

Efecto de Piridazino (4-5-b)indoles en Tromboxano Sintetasa. Nuevos inhibidores selectivos. Antiagregantes Plaquetarios

A. MONGE*, I. ALDANA*, A. ERRO*, P. PARRADO*, M. FONT*,

E. ROCHA**, I. PRIETO***, M. FREMONT-SMITH***

*Departamentos de Química Orgánica y Farmacéutica**,

*Hematología** e Investigaciones Médicas***,*

Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, Pamplona, España

y E. FERNANDEZ-ALVAREZ

Centro Nacional de Química Orgánica, C/Juan de la Cierva, N° 3, Madrid 6, España

RESUMEN. Se han realizado los ensayos como inhibidores selectivos de Tromboxano Sintetasa de siete compuestos de estructura relativa a piridazino (4,5-b)indol. La inhibición en la segunda onda de agregación inducida en plaquetas humanas por ADP, en la inducida por ácido araquidónico y por prostaglandina H₂ (PGH₂), así como en la producción de Tromboxano B₂ (TXB₂), han permitido determinar que dos de estos compuestos, 3,4-dihidro-4-oxo-5H-piridazino (4,5-b)indol (I) y 3,4-dihidro-4-oxo-5H-8-benciloxi-piridazino (4,5-b)indol (VII), son nuevos inhibidores selectivos de este sistema enzimático.

SUMMARY. Assays were performed which identified seven compounds with the general structure indol-piridazine (4,5-b) as selective inhibitors of Thromboxane Synthetase. Compounds whose activities includes inhibition of human platelet aggregation induced by Arachidonic acid (AA) and Prostaglandin H₂ (PGH₂), and inhibition of the second wave of platelet aggregation induced by ADP, were subjected to radioimmunoassay studies to measure TXB₂ and PGE₂ levels in the samples using AA as the aggregating agent. This work has determined that two of the compounds, 3,4-dihydro-4-oxo-5H-pyridazino-(4,5-b)indole (I) and 3,4-dihydro-4-oxo-5H-8-benzylxyppyridazino (4,5-b)indole (VII), are new selective inhibitors of this enzymatic system.

Se conoce de muchos compuestos su propiedad de inhibir las funciones plaquetarias y muy concretamente su capacidad de agregación¹⁻⁶. Esta observación ha dado lugar a la aparición de una interesante y alternativa línea de investigación referente a la terapia anticoagulante^{5,6}.

El papel de las plaquetas en la formación de trombos, así como el efecto de adenosín-difosfato (ADP) en su agre-

gación está muy documentado y se conoce desde antiguo⁷. Diversas sustancias capaces de inhibir esa agregación han sido investigadas en profundidad⁸, sin que por el momento se encuentren establecidas relaciones entre estructura química y actividad biológica.

Más recientemente se ha establecido la gran significación biológica y terapéutica de prostaciclina, encontrándose que esta prostaglandina es el más potente

PALABRAS CLAVE: Inhibidores de la agregación plaquetaria, inhibidores de Tromboxano Sintetasa, agentes agregantes: adenosina-5'-difosfato, ácido araquidónico y prostaglandina H₂
KEY WORDS: *Inhibitors of blood platelet aggregation. Thromboxane Synthetase inhibitors, aggregating agents: adenosine-5'-diphosphate, arachidonic acid and prostaglandin H₂*

inhibidor de todas las formas de agregación de plaquetas⁸.

Este descubrimiento anterior ha llevado al planteamiento de una más eficaz terapia anticoagulante mediante inhibidores selectivos de Tromboxano-sintetasa. Esta inhibición selectiva supone reducir la actividad de Tromboxano-A₂ (TXA₂), un potente agregante y vasoconstrictor, y un aumento en la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂)^{9,10}.

Este trabajo es parte de una serie y supone el estudio de siete derivados de (4,5-b) piridazinoindol. Los compuestos han sido descritos con anterioridad por nosotros¹¹ (ver parte experimental).

La demostración de actividad selectiva en los compuestos que se presentan se determinó de acuerdo con el modelo de Gorman: inhibición de la segunda onda en la agregación inducida por ADP, inhibición en la agregación inducida por ácido araquidónico (AA) y PGH₂ y aumento en la producción de PGE₂ en la agregación inducida por AA, con la consiguiente inhibición en la producción de TXB₂¹².

DISCUSION

Los ensayos de agregación se han realizado en piridazino (4,5-b)indoles previamente descritos por nosotros (ver parte experimental).

Estos ensayos se plantearon como consecuencia de observaciones publicadas con anterioridad, en los que se ponía de manifiesto la importancia del anillo de indol en este tipo de actividad¹³. En todos los casos se trataba de indoles sustituidos en posición dos del anillo. La actividad encontrada en 2-isopropil-3-nicotinilindol (L-8027)¹⁴, un indol 2,3 disustituido, unido a la actividad observada en indol-2-carbonil hidrazidas² nos llevó a plantear este trabajo, que supone la for-

mación de un sistema de piridazina en el enlace (b) del anillo de indol y por lo tanto relacionable con los sistemas 2,3-disustituidos.

Los ensayos se realizaron sobre sangre de voluntarios aparentemente sanos de entre 17 y 23 años de edad (30 mujeres y 13 hombres). El primer paso fue seleccionar aquellos donantes que presentaban una curva de agregación frente a ADP en la que fuese fácilmente determinable la segunda onda (Figura 1). Solamente veintitrés personas (18 mujeres y 5 hombres) presentaron la curva adecuada.

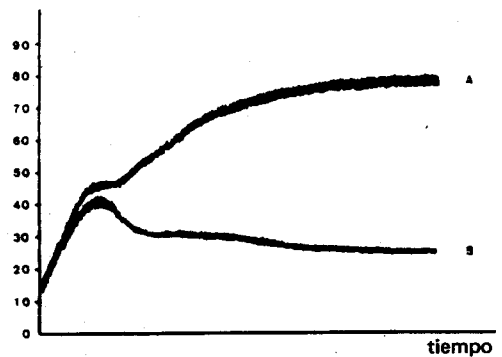


Figura 1. Estudio de la acción que produce la agregación plaquetaria inducida por ADP sobre plasma de donantes aparentemente sanos.
A. Donantes que presentan doble onda de agregación.
B. Donantes que no presentan dicha doble onda.

Las condiciones del ensayo se determinaron en razón de observaciones realizadas con anterioridad. Se utiliza etilenglicol al 1,0% en suero fisiológico como disolvente. A esta concentración el etilenglicol no tenía efecto sobre la agregación. El tiempo de incubación elegido fue de 5 y 60 minutos en función de observaciones realizadas también con anterioridad por nosotros, según las cuales se puede establecer una cierta dependencia en función del tiempo. Se puede observar (Tabla 1)

Compuestos	R ₁	R ₅	R ₈	Concentración final		% de inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ^a :					
				M	M	ADP-II ^b	ADP-II ^c	AA ^b	AA ^c	PGH ₂ ^b	PGH ₂ ^c
I	H	H	H	10 ⁵	10 ⁵	100	100	100	100	100	100
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	100	100	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	100	100	0	0	—	—
II	OH	H	H	10 ⁵	10 ⁵	100	100	0	0	0	—
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	0	100	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	62	0	0	—	—
III	H	H	OH	10 ⁵	10 ⁵	87	100	0	0	0	—
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	0	100	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	43	0	0	—	—
IV	H	CH ₃	H	10 ⁵	10 ⁵	0	0	0	0	0	—
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
V	CH ₃	H	H	10 ⁵	10 ⁵	37,5	100	0	0	0	—
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
VI	PCIC ₆ H ₄ --	H	H	10 ⁵	10 ⁵	0	23	0	0	0	—
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	0	0	0	—	—
VII	H	H	B ₂ O	10 ⁵	10 ⁵	60	100	100	100	100	100
				5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	40	80	0	0	—	—
				10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0	20	0	0	—	—

^a Los ensayos fueron efectuados sobre 8 muestras distintas de plasma en personas aparentemente sanas, sin incluir valores máximos y mínimos. ^b PRP incubado durante 5 min a 37° C. ^c PRP incubado durante 60 min a 37° C. B₂O = C₆H₅CH₂O—

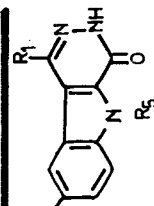


Tabla 1. Efectos de 4-oxo-piridazino-(4,5-b)indoles en la agregación plaquetaria

que algunos compuestos a los 5 minutos no presentaron actividad antiagregante mientras que a los 60 minutos esta actividad en la agregación inducida por ADP pasaba a ser significativa. Similares observaciones se pueden hacer a la inhibición de la agregación producida por el ácido acetilsalicílico (ASA) que se toma como referencia. Es de notar, a este respecto, el diferente comportamiento de los plasmas frente a ASA en función del tiempo de preincubación utilizado. De forma que en tanto a los 60 minutos todos los plasmas presentaron segunda onda de agregación inducida por ADP y quedaron inhibidos por ASA 10^{-4} M, a los 5 minutos este efecto solamente se producía en el 40% de los plasmas ensayados.

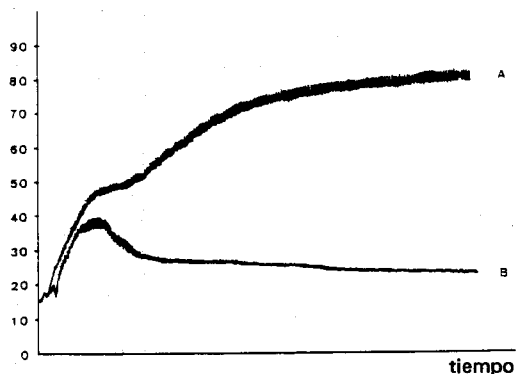


Figura 2. Estudio de la acción que producen los distintos compuestos sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, con un tiempo de incubación de 60 min a 37° C.

- A. Control etilenglicol-suero fisiológico al 10%
- B. Inhibición que presentan los compuestos a concentración final de 10^{-5} M

Los compuestos I, II, III, V y VII presentaron actividad antiagregante frente a ADP (Figura 2, Tabla 1) y posteriormente fueron ensayados frente a la agregación inducida por AA a 5 y 60 minutos de incubación. De los siete, solamente dos resultaron ser activos a las concen-

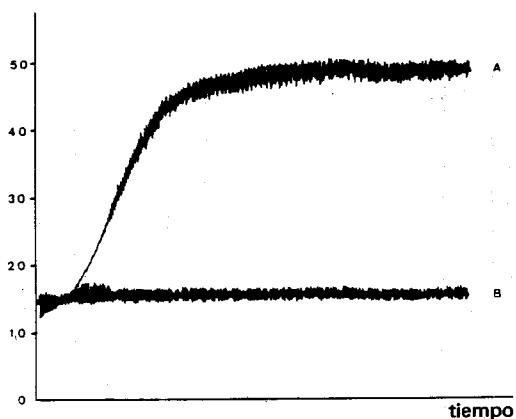


Figura 3. Estudio de la acción que producen los compuestos frente a la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico con un tiempo de incubación de 60 min a 37° C

- A. Control etilenglicol-suero fisiológico al 10%
- B. Inhibición que presentan los compuestos a concentración final de 10^{-5} M

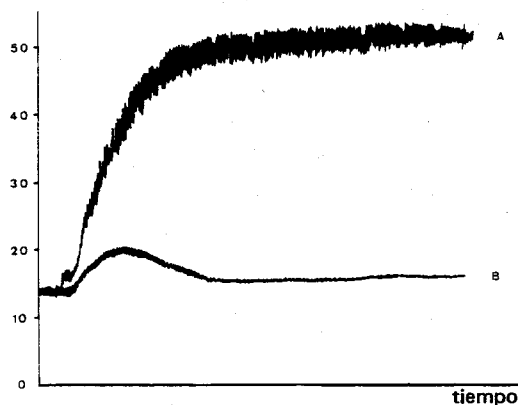


Figura 4. Estudio de la acción que producen los compuestos frente a la agregación plaquetaria inducida por PGH₂ con un tiempo de incubación de 60 min a 37° C

- A. Control etilenglicol-suero fisiológico al 10%
- B. Inhibición que presentan los compuestos a concentración final de 10^{-5} M

traciones indicadas frente a AA, concretamente 3,4-dihidro-4-oxo-5H-piridazino (4,5-b)indol (I) y 3,4-dihidro-4-oxo-5H-8-benciloxi-piridazino (4,5-b)indol (VII) (Tabla 1) que lo fueron a 10^{-5} M (Fig. 3)

Compuestos	R ₁	R ₅	R ₈	Concentración	% incremento	% inhibición
				final M	PGE ₂	TXB ₂
I	H	H	H	10 ⁻⁵	2,4	36
				5.10 ⁻⁶	0	0
				10 ⁻⁶	0	0
VII	H	H	BzO	10 ⁻⁵	270,4	48,7
				5.10 ⁻⁶	0	0
				10 ⁻⁶	0	0

Tabla 2. Efecto que producen los 4-oxo-piridazino-(4,5-b)indoles más activos de la Tabla 1 sobre la producción de TXB₂ y PGE₂ en la agregación plaquetaria inducida por AA.

Los PRP (Plasma rico en plaquetas) de los compuestos I y VII fueron estudiados por radioinmunoensayo después de la agregación inducida por AA. Se determina ahora los niveles de TXB₂, (forma estable de TXA₂) y de PGE₂. Para estos compuestos y a la concentración de 10⁻⁵ M el aumento de PGE₂ con respecto al control es de 2,4% y de 270,4% respectivamente; en tanto que la inhibición de TXB₂ con respecto al control fue de 36% y 48,7% respectivamente (Tabla 2).

Así mismo los compuestos I y VII presentaron una inhibición del 100% frente a la agregación inducida por PGH₂ (Figura 4, Tabla 1).

Estos compuestos I y VII que presentaron actividad antiagregante importante están estrechamente relacionados con (L-8027), según nuestra hipótesis inicial de trabajo.

Los resultados obtenidos permiten asegurar que nos encontramos frente a un nuevo tipo de compuestos inhibidores de tromboxano sintetasa y en consecuencia selectivos.

PARTE EXPERIMENTAL

La sangre fue obtenida del antebrazo de personas aparentemente sanas y

recogida en tubos de polietileno conteniendo un volumen de 1:9 de citrato sódico 3,8%.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación a 800 rpm durante 10 minutos y se ajustó con plasma pobre en plaquetas (PPP) a 200.000 plaquetas/mm³.

El plasma PPP se obtuvo por centrifugación de sangre citrada a 4.000 rpm durante 8 minutos.

Los compuestos fueron obtenidos con anterioridad por ciclación de indoles sustituidos a piridazino (4,5-b)indoles (I¹⁵, II¹⁶, III¹⁷, IV¹⁷, V¹⁸, VI¹⁸, VII¹⁷).

Como disolvente se utilizó etilenglicol-suero fisiológico a concentración final de 1%.

Los agentes agregantes fueron ADP (2 x 10⁻⁵ M), AA (1,3 mM) y PGH₂ (2,8 μM).

La agregación fue medida según el método descrito por Born y Cross¹⁹ utilizando un agregómetro de doble canal.

En el ensayo, 0,1 ml del compuesto se disuelven en 0,9 ml de etilenglicol-suero fisiológico al 10%, obteniéndose una concentración 10⁻⁵ M. De esta solución se toman 0,05 ml y se añaden a 0,4 ml de PRP contenidos en un tubo de po-

lietileno. Las plaquetas con el compuesto se incubaron 5 ó 60 minutos a 37° C y en este momento se añade el agente agregante (0,05 ml). Las concentraciones finales fueron de 10^{-5} , 5.10^{-6} y 10^{-6} M.

Las determinaciones de PGE₂ y TXB₂ se realizaron en las muestras de los compuestos que presentaron inhibición de agregación por radioinmunoen-

sayo, de acuerdo con métodos descritos con anterioridad²⁰.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo ha sido patrocinado por el Instituto Nacional de la Salud de España (INSALUD).

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a cuarenta y tres amigos que han colaborado de forma desinteresada donando su sangre para hacer posible este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Genua, M. I., J. Giraldez, E. Rocha, y A. Monge (1980) *J. Pharm. Sci.* 69: 1282-4
2. Monge, A., I. Genua, J. A. Palop, M. T. Martínez, F. Roldan y J. Fernández (1978) *J. Pharm. Sci.* 67: 1025-7
3. Rynbrand, R. H., E. E. Nishizawa, D. P. Balogoyen, A. Mendoza, y A. Annis (1981) *J. Med. Chem.* 24: 1507-10
4. Kienzle, F., A. Kaiser, y M. S. Chodnekar (1982). *Eur. J. Med. Chem.* Vol. XVII) 547-56
5. Schsetze, G. W. (1973) *Am. Heart. K.* 83: 552
6. Mustard, G. W. y M. A. Packham (1970). *Pharmacol. Rev.*, 22: 97-187
7. Garner, A., J. Jonsen, S. Laland, A. Hellen y P. A. Owren (1961) *Nature (London)*, 192: 531-2
8. Moncada, S. y J. R. Vane (1980) *J. Med. Chem.* 23: 591-3
9. Verstraete, M. (1983) *Arzneim. Forsch/Drug Res.*, 33: 1405-9
10. Smith, J. B. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 33: 1357-61
11. Monge, A., I. Aldana, P. Parrado y A. Erro (1984) *J. Pharm. Sci.* 84: (en prensa)
12. Gorman, R. R., en "Advances in Prostaglandin and Thromboxane research", Reven Press, vol. 6, (B. Samuelsson, P.W. Kamwell and R. Paoletti eds.), New York, 1980, págs. 417-25
13. Kikingowa, K. y M. Idrino (1973) *Chem. Pharm. Bull.* 21: 1151-9
14. Grylowski, R. J., A. Zmude, K. Korbunt, E. Krecioch, y K. Berton (1977) *Nature* 267: 627-30
15. Monge, A., I. Aldana y E. Fernández Alvarez (1978) *Eur. J. Med. Chem.* 13: 573-5
16. Monge, A., I. Aldana y E. Fernández Alvarez (1983) *An. Quim.* 79: 462-3
17. Monge, A., I. Aldana, M. Font, P. Parrado y F. Fernández Alvarez (1983) *An. Quim.*, 79: 242-7
18. Monge, A., I. Aldana, J. Lezamiz, y E. Fernández - Alvarez (1984) *Synthesis* (en prensa)
19. Born, G. U. R. y M. J. Cross (1963) *J. Physiol.* 168: 179
20. Salmon, J. A. (1978) *Prostaglandinas* 15: 383-97