

**Pentaerithrityltetranitrat, Glyceryltrinitrat,
deren bioaktive Metabolite
und andere NO-basierende Vasodilatoren**
—
Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Andreas König

geboren am 24. Februar 1977 in Mühlhausen/Thür.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann
2. Prof. Dr. Erika Glusa
3. Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.02.2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Januar 2004 bis Dezember 2007 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller Universität Jena durchgeführt.

In besonderer Weise möchte ich zwei Menschen gleichermaßen sehr herzlich danken. Zum einen Frau Professor Dr. Erika Glusa, die mich mit viel Sachverstand, Tatendrang und akademischer Disziplin, gleichzeitig verbunden mit menschlicher Herzlichkeit, an die pharmakologischen Fragestellungen herangeführt hat und in allen Phasen der Arbeit mir äußerst hilfreich zur Seite stand. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor. Dr. Jochen Lehmann, der das Thema anregte, die Arbeit mit großem Einsatz unterstützte und mit seiner freundlichen, entgegenkommenden und kreativen Art eine angenehme Arbeitsatmosphäre ermöglichte. Außerdem möchte ich ihm dafür danken, daß ich die in Erfurt begonnenen Arbeiten in Jena in seiner Arbeitsgruppe fortsetzen konnte und mir viele schöne und unvergessliche Momente wie die NO-Konferenz in Monterey oder die PETN-Expertentreffen ermöglicht wurden.

Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Für die große Kooperationsbereitschaft, erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung in den gemeinsamen Projekten danke ich Herrn PD Dr. habil. Michael Decker, Herrn Dr. Dirk Stalleicken, Herrn Dr. Dr. habil. Andreas Daiber, Herrn Dr. Jörg Konter, Frau Kathrin Lange sowie Frau Carolin Roegler.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt von ganzem Herzen bei allen Kollegen und den vielen gewonnenen Freunden im Institut, mit denen ich neben der angenehmen Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft eine wunderbare gemeinsame Zeit in Jena erleben durfte.

Mein privater und größter Dank gebührt meiner Familie, meinen Eltern Doris und Gerhard König sowie meinem Bruder Alexander König, die mich in jederlei Hinsicht auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt und gefördert hat, tiefsten Dank auch an Kathi Gülland einfach für eine schöne gemeinsame Zeit.

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Pharmakotherapie kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.1.1.	Die koronare Herzkrankheit	1
1.1.2.	Stellenwert und Anwendungsgebiete organischer Nitrate	2
	<i>Das erste organische Nitrat: Glycerylnitrat</i>	2
	<i>Entwicklung langwirksamer Nitrate</i>	4
	<i>Aktueller Arzneimittelbestand an Koronarmitteln</i>	7
	<i>Vergleichende Bewertung</i>	9
1.2.	Wirkmechanismus organischer Nitrate	10
1.2.1.	Antiischämisches Prinzip	10
1.2.2.	Wirkprinzip auf molekularer Ebene	11
1.2.3.	Bioaktivierung organischer Nitrate	13
	<i>NO aus Nitraten?</i>	13
	<i>Verschiedene Bioaktivierungshypothesen</i>	14
	<i>Die mitochondriale Aldehyddehydrogenase</i>	15
	<i>Hochpotenter Stoffwechselweg über ALDH-2</i>	16
	<i>Niedrigpotenter Stoffwechselweg über ?</i>	18
1.3.	Nitrattoleranz	18
1.3.1.	Pseudotoleranz	19
1.3.2.	Klassische Toleranz	20
	<i>Erklärungsansätze und –theorien</i>	20
2.	<u>Zielstellung</u>	23
2.1.	Vorbemerkungen	23
2.2.	Aufgabenstellungen	25
3.	<u>Übersicht der Veröffentlichungen</u>	29

4. <u>Veröffentlichungen</u>	33
Veröffentlichung 1	33
Pharmakologische Charakterisierung von Pentaerithryltetranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten und anderen organischen Nitraten an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins.	
<u>König, Andreas</u> ; Pietig, Imke; Homann, Alexander; Glusa, Erika; Fricke, Uwe; Lehmann, Jochen. In: ERDMANN, E.; MUTSCHLER, E.; STALLEICKEN, D. (Hrsg.): Pentaerithryltetranitrat: Evidenzorientiertes Therapiekonzept kardialer Erkrankungen. <i>Steinkopff Verlag, Darmstadt</i> (2004), 59-68.	
Veröffentlichung 2	43
Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol.	
Decker, Michael; <u>König, Andreas</u> ; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> (2004), 14, 4995-7.	
Veröffentlichung 3	46
Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate.	
<u>König, Andreas</u> ; Lange, Kathrin; Konter, Jörg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. <i>Journal of Cardiovascular Pharmacology</i> (2007), 50, 68-74.	
Veröffentlichung 4	53
NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.	
<u>König, Andreas</u> ; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> (2007), 17, 5881-5.	
Veröffentlichung 5	58
NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.	
Lange, Kathrin; <u>König, Andreas</u> ; Roegler, Carolin; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> . In Vorbereitung.	

5.	<u>Unveröffentlichte Ergebnisse</u>	63
5.1.	Einfluß der Nitratgruppenanzahl auf die vasodilatorische Potenz	63
5.2.	Stärkere Vasoaktivität direkter NO-Donoren am Beispiel der NONOate im Vergleich zu organischen Nitraten	65
5.3.	<i>In vitro</i> Wirkprofil von Nitraten, Nitriten und NONOaten	69
5.4.	<i>In vitro</i> Kreuztoleranzentwicklung zwischen organischen Nitraten und Nitriten nach EC ₅₀ -Bolusgabe	71
5.5.	Vasodilatorische Eigenschaften von NSAID-Nitrat-Hybridmolekülen	73
5.6.	Methoden zum Nachweis einer <i>in vitro</i> Nitrattoleranz	76
5.7.	Untersuchungen zur Kreuztoleranzentwicklung GTN vs. 1,2-GDN	77
5.8.	2-Aminoethylnitrat: <i>in vitro</i> Toleranzuntersuchungen	79
5.9.	2-Aminoethylnitrat: Bioaktivierung über ALDH-2?	80
5.10.	Untersuchung zur Bildung von ROS-Spezies bei einigen ausgewählten Mononitraten im Vergleich zu GTN	82
6.	<u>Diskussion</u>	85
6.1.	Einfluß der Nitratgruppenanzahl auf die Vasoaktivität	86
6.2.	Einfluß des nitrattragenden Rests auf die Vasoaktivität	88
	6.2.1. Synthese von strukturell verschiedenen organischen Mononitraten	88
	6.2.2. Unterschiede in den Wirkaktivitäten und deren mögliche Ursache	91
6.3.	Ein hochpotentes Mononitrat: 2-Aminoethylnitrat	92
6.4.	Nitrat-Hybridverbindungen	94
6.5.	Einfluß der Struktur organischer Nitrate auf die Toleranz	95
6.6.	Erklärungsansätze für das klinische Wirkprofil von PETN	99
7.	<u>Zusammenfassung</u>	101

8. **Conclusion** 106

9. **Literaturverzeichnis**

10. **Anhang**

Curriculum vitae

Publikationsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung

1. Einleitung

1.1. Pharmakotherapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind gegenwärtig die häufigsten Todesursachen bei Frauen und Männern in Deutschland und im europäischen Ausland.^{1,2} Aus dem im Auftrag des Bundes vom *Robert Koch-Institut* jährlich erstellten Bericht „Gesundheit in Deutschland“ geht für 2006 hervor, dass im Bundesgebiet nahezu bei jedem zweiten Verstorbenen der Tod durch eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems ausgelöst wurde. Dennoch sind die durch Herz-Kreislaufkrankheiten bedingten Todesfälle aufgrund stetig verbesserter Behandlungsmethoden seit 1990 in Deutschland kontinuierlich zurückgegangen.²

1.1.1. Die koronare Herzkrankheit

Innerhalb der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen kommt der koronaren oder auch ischämischen Herzkrankheit (KHK) die größte pathologische Bedeutung zu. Bei dieser chronischen Erkrankung der Koronargefäße wird durch morphologische oder pathophysiologische Veränderungen (z.B. Verengung oder Verschluss) eines oder mehrerer Gefäße eine Mangeldurchblutung der Herzens (Ischämie) verursacht. Damit ist in der Herzmuskulatur in Abhängigkeit von der Belastungssituation die Balance zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch gestört.

Vor allem die größeren Koronargefäße können von der Manifestation einer Arteriosklerose betroffen sein, der sogenannten Koronarsklerose. Eine Einengung (Stenose) der koronaren Strombahn ist die Folge und kann zusätzlich durch Thrombenbildung zum teilweisen oder vollständigen Verschluss von Koronararterienästen führen. Die Koronarsklerose zählt zu den wichtigsten Ursachen der KHK. Neben dieser können aber auch Herzklappenfehler, vegetative Fehlsteuerungen, Arrhythmien, Anämien oder Bluthochdruck das Krankheitsbild herbeiführen oder begünstigen.

Das hochvariable Spektrum der KHK erstreckt sich je nach Schweregrad von der asymptomatischen Form zu Beginn der Erkrankung über die Angina pectoris bis hin zum Myokardinfarkt (Herzinfarkt) oder Sekundenherztod („Herzschlag“). Als gesicherte Koronarsklerose-fördernde Risikofaktoren gelten Rauchen, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, Übergewicht und daraus schließlich resultierend

die endotheliale Dysfunktion. Der Vermeidung dieser Risikofaktoren, auch durch präventivmedizinische und therapeutische Maßnahmen, kommt große Bedeutung zu.^{2,3}

1.1.2. Stellenwert und Anwendungsgebiete organischer Nitrate

Zum modernen Standard in der klinischen Behandlung der KHK zählen Bypassoperationen und insbesondere interventionelle Therapiestrategien wie die „Perkutane transluminale coronare Angioplastie“ (PTCA) sowie Stent-Implantationen.^{4,5} Diese Verfahren sollen im Sinne einer Revaskularisation der Koronargefäße die Durchblutung des Herzmuskels wiederherstellen. Ungeachtet dieser etablierten interventionellen Verfahren besteht die Notwendigkeit einer symptomatischen Pharmakotherapie.⁶ Dies begründet sich darauf, dass einer KHK zumeist eine multiple Erkrankung der Gefäßwand zugrunde liegt und nicht alle Gefäßverschlüsse und –verengungen operabel sind, außerdem wird bei den operativen Verfahren an den Verhältnissen der Mikrozirkulation nichts geändert.

Das Ziel bei der medikamentösen Behandlung der KHK ist eine Beseitigung des Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –verbrauch in den von der Ischämie betroffenen Myokardbezirken. Drei Arzneimittelgruppen mit antianginöser Wirkung stehen zur Verfügung: Organische Nitrate, Calciumkanalblocker (Ca^{2+} -Antagonisten) und β -Adrenozeptoren-Antagonisten (β -Blocker).⁷ Die organischen Nitrate, auch Salpetersäureester oder häufig chemisch unkorrekt Nitrovasodilatoren genannt, finden seit über 120 Jahren Anwendung bei der Anfallskupierung und –prophylaxe von Angina pectoris. Sie gehören somit zu den ersten chemisch definierten Wirkstoffen überhaupt, die in der klinischen Medizin angewendet wurden.

Das erste organische Nitrat: Glyceryltrinitrat

In der Absicht, potentielle Sprengstoffe herzustellen, behandelte der Turiner Chemiker *Ascanio Sobrero* mehrwertige Alkohole mit einem Gemisch aus Schwefel- und Salpetersäure. Die Umsetzung war problematisch, da deren stark exothermer Verlauf häufig zu einer Detonation führte, sofern nicht ausreichend gekühlt wurde. Doch *Sobrerors* Bemühen war erfolgreich, er erhielt 1846 den Salpetersäureester des Glycerols, Glycerol- bzw. Glyceryltrinitrat (GTN), auch „Nitroglycerin“ genannt, der sich bei Schlag oder plötzlichem Erhitzen zersetzt.^{8,9} In der vorliegenden Arbeit soll die chemisch korrekte Bezeichnung „Glyceryltrinitrat“ verwendet werden.

Sobrero war es auch, der die ersten Beobachtungen zur Wirkung der Substanz am Menschen beschrieb. Bei der damals üblichen organoleptischen Prüfung brachte er eine vermeintlich kleine Menge auf die Zunge und registrierte ein „zerreißendes Pochen an den Schläfen und starke Kopfschmerzen“, er nannte die neue Verbindung daraufhin auch „Pyroglycerin“.⁸ *Sobrero*, selbst von einer Explosion im Gesicht schwer gezeichnet, betrachtete GTN als zu gefährlich für jegliche praktische Anwendung.¹⁰

Der deutsche Arzt und Homöopath *Constantin Hering*, Mitbegründer der Homöopathie in Amerika, wurde unmittelbar (1849) auf *Sobros* Veröffentlichungen aufmerksam und sah in der Substanz einen idealen potentiellen Kandidaten in der Reihe homöopathischer Heilmittel. Im Sinne einer homöopathischen Therapie sollte das kopfschmerzinduzierende GTN in großen Verdünnungen zur Kopfschmerzbehandlung angewendet werden.¹¹ Wie auch heute in der Homöopathie üblich, wurde die neue Substanz an gesunden Probanden in steigenden, nicht-homöopathischen Dosen bis zur Einstellung eines Effekts vorgeprüft. *Hering* beschrieb schon damals relativ umfassend das Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum von GTN, obwohl zu dieser Zeit die Schulmedizin an der von *Hering* als „Glonoine“ bezeichneten Substanz wenig Interesse zeigte.¹² Erstmals schrieb 1858 der britische Arzt *Alfred Field* der Substanz „antispasmodische“ Wirkung zu, nachdem er damit erfolgreich eine Frau mit Angina pectoris-artigen Beschwerden behandelte und damit das breite Interesse in der Ärzteschaft weckte.¹³

Vor der Einführung von GTN in die Therapie der Angina pectoris beschrieb der schottische Arzt *Thomas L. Brunton* die Verwendung von Amylnitrit, einem organischen Nitritester mit analoger Wirkungsweise.¹⁴ 1867 publizierte *Brunton* eine Untersuchung im *Lancet*, bei der er 5-10 Tropfen Amylnitrit auf ein Tuch auftrug und es einem Patienten zum Inhalieren verabreichte. Innerhalb weniger Sekunden errötete sich sein Gesicht, der Puls wurde kräftiger und eine Linderung der pektanginösen Beschwerden trat ein.¹⁵ Nachteilig war jedoch die mit der Applikation der flüchtigen, unangenehm riechenden Verbindung einhergehende Dosierungenauigkeit und die kurze Wirkdauer. Er notierte bereits zudem, daß die Dosis bei längerer Anwendung gesteigert werden muss, um den gewünschten Effekt zu erzielen, eine Anspielung auf Toleranzphänomene (*Kap. 1.3.*).¹⁵ Organische Nitrite führen zudem zu einer unerwünschten Methämoglobin-Bildung. Ihr Einsatz bei Angina pectoris ist daher heute obsolet, sie werden jedoch bei Cyanidvergiftungen sowie missbräuchlich als sog. „Poppers“ verwendet.

Der Londoner Arzt *William Murrell* erkannte beim GTN vor allem im Zeitprofil deutliche therapeutische Vorteile gegenüber Amylnitrit und publizierte 1879 im *Lancet* eine Studie

zur Wirksamkeit der Substanz an 35 Personen, Angina pectoris-Patienten und Bekannten und rühmte es als „Heilmittel par excellence bei Angina pectoris“. ¹⁶ GTN fand Eingang in die Britische Pharmakopöe und etablierte sich in der klinischen Behandlung. Neben einem stationären Behandlungsschema stattete *Murrell* den entlassenen Patienten mit einer „Notfallphiole“ zur Anfallskupierung aus, eine Maßnahme, vergleichbar mit der heutigen Anwendung der Zerbeißkapseln oder Sprays. *Murrell* widmete sich auch der Dosisfindung zur Vermeidung des Nitratkopfschmerzes, in der Regel hervorgerufen durch Überdosierungen, sowie der pharmazeutischen Verarbeitung des explosiven Wirkstoffs. Die damals übliche flüssige Formulierung war mit vielen Nachteilen behaftet und so bat *Murrell* den Pharmazeuten und Chemiker *William Martindale* um ein „stabileres und transportableres Präparat“. Dieser verarbeitete daraufhin einhundertstel grain GTN (1 grain = 0,0648 Gramm) in Schokolade. ¹⁷ Bereits 1882 war GTN in Pillenform in fünf Stärken erhältlich und wurde großindustriell durch *Parke Davis & Company* (Detroit, USA) produziert. ¹²

Im Jahr 1933 berichtete Sir *Thomas Lewis* von einer Erweiterung der Herzkranzgefäße sowie einer verbesserten Versorgung des Myokards mit Sauerstoff nach Gabe von GTN. Die vorlastsenkende Wirkung der Nitrate wurde erstmals 1959 durch *Gorlin* beschrieben. ¹⁸

Entwicklung langwirksamer Nitrate

Obwohl bereits *Bradbury* 1895 unter dem Titel „SOME NEW VASO-DILATORS“ verschiedene einfachstrukturierte Alkylnitrate vorstellte, ¹⁹ stand therapeutisch bis zum 2. Weltkrieg abgesehen vom Amylnitrit nur GTN für alle Formen der Angina pectoris zur Verfügung. Ab den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts begannen intensive Forschungsarbeiten mit dem Bestreben nach nebenwirkungsärmeren und langwirksameren Nitraten. Auf *John C. Krantz Jr.* und Mitarbeiter gehen viele Arbeiten zurück, die sich mit dem Metabolismus und der Pharmakologie von Zuckeralkoholen (Polyole), entsprechender Anhydride sowie deren Nitrat- und Nitritester beschäftigten. ^{20,21} Mono- oder Dianhydride entstehen durch Wasserentzug aus Zuckeralkoholen, nach der Entdeckung des Insulin erhoffte man damit Substanzen zu erhalten, die die Körperzellen als Energiequelle ohne Insulin verwerten. ²² Das war jedoch nicht der Fall, denn diese Anhydride werden praktisch nicht metabolisiert und unverändert rasch renal ausgeschieden, so fand Isosorbid Anwendung als orales, osmotisch wirksames Diuretikum (*Hydronol*®). ²³ Damit waren die Anhydride prädestiniert als Träger von Nitratgruppen ohne eigene Wirkkomponente.

Krantz publizierte 1939 eine Studie, in der er sieben organische Nitrat-Anhydride hinsichtlich Ausmaß und Dauer der Blutdrucksenkung am anästhesierten Hund untersuchte.²⁴ Er beobachtete gegenüber GTN einen geringeren aber deutlich länger anhaltenden Abfall des Blutdrucks, den er auf eine schlechtere Hydrolyisierbarkeit und bessere Wasserlöslichkeit der chemisch stabilen Verbindungen zurückführte. Neben dem günstigen therapeutischen Profil erkannte er auch aufgrund der geringeren Explosivität Vorteile in der Herstellung und Handhabung der Substanzen. In weiterführenden Studien wurden insbesondere die Stereoisomere Isomannid- (IMDN) und Isosorbiddinitrat (ISDN) geprüft.²⁵ *Goldberg* verglich die beiden Verbindungen experimentell-pharmakologisch hinsichtlich Toxizität, Blutdruck, Atmung, Koronarzirkulation an Mäusen und klinisch hinsichtlich Blutdruckabfall und Kopfschmerz an 24 hypertensiven Männern.²⁶ Aufgrund der höheren Aktivität und längeren Wirkdauer schlug er die therapeutische Verwendung von ISDN bei Bluthochdruck und Angina pectoris vor und legte damit den Grundstein für die Etablierung des Arzneistoffs.

Zwischen 1938 und 1962 wurden zahlreiche Arbeiten verfaßt, die sich mit der Entwicklung neuer Nitrate als potentielle Arzneistoffe beschäftigten. Dazu zählten unter anderem Methyl- und Ethyl-derivate des GTN, halogenierte und nicht halogenierte cyclische und aliphatische Nitrate, Alkylnitrate der Glykolsäure und deren Salze, Cholinnitratester und Nitrate mit einer Ethylaminpartialstruktur – wenige fanden Eingang in den Arzneimittelschatz.²² Andere Verbindungen wie Erythryltetranitrat (ETN) oder Mannitolhexanitrat waren schon länger aus der Sprengstoffindustrie bekannt.

Hervorzuheben ist dabei insbesondere das von *Vignon* und *Gerin* 1901 synthetisierte Pentaerythryltetranitrat (PETN).²⁷ *Takeshita* wies 1937 für PETN eine blutdrucksenkende Wirkung am Kaninchen nach,²⁸ die ersten klinischen Arbeiten stammen 1943 von *Bjerlöf*, der bei 165 Patienten zumeist günstigere Wirkungen für PETN als bei ETN fand.²⁹ 1952 erfolgte die erste Zulassung in den USA, gefolgt von den skandinavischen Ländern, Frankreich und der DDR (1964, *Pentalong*[®]). Während in der DDR Pentalong als einziges verfügbares Langzeitnitrat breite therapeutische Anwendung fand, kam dem Analogpräparat Dilcoran in der BRD eher eine „Stiefkindrolle“ zu. In den USA existierten in den 60er Jahren über 30 Formulierungen mit dem Inhaltsstoff PETN in Mono- oder Kombinationspräparaten. Zu den gängigsten Therapeutika zählten Kombinationen (Zweiphasentabletten) von GTN mit Diuretika vom Thiazidtyp, Hypnotika, Tranquillantien und Sedativa.³⁰

Daneben befanden sich zahlreiche weitere organische Nitrate in verschiedenen Ländern auf dem Arzneimittelmarkt, sind derzeit aber meist obsolet (Abb. 1).³¹⁻³⁷ Auffällig sind die teils beträchtlichen Unterschiede in den Dosierungsempfehlungen der Verbindungen, die bereits damals auf Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten hindeuten.

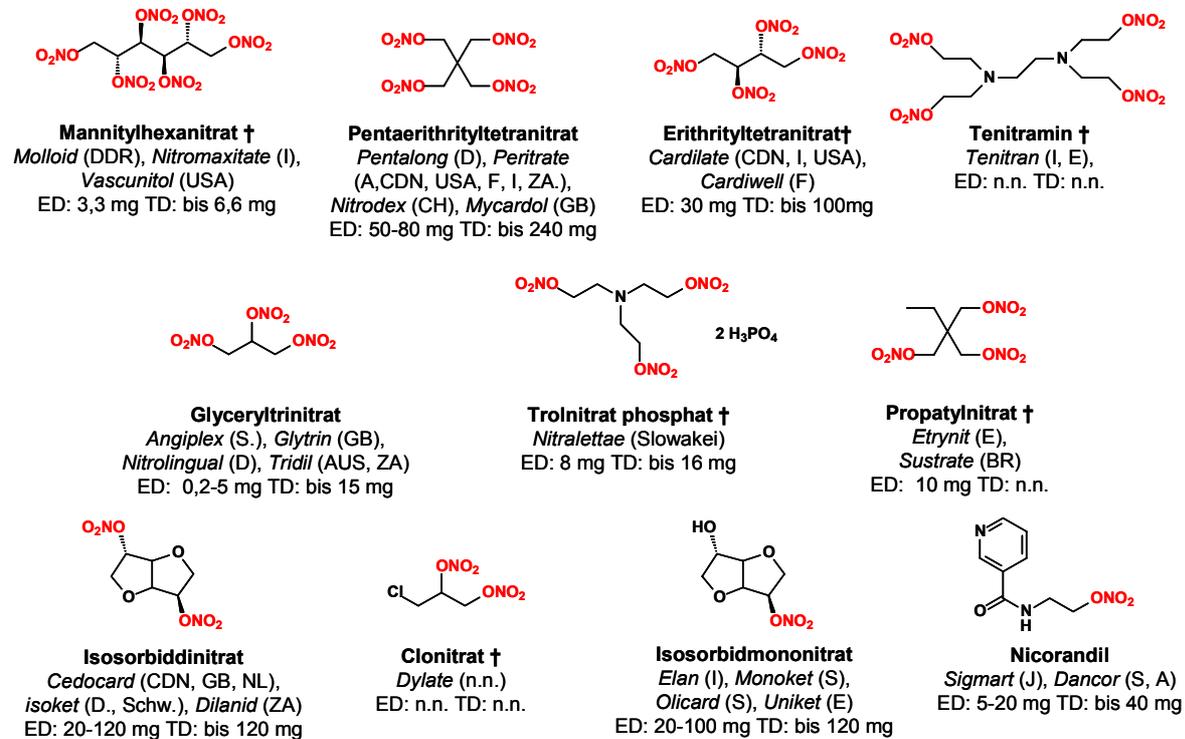


Abb. 1: Übersicht der Strukturformeln therapeutisch genutzter organischer Nitrate und deren Handelsnamen in den einzelnen Ländern, Einzeldosierung (ED), Tagesdosierung (TD) und Zulassungsstatus († = obsolet).³²⁻³⁷

Ab Mitte der 60er Jahre wurde der Metabolismus therapeutisch wichtiger Organonitrate mittels radioaktiver Markierung entschlüsselt.³⁸⁻⁴⁰ Dabei ergaben sich interessante Befunde für ISDN. Pharmakokinetische Studien an Menschen und Hunden belegten für ISDN einen ausgeprägten First-pass-Effekt nach peroraler Gabe.^{41,42} Der Hauptmetabolit 5-Isosorbidmononitrat (5-ISMN) wurde in 6-10-fach höheren Konzentrationen gegenüber seinem Isomer 2-Isosorbidmononitrat (2-ISMN) im Plasma nachgewiesen. ISDN selbst war nur wenige Minuten und auch nur in therapeutisch nicht relevanten Konzentrationen nachweisbar, der Metabolit 5-ISMN dagegen über 6 Stunden im Plasma.⁴² Damit war klar, dass die Abspaltung der ersten Nitratgruppe enzymatisch und stereoselektiv ablaufen muß und die langanhaltende Wirkung von ISDN ausschließlich auf 5-ISMN zurückzuführen ist. Diese Befunde führten 1981 zur Einführung von 5-ISMN als Arzneistoffe und erklären das analoge Dosierschema zur Muttersubstanz ISDN (Abb. 1).

Ein strukturell deutlich abweichender Vertreter unter den Nitraten wurde in den späten 70er Jahren entwickelt – das Nicotinamiderivat Nicorandil (*Abb. 1*).⁴³ Nicorandil ist der erste Vertreter aus der Gruppe der Nitrat-Hybridmoleküle, es besitzt neben der Nitratwirkung noch eine weitere Wirkkomponente, indem es als sogenannter „Kaliumkanalöffner“ die Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen in der Zellmembran der glatten Muskelzellen erhöht. Nicorandil vermindert somit gleichzeitig kardiale Vorlast („preload“) und Nachlast („afterload“) und ist ein potenter Koronardilatator.⁴⁴ Aktuell werden dem Arzneistoff kardioprotektive Eigenschaften nachgesagt, nachdem bei der IONA-Studie an 5000 Angina-pectoris Patienten eine signifikante Reduktion koronarer Ereignisse unter Gabe von Nicorandil nachgewiesen wurde,⁴⁵ zudem wurde keine Kreuztoleranz zu GTN beobachtet.⁴⁶ Jedoch hat sich der gewünschte Einsatz bei instabiler Angina pectoris oder als „Reservemedikament“ bei Patienten, die nicht auf die konventionelle Angina pectoris-Therapie ansprechen, bisher nur bedingt durchgesetzt, das Präparat befindet sich nur in einigen Ländern auf dem Markt.

Aktueller Arzneimittelbestand an Koronarmitteln

Arzneimittel zur symptomatischen Behandlung der KHK werden zur Indikationsgruppe „Koronarmittel“ zusammengefaßt.⁴⁷ Zu deren wichtigsten offizinellen Vertretern zählen in Deutschland gegenwärtig folgende organische Nitrate und wirkähnliche Stoffe mit jeweils unterschiedlichen therapeutischen Profilen. Neben den antianginösen Eigenschaften sind insbesondere für GTN zahlreiche andere Anwendungen beschrieben worden.

1. Glyceryltrinitrat (Handelspräparate: u.a. *Aquo-Trinitrosan*[®], *Corangin Nitro*[®], *Nitrangin*[®], *Nitrolingual*[®], *Nitroderm TTS*[®]), als Spray oder Zerbeißkapsel (klinisch auch *i.v.* Infusion). Erste Wahl bei der Anfallsbehandlung einer stabilen, unter Belastung auftretenden und einer instabilen Angina pectoris, dem akuten Myokardinfarkt und katheterinduzierten Koronarspasmus (Wirkeintritt ca. 1 min); in geringem Umfang Anwendung als Nitratpflaster zur Behandlung der chronisch kongestiven Herzinsuffizienz sowie zur Prophylaxe der chronischen Angina pectoris. GTN werden zudem günstige Effekte im nicht-kardiovaskulären Bereich zugesprochen, so zur Schmerzbehandlung diabetischer Neuropathie,⁴⁸ als Adjuvans zur Opioidtherapie,⁴⁹ zur Schmerzlinderung bei chronischen Analfissuren (*Rectogesic*[®]),⁵⁰ zur Erhaltung der Organfunktion bei Transplantationen⁵¹ und zur Kombinationstherapie inoperabler, kleinzelliger Zellkrebsformen.⁵²

Auch zahlreiche homoöpathische Kombinationspräparate mit dem Inhaltsstoff Glonoinum für GTN sind nach wie vor in D3 - D8 Potenzen für verschiedenste Beschwerden aktuell im Verkehr (u.a. *Hevert-Migräne*[®], *Ypsiloheel*[®]).

2. Pentaerithryltetranitrat (*Pentalong*[®], *Nirason*[®]), Prophylaxe und Langzeitbehandlung der Angina pectoris ohne sog. Nitratpause.
3. Isosorbiddinitrat (*isoket*[®]-Spray, -Sublingualtabletten, -Salbe; *ISDN-Stada*[®], *ISDN-ratiopharm*[®]; *Nitrosorbon*[®]), hauptsächlich als Intervalltherapie zur Prophylaxe und Langzeitbehandlung der Angina pectoris als Retardkapseln und -tabletten; sublingual oder als Spray zur Angina pectoris-Anfallsbehandlung sowie vorbeugende Einnahme unmittelbar vor körperlicher Belastung bei stabiler Angina pectoris (Wirkeintritt ca. 5 min), im Vergleich zu GTN allerdings langsamerer Wirkungseintritt.
4. 5-Isosorbidmononitrat (*Corangin*[®], *IS 5 mono-ratiopharm*[®], *Mono Mack*[®]), als Intervalltherapie zur Prophylaxe und Langzeitbehandlung der Angina pectoris, vorwiegend als Retardkapseln und -tabletten.
5. Molsidomin (*Corvaton*[®], *MolsiHexal*[®]), wirkähnliche Verbindung, die ohne Vermittlung von SH-Gruppen Stickstoffmonoxid (NO) freisetzt (*Abb. 2*).⁵³ Gleichzeitig wird jedoch bei dieser spontanen Reaktion auch Peroxynitrit (ONOO[•]) aus radikalischen Superoxidanionen (O₂⁻) und NO generiert, welches den oxidativen Streßstatus in der Zelle erhöht. Da jedoch im Vergleich zu den Nitraten eine Bioaktivierung über einen reduktiven Zwischenschritt nicht erforderlich ist, soll sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine für organische Nitrate typische Toleranzbildung (siehe *Kap 1.3.*) ausbleiben. Diesen positiven Eigenschaften stehen jedoch toxikologische Befunde gegenüber, die bei Gabe hoher Dosen in Tierversuchen auf eine verstärkte Kanzerogenität hindeuten. Daher ist die Indikation von Molsidomin stark limitiert, es dient als „Reservemedikament“ für Patienten in höherem Lebensalter und/oder die nicht auf die konventionelle Prophylaxe und Langzeitbehandlung der Angina pectoris ansprechen. Auch die Überbrückung der nächtlichen Nitratpause mit Molsidomin wird häufig praktiziert, ist aber umstritten.
6. Nitroprussidnatrium (*nipruss*[®]), wirkähnliche Komplexverbindung, die nichtenzymatisch NO oder eine verwandte Spezies freisetzt und gleichermaßen dilatierend auf die venöse und arterielle Strombahn wirkt. Wegen der raschen gastrointestinalen Inaktivierung kann Nitroprussidnatrium nur intravenös infundiert werden. Die Verbindung findet klinisch Anwendung als Mittel der Wahl bei

lebensbedrohlichen hypertensiven Krisen und zur Steuerung einer kontrollierten Hypotension in der Chirurgie, da aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit von 3-4 Minuten der Blutdruck genau „titriert“ werden kann. Während der Infusion muß gleichzeitig Natriumthiosulfat infundiert werden, um freigesetzte Cyanid-Ionen zu entgiften.⁷

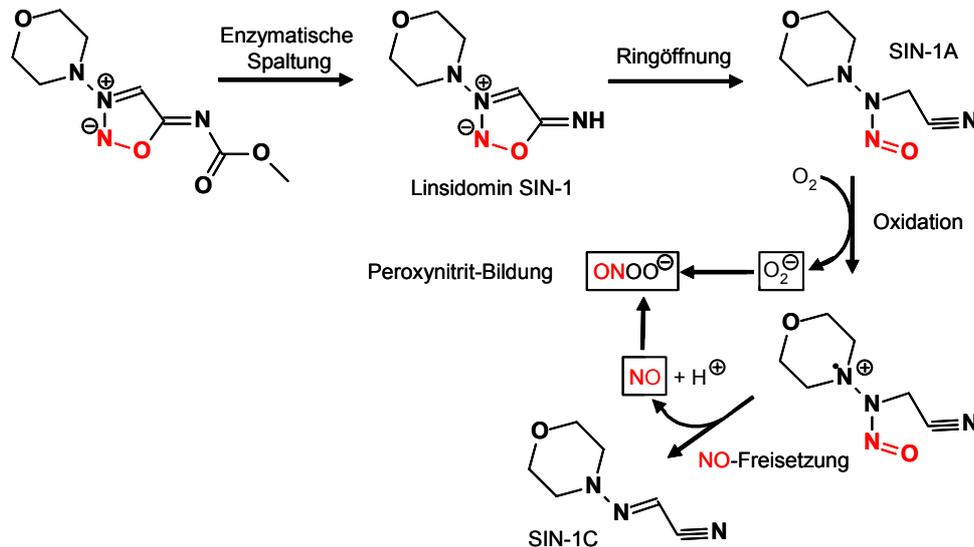


Abb. 2: Metabolisierung von Molsidomin. Enzymatische Spaltung der Carboxyethyl-Gruppe zu Linsidomin (SIN-1), welches sich unter neutralen Bedingungen spontan zum acyclischen Nitrosohydrazin-Derivat SIN-1A umsetzt. Sauerstoff oder Oxidationsmittel sind wiederum beteiligt an der Umsetzung zu einem Kationradikal unter Superoxidbildung (O₂[⊖]). Aus diesem Intermediat wird spontan NO freigesetzt, unter Deprotonierung bildet sich das stabile Iminoacetonitril-Derivat SIN-1C. modifiziert nach 53

Vergleichende Bewertung

Obwohl in Deutschland im Jahr 2005 unter den 3000 am häufigsten verordneten Arzneimitteln 49 Koronarmittel vertreten sind, hat deren Stellenwert im Arzneimittelschatz nach dem „Arzneiverordnungsreport 2006“ in den letzten Jahren durch eine rückläufige ärztliche Verordnung kontinuierlich abgenommen.⁵⁴ Diese Tendenz begründet sich aus bedenklichen Befunden, dass diese Medikamente lediglich rein symptomatische Wirkung oder sogar selbst Arteriosklerose-fördernde Eigenschaften besitzen, die die kardiovaskuläre Morbidität und Letalität erhöhen und somit die Langzeitprognose, z.B. unter Nitratgabe, verschlechtern.^{55,56} ISDN und ISMN sind die am häufigsten verwendeten Nitrate, da mit beiden Substanzen bei richtiger Dosierung und Einhaltung des nitratfreien Intervalls eine wirksame Anfallsprophylaxe durchgeführt werden kann. In der Therapie hat ISMN gegenüber ISDN vom aktuellen wissenschaftlichen Standpunkt her lediglich theoretische Vorzüge, z.B. eine höhere Bioverfügbarkeit, die jedoch, außer bei der

Dosisfindung, keine anwendungsrelevante Bedeutung besitzen. Nachteilig ist beim ISMN eher die relativ langsam verlaufende Resorption, die selbst bei sublingualer Applikation eine Behandlung akuter Angina-pectoris-Anfälle ausschließt. PETN wird seit einigen Jahren als einziges Langzeitnitrat wieder vermehrt eingesetzt, da umfangreiche Forschungsarbeiten *in vitro*, an Tieren und an gesunden Probanden auf eine signifikante Überlegenheit hinsichtlich Toleranzentwicklung und Nitratkopfschmerz gegenüber anderen organischen Nitraten hindeuten,⁵⁷⁻⁵⁹ eine abschließende kontrollierte, randomisierte, klinische Langzeitstudie steht allerdings noch aus.

Die Verordnungshäufigkeit von Molsidomin ist über die letzten Jahre nahezu konstant geblieben und liegt damit mittlerweile in der gleichen Größenordnung des zurückgehenden ISMN. Dies ist erstaunlich, da nach neueren Vergleichstudien auch unter Gabe von Molsidomin wie bei ISDN bereits nach 1-4 Tagen eine deutliche Abschwächung der antiischämischen Effekte eintritt.⁶⁰ Neben der potentiellen Kanzerogenität fehlen zudem bei Molsidomin kontrollierte Endpunktstudien.

1.2. Wirkmechanismus organischer Nitrate

1.2.1. Antiischämisches Prinzip

Organische Nitrate sind endothelunabhängige Vasodilatoren mit überwiegender Wirkung auf die venöse Strombahn und die Koronargefäße. Um eine Dilatation der Arteriole zu erreichen, sind deutlich höhere Nitratkonzentrationen nötig. Dies führt zu einem einzigartigen hämodynamischen Wirkspektrum in der Pharmakotherapie kardialer Erkrankungen:

- Durchblutungsverbesserung durch Dilatation großer Koronargefäße und u.a. über einen gesteigerten Kollateralfuß vor allem im Bereich partieller Stenosen,
- Senkung der Vorlast führt zu einem verminderten O₂-Bedarf des Herzens, verbesserte endokardiale Durchblutung durch eine verminderte intramyokardiale Wandspannung sowie eine Erhöhung des Perfusionsdrucks,
- kein „coronary steal“, da der Tonus der arteriellen Widerstandsgefäße erhalten bleibt.

Zudem sind Nitrate sowie Molsidomin und Nitroprussidnatrium antiaggregatorisch wirksam und können dadurch eine Thrombusbildung sowie einen Myokardinfarkt verhindern.⁷

1.2.2. Wirkprinzip auf molekularer Ebene

Bei der Therapie mit organischen Nitraten befand man sich lange in einer ungewöhnlichen Situation. Einerseits nutzte man seit 1879 die antianginösen Eigenschaften der Arzneistoffe in großem Umfang, andererseits war deren Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene lange Zeit völlig unbekannt. Mitte der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts fand *Ferid Murad* heraus, dass Vasodilatoren wie GTN, Nitroprussidnatrium und ähnliche Substanzen die lösliche Guanylylcyclase (sGC) aktivieren und infolge dessen die Umsetzung von Guanosin-5-triphosphat zu cyclischem Guanosin-3,5-monophosphat (cGMP) in glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert wird, identische biologische Effekte wurden für Stickstoffmonoxid (NO) beobachtet.^{61,62} *Furchgott* und *Zawadzki* beobachteten *in vitro*, anfangs eher zufällig, dass bei Gefäßpräparaten mit beschädigtem Endothel nach Acetylcholin-Zugabe eine üblicherweise einsetzende Relaxation ausblieb. Sie postulierten daraufhin die Existenz einer Substanz, die unter Einfluß zahlreicher Stimuli (z.B. Hormone, Neurotransmitter, Scherstreß) vom Endothel freigesetzt wird und in den umgebenden, glatten Gefäßmuskelzellen eine Relaxation auslöst.⁶³ Diese Substanz – sehr labil, leicht diffundierend und unbekannter Struktur – nannten sie EDRF (Endothelium-Derived-Relaxing-Factor). 1986 wurde entdeckt, dass es sich bei EDRF um NO handelt; ein sehr kurzlebiges, gasförmiges Stickstoffradikal, welches zuvor nur mit Luftverschmutzung, Zigarettenrauch oder Smog in Verbindung gebracht worden war.^{64,65} In der Folgezeit wurde immer deutlicher, welche wichtige Rolle NO als Botenstoff für viele biologische Prozesse spielt, allein in den letzten fünf Jahren sind etwa 13000 Arbeiten zu NO erschienen.⁶⁶ 1992 wurde NO von der Fachzeitschrift *Science* zum „Molecule of the year“ gewählt und 1998 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die Wegbereiter der NO-Forschung, *Robert F. Furchgott*, *Louis J. Ignarro* und *Ferid Murad* verliehen.^{67,68}

Es gilt heute als gesichert, dass die nitratinduzierte Relaxation in glatten Gefäßmuskelzellen durch folgenden kettenartigen Wirkmechanismus hervorgerufen wird (*Abb. 3*). Aktivierung der NO-sensitiven löslichen sGC, Erhöhung der Konzentration an cGMP und anschließende Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (cGK-I) und Ionenkanäle mit der Folge einer Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.⁶⁹ Ein bedeutsames Substrat der cGK-I ist VASP (Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein).⁷⁰ Über diesen Signalweg wirkt ebenso endogen von den NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildetes NO, es wird differenziert in: endotheliale, neuronale und induzierbare NO-Synthase (eNOS, nNOS, iNOS).⁷¹

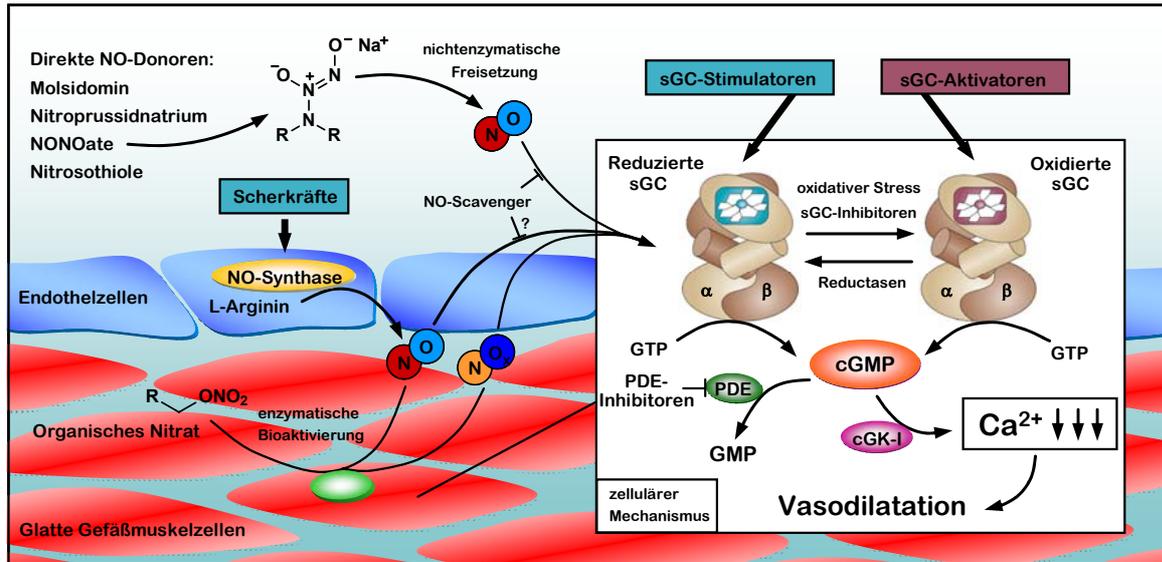


Abb. 3: Wirkmechanismus organischer Nitrate und direkter NO-Donoren. Organische Nitrate werden in der glatten Gefäßmuskulatur zu Stickstoffmonoxid (NO) und/oder verwandten Spezies (NO_x) bioaktiviert, während direkte NO-Donoren wie insbesondere die Diazeniumdiolate (NONOate) nichtenzymatisch unter bestimmten chemischen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur) direkt NO freisetzen. Dadurch wird die im Text beschriebene Reaktionskaskade in Gang gesetzt. Lösliche Guanylylcyclase (sGC), Guanosintriphosphat (GTP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Phosphodiesterase (PDE), cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK-I).^{modifiziert nach 72}

Die sGC ist ein heterodimeres Hämprotein mit einer $\alpha_{1,2}$ - und $\beta_{1,2}$ -Untereinheit und wird durch Bindung von NO an das zentralgebundene Eisenatom (Fe²⁺) der Hämgruppe aktiviert. Die damit verbundene Konformationsänderung am katalytischen Zentrum verdreifacht die Affinität der sGC für Guanosintriphosphat (GTP) und steigert 100-200-fach die Bildungsgeschwindigkeit des sekundären Botenstoffes cGMP. Zahlreiche Inhibitoren der NO-sensitiven sGC sind beschrieben worden, die neueren trizyklischen Quinoxalin-Derivate ODQ oder NS2028 zählen zu den potentesten und selektivsten Inhibitoren, indem sie eine Oxidation und/oder eine Koordinationsänderung des Häm-Eisen bewirken.^{73,74} Mit deren Entwicklung hat der Stellenwert von deutlich unspezifischeren sGC-Inhibitoren wie der Porphyrinderivate oder redoxsensitiven Farbstoffe (Methylenblau und LY 83583) abgenommen.^{75,76}

Eine Steigerung der sGC-Enzymfunktion kann durch zwei Mechanismen hervorgerufen werden und steht in engem Zusammenhang mit den zwei Redox-Zuständen der sGC: einer NO-empfindlichen, reduzierten und einer NO-unempfindlichen, oxidierten Form (Abb 3). Die sGC kann im reduzierten Zustand (reduziertes Häm) allosterisch durch sGC-Stimulatoren (z.B.: YC-1, BAY 41-2272) angeregt werden, eine deutlich gesteigerte

Empfindlichkeit gegenüber NO ist die Folge.⁷⁷⁻⁷⁹ Im Häm-oxidierten oder Häm-freien, NO-unempfindlichen Zustand der sGC sind die sGC-Stimulatoren hingegen wirkungslos, während in diesem Zustand sog. sGC-Aktivatoren (BAY 58-2667, HMR-1766) eine Aktivierung der sGC ohne NO oder Häm bewirken.^{72,80} In beiden Fällen ist jedoch übereinstimmend eine intrazelluläre Konzentrationserhöhung des second messengers cGMP die Folge. Inwieweit diese in der experimentell-pharmakologischen Forschung erfolgreich angewendeten, neuen und interessanten Wirkstoffklassen therapeutisch genutzt werden können, ist derzeit offen. Beide Verbindungsklassen befinden sich derzeit in vorklinischen Tests zur Behandlung chronischer Herzinsuffizienz und pulmonaler Hypertonie.⁸¹

Der Abbau des second messengers cGMP (sowie cAMP) zum entsprechenden acyclischen Nukleotid GMP (oder AMP) wird durch verschiedene Phosphodiesterase-Enzymfamilien (PDE 1-11) katalysiert (Abb. 3).⁸² Selektive Inhibitoren der Phosphodiesterase Typ 5 (PDE-5) werden bei der Behandlung der erektilen Dysfunktion angewandt (z.B.: Sildenafil in *Viagra*[®], Tadalafil in *Cialis*[®], Vardenafil in *Levitra*[®]). Neuerdings sind PDE-5-Inhibitoren daneben zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie der WHO-Funktionsklasse III zugelassen (Sildenafil in *Revatio*[®]).^{47,83} Die gleichzeitige Gabe von Organischen Nitraten oder wirkähnlichen Verbindungen und PDE-5-Inhibitoren ist aufgrund eines massiven Blutdruckabfalls infolge der cGMP-Kumulation streng kontraindiziert.

1.2.3. Bioaktivierung organischer Nitrate

Im Gegensatz zu direkten NO-Donoren (z.B. Diazeniumdiolate) oder NO⁺-Donoren (z.B. Nitrosothiole) bedürfen Nitrate (Oxidationsstufe: +5) einer vorausgehenden reduktiven Bioaktivierung in den glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 3). Organische Nitrate sind demnach klassische Prodrugs. Nach der Entdeckung von EDRF war der Gedanke naheliegend, NO (Oxidationsstufe: +2) als das eigentliche Wirkprinzip organischer Nitrate anzusehen,⁸⁴ der Nachweis von NO in biologischen Matrices gestaltete sich jedoch durch die Reaktivität und Kurzlebigkeit des Moleküls seit jeher schwierig.

NO aus Nitraten?

Einige Studien belegen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Bildung von NO aus GTN mittels Oxyhämoglobin Assay und Chemilumineszenzdetektion, allerdings nur nach Applikation therapeutisch irrelevant hoher Konzentrationen.⁸⁵⁻⁸⁷

Neuere Studien widerlegen die These, dass GTN in niedrigeren therapeutischen (nanomolaren) Dosen die vaskulären NO-Spiegel erhöhen kann. *Kleschyov et al.* bestimmten die NO-Donor-Eigenschaften von GTN mit Hilfe einer Kombination von NO-Spintrapping (mit Eisen(II)diethyldithiocarbamat - Fe[DECT]₂) und Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie und verglichen diese mit dem Ausmaß der Phosphorylierung der VASP am Ser239 (P-VASP) als Marker für die cGK-1-Aktivität.^{70,88} In Gefäßen mit intaktem Endothel bestand eine auffällige Diskrepanz (bis zu drei Zehnerpotenzen) zwischen starker vaskulärer Aktivität (Zunahme von P-VASP und beobachteter Vasorelaxation im nanomolaren Bereich) und seinen schwachen NO-Donoreigenschaften (Zunahme NO-Fe[DECT]₂ bei mikromolaren Konzentrationen). Bei ISDN und Calcium-Ionophore A23187, einem endothelabhängigen Vasodilator, wurde hingegen eine direkte Korrelation beobachtet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Inhibition mit dem NO-Scavenger Carboxy-PTIO die vasodilatorische Aktivität von GTN deutlich weniger abschwächt als die von üblichen NO-Donoren.^{89,90} Es ist denkbar, dass in therapeutisch wirksamen (nanomolaren) Konzentrationen eine mit NO eng verwandte sGC-aktivierende Spezies (NO_x) gebildet wird, die mit NO-Spintrapping nicht detektierbar ist (*Abb. 3*).

Folgende Erklärungsansätze bestehen außerdem: eine indirekte Aktivitätssteigerung oder Modulation durch Lageveränderung der sGC innerhalb der Zelle (wie auch bei direkten NO-Donoren beschrieben); Interaktion von GTN und/oder dessen bioaktive Metabolite mit sGC-Bindungsproteinen; sowie ein partieller Agonismus an der sGC.⁹¹⁻⁹⁴

NO ist nach aktuellem Kenntnisstand also nicht generell das Wirkprinzip organischer Nitrate, vielmehr ist die Bestätigung der NO-Hypothese abhängig von der gewählten NO-Analytik, von der verwendeten Nitratkonzentration, der gewählten Nitratverbindung und den jeweils zugrunde liegenden Bioaktivierungsmechanismen.

Verschiedene Bioaktivierungshypothesen

Welche Enzyme schließlich die Bioaktivierung katalysieren, war lange widersprüchlich. Schon früh war bekannt, dass thiolgruppenhaltige Verbindungen (R-SH) als Kofaktoren für die Gefäßrelaxation von organischen Nitraten erforderlich sind.⁹⁵ Eine Verarmung von „R-SH Pools“ wurde und wird in engen Zusammenhang mit der Nitrattoleranz gebracht.⁹⁴ *Needleman* und *Hunter* stellten bereits 1965 die Theorie auf, dass GTN durch eine glutathionabhängige Nitratreduktase metabolisiert wird, das Enzym wurde später als Glutathion-S-Transferase (GST) identifiziert.⁹⁶ Neben der GST wurden vielfach die Xanthinoxidoreductase und das Cytochrom P450 System als mögliche Kandidaten für die Umsetzung von GTN vorgeschlagen. Auch ein thiolabhängiger „GTN-Rezeptor“ sowie die

in vitro beobachtete und beschriebene nichtenzymatische Umsetzung organischer Nitrate mit Thiolen, insbesondere mit Cystein, wurde häufig zur Erklärung der Bioaktivierung herangezogen.⁹⁷ Die Relevanz dieser zumeist experimentell-pharmakologischen Befunde für die Bedeutung der Nitratbioaktivierung ist allerdings fraglich. So hat beispielweise der GST-Inhibitor Sulfobromophtalein keinen hemmenden Effekt auf die GTN-induzierte Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Innerhalb der GST-Enzymfamilie wurde für die GST_μ-Isoform die höchste GTN-Metabolisierungsaktivität in der Gefäßwand beschrieben. Ein Gendefekt der GST_μ, wie er beim Menschen vorkommen kann, hat jedoch keinerlei Einfluß auf die Wirksamkeit von GTN bei den betroffenen Patienten.⁹⁸ Vor allem aber katalysiert keines der vermeintlichen Bioaktivierungsenzyme selektiv die Umsetzung von GTN zum bioaktiven Metabolit 1,2-Glyceryldinitrat (1,2-GDN). Dieser wurde in Gefäßmuskelzellen in 2- bis 7-fach höheren Konzentrationen als 1,3-Glyceryldinitrat (1,3-GDN) nachgewiesen.⁹⁹ Genauso wenig wurde bei diesen Enzymen eine Korrelation zwischen Nitratoleranz und Aktivitätsänderung nachgewiesen.¹⁰⁰

Die mitochondriale Aldehyddehydrogenase

Chen et al. identifizierten 2002 die mitochondriale Isoform der Alkoholdehydrogenase (ALDH-2) als das Schlüsselenzym für die Bioaktivierung für GTN und konnten den zugrundeliegenden biochemischen Mechanismus, insbesondere in therapeutisch relevanten Konzentrationen (<1 μM), erstmals schlüssig klären.¹⁰¹ Nach aktuellen Befunden variiert die bioaktivierende Signalkette bei niedriger, therapeutischer (<1 μM) im Vergleich zu hoher, pharmakologischer (>1 μM) GTN-Konzentration, weshalb aktuell beim GTN in einen „niedrigpotenten“ und einen „hochpotenten“ Stoffwechselweg unterteilt wird. Diese These wurde auf andere Nitrate erweitert; vasoaktiv hochpotente Nitrate wie das Tetranitrat PETN, die Trinitrate GTN und Pentaerithryltrinitrat (PEtriN, bioaktiver PETN-Metabolit) werden bei niedrigen Konzentrationen über die ALDH-2 bioaktiviert (sog. „hochpotenter“ Stoffwechselweg).¹⁰² Die vasoaktiv niedrigpotenten Dinitrate ISDN und Pentaerithryldinitrat (PEdiN, bioaktiver PETN-Metabolit), die Mononitrate ISMN und Pentaerithrylmononitrat (PEmoN, bioaktiver PETN-Metabolit) sowie bei sehr hohen Konzentrationen teilweise auch die oben erwähnten Tetra- und Trinitrate unterliegen hingegen einem ALDH-2- unabhängigen Bioaktivierungsweg, dem sog. „niedrigpotenten“ Biotransformationsweg (*Abb. 4*). Damit wurde erstmals gezeigt, dass organische Nitrate über verschiedene Bioaktivierungswege metabolisiert werden können.

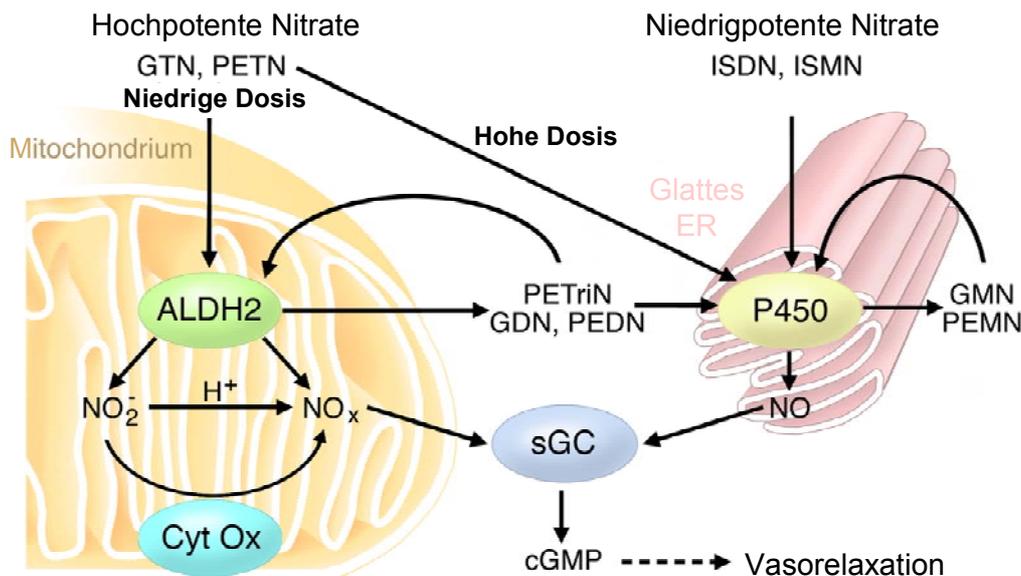


Abb. 4: Stoffwechselwege für Hoch- und Niedrigpotente Nitrate. PETN und GTN werden bei therapeutisch relevanten Dosen über ALDH-2 zu Nitrit und weiteren bioaktiven Metaboliten (PETriN, und 1,2-GDN) metabolisiert, wobei PETriN wiederum selbst eine Affinität zur ALDH-2 besitzt. Das Nitrit wird weiter reduktiv in der Atmungskette (z.B. Cytochrom-c-Oxidase) oder durch saure Disproportionierung zu NO oder einer verwandten Spezies (NO_x) umgesetzt. Niedrigpotente Nitrate sowie Hochpotente Nitrate in hohen Dosen werden wahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum (glattes ER) mittels Cytochrom-P450-Enzymen bioaktiviert, es entsteht dabei NO .⁹⁴

Hochpotenter Stoffwechselweg über ALDH-2

Die ALDH-2 ist ein Schlüsselenzym beim Ethanolabbau, zusätzlich zur bekannten NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasefunktion besitzt es noch eine für die Bioaktivierung hochpotenter Nitrate wichtige Esteraseaktivität (Abb. 5).¹⁰³ Die enzymatische Reaktion ist jedoch keine einfache Esterhydrolyse, sondern schließt eine Reduktion der Nitratgruppe ein. Beim GTN wurden als Metaboliten 1,2-GDN und Nitrit im stöchiometrischen Verhältnis detektiert.¹⁰⁰ Obwohl die Bioaktivierungsreaktion im Gegensatz zum Ethanolabbau reduktiven Charakter besitzt, beschleunigt NAD^+ die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich. In die Reaktion sind redoxensitive Thiolgruppen im katalytischen Zentrum des Enzyms eingebunden, die unter Bildung von Disulfidbrücken den reduktiven Schritt vermitteln, eine Inaktivierung der ALDH-2 ist die Folge. Das inaktive thiol-oxidierte Enzym kann wiederhergestellt werden durch „Thioldonoren“ wie Dithiotreitrol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol, als natürlicher „Reaktivator“ in einem komplexen Reparaturmechanismus gilt die mitochondriale Dihydroliponsäure.¹⁰⁴

Bisher ungeklärt ist die Umwandlung des gebildeten Nitrits (Oxidationsstufe: +3) zu einer sGC-aktivierenden Species. Beschrieben wurde häufig die redoxunabhängige Bildung von

S-Nitrosothiolen (Oxidationsstufe: +3) als Intermediate.¹⁰⁵ Von diesen ist bekannt, dass sie als Transport- und Stabilisierungsform von NO („NO-carrier“) durch niedermolekulare Peptide dienen, weshalb im weiteren Sinne als EDRF neben NO auch S-Nitrosothiol angesehen wird.¹⁰⁶ *Ignarro* vermutete bereits früh, dass S-Nitrosothiole unter Disulfidbildung spontan zu NO umgesetzt werden. Beschrieben ist aber auch eine weitere Reduktion durch die Atmungskette (Cytochrom bc1 complex, Cytochrom c oxidase) oder Disproportionierung im sauren Milieu des intramembranären Raums über salpetrige Säure als Zwischenprodukt.^{107,108} Auch ein Eisen-Porphyrin-NO-Komplex wird als NO-ähnliche Spezies beschrieben, da für Desoxyhämoglobin eine Nitritreduktion beschrieben wurde.¹⁰⁹ Keine Studie belegte jedoch bei therapeutischen GTN-Konzentrationen (<1µM) eine NO-Freisetzung durch diese Enzyme.

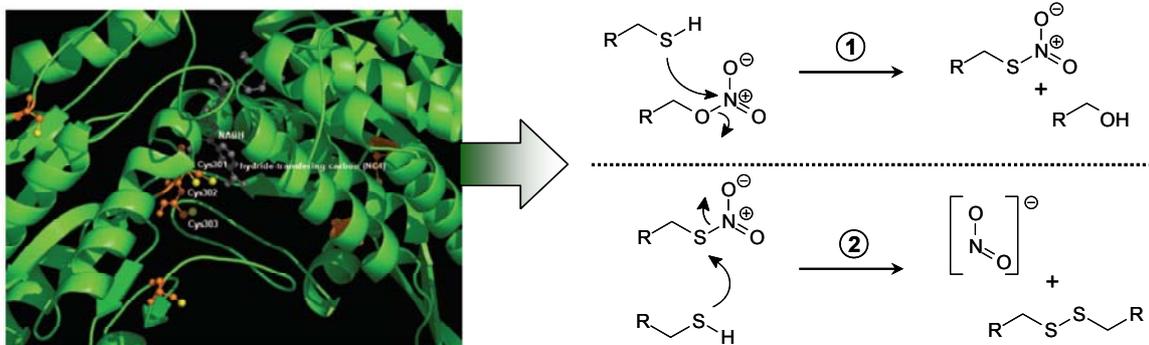


Abb. 5: Kristallstruktur (links) der bovinen ALDH-2 und postulierter Reaktionsmechanismus (rechts) bei der Bioaktivierung hochpotenter, organischer Nitrate. Die Struktur zeigt ein Monomer eines Tetramerkomplexes, im aktiven Zentrum befinden sich in direkter Nachbarschaft drei Thiolgruppen der Aminosäure Cystein (Cys 301-3), eine Aminosäure (vermutlich Cys 301) befindet sich in der Nähe des Cofaktors NAD⁺. Im ersten Reaktionsschritt bildet sich ein Thionitrat-Intermediat durch nukleophilen Angriff des Thiols am Nitratstickstoff. Im zweiten Schritt folgt ein weiterer nukleophiler Angriff eines Thiols am Thionitrat unter Bildung eines Disulfids und Nitrit als Abgangsgruppe, welches wiederum seinerseits weiterreagiert (siehe Text). Die Enzymfunktion wird „reaktiviert“ durch Reduktion der Disulfidbindung zu den freien Thiolen mittels mitochondrialer Dihydroliponsäure.^{100,102}

Spezifische (Daidzin, Benomyl) und unspezifische Inhibitoren (Chloralhydrat, Disulfiram, Cyanamid) der ALDH-2 sowie hohe Substratkonzentrationen (Acetaldehyd) vermindern die nitratinduzierte Vasorelaxation und Blutdrucksenkung bei Ratten und Kaninchen, eine Acetylcholin- oder SNP-induzierte Vasorelaxation bleibt hingegen unbeeinflusst.^{101,102} Gefäßringe von Wildtypmäusen, die mit einem selektiven Inhibitor der ALDH-2 maximal inhibiert wurden, ergaben Konzentrations-Wirkungskurven, die interessanterweise mit denen von ALDH-2 defizienten Tieren (ALDH-2^{-/-}) übereinstimmten.¹¹⁰ Damit wurde der

molekular-biologische Beweis geliefert, daß die ALDH-2 eine bestimmende Rolle für die GTN-Bioaktivierung besitzt. Die Hemmwirkung ist jedoch in allen Fällen (Inhibierung, Gendefekt, Toleranz) auf maximal zwei Zehnerpotenzen bei den hochpotenten Nitraten beschränkt. In Asien sind etwa 400-700 Millionen Menschen von einer Mutation des ALDH-2 Gens (E487K) betroffen. Es liegen aktuelle klinische Studien vor, wonach diese Patienten schlechter auf GTN ansprechen.¹¹¹ Dementsprechend besteht eine Kontraindikation für GTN mit den Arzneistoffen Disufiram, Chlrolhydrat und Acetaminophenon.

Niedrigpotenter Stoffwechselweg über ?

Bei hohen Nitratkonzentrationen ($>1\mu\text{M}$), wurde *in vivo* als auch *in vitro* eine NO-Bildung für GTN und ISDN beschrieben, NO ist demnach wahrscheinlich das Wirkprinzip für diesen Stoffwechselweg.^{87,112} Eine nichtenzymatische Umsetzung von GTN mit Thiolen (Thiosalicylsäure, Cystein, Acetylcystein) scheint dabei keine physiologische Bedeutung zu besitzen, da diese Reaktion erst bei hohen, millimolaren Konzentrationen beobachtet wurde.¹¹³ Speziell Cytochrom P₄₅₀ Enzyme werden für den niedrigpotenten Stoffwechselweg verantwortlich gemacht (*Abb. 4*). Eine Induktion von hepatischen CYP-Isoformen durch Glucocorticoide steigerte die cGMP- und NO-Bildung deutlich,¹¹⁴ während eine 3-tägige GTN-Infusion eine Verminderung der hepatischen CYP-Expression zur Folge hatte.¹¹⁵ Auch in menschlichen und tierischen Gefäßen sind für die NO-Bildung aus GTN (10 μM) CYP-Isoformen beschrieben worden, insbesondere CYP1A2 besaß die höchste Aktivität.^{116,117}

1.3. Nitrattoleranz

Die therapeutische Wirksamkeit von organischen Nitraten, insbesondere von GTN, schwächt sich bei chronischer Gabe ab. Die sogenannte Nitrattoleranz ist seit den ersten klinischen Untersuchungen mit Nitraten in vielfältiger Form beschrieben worden und gehört auch aktuell zu den limitierenden Faktoren bei der Nitrattherapie. In medizinischen Datenbanken (z.B. *PubMed*[®]) werden etwa 1000 wissenschaftliche Beiträge und 200 Reviews zur Nitrattoleranz geführt und sind Indiz dafür, welche Relevanz diesem Phänomen zukommt und wie äußerst komplex der zugrunde liegende Mechanismus ist.¹¹⁸ Viele Arbeiten in der Vergangenheit widmeten sich vorrangig der Substanz GTN (Goldstandard), die Ergebnisse wurden relativ unkritisch einfach auf andere Nitrate übertragen. Dies ist aus heutiger Sicht unzulässig, da die einzelnen Nitrate deutliche

Unterschiede im pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Verhalten aufweisen und sehr unterschiedlich dosiert und appliziert werden. Sie besitzen also keine übereinstimmenden, therapeutischen Profile. Insbesondere können organische Nitrate, wie unter *Kap. 1.2.3.* ausgeführt, auf molekularer Ebene unterschiedlichen Bioaktivierungsmechanismen unterliegen. Möglicherweise befindet sich hier der Schlüssel zur Klärung der verschieden ausgeprägten Toleranzphänomene.

Die *in vivo* Nitrat-toleranz ist zurückzuführen auf eine nitratunspezifische, neurohumorale Gegenregulation, die ebenso bei anderen Vasodilatoren auftreten kann („Pseudotoleranz“) und eine nitrat-spezifische „vaskuläre Toleranz“, die wirkmechanismus-basiert ist (auch „klassische Toleranz“). Eine durch ein bestimmtes Nitrat hervorgerufene Verminderung der Gefäßwirksamkeit gegenüber endogen gebildetem (Endothel) oder extern durch andere Nitrate oder NO-Donoren zugeführtem NO wird als „Kreuztoleranz“ bezeichnet. Die unter therapeutischen Bedingungen und chronischer Einnahme hervorgerufene „*in vivo* Toleranz“ ist von der „*in vitro* Toleranz“ zu unterscheiden, diese wird am isolierten Gefäß bei vergleichsweise hohen Konzentrationen erzeugt. Dieses Phänomen wird auch als Akuttoleranz oder allgemeiner, aber weniger spezifisch, als Tachyphylaxie bezeichnet und ist mit einem raschen Wirkungsverlust verbunden, der jedoch weitgehend reversibel ist. Die *in vitro* Toleranz ist dennoch in der experimentellen Pharmakologie von großem Interesse, da sie zeitnah Beurteilungen zu Struktur-Wirkungs- oder -Toleranz-Beziehungen unter Ausschluß pharmakokinetischer und neurohumoraler Einflüsse bei geringem Studienaufwand ermöglicht. Alle in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Nitrat-toleranz beschäftigen sich mit der *in vitro*-Toleranz. In der klinischen Pharmakologie ist zudem der „Rebound Effekt“ geläufig, der bei einer Nitratpause oder Therapiebeendigung mit einer deutlichen Verschlechterung der Symptome gegenüber der Prätherapiephase einhergeht.

1.3.1. Pseudotoleranz

Eine neurohumorale Gegenregulation wird allgemein durch den Nitrat-induzierten, dosisabhängigen Blutdruckabfall induziert, der seinerseits Baroreflexe stimuliert. Eine Vielzahl von Mechanismen setzt sich in der Folge in Gang: Erhöhung der Katecholamin-, Vasopressin-, Angiotensin- und Aldosteronkonzentrationen im Plasma. Eine intravaskuläre Volumenzunahme (Erniedrigung des Hämatokrits) unter Nitratgabe ist die Folge und kann den vorlastsenkenden Effekt der Nitrate abschwächen. Wahrscheinlich steht der Nitratkopfschmerz, die zweite bedeutsame therapielimitierende Nebenwirkung der Nitrate, in engem Zusammenhang mit der Pseudotoleranz. Beide Phänomene sind

vor allem zu Therapiebeginn charakteristisch, sehr dosisabhängig und für GTN am ausgeprägtesten.

1.3.2. Klassische Toleranz

Als Ursachen der klassischen Nitratoleranz sind verschiedene Mechanismen postuliert worden: Beeinträchtigung der Bioaktivierung, Desensibilisierung der sGC, Inaktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen, Stimulierung von cGMP/cAMP abbauenden Phosphodiesterasen, Beeinträchtigung der Endothelfunktion bis zu einer Endotheldysfunktion sowie gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren (Endothelin, Angiotensin II).⁹⁴ Viele dieser Faktoren stehen in engem Zusammenhang zueinander und sollten nicht isoliert betrachtet werden.

Erklärungsansätze und –theorien

Grundsätzlich haben sich zwei Haupttheorien etabliert. *Needleman* brachte bereits früh die Beeinträchtigung der GTN-Bioaktivierung mit einer Verarmung freier Thiolgruppen in Verbindung und sah darin die Ursache der Sensitivitätsabnahme bei chronischer GTN-Gabe. Die andere von *Münzel et al.* propagierte Theorie sieht als Hauptursache der Nitratoleranz die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zu oxidativem Streß im kardiovaskulären System und einer verminderten Bioverfügbarkeit gegenüber NO führt. Als potentielle Superoxid-Quellen werden die vaskuläre NADPH-abhängige Oxidase und die entkoppelte eNO-Synthase angesehen.^{119,120} Obwohl für beide Theorien Beweise erbracht wurden, konnten viele Phänomene, wie z.B. die Endotheldysfunktion (Kreuztoleranz), gesteigerte Sensitivität gegenüber Vasokonstriktoren oder nitratspezifische Differenzen im Toleranzverhalten nicht schlüssig geklärt und in Zusammenhang gebracht werden. Erst die von *Chen et al.* postulierte Schlüsselrolle der ALDH-2 für die Bioaktivierung organischer Nitrate ermöglichte ein besseres Verständnis der biochemischen Vorgänge, die zu einer Toleranz führen können. *In vitro* und *in vivo* wurde durch GTN eine Hemmung der ALDH-2 ausgelöst und führte zu einer deutlichen Abnahme der Gesamtaktivität (ca. 50%) der ALDH-2 in Gefäßhomogenaten und isolierten Mitochondrien aus Rattenaorten und -herzen. Dabei ist von untergeordneter Rolle, ob die ALDH-2-Inhibition durch GTN-Vorbehandlung, ALDH-2-Defizienz oder spezifische Inhibition mit Daidzin ausgelöst wird, die Abnahme der vasodilatorischen Antwort war jeweils relativ übereinstimmend.

Eine Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies in Endothel- und Gefäßmuskelzellen wurde in toleranten Gefäßen gefunden und konnte durch ROS-Radikalfänger wie Vitamin C, Ebselen oder Disulfid-reduzierende Substanzen wie Dithiotreitol (DTT) vermindert werden. Pathophysiologisch führt diese oxidative Dysbalance zu einer Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen Reaktionen (Enzymhemmung, -aktivierung, -entkopplung, Expressionsveränderungen), die in Abb. 6 zusammengefasst werden.

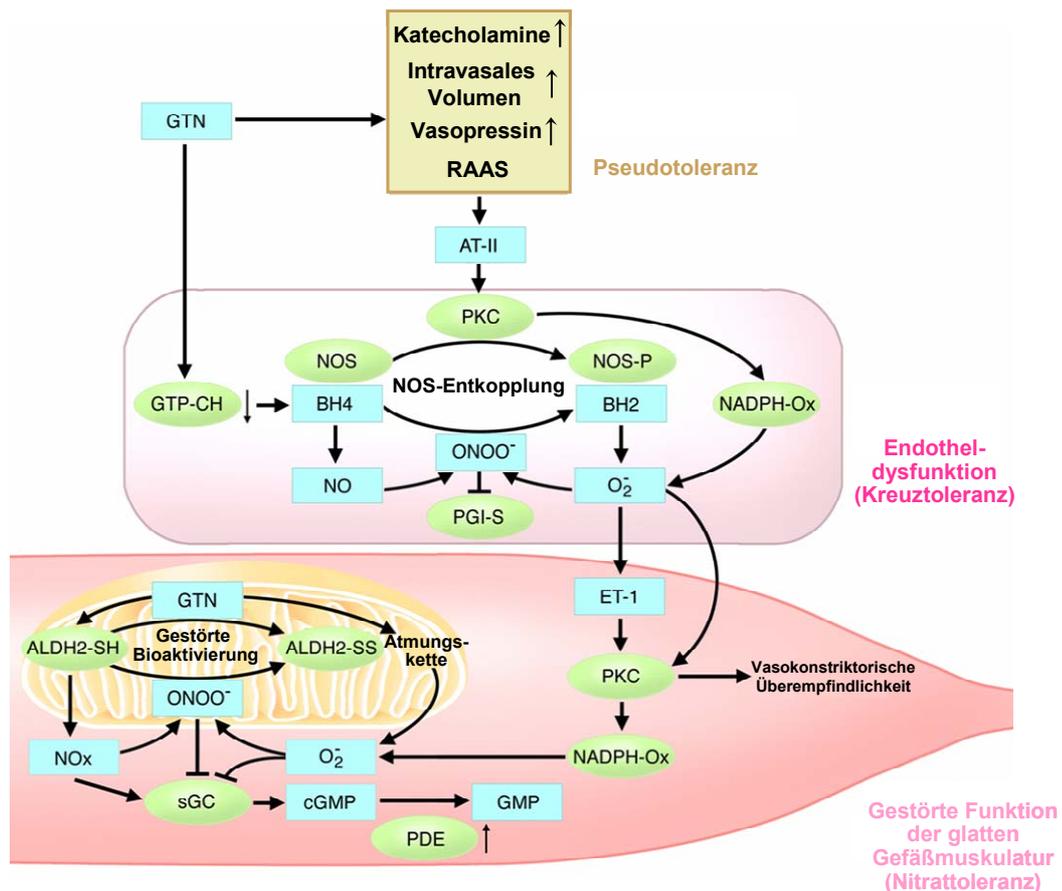


Abb. 6: Mechanismen der Nitrattoleranz. Eine neurohumorale Gegenregulation (Pseudotoleranz) stellt sich in der Regel unmittelbar zu Beginn einer kontinuierlichen, niedrigdosierten GTN-Therapie ein (RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Zur Dysfunktion des Endothels und der glatten Gefäßmuskulatur (Kreuz- und Nitrattoleranz) kommt es etwa nach 3 Tagen durch: a) erhöhte Superoxidbildung durch eine Proteinkinase C(PKC)-induzierte, gesteigerte Aktivität der NADPH-Oxidase (NADPH-OX) sowie direkte Hemmung der NO-Synthesen (NOS) durch PKC b) die Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) aus O₂⁻ und NO führt zu einer Oxidation von Tetrahydrobiopterin (BH₄), verminderte Expression der GTP-Zyklohydrolase (GTP-CH) durch GTN, beide Mechanismen führen zur NOS-Entkopplung c) Überempfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren (Angiotensin II-ATII) infolge einer erhöhten PKC-Aktivität d) Verminderung der GTN-Bioaktivierung durch eine ONOO⁻-induzierte Inaktivierung der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) e) Hemmung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) durch ONOO⁻ und O₂⁻ f) gesteigerter Abbau der zyklischen Guanosinmonophosphat (GMP)-Konzentration durch eine gesteigerte Phosphodiesterase(PDE)-Aktivität g) Hemmung der Prostacyclinsynthese (PGI-S) durch ONOO⁻; dadurch verminderte Bildung von Prostacyclin.⁹⁴

Allerdings ist offen, durch welchen chemischen Mechanismus mit GTN eine ROS-Bildung in den Mitochondrien induziert wird, ursächlich dürfte es aber der redoxabhängige Bioaktivierungsschritt sein. Wie bereits in *Kap. 1.2.3.* erwähnt, wird die Metabolisierung hochpotenter Nitrate durch Cysteinreste (Cys 301-302) im aktiven Zentrum der ALDH-2 vermittelt und diese im Zuge einer Reduktion durch Wasserstoffübertragung zu Disulfiden oxidiert. Das Enzym befindet sich daraufhin im inaktiven, funktionsuntüchtigen Status.

Neue Studien von *Daiber et al.* deuten auf einen Zusammenhang zwischen ROS-Bildung und gestörter Funktion der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) hin.¹²¹ Die Mn-SOD ist die mitochondriale Isoform der SOD und katalysiert den Abbau von Superoxid zu Wasserstoffperoxid, welches wiederum durch die Glutathionperoxidase zu Wasser detoxifiziert wird. Superoxid wird im Rahmen der Atmungskette permanent unter physiologischen Bedingungen durch fehlgeleitete Elektronen (ca. 1% des gesamten Elektronenflusses) produziert, der Mn-SOD kommt daher eine Schlüsselrolle beim Schutz der mitochondrialen Atmung vor Entkopplung zu. An einem Mn-SOD^{+/-}-Mausmodell wurde gezeigt, dass GTN bei chronischer und akuter Gabe eindeutig zu einer Erhöhung des vaskulären oxidativen Stresses führt. Insbesondere GTN-tolerante Aorten von Mn-SOD^{+/-}-defizienten Mäusen zeigten eine deutliche Verschlechterung in der Empfindlichkeit (EC₅₀) sowohl gegenüber GTN selbst (*in vitro*-Toleranz) als auch Acetylcholin (Kreuztoleranz). Diese Befunde wurden untermauert durch eine erniedrigte P-VASP-Expression als Marker für den Zustand der NO/sGC/cGK-I-Signalkette und einem Anstieg der mitochondrialen ROS-Bildung mittels Chemilumineszens bei Mn-SOD^{+/-}- gegenüber Wildtypmäusen. Als Konsequenz dieser gestörten biochemischen Prozesse war auch die ALDH-2 Dehydrogenase- und Esterasefunktion bei Mn-SOD^{+/-}-Mäusen signifikant vermindert. *Daiber* vermutete, dass eine chronische oder akut hochdosierte Behandlung mit hochpotenten Nitraten zu einer Erschöpfung der Reduktionskapazität (wahrscheinlich thiolabhängig) und Inaktivierung der ALDH-2 führt. Eine Akkumulation der Nitrate könnte durch Wechselwirkung mit der mitochondrialen Atmungskette zur ROS-Bildung beitragen. Es ist bekannt, dass Superoxid vasodilatierende Spezies wie NO unter Bildung von Peroxynitrit abfängt, ein gestörter NO-Signaltransduktionsweg ist die Folge. Zum anderen kann Peroxynitrit die Mn-SOD oxidativ modifizieren, womit eine ungehemmte Superoxidbildung ausgelöst wird. Ein *circulus vitiosus* setzt sich in Gang, der als Nitratintoleranz in Erscheinung tritt. Durch Induzierung einer endothelialen Dysfunktion kann somit die Langzeitprognose bei KHK-Patienten unter GTN-Behandlung verschlechtert werden. Diese biochemischen Einblicke in den intrazellulären Ablauf sind nicht generell übertragbar auf andere therapeutisch und nicht-therapeutisch verwendete Nitrate.

2. Zielstellung

2.1. Vorbemerkungen

Die in der Einleitung vorgestellten offizinellen Nitrate (Kap. 1.1.2.) werden in deutlich voneinander abweichenden Dosierungen eingesetzt (Tabelle 1).

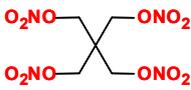
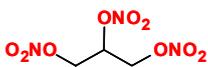
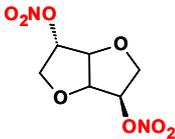
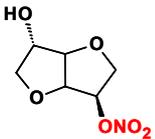
	PETN	GTN	ISDN	ISMN
Strukturformel				
Nitratgruppenanzahl	4	3	2	1
Dosierung	ED: 50-80 mg TD: bis 240 mg	ED: 0,2-2,4 mg TD: bis 15 mg	ED: 20-120 mg TD: bis 120 mg	ED: 20-100 mg TD: bis 120 mg
Wirkeintritt	40-60 min	1-3 min	15-30 min	30-60 min
Plasmahalbwertszeit	nicht bekannt	6 min	30-60 min	4-6 h
Wirkdauer	6-8 h	30-60 min	4-6 h	8-10 h

Tabelle 1: Daten zum klinischen Wirkprofil therapeutisch relevanter und zugelassener organischer Nitrate. Die Angaben zu Wirkeintritt, Plasmahalbwertszeit und Wirkdauer beziehen sich für PETN, ISDN und ISMN auf perorale, für GTN auf sublinguale Applikation. In peroraler Applikationsform wurde GTN in folgender Dosierung empfohlen: ED: 2,5 mg; TD bis 15 mg; jedoch sind keine Angaben zum Wirkprofil bekannt (Nitrolingual retard[®], Retard-Kapsel 2,5 mg, obsolet).^{36,47,122} ED: Einzeldosierung; TD: Tagesdosierung.

Selbst die Dosierung desselben Arzneistoffs, wie die des GTN, ist in klinisch-pharmakologischen Untersuchungen häufig variiert worden und bewegt sich aktuell je nach Therapieregime und -leitlinie in einer großen Bandbreite. Offensichtlich besteht bei der therapeutischen Dosierung von Nitraten kein Zusammenhang zur Anzahl der Nitratgruppen im Molekül. Dies ist bemerkenswert, da nur die Nitratgruppe ursächlich die gewünschte Gefäßrelaxation auslöst. Daher sollte eine Steigerung der Nitratgruppenzahl im Molekül die vasodilatorische Potenz erhöhen, wenn nicht andere physikochemische oder sterische Einflüsse dem entgegenwirken.

Bisher ist wenig über *in vitro* Struktur-Wirkungsbeziehungen bei organischen Nitraten bekannt. Klassische Organbadexperimente an isolierten Gefäßen zur Aufnahme isometrischer Relaxationskurven eignen sich hervorragend zur vergleichenden Charakterisierung der Pharmakodynamik einer größeren Anzahl verschiedener Nitrats. Sie ermöglichen unter Ausschluß pharmakokinetischer Parameter oder neurohumoraler Gegenregulationsmechanismen eine schnelle Bestimmung der Vasoaktivität, insbesondere auch in vergleichenden Parallelversuchen. Zudem bietet die Versuchsmethode im Vergleich zu *in vivo* Messungen (z.B. Tierversuche) eine hohe Reproduzierbarkeit bei relativ geringem apparativen Aufwand. Auch lassen sich durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Wirkmechanismen der untersuchten Verbindungen ziehen. Wiederholte Messungen erlauben weiterhin die Erkennung von Toleranzphänomenen. Als Gefäßtyp sollte bei der vergleichenden qualitativen und quantitativen Bewertung vasoaktiver Verbindungen die Arteria pulmonalis des Schweins dienen. In Voruntersuchungen zeigte sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Nitraten, sie weist eine intakte Endothelfunktion mit hoher NO-Kapazität auf und ist relativ einfach und schnell aus den Lungen zu präparieren. Darüber hinaus liegen an diesem Gefäßtyp bereits Befunde aus unserer Arbeitsgruppe vor.¹²³

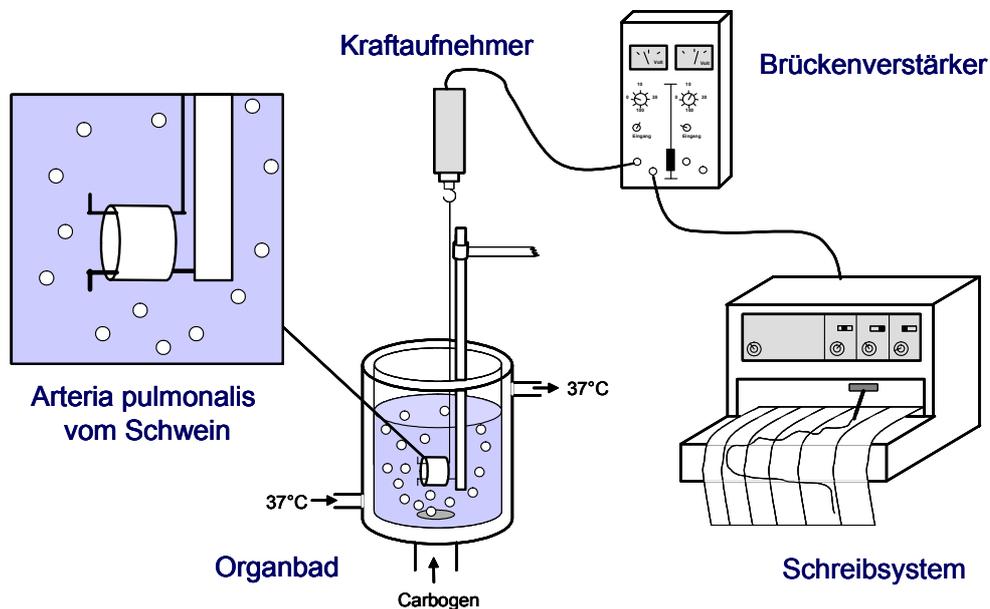


Abb. 7: Schematischer Aufbau einer Organbadapparatur, weitere Details in Veröffentlichung 1 - Methode.

2.2. Aufgabenstellungen

1. *Besteht bei offizinellen organischen Nitraten in vitro eine Korrelation zwischen der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und deren Vasoaktivität?*

In der Vergangenheit wurden lediglich unsystematisch einzelne Verbindungen in pharmakologischen Voruntersuchungen für klinische Tests geprüft, meist stimmen in den verschiedenen Publikationen weder Gefäßtypen noch Untersuchungsmethoden überein. Eine Bewertung dieser Ergebnisse, selbst von lange bekannten Nitratverbindungen, ist daher nur unzureichend möglich. Ziel der Untersuchungen war es deshalb, erstmals alle therapeutisch eingesetzten organischen Nitrate (PETN, GTN, ISDN, ISMN) unter standardisierten Bedingungen an einem Gefäßtyp (Arteria pulmonaris) und vergleichend hinsichtlich der vasodilatorischen Potenz im Organbad zu prüfen.

2. *Läßt sich eine Abfolge der vasodilatorischen Wirkaktivität bei den bioaktiven Metaboliten der offizinellen organischen Nitrate erkennen?*

Das besondere Merkmal von Oligonitraten ist, dass sie im Gegensatz zu Mononitraten bioaktive Metabolite bilden. So resultieren aus dem Arzneistoff PETN die 3 Metabolite Pentaerithryltrinitrat (PEtriN), Pentaerithryldinitrat (PEdiN) und Pentaerithrylmononitrat (PEmoN). Zusammen mit PETN selbst ergibt sich daraus ein idealer Satz von Verbindungen, an dem die Korrelation zwischen Zahl der Nitratgruppen und vasodilatorischer Potenz untersucht werden kann. Das Molekül Pentaerithritol ist zudem symmetrisch, Enantiomere können ebenfalls ausgeschlossen werden. Gleiche Untersuchungen sollten an den bioaktiven Metaboliten des GTN, nämlich mit 1,2-GDN und 1,3-GDN vorgenommen werden. Die Ergebnisse haben hohe Relevanz, da anzunehmen ist, dass der gesamte klinische Effekt der Nitrate wesentlich durch die bioaktiven Metabolite mitbestimmt wird.

3. *Welchen Einfluß besitzt bei organischen Nitraten das Gefäßendothel auf die Wirkstärke?*

Bekanntlich geht die Arteriosklerose einher mit einer endothelialen Dysfunktion, bei der im Rahmen eines komplexen pathophysiologischen Geschehens durch Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) nicht genügend Stickstoffmonoxid (NO) zur lokalen Regulierung des Vasotonus' bereitgestellt wird. Daher sollte untersucht werden, ob

Verschiebungen der Konzentrations-Wirkungskurve durch Schädigung der Endothelzellschicht oder Hemmung der endothelialen NO-Synthase zu beobachten sind, und ob generell das Gefäßendothel Struktur-Wirkungsbeziehungen bei organischen Nitraten beeinflusst.

4. *Wird die Gefäßrelaxation generell durch einen sGC-abhängigen Mechanismus vermittelt?*

Wie in der Einleitung erwähnt, wird die vasodilatorische Wirkung organischer Nitrate auf einen sGC-abhängigen Mechanismus zurückgeführt (Kap. 1.2.2.). Es sind in der Vergangenheit jedoch immer wieder Arbeiten erschienen, die zumindest bei direkten NO-Donoren auf einen davon unabhängigen, bisher noch nicht identifizierten Wirkmechanismus hinweisen.¹²⁴ Es sollte daher zusätzlich für alle organischen Nitrate in den *in vitro* Relaxationsuntersuchungen geprüft werden, ob deren Wirkung direkt über die sGC-vermittelt wird.

5. *Führen alle organischen Nitrate übereinstimmend zu einer in vitro-Toleranz?*

Die meisten Befunde hinsichtlich der Nitrattoleranz wurden in klinischen Studien erhoben, daneben gibt es einzelne, nicht systematisch durchgeführte vergleichende *in vitro* Untersuchungen. Es sollte nun in den experimentell-pharmakologischen Untersuchungen festgestellt werden, ob bei den verfügbaren Arzneistoffen und deren bioaktiven Metaboliten eine Korrelation zwischen der Zahl der Nitratgruppen und dem Ausmaß der Wirkungsabschwächung nach wiederholter Gabe besteht (*in vitro*-Toleranz). Das Design der Studie sollte so angepasst werden, dass die *in vitro*-Toleranz nicht nur durch Vorinkubation mit übereinstimmenden und vergleichsweise hohen mikromolaren Mengen an Nitrat (z.B. 300µM Bolus) – wie bisher üblich – sondern auch durch Vorinkubation mit Dosierungen gleicher Wirkstärke (EC₉₀ und EC₁₀₀) induziert wird. So könnten im Gegensatz zu früheren Studien die unterschiedliche Vasoaktivität der untersuchten organischen Nitrate berücksichtigt werden und relevantere Struktur-Toleranzbeziehungen erhalten werden.

6. *Synthese neuartiger Mononitrat-Verbindungen.*

Zur Erkennung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei organischen Nitraten sollte eingangs die Frage geklärt werden, ob eine und gegebenenfalls welche Korrelation zwischen Wirkstärke und Nitratgruppenzahl besteht. Weiterführend sollte darüber hinaus

der strukturelle Einfluß der organischen Nitrat-tragenden „Restmoleküle“ untersucht werden. Es sollten daher systematisch eine größere Zahl organischer Mononitrate konzipiert, synthetisiert, strukturell und analytisch gesichert werden. Zielsetzung war die Variation des Nitratcarriers mit dem Ziel hoher struktureller Divergenz in Bezug auf elektronische und sterische Eigenschaften.

7. Wie unterscheiden sich neuartige Mononitratverbindungen in ihrer Vasoaktivität?

Mit den etablierten *in vitro* Methoden sollte systematisch und reproduzierbar die vasodilatorische Potenz der neuen Mononitrate geprüft werden. Für ausgesuchte Verbindungen sollte untersucht werden, inwieweit eine endothelabhängige Relaxation sowie eine Toleranzentwicklung nachzuweisen ist. Da in früheren Arbeiten häufig ein Zusammenhang zwischen Lipophilie und Wirkaktivität postuliert wurde, sollte für jede geprüfte Verbindung ein logP-Wert als Maß für die Lipophilie berechnet werden.

8. Mögliche Bioaktivierungswege und in vitro Toleranz neuartiger Mononitratverbindungen?

Diese Untersuchungen sollen in Kooperation mit Herrn Dr. habil. Andreas Daiber, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik, Kardiologie erfolgen. Organische Nitrate können, wie in der Einleitung (Kap. 1.2.3.) erläutert, abweichend voneinander bioaktiviert werden. Es sollte geprüft werden, ob Mononitrate, die sich in den Relaxationsuntersuchungen als vergleichsweise hochpotent erwiesen, über den ALDH-2-vermittelten, hochpotenten Stoffwechselweg bioaktiviert werden. Dieser Metabolisierungsweg ist bisher nur für Tetra- und Trinitrate beschrieben worden. Die Untersuchungen erfolgten vergleichend an Wildtyp- und ALDH-2 defizienten (ALDH2^{-/-}) Mäusen. In diesem Zusammenhang sollte auch geprüft werden, ob ausgewählte Mononitrate *in vitro* Toleranz und im Kontext dazu ROS-Spezies induzieren.

9. Pharmakologische Charakterisierung von NO-Donor- und Nitrat-β-Rezeptorenblocker-Hybridmolekülen.

In Kooperation mit Herrn PD Dr. habil. Michael Decker aus dem eigenen Arbeitskreis sollten NO-Donor- und Nitrat-β-Rezeptorenblocker-Hybridmoleküle hinsichtlich ihrer Gefäß-wirkung untersucht werden. Die synthetisierten Verbindungen sollen vasodilatierende Eigenschaften von Nitroso- bzw. Nitratgruppen mit der Herzfrequenz und

-kontraktilitäts vermindern Wirkung von β -Adrenozeptor-Blockern verbinden. Ebenso sollten zudem die Wirkaktivitäten der Einzelkomponenten des Hybrids untersucht werden.

10. Pharmakologische Charakterisierung von NONOaten, NONOat-Prodrugs und anderer NO/NO_x-Donoren.

In Kooperation mit Herrn Dr. Jörg Konter aus dem eigenen Arbeitskreis sollte für ausgewählte NO-Donoren und NO-Donor-Prodrugs vom Diazeniumdiolattyp (NONOate) die Bestimmung der vasodilatorischen Potenzen sowie Untersuchungen zur *in vitro*-Toleranz vorgenommen werden. Damit sollte geklärt werden, inwieweit bei diesen Verbindungen ein Zusammenhang zwischen NO-Freisetzung und Gefäßwirksamkeit besteht. Davon unabhängig sollten andere NO/NO_x-Donoren (Nitrosothiole, Nitrite) auch im Hinblick auf Zeitverlauf und Reversibilität der vasodilatorischen Wirkung im Vergleich zu den organischen Nitraten charakterisiert werden.

11. Pharmakologische Charakterisierung von Nitrat-NSAID-Hybriden.

Dieses Projekt sollte in Zusammenarbeit mit Frau Apothekerin Kathrin Lange bearbeitet werden. Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR oder NSAID) wie Flurbiprofen und Indomethacin wurden mit bioaktiven Metaboliten des Arzneistoffs PETN in unterschiedlichen Verhältnissen NSAID:Nitrat verknüpft. Diese neuen Derivate können als gastroprotektive, antiinflammatorische Arzneistoffe betrachtet werden sowie als potentielle Arzneistoffe der Alzheimerschen Krankheit. Zur Evaluierung pharmakologischer Parameter sollte unter anderem deren Gefäßwirksamkeit bestimmt werden.

3. Übersicht der Veröffentlichungen

Nachfolgend sind alle Publikationen wiedergegeben, die sich aus den experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorgelegten Dissertation ergeben haben. Die Eigenanteile sind nachfolgend charakterisiert.

- Publikationen als Erstautor: In den Veröffentlichungen 1, 3 und 4 wurden von mir die experimentell-pharmakologischen Untersuchungen durchgeführt, sowie die Auswertung der Daten und die Erstellung der Manuskripte vorgenommen. In der Veröffentlichung 4 habe ich zudem die beschriebenen Mononitrate synthetisiert und aufgereinigt.
- Publikationen als Koautor: In den Veröffentlichungen 2 und 5 sind die beschriebenen Nitrate von mir hinsichtlich vasorelaxierender Eigenschaften vergleichend experimentell geprüft worden, an der Erstellung der Manuskripte habe ich mitgewirkt.

Veröffentlichung 1

Pharmakologische Charakterisierung von Pentaerithryltetranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten und anderen organischen Nitraten an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins.

König, Andreas; Pietig, Imke; Homann, Alexander; Glusa, Erika; Fricke, Uwe; Lehmann, Jochen. In: ERDMANN, E.; MUTSCHLER, E.; STALLEICKEN, D. (Hrsg.): Pentaerithryltetranitrat: Evidenzorientiertes Therapiekonzept kardialer Erkrankungen. *Steinkopff Verlag, Darmstadt (2004)*, 59-68.

In dieser einleitenden experimentell-pharmakologisch orientierten Arbeit werden erstmals alle therapeutisch relevanten, organischen Nitrate vergleichend hinsichtlich vasodilatatorischer Potenz unter identischen Versuchsbedingungen *in vitro* vorgestellt. Bei diesen einfach strukturierten Alkylnitraten besteht eine strenge Korrelation zwischen Nitratgruppenanzahl im Molekül und deren *in vitro*-Aktivität. Zudem wurde systematisch untersucht, inwieweit an Gefäßabschnitten mit geschädigter Endothelbarriere und -funktion bei diesen Nitraten Wirkunterschiede auftraten. Abschließend wurde gezeigt, dass alle untersuchten Nitrate eine über die lösliche Guanylylcyclase vermittelte

Relaxation auslösen. Mit der Arbeit wurden die Grundlagen für weiterführende Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen neuer organischer Nitrate gelegt.

Veröffentlichung 2

Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol.

Decker, Michael; König, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2004), 14, 4995-7.

Gegenstand dieser Veröffentlichung sind NO-Donor- und Nitrat- β -Rezeptoren-Blocker-Hybridmoleküle, welche durch die zwei unterschiedlichen Wirkprinzipien zu einer Blutdrucksenkung sowie einem geringeren Sauerstoffverbrauch des Myokards und damit zum Schutz vor Herzinsuffizienz führen sollen. In dieser Arbeit wird die Synthese und pharmakologische Charakterisierung von zwei strukturell unterschiedlichen Hybridmolekülen im Vergleich zu den entsprechenden Einzelkomponenten vorgestellt. Beide Hybridmoleküle sind in der Lage, eine vollständige Vasorelaxation auszulösen. Im Vergleich zu den jeweiligen Einzelkomponenten weisen sie jedoch deutlich abweichende *in vitro*-Wirkaktivitäten auf.

Veröffentlichung 3

Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate.

König, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Jörg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (2007), 50, 68-74.

Diese Veröffentlichung schließt neben den in der Veröffentlichung 1 vorgestellten therapeutisch relevanten organischen Nitraten die Untersuchung der *in vitro*-Gefäßwirksamkeit von SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamin) und des Diazeniumdiolates PHEPIPERAZI/NO ein. Insbesondere wird ein *in vitro*-Toleranzmodell vorgestellt, welches erstmals die unterschiedliche Vasoaktivität der verschiedenen organischen Nitrate in der Versuchsdurchführung berücksichtigt. In den Untersuchungen konnte verdeutlicht werden, daß die *in vitro*-Toleranz in enger Beziehung mit der Zahl der Nitratgruppen im Molekül steht. Insbesondere bei den Tetra- (PETN) und Trinitraten (GTN und PEtriN) wurde eine deutliche Abschwächung nach wiederholter Gabe beobachtet. Die mehrfach beschriebene *in vivo*-Toleranzfreiheit von

PETN wird offensichtlich entscheidend bestimmt durch die langsame Anflutung der wirkbestimmenden und toleranzarmen Di- und Mononitrat Metabolite PE_{Di}N und PE_{Mo}N. PETN selbst hingegen wird in großen Mengen unmetabolisiert ausgeschieden und ist sehr wahrscheinlich nicht an der Wirkung beteiligt.

Veröffentlichung 4

NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.

König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2007), 17, 5881-5.

Veröffentlichung 4 befaßt sich mit der Synthese und *in vitro*-Vasoaktivität organischer Mononitrate. In den vorangehenden Untersuchungen wurde deutlich, dass das Nitratgruppen tragende und strukturgebende Kohlenstoffgerüst durchaus Einfluß auf die Wirkstärke hat. Daher erfolgte die systematische Darstellung neuer organischer Mononitrate mit der Zielsetzung einer möglichst hohen Divergenz der Substituenten in Bezug auf elektronische und sterische Eigenschaften. Innerhalb der Gruppe von 14 Mononitraten wurden signifikante Unterschiede in der vasodilatorischen Potenz beobachtet, die Wirkaktivitäten bewegten sich in einer erstaunlich großen Spannbreite von 32 bis 435000 nM. Eine häufig postulierte Korrelation zwischen Lipophilie und *in vitro*-Wirkstärke wurde hingegen nicht beobachtet. Überraschenderweise erwies sich das 2-Aminoethylnitrat-Nitratsalz (2-Nitrooxyethyl-ammoniumnitrat) als starke vasodilatorische Verbindung und ist praktisch wirkungsgleich mit dem hochpotenten Trinitrat GTN. Die Vasoaktivität läßt sich demnach durch Variierung des nitrattragenden Molekülrests steuern.

Veröffentlichung 5

NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.

Lange, Kathrin; König, Andreas; Roegler, Carolin; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. In Vorbereitung.

In Veröffentlichung 5 wird die Synthese der bioaktiven Metaboliten von GTN und PETN beschrieben. PE_{Tri}N, PE_{Di}N, PE_{Mo}N, 1,2-GDN, 1,3-GDN, 1-GMN, 2-GMN sind wichtige Referenzverbindungen für pharmakokinetische Untersuchungen der beiden Arzneistoffe.

Zusätzlich werden die vasodilatorischen Eigenschaften dieser Verbindungen vorgestellt. Dabei ließ sich auch für die GTN-Metaboliten die postulierte Korrelation zwischen Vasoaktivität und Nitratgruppenanzahl bestätigen. Allerdings zeigen auch in diesem Fall Metaboliten mit gleicher Nitratgruppenanzahl unterschiedliche Relaxationseffekte, die in enger Abhängigkeit zur Position der Nitratgruppe am Trägermolekül stehen.

4. Veröffentlichungen

Veröffentlichung 1

**Pharmakologische Charakterisierung von
Pentaerithryltetranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten
und anderen organischen Nitraten
an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins.**

König, Andreas; Pietig, Imke; Homann, Alexander;
Glusa, Erika; Fricke, Uwe; Lehmann, Jochen.

In: ERDMANN, E.; MUTSCHLER, E.; STALLEICKEN, D. (Hrsg.):
Pentaerithryltetranitrat: Evidenzorientiertes Therapiekonzept
kardialer Erkrankungen.
Steinkopff Verlag, Darmstadt (2004), 59-68.

Pharmakologische Charakterisierung von Pentaerithryltetranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten und anderen organischen Nitraten an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins

A. KÖNIG, J. PIETIG, A. HOMANN, E. GLUSA, U. FRICKE, J. LEHMANN

■ Einleitung

Aus der Gruppe der organischen Nitratester besitzt das Pentaerithryltetranitrat (PETN*) aufgrund des verminderten Toleranzverhaltens und Nitratkopfschmerzes eine bessere therapeutische Wirksamkeit gegenüber den anderen Vertretern dieser Wirkstoffklasse [5, 12, 22]. Mit vier Nitratgruppen im Molekül weist PETN zudem die höchste Nitratgruppenanzahl dieser Arzneistoffklasse auf. PETN ist metabolisch instabil und wird hauptsächlich zu den pharmakologisch aktiven Biotransformationsprodukten Pentaerithryltrinitrat (PEtriN), Pentaerithryldinitrat (PEdiN), Pentaerithrylmononitrat (PEmoN) und Pentaerithritol umgewandelt [4, 25]. Sowohl die Primärmetaboliten als auch glucuronidierte Konjugate sind im Plasma nachgewiesen worden [3, 20]. Dem Di- und Mononitrat wird die therapeutische Hauptwirkung beigemessen [23]. Andere Arbeiten weisen auf hydrolytischen, nicht enzymatischen Abbau in biologischen Matrices von PETN zu Produkten hin, die mit den enzymatisch gebildeten Metaboliten identisch sind [1, 27]. Der Arzneistoff PETN selbst besitzt scheinbar keine therapeutische Relevanz, da er nach oraler Applikation intestinal und hepatisch in wirksame Metabolite denitriert wird [13]. Das Gesamtwirkungsprofil von PETN ergibt sich letztlich aus der Summe der Einzelwirkungen seiner nitrathaltigen Metabolite.

Gegenstand der vorliegenden experimentell-pharmakologischen Arbeit war es, an einem isolierten Gefäßpräparat mit entsprechender Sensitivität für organische Nitrate vergleichende Analysen der vasodilatierenden Wirkung von PETN, seinen Metaboliten und den anderen offizinellen organischen Nitraten durchzuführen und um die experimentellen Grundlagen für die Prüfung neu synthetisierter Nitratverbindungen und anderer NO-Donoren zu legen.

Untersuchungen an isolierten Gefäßen mit PETN und seinen Metaboliten sind in der Vergangenheit an isolierten Gefäßen vom Kaninchen vorgenommen worden. Diese Versuche belegten bereits die starke gefäßrelaxierende Wirkung von PETN, PEtriN und GTN [11, 17].

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Pulmonalarterien vom Schwein verwendet. Diese Gefäßpräparate sind dem menschlichen sehr ähnlich

* Handelsname: Pentalong®

und haben sich unter anderem zur Charakterisierung von Serotoninrezeptoren bewährt [8, 9]. Wie in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, reagiert die Pulmonalarterie vom Schwein sehr sensibel und rasch auf organische Nitrate. Darüber hinaus besitzt dieser Gefäßabschnitt ein Endothel mit einer hohen NO-Synthesekapazität, welche zur Messung endothelabhängiger Gefäßrelaxationen geeignet ist [7, 8]. Die Pulmonalarterie verfügt zudem über eine breite Rezeptorausstattung [6, 7], sodass dieses Modell im Rahmen der Forschung zur pulmonalen Hypertonie nützlich sein könnte. Die Pulmonalarterien sind hinsichtlich Präparation sowie Messung des Gefäßtonus relativ einfach zu handhaben und stellen ein preiswertes Untersuchungsobjekt dar.

Neben dem gefäßrelaxierenden Effekt der einzelnen Substanzen sollte untersucht werden, in welcher Weise die Anzahl der Nitratgruppen im Molekül mit der Wirkstärke korreliert. Weiterhin stellte sich die Frage, ob Verschiebungen der Konzentration-Wirkungskurve durch Hemmung der endothelialen NO-Synthese zu beobachten sind. In arteriosklerotischen Gefäßabschnitten, wo die Endothelbarriere und -funktion geschädigt sind, können organische Nitrate in die Gefäßmuskelzellen vermehrt eindringen und bioaktiviert werden [15, 16]. Andererseits wurde für Glyceroltrinitrat belegt, dass die NO-Freisetzung aus dem Nitrat in Abhängigkeit von der endogen verfügbaren NO-Ressource variiert [16]. Im Hinblick auf eine endotheliale Dysfunktion, bei der durch die Gabe von organischen Nitraten ein pathophysiologischer NO-Mangel substituiert wird, sind diese Ergebnisse von besonderem Interesse. Ziel der Arbeiten war weiterhin, eine direkte Wirkungsabhängigkeit der Organonitrate von der Guanylatcyclase, einem Schlüsselenzym für die Gefäßrelaxation, am Gefäßpräparat nachzuweisen.

■ Methode

Für die Experimente wurden frische Schweinelungen vom Schlachthof verwendet. Kleine Seitenäste der Arteria pulmonalis wurden freipräpariert, entnommen und von Lungenparenchym und Bindegewebe befreit. Die Gefäße wurden bei Zimmertemperatur sofort in eine Petrischale gebracht, die mit Krebs-Henseleit-Nährlösung folgender Zusammensetzung (mM): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, Glucose 11 (pH 7,4 und 37°C) gefüllt war. Gefäße, die in den folgenden zwei Tagen für die Experimente verwendet werden sollten, wurden im Kühlschrank (2–8°C) unter Luftabschluss aufbewahrt. Innerhalb von 24 Stunden erfolgte ein Austausch der Krebs-Henseleit-Nährlösung. Die Gefäßbringe (2–3 mm lang und 1,5–2 mm breit) wurden jeweils zwischen L-förmigen Metallhaken in einem Organbad (10 ml) fixiert. Die Lösung wurde permanent mit einer Mischung von 95% O₂/5% CO₂ begast und auf 37°C konstant temperiert. Die Spannungsänderung wurde kontinuierlich isometrisch über einen Kraftaufnehmer (F 30 Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) registriert, durch einen Brückenverstärker (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) verstärkt und mittels Mehrkanalschreiber aufgezeichnet.

■ Versuchsablauf

Zu Beginn jedes Experiments wurden die Gefäßringe mit einer Vorlast von 20 mN gespannt und während der Versuchsdauer aufrechterhalten. Nach einer Adaptationszeit von 60 min erfolgte ein Wechsel der Nährlösung nach jeweils 15 min. Die Gefäßringe wurden in Abständen von 45 min stimuliert, beginnend mit KCl (45 mM) und dann dreimal mit Prostaglandin F₂ (3 μM) bis zur konstanten Einstellung der Kontraktionsamplitude.

Im Anschluss an die dritte Zugabe von PGF_{2α} nach Erreichen des Kontraktionsplateaus, wurde schrittweise kumulativ in steigenden Konzentrationen die zu prüfende Substanz dem Organbad zugesetzt. Die Zugabe der nächsten höheren Teilkonzentration erfolgte jeweils dann, wenn sich nach Inkubation der vorhergehenden kleineren Teilkonzentration ein Relaxationsgleichgewicht eingestellt hatte. Die Integrität des Endothels wurde anhand der durch Bradykinin (10 nM) hervorgerufenen endothelabhängigen Gefäßrelaxation beurteilt, die einen Maximaleffekt von mindestens 80% bezogen auf die vorherige maximale Kontraktion betragen muss. Eine Relaxation nach Zugabe von Bradykinin (10 nM) trat nicht auf, wenn das Endothel mechanisch mittels eines aufgerauten Plastikstabs entfernt wurde. Weiterhin wurden die Gefäßringe 15 min vor Auslösung der Kontraktion mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NAME (0,2 mM) inkubiert. Zur Untersuchung der Wirkungsabhängigkeit der organischen Nitrate von der Guanylatcyclase wurden die Gefäßringe ebenfalls 15 min vor Auslösung der Kontraktion mit dem NO-sensitiven Guanylatcyclase-Inhibitor ODQ (10 μM) versetzt.

■ Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet: Bradykinintriacetat und Prostaglandin F_{2α} (PG F_{2α}) (Serva, Heidelberg, Germany), N^G-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) (Research Biochemicals Int., Natick, MA, USA), 1H-[1,2,4]-Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Alexis, Läfelfingen, Switzerland), Glyceroltrinitrat (GTN) (Merck, Darmstadt, Germany), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN), Pentaerithryltetranitrat (PETN), Pentaerithryltrinitrat (PEtriN), Pentaerithryldinitrat (PEdiN), Pentaerithrylmononitrat (PEmoN) und Pentaerithritol (freundlicherweise von D. Stalleicken zur Verfügung gestellt).

■ Datenanalyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM von n separaten Versuchen dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Stichproben, ein signifikanter Unterschied wurde für p < 0,05 festgelegt. Alle Berechnungen der Mittelwerte ± SEM sowie Berechnungen der Regressionsgera-

den erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel, Origin und GraphPad Prism. Die pD_2 -Werte stellen den negativen Logarithmus der molaren EC_{50} -Werte dar.

■ Ergebnisse

Einfluss der Nitratgruppen auf die Gefäßrelaxation

Die Konzentration-Wirkungsbeziehungen der untersuchten Nitrats hinsichtlich ihrer vasorelaxierenden Wirkung an der Arteria pulmonalis sind in Abbildung 1 dargestellt. PETN erwies sich in diesen Untersuchungen als organisches Nitrat mit der stärksten vasodilatierenden Potenz, dicht gefolgt von GTN und PEtriN, die eine nahezu gleich starke Gefäßwirkung besaßen (Tabelle 1). Die Unterschiede sind nicht signifikant. Ein deutlich geringerer gefäßrelaxierender Effekt wurde bei den Di- und Mononitraten beobachtet. Sowohl das Di- als auch Mononitrat des Isosorbids wirkten allerdings signifikant stärker relaxierend als das entsprechende Pentaerithritoldi- bzw. mononitrat.

Insgesamt betrachtet jedoch, korreliert die Abfolge der vasodilatierende Potenz am isolierten Gefäß gut mit der Zahl der Nitratgruppen im Molekül, wie aus den pD_2 -Werten in Tabelle 1 ersichtlich ist.

Einfluss des Endothels

Um zu prüfen, ob die gefäßrelaxierende Wirkung von der Integrität des Endothels bzw. der NO-Synthese abhängig ist, wurde das Endothel der Gefäße mechanisch entfernt (keine Relaxation auf Bradykinin) und zusätzlich die

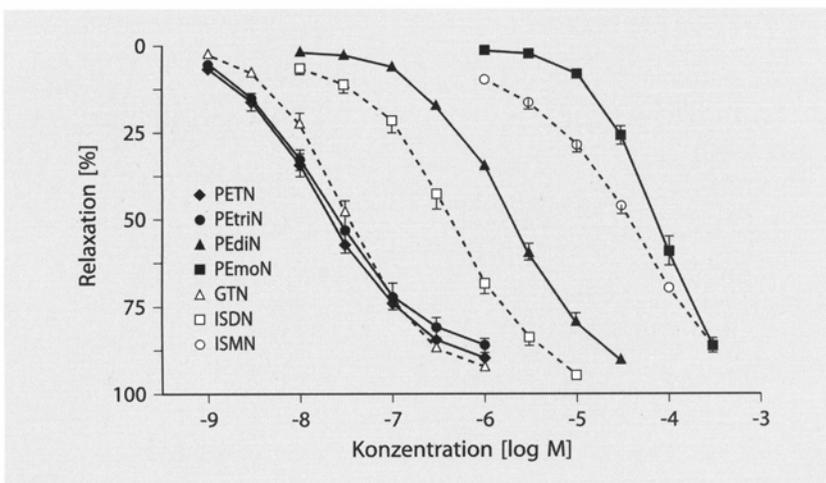


Abb. 1. Konzentrationswirkungskurven von Pentaerithryltetranitrat (PETN), Pentaerithryltrinitrat (PEtriN), Pentaerithryldinitrat (PEdiN), Pentaerithrylmononitrat (PEmoN), Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN) an $PGF_{2\alpha}$ ($3 \mu M$)-vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein *in vitro*. Die gefäßrelaxierende Wirkung ist in Prozent zu der durch $PGF_{2\alpha}$ ausgelösten Vorkontraktion dargestellt. Mittelwerte \pm SEM von 6–9 separaten Versuchen

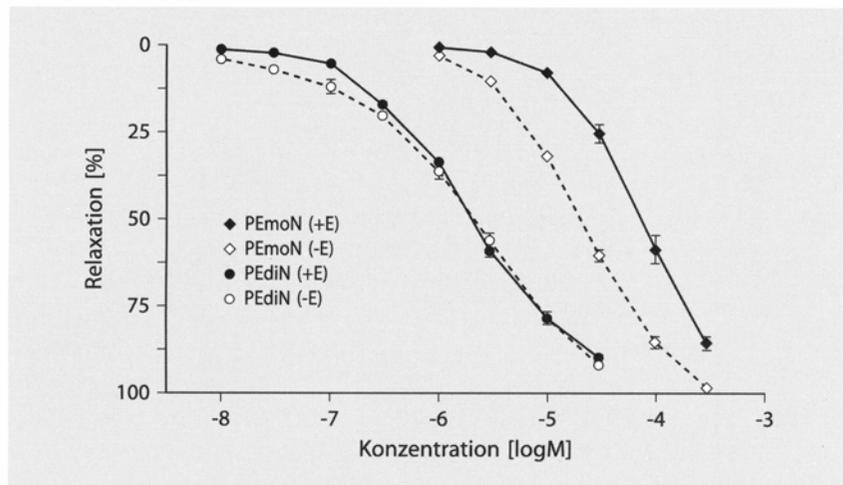


Abb. 2. Vasorelaxierende Wirkung von Pentaerithryldinitrat (PEdiN) und Pentaerithrylmononitrat (PEmoN) an $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-vorkontrahierten Pulmonalarterien mit intaktem Endothel (+E) und mechanisch geschädigtem Endothel mit zusätzlicher Blockade mit L-NAME ($0,2 \text{ mM}$) (-E). Die gefäßrelaxierende Wirkung ist in Prozent zu der durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Vorkontraktion dargestellt. Mittelwerte \pm SEM von 6–7 separaten Versuchen

Tabelle 1. Vergleich der relaxierenden Wirkung (pD_2) organischer Nitrates an $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel (+E) und mechanisch geschädigtem und durch L-NAME ($0,2 \text{ mM}$) – Blockade inaktiviertem Endothel (-E) in vitro. Mittelwerte \pm SEM

Substanz	mit Endothel (+E)	n	ohne Endothel (-E)	n
■ PETN	$7,62 \pm 0,03$	9	$7,92 \pm 0,04$	3
■ PEtriN	$7,53 \pm 0,04$	8	$7,94 \pm 0,08$	4
■ PEdiN	$5,68 \pm 0,02$	6	$5,72 \pm 0,03$	6
■ PEmoN	$4,14 \pm 0,02$	7	$4,70 \pm 0,02$	6
■ GTN	$7,44 \pm 0,02$	6	$7,60 \pm 0,04$	5
■ ISDN	$6,37 \pm 0,03$	7	$6,24 \pm 0,02$	2
■ ISMN	$4,48 \pm 0,03$	9	$4,48 \pm 0,07$	3

endotheliale NO-Synthase nach Vorinkubation mit L-NAME gehemmt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration-Wirkungskurve des PEdiN, nicht signifikant verschoben wird in den auf diese Weise deendothelialisierten Gefäßen, in Vergleich zu Gefäßen mit intaktem Endothel (Abb. 2). Für PEmoN war jedoch in deendothelialisierten Gefäßen die Gefäßrelaxation stärker ausgeprägt (Abb. 2). Insgesamt gesehen konnte eine Verschiebung der Konzentration-Wirkungskurve durch Ausschaltung des Endothels in unseren Untersuchungen mit PETN, seinen Metaboliten, GTN, ISDN und ISMN nur in geringem, teilweise nicht signifikantem Ausmaß beobachtet werden (Tabelle 1).

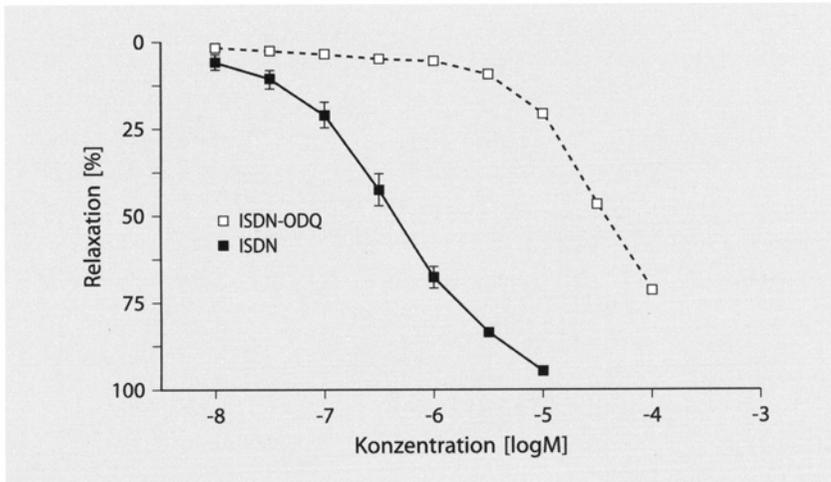


Abb. 3. Vasorelaxierende Wirkung von Isosorbiddinitrat (ISDN) an $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-vorkontrahierten Pulmonalarterien mit intaktem Endothel und Hemmung der vasorelaxierenden Wirkung von Isosorbiddinitrat durch Blockade der NO-sensitiven Guanylatcyclase durch ODQ ($10 \mu\text{M}$). Die gefäßrelaxierende Wirkung ist in Prozent zu der durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Vorkontraktion dargestellt. Mittelwerte - SEM von 3–6 separaten Versuchen

Einfluss von ODQ

Um nachzuweisen, ob die vasodilatierende Wirkung der untersuchten Nitratester auf eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase in der glatten Muskelzellen zurückzuführen ist, wurden die Experimente in Gegenwart von ODQ, einem Inhibitor der NO-sensitiven Guanylatcyclase durchgeführt. ODQ alleine hatte keinen Eigeneffekt auf den Gefäßtonus. Für alle verwendeten Nitrate konnte eine direkte Wirkungsabhängigkeit von der Guanylatcyclase belegt werden, wie beispielhaft für Isosorbiddinitrat in Abbildung 3 dargestellt. Durch Hemmung der Guanylatcyclase mit ODQ ($10 \mu\text{M}$) wurde die Konzentration-Wirkungskurve der Nitrate um durchschnittlich zwei Zehnerpotenzen nach rechts verschoben.

■ Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen konnte die starke vasorelaxierende Wirkung von PETN, PETriN und GTN erstmals auch an der isolierten Pulmonalarterie vom Schwein belegt werden. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit Daten überein, die an isolierten Gefäßabschnitten vom Kaninchen erhoben wurden und eine halbmaximale Relaxation im unteren nanomolaren Bereich ergaben [11, 17]. In vitro korreliert demnach die vaskuläre Wirksamkeit mit der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül. Im Gegensatz dazu waren bei isolierten Koronararterien vom Schwein die genannten drei Nitrate beim Vergleich der EC_{50} -Werte um mehr als eine Zehnerpotenz schwächer wirksam [10, 26].

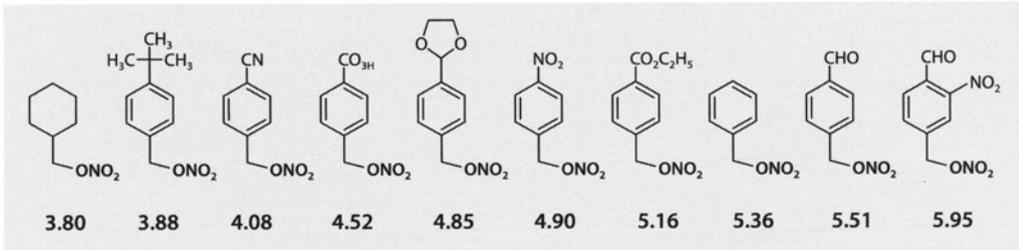


Abb. 4. Vergleich der vasorelaxierenden Wirkung (pD_2) von zehn unterschiedlichen Mononitraten an der Koronararterie vom Schwein mit intaktem Endothel (Daten von Weßler et al. [26])

Bemerkenswert ist, dass der Di- als auch Mononitratester des Isosorbids deutlich stärker gefäßwirksam war als PediN, bzw. PEmoN. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in der Gruppe der organischen Nitrate neben der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül ebenso strukturchemische und physikochemische Parameter einen Einfluss auf die Wirksamkeit besitzen. Es stellt sich die Frage, ob die Affinität und Aktivität des organischen Nitrat-Gesamtmoleküls an einem endogenen Biopolymer, z. B. an der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase, wesentlich zur Pharmakodynamik des Moleküls beiträgt. Weßler et al. [26] fanden in ihren Untersuchungen an der Koronararterie vom Hausschwein, dass Benzylmononitrat eine 300-mal stärkere Gefäßwirkung als das formal ähnliche Cyclohexylmononitrat aufweist. Darüber hinaus wurden auch innerhalb der Gruppe der Benzylmononitrate durch Variation der Substituenten im Bereich des die Nitratfunktion transportierenden organischen „Trägermoleküls“ erhebliche Unterschiede in der Gefäßwirksamkeit aufgezeigt (Abb. 4). Daher sind weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen innerhalb der Gruppe der organischen Nitrate von großem Interesse.

Die Befunde an der Arteria pulmonalis zeigten weiterhin, dass die untersuchten Nitrate mit geschädigter Endothelfunktion und -barriere gleichstark bzw. gering stärker vasorelaxierend wirken als bei intaktem Endothel. Einige Daten aus der Literatur [15, 16] belegen, dass organische Nitrate an Gefäßen, an denen das Endothel mechanisch entfernt wurde, vielfach stärker wirken als in Gefäßabschnitten mit intaktem Endothel. Eine Hemmung der endothelialen NO-Synthese kann einerseits durch mechanische Schädigung des Endothels, andererseits durch Inhibierung der endothelialen NO-Synthese durch L-NAME erfolgen. Eine vollständige reproduzierbare mechanische Schädigung bzw. Entfernung des Endothels erweist sich jedoch als schwierig, da bei diesem Verfahren auch sehr leicht die Gefäßmuskelzellen beschädigt werden können. Die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Gefäße wird während des späteren Experiments dadurch eingeschränkt. Aus diesem Grund wurde hier das Gefäßendothel nur gering mechanisch geschädigt und zusätzlich die NO-Synthese durch L-NAME inhibiert. Möglicherweise trägt das Ausmaß der Endothelschädigung zu einer verstärkten Wirkung der Nitrate an arteriosklerotisch geschädigten Gefäßen bei [24]. Vermutet wird,

dass durch endogen in den Endothelzellen gebildetes NO die Bioaktivierung der organischen Nitrate herabgesetzt wird, und somit in Gefäßarealen mit geschädigtem Endothel schneller NO liberiert wird und in der glatten Gefäßmuskulatur zur Wirkung gelangen kann [21].

■ Zusammenfassung

Es wurden vergleichende Untersuchungen zur Relaxation an $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit folgenden organischen Nitraten durchgeführt: Pentaerithrityltetranitrat (PETN), Pentaerithrityltrinitrat (PEtriN), Pentaerithrityldinitrat (PEdiN), Pentaerithritylmononitrat (PEmoN), Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN). Dabei zeigte sich, dass die vasodilatierende Wirkung mit der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül korreliert (pD_2 -Werte): PETN ($7,62 \pm 0,03$), PEtriN ($7,53 \pm 0,04$), PEdiN ($5,68 \pm 0,02$), PEmoN ($4,14 \pm 0,02$), GTN ($7,44 \pm 0,02$), ISDN ($6,37 \pm 0,03$), ISMN ($4,48 \pm 0,03$). Andererseits nimmt auch das strukturgebende Kohlenstoffgerüst Einfluss auf die Wirkungsstärke, was auch durch die unterschiedliche Aktivität innerhalb einer Gruppe von zehn unterschiedlichen Mononitraten deutlich wird.

Die untersuchten Nitrate wirken an vorsichtig mechanisch deendothelisierten und zusätzlich mit L-NAME geblockten Gefäßen gleich stark bzw. gering stärker als an Gefäßen mit intaktem Endothel. Die Wirkung der organischen Nitrate ist von der Aktivität der Guanylatcyclase in den Gefäßmuskelnzellen abhängig, wie die Untersuchungen mit dem selektiven Inhibitor der NO-sensitiven Guanylatcyclase ODQ zeigen.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die Pulmonalarterie vom Schwein ein geeigneter Gefäßabschnitt zum Nachweis einer Vasodilatation ist und sich daher für weiterführende Untersuchungen sowohl mit bewährten und neuartigen organischen Nitraten als auch anderen NO-Donoren eignet.

■ Ausblick

Zur Zeit sollen PETN, die PETN-Metabolite Pentaerithrityltrinitrat, Pentaerithrityldinitrat und Pentaerithritylmononitrat im Vergleich zu den anderen offizinellen organischen Nitraten hinsichtlich ihres Verhaltens bei der Ausbildung von Tachyphylaxie bzw. Toleranz untersucht werden. Um dieses Phänomen klar zu erkennen, ist im Vorfeld die Versuchsanordnung für diese Aufgabenstellung zu berücksichtigen. Bei der Toleranzentwicklung handelt es sich um eine Gewöhnung, die nach wiederholter Applikation eines Arzneimittels auftritt. Hingegen tritt bei der Tachyphylaxie sehr rasch – in Minuten bis Stunden – auch nach einmaliger höherer Dosierung eine deutliche Abschwächung des vasodilatierenden Effekts ein. Die normale Wirkung ist nach Absetzen des Arzneistoffs innerhalb kurzer Zeit wieder auslösbar [2, 19].

■ Literatur

1. Blinks PR, French CE, Nicklin S, Bruce NC (1996) Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Appl Environ Microbiol* 62:1214–1219
2. Bowman WC, Rand MJ (1980) *Textbook of Pharmacology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne
3. Crew M, Melgar MD, Di Carlo FJ (1975) Pentaerythritol tetranitrate and metabolites in rat plasma. *J Pharmacol Exp Ther* 192:218–223
4. Davidson IW, Miller HS Jr, Di Carlo FJ (1970) Absorption, excretion and metabolism of pentaerythritol tetranitrate by humans. *J Pharmacol Exp Ther* 175:42–50
5. Fink B, Bassenge E (1997) Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythritol tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:831–836
6. Glusa E, Adam C (2001) Endothelium-dependent relaxation induced by cathepsin G in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 133:422–428
7. Glusa E, Paintz M, Bretschneider E (1996) Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. *Semin Thromb Haemost* 22:261–265
8. Glusa E, Pertz HH (2000) Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br J Pharmacol* 130:692–698
9. Glusa E, Roos A (1996) Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Brit J Pharmacol* 119:330–334
10. Horstmann A, Pietig G, Abuo-Rehman G, Fricke U, Lehmann J (2002) Vasorelaxation of diazeniumdiolates in isolated coronary arteries parallels nitric oxide release. *Arch Pharm Med Chem* 335 (Suppl. 1) 128
11. Hüsgen B, Noack E, Kojda G (1995) Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. In: Schrör K, Pace-Asciak CR (Herausg) *Mediators in the Cardiovascular System: Regional Ischemia. Agents and Actions* 45 (Suppl.) 183–187. Birkhäuser Verlag Basel
12. Jurt U, Gori T, Ravandi A, Babaei S, Zeman P, Parker JD (2001) Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *J Am Coll Cardiol* 38:854–859
13. King SY, Fung HL (1984) Rapid microbiol degradation of organic nitrates in rat excreta. Reexamination of the urinary and fecal metabolite profiles of pentaerythritol-tetranitrate in the rat. *Drug Metab Dispos* 12(3):353–357
14. Kojda G (1997) Pentaerythryltetranitrat – NO-vermittelte Vasoprotektion und Hämodynamik. Steinkopff Verlag, Darmstadt
15. Kojda G, Behne M, Noack E (1991) The influence of endothelium on the extent of nitrate tolerance. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344:R 115
16. Kojda G, Behne M, Noack E (1992) Attenuation of nitrate activity and tolerance by intact endothelium. *J Vascul Res* 29:151
17. Kojda G, Hacker A, Noack E (1998) Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production. *Eur J Pharmacol* 355:23–31
18. Kutz C., Paintz M., Glusa E (1998) Inhibition of thrombin-induced contractile responses by protein kinase inhibitors on porcine pulmonary arteries. *Exp Toxic Pathol* 50:497–500

19. Mutschler E (Hrsg.) (2001) Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
20. Neurath GB, Dünger M (1977) Blood levels of the metabolites of glyceryl trinitrate and pentaerythritol tetranitrate after administration of two-step preparation. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 27:416–419
21. Noack E (1995) Basalpharmakologische Eigenschaften und vaskuläre Selektivität von PETN. In: Schneider HT, Stalleicken D (Hrsg) Pentaerythryltetranitrat: Beiträge zum klinischen und pharmakologischen Status. Steinkopff Verlag, Darmstadt, S 37–42
22. Pfaffenrath V, de la Motte S, Harrison F, Rühning C (1998) Wirkungen von Pentaerythryltetranitrat, Isosorbidmononitrat und Placebo auf den Kopfschmerz und auf die Beeinträchtigung der Arbeitsfähigkeit gesunder Probanden. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 48:646–650
23. Stalleicken D (2001) Pentaerythryltetranitrat: Therapierelevanter Wissensstand zu Pharmakologie und Klinik. Steinkopff Verlag, Darmstadt, S 13
24. Stalleicken D, Schröder H, Erdmann E (2002) Pentaerythryltetranitrat: Therapie der koronaren Herzkrankheit mit PETN im Vergleich zu anderen Nitraten. *Deutsche Apotheker Zeitung* 15:46–50
25. Weber W, Michaelis K, Luckow V, Kuntze U, Stalleicken D (1995) Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythryl tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 45:781–784
26. Weßler C, Homann A, Fricke U, Lehmann J (2003) NO donors, part 8 [1]: Synthesis and vasodilating activities of substituted benzylnitrates compared to cyclohexylmethyl nitrate and GTN. *Eur J Med Chem* 38:581–586
27. White GE, Snape JR, Nicklin S (1996) Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Appl Environ Microbiol* 62:637–642

Veröffentlichung 2

**Synthesis and vasorelaxant properties of
hybrid molecules out of NO-donors and
the beta-receptor blocking drug propranolol.**

Decker, Michael; König, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2004), 14, 4995-7.

Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the β -receptor blocking drug propranolol

Michael Decker,* Andreas König, Erika Glusa and Jochen Lehmann

Lehrstuhl für Pharmazeutisch/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

Received 10 June 2004; revised 5 July 2004; accepted 6 July 2004
Available online 29 July 2004

Abstract—*S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and 3-nitrooxypivaloyl acid were combined in the form of the respective amides with propranolol, in order to obtain prodrugs (NO-propranololes) with β -receptor blocking properties of the latter compound with nitric oxide releasing properties of the former compounds. A respective nitrateoester could not be synthesized, because it immediately rearranges to the amide after deprotection of the amino group. In vitro tests on porcine pulmonary arteries showed that both types of hybrid molecules (**6**, **12**) elicited vasorelaxation, but the nitrateoamide was less potent by more than one order of magnitude. The vasorelaxant effect of SNAP was more pronounced than that of the SNAP-hybrid (**12**), on the other hand the nitrateoamide **6** was more potent than 3-nitrooxypivaloyl acid.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Organic nitrates are common drugs for the treatment of coronary heart disease and congestive heart failure. *S*-Nitrosothiols (RSNOs) are compounds that play an important role in storing and transporting nitric oxide (NO) within the mammalian body.¹ They might be used for the treatment of congestive heart failure and hypertension.^{2,3} The vasodilating properties of both classes of compounds (RSNOs and nitrates, respectively), should be linked with the effects of the well-established β -adren-ergic blocking agent propranolol **1** (Fig. 1), which decreases heart rate and heart contractility, and therefore leads to a fall in blood pressure. NO-donor hybrids proved to show improved properties, for example, in combination with NSAIDs.^{4,5} Combining a β -receptor blocker with RSNOs and nitrates, respectively, within new hybrid molecules, should result in prodrugs, which might in vivo be able to prevent side effects of β -receptor blockers: the lowering effects on the blood pressure might be enhanced and oxygen consumption of the myocardium reduced, which would be beneficial for the prevention of coronary heart disease. Another advantage of hybrid molecules is the fact that the intake of one hybrid drug is better for patients' compliance. Compound **2**, for exam-

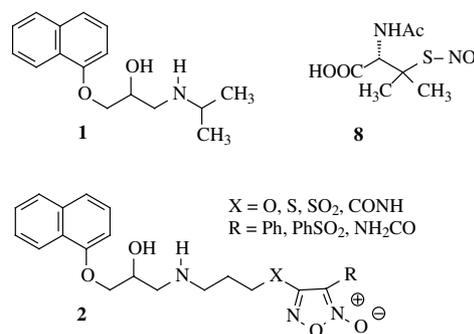


Figure 1. Structures of propranolol **1**, nitrapidol **2** and *S*-nitroso-*N*-acetyl-D-penicillamine (SNAP) **8**.

ple, can be chemically regarded not as a prodrug, but as a β -receptor blocking agent as a whole molecule, which showed also a vasorelaxant activity (Fig. 1).⁶ Another successful application of this principle was reached with 1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propyl nitrate, which affects peripheral vascular resistance less than propranolol.⁷

Our strategy was to use different NO-donors: 3-nitrooxypivaloyl acid **5** as a stable organic nitrate, the carbonylate moiety of which is suitable for combining this molecule with propranolol **1**. The thiol group of *N*-acetyl-D-penicillamine **7**, which also possesses a carboxylic

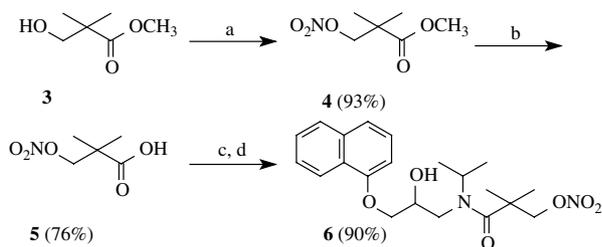
Keywords: Hybrids; Propranolol; NO-donors; Vasorelaxation.

* Corresponding author. Tel.: +49-3641-949817; fax: +49-3641-949802; e-mail: m.decker@uni-jena.de

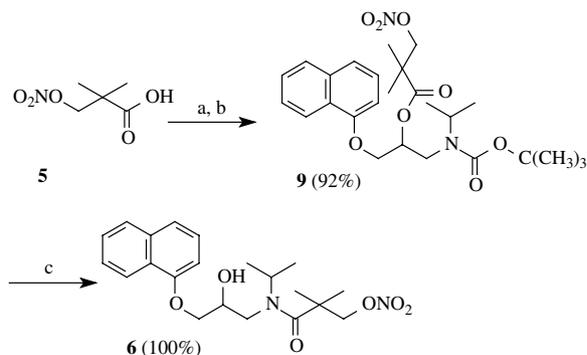
acid moiety, can be easily transformed to *S*-nitroso-*N*-acetyl-D-penicillamine (SNAP) **8**, one of the few stable *S*-nitroso thiols, which is also an excellent NO donor that is able to release NO (or NO⁺, respectively) in hybrid molecules (Fig. 1).⁸

2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)propanoic acid (3-nitrooxy-pivaloyl acid) **5** was synthesized from methyl 3-hydroxy-2,2-dimethylpropanoate **3** by nitration with fuming nitric acid in the presence of acetic anhydride and subsequent ester hydrolysis in methanolic sodium hydroxide solution. The resulting acid **5** was activated using CDI (*N,N'*-carbonyldiimidazole) and reacted directly with the free base of propranolol **1** to the hybrid molecule **6** (Scheme 1).⁹ By protecting the amino group of propranolol as a *t*-butyl carbamate (Boc), its hydroxy group could be acylated with 3-nitrooxypivaloyl chloride to yield the Boc-protected ester **9**. Deprotection of the amino group under acidic conditions did not yield the respective ester, but again the amide **6**, which was immediately formed by rearrangement of the carbonic acid moiety (Scheme 2). Spectroscopically, amide **6** and its isomeric ester cannot be easily distinguished, but they differ in their respective solubility in aqueous acid, the previous being very hardly soluble.

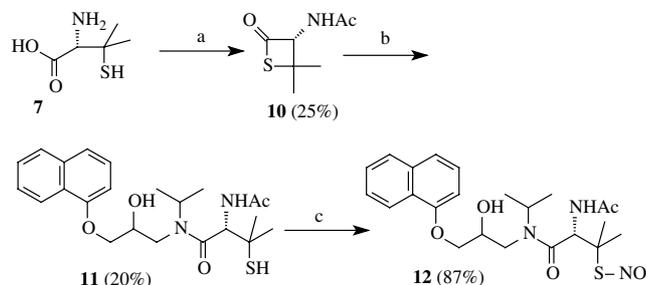
In order to obtain a hybrid of propranolol (**1**) and SNAP (**8**), *D*-penicillamine reacted with acetic anhydride in the presence of pyridine to 3-acetamido-4,4-dimethylthietan-2-one **10**, so *N*-acetylation and cyclization



Scheme 1. Synthesis of 3-nitrooxypivaloyl propranolol-amide **6**. Reagents and conditions: (a) fuming nitric acid/acetic anhydride, <10 °C; (b) MeOH, NaOH, 2 h, rt; (c) CDI, THF, 3 h; (d) propranolol **1**, overnight at rt.



Scheme 2. Synthesis of a Boc-protected 3-nitrooxypivaloyl propranolol-ester **9** and rearrangement after deprotection. Reagents and condition: (a) SOCl₂, CHCl₃, reflux for 3 h; (b) Boc-I, Et₃N; (c) HCl_g, MeOH.



Scheme 3. Synthesis of SNAP-propranolol-amide **12**. Reagents and conditions: (a) acetic anhydride, pyridine; (b) propranolol **1**, pyridine, Et₃N; (c) NaNO₂, glacial acetic acid.

occur in one step.¹⁰ Propranolol free base was coupled in the presence of pyridine and triethylamine to the thio-lactone yielding the respective amide **11**,⁸ the free thiol group of which was in turn nitrosated by a mixture of sodium nitrite and glacial acetic acid to generate the hybrid **12**.¹¹ The use of nitrite/acetic acid proved to be superior to the use of *t*-butyl nitrite, both in terms of yield and purity (Scheme 3).

Activating *N*-acetyl-D-penicillamine (e.g. using CDI) for the preparation of a respective propranolol ester was unsuccessful, because decomposition—partially due to oxazoline formation—occurred. Also the use of DCC (dicyclohexylcarbodiimide) for ester formation resulted in decomposition of *N*-acetyl-D-penicillamine.

For studying the vasorelaxant effects, rings (2–3 mm in length) from small branches of the pulmonary artery from pig lungs were carefully prepared and placed in 10 mL of organ bath for isometric measurement of vascular tension.¹² The relaxant effects were measured in PGF_{2α} (3 μM)-precontracted rings; the test compounds were added to the organ bath at plateau of contraction in cumulative manner. The vasorelaxant action was performed using vessels with intact endothelium. The integrity of the endothelium was assessed by the bradykinin (10 nM)-induced relaxation of PGF_{2α}-precontracted ring segments. The relaxation was absent after mechanical removal of the endothelium. The vasorelaxant potencies of the tested compounds were expressed as *pD*₂ values (negative logarithm of the molar concentration of compound producing 50% of the maximum response).

In PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries the hybrid molecules (**6** and **12**, respectively), elicited a concentration-dependent relaxation (Fig. 2). The *pD*₂ for the SNAP-propranolol hybrid **12** amounted to 6.94 ± 0.04 and 7.97 ± 0.02 for SNAP, respectively, being significantly different (*p* < 0.05; Student's *t*-test). In isolated porcine coronary arteries SNAP induced vasorelaxation with an *pD*₂ value of 6.69.¹³ In porcine pulmonary arteries, we found for glycerol trinitrate (GTN) a *pD*₂ of 7.44 ± 0.02. The 3-nitrooxypivaloyl propranolol hybrid **6** was significantly (*p* < 0.05; Student's *t*-test) less potent than the SNAP-propranolol hybrid **12**. The *pD*₂ values were 5.40 ± 0.06 for the hybrid molecule **6**, and 4.69 ± 0.02 for 3-nitrooxypivaloyl acid,

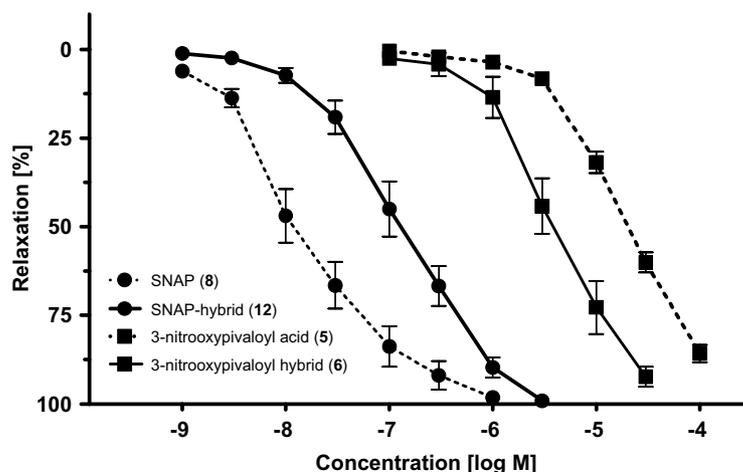


Figure 2. Concentration–response curves for the vasorelaxation of $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted pig pulmonary arteries induced by SNAP-propranolol hybrid **12** (—●—) and 3-nitrooxypivaloyl propranolol hybrid **6** (—■—), and their respective NO-donating moieties SNAP **8** (---●---) and 3-nitrooxypivaloyl acid **5** (---■---), respectively. Means \pm SEM, $n = 5-6$.

respectively. Noteworthy, in contrast to the NO-donor SNAP, the NO-donor 3-nitrooxypivaloyl had a significantly ($p < 0.05$; Student's t -test) weaker vasorelaxant effect than the 3-nitrooxypivaloyl propranolol hybrid **6**.

In conclusion, two hybrid molecules were synthesized containing NO-donors (SNAP and 3-nitrooxypivaloyl acid, respectively), and propranolol. The hybrid compounds exhibit vasorelaxant properties. Compared to the NO-donor moieties, the vasorelaxant effect of hybrid **12** was one order of magnitude weaker, while the vasorelaxation of hybrid **6** was more pronounced.

Acknowledgements

A Ph.D. scholarship for A.K. by the 'Graduierföderung' of Thuringia, Germany, and financial support of the 'Fonds der Chemischen Industrie' (FCI) for M.D. are gratefully acknowledged.

References and notes

- Williams, D. L. H. *Chem. Soc. Rev.*, **1985**, 171.
- Luscher, T. F.; Raij, L.; Vanhoutte, P. M. *Hypertension* **1987**, *9*, 157.
- Drexler, H.; Hayoz, D.; Munzel, T.; Hornig, B.; Just, H.; Brunner, H.; Zelis, R. *Am. J. Cardiol.* **1992**, *69*, 1596.
- Jain, N. K.; Patil, C. S.; Kartasmita, R. E.; Decker, M.; Lehmann, J.; Kulkarni, S. K. *DDR* **2004**, *61*, 66.
- Chiroli, V.; Benedini, F.; Ongini, E.; Del Soldato, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*(4), 441.
- Boschi, D.; Di Stilo, A.; Cena, A.; Lolli, M.; Fruttero, R.; Gasco, A. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1750.
- Korzycka, L.; Owczarek, J.; Czarnecka, E. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*(5), 365.
- Hou, Y.; Wu, X.; Xie, W.; Braunschweiger, P. G.; Wang, P. G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 825.
- 3-[[2-Hydroxy-3-(1-naphthoxy)propyl](isopropylamino)-2,2-dimethyl-3-oxopropyl nitrate (**6**). Light beige smeary crystals. Mp 74°C. $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.1–1.2 (12H, m, $4 \times \text{CH}_3$), 3.3 (2H, m, CH_2N), 4.0 (2H, m, $2 \times \text{CH}$), 4.3–4.4 (2H, m, CH_2O), 4.6 (2H, s, CH_2ONO_2), 5.5 (1H, s, OH), 6.9 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$, C(6)H), 7.2–7.5 (4H, m, C(4, 5, 8, 9)H), 7.9 (1H, d, $J = 7\text{ Hz}$, C(10)H), 8.1 (1H, d, $J = 7\text{ Hz}$, C(7)H) ppm. IR (KBr): 3272, 2928, 1699, 1631, 1288, 1151, 887, 770 cm^{-1} . FAB-MS m/z 405 ($\text{M}+\text{H}^+$). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$): C, H, N.
- Al-Zaidi, S. M. R.; Crilley, M. M. L.; Stoodley, R. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 2259.
- N^2 -Acetyl- N^1 -[2-hydroxy-3-(1-naphthoxy)propyl]- N^1 -isopropyl-3-(nitrosothio)-D-valinamide (**12**). Red-brown powder (green solution in CHCl_3) consisting of two conformers mp 106°C (decomp, gas evolution). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.2–1.6 (12H, m, $4 \times \text{CH}_3$), 2.1 (3H, s, acetyl- CH_3), 3.5–3.7 (2H, m, CH_2N), 4.1–4.5 (3H, m, CH_2O , i -propyl- CH), 5.4 (1H, m, CHOH), 5.7 (0.8H, d, $J = 8\text{ Hz}$, CHNH , first diaster.), 6.0 (0.2H, d, $J = 10\text{ Hz}$, CHNH , second diaster.), 6.8 (1H, 2 \times d, $J = 7\text{ Hz}$, C(6)H), 7.4–7.6 (4H, m, C(4, 5, 8, 9)H), 7.8 (1H, 2 \times d, $J = 7\text{ Hz}$, C(10)H), 8.2 (1H, 2 \times d, $J = 10\text{ Hz}$, C(7)H), 8.3 (2H, brd, OH, NH) ppm. IR (KBr): 3293, 2971, 2920, 2367, 1715, 1619, 1268, 1102, 772, 666 cm^{-1} . FAB-MS m/z 462 ($\text{M}+\text{H}^+$). Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$): C, H, N.
- Glusa, E.; Pertz, H. H. *Brit. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 692.
- Horstmann, A.; Pietig, G.; Abu-Rehman, G.; Fricke, U.; Lehmann, J. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*(Suppl. 1), 128.

Veröffentlichung 3

Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate.

König, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Jörg; Daiber, Andreas;
Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

Journal of Cardiovascular Pharmacology (2007), 50, 68-74.

Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate

Andreas Koenig, MS,* Kathrin Lange, MS,* Joerg Konter, MS,* Andreas Daiber, PhD,†
Dirk Stalleicken, MD,‡ Erika Glusa, MD,* and Jochen Lehmann, PhD*

Abstract: Neither therapeutic dosage of nitrovasodilators nor the development of tolerance correlates with nitrate groups in these molecules. Clinically, low dosages of glyceryl trinitrate (GTN) develop tolerance, but 100-fold higher dosages of pentaerythrityl tetranitrate (PETN) do not. Vasorelaxation was studied on prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$)-precontracted porcine pulmonary arteries in organ bath procedure. In vitro tolerance was induced by incubating the arteries with different nitrate concentrations and thereafter concentration-response curves were repeated. Furthermore, 14 mg/kg PETN were daily administered to rats by gavage; PETN and metabolites were measured in feces and blood. In vitro, the vasodilator potencies increased from mononitrates to tetranitrates (pD $_2$: 4.14 to 8.18); PETN was the most potent vasodilator. In vitro tolerance was found with PETN and trinitrates but not with dinitrates and mononitrates. Thus, in vitro tolerance correlated with the in vitro potency of nitrates but not with the vasodilator potency of NO donors in general, because S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine and N-phenylpiperazine-NOOate were more potent than GTN but did not induce tolerance. After feeding of rats with PETN, pentaerythrityl dinitrate (PEdiN) and mononitrate (PEmonoN) but neither PETN nor PETriN (both detected in feces) were found in the blood. The missing systemic bioavailability of PETN and PETriN may explain the discrepancy between in vitro and in vivo findings. We conclude that the partially denitrated metabolites PEdiN and PEmonoN contribute to the moderate and tolerance-devoid clinical activity of PETN.

Key Words: organic nitrates, pentaerythrityl tetranitrate, vasodilation, nitrate tolerance, bioavailability

(*J Cardiovasc Pharmacol*TM 2007;50:68–74)

Organic mononitrates, dinitrates, trinitrates, and tetranitrates are used therapeutically for vasodilation in cardiovascular diseases. Among these, pentaerythrityl tetranitrate (PETN) develops little or no nitrate tolerance and fewer

patients suffer from headaches in comparison to a treatment with other nitrates such as glyceryl trinitrate (GTN).^{1–3} Various explanations for the phenomenon of nitrate tolerance have been proposed and investigations are still ongoing.^{4,5} Detailed studies with GTN suggest a mechanism of tolerance that is based in part on the inhibition of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2), which catalyzes the bioactivation of highly potent vasodilators such as GTN.⁶ Inhibition of ALDH-2 diminishes the GTN-induced vasorelaxation tenfold. However, because bioactivation of higher concentrations of GTN is thought to be performed by an ALDH-2-independent mechanism that is not susceptible to exhibit tolerance, a reduced vasodilator activity is still maintained. These findings were confirmed by studies with mtALDH^{-/-} mice.⁷ Furthermore, tolerance to GTN is accompanied by an increase in vascular reactive oxygen species production.⁵

Peroral therapeutic dosage of organic nitrates differs extremely from each other. Clinically, there is no correlation between the number of nitrate groups and the vasodilators efficacy represented by the dosage, or to the development of nitrate tolerance. Application of a comparatively low dose of the trinitrate GTN (0.4 to 2.4 mg/day) develops tolerance; the tetranitrate PETN, which has to be administered in high dosage of 100 to 240 mg/day, does not. One objective of our pharmacological in vitro study using isolated vessels was to investigate and compare the vasorelaxant effects and the development of acute tolerance, respectively, for PETN and for its potential metabolites pentaerythrityl trinitrate (PETriN), pentaerythrityl dinitrate (PEdiN), pentaerythrityl mononitrate (PEmonoN), as well as for other nitrates such as GTN, isosorbide-dinitrate (ISDN), and isosorbide-5-mononitrate (ISMN). The NO/NO⁺ donor S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine (SNAP), which is bioactivated differently from the nitrates, and sodium 1-(Phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO), which releases NO spontaneously without bioactivation, were also included. In preliminary studies, we found that porcine pulmonary arteries respond very sensitively and reproducibly to organic nitrates. These vessels possess an endothelium with a high capacity for NO synthesis, and therefore they are suitable for measuring NO-mediated endothelium-dependent relaxation.⁸ Porcine pulmonary arteries are simple to handle with regard to the preparation and the measurement of vascular tone.

So far, such a wide range of NO-based vasodilators have not been investigated under the same conditions and the same

Received for publication November 30, 2006; accepted March 6, 2007.
From the *Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany; †Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik Kardiologie, Mainz, Germany; and ‡Actavis Deutschland, Langenfeld, Germany.
Reprints: Jochen Lehmann, PhD, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany (e-mail: j.lehmann@uni-jena.de).

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

vessel. The objectives of our study are to identify the relations between the structure of a NO donor and its vasodilator potency and its tendency to induce in vitro tolerance, respectively. Furthermore, in combination with in vivo bio-availability studies on rats with PETN, we want yield new insights into the moderate and tolerance-devoid clinical activity of PETN.

MATERIALS AND METHODS

Substances

The following drugs were used: bradykinin triacetate and prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; Serva, Heidelberg, Germany), N^G -nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME) and 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; Sigma, Deisenhofen, Germany), GTN (Merck, Darmstadt, Germany). ISDN and ISMN were obtained as gifts from Schwarz-Pharma AG (Monheim). SNAP was synthesized in our laboratory as described recently.⁹ Pure PETN was synthesized by treating pentaerythritol with a mixture of nitrous and sulfuric acid. PEtriN, PEdiN, and PEmonoN were obtained by selectively reducing PETN using hydrazine hydrate. Sodium 1-(Phenylpiperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO) was prepared by treating N-phenylpiperazine and sodium methoxide with four bar nitric oxide in the NOTizer.¹⁰

Tissue Preparation

According to a previously described protocol,¹¹ lungs from adult pigs were obtained from the local slaughterhouse. Small branches of pulmonary arteries were removed, cleared of parenchyma and connective tissue, and kept in a modified Krebs-Henseleit solution composed of the following compounds (mM): NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, and glucose 11.5 (pH 7.4). Vessels to be used the next day were kept in the refrigerator (4°C) overnight.

Measurement of Vascular Tone

Pulmonary arteries were cut into rings (2-mm long, 1.5 to 2 mm diameter). In experiments with endothelium-denuded rings, the endothelium was removed by gently rubbing the inner surface with a rough plastic rod. The rings were suspended between two L-shaped platinum hooks and mounted in a 10-mL organ bath filled with modified Krebs-Henseleit solution. The solution was kept at 37°C and aerated with 95% O_2 /5% CO_2 . Preparations were connected to an isometric force transducer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) to continuously measure changes in tension. A resting tension of 20 mN was maintained throughout the experiment. After an equilibration period of 60 min, contractions were induced at intervals of 45 min. The ring segments were initially made to contract with KCl (45 mM) and subsequently with $PGF_{2\alpha}$ ($2-3 \times 3 \mu M$) until the contractions became constant. Endothelial integrity was assessed by the bradykinin (10 nM)-induced relaxation of $PGF_{2\alpha}$ -precontracted vessels. In mechanically endothelium-denuded arterial rings, pretreated with 0.2 mM L-NAME, the relaxation induced by bradykinin was less than 10%. The relaxation response to organic nitrates was studied after

the second or third $PGF_{2\alpha}$ -induced contraction had stabilized, by constructing a cumulative concentration-response curve. Relaxation responses were expressed as a percentage of the $PGF_{2\alpha}$ ($3 \mu M$)-induced contraction in each tissue.

Measurement of In Vitro Tolerance

To study the relaxation responses after a repeated exposure of the vessels to the vasodilators, two different experimental protocols were used. In protocol A, the compounds were given cumulatively up to a maximum relaxation of 100% and after 30 min a washout time of 45 min was performed (3 times changing the medium). Thereafter the cumulative concentration-response curve was repeated. In protocol B, after 30-min incubation with a bolus of 300 μM of the compound and a washout period of 45 min, the cumulative concentration-response curve for the relaxation by the respective nitrates was performed again. In protocol A, the arterial rings were pretreated with concentrations of equivalent vasorelaxation potency; in protocol B, concentrations of the same molarity were added.

Quantification of PETN Metabolites in Rat Blood and Feces

The levels of PETN and its metabolites in whole blood and feces samples were measured on three consecutive days, using an improved high-performance liquid chromatography (HPLC)-based method with chemoluminescence nitrogen detection (CLND) as described previously.¹² After cleavage of conjugates by an aryl sulfatase/glucuronidase-mixture (VWR International; 5 hours at 40°C), blood samples were diluted 1:1 with methanol and centrifuged 15 min at 3000 rpm, completely separating denaturated proteins. Then 100 μL of the clear supernatant were injected directly into the HPLC. Feces samples were solubilized by freeze drying and then extracted under reflux with ethyl acetate, isopropanol, and acetonitrile. The extracts were dried in a nitrogen stream, resolved in 1 mL of the eluent (methanol/water), and analyzed by HPLC.

The animal experiments were carried out in the laboratories of the Second Medical Clinic, Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany; details of the experimental procedures are described elsewhere.⁶ Male Wistar rats (200 g, Charles River, Sulzfeld, Germany) were fed by gavage (feeding tube) at intervals of 12 hours with either 7 mg/kg PETN (suspension in water) or the solvent for 3 days. After 3 days, rats were sacrificed after blood samples were taken from anesthetized rats. Feces were collected during the last day of treatment. All animal treatment was in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Eppendorf and the University Hospital Mainz.

Data Analysis

Data are given as means \pm SEM for tissues from n animals. Agonist concentration-response curves were constructed using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). The calculated pD_2 presented the negative

logarithm of the molar concentration producing 50% of the maximum response. Results were compared using Student's *t* test followed by Bonferroni corrected *t* test for stepwise comparison. *P* values <0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Vasorelaxant Effects of Nitrates, SNAP, and PHEPIPERAZI/NO

In PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium, all of the compounds were able to elicit a vasodilation in a concentration-dependent manner (Fig. 1). In all experiments, a maximum vasodilation has been achieved ($E_{max} \sim 100\%$). PETN proved to be the most potent nitrate, followed by PEtriN and GTN; the pD₂-values of these trinitrates did not differ significantly (Table 1). The dinitrates and mononitrates induced less vasodilation. However, ISDN exhibited a more pronounced relaxant response than did the respective pentaerythrityl derivative PEdiN. In conclusion, the results demonstrate that the relaxation potency of the organic nitrates investigated correlated with the number of nitrate groups in the molecule. The nitrosothiol SNAP was found to be nearly equipotent and the phenylpiperazine-derived diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO even more potent than the most active nitrate PETN (Fig. 1, Table 1).

In order to examine whether the relaxant effects of the organic nitrates depends on the integrity of endothelium, endothelium-denuded vessels that did not relax to bradykinin were used. In addition, the endothelial NO-synthase (eNOS) was inhibited by preincubation with L-NAME (0.2 mM). Compared to the vessels with intact endothelium, the concentration-response curves in the endothelium-denuded vessels did not shift significantly, with the exception of PEmonoN, which was clearly more effective in denuded arteries (Table 1).

To ensure that all tested organic nitrates stimulate the soluble guanylyl cyclase (sGC) in smooth muscle cells, the

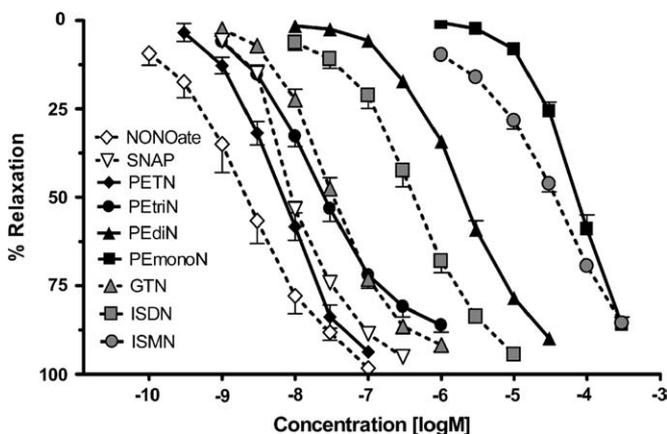


FIGURE 1. Concentration-response curves for the vasorelaxant effects of the NONOate PHEPIPERAZI/NO, *S*-nitroso-*N*-acetyl-D-penicillamine (SNAP), PETN, PEtriN, PEdiN, PEmonoN, GTN, ISDN, ISMN, on PGF_{2α} (3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries in vitro. Data are means ± SEM from 3 to 9 independent experiments.

vessels were treated with ODQ, a selective inhibitor of the NO-sensitive sGC. Preincubation of isolated pulmonary arteries with 10 μM ODQ shifted the concentration-response curves for the nitrate-induced relaxation significantly to the right (data not shown).

Studies of In Vitro Tolerance

Two different procedures (see Methods) were used to investigate any development of in vitro tolerance by repeated exposure to the vasodilators. Preincubation was performed with concentrations of the same vasodilator potency (protocol A: EC₁₀₀) and in some experiments with a 300 μM bolus (protocol B) depending on the EC₅₀-values of the tested compounds.

The tetranitrate PETN and the trinitrates PEtriN and GTN were significantly less potent in the second exposure (Figs. 2 and 3, Table 2). Depending on the preincubation procedure, the EC₅₀ values were enhanced by factors ranging from 11 to more than 30 compared to the control. The bolus application induced the strongest rightward shift of the concentration-relaxation curves. Due to its low solubility and high vasorelaxation potency, a 300 μM bolus could not be applied to PETN; only a prerelaxation to 100% (protocol A) was used for this compound (Fig. 3), resulting in a significant increase of the EC₅₀ value from 7 nM to 102 nM. The trinitrates PEtriN and GTN induced in vitro tolerance in the same order of magnitude (Figs. 2 and 3). ISDN developed some in vitro tolerance after preincubation with a 300 μM bolus, but generally and in contrast to the trinitrate and the tetranitrate, the dinitrates (PEdiN, ISDN) and mononitrates (PEmonoN, ISMN) exhibited no or negligible in vitro tolerance in all experimental procedures (Table 2, Figs. 4 and 5). Protocol B was not performed with mononitrates because the EC₁₀₀ values were already in the range of the 300 μM bolus. SNAP and the diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO were more potent vasodilators than GTN but did not induce in vitro tolerance, which was exemplified by using protocol A (Table 2, Fig. 6).

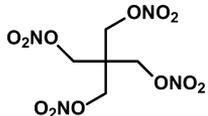
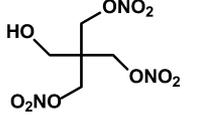
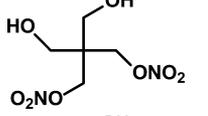
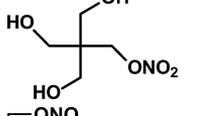
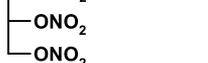
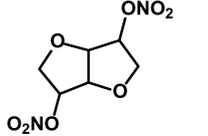
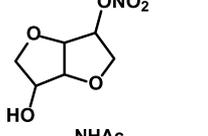
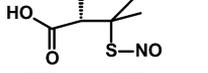
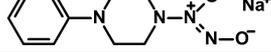
Studies on Bioavailability of PETN in Rats

After feeding rats with 7 mg/kg PETN 2 times per day by gavage for 3 days, on day 3 we found considerable amounts of PETN (up to 120.8 to 136.7 ng/g), low amounts of PEtriN (18.1 to 21.9 ng/g), and very low amount PEdiN (6.4 to 11.6 ng/g) in the feces (Table 3). Neither PETN nor PEtriN was found in the blood (LOD: 4 ng/mL). PEdiN was quantified in blood (17 to 33 ng/mL), PEmonoN could not be quantified because the short retention time of this compound in the HPLC protocol applied caused it to coelute with other nitrogen-containing compounds in the blood, but it was indicated by peak-broadening.

DISCUSSION

The results of our comparative study demonstrate the vasorelaxant responses of isolated porcine pulmonary arteries to different types of nitric-oxide-based vasodilators, including therapeutically used organic nitrates, their bioactive metabolites, a nitrosothiol (SNAP), and a diazeniumdiolate

TABLE 1. Vasodilatory Effects (pD₂ Values) of Organic Nitrates and Other NO Donors on PGF_{2α}-Precontracted Porcine Pulmonary Arteries With Intact Endothelium and on Endothelium-Denuded + L-NAME (0.2 mM) Pretreated Vessels In Vitro

Vasodilator	Structure	pD ₂ (n)	
		Intact Vessels	Denuded Vessels
PETN		8.18 ± 0.03 (7)	8.28 ± 0.04 (5)
PEtriN		7.53 ± 0.04 (8)	7.94 ± 0.08 (4)
PEdiN		5.68 ± 0.02 (6)	5.72 ± 0.03 (6)
PEmonoN		4.14 ± 0.02 (7)	4.70 ± 0.02 (6)
GTN		7.44 ± 0.02 (6)	7.60 ± 0.04 (5)
ISDN		6.37 ± 0.03 (7)	6.24 ± 0.01 (3)
ISMN		4.48 ± 0.03 (9)	4.48 ± 0.07 (3)
SNAP		7.97 ± 0.02 (6)	ND
PHEPIPERAZI/NO		8.67 ± 0.06 (5)	ND

Data are means ± SEM from n separate experiments.

(PHEPIPERAZI/NO). In contrast to previous studies reported in the literature, for the first time the complete set of therapeutically relevant organic nitrates together with other types of NO donors were tested comparatively at the same vascular preparation and under the same experimental conditions.

The most potent nitrates were PETN, PEtriN, and GTN. These findings agree with previous organ-bath studies on isolated vessels from different species, such as rabbit aorta and bovine coronary arteries, resulting in pD₂ values for the relaxant effects which are in the same range as those found in our study.¹³⁻¹⁵ The dinitrates and mononitrates were less effective than the tetranitrates and trinitrates; similar results were shown by other groups with rat and rabbit aortas.^{6,13} The dinitrate and mononitrate of isosorbide exhibit a stronger relaxant response than the corresponding pentaerythryl

derivatives. The correlation between vasodilator potency and number of nitrate groups in the vasodilator substances became obvious from our results. But apart from this, it is noteworthy that different physicochemical parameters of the nitrate carrier molecule further influence the vasorelaxant potency. Using isolated porcine coronary arteries, we have previously demonstrated that in a group of mononitrates the benzyl mononitrate induces a vasorelaxation that was 300 times stronger than that of cyclohexyl mononitrate.¹⁶ Furthermore, it was shown that the vasodilator potency of differently substituted benzyl nitrates varied significantly depending on the nature and the position of the substituents in the benzyl nitrate molecule.¹⁶

There are contrary reports about the influence of endothelium on the GTN-induced relaxation. Alheid et al found an increase in the response to nitrates after removal of

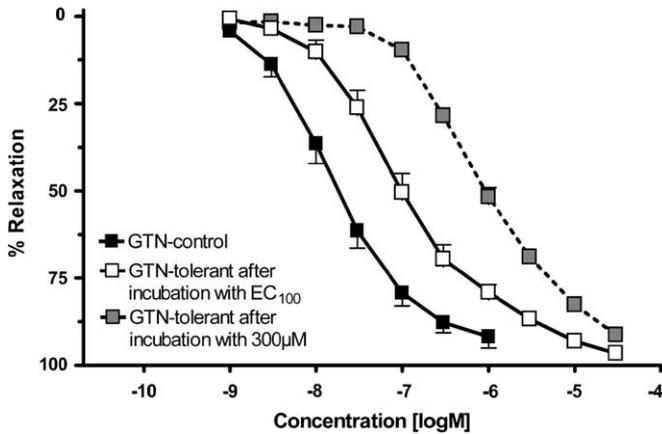


FIGURE 2. The relaxation to GTN in control and GTN-tolerant $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The EC_{50} values of tolerant vessels are significantly different from the control ($P < 0.05$). Data are means \pm SEM from 4 to 8 independent experiments.

endothelium,¹⁷ whereas Kojda et al found an endothelium-independent relaxation.¹⁸ Our studies revealed that the concentration-dependent relaxations induced by the tested nitrates in pulmonary arteries were roughly similar in vessels with denuded and with intact endothelium. Moreover, the results confirmed that the mechanism underlying the vaso-relaxant response is mediated by the activation of guanylyl cyclase because inhibiting the enzyme by ODQ diminished the vasodilator effects of nitrates.

So far, investigations into development of tolerance in vitro have mainly been carried out for GTN and ISMN.^{13,19} The strong attenuation of the vasodilator response to GTN after repeated administration was also seen in our studies with isolated porcine pulmonary arteries. Furthermore, we now demonstrate the appearance of in vitro tolerance for PETN and PErtriN similarly to GTN. The dinitrates and mononitrates

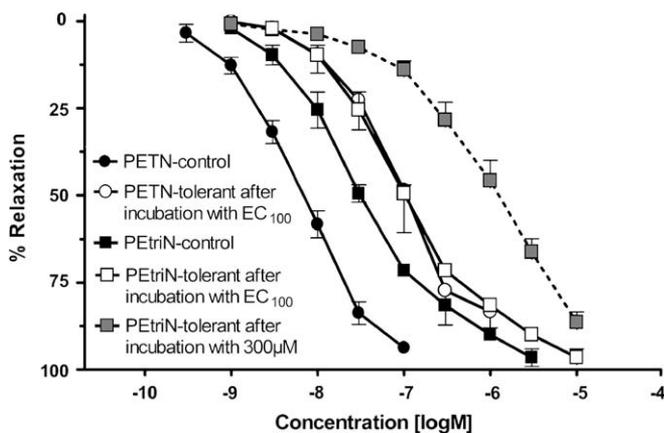


FIGURE 3. PETN- and PErtriN-induced in vitro tolerance of $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The "tolerant" curves are significantly different from control ($P < 0.05$). Data are means \pm SEM from 4 to 8 independent experiments. Details shown in Methods.

TABLE 2. Comparison of the Mean of EC_{50} for the Relaxant Responses of Different Vasodilators on Nontolerant (Control) and Tolerant (Preincubation With EC_{100}) Segments of Porcine Pulmonary Arteries

Vasodilator	EC_{50} (M)		$\frac{\text{EC}_{50}(\text{tolerant})}{\text{EC}_{50}(\text{control})}$
	Control (Nontolerant)	Tolerant	
PETN	6.67×10^{-9}	1.02×10^{-7}	15.3
PErtriN	3.55×10^{-8}	4.00×10^{-7}	11.3
PEdiN	2.34×10^{-6}	3.07×10^{-6}	1.3
PEmonoN	5.32×10^{-5}	7.23×10^{-5}	1.4
GTN	2.21×10^{-8}	2.58×10^{-7}	11.7
ISDN	4.96×10^{-7}	6.20×10^{-7}	1.3
ISMN	3.96×10^{-5}	6.67×10^{-5}	1.7
SNAP	1.37×10^{-8}	1.14×10^{-8}	0.8
PHEPIPERAZI/NO	2.54×10^{-9}	3.34×10^{-9}	1.3

The ratio of $\text{EC}_{50}(\text{tolerant})$ and $\text{EC}_{50}(\text{control})$ represents the x -fold reduction of the vasodilator potency.

developed little or no tolerance in vitro, with PEdiN showing less attenuation than ISDN (Figs. 4 and 5) after preincubation with a $300 \mu\text{M}$ bolus. Similar findings were reported for ISMN compared to GTN.¹³

We conclude that the development of in vitro tolerance obviously increases with the number of nitrate groups in the molecule and hence with the potency of the nitrate, but generally not with the vasodilator properties of NO donors. Both the nitrosothiol SNAP and the spontaneously NO-releasing diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO exhibited higher vasodilator potency than GTN but, in contrast to GTN and PETN, they did not develop in vitro tolerance (Table 2; Figs. 2, 3, and 6). Obviously, the phenomenon of nitrate tolerance in vitro might be associated with the bioactivation processes of the vasodilators. SNAP is bioactivated differently from the organic nitrates, and the spontaneously NO-releasing

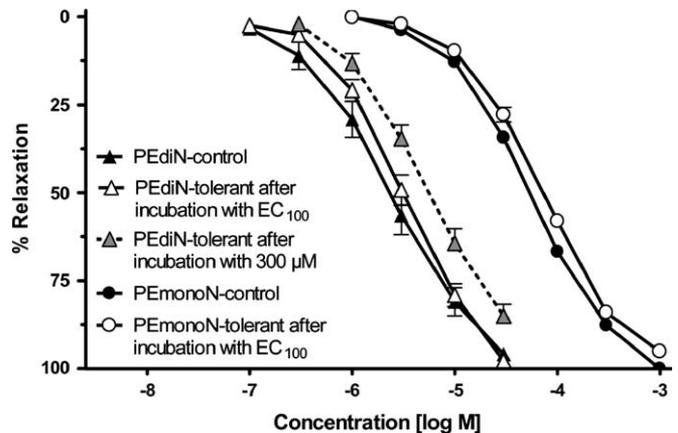


FIGURE 4. The relaxation to PEdiN and PEmonoN in control and tolerant $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The curves are not significantly different from control ($P < 0.05$). Data are means \pm SEM from 5 to 8 independent experiments.

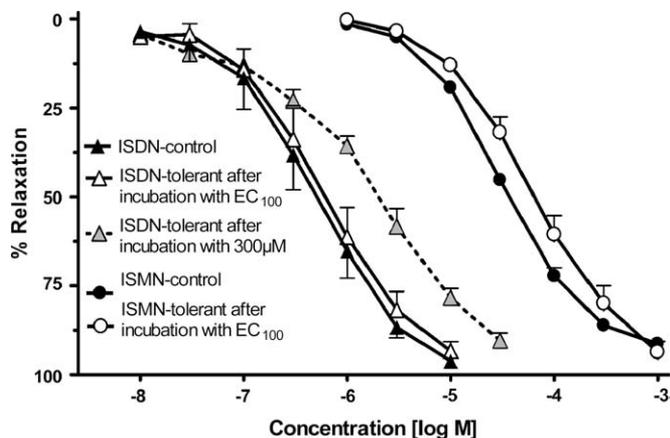


FIGURE 5. The relaxation to ISDN and ISMN in control and tolerant PGF_{2α}(3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. Data are means ± SEM from 5 to 8 independent experiments.

diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO needs no bioactivation. Within the organic nitrates, only the high-potency compounds GTN, PETN, and PEtriN undergo ALDH2-catalyzed bioactivation, and they are sensitive to development of in vitro tolerance unlike the low-potency dinitrates and mononitrates.⁵ However, the in vitro tolerance allows only few insights in the mechanism of clinical tolerance caused by chronic treatment; additional factors may play an important role in vivo. There are various reports in the literature that the therapy with PETN does not induce oxidative stress and this is supposed to be a key factor in preventing clinical tolerance.² Especially, the increased heme oxygenase (HO)-1 expression and ensuing formation of cytoprotective bilirubin may contribute as well.²⁰

All of our in vitro findings are in contrast to the therapeutic use of PETN, which requires high oral dosage and

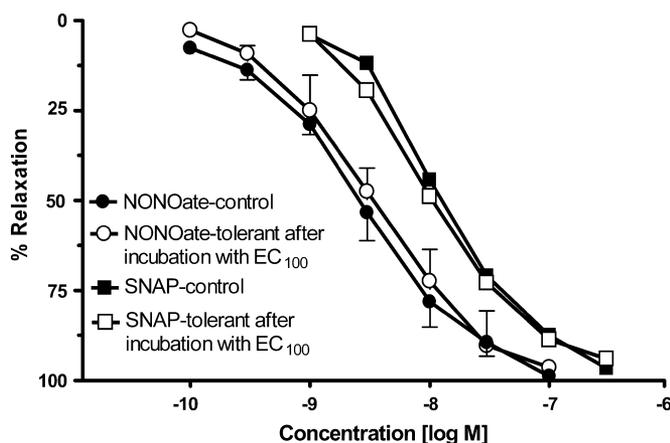


FIGURE 6. Vasorelaxation induced by PHEPIPERAZI/NO (NONOate) and SNAP in control and tolerant PGF_{2α}(3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The “tolerant” curves are not significantly different from control (*P* < 0.05). Data are means ± SEM from two independent experiments.

TABLE 3. Whole Blood and Feces Levels of PETN and Its Metabolites Upon Administration of 7 mg/kg PETN 2 Times Per Day by Gavage for 3 Days to Rats (n = 12)

Sample Source	PETN	PEtriN	PEdiN
Blood (ng/mL)	ND	ND	17–33
Feces (ng/g)			
Day 1	38.6–53.9	13.5–16	6.6–8.6
Day 2	38.5–129.5	19.1–24	5.4–8.6
Day 3	120.8–136.7	18.1–21.9	6.4–11.6

ND, not determined because the concentrations in the blood samples were mostly (n = 10) at the LOQ of 11 ng/mL. Only two samples have shown higher amounts. Feces samples were collected from three animals.

does not develop significant tolerance.² The missing bioavailability for PETN—and also PEtriN—due to poor absorption or a fast hydrolytic degradation to less vasoactive metabolites may explain the discrepancy between in vitro and in vivo.^{21,22} Recently, we could excluded hydrolytic degradation of PETN in different mediums.¹² Only rapid degradation in vitro occurred after adding thiol. Thus, PETN is supposed to undergo enzymatic denitration by intestinal microorganisms yielding the lower nitrate metabolites PEtriN, PEdiN, and PEmonoN.²³ After peroral application of PETN to humans, it was found in the feces and remained present throughout a 3-day period after the drug was administered.²¹ To our knowledge, PETN has never been quantified in the blood and PEtriN has only been detected occasionally at very low concentrations. Only PEdiN and PEmonoN have been found at higher concentrations in the blood.²⁴ In healthy volunteers, the plasma half-life time of PEdiN and PEmonoN amounted to 4 to 5 hours and 10 to 11 hours, respectively.²⁵ After feeding rats PETN, we found considerable amounts of PETN in the feces, but little PEtriN and very little PEdiN. In agreement with human investigations, neither PETN nor PEtriN were detected in the blood of rats; only PEdiN could be quantified by the HPLC protocol. Therefore, according to the in vivo findings, in the future in vitro studies on the pharmacological effects of PETN should also include the effects of PEdiN and PEmonoN.

We conclude that, in vivo, PETN is highly stable and very poorly soluble and absorbable. Biotransformation and absorption produce successively limited blood levels of PEdiN and PEmonoN. As shown by our investigations, these two metabolites contribute to the moderate, long-acting, and tolerance-devoid activity of the PETN.

ACKNOWLEDGMENTS

A Ph.D. scholarship for A.K. by Graduiertenförderung (Thuringia, Germany) is gratefully acknowledged. The authors also thank Dr. Kleinhans (Veterinäramt Weimarer Land, Nohra) for providing with lungs from pigs for this study and Actavis Deutschland for financial support.

REFERENCES

1. Fink B, Bassenge E. Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythryl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30: 831–836.

2. Jurt U, Gori T, Ravandi A, et al. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: A human in vivo study. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:854–859.
3. Pfaffenrath V, de la Motte S, Harrison F, et al. Effect of pentaerythritol tetranitrate, isosorbide mononitrate and placebo on the headache and on the ability to work of healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*. 1998;48:646–650.
4. Schwemmer M, Bassenge E. New approaches to overcome tolerance to nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17:159–173.
5. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97:618–628.
6. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol*. 2004;66:1372–1382.
7. Chen ZQ, Foster MW, Zhang J, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12159–12164.
8. Glusa E, Pertz HH. Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;130:692–698.
9. Decker M, Koenig A, Glusa E, et al. Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:4995–4997.
10. Konter J, Abou-Rahma El-Din AAH, El-Emam A, et al. The NOtizer - a device for the convenient preparation of diazen-1-ium-1,2-diolates. *Methods Enzymol*. 2005;396:17–26.
11. Glusa E, Adam C. Endothelium-dependent relaxation induced by cathepsin G in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2001;133:422–428.
12. Seeling A, Lehmann J. NO-donors, part X [1]: Investigations on the stability of pentaerythritol tetranitrate (PETN) by HPLC-chemoluminescence-N-detection (CLND) versus UV-detection in HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40:1131–1136.
13. Kukovetz WR, Holzmann S. Mechanisms of nitrate-induced vasodilatation and tolerance development. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40:103–109.
14. Kojda G, Hacker A, Noack E. Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production. *Eur J Pharmacol*. 1998;355:23–31.
15. Hüsgen B, Noack E, Kojda G. Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. In: Schrör K, Pace-Asciak CR, eds. *Mediators in the Cardiovascular System: Regional Ischemia*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1995:183–187.
16. Wessler C, Homann A, Fricke U, et al. NO donors, part 8 [1]: synthesis and vasodilating activities of substituted benzylnitrates compared to cyclohexylmethylnitrate and GTN. *Eur J Med Chem*. 2003;38:581–586.
17. Alheid U, Dudel C, Forstermann U. Selective-inhibition by gossypol of endothelium-dependent relaxations augments relaxations to glyceryl trinitrate in rabbit celiac artery. *Br J Pharmacol*. 1987;92:237–240.
18. Kojda G, Beck JK, Meyer W, et al. Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna - dependence on intact endothelium. *Br J Pharmacol*. 1994;112:533–540.
19. Chen ZQ, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8306–8311.
20. Oberle S, Abate A, Grosser N, et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythritol tetranitrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:1539–1544.
21. Davidson IW, Miller HS, Dicarolo FJ. Absorption, excretion and metabolism of pentaerythritol tetranitrate by humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970;175:42–50.
22. Davidson IW, Rollins FO, Dicarolo FJ, et al. Pharmacodynamics and biotransformation of pentaerythritol tetranitrate in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1971;12:972–981.
23. King SY, Fung HL. Rapid microbial degradation of organic nitrates in rat excreta. Re-examination of the urinary and fecal metabolite profiles of pentaerythritol tetranitrate in the rat. *Drug Metab Dispos*. 1984;12:353–357.
24. Neurath GB, Dunger M. Blood levels of metabolites of glyceryl trinitrate and pentaerythritol tetranitrate after administration of a two-step preparation. *Arzneimittelforschung*. 1977;27:416–419.
25. Weber W, Michaelis K, Luckow V, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythritol tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneimittelforschung*. 1995;45:781–784.

Veröffentlichung 4

NO donors. Part 16: Investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.

König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin;
Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007), 17, 5881-5.

NO donors. Part 16: Investigations on structure–activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator[☆]

Andreas Koenig,^a Carolin Roegler,^a Kathrin Lange,^a Andreas Daiber,^b
Erika Glusa^a and Jochen Lehmann^{a,*}

^a*Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medicinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany*

^b*Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik, Kardiologie, 55101 Mainz, Germany*

Received 24 June 2007; revised 30 July 2007; accepted 1 August 2007

Available online 28 August 2007

Abstract—The vasoactive properties of 14 organic mononitrates were investigated in vitro using PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries. A surprisingly wide range of vasorelaxant potencies was observed (pD_2 : 3.36–7.50). Activities showed to be highly sensitive to the molecular structure and the substituents at the molecular carrier of the nitrate group. A correlation between lipophilicity and vasorelaxant potency could not be recognized. 2-Nitrooxyethylammoniumnitrate (**1**) was found to be slightly superior to the high potency trinitrate GTN.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Organic nitrates are useful drugs for the treatment of ischemic heart diseases. The vasoactive response is mediated by a catenary process which includes bioactivation to nitric oxide (NO) and/or related species, and intracellular accumulation of cyclic GMP causing relaxation of vascular smooth muscle cells. Four organic nitrates are used therapeutically: pentaerythrityl tetranitrate (PETN), glyceryl trinitrate (GTN), isosorbide dinitrate (ISDN), and isosorbide mononitrate (ISMN).^{2,3} Clinically, GTN represents the most potent compound (daily dosage about 1 mg) but it induces nitrate tolerance. PETN, although having more nitrate groups than the other nitrates, requires the highest daily dosage (50–240 mg), but on the other hand it does not develop significant tolerance.⁴ However, experimental in vitro studies (tension measurements) yielded different results. Using PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries we have shown that there is a clear correlation between the number of nitrate groups in the molecule and the vasodilator potency and PETN showed to be the most

potent nitrate (pD_2 : 8.18).¹ Low systemic bioavailability for PETN and its active metabolite PEtriN^{5,6} as well as a limited absorption of its less active metabolites PEdiN and PEmonoN is obviously responsible for the clinical profile of PETN.¹

Besides the number of nitrate groups, the lipophilicity ($\log P$) and stereochemistry of the nitrate carrier molecule may influence the vasorelaxant potency.^{7,8} Furthermore it was reported that the vasoactivities of cyclic organic dinitrate isomers like isoidide dinitrate, isosorbide dinitrate, and isomannide dinitrate differ significantly, although their $\log P$ were similar.^{9,10} The authors assumed that compounds with a nitrate group in the endo position were less potent than exonitrates due to the steric hindrance to endogenous bioactivating ligands. It is supposed that the bioactivating enzyme requires two attachment sites for interaction with the nitrate compound, one involves the oxygen in the nitrate group, while the other seeks another electron-rich center.¹¹ Moreover, there are two different bioactivation pathways for organic nitrates. Recent results revealed that only the ‘high potency nitrates’ GTN and PETN but not the ‘low potency nitrates’ ISDN and ISMN were bioactivated predominantly by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2).^{12–14} At higher concentration (>1 μ M), GTN and PETN are also subjected

Keywords: Organic nitrates; Vasorelaxation; Structure–activity relationships.

[☆] See Ref. 1.

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949803; fax: +49 3641 949802.; e-mail: j.lehmann@uni-jena.de

Table 1. Vasodilatory effects (pD_2 -value and EC_{50}) of organic mononitrates, ISDN and GTN, on $PGF_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium

Compound	Structure	pD_2	EC_{50} (M)	n	$\text{Log } P$	Compound	Structure	pD_2	EC_{50} (M)	n	$\text{Log } P$
1 ^a		7.50 (± 0.02)	3.15×10^{-8}	6	0.06 ^a	9		4.48 (± 0.03)	3.35×10^{-5}	4	-0.74
2		6.42 (± 0.04)	3.77×10^{-7}	3	1.59	10		4.14 (± 0.02)	7.25×10^{-5}	7	-0.37
3		6.34 (± 0.04)	4.12×10^{-7}	5	2.37	11		4.01 (± 0.03)	8.77×10^{-5}	4	1.97
4		5.99 (± 0.05)	1.03×10^{-6}	6	0.90	12		3.85 (± 0.02)	1.41×10^{-4}	5	2.15
5		5.81 (± 0.03)	1.54×10^{-6}	5	2.48	13		3.36 (± 0.04)	4.35×10^{-4}	4	1.43
6		5.02 (± 0.06)	9.56×10^{-6}	7	0.44	14		<DMSO	>DMSO	8	4.09
7		4.83 (± 0.03)	1.47×10^{-5}	9	1.14	GTN		7.44 (± 0.02)	3.56×10^{-8}	6	2.21
8		4.48 (± 0.03)	3.32×10^{-5}	9	-0.30	ISDN		6.37 (± 0.03)	4.24×10^{-7}	7	0.90

The pD_2 -value presents the negative logarithm of the molar concentration producing 50% of the maximum relaxation (EC_{50}). Values are means \pm SEM from n separate experiments.

^a Applied as 2-nitrooxyethylammoniumnitrate.

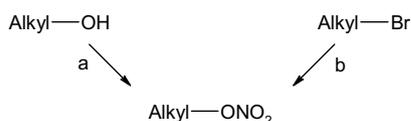
additionally to the ‘low potency nitrates’ pathway. Most probably, the low potency mononitrates are bioactivated exclusively by cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum for all concentrations.¹³

The correlation between the number of nitrate functions in the molecule and the vasorelaxant potency^{1,14,15} prompted us to perform further investigations of structure–activity relationships (SAR) in this class of bioactive compounds, but this time by structural alterations with a fixed number of nitrate groups. Especially organic mononitrates are appropriate for this study. They are less explosive, easy to handle, and the break down to active metabolites can be excluded. In addition, the chemical variation of the organic nitrate carrier molecule is easier than by using di- or trinitrates.

Several methods have been applied for the synthesis of organic nitrates.¹⁶ In this study, the preparation of the mononitrates (Table 1) was accomplished by esterification of the corresponding alkyl alcohols with fuming nitric acid or from the corresponding alkyl bromides by reaction with silver nitrate in acetonitrile, respectively (Scheme 1). The following nitrates were prepared according to procedures reported in the literature: **1**^{17,18} from 2-aminoethanol, **2**¹⁹ from 2-bromoethanol, **3**⁷ from benzylbromide, **4**²⁰ from methyl 3-hydroxypropanoate, **5**²¹ from 2-hydroxy-1-phenylpropanone, **6**¹⁸ from 3-hydroxypropionic acid, **7**²² from methyl 3-hydroxy-2,2-dimethylpropanoate and subsequent ester hydrolysis in methanolic sodium hydroxide, **9**²³ from 2-hydroxyethanesulfonic acid, **10** from 2-(bromomethyl)-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (this synthesis will be reported in detail later), and **12**²⁴ from 1-bromobutane.

The following nitrates were purchased: **11**, **13**, and **14** (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany), GTN (Merck, Darmstadt, Germany). Compound **8** and ISDN were obtained as gift from Schwarz-Pharma AG (Monheim, Germany).

To study SAR without the influence of any pharmacokinetic parameters, tension experiments were performed in organ baths using PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries and the vasorelaxant responses for the nitrates were measured and are given in Table 1. According to a previously described protocol,¹ lungs from adult pigs were obtained from the local slaughterhouse. Small branches from pulmonary arteries were prepared and cut into rings (length 2–3 mm, diameter 1.5–2 mm). In experiments with endothelium-denuded rings, the endothelium was removed by gently rubbing



Scheme 1. Synthesis of mononitrates from alkyl alcohols and alkyl bromides, respectively: Reagents and conditions: (a) fuming nitric acid, 2 h, <10 °C for **1**, **3**, **7**, and **9**; (b) silver nitrate/acetonitrile, 2–28 d, rt 50 °C (depending on the compound) for **2**, **4**, **5**, **6**, **10**, and **12**.

the inner surface with a rough plastic rod. The rings were suspended between two L-shaped platinum hooks and mounted in 10 mL organ baths filled with modified Krebs–Henseleit solution. The solution was kept at 37 °C and aerated with 95% O₂/5% CO₂. The vasorelaxant effects were measured using the PGF_{2α} (3 μM)-precontracted rings with a resting tension of 20 mN. The test compounds were added to the organ bath at the contraction plateau in a cumulative manner. Endothelial integrity was assessed by bradykinin (10 nM)-induced relaxation of PGF_{2α}-precontracted vessels. In mechanically endothelium-denuded arterial rings, pretreated with 0.2 mM L-NAME, the relaxation induced by bradykinin was less than 10%. Relaxation responses were expressed as a percentage of the PGF_{2α} (3 μM)-induced contraction in each tissue.

All of the compounds were able to elicit a significant vasorelaxation in a concentration-dependent manner (Fig. 1) with exception of compound **14**, which induced a very weak relaxation in the range of the pure solvent DMSO. The maximum of vasorelaxation has been achieved throughout for the compounds **1**–**12** ($E_{\text{max}} \sim 100\%$), compound **13** only performed $\sim 70\%$ relaxation after adding the selected maximum concentration of 1 mM. The sigmoidal concentration–response curves (Fig. 1) were consistent with the Hill slope for these mononitrates. The concentration–response curves resulting from experiments with endothelium-denuded vessels did not shift significantly, compared to the vessels with intact endothelium (data not shown).

In order to recognize any relationship between vasodilator potency and lipophilicity the pD_2 -values were plotted against the calculated log P -values (ACD, Toronto, Canada) (Table 1 and Fig. 2).

According to previous investigations, it had to be expected that the vasorelaxant potency of the organic nitrates investigated should increase with their lipophilicity.^{8,9} We have found the calculated log P -values for the bioactive nitrates in a wide range of three orders of magnitude (–0.74 to 2.48), but no clear correlation with the vasodilator activity could be recognized (Fig. 2).

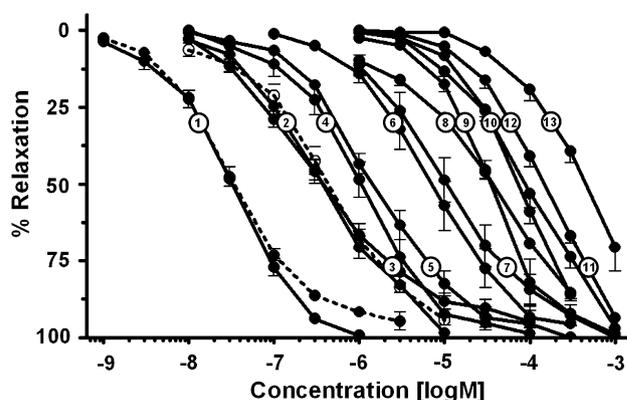


Figure 1. Concentration–response curves for the relaxation of PGF_{2α}-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium induced by the mononitrates given in Table 1. GTN (–•–) and ISDN (–○–). Mean ± SEM.

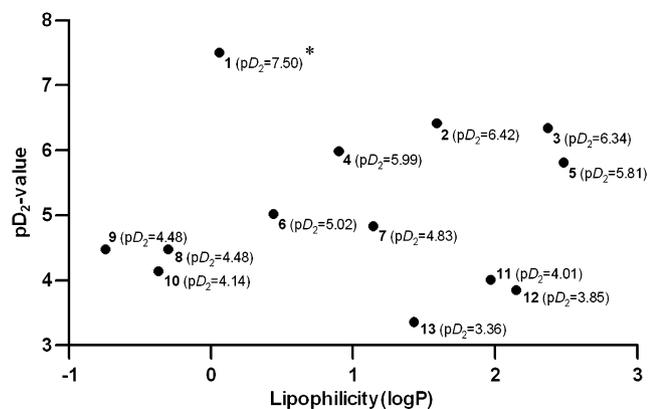
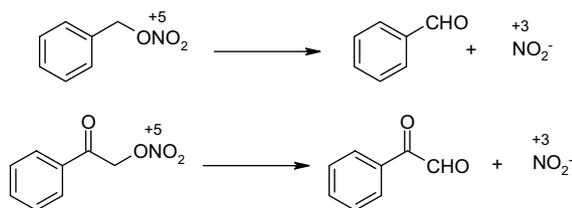


Figure 2. Relationship between lipophilicity ($\log P$) and the concentrations for half maximal relaxation (expressed as pD_2 -values) of the organic mononitrates. *Calculated for the uncharged molecule.

Nevertheless there is a significant influence of the nitrate carrier structures on the vasodilator potency. Compounds bearing the nitrate function attached to bulky and lipophilic carrier molecules without any further functional groups (**11–14**) displayed the lowest activities, particularly the most lipophilic compound **14** which even failed to outperform the solvent DMSO.

Polarization of the nitrate carriers by hydroxylation (**8** and **10**), introduction of hydrophilic cyclic ether (**8**), carboxy (**6** and **7**) or sulfonic acid moieties (**9**) enhances the vasodilator activities significantly. Acidity in general seems to be less crucial. The sulfonic acid **9** is more acidic but less active than the carboxylic acids **6** and **7**. Remarkably, the lipophilic ester **4** is more active than the corresponding less lipophilic acid **6**. It can be speculated that chemically reactive functions such as a carboxylic ester (**4**) or an alkyl bromide (**2**) are able to support the bioactivation of the attached nitrate. Compounds **3** and **5** extremely drop out of any potency/lipophilicity correlation (Fig. 2). We suggest that these unexpected high potencies may be based on a lability of the nitrate functions due to the specific chemical properties of these compounds which are not present in all of the other structures. Both, benzylnitrates and α -nitratophenones are capable to decompose in terms of a disproportionation.²¹ Scheme 2 demonstrates that both structures may be considered as ‘self-reducing nitrates’. Independently whether disproportionations as outlined in Scheme 2 will be performed under physiological conditions, we suggest that these properties support the bioactivation of the organic nitrate to break-down species.



Scheme 2. Disproportionation of benzylnitrates and α -nitratophenones.²¹

The 2-amino-substituted ethylmononitrate **1** was found to be the most potent mononitrate with $pD_2 = 7.50$. This surprising result indicates that in addition to previous observations¹ the number of nitrate moieties in the vasodilator compound is not necessarily the leading parameter for vasodilator potency. Recently, we speculated that the reactivity of oligonitrates, which is directly correlated with the number of nitrate groups, determines the vasodilator potency of organic nitrates and whether they are bioactivated by ALDH-2 or not.¹² Probably, the reactivity can also be increased by insertion of other functional groups (Table 1). Compound **1** showed to be more potent than all of the dinitrates investigated up to now and furthermore it reaches the efficacy of the most potent trinitrate GTN ($pD_2 = 7.44$).

Contradictory to the idea that the structure of the organic carrier is more or less negligible with regard to the biological activity, the present results reveal that the carrier molecule and its substituents are highly important. The vasoactivity of nitrovasodilators is definitively more sensitive to the functional groups rather than to the lipophilicity of the compounds. Therefore, we conclude that this is due to the significant differences in the binding affinities for the nitrate bioactivating enzymes ALDH-2 and cytochrome P450. It is suggested that these affinities for the binding areas of the enzymes are determined not only by the stereochemistry and the physicochemical properties of the compounds but in first line by polar substituents which are able to perform additional binding options. In particular, the primary protonated amino group in compound **1** is capable of improving the binding to the target enzyme.

Acknowledgment

A Ph.D. scholarship for A.K. by Graduiertenförderung (Thuringia, Germany) is gratefully acknowledged.

References and notes

- Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *50*, 68.
- Ahlner, J.; Andersson, R. G.; Torfgard, K.; Axelsson, K. L. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 351.
- Parker, J. D.; Parker, J. O. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 520.
- Jurt, U.; Gori, T.; Ravandi, A.; Babaei, S.; Zeman, P.; Parker, J. D. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 854.
- Wenzel, P.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Hortmann, M.; Seeling, A.; Hink, U.; Mollnau, H.; Stalleicken, D.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Li, H.; Forstermann, U.; Munzel, T.; Daiber, A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1729.
- Seeling, A.; Lehmann, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 1131.
- Wessler, C.; Homann, A.; Fricke, U.; Lehmann, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 581.
- Noack, E. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1984**, *6*, 583.

9. Bron, J.; Sterk, G. J.; Vanderwerf, J. F.; Timmerman, H. *Pharm. World Sci.* **1995**, *17*, 120.
10. Bogaert, M. G.; Rosseel, M. T. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1972**, *275*, 339.
11. Tzeng, T. B.; Fung, H. L. *Med. Hypotheses* **1992**, *37*, 58.
12. Chen, Z. Q.; Zhang, J.; Stamler, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 8306.
13. Munzel, T.; Daiber, A.; Mulsch, A. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 618.
14. Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; Lange, K.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Munzel, T.; Daiber, A. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 526.
15. Daiber, A.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Bachschmid, M.; Wenzel, P.; Sydow, K.; Wendt, M.; Kleschyov, A. L.; Stalleicken, D.; Ullrich, V.; Mulsch, A.; Munzel, T. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1372.
16. Boschan, R.; Merrow, R. T.; Vandolah, R. W. *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 485.
17. Berthmann, A.; Ratz, H.. In *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*; Bayer, E., Berthmann, A., Hauswiler, A., Eds.; Thieme: Stuttgart, 1963; Vol. 6, p 329.
18. Ishihara, S.; Saito, F.; Ohhata, Y.; Kanai, M.; Mizuno, H.; Fujisawa, M.; Yorikane, R.; Koike, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1527.
19. Kartasasmita, R. E.; Laufer, S.; Lehmann, J. *Arch. Pharm.* **2002**, *335*, 363.
20. Mccallum, K. S.; Emmons, W. D. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 367.
21. Emmons, W. D.; Freeman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4415.
22. Decker, M.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4995.
23. Whewell, C. U.S. Patent 20,060,293,384, 2006.
24. Muthuramu, K.; Shepson, P. B.; O'Brien, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 1117.

Veröffentlichung 5

NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.

Lange, Kathrin; König, Andreas; Roegler, Carolin;
Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, In Vorbereitung.

NO donors. Part 18:¹ Bioactive Metabolites of GTN and PETN - Synthesis and Vasorelaxant Properties

Kathrin Lange, Andreas Koenig, Carolin Roegler, Andreas Seeling, Jochen Lehmann*

Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

This is where the receipt/accepted dates will go; Received Month XX, 2000; Accepted Month XX, 2000 [BMCL RECEIPT]

Abstract—The vasodilators glyceryl trinitrate (GTN) and pentaerythrityl tetranitrate (PETN) are supposed to be degraded *in vivo* to the lower nitrates PETriN, PEDN, PEMN, 1,2-GDN, 1,3-GDN, 1-GMN and 2-GMN. We synthesized these bioactive metabolites as reference compounds for pharmacokinetic studies. The use of HPLC-methods for monitoring the stepwise reduction of PETN to lower nitrates and the syntheses of the glyceryl dinitrates proved advantageous. Furthermore, we measured the vasorelaxant properties of all metabolites by performing organ bath experiments with porcine pulmonary arteries. In general, the vasodilator potency increases with the number of nitrate moieties in the compound. ©2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Glyceryl trinitrate (GTN), pentaerythrityl tetranitrate (PETN), isosorbide dinitrate (ISDN) and isosorbide-5-mononitrate (5-ISMN) are used in the therapy of cardiovascular diseases. These compounds are supposed to be enzymatically bioactivated in order to liberate nitric oxide as the vasorelaxant factor. Not only this bioactivation process but also chemical or enzymatic degradation *in vivo* may generate lower bioactive nitrates from GTN, PETN and ISDN.^{2,3}

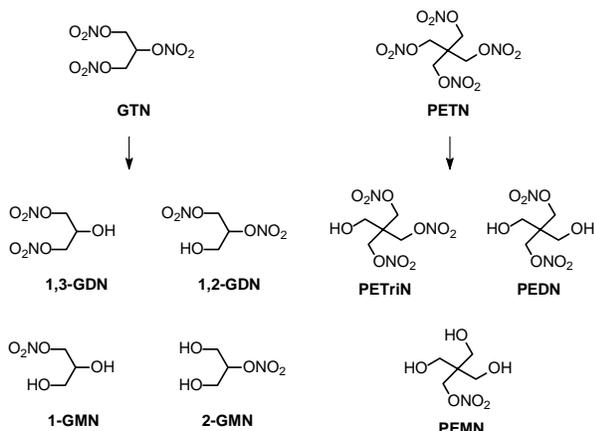


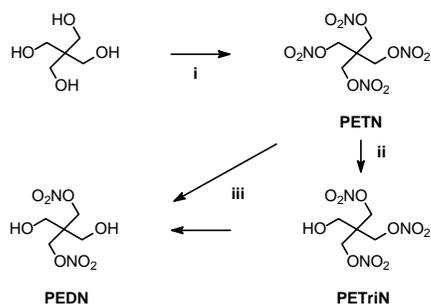
Figure 1. Potential bioactive metabolites of PETN and GTN

Keywords: organic nitrates, metabolites, GTN, PETN
*corresponding author: Tel.: + 49 3641 949803; fax +49 3641 949 802
e-mail: j.lehmann@uni-jena.de

Accordingly, the clinical profiles may result not only from the initially administered oligonitrates but also and even predominantly⁴ from the action of the metabolites. Many studies were carried out with PETN and GTN without looking at the bioactive metabolites. The very limited availability of the metabolites for pharmacological and analytical purposes may be one of the reasons for this restriction. We therefore synthesized and characterized pharmacologically the potential bioactive metabolites of GTN and PETN in order to estimate their possible contributions to the overall effect of the substances.

Several strategies were applied to synthesize organic nitrates.^{5,6} We performed the synthesis of the PETN-metabolites pentaerythrityl trinitrate (PETriN) and pentaerythrityl dinitrate (PEDN) similarly to Hess¹² by reductively degrading PETN with different molar amounts of hydrazine hydrate (2:1 for PETriN, 8:1 for PEDN) in boiling mixtures of ethanol and dioxane (Scheme 1.).

Treating an organic nitrate with hydrazine hydrate results among other compounds in the formation of inorganic nitrite, nitrogen, nitric oxide, ammonia and the corresponding alcohol.⁷ Monitoring the reaction is advantageous and was accomplished by HPLC-method A.



Scheme 1. Synthesis of PETN, PETriN and PEDN: i. - nitric acid (100%), 4-5h, -5 to -10°C; ii. - hydrazine hydrate, dioxane, ethanol, 3h, reflux; iii. - hydrazine hydrate, dioxane, ethanol, 6.5h, reflux

To prepare PEDN, we used HPLC-method A. We measured the degradation of PETN to PETriN, PEDN and PEMN (Fig. 2; data from PEMN not shown) and identified a suitable end point after 6.5 hours (Fig. 2).

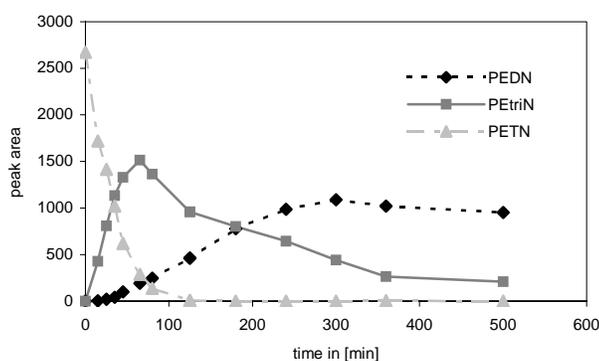
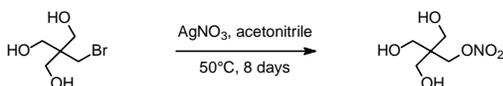


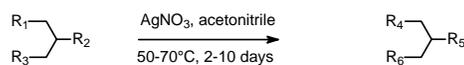
Figure 2. Synthesis of PEDN by reductive degradation with an eightfold excess of hydrazine hydrate, monitored by HPLC

PETriN was obtained after 3 hours with a twofold excess of hydrazine hydrate. Purification was accomplished by column chromatography.

Reductive degradation was shown to be less advantageous for the preparation of pentaerythritol mononitrate (PEMN), 1,2-glycerol dinitrate (1,2-GDN), 1,3-glycerol dinitrate (1,3-GDN) and 1-glycerol mononitrate (1-GMN). We preferred reacting the corresponding bromides with silver nitrate in acetonitrile (Schemes 2 and 3) and, if necessary, using a “fractionated extraction” to remove byproducts. This procedure resulted in purer compounds and higher yields than did purification by column chromatography. Progress of the reaction was monitored using the HPLC-method B for GDN.



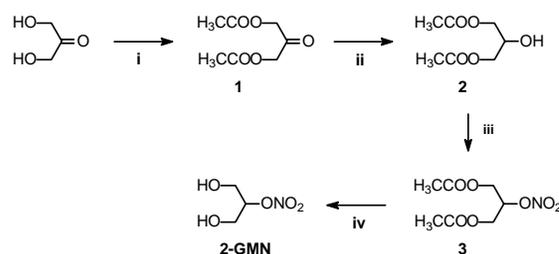
Scheme 2. Synthesis of PEMN



$R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{Br}, R_3 = \text{OH}$ **1,2-GDN:** ($R_4 = \text{ONO}_2, R_5 = \text{ONO}_2, R_6 = \text{OH}$)
 $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{Br}$ **1,3-GDN:** ($R_4 = \text{ONO}_2, R_5 = \text{OH}, R_6 = \text{ONO}_2$)
 $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}$ **1-GMN:** ($R_4 = \text{ONO}_2, R_5 = \text{OH}, R_6 = \text{OH}$)

Scheme 3. Synthesis of 1,3-GDN, 1,2-GDN and 1-GMN

A 4-step synthesis of 2-GMN was performed by acetylation of dihydroxy acetone, reduction of **1** and nitration of **2** with fuming nitric acid in the presence of acetic anhydride. After hydrolysis of **3** with sodium hydroxide, 2-GMN was obtained initially together with ~ 30% 1-GMN. The isomerization of 2-GMN to 1-GMN under basic conditions has been already described by Capellos *et al.*⁸ and was explained by a higher stability of the ONO_2 -group in position 1. Less basic conditions and shorter reaction times resulted in higher yields of 2-GMN.



Scheme 4. Synthesis of 2-GMN: i. - pyridine, acetic anhydride, 1.5h, rt Lit.¹¹; ii. - $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF, 7h, 3°C; iii. - urea, nitric acid (100%), acetic anhydride, 12h, 3°C; iv. - sodium hydroxide, dichloromethane, 7 min, rt

As described previously,² organ bath experiments were performed using $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries. The vasorelaxant responses of PETN, GTN, the synthesized bioactive of metabolites and of compound **3** are given in Table 1.

Table 1. Concentration-response curves and vasodilatory effects (EC_{50} -values) of PETN and GTN, their active metabolites, and compound (**3**).

Compounds	EC_{50} , nM ^a	Compounds	EC_{50} , nM ^a
PETN	7 *	GTN	27 *
PETriN	30 *	1,3-GDN	523
PEDN	2100 *	1,2-GDN	1930
PEMN	72000 *	1-GMN	56300
		2-GMN	115000
		3	1230

^aValues are means of three to nine experiments

*taken from a previous publication [3]

Table 1 demonstrates that the vasodilator potencies of these organic nitrates correlate with the number of nitrate groups. Surprisingly, quite significant differences in vasodilator potency were found between 1,3-GDN and 1,2-GDN and between 1-GMN and 2-GMN, respectively.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

References and notes

1. Konter, J.; Lehmann, J.; Moellmann, U.; *Bioorg. Med. Chem.*; submitted
2. Koenig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5881.
3. Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J.; *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *5*, 68
4. Weber, W.; Michaelis, K.; Luckow, V.; Kuntze, U.; Stalleicken, D.; *Arzneim.-Forsch.* **1995**, *45*, 781
5. Boschan, R.; Merrow, R.T.; Van Dolah, R.W.; *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 485.
6. Berthmann, A.; Ratz, H.; In *Houben-Weyl – Methoden der Organischen Chemie*; Bayer, E., Berthmann, A., Hausweiler, A., Eds.; Thieme: Stuttgart, **1963**, *6*, 329
7. Merrow, R.T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1297
8. Capellos, C.; Fisco, W.J.; Ribaud, C.; Hogan, V.D.; Campisi, J.; Murphy, F.X.; Castorina, T.C.; *Int. J. Chem. Kinet.* **1982**, *14*, 903
9. Brandstaetter-Kuhnert, M.; Kuhnert, G.; *Sci. Pharm.* **1960**, *28*, 287
10. Korolev, A.M.; Eremenko, L.T.; Meshikhina, L.V.; *Russ. Chem. Bull.* **2002**, *51*, 2306 (Translation of *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.* **2002**, *51*, 2141)
11. Bentley, P.H.; McCrae, W.; *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2082
12. Hess, U.; *U.S. Patent 6180664*, **1997**, 10
13. HPLC-Methods: (A): column: Chromolith® Performance RP-18 100-4,6 mm (5µm); eluent: methanol/water 1:1; flow: 0,3 ml/min (isocratic); detection: UV, 215 nm; retention factors: 22,3 min PETN; 13,5 min PETriN; 7,6 min PEDN; 5,8 min PEMN. (B): column: Chromolith® Performance RP-18 100-4,6 mm (5µm); eluent: methanol/water 30:70; flow: 0,3 ml/min (isocratic); detection: UV, 215 nm; retention factors: 11,7 min 1,3-GDN; 16,8 min 1,2-GDN.
14. Pentaerythrityl tetranitrate (PETN): Pentaerythritol (0.50 g, 3.67 mmol) was dissolved dropwise under stirring in 2 mL of concentrated nitric acid (100%) at -5 to -10°C. After two to three hours 1 mL of water was added and the mixture maintained for 2 more hours. The voluminous white precipitate was filtered off, washed carefully with water, dissolved in 20 mL of acetone and filtered again. The filtrate was diluted with 20 mL of water and the acetone cautiously evaporated. The white precipitate was separated and dried in a desiccator under reduced pressure. Yield 0.51 g (44%), white solid, mp. 142,2°C (Lit.⁹ 142°C); IR (KBr): 3430, 2908, 1648, 1274, 1005, 853, 748; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 4.69 (s, 8 H, 4x -CH₂-ONO₂); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 41.27 (-CH₂-C-CH₂-), 70.74 (4x -CH₂-ONO₂); anal. (C₅H₈N₄O₁₂) C,H,N.
15. Pentaerythrityl trinitrate (PETriN): Similarly to Hess¹² pentaerythrityl tetra-nitrate (2.25 g, 7.12 mmol) was dissolved under stirring in a boiling mixture of 50 mL of dioxane and 50 mL of ethanol. Hydrazine hydrate (0.72 g, 14.4 mmol) in 30 mL of water was added dropwise to the stirred solution over 1 hour. The mixture was refluxed for 2 h and cooled to room temperature. The progress of the reaction was monitored with HPLC-method A. The solution was diluted with 100 mL of water and extracted with 6 x 50 mL of dichloromethane. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated. The crude oil was purified by column chromatography on silica gel using hexane/ethylacetate (40/60) as eluent and obtained as a light yellow oil. Yield 0.98 g (51%), light yellow oil. IR (KBr): 3604, 3424, 2971, 2905, 1638, 1477, 1277, 995, 856, 755; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 3.48 – 3.50 (d, 2 H, -CH₂-OH), 4.60 (s, 6 H, 3x -CH₂-ONO₂), 5.29 – 5.34 (t, 1 H, -OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 42.66 (-CH₂-C-CH₂-), 59.18 (-CH₂-OH), 71.20 (3x -CH₂-ONO₂); anal. (C₅H₉N₃O₁₀) C,H,N.
16. Pentaerythrityl dinitrate (PEDN): Similarly to Hess¹² pentaerythrityl tetranitrate (2.43 g, 7.69 mmol) was dissolved under stirring in a boiling mixture of 50 mL of dioxane and 50 mL of ethanol. Hydrazine hydrate (3.09 g, 61.7 mmol) in 30 mL of water was added dropwise under stirring over 1.5 hours. The mixture was refluxed for further 5 h and then cooled to room temperature. The progress of the reaction was monitored with HPLC-method A. The solution was diluted with 100 mL of water and extracted with 6 x 50 mL of ethylacetate. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated, and the resulting oil was purified by column chromatography on silica gel using hexane/ethylacetate (40/60) as eluent. Yield 0.75 g (43%), light yellow oil, later crystallizing to a light yellow solid. IR (KBr): 3386, 2958, 2895, 1641, 1274, 1052, 983, 859; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 3.39 – 3.41 (d, 4 H, 2x -CH₂-OH), 4.52 (s, 4 H, 2x -CH₂-ONO₂), 4.93 – 4.97 (t, 2 H, 2x -OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 44.28 (-CH₂-C-CH₂-), 59.35 (2x -CH₂-OH), 71.94 (2x -CH₂-ONO₂); anal. (C₅H₁₀N₂O₈ x 1/5 ethylacetate) C,H,N.
17. Pentaerythrityl mononitrate (PEMN): A solution of 2-bromomethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (6.61 g, 33.2 mmol) and silver nitrate (12.41 g, 73.0 mmol) in 50 mL of dry acetonitrile was heated at 50°C under stirring and protection from light. The precipitated silver bromide was filtered off repeatedly. After 8 days the mixture was cooled to room temperature and saturated sodium chloride solution was added. The filtrate of this mixture was extracted with 10 x 100mL of ethylacetate. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated. 100 mL of water were added and the mixture extracted with 3 x 100 mL of n-hexane, 4 x 100 mL of diethylether, 4 x 100 mL of dichloromethane and 6 x 100 mL of ethylacetate. The

- n-hexane, diethylether and dichloromethane phases were discarded and the ethylacetate phases were analyzed for byproducts by HPLC. The pure ethylacetate phases were combined, dried (MgSO₄) and evaporated. The remaining precipitated white solid was recrystallized from diethylether. Yield 1.35 g (22%), white solid, mp. 78°C (Lit.¹⁰ 78-79°C). IR (KBr): 3326, 2949, 2898, 1644, 1277, 1046, 865, 714, 606; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 3.34 – 3.36 (d, 6 H, 3x -CH₂-OH), 4.43 (s, 2 H, -CH₂-ONO₂), 4.51 – 4.56 (t, 3 H, 3x -OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 45.25 (-CH₂-C-CH₂-), 59.66 (3x -CH₂-OH), 72.68 (-CH₂-ONO₂); anal. (C₃H₁₁NO₆) C,H,N.
18. Glycerol trinitrate (GTN) was purchased from Merck, Darmstadt, Germany.
 19. 1,3-Glycerol dinitrate (1,3-GDN): A solution of 1,3-dibromo-2-propanol (0.51 g, 2.3 mmol) and silver nitrate (1.42 g, 8.4 mmol) in 8 mL of dry acetonitrile was heated at 50°C for 7 days under stirring and protection from light. The precipitated silver bromide was separated repeatedly. Progress of the reaction was monitored with HPLC-method B. The solution was then cooled to room temperature and saturated sodium chloride solution was added repeatedly. The precipitated silver chloride and silver bromide were removed and the filtrate was extracted with 3 x 100 mL of chloroform. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated to give 1,3-dinitrooxy-2-propanol as a light yellow oil. Yield: 0.40 g (94%). IR (KBr): 3579, 3389, 2905, 1638, 1274, 1128, 1002, 859; ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, δ ppm): 2.56 – 2.58 (d, 1 H, -OH), 4.25 – 4.35 (sext, 1 H, >CH-OH), 4.50 – 4.64 (m, 4 H, 2x -CH₂-ONO₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 65.49 (>CH-OH), 72.26 (2x -CH₂-ONO₂); anal. (C₃H₆N₂O₇) C,H,N.
 20. 1,2-Glycerol dinitrate (1,2-GDN): Prepared as described above for 1,3-GDN from 2,3-dibromo-1-propanol (1.00 g, 4.6 mmol) and silver nitrate (7.80 g, 45.9 mmol) for 2 days. Extraction with 6 x 100 mL of ethylacetate. The crude oily product was diluted with 60 mL of water and extracted with 3 x 60 mL of n-hexane and 4 x 60 mL of diethylether. The n-hexane phases were discarded and the diethylether phases were analyzed for byproducts with HPLC-method B. The pure diethylether phases were combined, dried (MgSO₄) and evaporated. Yield: 0.51 g (61%), colourless oil. IR (KBr): 3592, 3389, 1638, 1274, 1062, 995, 853, 748; ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, δ ppm): 1.94 (s, 1 H, -OH), 3.80 – 3.95 (mc, 2 H, -CH₂-OH), 4.57 – 4.81 (m, 2 H, -CH₂-ONO₂), 5.25 – 5.33 (mc, 1 H, >CH-ONO₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 59.99 (-CH₂-OH), 68.82 (-CH₂-ONO₂), 78.94 (>CH-ONO₂); anal. (C₃H₆N₂O₇) C,H,N.
 21. 1-Glycerol mononitrate (1-GMN): Prepared as described above from 3-bromo-1,2-propanediol (1.00 g, 6.5 mmol) and silver nitrate (1.96 g, 11.6 mmol) in 12 mL of dry acetonitrile, 70°C for 10 days. Extraction with 4 x 60 mL of ethylacetate, the combined organic phases dried (MgSO₄), evaporated, the crude oily product diluted with 80 mL of water and extracted with 3 x 80 mL of n-hexane, 3 x 80 mL of diethylether, 3 x 80 mL of dichloromethane and 5 x 80 mL of ethylacetate. The hexane, diethylether and dichloromethane phases were discarded. The pure ethylacetate phases were combined, dried (MgSO₄) and evaporated. Yield: 0.33 g (37%), light yellow oil. IR (KBr): 3379, 2892, 1632, 1283, 1052, 862; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 3.28 – 3.44 (m, 2 H, -CH₂-OH), 3.68 – 3.79 (mc, 1 H, >CH-OH), 4.36 – 4.43 (dd, 1 H, -CHH-ONO₂), 4.56 – 4.62 (dd, 1 H, -CHH-ONO₂), 4.79 – 4.84 (t, 1 H, -CH₂-OH), 5.20 – 5.22 (d, 1 H, >CH-OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 62.76 (-CH₂-OH), 68.35 (>CH-OH), 75.68 (-CH₂-ONO₂); anal. (C₃H₇NO₅ x ³/₁₁ water x ¹/₂₂ ethylacetate) C,H,N.
 22. 1,2,3-Trihydroxy-propane 1,3 diacetate (2): 1M-BH₃*THF (3.40 mL, 3.40 mmol) was added dropwise under nitrogen and stirring to 1,3-dihydroxypropane-2-one 1,3 diacetate (**1**) (0.25 g, 1.44 mmol), synthesized as described previously¹¹, in 4 mL of dry THF over 7 hours at 3°C (monitoring by GC/MS). The mixture was diluted with 30 mL of water, extracted with 3 x 20 mL of chloroform and the combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated. Yield: 0.085 g (34%), colourless oil. IR (KBr): 3459, 2958, 1743, 1375, 1230, 1046; ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, δ ppm): 2.08 (s, 6 H, 2x H₃C-COO-), 2.72 (s, 1 H, >CH-OH), 4.04 – 4.20 (m, 5 H, -CH₂-CH(OH)-CH₂-); ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 20.71 (2x H₃C-COO-), 65.17 (-CH₂-CH(OH)-CH₂-), 68.03 (>CH-OH), 171.06 (2x H₃C-COO-); anal. (C₇H₁₂O₅) C,H,N.
 23. 1,3-Dihydroxy-2-nitrooxypropane 1,3 diacetate (**3**): A solution of (**2**) (0.50 g, 2.84 mmol) and urea (0.004 g, 0.067 mmol) in 15 mL of dichloromethane was cooled to 3°C and concentrated nitric acid (100%) (0.36 g, 5.70 mmol) was added dropwise < 10°C under stirring. After cooling to 3°C, acetic anhydride (0.58 g, 5.70 mmol) was added dropwise < 10°C, the mixture stirred over night at room temperature and then diluted with 20 mL of water. The organic phase was separated and washed once with 30 mL of water and 30 mL of saturated sodium bicarbonate solution and twice with 30 mL of water. The organic phase was dried (MgSO₄) and evaporated. Yield: 0.60 g (96%), colourless oil. IR (KBr): 2965, 1743, 1644, 1369, 1220, 1052, 850; ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, δ ppm): 2.09 (s, 6 H, 2x H₃C-COO-), 4.19 – 4.44 (m, 4 H, -CH₂-CH(ONO₂)-CH₂-), 5.39 – 5.47 (mc, 1 H, >CH(ONO₂)); ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 20.50 (2x H₃C-COO-), 60.89 (-CH₂-CH(OH)-CH₂-), 77.96 (>CH-ONO₂), 170.25 (2x H₃C-COO-); anal. (C₇H₁₁NO₇) C,H,N.
 24. 2-Glycerol mononitrate (2-GMN): A solution of sodium hydroxide (0.13 g, 3.25 mmol) in 0.19 mL of water was added dropwise under stirring to 1,3-dihydroxy-2-nitrooxypropane 1,3 diacetate (0.37 g, 1.67 mmol) dissolved in 2.4 mL of dichloromethane. The mixture was maintained for 7 more minutes, then

neutralized with concentrated hydrochloric acid and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with 3 x 10 mL of diethylether and the combined organic phases were dried (MgSO₄) and evaporated. Yield: 0.12 g (53%), light yellow oil. IR (KBr): 3354, 2943, 1632, 1277, 1049, 856; ¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz, δ ppm): 3.49 – 3.67 (m, 4 H, 2x -CH₂-OH), 5.02 – 5.07 (m, 3 H, >CH-ONO₂, 2x -CH₂-OH); ¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, δ ppm): 58.52 (2x -CH₂-OH), 86.47 (>CH-ONO₂); anal. (C₃H₇NO₃) C,H,N.

5. Unveröffentlichte Ergebnisse

Im nachfolgenden Kapitel werden Untersuchungen und Ergebnisse diskutiert, die entweder noch nicht zur Veröffentlichung eingereicht wurden oder in bisher erschienenen Publikationen trotz inhaltlicher Nähe nicht eingearbeitet worden sind. Viele der verwendeten Materialien und Methoden sind publiziert, auf Abweichungen wird explizit hingewiesen.

5.1. Einfluß der Nitratgruppenanzahl auf die vasodilatorische Potenz

In den *Veröffentlichungen 1* und *3* werden die ermittelten pharmakologischen Kenngrößen (EC_{50} - und pD_2 -Wert) sowie die dazugehörigen Konzentrations-Wirkungskurven der Tetra- bis Mononitrate vorgestellt. Der direkte Vergleich der vasodilatorischen Potenzen zur Nitratgruppenanzahl zur Aufklärung einer möglichen Korrelation blieb jedoch aus.

Wie in *Abb. 8* dargestellt, korreliert beim Vergleich der 4 offizinellen Nitrate durch Regressionsanalyse die vasodilatorische Wirkaktivität mit der Nitratgruppenanzahl im Molekül ($R^2 = 0,9558$), für die Reihe der PETN-Metaboliten war diese Korrelation sogar noch geringfügig besser ($R^2 = 0,9690$). Dies ist nachvollziehbar, da bei den offizinellen Nitraten PETN, GTN, ISDN und ISMN durch die strukturell recht unterschiedlichen nitrattragenden Reste stärkere Abweichungen zu erwarten waren, wohingegen beim Vergleich der PETN-Metaboliten der Einfluß des „Nitratcarriers“ geringer sein sollte. Nichtsdestotrotz handelt es sich formal bei allen vier offizinellen Nitraten um Alkylnitrate ohne zusätzliche Aromaten oder funktionelle Gruppen, die wie in *Veröffentlichung 4* beschrieben die Gefäßwirkung deutlich beeinflussen.

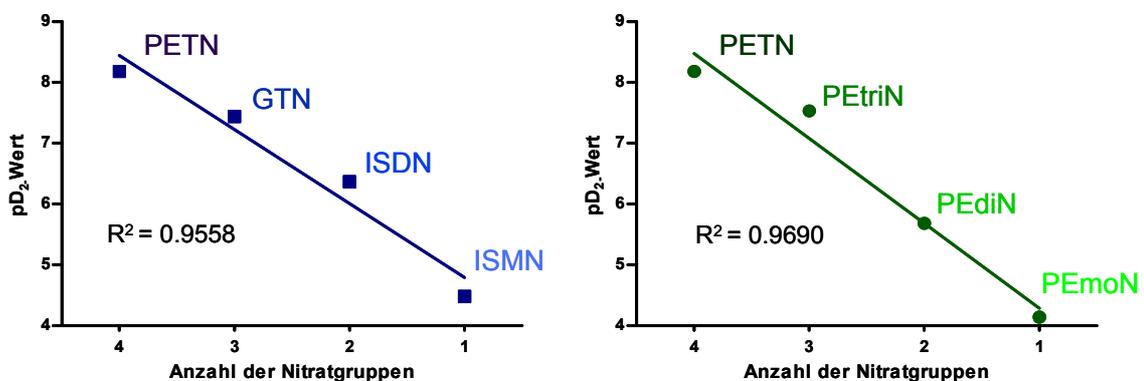


Abb. 8: Korrelation bei Tetra- bis Mononitraten zwischen Nitratgruppenanzahl im Molekül und vasodilatorischer Wirkstärke (pD_2 -Wert) an PGF_{2a} -vokontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein. Lineare Regressionsanalyse (GraphPad Prism). Mittelwerte \pm SEM von 3-9 separaten Versuchen.

In Abb. 9 werden die Nitrate PETN, GTN und ISDN direkt ihren partiell denitrierten, bioaktiven Metaboliten gegenübergestellt und deren unterschiedliche Wirkaktivität zueinander verglichen. Die Zahlenwerte oder Faktoren verdeutlichen, um welches Maß die vasodilatorische Potenz durch stufenweisen Entzug von Nitratgruppen aus dem Arzneistoffmolekül abgeschwächt wird.

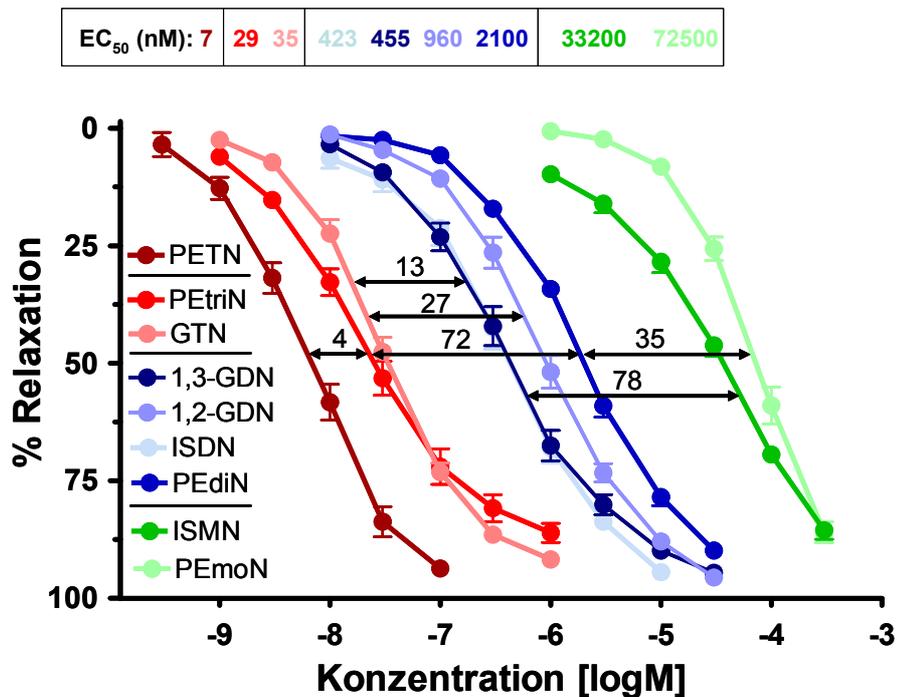


Abb. 9: Konzentrations-Wirkungskurven von PETN, GTN, ISDN und deren jeweilige bioaktive Metaboliten sowie deren relative Wirkaktivitäten zueinander an der PGF_{2α}-vorkontrahierten Pulmonalarterie vom Schwein mit intaktem Endothel. Die jeweiligen Faktoren geben den Quotienten der EC₅₀-Werte eines um eine Nitratgruppe verminderten Metaboliten zum Arzneistoff oder dem entsprechenden nächst höheren Nitratmetaboliten an (z.B.: PEtriN/PETN oder PEdiN/PEtriN). Mittelwerte ± SEM von 3-9 separaten Versuchen.

Die Wirkungsabschwächung vom Tetra- zum Trinitrat (PETN → PEtriN) ist geringer als beim Übergang von Tri- zu Dinitraten oder Di- zu Mononitraten. Oder umgekehrt formuliert, durch Einführung weiterer Nitratgruppen in ein organisches Nitrat läßt sich die Wirkaktivität nicht beliebig steigern, sondern nähert sich einem Maximaleffekt an. Aktuelle Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe Lehmann zeigen, dass Mannitolhexanitrat (MHN) mit zwei zusätzlichen Nitratgruppen im Vergleich zu PETN lediglich etwa um den Faktor 2 stärker vasoaktiv ist (EC₅₀ = 3,45 nM; Daten Roegler).

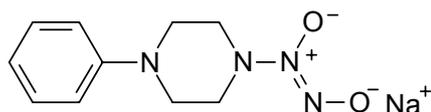
Weniger offensichtlich ist die Tendenz beim direkten Vergleich der Übergänge vom Tri- zum Dinitrat (PEtriN → PEdiN; GTN → 1,2-GDN; GTN → 1,3-GDN) und Di- zum Mononitrat (PEdiN → PEmoN; ISDN → ISMN). Wie aus Abb. 8 hervorgeht, war zwar in beiden Fällen ein deutlicher Abfall hinsichtlich der vasodilatorischen Potenz zu

beobachten (Faktor: 13-78), das Maß der Wirkungsabschwächung variierte jedoch in Abhängigkeit der jeweilig ausgewählten Vergleichspaare deutlich. So fiel bei den PETN Metaboliten die Gefäßwirksamkeit von PEtriN zu PEdiN (Faktor 72) etwa doppelt so stark ab wie beim Übergang von PEdiN zu PEmoN (Faktor 35). Hingegen wurde bei den Dinitratmetaboliten 1,2-GDN und 1,3-GDN eine geringere Abschwächung (Faktor 13 bzw. 27) der vasodilatorischen Potenz zum Ausgangsstoff GTN im Vergleich zum entsprechenden PETN-Metabolitenpaar PEtriN → PEdiN (Faktor 72) beobachtet. Wiederum war die Abschwächung für ISDN → ISMN (Faktor 78) deutlich stärker ausgeprägt als für PEdiN → PEmoN (Faktor 35). Für GTN und ISDN lassen sich hinsichtlich weiterer Nitratverbindungen oder Metaboliten keine weiterführenden Aussagen treffen, da der Zuckeralkohol Isosorbid durch seine zwei Alkoholfunktionen kein Tri- oder Tetranitrat bilden kann und für GTN zum Zeitpunkt der Veröffentlichung keine Mononitratmetaboliten (1-GMN, 2-GMN) vorlagen. Wie zu erwarten war, wurde für die nitratfreien Alkohole wie Pentaerithritol kein relevanter Gefäßeffekt beobachtet.

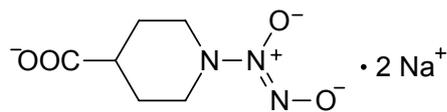
Die in der *Abb. 8* dargestellten Faktoren erlauben eine Abschätzung der relativen Wirkpotenzen einer Metabolitenfolge (PETN → PEmoN) oder verschiedener Nitrats (PETN → ISMN) zueinander. Beispielweise läßt sich daraus für PETN ableiten, dass *in vitro* und *in vivo* (z.B. bei i.v. Gabe) PEmoN in einer etwa 10000-fach höheren Konzentration eingesetzt werden muß, um einen zum PETN vergleichbaren Relaxationseffekt auszulösen.

5.2. Stärkere Vasoaktivität direkter NO-Donoren am Beispiel der NONOate im Vergleich zu organischen Nitraten

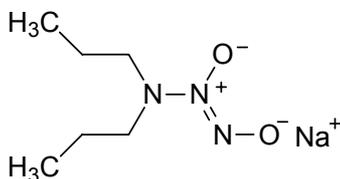
Bei den direkten NO-Donoren besitzen die Diazen-1-ium-1,2-diolate (Diazeniumdiolate, NONOate oder „solid NO“) eine herausgehobene Stellung, da sich bei ihnen die nichtenzymatische NO-Freisetzung gezielt durch Variation von pH-Wert und Temperatur und Molekülstruktur steuern läßt. In Kooperation mit Herrn Apotheker Dr. Jörg Konter wurden drei strukturell verschiedenartige Diazeniumdiolat-Natriumsalze und eine Prodrugverbindung hinsichtlich ihrer vasodilatorischen Potenz im Vergleich zu GTN an der Arteria pulmonalis geprüft (*Abb. 10*).¹²⁵



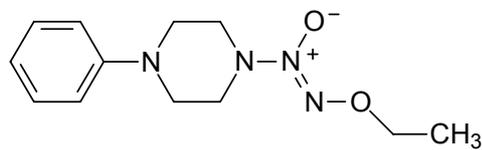
Trivialname: PHEPIPERAZI/NO



Trivialname: ISONIPECO/NO



Trivialname: DPA/NO



Trivialname: Et-PHEPIPERAZI/NO

Abb. 10: Strukturen der für die Relaxationsmessung verwendeten NONOate.¹²⁵

Die direkt NO-freisetzenden NONOate (PHEPIPERAZI/NO, DPA/NO und ISONIPECO/NO) relaxierten die Gefäßringe stärker als GTN. Dabei stellte PHEPIPERAZI/NO die stärkste vasoaktive Verbindung mit einem EC_{50} -Wert von 2,12 nM dar, gefolgt vom DPA/NO (EC_{50} -Wert: 6,37 nM), sowie dem ISONIPECO/NO als schwächste Verbindung (EC_{50} -Wert: 20,6 nM). Die Gefäßwirksamkeit der drei NONOate liegt demnach in einer engen Bandbreite von etwa einer Zehnerpotenz. Beim Vergleich der EC_{50} -Werte zu den UV-spektroskopisch ermittelten Freisetzungshalbwertszeiten ($t_{1/2}$ bei pH 7,4, 37°C) war eine „indirekte“ Korrelation zu beobachten (Tabelle 2, Abb. 11). NONOate, die schnell NO freisetzen, lösen einen schwächeren vasorelaxierenden Effekt aus als NONOate mit einer geringeren NO-Freisetzungsgeschwindigkeit.

Tabelle 2 : Vergleich der pharmakologischen Kenngrößen (EC_{50} und pD_2) der untersuchten NONOate sowie GTN als Referenz zu deren NO-Freisetzungsgeschwindigkeit (für GTN und Et-PHEPIPERAZI/NO nicht meßbar).

Substanz	EC_{50} [mol/l]	pD_2 (n)	Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der NO-Freisetzung [min]
PHEPIPERAZI/NO	2.12×10^{-9}	8.67 (5)	4.5
DPA/NO	6.37×10^{-9}	8.20 (2)	1.5
ISONIPECO/NO	2.06×10^{-8}	7.69 (3)	0.5
GTN	1.91×10^{-8}	7.44 (6)	--
Et-PHEPIPERAZI/NO	1.09×10^{-5}	4.96 (2)	--

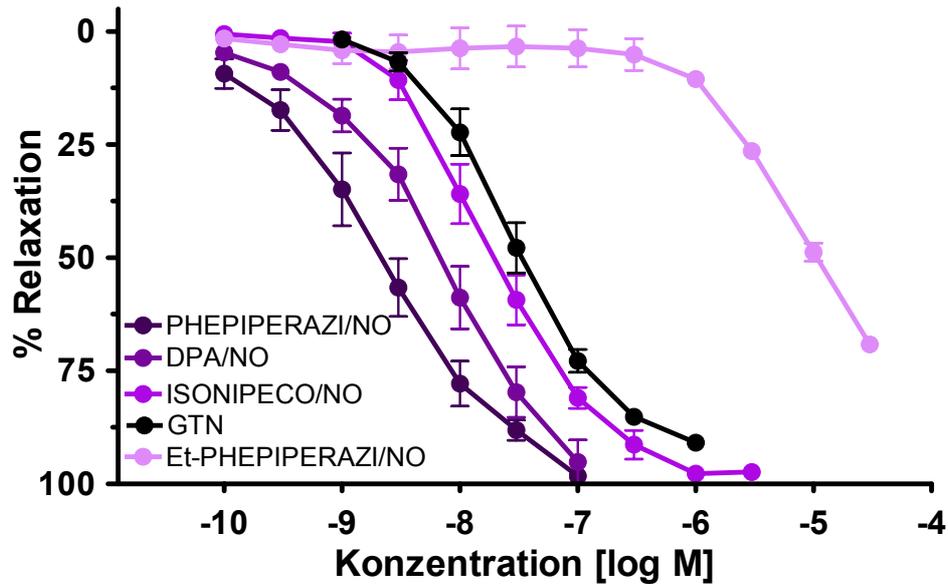


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungskurven von Diazeniumdiolaten im Vergleich zu GTN an $PGF_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Mittelwerte \pm SEM von 2-5 separaten Versuchen.

Die Ursache dafür dürfte im apparativen Aufbau des Organbades liegen. Nach dem Zupipettieren einer Lösung definierter Konzentration findet eine Verteilung im Organbad statt, nach etwa 5 - 10 s war bei den NONOaten ein Initialeffekt am Gefäß zu beobachten. Um eine vorzeitige Zersetzung des NONOats zu verhindern, wurde als Lösungsmittel der Verdünnungsreihe 0,01 M NaOH verwendet. Nach Zugabe zum Organbad setzt das NONOat aufgrund der Milieuänderung also bereits NO frei, welches sogleich mit dem die Lösung durchspülenden Carbogengas (95 % O_2 , 5 % CO_2) zu Stickstoffdioxid (NO_2) weiterreagiert, so dass mit Wasser anorganisches Nitrit entsteht, welches seinerseits nur einen schwachen vasorelaxierenden Effekt auslöst.

Daher geht bei schneller freisetzenden NONOaten ein verhältnismäßig großer Teil der ursprünglich verfügbaren NO-Menge durch Oxidation im Nährmedium verloren, die NO-Verfügbarkeit am Gefäßring selbst nimmt demzufolge ab. Bei langsamer freisetzenden NONOaten hingegen besteht eine höhere NO-Verfügbarkeit am Gefäß, da sich ein größerer Anteil pro Zeiteinheit unzersetzt im Organbad verteilen kann und damit mehr NO in unmittelbarer Nähe des Gefäßrings generiert wird und einen biologischen Effekt auslöst.

Eine deutlich geringere vasodilatorische Potenz besitzt die NONOat-Prodrug-Verbindung Et-PHEPIPERAZI/NO, sie bedarf einer vorausgehenden Bioaktivierung. Da Untersuchungen mit der NO-Sonde zeigten, dass eine einfache chemische Hydrolyse nicht stattfindet (Tabelle 2), ist eine enzymatische Abspaltung der Ethylgruppe durch

Esterasen erforderlich, dadurch geschwindigkeitsbestimmend und dürfte der Grund für die verminderte Vasoaktivität sein. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass bei der kumulativen Zugabe von Et-PHEPIERAZI/NO der initiale vasorelaxierende Effekt deutlich später (15 - 20 s) zu beobachten war als bei den direkten NONOaten. Zusätzlich stellte sich beim Prodrug bei jeder Teilkonzentration ein stabiles Zwischenplateau ein, während die Gefäßrelaxation bei den direkten NONOaten nach Erreichen eines kurzzeitigen Maximaleffekts vollständig und rasch reversibel war (siehe Kap. 5.3.).

Um zu prüfen, ob der gefäßrelaxierende Effekt der NONOate über die sGC vermittelt wird, wurden die Gefäßringe, wie in *Veröffentlichung 3* beschrieben, mit dem sensitiven sGC-Inhibitor ODQ (10 μM) vorinkubiert. ISONIPECO/NO zeigte eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, etwa um den Faktor 50 (*Abb. 12*). Damit wurde wie schon für die organischen Nitrate nachgewiesen, dass der vasorelaxierende Effekt der NONOate auf den in der Einleitung (*Kap. 1.2.2.*) vorgestellten sGC-vermittelten Mechanismus zurückzuführen ist.

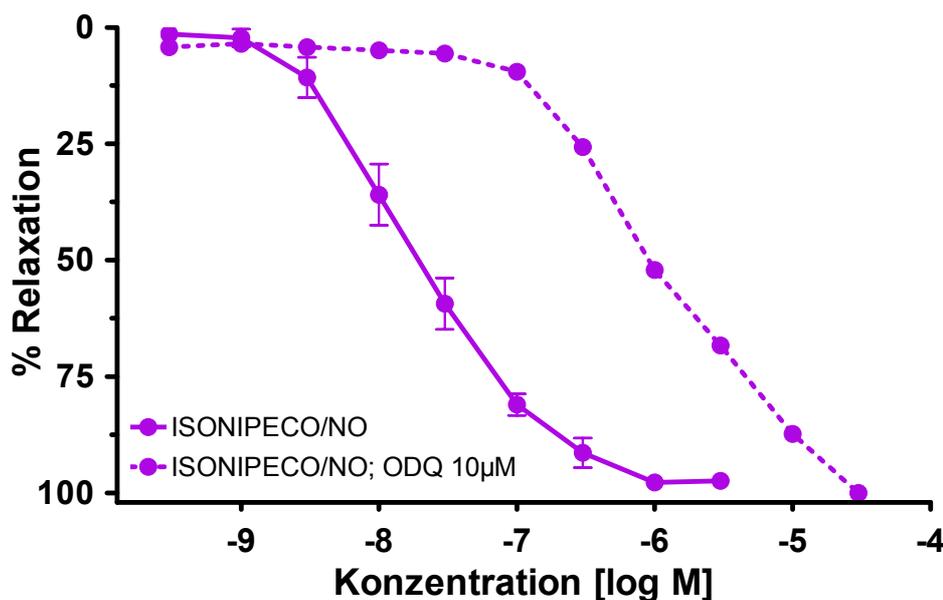


Abb. 12: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve des Diazeniumdiolats ISONIPECO/NO durch Inhibition der sGC mittels ODQ (10 μM , 30 min) an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. ISONIPECO - $EC_{50} = 2.06 \times 10^{-8}$; ISONIPECO + ODQ - $EC_{50} = 1.02 \times 10^{-6}$. Mittelwerte \pm SEM von 1-3 separaten Versuchen.

5.3. *In vitro* Wirkprofil von Nitraten, Nitriten und NONOaten

Aus Konzentrations-Wirkungskurven einer vasoaktiven Verbindung lassen sich pharmakologische Kenngrößen wie der EC_{50} -Wert ableiten, auch eine vergleichende Abschätzung der Wirkstärken verschiedener Verbindungen zueinander ist sehr einfach möglich. Hingegen ist aus diesen nicht ersichtlich, wie schnell der konzentrationsabhängige Effekt eintritt oder wie lange er anhält, da für jeweils eine Konzentration nur ein Messwert aufgenommen wird. Im Folgenden soll auf die bei der Untersuchung erhaltenen Meßkurven eingegangen werden, da sich diese Informationen daraus gut ablesen lassen.

Bei den direkt NO-freisetzenden NONOaten wurde in Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit des jeweiligen NONOats eine nahezu vollständig reversible Relaxation beobachtet, dieser Effekt trat ebenso bei den Nitrosothiolen wie SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin) auf. Selbst nach mehrmaliger Behandlung der Gefäßringe mit dem jeweiligen NONOat, in *Abb. 12* beispielhaft PHEPIPERAZI/NO, stellte sich nach dem Abklingen des Relaxationseffekts das durch $PGF_{2\alpha}$ induzierte Kontraktionsplateau umgehend wieder fast in voller Höhe ein.

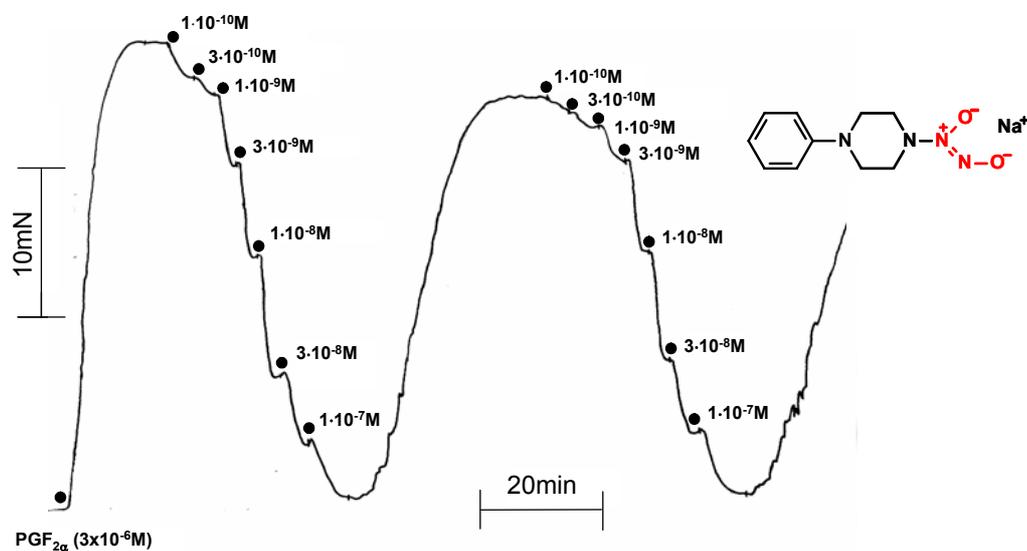


Abb. 13: Meßkurve für die wiederholte kumulative Gabe von PHEPIPERAZI/NO an $PGF_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Nach Erreichen einer vollständigen Gefäßrelaxation (100%) bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-7} M$ stellte sich innerhalb von etwa 20 min ein nahezu gleich hohes Kontraktionsplateau wie nach der ersten Gabe ein (reversible Relaxation). Die geringe Abflachung ist auf eine gewisse Eigenrelaxation zurückzuführen, wie sie auch bei Gefäßringen zu beobachten ist, die zur Kontrolle nur mit $PGF_{2\alpha}$ behandelt wurden. Die Gefäßringe sprechen nach mehrmaliger Behandlung mit dem Diazeniumdiolat ebenso sensibel auf die Verbindung an bei der erstmaligen Behandlung (keine *in vitro* Toleranz).

Diese Beobachtung verdeutlicht die relativ kurze NO-Verfügbarkeit aus dem NONOat am Gefäßring und die kurze Verweildauer an der sGC. Darüber hinaus waren die Gefäßringe nach der Erstbehandlung, wie in *Veröffentlichung 3* beschrieben, unverändert empfindlich gegenüber einer erneuten Behandlung mit dem NONOat selbst, aber auch dem endothelabhängigen Vasodilator Bradykinin gegenüber. Es trat also *in vitro* weder eine Toleranz (NONOat) noch eine endothelvermittelte Kreuztoleranz (Bradykinin, nicht abgebildet) auf. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass aufgrund der relativ hohen Freisetzungsgeschwindigkeit schon innerhalb der ersten Minuten der Inkubation (30 min) die NO-Freisetzung praktisch abgeschlossen und gebildetes NO aufgrund seiner Reaktivität nicht während der ganzen Inkubationsdauer verfügbar ist.

Bei den organischen Nitraten wurden ganz andere Meßkurven erhalten. Bis auf einen geringfügigen Reboundeffekt führten alle untersuchten Nitrate, unabhängig von der gewählten Konzentration, zu einer langanhaltenden und stabilen Gefäßrelaxation (*Abb. 13*). Dies belegt, dass die organischen Nitrate in der Nährlösung stabil sind und erst in den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer vasoaktiven Spezies (NO/NO_x) bioaktiviert werden. Im Organbad befinden sich also bei einer definierten Konzentration über einen langen Zeitraum annähernd gleichbleibend viele Moleküle des jeweiligen Nitrats, die in die Zellen nachdiffundieren können und über den vorgestellten Mechanismus (*Kap. 1.2.3.*) ein bestimmtes Maß an Relaxation aufrecht erhalten. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Lösungen der hergestellten Verdünnungsreihen aller geprüften Nitrate sehr stabil waren. Selbst nanomolare Verdünnungen, wie bei hochpotenten Nitraten erforderlich, riefen über eine Woche einen gleichbleibenden Relaxationseffekt hervor, unabhängig davon, ob diese in Plastik- und Glasgefäßen hergestellt und aufbewahrt wurden. Im Gegensatz zu den NONOaten ermöglicht dies eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen mit organischen Nitraten auch für biologische Langzeituntersuchungen (z.B.: mehrtägige Infusion per miniosmotischer Pumpe). Gleichzeitig belegen die Ergebnisse, vor allem bei den hochpotenten Vasodilatoren, die hohe Empfindlichkeit von Organbadmessungen für die Abschätzung der Stabilität solcher Verbindungen in Nährlösungen.

Darüber hinaus wurden auch Untersuchungen mit organischen Nitriten durchgeführt (3-Methylbutylnitrit, tert-Butylnitrit). Interessanterweise zeigten diese eine vollständige, den NONOaten ähnliche kurzanhaltende Relaxation, die vollständig reversibel war. Auffällig war bei der sich anschließenden Kontraktion der biphasische Verlauf, der auf zwei unterschiedliche zugrunde liegende Mechanismen zurückzuführen sein könnte (*Abb. 13*). Möglicherweise besitzen Nitrite oder viel mehr deren Abbauprodukte selbst eine

vasokontrahierende Komponente, die die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion zusätzlich überlagert. Es könnte spekuliert werden, dass diese Befunde auf eine im Vergleich zu den organischen Nitraten erhöhte Reaktivität gegenüber den zellulären Bestandteilen am Gefäßring hindeuten (Kap. 6.6.) und wie in der Einleitung (Kap. 1.2.3.) erwähnt ohne einen weiteren enzymvermittelten Redoxschritt spontan durch Umsetzung oder Stabilisierung beispielsweise zu Nitrosothiolen zur Wirkung kommen.

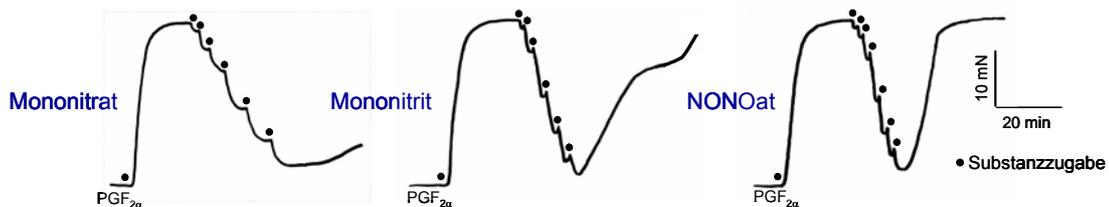


Abb. 14: Beispielhafte Darstellung der Meßkurven eines Mononitrats, -nitrits und NONOats an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Während beim Mononitrat eine langanhaltende und stabile Relaxation zu beobachten war, verlief diese bei den Nitriten und NONOaten kurzanhaltend und vollständig reversibel, dieser Effekt war bei den NONOaten noch deutlicher als bei den Nitriten ausgeprägt.

5.4. *In vitro* Kreuztoleranzentwicklung zwischen organischen Nitraten und Nitriten nach EC_{50} -Bolusgabe

In diesem Abschnitt wird der zeitliche Verlauf einer Relaxation von organischen Nitraten und Nitriten nach einer definierten Bolusgabe vergleichend betrachtet. Für die Versuchsdurchführung wurde eine Konzentration gewählt, die dem EC_{50} -Wert entsprach, also etwa eine halbmaximale Relaxation hervorrief, gemessen wurde der Zeitraum zwischen Probenzugabe und Einstellung des Maximaleffekts. Diese Messung wurde wiederholt, wobei die Bolusbehandlung zwischen Nitrat und Nitrit variiert wurde.

Erwartungsgemäß wurde die halbmaximale Relaxation am schnellsten erreicht bei den NONOaten (< 30 s, nicht abgebildet), gefolgt vom Nitrit (3-Methylbutylnitrit – 3-MBN; ca. 40 – 70 s). Bei den Nitraten (Nitratopropionsäuremethylester - NPME; > 120 s) stellte sich dieser Effekt am langsamsten ein (Abb. 15).

Interessante Befunde ergeben sich bei der wechselnden Wiederholung der EC_{50} -Bolusgaben. So wurde in der ersten Versuchsdurchführung nach Bolusgabe des Nitrats ins Organbad ein Bolus des Nitrits gegeben und letzteres nach Wiedereinstellung des Kontraktionsplateaus wiederholt (Abb. 15). Die Vorbehandlung des Nitrats hatte keinen

Einfluß auf die Wirksamkeit des Nitrits, welches ausgehend von der Relaxationshöhe des Nitrats seinerseits eine Relaxation von 72% bei der ersten und eine Relaxation von 65% bei der zweiten Behandlung hervorrief. Im Vergleich zur zweiten Versuchsdurchführung, bei der initial mit dem Nitrit behandelt wurde (55% Relaxation), wurde demnach durch die Vorbehandlung mit dem Nitrat die Gefäßwirkung des Nitrits sogar noch geringfügig verstärkt. Bei der zweiten Versuchsdurchführung wird der Relaxationseffekt des Nitrats durch die Vorbehandlung mit dem Nitrit deutlich abgeschwächt (25% Relaxation), zudem war die Zeitspanne zwischen Zugabe des Bolus' und Einstellung des Maximaleffekts länger (144 s) als bei nicht vorbehandelten Gefäßen (122 s).

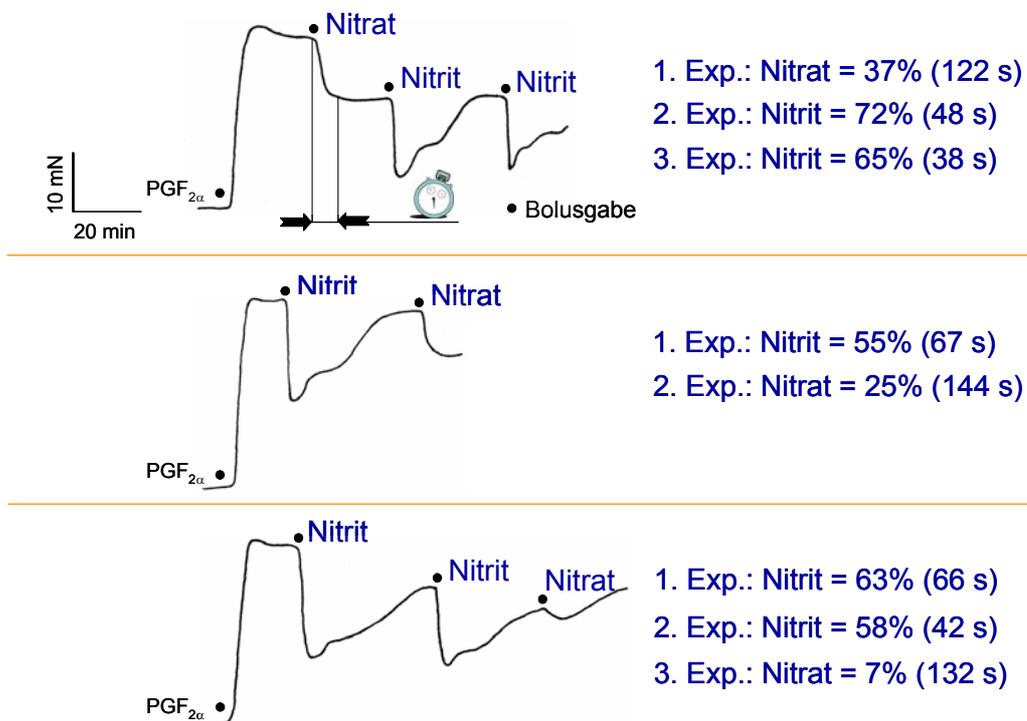


Abb. 15: Meßkurven für die wiederholte Bolusgabe der Mononitratverbindung Nitratopropionsäuremethylester (NPME) und der Mononitritverbindung 3-Methylbutylnitrit (3-MBN) an der Arteria pulmonalis vom Schwein mit intaktem Endothel. Die Konzentration des Bolus' entsprach einer Konzentration, die einen halbmaximalen Relaxationseffekt EC_{50} hervorrief (NPME = 1,1 μ M; 3-MBN = 18,8 μ M). Wie dargestellt, wurden 3 Versuchsdurchführungen gewählt: 1) Nitrat \rightarrow Nitrit \rightarrow Nitrit; 2) Nitrit \rightarrow Nitrat 3) Nitrit \rightarrow Nitrit \rightarrow Nitrat. Die Zugabe des jeweiligen Bolus erfolgte nach etwa konstanter Einstellung des Relaxationsplateaus (ca. 20-40 min).

Noch deutlicher wird dies bei der dritten Versuchsdurchführung, bei der die Gefäßringe zweimal mit dem Nitrit vorbehandelt wurden. Die dann folgende Nitratbolusgabe bewirkte dabei nur eine geringe Relaxation von 7%, die Relaxation wurde außerdem unmittelbar von einer Kontraktion kompensiert, so dass die Zeitspanne sogar etwas geringer war als bei der Versuchsdurchführung 2 (132 s). Aus dem Vergleich der zeitlichen Verläufe läßt

sich ableiten, dass bei der Wirkung der Nitrate der geschwindigkeitsbestimmende Schritt offensichtlich die vorausgehende Bioaktivierung ist. Die Beobachtungen bei der wiederholten Bolusgabe geben einen Hinweis darauf, dass möglicherweise dem Nitrit als reaktive Spezies eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Nitrattoleranz zukommen könnte (*Kap. 6.4.*).

Interessant ist außerdem, dass weder bei Vorbehandlung mit dem Nitrat noch mit Nitrit eine Abschwächung der Nitritrelaxation zu beobachten war. Das bedeutet, dass obwohl offensichtlich die Nitratwirkung durch Nitrit abgeschwächt wird, möglicherweise durch Schädigung der bioaktivierenden Enzyme, die nitriteigene Ansprechbarkeit nicht beeinträchtigt wird. Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, dass die Nitritwirkung möglicherweise nicht durch einen weiteren enzymabhängigen Redoxschritt vermittelt wird, wie bereits im vorhergehenden Kapitel postuliert. Übereinstimmende Ergebnisse wurden ebenso mit Glyceryltrinitrat (GTN) und 3-MBN erhalten.

5.5. Vasodilatorische Eigenschaften von NSAID-Nitrat-Hybridmolekülen

Die bioaktiven Metaboliten vom PETN (PEtriN, PEdiN, PEmoN) eignen sich neben der Untersuchung des Einflusses der Nitratgruppenanzahl auf die vasodilatorische Potenz (*Kap. 5.1.*) auch hervorragend als Synthone für NSAID-Nitrat-Hybridmoleküle (NSAID: non steroidal anti inflammatory drugs). Durch die unterschiedliche Anzahl von Nitrat- und freien Hydroxygruppen lässt sich das Verhältnis NSAID:Nitratgruppen von 3:1 bis 1:3 gezielt variieren (*Abb. 16*). Die NSAIDs Flurbiprofen und Indomethacin wurden nach Aktivierung mit Carbodiimidazol (CDI) mit dem jeweiligen PETN-Metaboliten in verschiedenen molaren Verhältnissen in THF oder Acetonitril umgesetzt. Die PETN-Metaboliten ihrerseits wurden durch reduktiven Abbau von PETN mittels Hydrazinhydrat (PEtriN, PEdiN) oder durch Umsetzung von AgNO_3 mit dem entsprechenden korrespondierenden Bromderivat (PEmoN) erhalten.

Diese neuartigen Hybridverbindungen können als gastroprotektive, antiinflammatorische Arzneistoffe oder als potentielle Mittel bei der Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung angesehen werden und sollten in diesem Zusammenhang auf vasoaktive Eigenschaften geprüft werden. Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Frau Apothekerin Lange aus der eigenen Arbeitsgruppe, die den synthetischen Teil des Projekts bearbeitete.

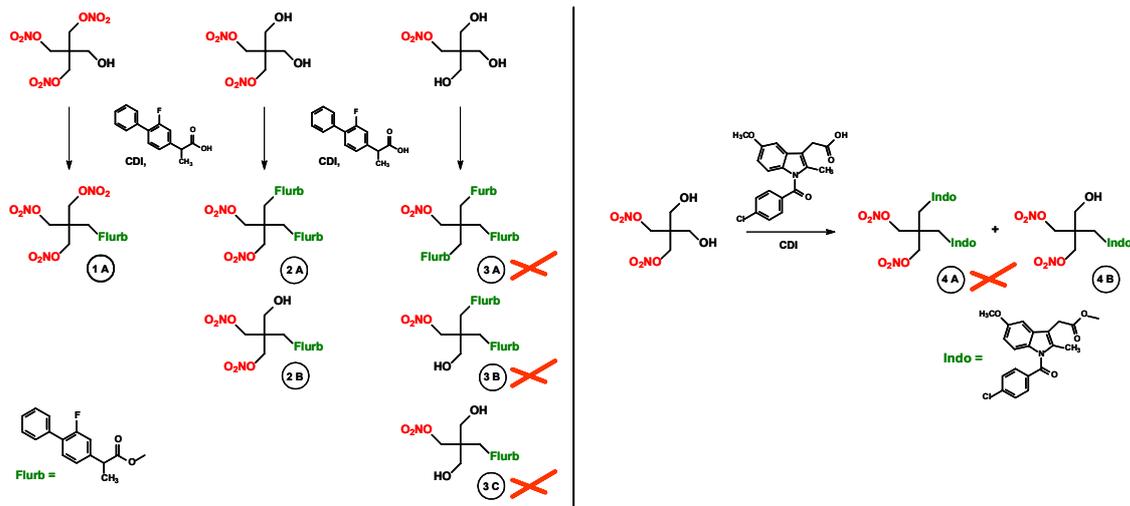


Abb. 16: Im linken Teil NSAID-Nitrat-Hybridverbindungen (1A-3C) bestehend aus den PETN-Metaboliten PEtriN, PEdiN, PEmoN und Flurbiprofen in wechselnden Verhältnissen NSAID/Nitratgruppen von 3:1 (3A) bis 1:3 (1A). Im rechten Teil der Abbildung NSAID-Nitrat-Hybridverbindungen (4A, 4B) aus PEdiN und Indomethacin im Verhältnis NSAID/Nitratgruppen 2:2 (4A) und 1:2 (4B). Für die Verbindungen 3A, 3B, 3C und 4A (rotes Kreuz) konnten aufgrund unzureichender Löslichkeit in der Nährlösung des Organbads keine Messwerte für die *in vitro* Vasoaktivität ermittelt werden.

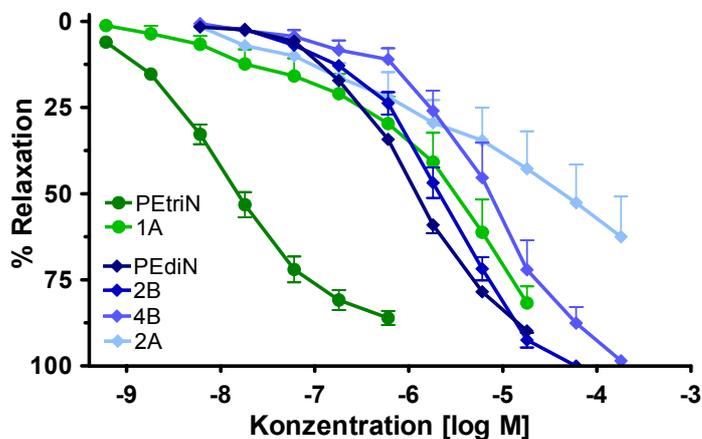
Das einzige Trinitrathybrid 1A rief im Vergleich zu PEtriN einen um mehr als einhundertfach schwächeren vasorelaxierenden Effekt hervor und war damit sogar schwächer wirksam als PEdiN (Abb. 17, Tabelle 3).

In der Gruppe der Hybridverbindungen mit zwei Nitratgruppen war insgesamt ebenso eine abgeschwächte Gefäßwirkung gegenüber PEdiN zu beobachten, der Abfall war weniger stark ausgeprägt war als beim Trinitrat. Allerdings konnten bei den Dinitraten nur für zwei der vier Verbindungen befriedigende Messwerte ermittelt werden. Während bei den Konzentrationswirkungskurven von 2B und 4B ein deutlicher sigmoidaler Kurvenverlauf zu beobachten war, ergab sich für 2A mehr ein linearer Relaxationsverlauf, der im Allgemeinen durch unspezifische Gefäßeffekte hervorgerufen wird. Keine Ergebnisse konnten für die Dinitrathybridverbindung 4A und die 3 Mononitrate 3A-C ermittelt werden, da diese zwar in der Verdünnungsreihe mittels DMSO in Lösung gebracht wurden, aber aufgrund deren geringen Wasserlöslichkeit in der Nährlösung des Organbads unmittelbar nach der Zugabe wieder ausfielen.

Die vasodilatorische Potenz der NSAID-Nitrat-Hybridverbindungen wird demnach hauptsächlich vom Hybridisierungsgrad, von der Anzahl freier Hydroxylgruppen und nur untergeordnet von der Nitratgruppenanzahl bestimmt. Beim Vergleich 2A/2B wird deutlich, dass bei 2A aufgrund des zusätzlichen sterisch anspruchsvollen Flurbiprofen-Rests ein dramatischer Verlust der Wirkaktivität erfolgte. Beim Vergleich 1A/2B ist ersichtlich, dass

trotz einer verminderten Nitratgruppe bei der Verbindung 2B dessen Wirkaktivität geringfügig stärker war als bei 1A mit drei Nitratgruppen bei jeweils gleicher Anzahl Flurbiprofenmoleküle. Demzufolge tritt der Einfluß der Anzahl der Nitratgruppen einer Verbindung auf die Gefäßwirkung bei diesen Hybriden in den Hintergrund. Der starke Wirkungsverlust bei 1A ist vermutlich auf die Abnahme oder den Verlust der Affinität an der ALDH-2 zurück zu führen und ist bedingt durch die sterische Hinderung der Flurbiprofengruppe (Kap. 1.2.3.). Interessanterweise befinden sich die Aktivitäten der drei meßrelevanten Verbindungen (1A, 2B, 4B) trotz unterschiedlicher Nitratgruppenanzahl und Hybridisierungsgrad in einer engen Bandbreite von 4 bis 11 μM .

Flurbiprofen selbst zeigte einen zu vernachlässigenden Eigenrelaxationseffekt, der mit dem der entsprechenden DMSO-Kontrollösung vergleichbar war. Jedoch wurde beobachtet, daß bei der kombinierten Gabe der Einzelverbindungen (Flurbiprofen und PEtriN) mittels Vorinkubation von Flurbiprofen (1×10^{-4} M, 30 min) und anschließender Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve von PEtriN eine leichte Linksverschiebung auftrat ($\text{EC}_{50} = 1,3 \times 10^{-8}$ M) im Vergleich zur PEtriN-Kontrollkurve ($\text{EC}_{50} = 3,0 \times 10^{-8}$ M) (nicht abgebildet). Flurbiprofen sensibilisiert demnach die Gefäßringe für eine Nitrat-induzierte Relaxation!



Verbindung	EC_{50} [μM]
1A	4,1
2B	3,3
4B	10,7
2A	65,0

Abb. 17; Tabelle 3: Konzentrations-Wirkungskurven vom NSAID-Nitrat-Hybrid 1A mit 3 Nitratgruppen sowie den NSAID-Nitrat-Hybriden 2B, 4B, 2A mit zwei Nitratgruppen zu PEtriN und PEdiN. Mittelwerte \pm SEM; $n = 3-4$.

5.6. Methoden zum Nachweis einer *in vitro* Nitrattoleranz

In der *Veröffentlichung 3* wurden vergleichende Untersuchungen zur *in vitro* Nitrattoleranz vorgestellt. Im Vorfeld dazu wurde eine Versuchsmethode zur Induktion einer Toleranz entwickelt, die erstmals die jeweilige Wirkstärke eines organischen Nitrats berücksichtigt. In früheren Arbeiten wurde im Allgemeinen Bolusgaben gleicher molarer Dosierung gewählt, obwohl beispielsweise GTN mehr als zehnfach stärker wirksam als ISDN und fast tausendfach stärker als ISMN ist. Um dies bei der Erzeugung der *in vitro*-Toleranz zu berücksichtigen, wurden bei der wiederholten Nitratgabe im ersten Versuchsdurchgang die Gefäßringe bis zum Erreichen einer submaximalen (EC_{90}) oder maximalen Relaxation (EC_{100}) mit dem entsprechenden Nitrat behandelt. Nach einer gleichbleibenden Inkubationszeit (30 min) und Auswaschphase (45 min) wurde erneut eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen (*Abb. 18*). Zum Vergleich wurde außerdem wie gewohnt eine Toleranz mit einem Bolus gleicher Dosierung (300 μ M) hervorgerufen.

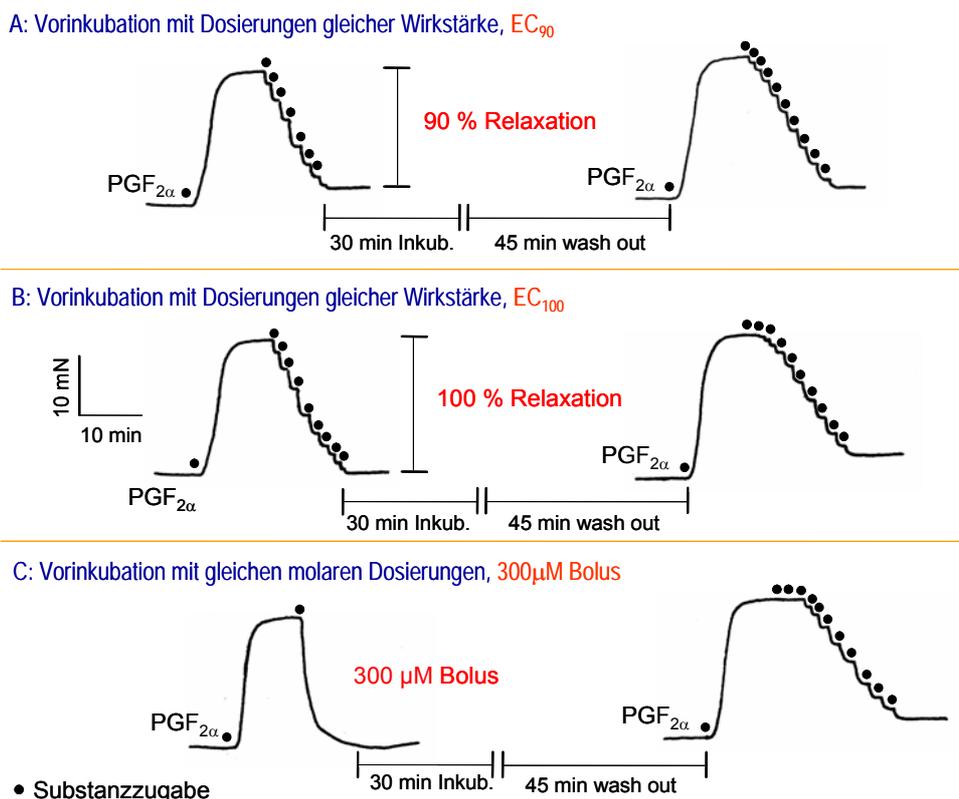


Abb. 18: Methoden zur Erzeugung einer in vitro Nitrattoleranz an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Dargestellt sind die aufgenommenen Meßkurven, in der Versuchsdurchführung A und B wurde mit Dosierungen gleicher Wirkstärke eine Toleranz erzeugt, bei C mit einem Bolus gleicher molarer Dosierung.

Aus der Abb. 19 geht beispielhaft für GTN hervor, dass sich die Stärke der *in vitro* Toleranz mit den unterschiedlichen Versuchsmethoden variieren ließ. Demnach ist das Ausmaß der Wirkungsabschwächung abhängig von der gewählten Konzentration, mit der die Gefäße vorbehandelt wurden (EC_{90} , EC_{100} , $300 \mu\text{M}$) und von der Inkubationszeit. Mit zunehmender Inkubationszeit (10 - 60 min) verstärkt sich die *in vitro* Toleranz drastisch (nicht abgebildet). Für die vergleichenden Nitrat-Toleranzstudien erwies sich eine Zeitspanne von 30 min als optimal. Unterhalb dieser Inkubationszeit war bei den toleranzinduzierenden Nitraten die Wirkungsabschwächung weniger deutlich ausgeprägt und teilweise nicht signifikant, bei einer höheren Zeitspanne wurden die Gefäßringe häufig so irreversibel durch das Nitrat geschädigt, dass keine erneute Vorkontraktion mehr möglich war.

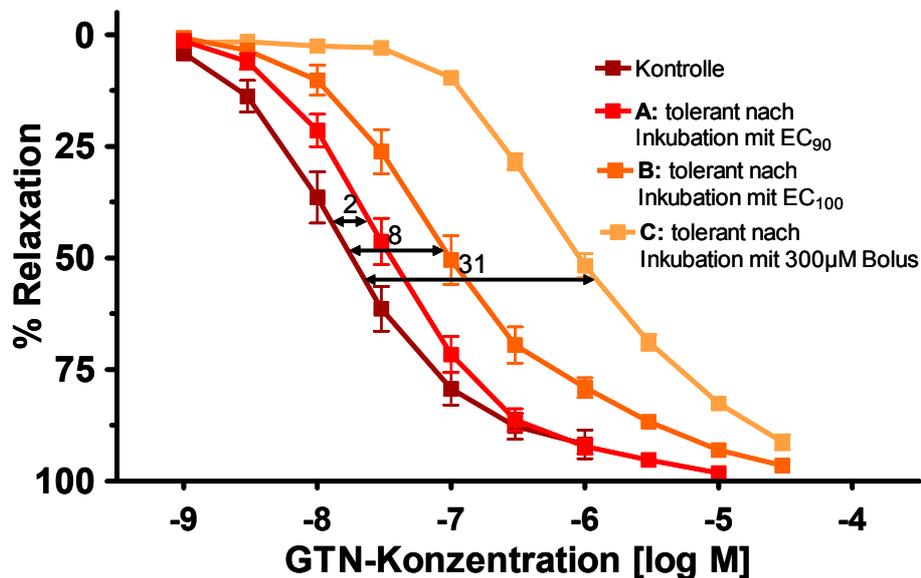


Abb. 19: *In vitro* Toleranz für GTN an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Das Ausmaß der Abschwächung der Nitratwirkung nach wiederholter Gabe kann gut gesteuert werden durch die jeweilige Vorbehandlung der Gefäßringe (Methode A, B, C). Die Faktoren sind der Quotient der EC_{50} -Werte toleranter Gefäßringe zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von 4-8 separaten Versuchen.

5.7. Untersuchungen zur Kreuztoleranzentwicklung GTN vs. 1,2-GDN

Im Allgemeinen wurden Toleranzinduktion und die darauf folgende Relaxationsmessung mit dem selben Nitrat vorgenommen. Ergänzend wurde beispielhaft mit ausgewählten Nitraten auf sich gegenseitig bedingende Toleranzeffekte zueinander geprüft, um mögliche Kreuztoleranzphänomene zu erkennen. Es wurde speziell geprüft, ob für den GTN-Hauptmetaboliten 1,2-GDN eine gegenseitige Kreuztoleranz zu GTN zu beobachten

ist. Außerdem wurde untersucht, ob sich ähnlich den PETN-Metaboliten, auch für 1,2-GDN eine verminderte Toleranzbildung im Vergleich zu GTN nachweisen läßt. Es wurde die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Versuchsdurchführung B verwendet, bei der die Gefäßringe im Vorversuch maximal relaxiert werden (EC_{100}).

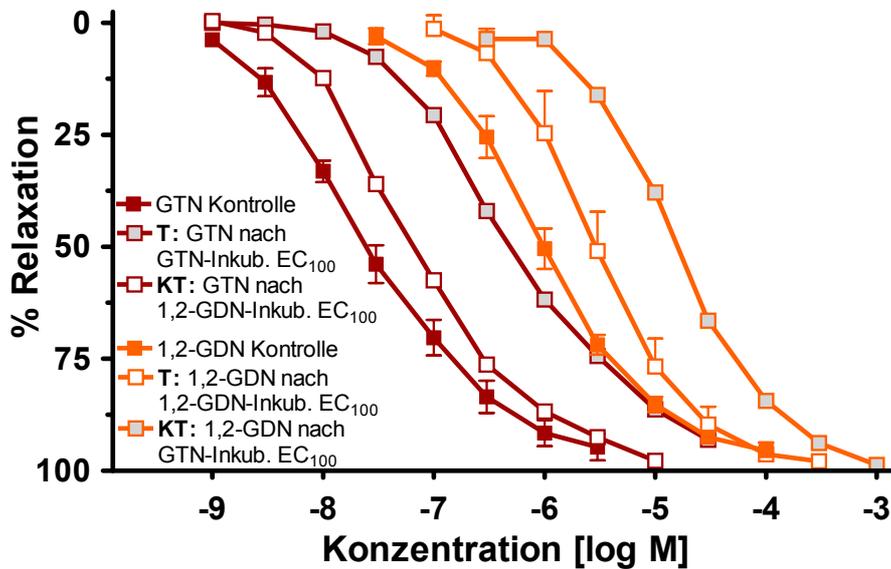


Abb. 20: *In vitro* Toleranz für 1,2-GDN und GTN an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel. Die Gefäße wurden im Vorversuch maximal mit GTN oder 1,2-GDN vorrelaxiert (EC_{100}), im zweiten Versuchsdurchgang wurden die Gefäßringe mit demselben Nitrat (T) oder dem jeweils anderen (KT) relaxiert. Mittelwerte \pm SEM von 1-3 separaten Versuchen.

Dabei zeigte sich, dass die mit 1,2-GDN vorbehandelten Gefäßringe bei der wiederholten 1,2-GDN-Gabe wie bei anderen Dinitraten (ISDN, PEdiN) geringfügig tolerant waren (Abb. 20, T). Wurden die Gefäße mit GTN vorbehandelt, trat eine sehr viel deutlichere Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve bei der folgenden 1,2-GDN Behandlung im Vergleich zur Kontrolle auf (KT). Es wurde demnach klar eine Kreuztoleranz für GTN \rightarrow 1,2-GDN nachgewiesen. Für GTN wiederum ergab sich ein umgekehrtes Bild, die 1,2-GDN-Vorbehandlung führte nicht zu einer Kreuztoleranz sondern nur zu einer leichten Abschwächung der GTN-Aktivität (KT). GTN selbst erzeugte wie bereits beschrieben eine ausgeprägte Eigentoleranz (T).

Aus der Abbildung geht zugleich hervor, dass das Ausmaß der Abschwächung bei identischer Vorbehandlung bei GTN und 1,2-GDN etwa gleich stark ausgeprägt ist (GTN-Inkubation: Faktor 10-15; GDN-Inkubation: Faktor 2-3). Die GTN-Vorbehandlung führte *in vitro* in jedem Fall Toleranz, während 1,2-GDN jeweils nur sehr geringe Toleranz induzierte.

5.8. 2-Aminoethylnitrat: *in vitro* Toleranzuntersuchungen

In *Veröffentlichung 4* wird deutlich, dass das Nitrat-Trägermolekül erhebliche wirkungsmodulierende Eigenschaften besitzt und ein Mononitrat, wie das 2-Aminoethylnitrat (AEN), die Wirksamkeit des GTN erreichen kann. Daher wurde geprüft, ob das hochpotente Mononitrat AEN wie andere niedrigpotente Mononitrate (ISMN, PEmoN) keine oder wie das hochpotente Trinitrat GTN eine *in vitro* Toleranz induziert (*Veröffentlichung 3*). Zusätzlich wurde ebenso wie im vorhergehenden Abschnitt untersucht, ob eine Kreuztoleranz gegenüber GTN auftritt.

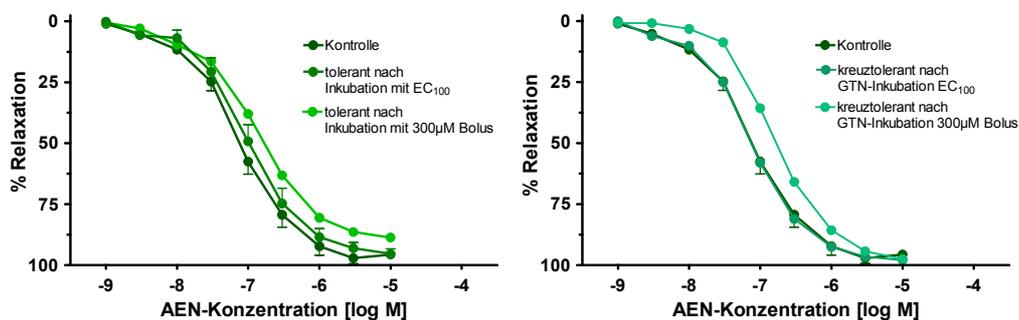


Abb. 21: Untersuchungen zur *in vitro* Eigentoleranz von 2-Aminoethylnitrat (AEN, links) und *in vitro*-Kreuztoleranz gegenüber GTN (rechts) an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein. Mittelwerte \pm SEM, 1-3.

In allen Versuchsdurchführungen (EC₁₀₀ und 300µM Bolus) wurde bei AEN keine bzw. eine unbedeutende Wirkungsabnahme nach wiederholter Gabe beobachtet, die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve bei der Bolusgabe war gering (Faktor 2). Gleiche Befunde ergaben sich für die Kreuztoleranz mit GTN, erstaunlicherweise rief GTN offensichtlich keinen Aktivitätsverlust für die Relaxation von AEN hervor, GTN induziert also keine *in vitro* Toleranz gegenüber AEN. Die erhaltenen Konzentrationswirkungskurven für die Kreuztoleranz mit GTN und denen der Eigentoleranz von AEN waren nahezu identisch (Abb. 21).

Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass trotz equipotenter Wirkaktivität beider Nitrate diese unterschiedlich und unabhängig voneinander bioaktiviert werden und sich nicht gegenseitig in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigen. Somit muß eine starke Vasoaktivität nicht zwangsläufig auch zu einer *in vitro* Toleranz wie bei GTN oder PETN führen. Aktivität und Toleranzinduktion sind also unabhängig voneinander zu betrachten, jedoch beide werden durch strukturelle Parameter des jeweiligen Vasodilators bestimmt. Vorab gilt: Toleranz-Induktion korreliert eher mit der Nitratgruppenanzahl und weniger mit der Wirkstärke.

5.9. 2-Aminoethylnitrat: Bioaktivierung über ALDH-2?

Wie in der Einleitung dargestellt, konnten *Chen et al.* erstmals belegen, dass an Aortenringen von ALDH-2-defizienten (ALDH-2^{-/-}) Mäusen die GTN-induzierte Relaxation signifikant gegenüber der Wildtypkontrolle vermindert war. Keine Verschlechterung der Relaxation beobachteten sie hingegen bei ISDN und Nitroprussid-Natrium.¹¹⁰ *Wenzel et al.* erweiterten die Untersuchungen an ALDH-2^{-/-}-Mäusen und prüften neben GTN auch dessen Metabolit 1,3-GDN sowie PETN und dessen 3 Metaboliten (PEtriN, PEdiN, PEmoN).¹²⁶ Aus den überraschenden Ergebnissen wurde geschlußfolgert, dass lediglich die hochpotenten Nitrate PETN, PEtriN und GTN durch die ALDH-2 bioaktiviert werden, nicht aber weniger aktive Nitrate wie ISDN, ISMN, PEdiN und PEmoN (*Kap. 1.2.3.*). Nach dieser These besitzt demnach die ALDH-2 eine spezifische Affinität nur für Tetra- und Trinitrate, nicht aber für Di- und Mononitrate. In Kooperation mit *Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Daiber vom Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*, sollte geklärt werden, ob die hochpotente Mononitratverbindung AEN im Gegensatz zu ISMN und PEmoN über die ALDH-2 bioaktiviert wird. Für diese Untersuchungen verwendeten *Daiber u. Mitarb.* etwa 8 Wochen alte ALDH-2^{-/-} Mäuse und vergleichbare C57B6 Wildtypmäuse. Für detaillierte Angaben bezüglich Erzeugung von ALDH-2 Nullmutanten, Tierhaltung, Betäubung und Gefäßpräparation sei auf die Literatur verwiesen.^{126,127}

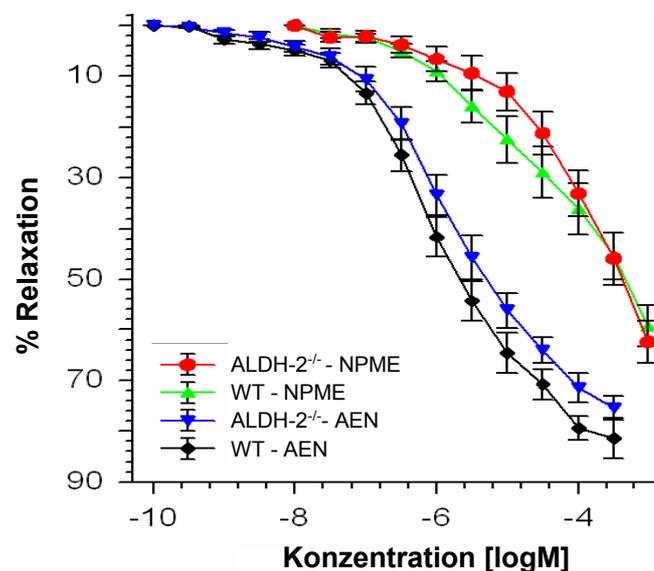


Abb. 22: Konzentrations-Wirkungskurven von 2-Aminoethylnitrat (AEN) und 3-Nitratopropionsäuremethylester (NPME) an PGF_{2α} (3 µM)-vorkontrahierten Aortenringen von C57B6 (Wildtyp, WT) und ALDH-2 defizienten (ALDH-2^{-/-}) Mäusen mit intaktem Endothel. Mittelwerte ± SEM von 16-20 separaten Versuchen.

In diesen Untersuchungen zeigte sich zunächst, dass AEN an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten, murinen Aortenringen generell schwächer gefäßwirksam (EC_{50} : ca. $1 \mu\text{M}$) war als an den Pulmonalarterien vom Schwein. Dieser Effekt ist jedoch bei allen anderen Nitraten ebenso zu beobachten, was auf eine allgemein geringere Empfindlichkeit der Mäuseaorten gegenüber organischen Nitraten hindeutet. Darüber hinaus zeigte keine der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven eine vollständige Relaxation von 100 %, bezogen auf die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Vorkontraktion stellte sich ein Maximaleffekt bei 70-80 % ein.

Eine AEN-Behandlung der $\text{ALDH-2}^{-/-}$ -Aortenringe führte nicht zu einer wirklich signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve gegenüber der Wildtyp-Kontrolle, nur eine leichte Wirkungsabnahme war zu beobachten (Abb. 21). Bei dem wirkungsschwächeren Mononitrat 3-Nitratopropionsäuremethylester (NPME) fiel die Rechtsverschiebung noch geringer aus. Beide Nitrate werden also nicht signifikant über die ALDH-2 bioaktiviert, obwohl AEN zu den Nitraten mit hoher Gefäßrelaxation zu zählen ist. Dies deutet erneut darauf hin, dass GTN und AEN zumindest bei niedrigen Konzentrationen trotz ähnlicher Wirkpotenz unterschiedlich bioaktiviert werden.

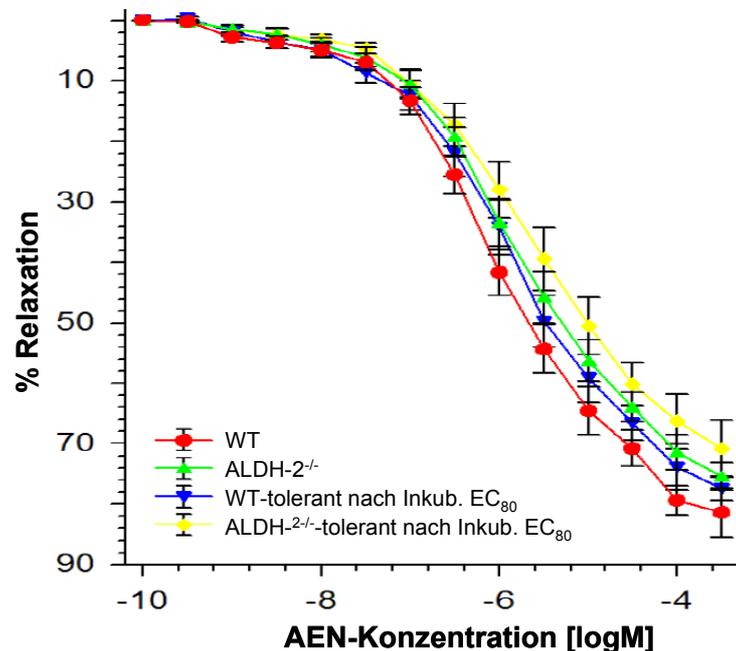


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungskurven von 2-Aminoethylnitrat (AEN) an $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$)-vorkontrahierten Aortenringen von C57B6 (Wildtyp, WT) und $\text{ALDH-2}^{-/-}$ Mäusen mit intaktem Endothel. Eine *in vitro*-Toleranz wurde erzeugt, indem die Gefäßringe bei der 1. Behandlung maximal relaxiert (ca. 80 %) und 5 min inkubiert wurden, Auswaschphase 3×15 min. Mittelwerte \pm SEM von 16-20 separaten Versuchen.

Weiterhin wurden *in vitro*-Toleranzuntersuchungen an den murinen Aortenringen vorgenommen, bei denen, wie im vorhergehenden Abschnitt vorgestellt, die Gefäßringe bei der Vorbehandlung maximal relaxiert wurden (ca. EC₈₀). Es sollte dabei geprüft werden, ob und inwieweit bei Aortenringen von ALDH-2^{-/-}-Mäusen eine Toleranzausbildung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten ist.

In Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen an den Pulmonalarterien vom Schwein trat beim Wildtyp lediglich eine geringe Wirkungsabschwächung bei der zweiten Behandlung der Gefäßringe mit AEN auf (Abb. 23). Gleichartiges zeigte sich bei den ALDH2^{-/-}-Aortenringen, die Rechtsverschiebung der KW war zwar geringfügig stärker als beim Wildtyp, allerdings nicht signifikant. Trotz der hohen Wirkpotenz war eine *in vitro*-Toleranz folglich weder bei Aortenringen von Wildtyp- als auch von ALDH-2^{-/-}-Mäusen zu beobachten. Diese Befunde unterstützen die These, dass zumindest initial die Toleranzausbildung bei organischen Nitraten entscheidend mit der Bioaktivierung über die ALDH-2 im Zusammenhang steht. Da AEN scheinbar keine Affinität gegenüber der ALDH-2 besitzt, bleibt eine *in vitro*-Toleranzausbildung weitgehend aus. Inwieweit diese interessanten Ergebnisse für AEN auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, wird derzeit bei Langzeituntersuchungen an Mäusen durch Applikation mit miniosmotischer Pumpe geprüft.

Es kann aber bereits geschlussfolgert werden, dass die Fähigkeit eines Nitrats zur Toleranzausbildung bei *in vitro*-Gabe hauptsächlich von der Affinität des jeweiligen Nitrats zur ALDH-2 und nicht von dessen vasodilatorischer Aktivität abhängt. In aktuellen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe wurde zudem gezeigt, dass ebenso schwachwirksame Trinitrate existieren, die eine Affinität zur ALDH-2 besitzen und darüber hinaus starke Toleranz erzeugen (*Daten Roegler*, nicht abgebildet).

5.10. Untersuchung zur Bildung von ROS-Spezies bei einigen ausgewählten Mononitraten im Vergleich zu GTN

Insbesondere für GTN wird immer wieder ein Zusammenhang zwischen Nitrattoleranz und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) formuliert (*Kap. 1.3.2.*). Einerseits wird im Zuge der Bioaktivierung wirkungbestimmendes NO/NO_x freigesetzt, andererseits werden die vaskulären Superoxidspiegel beispielsweise durch Wechselwirkung der Nitrate mit der mitochondrialen Atmungskette oder NAD(P)H-Oxidasen erhöht.^{128,129} Durch die gleichzeitige Freisetzung dieser beiden Spezies entsteht unmittelbar Peroxynitrit,

welches seinerseits durch radikalische Reaktionen eine Inaktivierung zahlreicher für die Wirkung von Nitraten essentieller Enzyme hervorruft.

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass es sich offenbar bei AEN um ein hochpotentes Nitrat ohne unerwünschte Toleranzbildung handelt. Zur weiteren Aufklärung dieses Phänomens sollte untersucht werden, ob im Kontext dazu ebenso eine ROS-Bildung unter AEN-Gabe ausbleibt. Diese Experimente wurden ebenso in Kooperation von *Andreas Daiber am Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* vorgenommen.

Für eine schnelle und sensitive Detektion der ROS sind Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-basierte Assays am verbreitetsten, wobei je nach zu detektierender Radikalspezies mit einer Vielzahl von Farbstoffen mit jeweils deutlich unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität gearbeitet wird. Ein sehr verbreiteter Chemilumineszenz Farbstoff ist Luminol und dessen Analogon L-012 (8-Amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dion-Natrium), mit dem in diesen Untersuchungen gearbeitet wurde. Aufgrund seiner vergleichsweise geringen Spezifität läßt sich mit L-012 der gesamte oxidative Streßstatus erfassen. Insbesondere hat sich L-012 für die Detektion von mitochondrialem Superoxid und Peroxynitrit bewährt, da beide gleichermaßen gut detektiert werden, während die Sensitivität für Wasserstoffperoxid gering ist.¹²⁹ Für die Untersuchungen wurden Herzen von unbehandelten ALDH-2^{-/-}- und vergleichbaren C57B6 Wildtypmäusen verwendet und mittels Homogenisierung sowie fraktionierter Zentrifugation zu einer mitochondrialen Stammlösung bzw. -suspension mit einer finalen Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) aufgearbeitet. Zur Quantifizierung der ROS wurde die mitochondriale Stammlösung zu Beginn der Messung mit jeweils 10 und 1000 µM der Mononitrate AEN, NPME und IPN (Isopropylnitrat) sowie als Vergleich mit 100 µM GTN direkt inkubiert. Im Anschluß wurde die Lösung mit L-012 (100 µM) sowie Na-succinat (4 mM), einem Complex II-Substrat der mitochondrialen Atmungskette, versetzt und somit die Messung gestartet. Die beim Zerfall des Farbstoffs auftretende Lichtemission (Chemilumineszenz) wurde über 5 min mit dem Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) aufgezeichnet, die Meßsignale werden als Counts (Anzahl) pro halber Minute dargestellt.¹²¹

„Passend“ zu den *in vitro*-Toleranzuntersuchungen führte eine akute Gabe von AEN sowohl bei der ALDH-2^{-/-}- als auch WT-Gruppe nicht zur Erhöhung des mitochondrialen Stresses. Es war sogar selbst bei der unphysiologisch hohen Konzentration 1000 µM eine Abnahme gegenüber der basalen ROS-Spiegel (Kontrolle) zu beobachten (*Abb. 24*). Dies

deutet daraufhin, dass AEN den natürlichen ROS-Spiegel, wie in der Kontrollgruppe zu beobachten, sogar absenkt, die Verbindung also eventuell antioxidative Eigenschaften besitzt. Diese Befunde bedürfen weitergehender Untersuchungen.

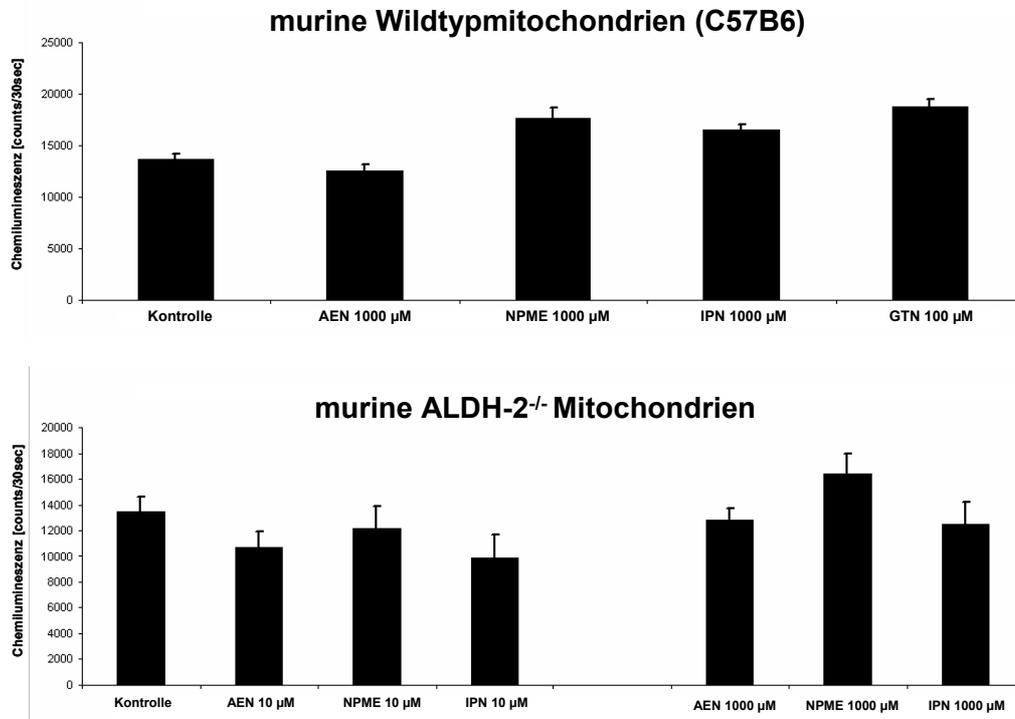


Abb. 24: Effekte einer *in vitro*-Behandlung mit AEN (2-Aminoethylnitrat), NPME (2-Nitratopropionsäuremethylester), IPN (Isopropylnitrat) und GTN an isolierten Herzmitochondrien von Wildtyp (C57B6) und ALDH-2^{-/-}-Mäusen. Die mitochondriale ROS-Bildung wurde anhand der L-012 (100 μ M/counts) Chemilumineszenz gemessen. Mittelwerte \pm SEM von 4-24 separaten Versuchen.

Im Allgemeinen ließen sich - abgesehen von geringen Schwankungen bei IPN - bei den untersuchten Mononitraten keine beträchtlichen Unterschiede hinsichtlich der ROS-Bildung zwischen der ALDH-2^{-/-}- und WT-Gruppe beobachten. Diese Ergebnisse deuten erneut daraufhin, dass die Mononitrate unabhängig von ihrer teilweise sehr unterschiedlichen Wirkpotenz keine oder nur sehr geringe Affinität zur ALDH-2 aufweisen. Auffällig war die bei hohen Konzentrationen signifikant erhöhte ROS-Bildung nach NPME-Behandlung, einem mittelpotenten Nitrat. Auch eine IPN-Behandlung führte in der WT-Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung der ROS-Spiegel gegenüber der Kontrolle, obwohl IPN das schwächste Mononitrat aus *Veröffentlichung 4* ist. Keines der Nitrats rief allerdings eine stärkere ROS-Bildung hervor als GTN, obwohl wie bereits erwähnt GTN und AEN in etwa vasodilatatorisch equipotent sind (für GTN nur WT dargestellt). Daraus läßt sich schließen, dass keine Korrelation besteht zwischen vasodilatatorischer Potenz eines Nitrats und dessen Fähigkeit, oxidativen Streß zu induzieren.

6. Diskussion

Auf der Suche nach potentiellen Sprengstoffen wurden Mitte des 19. Jahrhunderts erstmals organische Nitrate synthetisiert. Entgegen der eigentlichen Bestimmung als Sprengstoff erlangte dabei speziell GTN im Sinne des Serendipity-Prinzips rasch einen bedeutenden therapeutischen Stellenwert bei der Behandlung pektaginöser Beschwerden, der bemerkenswerterweise bis zur Gegenwart besteht. GTN ist nicht nur der erste Vertreter der Arzneistoffklasse der organischen Nitrate sondern der erste synthetisch-definierte Arzneistoff überhaupt. Dessen chemische Struktur, Synthese, technologische Verarbeitung sowie die therapeutische Anwendung waren bereits Ende des 19. Jahrhunderts gut bekannt.¹⁷

Bis heute wurde diese Arzneistoffklasse nur um 3 weitere therapeutisch genutzte Vertreter bereichert, obwohl organische Nitrate häufig angewendet werden und relativ einfach darstellbar sind. Im Vergleich zu anderen verbreiteten Wirkstoffklassen, wie z.B. den β -Blockern, mit zahlreichen, strukturell sehr ähnlichen Vertretern ist dies erstaunlich. Ein Grund besteht im unverhältnismäßig hohem Kostenaufwand bezüglich Entwicklung und Zulassung neuer organischer Nitrate in Relation zum erwarteten begrenzten Vorteil gegenüber den günstigen, etablierten Nitraten. Zum anderen festigte sich in den Achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts bereits die Auffassung, dass für die Wirkung von Nitrovasodilatoren einzig die Anwesenheit der NO produzierenden oder NO imitierenden Nitratgruppe entscheidend ist. Dem die Nitratgruppe tragenden Restmolekül wurde kaum Aufmerksamkeit gewidmet. Nach dieser Vorstellung waren daher bei verschiedenen Nitraten keine dramatischen Unterschiede hinsichtlich der vasodilatorischen Aktivität oder des therapeutischen Nutzens zu erwarten.

Systematische Untersuchungen zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei organischen Nitraten existieren daher bis heute nur sehr wenige. Keine Arbeit liefert befriedigende Aussagen, wie die jeweilige Struktur des Nitrats modifiziert werden muß, um die vasodilatorische Potenz zu steuern.

Allerdings sind die beträchtlichen Unterschiede der peroralen therapeutischen Dosierungen therapeutisch eingesetzter Nitrate geradezu augenscheinlich und zeigen so, dass deutliche Unterschiede im Wirkungsprofil der Verbindungen existieren. Auffällig ist auch, dass klinisch keine Korrelation zwischen Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und

der therapeutischen Wirksamkeit/Dosierung sowie der Entwicklung einer Nitratoleranz bestehen. (Kap. 2.1., Tabelle 1).

6.1. Einfluß der Nitratgruppenanzahl auf die Vasoaktivität

In *Veröffentlichung 1* und *3* wurde entgegen dem klinischen Bild für die offizinellen Nitrate ISMN, ISDN, GTN und PETN, einschließlich der bioaktiven PETN-Metaboliten PEtriN, PEdiN und PEmoN, eine eindeutige positive Korrelation zwischen Nitratgruppenanzahl im Molekül und vasodilatorischer Potenz aufgezeigt. In *Kap. 5.1.* wurde diese mittels Regressionsanalyse weiter gestützt. Dies ist nach dem Prinzip „Mehr Nitrat = stärkere Vasodilatation“ spontan nachvollziehbar, Abweichungen davon zeigen sich jedoch bei genauerer Betrachtung. Vorausgesetzt, jede Nitratgruppe verhielte sich unabhängig von den anderen Molekülbestandteilen, sollte nach dem stöchiometrischen Prinzip ein Mononitrat ein Molekül NO/NO_x freisetzen, ein Dinitrat zwei, ein Trinitrat drei usw., dementsprechend wäre ein Dinitrat zweifach potenter und ein Trinitrat dreifach potenter als ein Mononitrat. Nach den Befunden verdoppelt sich allerdings die vasodilatorische Potenz beispielsweise beim Vergleich des Dinitrats ISDN zum Mononitrat ISMN nicht nur, sondern nimmt um den Faktor 78 zu; dies gilt für andere Vergleiche ebenso. Die Anwesenheit einer zusätzlichen Nitratgruppe verursacht also einen überproportional hohen Anstieg der Wirkaktivität.

Die Steigerung der vasodilatorischen Potenz mit zunehmender Nitratgruppe schwächt sich nach „oben hin“ ab, wie z.B. beim Vergleich PETN/PEtriN – Faktor 4 - deutlich wird. Der Anstieg bei zunehmender Nitratgruppenanzahl folgt somit keinem linearen, sondern eher einem exponentiellen Verlauf. Die Aktivität nähert sich dabei einem Wirkmaximum im unteren einstelligen nanomolaren Bereich, wie für das Polynitrat Mannitolhexanitrat (MHN) schön gezeigt wurde ($EC_{50} = 3,45 \text{ nM}$; *Daten Roegler*). Diese Maximalaktivität stimmt gut überein mit denen für die direktfreisetzenden NONOate (PHEPIPERAZI/NO, $EC_{50} = 2,12 \text{ nM}$; DPA/NO, $EC_{50} = 6,37 \text{ nM}$) ermittelten Werte. Da NONOate keine Bioaktivierung benötigen und NO fast stöchiometrisch freisetzen, scheint in diesem Konzentrationsbereich keine weitere Affinitätssteigerung von Nitraten am bioaktivierenden Enzym mehr möglich zu sein.

Für die überproportionale Aktivitätssteigerung mit zunehmender Nitratgruppenanzahl müssen abgesehen von der Nitratgruppe selbst also noch zusätzliche strukturell bedingte Faktoren verantwortlich sein. Beschrieben ist ein theoretischer Ansatz, wonach das bioaktivierende Enzym zwei Bindungsstellen für die optimale Wechselwirkung mit dem

organischen Nitrat benötigt, eine Bindungsstelle interagiert mit dem Sauerstoff im Nitrat und die andere mit einem weiteren elektronenreichen Zentrum.¹³¹ Bei den PETN-Metaboliten steigt mit zunehmender Nitratgruppenanzahl aber auch die Lipophilie des Nitrats – Ersatz von OH durch ONO_2 –, somit verändert sich der Verteilungskoeffizient und damit grundsätzlich auch die Membranpermeabilität.

Grundsätzlich besitzt die die Korrelation zwischen Nitratgruppenanzahl und Wirkpotenz nur für einfachstrukturierte Alkylnitrate ohne weitere aktivitätsbeeinflussende funktionelle Gruppen oder Aromaten Gültigkeit. Allgemein sollte im Sinne hoher Aktivität der nitrattragende Rest nicht gegenüber endogenen bioaktivierenden Liganden zu stark abschirmen sondern die Bioaktivierung durch sterische Freilegung und Reaktivitätserhöhung der Nitratfunktion fördern, möglicherweise auch durch zusätzliche Anbindungsmöglichkeiten des Gesamtmoleküls an den bioaktivierenden Enzymen.

Der gestaffelten Abfolge der vasodilatorischen Wirkpotenzen in Abhängigkeit zur Nitratgruppenanzahl wurde bisher in der *in vitro*-Situation wenig Beachtung geschenkt. Insbesondere in pharmakologischen Zellversuchen wird häufig mit Bolusgaben von Nitraten gearbeitet, ohne dass die teilweise beträchtlichen Unterschiede in der Wirkaktivität der einzelnen Nitrate in der Regel ausreichend berücksichtigt werden. So werden häufig die jeweiligen Nitrate vereinfacht in identischen Konzentrationen verwendet oder vereinzelt in Zehnerpotenzschritten variiert. Die Aussagekraft beispielsweise von Untersuchungen zur Ferritin-Proteinexpression von PETN-Metaboliten als Erklärungsansatz der verminderten PETN-Toleranz ist daher eher gering, da hier bei einer Konzentrationen von 500 μM die Effekte von PEtriN mit denen von ISMN verglichen werden, obwohl PEtriN im Vergleich zu ISMN eine über tausendfach stärkere Wirkaktivität besitzt.¹³²

Die Abschätzung der relativen Wirkpotenzen der bioaktiven Metaboliten eines Ausgangsnitrats ist insbesondere beim PETN von großem Interesse, da wie in der *Veröffentlichung* 3 beschrieben die PETN-Metaboliten PEdiN und PEmoN als wirkbestimmend angesehen werden, da nur diese systemisch in signifikanten Konzentrationen und über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden können. PEmoN zeigt wiederum den schwächsten vasorelaxierenden Effekt aller Metabolite. Verglichen zum „Muttermolekül“ PETN ist es um den Faktor 1×10^{-4} schwächer aktiv, so dass 1/10000 der Konzentration an PETN den gleichen Effekt wie das entsprechende Mononitrat bewirkt und möglicherweise wirkungsrelevant ist, obwohl es unter die Nachweisgrenze fällt. Somit lässt sich bisher nicht vollständig ausschließen, dass

zumindest initial der bisher in Plasmaproben nicht detektierte Arzneistoff PETN selbst und sein erster Metabolit PEtriN an der Wirkung nach peroraler Gabe beteiligt sind. Allerdings sprechen wiederum die physikochemischen Eigenschaften von PETN sowie der verzögerte und moderate Wirkungseintritt gegen diese These (siehe *Kap. 6.4.*).

Auffällig ist bei allen Untersuchungen die hohe Sensitivität der Gefäßringe porciner Pulmonalarterien insbesondere gegenüber den hochpotenten Nitraten sowie den direkten NO-Donoren wie den NONOaten, die bereits unterhalb von 1nM einen initialen Relaxationseffekt zeigten.

6.2. Einfluß des nitrattragenden Rests auf die Vasoaktivität

In früheren Arbeiten wurde in Unkenntnis des Wirkprinzips und der bioaktivierenden Enzyme von organischen Nitraten einzig deren jeweilige Lipophilie als wirkungsdifferenzierend betrachtet.¹³³ Dieser Ansatz war zu vereinfacht, da einerseits die Nitratgruppenanzahl eines Nitrats nicht berücksichtigt wurde und andererseits sich bei der Untersuchung von isomeren Dinitrat-Zuckeranhydriden herausstellte, dass Nitrate mit identischer Lipophilie durchaus sehr unterschiedlich vasoaktiv sein können. Dem nitrattragenden Rest wurde dennoch kaum Beachtung geschenkt, bei dessen Auswahl stand wie bei PETN oder ISDN eigentlich nur die Untoxizität und die metabolische Stabilität des entsprechenden Alkoholedukts im Vordergrund. Insbesondere war völlig offen, wie funktionelle Gruppen im nitrattragenden Rest die Aktivität beeinflussen. Aufgrund der nachfolgend dargestellten Untersuchungen steht jetzt fest, dass die Vasoaktivität ebenso entscheidend beeinflusst wird durch: strukturelle und sterische Faktoren, die Reaktivität der Nitratgruppe sowie die Affinität zum bioaktivierenden Enzym.

6.2.1. Synthese von strukturell verschiedenen organischen Mononitraten

Alkylmononitrate eignen sich für Struktur-Wirkungsbeziehungsuntersuchungen in mehrfacher Hinsicht. Mit einer pharmakophoren Nitratgruppe können keine bioaktiven und somit die Verhältnisse verkomplizierenden Metaboliten gebildet werden, sie sind ungefährlich in der Handhabung, einfach zu synthetisieren und strukturell leicht zu variieren. Aufgrund ihrer im Allgemeinen durch nur eine Nitratgruppe hervorgerufenen geringen vasodilatorischen Potenz tritt der Einfluß des nitrattragenden Rests deutlicher in den Vordergrund als bei höheren Nitraten.

Bereits Anfang bis Mitte des letzten Jahrhunderts sind für die Synthese von organischen Nitraten verschiedene Methoden in Journals und Handbüchern der Organischen Chemie beschrieben worden (Abb. 25).¹³⁴ Die Entwicklung der Methoden stand häufig in engem Zusammenhang mit der Erforschung neuer Sprengstoffe oder pyrotechnischer Treibsätze. Dabei muß berücksichtigt werden, daß nicht alle Methoden generell für die Darstellung von Alkylmononitraten geeignet oder praktikabel sind.

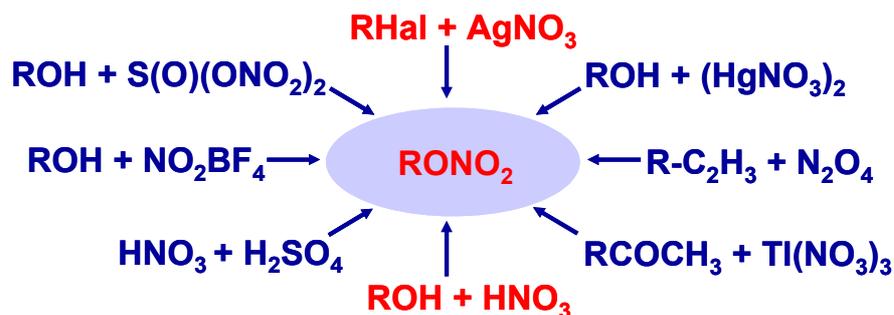


Abb. 25: Literaturbekannte Synthesen für organische Nitrate.¹³⁴

Als einfache und relativ zuverlässige Einstufen-Synthese mit hoher Ausbeute hat sich im Rahmen dieser Arbeit die Umsetzung des entsprechenden Alkylbromids mit Sibernitrat in Acetonitril in homogener Phase erwiesen. Der Reaktionsverlauf ist gut zu verfolgen durch die Menge an präzipitiertem Silberbromid. Die Reaktion wird ebenso für Alkyljodide und aktive Alkylchloride beschrieben. Die Aufreinigung durch Extraktion und Destillation führte zu Ausbeuten von etwa 55-65 %, die Ausbeuteminderung dürfte in erster Linie bei der Destillation eintreten. Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung ist eine gute Löslichkeit des Alkylbromids in Acetonitril. War sie nicht gegeben, wurde die Darstellung des Alkylnitrats aus dem entsprechenden Alkohol und hochkonzentrierter Salpetersäure (100 %) unter Eiskühlung und Harnstoffzusatz zur Zerstörung salpetriger Säure vorgezogen. Die allgemein recht lipophilen Nitrate ließen sich gut abtrennen durch Abscheidung nach Eingießen in Wasser. Sie wurden abgetrennt, gewaschen, getrocknet und der ölige Rückstand im Vakuum destilliert. AEN fällt dagegen nach Umsetzung von 2-Aminoethanol mit Salpetersäure in Ether als Feststoff (Nitratsalz) an. Um Nebenreaktionen wie die Oxidation des Alkohols zu verhindern, muß bei dieser Umsetzungsmethode zwar permanent der Temperaturverlauf und die Eintropfgeschwindigkeit kontrolliert werden, allerdings liefert sie höhere Ausbeuten von bis zu 80-90 %.

Problematisch erweist sich bei allen Alkylverbindungen die UV-Detektion bei chromatographischen Untersuchungen, um beispielsweise den Reaktionsverlauf zu

verfolgen. Abgesehen von den Verbindungen mit aromatischem Rest besitzen diese Verbindungen keine Eigenabsorption, der Einsatz von Sprühreagenzien (z.B. Diphenylamin-Reagenz) erwies als wenig hilfreich, um sensitiv die synthetisierten Nitrate zu detektieren. Auch die GC/MS-gekoppelte Analytik ist für organische Nitrate wenig nützlich, da organische Nitrate in der Regel unmittelbar nach Aufgabe der Nitratprobe in den Injektor aufgrund der Temperaturinstabilität zersetzt werden. Als Identitätskriterien kommen daher nur NMR-Analytik, IR-Spektroskopie, Elementaranalyse sowie Siedepunktbestimmung der zumeist öligen Verbindungen in Frage. Die NMR-Analytik und Elementaranalyse sind letztlich die geeigneten Methoden, um die Reinheit der Mononitratderivate festzustellen.

Sowohl ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Analytik liefern relativ einfache und übersichtliche Spektren. Ein wichtiges Identitätskriterium zur Unterscheidung Edukt/Produkt ist beim Nitrat gegenüber Alkohol- bzw.- Bromedukt die Tieffeldverschiebung des Signals im ^1H -NMR-Spektrum, welches aus der zur Nitratgruppe benachbarten CH_2 -Gruppe resultiert. (Abb. 27).

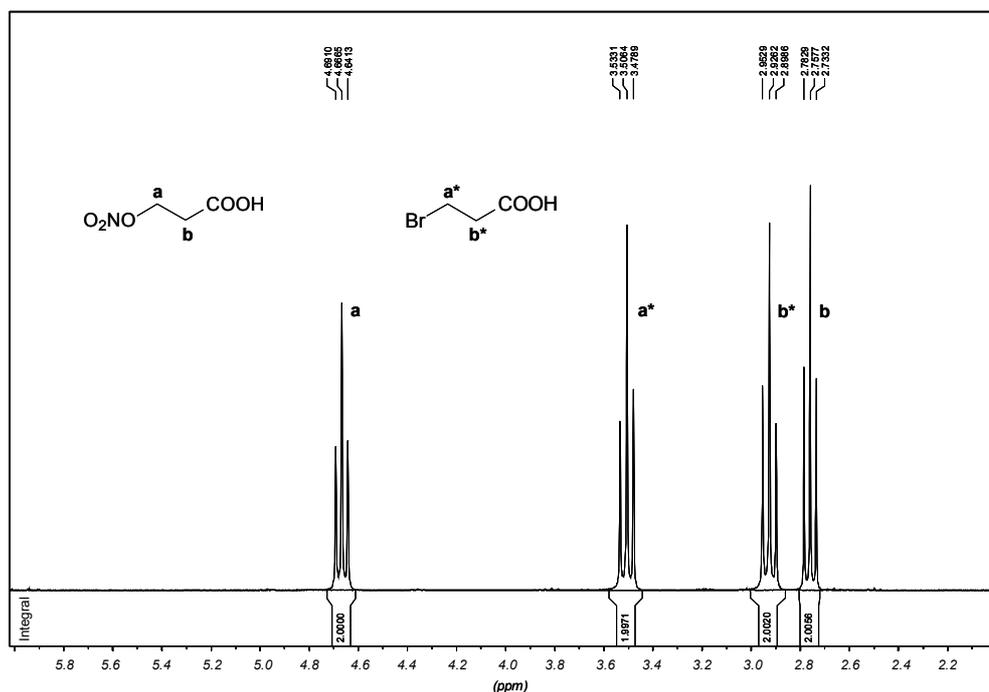


Abb. 27: Ausschnitt der überlagerten NMR-Spektren des 3-Nitropropionsäure-Produkts (links) aus Veröffentlichung 4 und des entsprechenden 3-Bromopropionsäure-Edukts (rechts) in CDCl_3 .

Da die Verbindungen aus experimentell-chemischen Arbeiten bekannt sind, wurden im Allgemeinen die experimentellen Daten bereits erhoben und sind damit bekannt. In

Veröffentlichung 4 wird die jeweilige Literatur zitiert. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass nahezu alle Verbindungen nicht experimentell-pharmakologisch geprüft wurden.

6.2.2. Unterschiede in den Wirkaktivitäten und deren mögliche Ursache

Erstmals konnte gezeigt werden, dass bei konstanter Nitratgruppenanzahl im Molekül durch Variation des Nitrat-Trägermoleküls ein unerwartet breites Aktivitäts-Spektrum von mehr als 4 Zehnerpotenzen auftreten kann. Aus *Abb. 1* in *Veröffentlichung 4* wird deutlich, dass Mononitrate nahezu unwirksam oder aber auch wie das 2-Aminoethylnitrat (AEN) GTN equipotent sein können. Demnach kommt dem Trägermolekül eine sehr viel größere wirkungsmodulierende Wirkung zu als bisher vermutet. Keineswegs konnte bestätigt werden, dass durch Steigerung der Lipophilie des Trägermoleküls generell eine Aktivitätsverbesserung zu beobachten wäre. Einfach strukturierte lipophile Alkylmononitrate besitzen sogar die geringste vasodilatorische Potenz innerhalb der Mononitrate. Besonders augenscheinlich ist der Abfall der Wirkaktivität bei Mononitraten mit großen und sperrigen Resten (Verbindung 14), die scheinbar eine optimale Ausrichtung am bioaktivierenden Enzym verhindern, dieser Effekt läßt sich für viele raumerfüllende Hybrid-Nitratverbindungen bestätigen. Entscheidend für diese Ausrichtung scheint darüber hinaus auch die freie Drehbarkeit der Nitratgruppe an einer Methylengruppe zu sein, wie der Vergleich der Wirkaktivitäten von Verbindungen 11 zu 13 in *Veröffentlichung 4* verdeutlicht.

Hingegen wurde generell eine Aktivitätssteigerung durch Einführung funktioneller Gruppen an der Nitratethylausgangsstruktur in folgender Reihenfolge beobachtet: Hydroxy- < Sulfo- < Carboxy- < Methoxycarbonyl- < Bromo- < Amino-ethylnitrat. Aus *Tabelle 1* und *Abb. 2* in *Veröffentlichung 4* wird deutlich, dass bei diesen Verbindungen weniger deren physikochemische Eigenschaften (logP-Wert) von Bedeutung sind, sondern vielmehr die Fähigkeit der polaren und teilweise reaktiven Substituenten, mit einer Nitrat-benachbarten Bindungsstelle zu interagieren und so die Bindungsaffinität am Enzym und damit die Wirkaktivität zu erhöhen.

Besonders Alkylmononitrate mit aromatischem Rest (Verbindung 3, 5 in *Abb. 2*) stechen bei der Betrachtung des Verhältnisses vasodilatorische Potenz/Lipophilie hervor. Die unerwartet hohen Aktivitäten der beiden Verbindungen basieren vermutlich auf der Labilität des Nitratrests, da bekannt ist, dass sowohl Benzylnitrate als auch α -Nitratophenone im Sinne einer Disproportionierung zum anorganischen Nitrit und dem entsprechenden Aldehyd zerfallen (*Schema 2* in *Veröffentlichung 4*).¹³⁵ Sie können daher als selbstreduzierende Nitrate angesehen werden.

6.3. Ein hochpotentes Mononitrat: 2-Aminoethylnitrat

Die Wirkaktivität von AEN übertrifft überraschenderweise die der anderen Mononitrate bei weitem. Bisher ist offen, wie diese hohe Aktivität im Detail erklärt werden kann. Allerdings können aus mittlerweile fortgeführten Untersuchungen erste Ansätze formuliert werden.

Entgegen der ursprünglichen Erwartung verschlechterte sich durch Einführung weiterer Nitratgruppen in die Aminoethylnitrat-Grundstruktur die Wirkaktivität drastisch. Neben der primären Aminfunktion scheint auch der Abstand zwischen der Nitrat- und Aminogruppe entscheidend für die Aktivität zu sein, da eine Verlängerung der Ethyl- zu einer Propylbrücke bereits mit einem starken Wirkungsverlust am Gefäßring verbunden ist, wie aus aktuellen, bisher nichtveröffentlichten Untersuchungen hervorgeht. Die Salzform hat hingegen keinen Einfluß auf die Wirkaktivität (*Daten Roegler*).

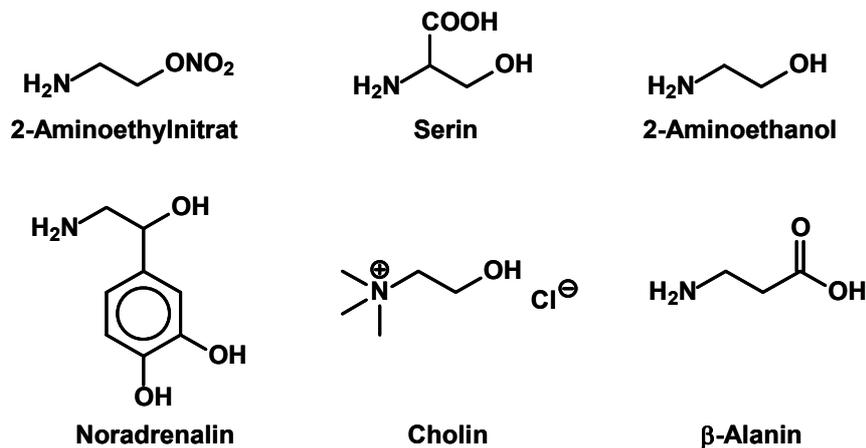


Abb. 28: Bei 2-Aminoethylnitrat sowie der entsprechenden Synthesevorstufe 2-Aminoethanol handelt es sich um primäre Amine mit möglicherweise biogenen Eigenschaften, welche Ursache für die hohe Aktivität von AEN sein könnte. „Aminoethanol“ entsteht seinerseits durch Decarboxylierung der Aminosäure Serin. Strukturähnliche biogene Amine sind β-Alanin, Cholin sowie im weiteren Sinne Noradrenalin.

AEN weist gewisse Ähnlichkeiten zu verschiedenen biogenen Aminen und damit auch zu einigen Neurotransmittern auf, bei denen eine Aminfunktion, in der Regel primärer Natur, über einen C2-Spacer mit einem anderen Strukturelement verbunden ist (Abb. 28). Wie bei anderen biogenen Aminen ist das synthetische AEN-Edukt 2-Aminoethanol (AE) ein Decarboxylierungsprodukt einer Aminosäure, in diesem Fall Serin. AE ist unwirksam an den Gefäßen, aber Wechselwirkungen mit der Zellmembran sind denkbar. Ethanolamine besitzen nämlich eine biologische Bedeutung in der Zellmembran-Lipiddoppelschicht als polare Kopfgruppen von Phospholipiden wie beim Phosphatidylethanolamin. Außerdem ist auch ein wie für andere biogene Amine üblicher aktiver Stofftransport durch die

Zellmembran der glatten Gefäßmuskulatur denkbar. Es kann spekuliert werden, ob die hohe Aktivität des Aminoethylnitrats auch durch Ausnutzung eines biogenen Amin- oder Catecholamin-Transporters bedingt ist.

Die herausgehobene vasodilatorische Potenz von AEN unter den Mononitraten ließ vermuten, daß möglicherweise eine Affinität zur ALDH-2 bestehen könnte. Durch die Kooperation mit Dr. Daiber war es erstmals möglich, überhaupt neuartige Nitrate wie AEN und andere Mononitrate, an Gefäßen von ALDH-2 defizienten Mäusen zu testen. Offensichtlich werden jedoch übereinstimmend alle Mononitrate, unabhängig vom nitratragenden Rest und der jeweiligen Wirkpotenz, nicht ALDH-2 vermittelt bioaktiviert (Kap. 5.9.). Insofern ist die mit der ALDH-2 in Verbindung gebrachte, literaturbekannte Bezeichnung „Hochpotenter Bioaktivierungsweg“ nicht zutreffend, da er keine allgemeine Gültigkeit für alle Nitrate besitzt. Diese Befunde stehen in enger Beziehung zu den Ergebnissen aus den Toleranzuntersuchungen (Kap. 6.6.).

Interessanterweise beinhaltet Nicorandil als Partialstruktur 2-Aminoethylnitrat (Abb. 1), welche über eine Amidbindung an Nicotinsäure gebunden ist. Es überrascht daher nach eingehender Literaturrecherche, dass diese Verbindung bisher nie genauer pharmakologisch charakterisiert wurde. Es existieren lediglich zwei Arbeiten, in denen AEN im Zusammenhang mit Vasoaktivität erwähnt wird.^{136,137} Keine der Veröffentlichungen unterstreicht jedoch die starke vasodilatorische Potenz der Verbindung gegenüber anderen Mononitraten, da es sich nicht um vergleichende *in vitro* Studien handelte.

Wenig wahrscheinlich beim AEN ist hingegen eine Synproportionierung der Amin- und der Nitratgruppe zu einer vasorelaxierenden Spezies oder überhaupt eine chemische Labilität der Substanz, da in allen verwendeten Nährlösungen selbst in konzentrierten Lösungen über mehrere Tage keine Aktivitätsverminderung am Gefäßring zu beobachten war. Ebenso in DMSO gelöst wurde anhand von H-NMR-Analytik keine Zersetzung von AEN beobachtet. Daher eignet sich die Verbindung auch für *in vivo* Langzeituntersuchungen mit der miniosmotischen Pumpe, bei der das Nitrat über einen Zeitraum von mehreren Tagen in Lösung gehalten werden muß. Diese Versuche sind derzeit Gegenstand der aktuellen Forschung.

Neben den unterschiedlichen Affinitäten am bioaktivierenden Enzym könnten auch die verschiedenen Reaktivitäten verschiedener organischer Nitrate gegenüber diesen Enzymen oder anderen Vasodilatation auslösenden Targetproteinen, im speziellen die

unterschiedliche Reaktivität mit Thiolgruppen, die vasodilatorische Potenz variieren. So ist beispielweise beobachtet worden, dass bei höheren Konzentration Nitrate mit Thiolen nichtenzymvermittelt abreagieren.¹³⁸ Es wäre deshalb zukünftig von Interesse, die synthetisierten Mononitrate über einen definierten Zeitraum mit einem Thiol, wie der natürlichen Aminosäure L-Cystein, in unterschiedlichen Konzentrationen zu inkubieren und diese Reaktion per HPLC mit N-sensitiven Chemilumineszenzdetektor zu verfolgen.

6.4. Nitrat-Hybridverbindungen

Hybridverbindungen sind aus zwei verschiedenen bioaktiven Teilen oder Domänen aufgebaut. Für deren Synthese gibt es unterschiedliche Beweggründe:

- Domäne 2 soll unerwünschte Effekte der Domäne 1 gegenregulieren
- Domäne 2 soll den pharmakologischen Effekt der Domäne 1 an einer für beide identischen Zielstruktur steigern
- Domäne 2 soll den klinischen Effekt von Domäne 1 durch Wechselwirkung an einer anderen Zielstruktur modifizieren oder steigern

Im Rahmen von Kooperationen innerhalb der Arbeitsgruppe wurden in den Arbeiten zu dieser Dissertation verschiedene Nitrat- und NO-Donor-Hybridverbindungen hinsichtlich pharmakologischer Aktivität *in vitro* untersucht. In der Regel stand bei den meisten Verbindungen nicht unbedingt die Vasoaktivität der Verbindung im Vordergrund sondern andere Effekte. Beispiele sind:

- β -Blocker-Nitrathybride für eine verbesserte Behandlung kardialer Erkrankungen durch Kombination einer vasodilatorischen (Nitrat) und einer kontraktilitätsvermindernden (β -Blocker) Komponente (*Veröffentlichung 2*)
- NSAID-Nitrathybride als potentielle gastroprotektive NSAIDs oder antiamyloidogene Antidementiva (*Kap. 5.5*)
- Ketoconazol-Nitrat- bzw. Ketoconazol-NONOathybride als Antimykotika mit verbesserter Wirksamkeit¹³⁹
- Statin- und Cholinesteraseinhibitor-Nitrathybride als potentielle Antidementiva¹⁴⁰

Mit Ausnahme der Nitratopivaloyl-Propranolol-Hybridverbindung (NPH, *Veröffentlichung 2*) war die vasodilatorische Potenz der getesteten Hybride geringer als die der entsprechenden Einzelnitrate. Eine vollständige Relaxation wurde jedoch bei höheren

Konzentrationen für alle getesteten Verbindungen erreicht, die Wirkungskomponente des Nitrats bleibt demnach im Hybrid erhalten. Wenig Aussagen können zu Hybriden mit geringer Wasserlöslichkeit verbunden mit einer geringen Wirkpotenz getroffen werden, da im geprüften Konzentrationsbereich eine Präzipitierung der Substanz im Organbad vor Eintritt eines Relaxationseffekts auftritt. Für diese Verbindungen sind demnach Organbadversuche nicht geeignet.

Offenbar moduliert die Nichtnitrat-Domäne die vom Nitrat ausgehende Wirkaktivität maßgeblich, wie bei den zwei unterschiedlich aktiven PEdiN-NSAID Hybriden (2. Domäne: Indomethacin bzw. Flurbiprofen; 4B, 2B in *Kap. 5.5.*) deutlich wird. Ein und dieselbe Nichtnitrat- bzw. Nichtnitroso-Domäne kann aber auch, wie in *Veröffentlichung 2* für das Propranolol vorgestellt wird, die vasorelaxierende Wirkung des Nitrats einerseits verstärken sowie die des Nitrosothiols andererseits abschwächen, obwohl Propranolol an PGF_{2 α} -vorkontrahierten Pulmonalarterien selbst keine bedeutende Relaxation auslöst. Wie für NSAID-Hybridverbindungen der PETN-Metaboliten zudem gezeigt wurde, wird die vasodilatorische Potenz nur untergeordnet von der Nitratgruppenanzahl der Nitratdomäne bestimmt.

Für die Hybridisierung werden überwiegend Mononitratverbindungen verwendet, die Verknüpfung erfolgt zumeist über eine Amid- oder Esterbindung. Der Auswahl des geeigneten Mononitrats wurde bisher wenig Aufmerksamkeit gewidmet, im Vordergrund stand nur eine geeignete Verknüpfbarkeit über funktionelle Gruppen (Hydroxy-, Carboxy-, Amino-). Aus den Ergebnissen der *Veröffentlichung 4* wird nun deutlich, daß die Wirkaktivität des Hybrids offenbar sehr von der Wahl der Mononitrat-Komponente abhängt.

Offen bleibt, wie seit langem diskutiert, ob *in vitro* die Hybride als Gesamtmolekül zum Ort der Wirkung gelangen, oder ob, wo, wann und in welchem Ausmaß durch zelluläre Esterasen oder Amidasen bereits vorher eine partielle Spaltung zu den Einzelverbindungen stattfindet.

6.5. Einfluß der Struktur organischer Nitrate auf die Toleranz

Trotz intensiver Forschung ist das pathophysiologische Geschehen der Nitrattoleranz bisher noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Aus den vorliegenden Untersuchungen wird nun deutlich, dass die experimentell akut erzeugte *in vitro* Toleranz von dem klinischen Bild einer Nitrattoleranz unter chronischer Gabe abzugrenzen ist, die häufig einhergeht mit einer endothelialen Dysfunktion. Offenbar können Verbindungen, die *in*

vitro durchaus Toleranz hervorrufen, *in vivo* während einer Langzeitbehandlung keine Toleranz erzeugen (PETN) und umgekehrt (ISMN). Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die Arzneistoffgruppe der organischen Nitrate keineswegs wie allgemein verbreitet als homogene Wirkstoffgruppe angesehen werden darf, sondern jedes Nitrat ein individuelles Wirk- und Nebenwirkungsprofil besitzt.

In den vorliegenden Untersuchungen ist es gelungen, eine Methode zu entwickeln, welche bei der Induktion einer *in vitro* Toleranz erstmals die jeweilige Wirkpotenz der Verbindungen berücksichtigt und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich verbessert, dies wurde in der Vergangenheit nicht ausreichend berücksichtigt. In *Veröffentlichung 3* wurde gezeigt, dass in der *in vitro* Situation die Entwicklung einer Nitratoleranz eng mit steigender Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und somit also auch mit der Wirkstärke korreliert. Mittlerweile ist nun bekannt, dass diese Beziehung offenbar oft, z.B. bei den offizinellen Nitraten PETN, GTN, ISDN, ISMN und den Metaboliten PetriN, PediN, PemoN, aber nicht immer Gültigkeit besitzt. Denn nachdem es gelungen ist, chemisch abweichende Mononitrate mit hochpotenten vasodilatatorischen Eigenschaften ohne Toleranzentwicklung zu finden (AEN), besteht keine allgemeingültige Beziehung mehr zwischen Aktivität und Toleranzinduktion. Vielmehr wird Toleranz unabhängig von der Wirkaktivität durch strukturelle Parameter sowie der Nitratgruppenanzahl bestimmt. Nach dem derzeitigen Stand ist es sehr wahrscheinlich, dass zumindest für die *in vitro* Toleranzentwicklung eine hohe Affinität des Nitrats zur ALDH-2 relevant ist, erstaunlicherweise wurde diese bisher nur für Tetra- und Trinitrate nachgewiesen, selbst wenn diese weniger aktiv sind.

Bei der Entwicklung neuartiger und toleranzarmer Nitrate wäre nach dem derzeitigen Stand von Bedeutung, daß bei den gewünschten Verbindungen eher eine geringe Affinität zur ALDH-2 besteht, um eine mögliche Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette zu vermeiden. Dies wäre prinzipiell bei den Mononitraten gegeben, allerdings wird aus *Abb. 24* deutlich, dass trotz abweichender Bioaktivierung gegenüber GTN wiederum auch schwache Mononitrate (IPN) ROS induzieren können, während das hochaktive Mononitrat AEN den natürlichen ROS-Spiegel sogar noch absenkt. Welche Bedeutung diese interessanten Befunde mit den neuartigen Mononitraten für Struktur-Toleranzbeziehungen besitzen, wird von großem Interesse sein.

Neuartig sind auch die Befunde aus *Kap. 5.4.*. Danach erzeugt ein organisches Nitrit (3-MBN) eine gegenüber Nitraten deutlich ausgeprägtere *in vitro* Toleranz. Wie man aufgrund des schnellen Wirkungseintritts von Organonitriten *in vivo* und der zeitlichen

Verläufe der Meßkurven in *Kap. 5.3 in vitro* ableiten kann, fluten organische Nitrite wegen ihrer physikochemischen Eigenschaften rasch in den Gefäßmuskelzellen an und werden sogleich aufgrund ihrer chemischen Labilität im Zytosol hydrolytisch gespalten. Das dabei intrazellulär gebildete und nachgewiesene anorganische Nitrit wird wiederholt ebenso als Zwischenstufe bei der Bioaktivierung der organischen Nitrate postuliert.¹⁰⁰ Die Behandlung von Gefäßringen mit anorganischem Nitrit (Kaliumnitrit) rief allerdings nur einen unbedeutenden Relaxationseffekt hervor, vermutlich weil das Nitritanion aufgrund seiner Hydratisierung Zellmembranen schlecht permeieren kann.¹⁴¹

Denkbar ist, dass es bei der Bolusgabe des organischen Nitrits zu einer massiven Anflutung der Nitriten in der Zelle kommt und diese wiederum neben der sGC-Stimulierung spontan mit weiteren zellulären Bestandteilen abreagieren. So sind unspezifische Nitrosierungen von Enzymen (S-Nitrosierung), die Oxidation der Hämgruppe der sGC sowie eine Verschiebung des oxidativen Zustands der Zelle möglich und können dadurch unter anderem eine Schädigung der Nitrat-bioaktivierenden Enzyme hervorrufen. Der gleiche pathophysiologische Mechanismus ist verzögert bei der akuten oder chronischen Gabe von Nitraten ebenso zu erwarten, da auch bei dieser Nitrit als Intermediat nachgewiesen wurde. Interessant wäre weiterführend, inwieweit organische Nitrite den ROS-Spiegel erhöhen (*Kap. 5.9.*)

Wie können jedoch die Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Nitratgabe möglicherweise erklärt werden und warum weisen Nitrate *in vivo* unterschiedliche Toleranzverhalten auf?

Wie bereits beschrieben in *Veröffentlichung 3*, ist insbesondere beim PETN die *in vitro* und *in vivo* Toleranzsituation geradezu gegensätzlich und soll daher näher betrachtet werden. Bei der *in vitro* Behandlung werden Gefäßringe oder Zellen einmalig akut mit einer im Vergleich zur chronischen *in vivo* Therapie sehr hohen Nitratkonzentration behandelt. Bei der kurz darauf folgenden wiederholten Behandlung werden die verschiedenen Toleranzeffekte wie Wirkungsabschwächung, Bildung von ROS-Spezies oder verminderte ALDH-2 Enzymaktivität sofort innerhalb weniger Minuten sichtbar. Die Gefäßmuskelzellen werden bei der akuten Behandlung gewissermaßen mit dem Nitrat „überladen“, eine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette bis zur ALDH-2 Inaktivierung ist die Folge, maßgeblich daran beteiligt sind reaktive Sauerstoffspezies. Da sowohl GTN als auch PETN über den hochpotenten ALDH-2 Bioaktivierungsweg metabolisiert werden und chemisch betrachtet beide über eine relativ ähnliche einfache Alkylgrundstruktur verfügen, ist nachvollziehbar, dass beide Verbindungen *in vitro*

ähnliche Toleranzeffekte ausbilden. So wurde bei PETN-Akutgabe als Toleranzeffekt neben der verminderten vasodilatorischen Potenz auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie eine Absenkung der ALDH-2 Aktivität beobachtet.¹⁰² Offenbar werden bei diesen Nitraten während der ALDH-2 Bioaktivierung unmittelbar reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die ihrerseits die mitochondriale Atmungskette rasch in ihrer Aktivität beeinträchtigen. Selbst bei der Vorinkubation mit massiv hohen Nitratkonzentrationen greifen darüber hinaus noch andere weniger ROS-sensible Bioaktivierungsmechanismen, so dass eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve sichtbar wird, die Gefäßringe relaxieren aber nach wie vor vollständig (100%).

Dies begründet auch, warum Nitrate mit einer geringen Affinität gegenüber der ALDH-2 bei der Akutgabe keine oder wenig *in vitro* Toleranz erzeugen. Im Kontext dazu erzeugen diese Nitrate ebenso weniger reaktive Sauerstoffspezies.¹⁰² Zusammenfassend bedeutet das für die *in vitro* Situation, dass ein enger Zusammenhang zwischen Nitrattoleranz und der ALDH-2 Affinität besteht.

In vivo während chronischer Behandlung gestaltet sich das Geschehen komplexer, Toleranzphänomene treten zudem in Abhängigkeit der Dosierung, Applikation und des Nitrats häufig erst nach Tagen auf. Im Gegensatz zur üblichen sublingualen oder bukkalen GTN-Applikation verbunden mit einer schnellen Resorption flutet nach peroraler PETN-Gabe der Wirkstoff bzw. seine bioaktiven Metaboliten langsam und kontrolliert in geringen Mengen an. Zudem werden beim PETN endogene Schutzmechanismen aktiviert, zu diesen zählen eine erhöhte Hämoxxygenase (HO)-1 Expression verbunden mit erhöhten Ferritinspiegeln sowie die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen (EPCs), diese Befunde stammen jedoch hauptsächlich aus *in vitro* Untersuchungen mit PETN.^{142,143} Über welchen genauen biochemischen Mechanismus dieser Schutz erzeugt wird, vor allem im Unterschied zum strukturell ähnlichen GTN, ist bisher völlig ungeklärt. Da wie im nächsten Abschnitt beschrieben die bioaktiven Metaboliten PEdiN und PE_{mo}N als bestimmend für die Langzeitwirkung angesehen werden, wäre von besonderem Interesse, inwieweit diese im Stande sind, die besagten Schutzmechanismen zu aktivieren. Jedenfalls wurden bei chronischer PETN-Gabe keine messbaren ROS-Spiegel detektiert, eine endotheliale Dysfunktion blieb ebenso aus wie eine Nitrattoleranz bei gesunden Probanden. Völlig unklar ist hingegen, warum ISMN, welches nicht über ALDH-2 bioaktiviert wird, bei längerer Therapie ebenso Toleranz und endotheliale Dysfunktion erzeugt, obwohl *in vitro* weder Toleranz noch ROS festgestellt wurden¹⁴⁴

Neueste Befunde von *Gori et al.* zeigen ein neues Bild für die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies unter Nitratgabe auf. Eine endotheliale Dysfunktion kann experimentell durch ein Ischämie- und Reperusions- (IR)-Modell am Menschen erzeugt werden, interessanterweise kann diese bei einer *in vivo* Kurzzeitgabe im Sinne einer ischämischen Präkonditionierung mit GTN und PETN nicht aber mit ISMN behoben werden.¹⁴⁵ Die Autoren nehmen an, dass dieser protektive Effekt jedoch für GTN und PETN jeweils unterschiedlich begründet ist. Paradoxerweise wurde nachgewiesen, dass zumindest beim GTN durch die kurzzeitige ROS-Bildung eine endotheliale Dysfunktion verhindert wird, ein ähnlicher ROS-vermittelter Effekt wurde bei sportlicher Betätigung beschrieben.¹⁴⁶

6.6. Erklärungsansätze für das klinische Wirkprofil von PETN

Auf Grundlage der dargelegten experimentell-pharmakologischen *in vitro* Ergebnisse stellt sich die Frage, wie die hohe vasodilatorische *in vitro* Potenz von PETN mit der ungewöhnlich hohen therapeutischen Dosierung, die selbst die ISMN-Dosierung übersteigt, zu vereinbaren ist (*Tabelle 1* in *Kap. 2.1.*). Die klinische Wirkung tritt zudem langsam und moderat ein (40-60 min) und hält über einen langen Zeitraum an, weswegen PETN als Langzeitnitrat bezeichnet wird (6-8 h). Ein völlig unterschiedliches Wirkprofil zeigt dagegen der bioaktive Metabolit PEtriN nach peroraler und sublingualer Applikation.¹⁴⁷ Eine gegenüber PETN (80 mg) vergleichsweise niedrige Dosierung von 10 mg ¹⁴C-PEtriN führte bei gesunden männlichen Probanden innerhalb weniger Minuten zu einem schnellen und massiven Blutdruckabfall, verbunden mit Überdosierungserscheinungen wie Nitratkopfschmerz, Synkope und Schwindel. Im übrigen wurden in den Faeces innerhalb von 72 h weniger als 2 % der Ausgangsdosierung gemessen an der Gesamtradioaktivität gefunden und deutet eine deutlich verbesserte Bioverfügbarkeit von PEtriN gegenüber dem Muttermolekül hindeutet.

Ein wichtigen Erklärungsansatz für das klinische Wirkprofil von PETN liefern dessen physikochemische Eigenschaften. Die Verbindung liegt in kristallinem Zustand vor und ist aufgrund ihrer Lipophilie (calc. logP = 4.59; ACD/Labs) im physiologischen Milieu des Magen-Darmtrakts praktisch unlöslich und im Rahmen der Nachweiskgrenzen auch nicht systemisch detektierbar, offensichtlich wegen mangelnder Resorbierbarkeit. Vielmehr kommt es wahrscheinlich aus einem „depotartigen“ Reservoir von ungelöstem PETN im Darm zu einem langsamen, zeitlich gestaffelten Anfluten der bioaktiven Metaboliten

PEtriN (vermutlich nur sehr geringe Mengen), PEdiN und als Hauptmetabolit PEmoN mit der längsten Plasmahalbwertszeit. Der initiale Abbau des PETN zum polareren, besser resorbierbaren PEtriN könnte auch durch intestinale Mikroorganismen vermittelt werden.¹⁴⁸ Diese These wird gestützt durch die in *Veröffentlichung 3* beschriebenen HPLC-basierten pharmakokinetischen Untersuchungen an Blut- und Faecesproben von Ratten, die per Schlundfütterung über 3 Tage mit PETN behandelt wurden. Die zu untersuchenden Nitrate wurden dabei durch einen Chemolumineszenz Detektor quantifiziert. Sowohl PETN als auch PEtriN konnte in keiner der Blutproben nachgewiesen werden. PETN war hingegen in hohen, PEtriN in deutlich geringeren Mengen über 3 Tagen in den Faeces nachweisbar. Wirkbestimmend über einen langen Zeitraum sind PEdiN (4 bis 5 Stunden) und PEmoN (10 bis 11 Stunden), für die ein enterohepatischer Kreislauf beschrieben ist.^{148,149}

Demnach verfügt PETN über eine sehr geringe Bioverfügbarkeit, der Hauptteil des Arzneistoffs wird nach peroraler Einnahme unmetabolisiert ausgeschieden. Aus theoretischen Berechnungen unter Berücksichtigung von Lipophilie, Verteilungsvolumen und anderen pharmakokinetischen Parametern wird die Bioverfügbarkeit mit deutlich unter 3 % angegeben.¹⁵⁰

Daher handelt es sich im eigentlichen Sinne bei PETN um ein „Pre-prodrug“, das im ersten Schritt zu seinen resorbierbaren, bioaktiven, wirkbestimmenden Metaboliten abgebaut wird und diese Prodrugs dann im zweiten Schritt durch Bioaktivierungsschritte gefäßwirksames NO/NO_x (Drug) bilden.

Für das sehr unterschiedliche klinische Wirkprofil (Kurz- oder Langzeitnitrat) organischer Nitrate sind somit sehr wesentlich auch Resorptions- sowie Verteilungsvorgänge, also pharmakokinetische Parameter, verantwortlich.

7. Zusammenfassung

Gegliedert nach den in *Kap. 2.2.* wiedergegebenen Fragestellungen lassen sich die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit wie folgt zusammenfassen.

1. *Besteht bei offizinellen organischen Nitraten in vitro eine Korrelation zwischen der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und deren Vasoaktivität?*

Bei den 4 offizinellen organischen Nitraten PETN, GTN, ISDN und ISMN steigt die vasodilatorische Potenz (EC_{50} : 7 – 33200 nM in *Abb. a*) mit zunehmender Anzahl der Nitratgruppen (1 – 4) im Molekül an. An $PGF_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein wurde in Organbadversuchen eine durchgängige Korrelation erkannt. Die unterschiedlichen acyclischen (Pentaerithritol, Glycerol) und cyclischen (Isosorbid) nitrattragenden Alkylreste modulieren die Wirkaktivität der Verbindungen nur geringfügig. Diese Befunde stehen im Gegensatz zum klinischen Bild, *in vivo* wird die Wirkaktivität durch die sehr unterschiedliche Pharmakokinetik der Verbindungen überlagert, so dass keine Korrelation zwischen erforderlicher therapeutischer Dosis und Nitratgruppenanzahl bzw. *in vitro* Wirkaktivität besteht (*Veröffentlichung 1 & 3*). Gefäßringe der Arteria pulmonalis vom Schwein reagieren sehr empfindlich auf organische Nitrate, so dass sich dieser Gefäßtyp für weiterführende Untersuchungen mit größeren Substanzreihen als geeignet erwies.

2. *Läßt sich eine Abfolge der vasodilatorischen Wirkaktivität bei den bioaktiven Metaboliten der offizinellen organischen Nitraten erkennen?*

In der Abfolge PE_{mo}N, PE_{di}N, PE_{tri}N und PETN, also mit zunehmender Nitratgruppenanzahl bei gleichem symmetrischen Trägermolekül, steigt die Wirkaktivität am Gefäß ebenfalls und zwar überproportional und nicht stöchiometrisch an (Faktoren 4 – 72 in *Abb. a*). Bei PETN liegt das Maximum im einstellig nanomolaren Bereich. Die sehr klare Korrelation zwischen Nitratgruppenanzahl und *in vitro*-Wirkstärke zeigt, daß bei gleichem oder ähnlichem „Nitratcarrier“ hauptsächlich die Nitratgruppenanzahl die Wirkaktivität bestimmt. Übereinstimmend hiermit ist der Vergleich der GTN-Metabolite 1,2-GDN und 1,3-GDN mit GTN. Um die Aussagekraft von vergleichenden experimentell-pharmakologischen Untersuchungen mit Nitraten zu verbessern, sollte künftig den sehr unterschiedlichen vasodilatorischen Wirkpotenzen mehr Rechnung getragen werden (*Veröffentlichung 1 & 5; Kap. 5.1*)

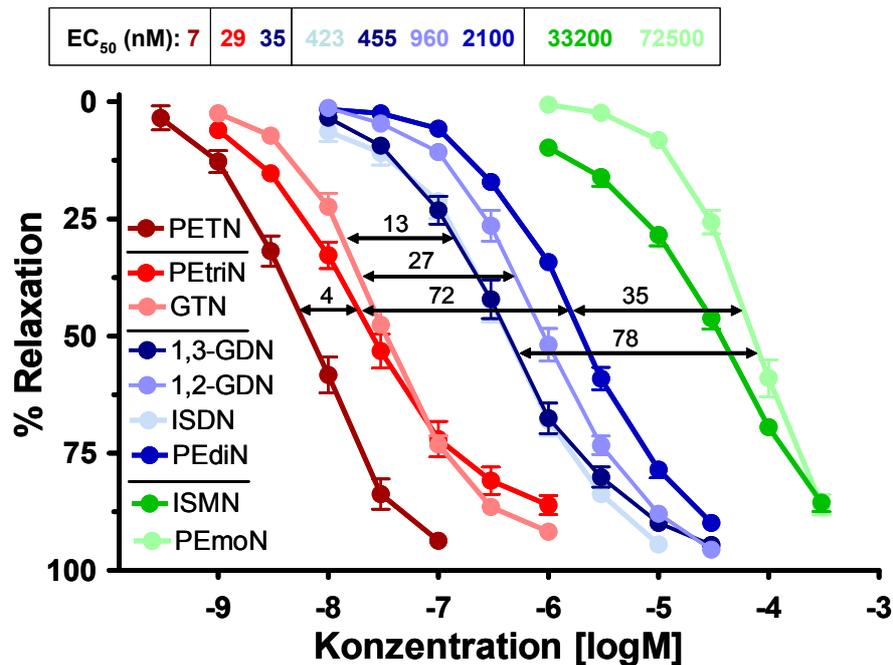


Abb. a: Konzentrations-Wirkungskurven von PETN, GTN, ISDN und deren bioaktiven Metaboliten sowie die Wirkaktivitäten (EC₅₀) an PGF_{2α}-vorkontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein. Die Zahlenwerte über den Doppelpfeilen sind Faktoren und geben den Quotienten der EC₅₀-Werte eines um eine Nitratgruppe verminderten Metabolits zum Arzneistoff oder dem entsprechenden nächst höheren Nitratmetaboliten an (z.B.: PEtriN/PETN oder PEdiN/PEtriN). Mittelwerte ± SEM von 3-9 separaten Versuchen.

3. Welchen Einfluß besitzt bei organischen Nitraten das Gefäßendothel auf die Wirkstärke?

Die Arteria pulmonalis vom Schwein verfügt über eine hohe NO-Bildungskapazität, bei unteren nanomolaren Konzentrationen werden die Gefäßringe durch endothelvermittelte Vasodilatoren wie Bradykinin oder Acetylcholin bereits vollständig relaxiert. Nach einer Entfernung des Endothels verbunden mit einer Inhibition der eNOS wurde bei den untersuchten Nitratverbindungen kein wesentlicher Einfluß des Endothels auf die Wirkstärke beobachtet, d.h. die Verbindungen verhielten sich in endothelgeschädigten und endothelintakten Gefäß ähnlich. Es ist deshalb auszuschließen, dass das Endothel die Struktur-Wirkungsbeziehungen bei organischen Nitraten signifikant beeinflusst (Veröffentlichung 1).

4. Wird die Gefäßrelaxation generell durch einen sGC-abhängigen Mechanismus vermittelt?

Eine Vasodilatation kann durch spezifische (z.B.: Calcium-Kanal-Blockade, Kalium-Kanal-Öffnung) und unspezifische Effekte ausgelöst werden. Generell konnte für alle in der Arbeit untersuchten Nitrate ein spezifischer sGC-abhängiger Mechanismus bestätigt

werden. Durch ODQ, einem NO-sensitiven Inhibitor der sGC, wurde eine konzentrationsabhängige Abschwächung der Nitratwirkung am Gefäß beobachtet. (*Veröffentlichung 1 & 3*).

5. *Führen alle organischen Nitrate übereinstimmend zu einer in vitro-Toleranz?*

In vitro Toleranzuntersuchungen erwiesen sich als geeignet, um Hinweise zur deutlich komplexeren *in vivo* Situation zu erhalten, da neurohumorale und pharmakokinetische Parameter ausgeschaltet werden. Des Weiteren wurden nicht nur die Beziehungen zwischen Struktur und vasodilatorischer Potenz sondern auch zwischen Struktur und Induktion einer *in vitro* Toleranz ermittelt. Dazu wurde ein Versuchsdesign zur Bestimmung einer *in vitro* Toleranz etabliert, das erstmals die jeweiligen Wirkstärken (EC₉₀ bzw. EC₁₀₀) eines organischen Nitrats in der experimentellen Durchführung berücksichtigt. In den zahlreichen, vorliegenden Untersuchungen wurde nicht nur die oben beschriebene Korrelation zwischen Wirkstärke und Nitratgruppenanzahl, sondern auch eine Korrelation zwischen Entwicklung von *in vitro* Toleranz und Nitratgruppenzahl und damit auch der Wirkstärke festgestellt. Das klinische Wirkprofil von PETN – sehr geringe Toleranzentwicklung, hohe Dosierung und langsam eintretende aber lang anhaltende Wirkung – ist auf das zeitlich gestaffelte Anfluten der bioaktiven und toleranzarmen Metaboliten PEdiN und PemoN zurückzuführen, PETN ist selbst nicht systemisch verfügbar (*Veröffentlichung 3*).

6. *Synthese neuartiger Mononitrat-Verbindungen.*

Um den Einfluß verschiedener Nitratträgerstrukturen auf die Wirkaktivität bei gleichbleibender Nitratgruppenanzahl zu prüfen, wurde eine Serie von strukturell sehr unterschiedlichen Mononitraten überwiegend durch einfache Einstufensynthesen dargestellt. Im Wesentlichen wurden die Zielverbindungen durch nukleophile Substitution von Alkylhalogeniden mit Silbernitrat oder durch Nitrierung entsprechender Alkohole mit hockkonzentrierter Salpetersäure gewonnen (*Veröffentlichung 4*).

7. *Wie unterscheiden sich neuartige Mononitratverbindungen in ihrer Vasoaktivität?*

Der Struktur des Nitratträgermoleküls kommt eine größere wirkungsmodulierende Eigenschaft zu als bisher angenommen. Bei 14 Mononitraten wurde trotz der einheitlichen pharmakophoren Nitratgruppe durch die Modifikation des Trägermoleküls eine Streuung der Wirkaktivitäten um mehr als vier Zehnerpotenzen gefunden. Mononitrate können demnach nahezu unwirksam sein (Verbindung 14) oder aber auch wie 2-Aminoethylnitrat

in vitro toleranzfrei und generiert im Kontext dazu keine reaktiven Sauerstoffspezies. Auch Toleranzinduktion und Wirkaktivität sind demnach unabhängig voneinander zu betrachten, jedoch werden beide durch strukturelle Parameter des jeweiligen Vasodilators bestimmt (in Kooperation mit Dr. Daiber, Mainz; Kap. 5.8. bis 5.10.).

9. *Pharmakologische Charakterisierung von NO-Donor- und Nitrat- β -Rezeptorenblocker-Hybridmolekülen.*

Diese Hybridmoleküle, bestehend aus einem S-Nitrosothiol (SNAP) bzw. Mononitrat (Nitratopivalinsäure) und amidartig gebundenem Propranolol, lösen eine vollständige Relaxation (100%) an den Pulmonalarterien aus. Durch Hybridisierung wird die Wirkaktivität zu den Einzelverbindungen stark modifiziert und im Fall des Nitrat- β -Rezeptorenblocker-Hybridmoleküls paradoxerweise sogar verstärkt (*Veröffentlichung 2*).

10. *Pharmakologische Charakterisierung von NONOaten, NONOat-Prodrugs und anderer NO/NO_x-Donoren.*

Direkt freisetzende NO/NO_x-Donoren (NONOate, S-Nitrosothiole) sind durchweg sehr starke Vasodilatoren mit Wirkaktivitäten im unteren nanomolaren Bereich. Der Relaxationseffekt setzt im Vergleich zu Nitraten deutlich rascher ein, hält aber nur kurzzeitig an und ist vollständig reversibel. Die Verbindungen besitzen daher ein von den Nitraten vollständig abweichendes Wirkprofil und müssen als unterschiedliche Wirkstoffklassen betrachtet werden. Mittels Formulierung eines NO-Donor-Prodrugs ließ sich durch den vorgeschalteten Bioaktivierungsschritt eine geringere Wirkaktivität erzielen. Eine GTN-typische *in vitro* Toleranz wurde bei den Verbindungen nicht beobachtet, demnach besteht wie auch beim AEN keine Korrelation zwischen vasodilatorischer Potenz und *in vitro* Toleranzinduktion. Weiterhin wurde bei allen Substanzen ein sGC-abhängiger Mechanismus nachgewiesen (Kap. 5.2.; 5.3).

11. *Pharmakologische Charakterisierung von Nitrat-NSAID-Hybriden.*

NSAID-Nitrat-Hybridmoleküle, zusammengesetzt aus Flurbiprofen oder Indomethacin und PETN/PETriN/PEdiN/PEmoN in einem variierenden Verhältnis von 3:1 bis 1:3, besitzen eine durchweg schwächere Wirkaktivität als die Ausgangsnitrate. Der Einfluß unterschiedlicher Nitratgruppenanzahl im Hybridmolekül wird durch das sterisch anspruchsvolle Restmolekül abgeschwächt. Sowohl NSAID-Struktur (Flurbiprofen oder Indomethacin) als auch Anzahl (1-3) der gebundenen NSAID-Moleküle beeinflussen die vom Nitrat ausgehende Wirkung entscheidend (Kap. 5.5.).

8. Conclusion

Organic mononitrates, dinitrates, trinitrates, and tetranitrates are used for vasodilation in cardiovascular diseases such as stable and unstable angina pectoris. Neither therapeutic dosage of nitrovasodilator nor the development of tolerance correlate with the number of nitrate groups in the molecules. Clinically, low dosages of glyceryl trinitrate (GTN) develop tolerance, but 100-fold higher dosages of pentaerythrityl tetranitrate (PETN) do not. Vasorelaxation of officinal organic nitrates were studied on prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)-precontracted porcine pulmonary arteries in isometric tension studies. In contrast to the therapeutical dosages, the vasodilator potencies increased *in vitro* from mononitrates to tetranitrates (EC_{50} : 7 – 33200 nM), PETN was the most potent vasodilator. Porcine pulmonary arteries have shown to be very sensitive to organic nitrates and useful for further investigations.

Especially the results for PETN and its bioactive metabolites pentaerythrityl-trinitrate (PEtriN), -dinitrate (PEdiN), -mononitrate (PEmoN) demonstrate that the relaxation potency of the organic nitrates correlated strongly with the number of nitrate groups in the molecule. Similar results were obtained for GTN and its bioactive metabolites. The number of nitrate groups determines the vasorelaxant activity of organic nitrates with identical or similar nitrate carrier molecules. It was shown that the vasodilation of all nitrates tested was caused by activation of the soluble vascular guanylyl cyclase (sGC), no other mechanism was found. Furthermore the vasorelaxation of these nitrates was not endothelium mediated, since the concentration response curves in the endothelium-denuded vessels did not shift significantly compared to the vessels with intact endothelium, therefore an influence of the endothelium on structure-activity relationships can be excluded.

A set of 14 organic mononitrates were synthesized and the vasoactive properties were investigated. A surprisingly wide range of vasorelaxant potencies was observed (EC_{50} : 32 – 435000 nM). In contrast to the data from the experiments with PETN, GTN, and their bioactive metabolites the vasoactivity of the new mononitrates is highly sensitive to the molecular structure and the substituents on the molecular carrier of the nitrate group. A correlation between lipophilicity and vasorelaxant response could not be recognized. The mononitrate 2-Aminoethylnitrate (AEN) was found to be equipotent to the strong vasodilator GTN. Summarized, the nitrate-carrier structure proved to be more important than expected. The previously found correlation between the number of nitrate groups in

an organic nitrate and the vasodilator activity obviously affords quite similar nitrate carrier molecules without any vasomodulating effect.

Mitochondrial aldehydehydrogenase (ALDH-2) was recently identified for bioactivation of tetra- and trinitrates (PETN, PEtriN, GTN) but not for less potent nitrates like di- and mononitrates (PEdiN, PEmoN, ISDN, ISMN). To clarify the affinity of the high potent AEN for the ALDH-2, the vasorelaxant effect was measured using isolated aortic segments of wildtype and ALDH-2^{-/-} mice. The vasorelaxation in response to AEN was quite similar between ALDH-2^{-/-} and WT, no significant attenuation in ALDH-2^{-/-} mice was found. In general, ALDH-2 mediated relaxation by organic nitrates depends not on the vasoactivity, but rather on the number of nitrate groups. Organic mononitrates, inclusively AEN, are apparently biotransformed by other unknown pathways.

In the organ bath studies NO-Donors like diazeniumdiolates (NONOates) and S-nitrothiols proved to be strong vasodilators with nanomolar efficacies. In contrast to organic nitrates these compounds exhibit fast, short and reversible relaxant properties, tolerance-devoid activity could be demonstrated by comparing them to GTN. The lower activity of the Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO was related to bioactivation process.

In vitro tolerance studies allow primary insights in the complex mechanism of clinical tolerance without any pharmacokinetic or neurohumoral effects. Induction of *in vitro* tolerance was found with tetra- and trinitrates but not with di- and mononitrates. Obviously, development of *in vitro* tolerance increases with the number of nitrate groups in the molecule and to a lesser extent with the vasodilator potency of the nitrate or NO-donor because no *in vitro* tolerance was demonstrated for high potent vasodilators like AEN or NONOates. Consistent with the absence of tolerance, the high potent AEN does not induce the formation of reactive oxygen species, which is an evidence for oxidative stress during nitrate treatment. In addition, it is suggested that the partially denitrated metabolites PEdiN and PEmoN contribute to the moderate and tolerance-devoid clinical activity of the drug PETN.

Novel NSAID-nitrate-hybrid molecules with molar NSAID:nitrate ratios ranging from 3:1 to 1:3 are potential antiamyloidogenic and antiinflammatory agents. These compounds are weaker vasodilators compared to the origin nitrates. Their vasodilator activities do not correlate with the number of nitrate moieties, instead the nature (flurbiprofen, indomethacin) and the number (1-3) of connected NSAID-molecules affect the vasorelaxant response.

In conclusion, organic nitrates showed to be a more heterogeneous group of bioactive compounds than to be expected from literature.

9. Literaturverzeichnis

1. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D. European Society of Cardiology. American Heart Association. American College of Cardiology. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Atherosclerosis* (2004), 173, 381-91.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg). Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut, Berlin (2006).
3. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* (2007), 6. Aufl.
4. Silber S, Albertsson P, Aviles FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, Jorgensen E, Marco J, Nordrehaug JE, Ruzyllo W, Urban P, Stone GW, Wijns W. Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* (2005), 26, 804-47.
5. Lenzen MJ, Boersma E, Bertrand ME, Maier W, Moris C, Piscione F, Sechtem U, Stahle E, Widimsky P, de Jaegere P, Scholte op Reimer WJ, Mercado N, Wijns W. European Society of Cardiology. Management and outcome of patients with established coronary artery disease in the Euro Heart Survey on coronary revascularization. *Eur Heart J* (2005), 26, 1169-79.
6. Daly CA, Clemens F, Sendon JL, Tavazzi L, Boersma E, Danchin N, Delahaye F, Gitt A, Julian D, Mulcahy D, Ruzyllo W, Thygesen K, Verheugt F, Fox KM. Euro Heart Survey Investigators. The initial management of stable angina in Europe: a description of pharmacological management and revascularization strategies initiated within the first month of presentation to a cardiologist in the Euro Heart Survey of Stable Angina. *Eur Heart J* (2005), 26, 1011-22.
7. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Forth W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier, München* (2005), 9. Aufl.
8. Sobrero MA. Sur plusieurs composes detonants produits avec l'acide nitrique et de le surce, la dextrine, la mannite et la glycerine. *CR Acad Sci* (1847), 25, 247-8.

9. Lehmann J. NO-Donoren - Übersicht und neuere Entwicklungen. In: Mutschler E, Schneider D, Stalleicken D (Hrsg.). Pentaerithryltetranitrat, NO-Substitution als pharmakologisch begründetes Therapieprinzip. *Steinkopff, Darmstadt* (2000).
10. Online: http://nobelprize.org/alfred_nobel/biographical/articles/life-work/sobrero.html
11. Hering C. Glonoine, a new medicine for headache etc. *Am J Homeopathy* (1849), 4,3.
12. Fye WB. Nitroglycerin: a homeopathic remedy. *Circulation* (1986), 73, 21-9.
13. Field AG. On the toxic and medicinal properties of nitrate of oxyde of glycycl. *Med Times Gazette* (1858) 16, 291-6.
14. Fye WB. T. Lauder Brunton and amyl nitrite: a Victorian vasodilator. *Circulation* (1986), 74, 222-9.
15. Brunton TL. On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* (1867), 90, 97-8.
16. Murrell W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* (1879), 113, 80-1, 113-5, 151-2, 225-7.
17. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2000), 27, 313-9.
18. Gorlin R, Brachfeld N, MacLeod C, Bopp P. Effect of nitroglycerin on the coronary circulation in patients with coronary artery disease or increased left ventricular work. *Circulation* (1959), 19, 705-18.
19. Bradbury JB. The bradshaw lecture on some new vaso-dilators. *Lancet* (1895), 146, 1205-13.
20. Carr CJ, Musser R, Schmidt JE Krantz JC Jr. The fate of mannitol and mannitan in the animal body. *J Biol Chem* (1933), 102, 721-32.
21. Carr CJ, Krantz JC Jr. Sugar Alcohols. XII. The fate of polygalitol and mannitol in the animal body. *J Biol Chem* (1938), 121, 221-7.
22. Carr CJ. History of the synthesis and pharmacology of isosorbide dinitrate. *Am Heart J* (1985), 110, 197-201.
23. Treon JF, Gongwer LE, Rueggeberg WH. Isosorbide, a new oral osmotic diuretic. *Proc Soc Exp Biol Med* (1965), 119, 39-42.
24. Krantz JC Jr, Carr CJ, Forman S, Ellis FW. Alkyl nitrites III. A pharmacologic study of a new series of organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* (1939), 67, 187-90.
25. Krantz JC Jr, Carr CJ, Forman S, Ellis FW. Alkyl nitrites IV. The pharmacology of isomannide dinitrate. *J Pharmacol Exp Ther* (1939), 67, 191-200.
26. Goldberg L. Pharmacological properties of sorbide dinitrate. *Acta Phys Scandinav* (1948), 15, 173-87.

27. Vignon L, Gerin F. Derives nitres de l'arabite et de la rhammite; constitution de certains ethers nitriques. *Comt rend Acad sc URSS* (1901), 133, 641-4.
28. Takeshita K. The depressor action of hasethrol. *Jikken Yakubutsugaku Zasshi* (1937), 14, 481-6.
29. Bjerlöv H. Nitropent, ett nytt medel mot angina pectoris. *Svenska Läkartidn* (1943), 40, 694-7.
30. Fisch S. Antianginal Drugs. Part IV. The long-acting nitrates. *Am Heart J* (1966), 71, 712-3.
31. Heller EM. Triethanolamine trinitrate (metamine) in the treatment of angina pectoris; a long-term study. *Can Med Assoc J* (1956), 74, 197-204.
32. Ruskin A. Effects of erythrol tetranitrate and amotriphene on exercise tolerance tests in angina pectoris. *Circulation* (1961), 23, 681-4.
33. Burgison RM, Ling JSL, Rudo F, Krantz JC Jr. Nitrites XVII. Tetrahydroxyethylethylenediamine tetranitrate as a coronary artery dilator. *Toxicol Appl Pharmacol* (1962), 4, 116-22.
34. Krantz JC Jr, Lu GG, Bell FK, Cascorbi HF. Nitrites. XIX. Studies of the mechanism of action of glyceryl trinitrate. *Biochem Pharmacol* (1962), 11, 1095-9.
35. Romano M, Indolfi C, Ascoli R, Chiariello M, Condorelli M. Reduction in cardiac preload and improved exercise tolerance after tenitramine in stable angina: a double-blind placebo-controlled-study. *Curr Ther Res* (1984), 36, 171-80.
36. Online: <https://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>
37. List of pharmaceutical substances. *ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn* (1996), 10. Aufl.
38. Needleman P, Krantz JC Jr. The biotransformation of nitroglycerin. *Biochem Pharmacol* (1965), 14, 1225-30.
39. Di Carlo FJ, Crew MC, Coutinho CB, Haynes LJ, Sklow NJ. The absorption and biotransformation of pentaerythritol tetranitrate-1,2¹⁴C by rats. *Biochem Pharmacol* (1967), 16, 309-16.
40. Needleman P, Lang S, Johnson EM Jr. Organic nitrates: relationship between biotransformation and rational angina pectoris therapy. *J Pharmacol Exp Ther* (1972), 181, 489-97.
41. Dietz AJ Jr. The biotransformation of isosorbide dinitrate in dogs and humans. *Biochem Pharmacol* (1967), 16, 2447-8.
42. Sisenwine SF, Ruelius HW. Plasma concentrations and urinary excretion of isosorbide dinitrate and its metabolites in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* (1971), 176, 296-301.

43. Taira N, Satoh K, Yanagisawa T, Imai Y, Hiwatari M. Pharmacological profile of a new coronary vasodilator drug, 2-nicotinamidoethyl nitrate (SG-75). *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1979), 6, 301-16.
44. Frampton J, Buckley MM, Fitton A. Nicorandil. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in angina pectoris. *Drugs* (1992), 44, 625-55.
45. IONA Study Group. Effect of Nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the impact of nicorandil in angina (IONA) randomised trial. *Lancet* (2002), 359, 1269-75.
46. Simpson D, Wellington K. Nicorandil: a review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. *Drugs* (2004), 64, 1941-55.
47. Online: <http://www.rote-liste.de>
48. Higa M, Takasu N, Tamanaha T, Nakamura K, Shimabukuro M, Sasara T, Tawata M. Nitroglycerin spray rapidly improves pain in a patient with chronic painful diabetic neuropathy. *Diabet Med* (2004), 21, 1053-4.
49. Lauretti GR, Perez MV, Reis MP, Pereira NL. Double-blind evaluation of transdermal nitroglycerine as adjuvant to oral morphine for cancer pain management. *J Clin Anesth* (2002), 14, 83-6.
50. Lindsey I, Jones OM, Cunningham C, Mortensen NJ. Chronic anal fissure. *Br J Surg* (2004), 91, 270-9.
51. Baxter K, Howden BO, Jablonski P. Heart preservation with celsior solution improved by the addition of nitroglycerine. *Transplantation* (2001), 71,1380-4.
52. Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Sasaki T, Ebihara S, Kanda A, Asada M, Inoue D, Suzuki T, Okazaki T, Takahashi H, Yoshida M, Kaneta T, Ishizawa K, Yamanda S, Tomita N, Yamasaki M, Kikuchi A, Kubo H, Sasaki H. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV nonsmall-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2006), 24, 688-94.
53. Schönafinger K. Heterocyclic NO prodrugs. *Farmaco* (1999), 54, 316-20.
54. Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungsreport 2006. *Springer Verlag, Berlin* (2006), 1. Aufl.
55. Nakamura Y, Moss AJ, Brown MW, Kinoshita M, Kawai C. Long-term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease: A study using the databases from two large-scale postinfarction studies. *Am Heart J* (1999), 138, 577-85.
56. Kanamasa K, Hayashi T, Kimura A, Ikeda A, Ishikawa K. Long-term, continuous treatment with both oral and transdermal nitrates increases cardiac events in healed myocardial infarction patients. *Angiology* (2002), 53, 399-408.

57. Fink B, Bassenge E. Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythryl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* (1997), 30, 831-6.
58. Jurt U, Gori T, Ravandi A, Babaei S, Zeman P, Parker JD. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *J Am Coll Cardiol* (2001), 38, 854-9.
59. Pfaffenrath V, de la Motte S, Harrison F, R uthning C. Effect of pentaerythritol tetranitrate, isosorbide mononitrate and placebo on the headache and on the ability to work of healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* (1998), 48, 646-50.
60. Lehmann G, Hahnel I, Reiniger G, Lampen M, Beyerle A, Schomig A. Infusions with molsidomine and isosorbide-5-mononitrate in congestive heart failure: mechanisms underlying attenuation of effects. *J Cardiovasc Pharmacol* (1998), 31, 212-20.
61. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* (1978), 9, 145-58.
62. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977), 74, 3203-7.
63. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* (1980), 288, 373-6.
64. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987), 327, 524-6.
65. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987), 84, 9265-9.
66. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* (2007), 151, 305-21.
67. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* (1992), 258, 1861.
68. Online: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/index.html
69. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* (2004), 24, 452-74.
70. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* (2000), 87, 999-1005.

71. Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1995), 352, 351-64.
72. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* (2006), 5, 755-68.
73. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol* (1995), 48, 184-8.
74. Olesen SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R, Mülsch A. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* (1998), 123, 299-309.
75. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol* (1993), 45, 367-74.
76. Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and etalloporphyrins: a unifying concept. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* (1984), 17, 267-74.
77. Mulsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* (1997), 120, 681-9.
78. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* (2001), 410, 212-5.
79. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* (2001), 1, 1-13.
80. Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* (2006), 69, 1260-8.
81. Schmidt PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* (2004), 279, 3025-32.

82. Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* (2007), 100, 309-27.
83. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G; Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* (2005), 353, 2148-57.
84. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm Res* (1989), 6, 651-9.
85. Marks GS, McLaughlin BE, Nakatsu K, Brien JF. Direct evidence for nitric oxide formation from glyceryl trinitrate during incubation with intact bovine pulmonary artery. *Can J Physiol Pharmacol* (1992), 70, 308-11.
86. Gorren AC, Russwurm M, Kollau A, Koesling D, Schmidt K, Mayer B. Effects of nitroglycerin/L-cysteine on soluble guanylate cyclase: evidence for an activation/inactivation equilibrium controlled by nitric oxide binding and haem oxidation. *Biochem J* (2005), 390, 625-31.
87. Feelisch M, Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1991), 180, 286-93.
88. Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, Schulz E, Sydow K, Fichtlscherer B, Mulsch A, Munzel T. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* (2003), 93, e104-12.
89. Wanstall JC, Jeffery TK, Gambino A, Lovren F, Triggle CR. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol* (2001), 134, 463-72.
90. Garcia-Pascual A, Costa G, Labadia A, Jimenez E, Triguero D. Differential mechanisms of urethral smooth muscle relaxation by several NO donors and nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1999), 360, 80-91.
91. Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Müller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* (2002), 4, 307-11.
92. Meurer S, Pioch S, Wagner K, Muller-Esterl W, Gross S. AGAP1, a novel binding partner of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *J Biol Chem* (2004), 279, 49346-54.

93. Artz JD, Toader V, Zavorin SI, Bennett BM, Thatcher GR. In vitro activation of soluble guanylyl cyclase and nitric oxide release: a comparison of NO donors and NO mimetics. *Biochemistry* (2001), 40, 9256-64.
94. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* (2005), 97, 618-28.
95. Needleman P, Jakschik B, Johnson EM Jr. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* (1973), 187, 324-31.
96. Needleman P, Hunter FE Jr. The transformation of glyceryl trinitrate and other nitrates by glutathione-organic nitrate reductase. *Mol Pharmacol* (1965), 1, 77-86.
97. Torfgard KE, Ahlner J. Mechanisms of action of nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther* (1994), 8, 701-17.
98. Haefeli WE, Srivastava N, Kelsey KT, Wiencke JK, Hoffman BB, Blaschke TF. Glutathione S-transferase mu polymorphism does not explain variation in nitroglycerin responsiveness. *Clin Pharmacol Ther* (1993), 53, 463-8.
99. Brien JF, McLaughlin BE, Kobus SM, Kawamoto JH, Nakatsu K, Marks GS. Mechanism of glyceryl trinitrate-induced vasodilation. I. Relationship between drug biotransformation, tissue cyclic GMP elevation and relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* (1988), 244, 322-7.
100. Chen Z, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med* (2006), 16, 259-65.
101. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99, 8306-11.
102. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, Wendt M, Kleschyov AL, Stalleicken D, Ullrich V, Mulsch A, Munzel T. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol* (2004), 66, 1372-82.
103. Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *J Biol Chem* (1972), 247, 267-72.
104. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, Ho KK, Weiner H, Bachschmid M, Münzel T, Daiber A. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem* (2007), 282, 792-9.
105. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites,

- nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* (1981), 218, 739-49.
106. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992), 89, 7674-7.
 107. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* (1999), 454, 127-30.
 108. Brudvig GW, Stevens TH, Chan SI. Reactions of nitric oxide with cytochrome c oxidase. *Biochemistry* (1980), 19, 5275-85.
 109. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest* (2005), 115, 2099-107.
 110. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT, Stamler JS. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005), 102, 12159-64.
 111. Li Y, Zhang D, Jin W, Shao C, Yan P, Xu C, Sheng H, Liu Y, Yu J, Xie Y, Zhao Y, Lu D, Nebert DW, Harrison DC, Huang W, Jin L. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest* (2006), 116, 506-11.
 112. Mulsch A, Bara A, Mordvintcev P, Vanin A, Busse R. Specificity of different organic nitrates to elicit NO formation in rabbit vascular tissues and organs in vivo. *Br J Pharmacol* (1995), 116, 2743-9.
 113. Feelisch M, Noack E, Schroder H. Explanation of the discrepancy between the degree of organic nitrate decomposition, nitrite formation and guanylate cyclase stimulation. *Eur Heart J* (1988), 9 Suppl A, 57-62.
 114. Bennett BM, McDonald BJ, St James MJ. Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J Pharmacol Exp Ther* (1992), 261, 716-23.
 115. Minamiyama Y, Takemura S, Yamasaki K, Hai S, Hirohashi K, Funae Y, Okada S. Continuous administration of organic nitrate decreases hepatic cytochrome P450. *J Pharmacol Exp Ther* (2004), 308, 729-35.
 116. Minamiyama Y, Takemura S, Akiyama T, Imaoka S, Inoue M, Funae Y, Okada S. Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett* (1999), 452, 165-9.

117. Minamiyama Y, Takemura S, Nishino Y, Okada S. Organic nitrate tolerance is induced by degradation of some cytochrome P450 isoforms. *Redox Rep* (2002), 7, 339-42.
118. Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
119. Munzel T, Kurz S, Heitzer T, Harrison DG. New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol* (1996), 77, 24C-30C.
120. Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* (2000), 86, E7-E12.
121. Daiber A, Oelze M, Sulyok S, Coldewey M, Schulz E, Treiber N, Hink U, Mülsch A, Scharffetter-Kochanek K, Münzel T. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice (Mn-SOD^{+/-}): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. *Mol Pharmacol* (2005), 68, 579-88.
122. Rote Liste 2001. *ECV für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf* (2001).
123. Abuo-Rahma Gel D, Horstmann A, Radwan MF, El-Emam A, Glusa E, Lehmann J. NO-donors. Part 9: diazeniumdiolates inhibit human platelet aggregation and induce a transient vasodilatation of porcine pulmonary arteries in accordance with the NO-releasing rates. *Eur J Med Chem.* (2005), 40, 281-7.
124. Homer KL, Wanstall JC. Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* (2000), 131, 673-82.
125. Konter J, Abuo-Rahma GEAA, El-Emam A, Lehmann J. Synthesis of diazen-1-ium-1,2-diolates monitored by the "NOtizer" apparatus: relationship between formation rates, molecular structure and the release of nitric oxide. *Eur J Org Chem* (2007), 4, 616-24.
126. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Seeling A, Isse T, Bruns K, Steinhoff L, Brandt M, Kleschyov AL, Schulz E, Lange K, Weiner H, Lehmann J, Lackner KJ, Kawamoto T, Münzel T, Daiber A. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2^{-/-} mice. *Br J Pharmacol* (2007), 150, 526-33.
127. Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, Nakayama K. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of

- methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett* (2000), 476, 306-11.
128. Münzel T, Harrison DG. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med* (1997), 75, 891-900.
129. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, Kleschyov AL, Munzel T. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic Res* (2004), 38, 259-69.
130. Oberle S, Schwartz P, Abate A, Schröder H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1999), 261, 28-34.
131. Tzeng TB, Fung HL. Structure activity relationship of organic nitrates: an exploratory hypothesis via molecular models. *Med Hypotheses* (1992), 37, 58-62.
132. Oberle S, Schwartz P, Abate A, Schröder H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1999), 261, 28-34.
133. Noack E. Investigation on structure-activity relationship in organic nitrates. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* (1984), 6, 583-6.
134. Berthmann A, Ratz H. Allgemeine Gesichtspunkte bei der Herstellung von Salpetrig- und Salpetersäureestern. In: E. Bayer, A. Berthmann and A. Hausweiler, Editors, *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie Vol. 6*, Thieme, Stuttgart (1963), p. 329-59.
135. Emmons WD, Freeman JP. The synthesis of diketones from nitratoketones. *J Am Chem Soc* (1955), 77, 4415-16.
136. Bovet D, Bovet-Nitti F, Montezin G. Activités hypotensives et vasodilatatrices des esters nitriques d'aminoalcools. *Soc Biol* (1946), 140, 292-4.
137. Abe K, Yamada M, Terao T, Mizuno H, Matsuoka Y, Yorikane R, Tokui T, Ikeda T. Novel organic nitrate prodrug 4(R)-N-(2-Nitroxyethyl)-2-oxothiazolidine-4-carboxamide (RS-7897) serves as a xenobiotic substrate for pyroglutamyl aminopeptidase I in dogs. *Drug Metab Pharmacokinet* (2003), 18, 373-80.
138. Seeling A, Lehmann J. NO-donors, part X [1] : investigations on the stability of pentaerythryl tetranitrate (PETN) by HPLC-chemoluminescence-N-detection (CLND) versus UV-detection in HPLC. *J Pharm Biomed Anal* (2006), 40, 1131-6.
139. Konter J, Möllmann U, Lehmann, J. NO donors, part 17: synthesis, and antimicrobial activity of novel ketoconazol-NO-donor hybrid drugs and corresponding nitric oxide donors. *Bioorg Med Chem* (2007), submitted.

140. Fang L, Appenroth D, Decker M, Kiehntopf M, Roegler C, Deufel T, Fleck C, Peng S, Zhang Y, Lehmann J. Synthesis and Biological Evaluation of NO-Donor-Tacrine Hybrids as Hepatoprotective Anti-Alzheimer Drug Candidates. *J Med Chem* (2007), *submitted*.
141. Shirasaki Y, Su C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur J Pharmacol* (1985), 114, 93-6.
142. Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, Münzel T, Ertl G, Bauersachs J. Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007), 27, 748-54.
143. Wenzel P, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, Mollnau H, Stalleicken D, Weiner H, Lehmann J, Li H, Förstermann U, Münzel T, Daiber A. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007), 27, 1729-35.
144. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med* (1998), 338, 520-31.
145. Dragoni S, Gori T, Lisi M, Di Stolfo G, Pautz A, Kleinert H, Parker JD. Pentaerythryl tetranitrate and nitroglycerin, but not isosorbide mononitrate, prevent endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007), 27, 1955-9.
146. Suvorava T, Kojda G. Prevention of transient endothelial dysfunction in acute exercise: a friendly fire? *Thromb Haemost* (2007), 97, 331-3.
147. Davidson IW, Rollins FO, DiCarlo FJ, Miller HS Jr. The pharmacodynamics and biotransformation of pentaerythritol trinitrate in man. *Clin Pharmacol Ther* (1971) 12, 972-81.
148. Davidson IW, Miller HS Jr, DiCarlo FJ. Absorption, excretion and metabolism of pentaerythritol tetranitrate by humans. *J Pharmacol Exp Ther* (1970), 175, 42-50.
149. Weber W, Michaelis K, Luckow V, Kuntze U, Stalleicken D. Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerithryl tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneimittelforschung* (1995), 45, 781-4.
150. Stalleicken D. Pentaerithryltetranitrat – Therapierelevanter Wissensstand zu Pharmakologie und Klinik. *Steinkopff Verlag, Darmstadt* (2007),. 3. Aufl.

Publikationsverzeichnis

Pharmakologische Charakterisierung von Pentaerithryltetranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten und anderen organischen Nitraten an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins.

König, Andreas; Pietig, Imke; Homann, Alexander; Glusa, Erika; Fricke, Uwe; Lehmann, Jochen. In: ERDMANN, E.; MUTSCHLER, E.; STALLEICKEN, D. (Hrsg.): Pentaerithryltetranitrat: Evidenzorientiertes Therapiekonzept kardialer Erkrankungen. *Steinkopff Verlag, Darmstadt (2004)*, 59-68.

Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol.

Decker, Michael; König, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2004)*, 14, 4995-7.

Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythryl tetranitrate.

König, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Jörg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Journal of Cardiovascular Pharmacology (2007)*, 50, 68-74.

NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.

König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007)*, 17, 5881-5.

NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.

Lange, Kathrin; König, Andreas; Roegler, Carolin; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. In Vorbereitung.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität als Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, im Januar 2008