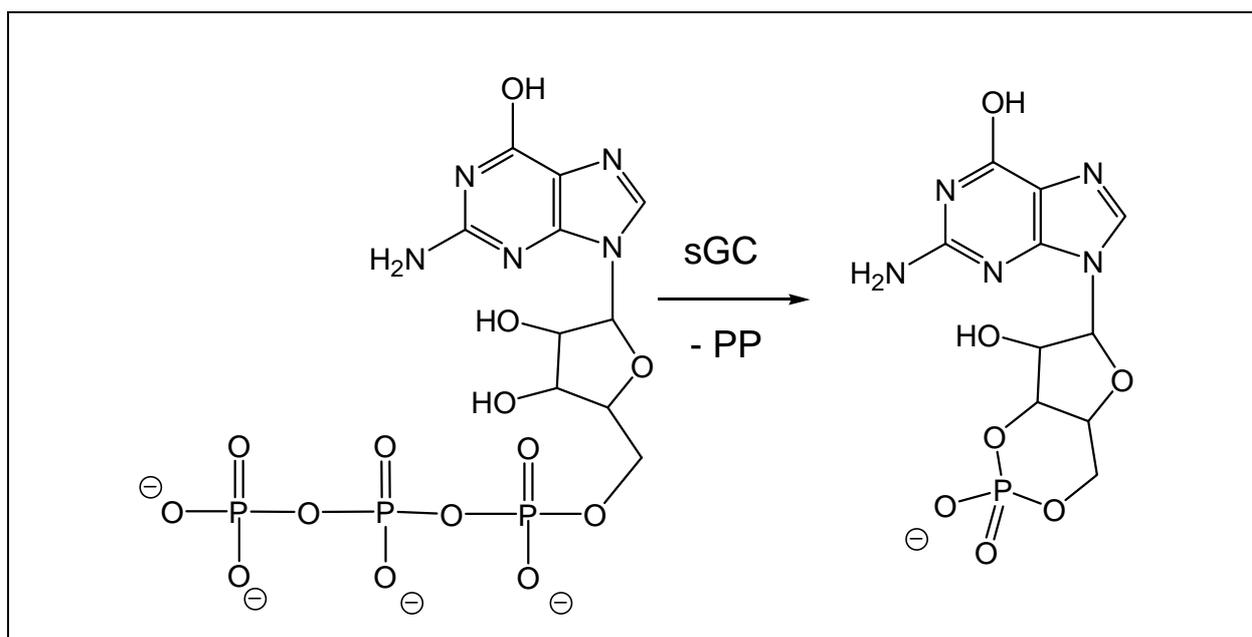
Sie inhibieren die PDE-5 im Corpus cavernosum. Diese Hemmung bewirkt eine Erhöhung der cGMP-Konzentration und führt zu einer Relaxation der penilen arteriolen Gefäßmuskulatur (siehe *Moreland*<sup>[12]</sup>).



**Abb. 2:** Strukturen von dem sGC- Aktivator **YC-1**<sup>[13]</sup> und den PDE-5-Inhibitoren **ONO-1505**<sup>[14]</sup>, **Sildenafil**<sup>[15]</sup>, **Vardenafil**<sup>[16]</sup>, **Tadalafil**<sup>[17]</sup> und **BF-385**<sup>[123]</sup>

## 1.1 Guanylatcyclasen

Guanylatcyclasen sind seit den sechziger Jahren bekannt. Sie wurden in den meisten Zellen, wie z.B. glatten Muskelzellen und Monozyten, nachgewiesen. Guanylatcyclasen katalysieren die Synthese des cyclischen Guanosin-3', 5'-monophosphates (**cGMP**) aus Guanosin-5'-triphosphat (**GTP**) (siehe Abbildung 3 unten).

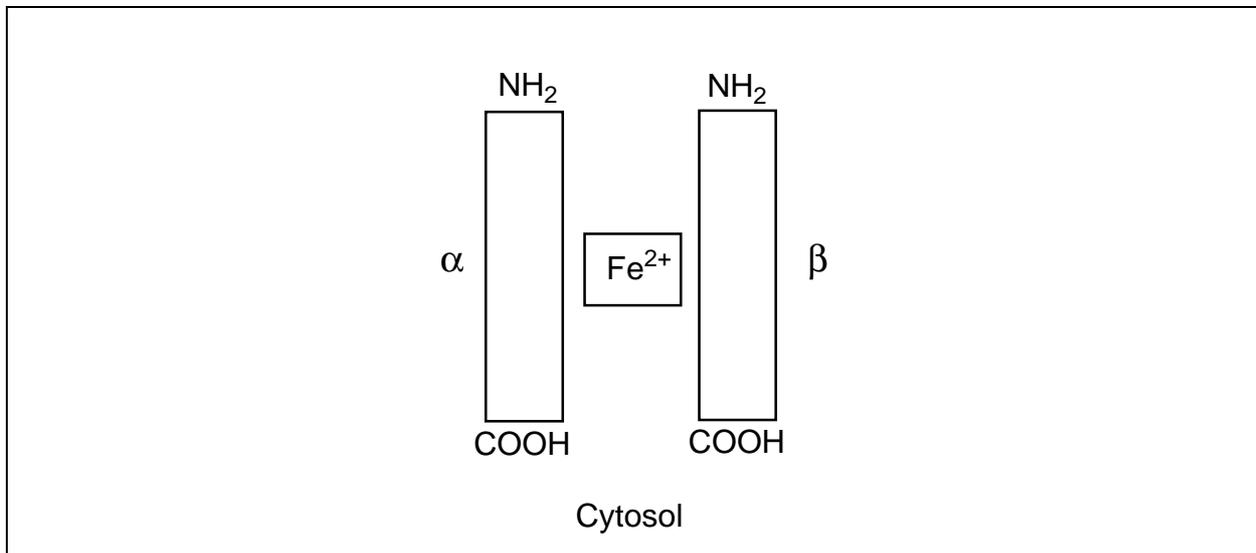


**Abb. 3:** Umsetzung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) (PP = Pyrophosphat)

Aufgrund von unterschiedlichen strukturellen Merkmalen werden die Guanylatcyclasen in membrangebundene und in lösliche Formen eingeteilt<sup>[18-20]</sup>. Die membrangebundenen oder auch partikulären Guanylatcyclasen (**pGC**) sind Homodimere, die durch natriuretische Peptide stimuliert werden (vgl. *Schmidt*<sup>[4]</sup>).

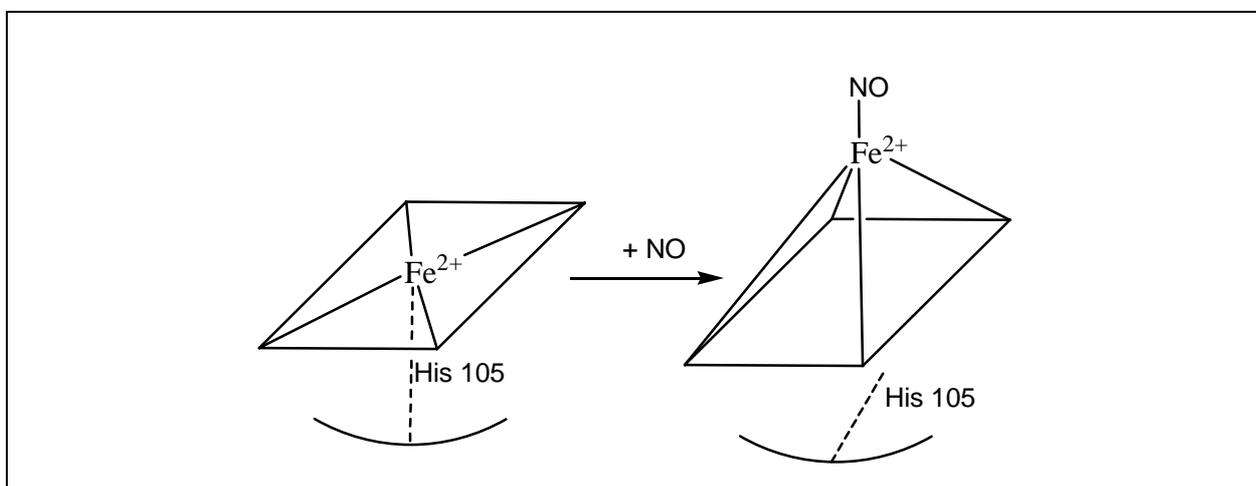
Die löslichen Guanylatcyclasen (**sGC**) werden mit NO aktiviert (siehe schematische Darstellung in Abb. 4 auf Seite 6). Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - (73 kDa bis 88 kDa) und einer  $\beta$ -Untereinheit (70 kDa bis 76 kDa). Außerdem enthalten sie pro Heterodimer ein Häm als prosthetische Gruppe. Beide Untereinheiten sind für die Katalyse notwendig (vgl. *Denninger*<sup>[22]</sup>).

Abbildung 4 stellt den schematischen Aufbau der löslichen Guanylatcyclase (sGC) dar.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) nach *Denniger*<sup>[22]</sup>

In den Thrombozyten wird nur die sGC gefunden (vgl. *Schwarz*<sup>[21]</sup>). Abbildung 5 zeigt die Aktivierung der sGC<sup>[22-24]</sup>.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Aktivierung der sGC durch NO nach *Koesling*<sup>[23]</sup>

Das Häm-Gerüst der sGC enthält Eisen als Zentralatom. Es ist vermutlich mit der Aminosäure **Histidin 105 (His-105)**, die aus dem N-terminalen Rest der  $\beta$ -Untereinheit stammt, assoziiert. NO bindet an das Eisenatom, so daß ein hexakoordinierter Komplex entsteht. Dabei wird das Eisenatom aus der Ebene des Porphyrinringes herausgehoben. Die sGC ist jetzt geringfügig stimuliert.

Die Histidin-Eisen-Bindung lockert sich. Dadurch bildet sich ein pentakoordinierter Nitrosyl-Eisen-Übergangskomplex aus. Die veränderte Konformation führt zu einer 100- bis 400fachen Aktivierung des Enzyms. GTP bindet an die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Vermutlich wird das GTP über weitere Metallionen und den Imidazol-Ring des Histidins zum cGMP umgesetzt.

Die Umwandlung vom hexa- zum pentakoordinierten Komplex stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Dieser wird durch die NO-Konzentration beeinflusst (vgl. *Zhao*<sup>[25]</sup>).

Auch Kohlenmonoxid (CO) bindet an das Eisenatom unter Bildung eines hexakoordinierten Komplexes und aktiviert die sGC um das Vierfache (vgl. *Stone*<sup>[26]</sup>). Das Eisenatom wird dabei ebenfalls aus der Ebene des Porphyrinringes herausgehoben. Eine Spaltung der Eisen-Histidin-Bindung wird nicht registriert.

Die hexa- und pentakoordinierten Komplexe wurden durch UV-spektroskopische Untersuchungen belegt (siehe *Koesling*<sup>[23]</sup>).

In der Laborpraxis ist das Phenylmethylindazolderivat **YC-1** (siehe Abb. 6 unten) eine wichtige Leitstruktur der sGC-Aktivatoren. Die Arbeitsgruppe um *Wu*<sup>[98]</sup> zeigte in ihren Versuchen, daß **YC-1** NO-unabhängig die lösliche Guanylatcyclase aktiviert. Somit wird über eine Aktivierung der sGC der cGMP-Spiegel erhöht. Die beobachtete antiaggregatorische Wirkung führte *Wu*<sup>[98]</sup> auf diesen Mechanismus zurück.

Die Gruppe um *Galle*<sup>[154]</sup> stellte zusätzlich eine Hemmung verschiedener Isoformen der Phosphodiesterasen (PDE) fest. Somit wird die cGMP-Konzentration durch die Aktivierung der sGC und durch die Hemmung der PDE erhöht.

Der genaue Wirkmechanismus von **YC-1** ist dennoch nicht vollständig geklärt (vgl. *Mayer*<sup>[27]</sup>).

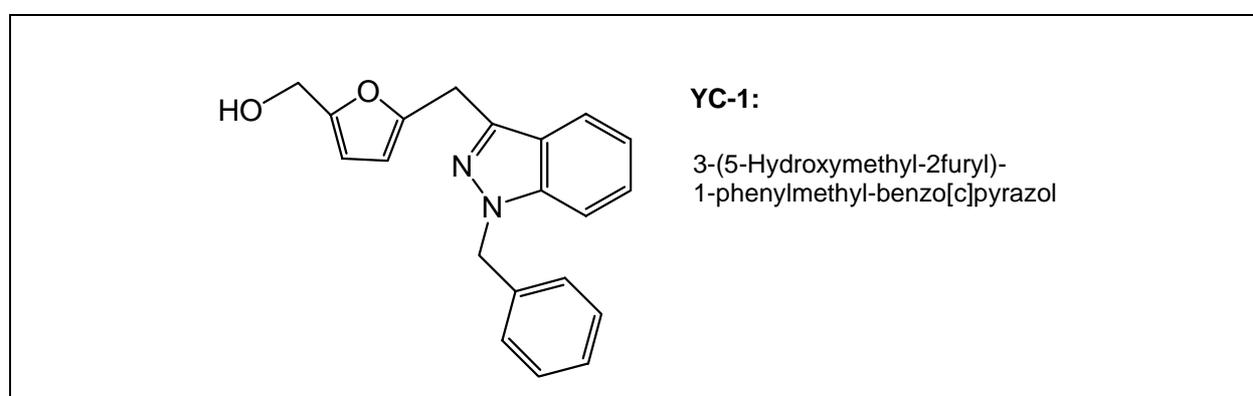


Abb. 6: Strukturformel von **YC-1**<sup>[13]</sup>

## 1.2 Phosphodiesterasen (PDE)

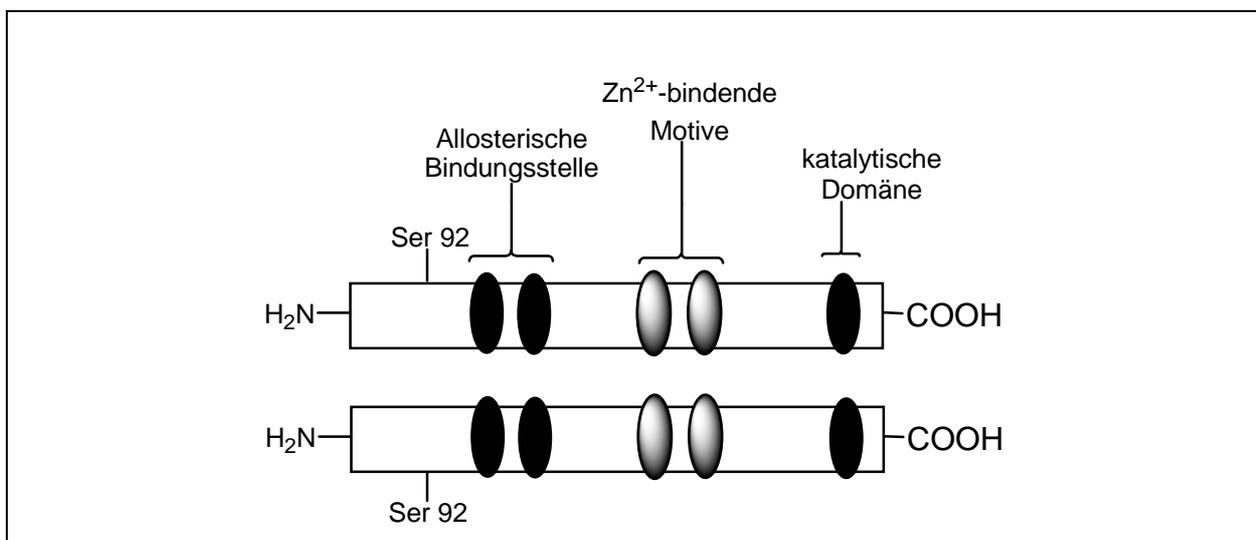
Der Abbau von cyclischen Nucleotiden wie **cGMP** und **cAMP** (cyclisches Adenosin-3', 5'-monophosphat) wird über **Phosphodiesterasen (PDE)** reguliert. Derzeit sind 11 verschiedene PDE-Familien<sup>[28-32]</sup> bekannt. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Inhibitoren, der Gewebeverteilung und ihrer Substratspezifität (siehe *Fawcett*<sup>[31]</sup> und *Nicholson*<sup>[32]</sup>). Zu den allgemeinen Strukturmerkmalen der Phosphodiesterasen (PDE) gehört eine homologe katalytische Domäne aus ca. 300 Aminosäuren am Carboxyterminus und Histidin als wichtige Aminosäure in diesem Bereich (siehe *Conti*<sup>[28]</sup>).

In den Thrombozyten befinden sich die PDE-2, die PDE-3 und die PDE-5 (siehe *Haslam*<sup>[8]</sup>). Einen Überblick über diese drei Phosphodiesterasen präsentiert Tabelle 1.

**Tab. 1:** Überblick über die Phosphodiesterasen 2, 3 und 5

Enzym	Familie	Substrat
<b>PDE-2</b>	cGMP-stimulierte PDE	cGMP, cAMP
<b>PDE-3</b>	cGMP-inhibierte PDE	cAMP
<b>PDE-5</b>	cGMP-spezifische PDE	cGMP

Die PDE-5 ist dabei mit der höchsten Konzentration vertreten. Sie katalysiert die Hydrolyse von cGMP zu GMP. Die PDE-5 reguliert die cGMP-Konzentration über den Abbau des Nucleotides. Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau der PDE-5 (siehe *Conti*<sup>[28]</sup>).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der PDE-5 nach *Conti*<sup>[28]</sup>

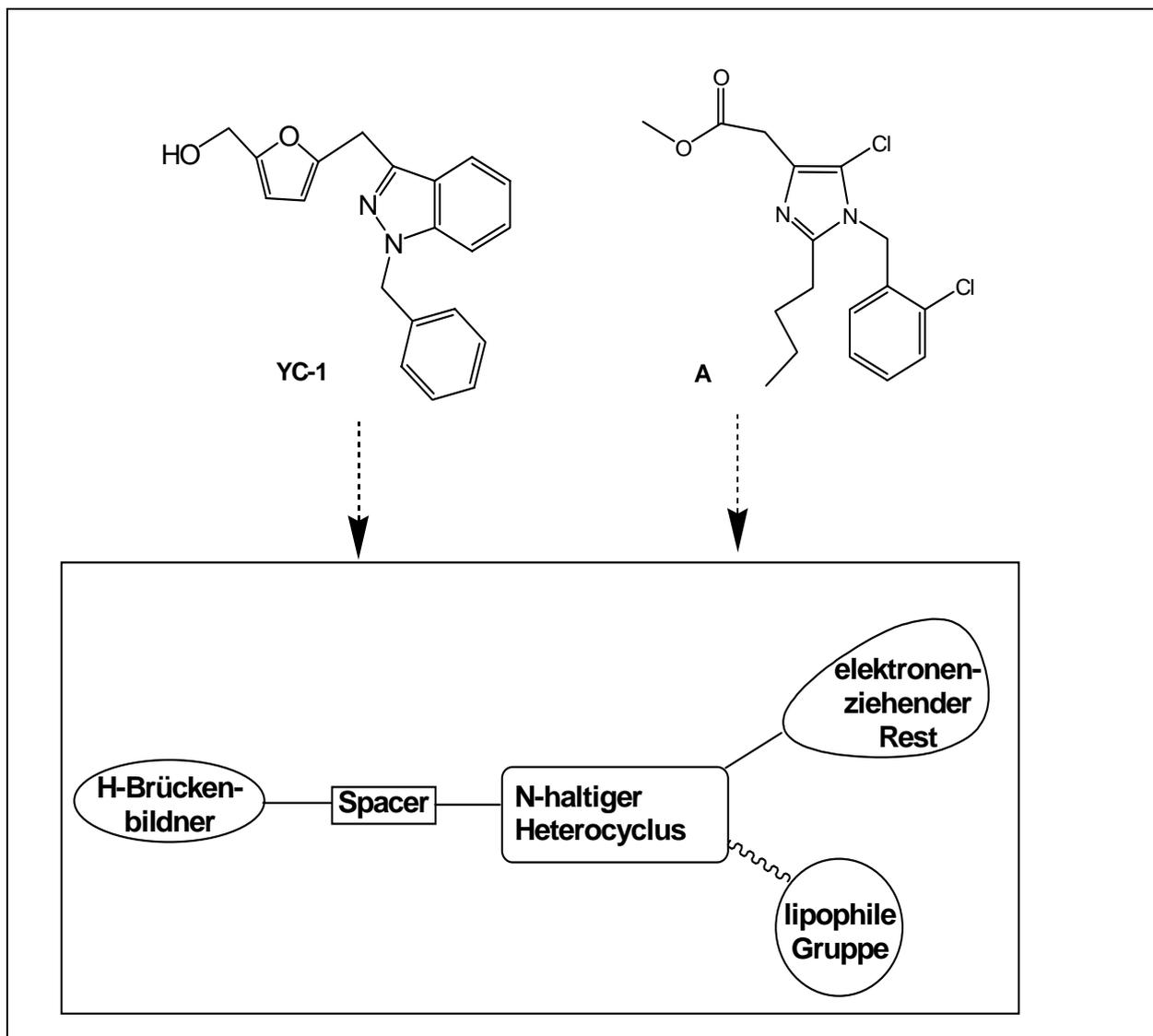
Die PDE-5 ist ein Homodimer mit einer Molekularmasse von 190 kDa. Jedes Monomer besitzt eine Phosphorylierungsstelle (Serin 92), zwei allosterische Bindungsstellen für cGMP, zwei  $Zn^{2+}$ -Bindungsmotive und eine katalytische Domäne. Die katalytische Domäne ist eine cGMP-selektive Bindungsstelle. Eine Phosphorylierung am Serin 92 durch **Proteinkinasen (PKA, PKG)** erhöht die Enzymaktivität.

Bei hohen cGMP-Konzentrationen bindet cGMP an der cGMP-Bindungsstelle der katalytischen Domäne und an der allosterischen Bindungsstelle. Zusätzlich wird das Serin 92 phosphoryliert und die Enzymaktivität erhöht. Somit wird mehr cGMP zu GMP hydrolysiert. Der Zusammenhang zwischen Zinkionenbindung, Dimerisierung der Monomere und die Aktivierung der PDE-5 ist noch nicht abschließend geklärt<sup>[33-34]</sup>.

Die Hemmung der PDE-5 durch Substanzen wie **ONO-1505** führt über die Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (siehe *Laight*<sup>[14]</sup>). Derzeit sind die drei Inhibitoren der PDE-5 **Sildenafil** (Viagra<sup>®</sup>)<sup>[15]</sup>, **Tadalafil** (Cialis<sup>®</sup>)<sup>[17]</sup> und **Vardenafil** (Levitra<sup>®</sup>)<sup>[16]</sup> zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt zugelassen. Sie inhibieren die PDE-5 im Corpus cavernosum. Diese Hemmung bewirkt eine Erhöhung der cGMP-Konzentration und führt zu einer Relaxation der penilen arteriolen Gefäßmuskulatur (siehe *Moreland*<sup>[12]</sup>).

### 1.3 Zielsetzung

Nach Vergleich von sGC-Aktivatoren wie **YC-1** und PDE-5-Inhibitoren (**ONO-1505**<sup>[14]</sup>, **Sildenafil**<sup>[15]</sup>, Substanz **A**<sup>[42]</sup>) wurde ein Arbeitsschema erstellt, das Abbildung 8 zeigt.

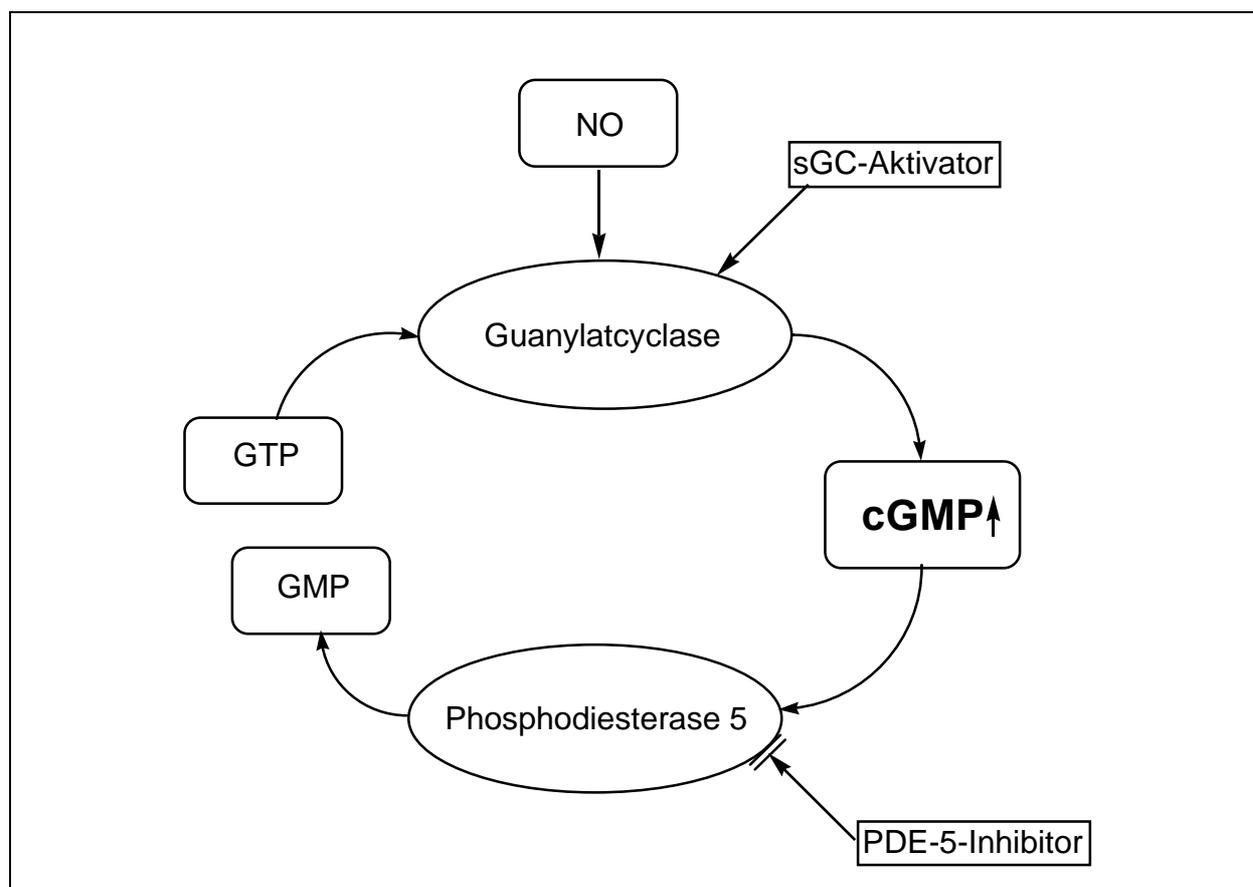


**Abb. 8:** Arbeitsschema zur Entwicklung gemischter sGC-Aktivatoren/PDE-5-Inhibitoren am Beispiel des sGC-Aktivators **YC-1**<sup>[13]</sup> und des selektiven cGMP-Phosphodiesterase-Inhibitors **A**: **YC-1**=3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-phenylmethyl-1H-indazol, siehe *Ko*<sup>[13]</sup>  
**A** = [2-*n*-Butyl-5-chlor-1-(2-chlorphenylmethyl)-1H-imidazol-4-yl]-essigsäure-methyl-ester, siehe *Booth*<sup>[42]</sup>

Die neuen Verbindungen sollen die sGC aktivieren und die PDE-5 inhibieren, um den cGMP-Spiegel in den Thrombozyten zu erhöhen. Eine hohe Konzentration an cGMP in den Thrombozyten bewirkt einen antithrombotischen Effekt.

Im Zentrum steht ein stickstoffreicher Heterocyclus, der sich von dem Imidazolgrundgerüst der Substanz **A** (vgl. Booth<sup>[42]</sup> und siehe Abb. 8 auf Seite 10) ableitet. Am Heterocyclus befindet sich ein lipophiler Rest (Arylalkylgruppe). Desweiteren ist das Ringsystem über einen Spacer mit einem Wasserstoffbrückendonator bzw. einem Wasserstoffbrückenakzeptor verbunden. Der Spacer mit dem Wasserstoffbrückenbildner bildet die Seitenkette. Zusätzlich befindet sich am stickstoffreichen Heterocyclus ein weiterer Rest, der elektronenziehende Eigenschaften besitzt, wie z.B. einen Chlorrest bzw. eine 4-Chlorphenylsulfonylaminogruppe.

Ziel dieser Arbeit ist es, Substanzen mit Imidazolgrundkörper nach dem in Abbildung 8 auf Seite 10 angegebenen Arbeitschema zu synthetisieren. Anschließend sollen die dargestellten Verbindungen auf ihre antiaggregatorischen (*in vitro*) und antithrombotischen (*in vivo*) Eigenschaften getestet werden. Die Substanzen sollen über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels (siehe Abb. 9 unten), die durch Aktivierung der sGC und/oder Hemmung der PDE-5 ausgelöst wird, die Thrombozytenaggregation hemmen.



**Abb. 9:** Modell der Erhöhung der cGMP-Konzentration durch einen gemischten sGC-Aktivator/PDE-5-Inhibitor

