

1 Einleitung und Problemstellung

Blutgerinnung stellt für den Körper ein besonders wichtigen Schutzmechanismus dar, der durch Zusammenwirken verschiedener Faktoren kontrolliert wird. Bei der Verletzung eines Gewebes adherieren Thrombozyten an verletztem Endothel und binden über thrombozytäre Glykoproteine (Ib, IX, V) an subendotheliale Strukturen. Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert und setzen Inhaltsstoffe wie z.B. Adenosin-5'-diphosphat (ADP), „platelet activating factor“ (PAF) und Serotonin frei. Durch diese Substanzen werden weitere Thrombozyten aktiviert. Die aktivierten Thrombozyten lagern sich über GPIIb/IIIa Rezeptoren aneinander (Aggregation), wobei Fibrinogen als Brücke zwischen den GPIIb/IIIa-Rezeptoren benachbarten Plättchen fungiert.

Eine erhöhte Neigung zur Thrombozytenaggregation wird bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Diese gehören in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen. Daher ist die Entwicklung von Arzneistoffen, welche die Thrombozytenaggregation hemmen, von großer Bedeutung.

Die Entdeckung des Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) durch Furchgott und Zawadzki^[1] 1980 war für die Entwicklung vieler Arzneistoffe besonders wichtig. EDRF kommt im intakten Endothel der Blutgefäße vor. Er vermittelt den vasodilatierenden Effekt des Acetylcholins^[2]. Da EDRF sehr kurze Halbwertszeit hat, wurde seine Struktur erst 1987 von Palmer et al.^[3] durch Chemilumineszenz als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert.

Stickstoffmonoxid aktiviert die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Hierdurch wird die cGMP-Konzentration erhöht. Durch die Erhöhung der cGMP-Konzentration wird die Ca^{2+} -Konzentration abnehmen. Hierdurch wird unter anderem eine Vasodilatation und Verminderung der Thrombozytenadhäsion und deren Aggregation verursacht^[4,5]. Die Effekte des cGMPs werden durch cGMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt^[6]. Ein NO-Mangel, der unter anderem durch funktionseingeschränkte Endothelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen verursacht wird, kann durch Gabe von NO-Donoren (Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat) teilweise oder vollständig ausgeglichen werden. NO-Donoren werden seit Jahren bei der Behandlung von Angina pectoris verwendet^[7]. Die Bildung von Nitrat-Toleranz^[8,9] machte aber die Suche nach NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren unverzichtbar.

YC-1^[10] wurde von der Arbeitsgruppe um Ko^[10] 1994 entdeckt. Sie aktiviert unabhängig von NO die lösliche Guanylatcyclase. Die daraus resultierende Erhöhung des cGMP-Spiegels führt zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation^[11]. **YC-1** zeigt bei Mäusen antithrombotische Eigenschaften^[12]. Die Hemmung der PDE 5, die der Abbau von cGMP zu GMP katalysiert, ist eine weitere Möglichkeit der cGMP-Spiegel in Thrombozyten zu erhöhen.

1.1 Guanylatcyclasen

Guanylatcyclasen sind seit den sechziger Jahren bekannt und kommen in den meisten Zellen wie z.B. glatten Muskelzellen und Monozyten vor^[13,14]. Guanylatcyclasen katalysieren die Synthese von cGMP aus GTP (siehe Abbildung 1).

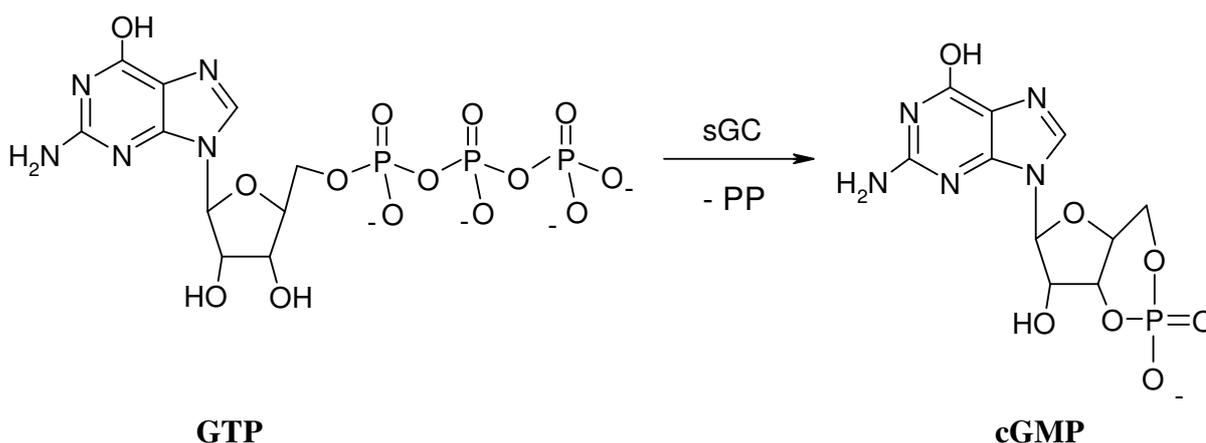


Abb. 1: Umsetzung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) (pp= Pyrophosphat)

Die Guanylatcyclasen werden aufgrund von verschiedenen strukturellen Merkmalen in die membrangebundenen und in die löslichen Formen eingeteilt^[15-17]. Die membrangebundenen oder auch partikulären Guanylatcyclasen (pGC) sind Homodimere, die durch natriuretische Peptide stimuliert werden^[3]. Die löslichen Guanylatcyclasen werden durch NO aktiviert. Sie bestehen aus einer α (73-88 kDa) und einer β -Untereinheit (70-76kDa). Sie enthalten pro Heterodimer ein Häm als prosthetische Gruppe^[18]. Beide Untereinheiten sind für die Katalyse notwendig. In den Thrombozyten sind nur die löslichen Guanylatcyclasen nachgewiesen^[19]. Abbildung 2 auf Seite 3 zeigt die Aktivierung von sGC^[20-22].

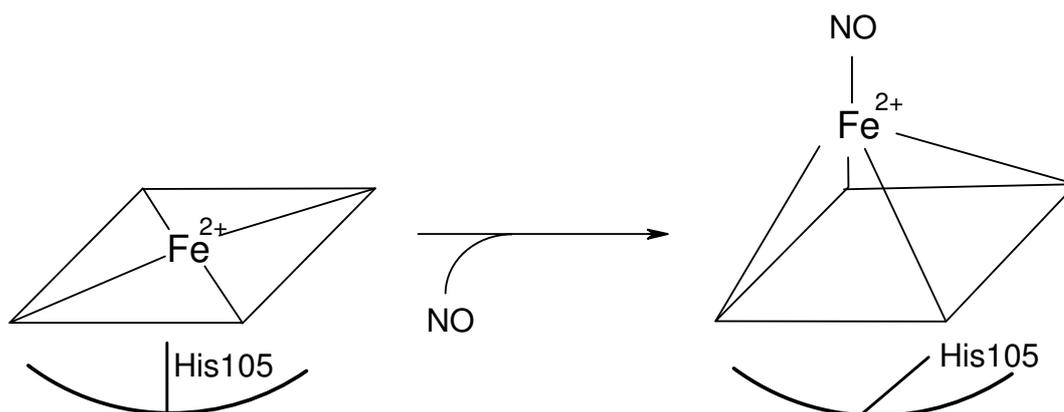


Abb. 2: Aktivierung des Enzyms sGC durch NO nach *Koesling et al*^[22]

Das Häm-Gerüst der sGC enthält Eisen als Zentralatom. Es assoziiert vermutlich mit der Aminosäure Histidin 105 (His-105), die aus dem N-terminalen Rest der β -Untereinheit stammt. 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. Wegen der veränderten Konformation kommt zu einer 100-400 fachen Aktivierung des Enzyms. GTP bindet an die löslichen Guanylatcyclasen und wird wahrscheinlich über weitere Metallionen und den Imidazol-Ring des Histidin zum cGMP umgesetzt. Die Umwandlung von hexa- zum pentakoordinierten Komplex stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und wird durch die NO-Konzentration beeinflusst^[23].

Auch Kohlenmonoxid (CO) bindet an das Eisenatom unter Bildung eines hexakoordinierten Komplexes und aktiviert die sGC um das Vierfache^[24]. 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^[25].

YC-1, ein Benzylindazol-Derivat (siehe Abbildung 3 auf Seite 4) ist eine wichtige Leitstruktur der sGC-Aktivatoren. Die Arbeitsgruppe um Wu^[11] konnte nachweisen, dass **YC-1** NO-unabhängig die lösliche Guanylatcyclase aktiviert. Durch die Aktivierung der sGC wird der cGMP-Spiegel erhöht. Die Arbeitsgruppe um Galle^[26] konnte eine Inhibition der

verschiedenen Isoformen der Phosphodiesterasen feststellen. Der genaue Wirkungsmechanismus von **YC-1** ist noch nicht vollständig geklärt^[27].

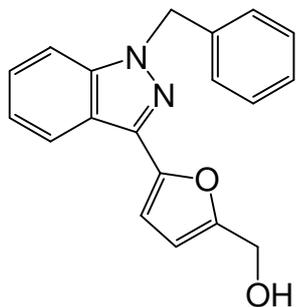


Abb. 3: Strukturformel von **YC-1**: 3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-phenylmethyl-1*H*-indazol

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 bekannt^[28-30]. In den Thrombozyten befinden sich PDE 2,3 und 5^[6] (siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Phosphodiesterasen vom Typ 2, 3 und 5

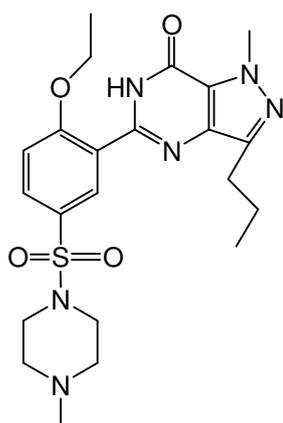
Enzym	Substrat
PDE 2 cGMP-stimulierte PDE	cGMP, cAMP
PDE3 cGMP-inhibierte PDE	cAMP
PDE5 cGMP-spezifische PDE	cGMP

Die PDE5 ist mit höchster Konzentration in den Thrombozyten vertreten und katalysiert die Hydrolyse von cGMP zu GMP (Guanosin-5'-monophosphat). Über den Abbau des Nucleotids reguliert die PDE 5 die cGMP Konzentration. Die PDE 5 ist ein Homodimer mit einer Molekularmasse von 190 kDa. In jeder Untereinheit befindet sich eine Phosphorylierungsstelle (Serin 92), zwei allosterische Bindungsstellen für cGMP, zwei Zn²⁺-Bindungsmotive und eine katalytische Domäne. Die katalytische Domäne ist eine cGMP-selektive Bindungsstelle. Wenn die cGMP-Konzentration erhöht ist, bindet cGMP an der cGMP-Bindungsstelle der katalytischen Domäne und an der allosterischen Bindungsstelle. Durch Phosphorylierung am Serin

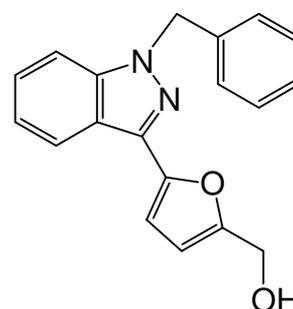
92 wird die Enzymaktivität erhöht. Der Zusammenhang zwischen Zinkionenbindung, Dimerisierung der Monomere und die Aktivierung der PDE 5 ist noch nicht vollständig geklärt^[31,32]. Die Hemmung der PDE 5 durch Substanzen wie **ONO-1505** führt über die Erhöhung des cGMP-Spiegels zu einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation^[33]. Derzeit sind drei Inhibitoren der PDE 5 **Sildenafil** (Viagra[®])^[34], **Tadalafil** (Cialis[®])^[35] und **Vardenafil** (Levitra[®])^[36], zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt zugelassen. Sie bewirken eine Relaxation der Schwellkörpermuskulatur im Penis^[37].

1.3 Zielsetzung

Nach Vergleich von sGC-Aktivatoren wie **YC-1** und PDE 5-Inhibitoren **ONO 1505**, **Sildenafil** (Viagra[®]) wurde ein Arbeitsschema entwickelt (siehe Abbildung 4).



Sildenafil (Viagra[®])



YC-1

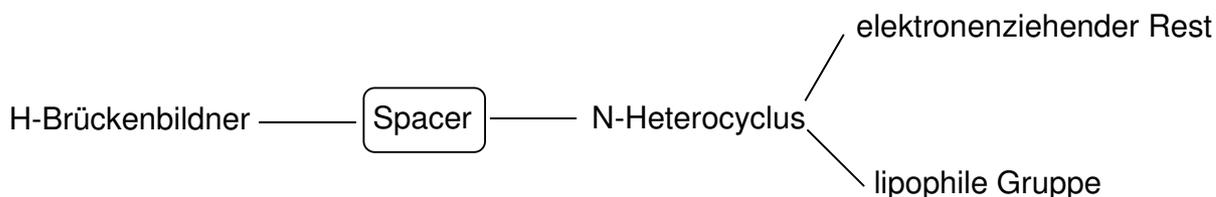


Abb. 4: Arbeitsschema zur Entwicklung von gemischten sGC-Aktivatoren/PDE 5-Inhibitoren

Die neue Substanzen sollten beide Enzyme so beeinflussen, dass die Konzentration des cGMP im Thrombozyten erhöht wird und es dadurch zu Hemmung der Thrombozytenadhäsion kommt.

Im Zentrum steht ein stickstoffreicher Heterocyclus, der mit einem lipophilen Rest (Phenylgruppe) substituiert ist. Außerdem ist das Ringsystem über einen Spacer mit einem Wasserstoffbrückendonator bzw. einem Wasserstoffbrückenakzeptor verbunden.

Am Ringsystem befindet sich noch ein weiterer Rest mit elektronenziehenden Eigenschaften wie z.B. der 4-Chlorphenylsulfonylaminogruppe.

Ziel dieser Arbeit war es, Substanzen mit Pyrazolgrundkörper nach dem in Abbildung 4 auf Seite 5 angegebenen Schema zu synthetisieren und auf ihre antiaggregatorische (*in vitro*) und antithrombotische (*in vivo*) Aktivitäten zu testen. Die Substanzen sollten über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels, die durch Aktivierung der sGC und/oder Hemmung der PDE 5 verursacht werden kann, die Thrombozytenaggregation hemmen.