



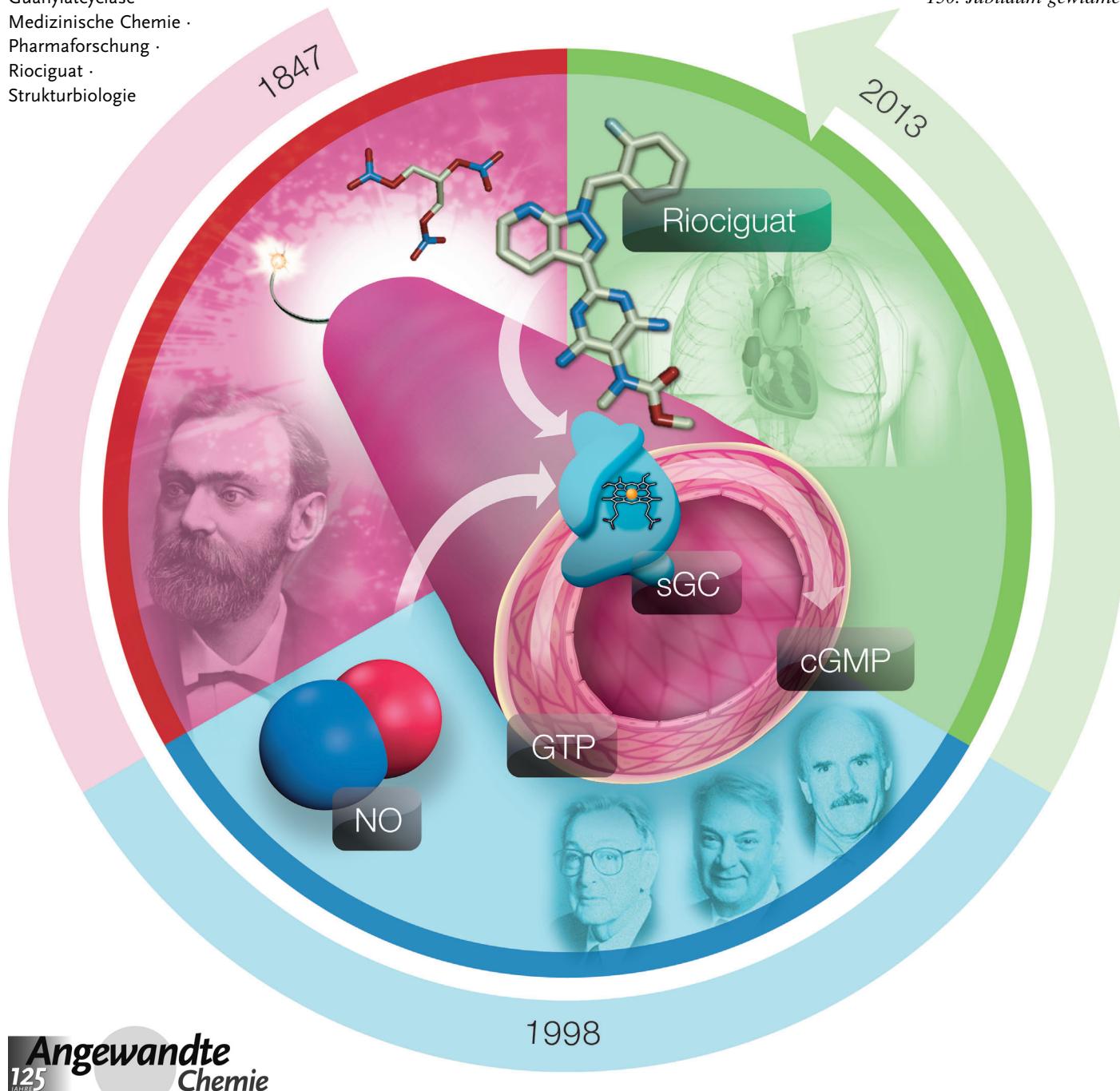
Chemie und Biologie der Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatcyclase

Markus Follmann,* Nils Griebenow, Michael G. Hahn, Ingo Hartung, Franz-Josef Mais, Joachim Mittendorf, Martina Schäfer, Hartmut Schirok, Johannes-Peter Stasch, Friederike Stoll und Alexander Straub

Stichwörter:

Guanylatcyclase ·
Medizinische Chemie ·
Pharmaforschung ·
Riociguat ·
Strukturbiologie

Der Firma Bayer zum
150. Jubiläum gewidmet



Die gefäßerweiternden Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO) werden in der Pharmakotherapie bereits seit mehr als 130 Jahren genutzt, und auch heute noch spielen NO-Donatoren eine bedeutende Rolle bei der Behandlung von Herzkreislauferkrankungen. Inhaliertes NO oder organische Nitrate und NO-freisetzende Medikamente sind jedoch mit erheblichen therapeutischen Nachteilen behaftet, beispielsweise einer Toleranzentwicklung bei Langzeitbehandlung und unspezifischen Effekten wie der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Die positiven Wirkungen von NO werden durch die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) vermittelt, einem Häm-haltigen Enzym, welches das intrazelluläre Signalmolekül cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet. Vor kurzem wurden zwei Substanzklassen entdeckt, die die Wirkung der sGC NO-unabhängig verstärken, die sogenannten sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren. Der erste Vertreter dieser neuen Medikamentenklassen, der sGC-Stimulator Riociguat, zeigte überzeugende Wirksamkeit in klinischen Phase-III-Studien bei unterschiedlichen Formen des Lungenhochdrucks.

1. Einführung

Retrospektiv betrachtet war die Entdeckung vieler Medikamente alles andere als geplant.^[1-3] Wissenschaftler sprechen häufig von einem glücklichen Zufall („serendipity“), wenn sie auf einem Gebiet einen Durchbruch erzielen, während sie eigentlich nach etwas ganz anderem suchen. Die Entdeckung des Nitroglycerins ist dafür ein Paradebeispiel. Der Sprengstoff Nitroglycerin wurde 1847 von dem italienischen Chemiker Ascanio Sobrero (1812–1888) an der Universität Turin entdeckt; Sobrero notierte jedoch bereits, dass beim Umgang mit dieser chemischen Substanz Kopfschmerzen auftraten (heute wissen wir, dass der Grund hierfür eine zerebrale Gefäßerweiterung ist). Der schwedische Erfinder Alfred Nobel (1833–1896) stellte bei der Untersuchung von Nitroglycerin fest, dass die Substanz durch Einbettung in Kieselgur weniger stoßempfindlich, leichter zu kontrollieren und damit besser transportierbar wird. Er nannte die Formulierung Dynamit und ließ sie 1867 patentieren.^[4-6] Bei der Herstellung im Industriemaßstab beklagten die Arbeiter in Nobels Fabriken die unangenehmen Wirkungen der Substanz; sie verursachte Kopfschmerzen und Schwindel. Zu dieser Zeit begannen Ärzte mit organischen Nitraten zu experimentieren. 1867 stellte Sir Lauder Brunton (1844–1916), ein schottischer Arzt, fest, dass organische Nitrate die Thoraxschmerzen bei Angina pectoris wirksam linderten.^[7] In seiner berühmten Publikation in *The Lancet* von 1879 mit dem Titel „Nitroglycerin als Heilmittel für Angina pectoris“^[8] beschrieb der britische Arzt William Murrell die Ergebnisse seiner Selbstversuche und der Behandlung von Patienten mit Nitroglycerin.^[9]

Unglücklicherweise litt Nobel am Ende seines Lebens selbst an Angina pectoris im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung. Weniger als zwei Monate vor seinem Tod schrieb er in einem Brief an einen Kollegen: „Ist es nicht eine

Aus dem Inhalt

1. Einführung	9619
2. sGC-Stimulatoren	9622
3. sGC-Aktivatoren	9630
4. Strukturbioologie	9633
5. Zusammenfassung und Ausblick	9636

Ironie des Schicksals, dass mir Nitroglycerin zur Einnahme verschrieben worden ist! Sie nennen es Trinitrin, um die Apotheker und die Öffentlichkeit nicht zu erschrecken.“ Er verweigerte die Einnahme.^[10]

Im Gegensatz zu Nobels zögerlicher Haltung werden Nitrodilatatoren wie Nitroglycerin seit dieser Zeit zur Behandlung von Angina-pectoris-Anfällen und Herzinsuffizienz vielseitig angewendet und kommen trotz ihrer unerwünschten Nebenwirkungen und zahlreichen Einschränkungen auch heute noch zum Einsatz.^[11,12]

Doch über welchen Mechanismus lindert diese im 19. Jahrhundert entdeckte explosive Substanz Angina pectoris und erweitert die Blutgefäße? Die Antwort auf diese Frage sollte noch ein Jahrhundert auf sich warten lassen.

1977 entdeckte Ferid Murad, dass Nitrate nur dann eine physiologische Wirkung haben, wenn sie zu Stickstoffmonoxid (NO) abgebaut werden.^[13,14] Das Gas, das auch in die Kategorie der Umweltschadstoffe fällt, führt zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen. 1978 stellte Robert Furchtgott (1916–2009) fest, dass eine Substanz im Endothel (Innenwand des Gefäßes) namens EDRF (endothelium-derived relaxing factor) die Blutgefäße erweitert.^[15-17] Die chemische Formel des EDRF war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Interessanterweise kam Louis Ignarro unabhängig davon etwa zur gleichen Zeit zu ähnlichen Schlüssen,^[18-26] und Furchtgott und Ignarro präsentierten auf Konferenzen im Jahr 1986 Belege dafür, dass EDRF in Wirklichkeit NO ist. Im Jahr 1998 wurde Murad, Ignarro und Furchtgott für ihre Entdeckung des Wirkmechanismus von NO im Körper gemeinsam der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen.^[14,26] Insbesondere erhielten sie den renommiertesten Wissenschaftspreis für ihre Arbeiten, dass die physiologische Wir-

[*] Dr. M. Follmann, Dr. N. Griebenow, Dr. M. G. Hahn, Dr. I. Hartung, Dr. F.-J. Mais, Dr. J. Mittendorf, Dr. M. Schäfer, Dr. H. Schirok, Dr. J.-P. Stasch, Dr. F. Stoll, Dr. A. Straub
Bayer Pharma Aktiengesellschaft, Global Drug Discovery
Aprather Weg 18a, 42113 Wuppertal (Deutschland)
E-Mail: markus.follmann@bayer.com

kung der von Nobel als Sprengstoff entwickelten Substanz über die Freisetzung von NO vermittelt wird.

Genauer betrachtet wirkt NO über die lösliche Guanylatcyclase (sGC), ein Enzym mit hoher Affinität zu NO.^[27] Bei sGC handelt es sich um einen wichtigen Regulator des Herzkreislaufsystems, der in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen und in Thrombozyten vorzufinden ist.^[28–31] NO wird von verschiedenen Stickoxidsynthasen, beispielsweise endothelialer Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), neuronaler Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) und der induzierbaren Isoform (iNOS) aus L-Arginin synthetisiert. In Endothelzellen, den inneren Zellschichten in Arterien, wird NO durch endothiale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) erzeugt und

diffundiert rasch in tiefer liegende glatte Muskelzellen, wo es sGC stimuliert (Abbildung 1). Dies führt zu einem intrazellulären Anstieg des Botenstoffs cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), was eine Vielzahl physiologischer Reaktionen auslöst, beispielsweise die Erweiterung der Blutgefäße (und damit die Senkung des Blutdrucks) und eine Verbesserung der Blutzirkulation. Die Pathogenese verschiedener Erkrankungen, insbesondere des Herzkreislaufsystems, geht mit einer unzureichenden sGC-Stimulation einher.^[32–38]

sGC selbst ist ein zytosolisches heterodimeres Protein, das aus einer α - und einer β -Untereinheit mit einer prosthetischen Häm-Gruppe an der β -Untereinheit (Häm-bindende



Markus Follmann studierte Chemie in Deutschland und Japan. In 2000 promoviert wurde er bei Prof. H. Kunz in Mainz. Nach einem zweijährigen Postdoc-Aufenthalt bei Prof. K. C. Nicolaou in La Jolla trat er 2003 in die Pharmaforschung der Aventis AG in Frankfurt ein. 2008 wechselte er nach Wuppertal zu Bayer Healthcare, wo er verschiedene Projekte in kardiologischen Indikationen leitete. Seit 2012 ist er Abteilungsleiter in der Medizinischen Chemie. Er ist Koautor von über 60 Publikationen und Patentanmeldungen.



Nils Griebeinow studierte Chemie in Marburg und am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr und promovierte bei Prof. Manfred T. Reetz. 1995 trat er in die Bayer AG ein und war am Aufbau der Kombinatorischen Chemie im Bereich der Zentralen Forschung beteiligt. 2002 wechselte er in den Pharmabereich der Bayer AG und war seitdem in verschiedenen therapeutischen Gebieten, wie Alzheimer, Atherosklerose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Onkologie tätig. Er ist Miterfinder von mehr als 40 Patenten, von denen 19 in direktem Zusammenhang mit Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatcyclase stehen.



Michael G. Hahn studierte Chemie an der Universität Wuppertal und promovierte dort 1998 bei Prof. H.-J. Altenbach. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Universität Cambridge (UK) in der Gruppe von Prof. S. V. Ley wechselte er an das Institut für Medizinische Chemie der Bayer HealthCare und arbeitet dort seitdem auf dem Gebiet der sGC Aktivatoren.



Ingo V. Hartung studierte Chemie in Hannover und an der Stanford University (USA) und promovierte bei Prof. H. M. R. Hoffmann in Hannover. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Chaitan Khosla an der Stanford University trat er 2004 als Medizinalchemiker in die Pharmaforschung der Schering AG in Berlin ein. In den 9 Jahren seitdem beschäftigte er sich mit der Erforschung neuer Leitstrukturen in der Krebs- und Herz-Kreislauf-Forschung, von 2009 bis 2011 als Laborleiter in der Medizinischen Chemie von Bayer HealthCare in Wuppertal. Seit 2011 leitet er das Fermentations- und Zellkultur-Labor von Bayer HealthCare in Berlin und beschäftigt sich mit Biooxidationen zur präparativen Herstellung von Wirkstoff-Metaboliten sowie neuen Trends in der Biokatalyse.



Franz-Josef Mais studierte Chemie in Mainz und Düsseldorf und promovierte 1985 bei Prof. H.-D. Martin. Anschließend trat er in die Forschung des Geschäftsbereichs Organica der Bayer AG ein und beschäftigte sich mit der Verfahrensentwicklung von Grund- und Feinchemikalien. In 2002 wechselte er in den Bereich HealthCare und ist seitdem mit der Verfahrensentwicklung von kardiologischen und onkologischen Wirkstoffen beschäftigt. Er ist Entwickler des technischen Syntheseverfahrens für den sGC-Stimulator Riociguat.



Joachim Mittendorf studierte Chemie in Göttingen und promovierte 1989 bei Prof. U. Schölkopf. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. K. P. C. Vollhardt trat er 1990 in die Pharmaforschung der Bayer AG ein (Bereich Antiinfektiva). Nach einer Jobrotation von 1994–1996 in der Chemischen Entwicklung war er Projektleiter in der Medizinischen Chemie für Projekte in den Indikationsbereichen ZNS, Atemwegs- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Seit 1999 ist er Abteilungsleiter für Medizinische Chemie bei Bayer HealthCare in Wuppertal und seit 2002 zusätzlich verantwortlich für die integrierte Forschungs-IT-Plattform Pharmacophore Informatics. 2009 wurde er zum Honorarprofessor für Medizinische Chemie an der Universität Leipzig ernannt.

Domäne) besteht.^[39–45] NO stimuliert die sGC-Aktivität, indem es an das Fe²⁺ der Häm-Gruppe bindet, was zu einer Spaltung der Fe²⁺-His105-Bindung und zu einer Konformationsänderung im Enzym führt. Diese wirkt sich wiederum auf die katalytische Untereinheit aus und hat eine erhöhte cGMP-Produktion zur Folge. Dieser beschriebene NO-induzierte Schaltmechanismus ist jedoch eine starke Vereinfachung eines weitaus komplexeren Prozesses, wie er in Kapitel 4 näher erläutert wird. cGMP reguliert verschiedene Effektorsysteme wie z.B. die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen. Nachgeschaltet vermitteln diese Effektorsysteme verschiedene physiologische und gewebeschützende Effekte, beispielsweise die Va-



Martina Schäfer studierte Chemie und Germanistik in Göttingen und promovierte bei Prof. G. M. Sheldrick. 1999 trat sie als Proteinstrukturographin der Pharmaforschung bei der damaligen Schering AG bei. Nach 6 Jahren wechselte sie für 5 Jahre nach Wuppertal in die Pharmaforschung der Bayer Schering Pharma AG; seit 2012 ist sie als Senior Research Scientist wieder am Forschungsstandort Berlin der Bayer HealthCare beschäftigt. Der Forschungsschwerpunkt liegt auf der Strukturaufklärung von Eiweißmolekülen im Komplex mit neuen Leitstrukturen, die in den kardiologischen Indikationen relevant sind.



Hartmut Schirok studierte Chemie in Göttingen und promovierte 1999 bei Prof. L. F. Tietze. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. B. M. Trost in Stanford trat er 2000 als Medizinalchemiker in die Pharmaforschung der Bayer AG in Wuppertal ein. Er arbeitet heute als Senior Research Scientist in Projekten zu den Therapiegebieten Krebs, Herz-Kreislauf- und Augenerkrankungen.



Johannes-Peter Stasch ist Chief Scientist in der Herz-Kreislauf-Forschung von Bayer Pharma in Wuppertal und Honorarprofessor für Arzneimittelforschung an der Universität Halle-Wittenberg. Er ist Diplom-Chemiker, Apotheker für Arzneimittelinformation, promovierte an der Universität Würzburg und habilitierte sich in Pharmakologie an der Universität Halle-Wittenberg. Er hat mehr als 30 Jahre Erfahrung auf den Gebieten der Biochemie, Pharmakologie und Wirkstoffentdeckung und spielte die entscheidende Rolle bei der Entdeckung und Entwicklung der sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren. Seine Forschung hat zu mehr als 170 Originalarbeiten, 190 Patentanmeldungen, mehreren Entwicklungsprodukten und letztendlich zu Riociguat geführt. Kürzlich wurde er zum Mitglied in der Nationalen Akademie der Wissenschaften, Leopoldina, ernannt.

sorelaxation und Inhibition der Proliferation der glatten Muskelzellen, die Leukozyten-Rekrutierung und die Thrombozytenaggregation. Diese Signaltransduktionskaskade wird als NO-sGC-cGMP-Signalweg bezeichnet (Abbildung 1).^[46,47]

sGC kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen (Abbildung 2). Die native, Häm-haltige oder reduzierte Form der sGC, bei der es sich um den endogenen Rezeptor für NO handelt, und die Häm-freie Form. Unter oxidativem Stress, der mit der Entwicklung vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen einhergeht, entstehen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS).^[49] Diese können das zentrale Eisen im Häm der sGC oxidieren (Fe²⁺→Fe³⁺), was schließlich zu einem Verlust der Häm-Gruppe führt.^[50] Diese Häm-freie Form der sGC reagiert nicht mehr auf NO und wird deshalb auch als dysfunktional bezeichnet. Darüber hinaus wird die Häm-freie sGC mittels Ubiquitylierung rasch abgebaut.^[50–52]

In den letzten 15 Jahren wurden zwei Verbindungsklassen entdeckt, die beide Formen der sGC NO-unabhängig aktivieren können,^[27,47] nämlich die Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren und die Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren. sGC-Stimulatoren weisen einen dualen Wirkmodus auf: Sie wirken in Synergie mit endogenem NO und können darüber hinaus die native Form des Enzyms NO-unabhängig direkt stimulieren. Im Gegensatz dazu können sGC-Aktivatoren die pathologisch veränderte Häm-freie sGC, mit anderen Worten



Friederike Stoll studierte Pharmazie in Berlin und promovierte 2001 bei Prof. H.-D. Höltje in Düsseldorf. Nach einem Postdoc und zweijähriger Tätigkeit bei Novartis trat sie 2004 in die Computerchemie-Abteilung von Bayer Healthcare ein und bearbeitete dort vorwiegend kardiologische Projekte. Seit 2011 arbeitet sie in der R&D-Informationenabteilung von Bayer Healthcare.



Alexander Straub studierte Chemie in Stuttgart, promovierte 1989 bei Prof. F. Effenberger und trat anschließend als Medizinalchemiker in die Pharmaforschung der Bayer AG ein. Nach 10 Jahren wechselte er für 8 Jahre zu Bayer CropScience, wo er sich in der Verfahrensforschung und Verfahrensentwicklung mit chemischen Produktionsverfahren beschäftigte. Seit 2008 ist er als Principal Research Scientist bei Bayer HealthCare in kardiologischen Indikationen tätig. Er ist Koautor von über 50 Publikationen sowie 60 Patentanmeldungen und Miterfinder des sGC-Stimulators Riociguat.

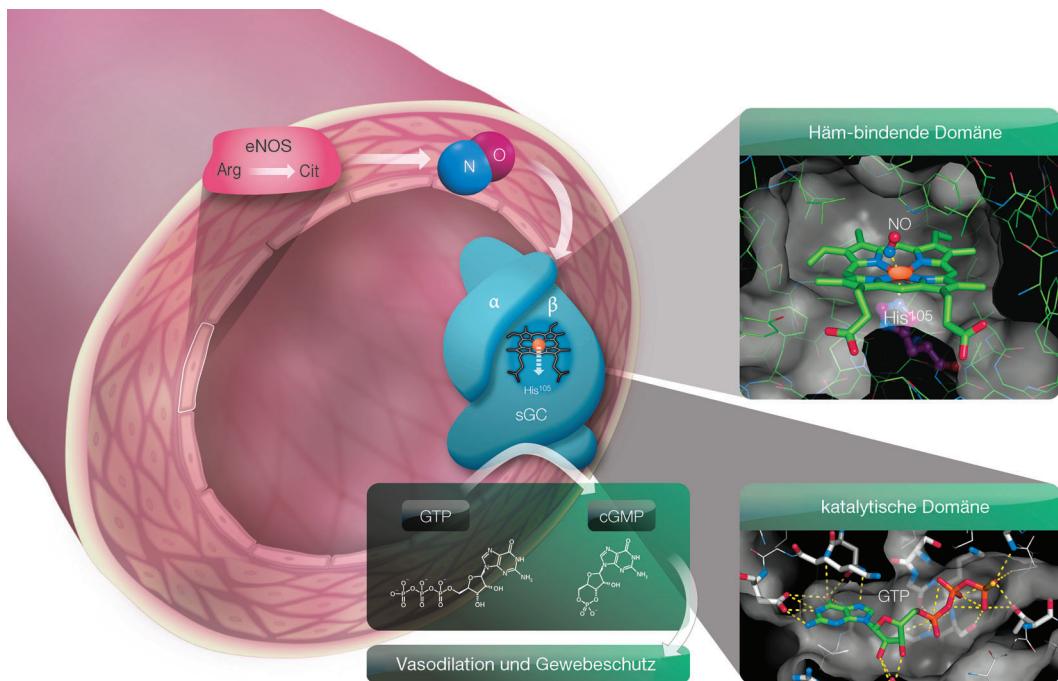


Abbildung 1. NO-sGC-cGMP-Signalweg und Kristallstrukturanaloge der Häm-bindenden und katalytischen Domäne der humanen löslichen Guanylylcyclase (sGC). Die dargestellten Strukturen basieren auf den inzwischen bekannten Kristallstrukturen des Häm-bindenden Proteins des Cyanobakteriums *Nostoc* sp. (pdb-Eintrag 2OOC)^[130] mit einer Sequenzhomologie von 35 % zu der Häm-bindenden Domäne von sGC und der katalytischen Säugetier-AC5-Domäne (pdb-Eintrag 3C14).^[48]

sGC, die sich in einem Zustand befindet, in dem das körpereigene NO kaum noch eine Wirkung hat, aktivieren.

Sowohl die Stimulation der nativen als auch die Aktivierung der Häm-freien sGC führen zu einem Anstieg der cGMP-Bildung.^[27] Die Chemie und Biologie dieser beiden neuartigen Arzneimittelklassen – sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren – von denen einige derzeit in klinischen Studien untersucht werden, möchten wir in diesem Überblick näher erläutern.

2. sGC-Stimulatoren

2.1. Entdeckung der NO-unabhängigen, Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren

1994 begannen Wissenschaftler bei Bayer, systematisch nach Substanzen zu suchen, die zu einer Steigerung der NO-Synthese führen und damit die sGC stimulieren könnten.^[27,47] Im Rahmen dieser Screeningtests wurden die cGMP-Mengen unter Substanzeinfluss in Endothelzellen von Schweinen mittels Radioimmunoassay gemessen, was zu der unerwarteten Entdeckung der direkten, NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren führte. Im gleichen Jahr berichteten Forscher von der Nationalen Universität von Taiwan in Taipeh, dass eine Benzylindazol-Verbindung namens YC-1 (1; Schema 1)^[53] die Thrombozytenaggregation über eine Stimulation der cGMP-Synthese inhibierte.^[54] YC-1 (1) wurde nachfolgend als direkter NO-unabhängiger, Häm-abhängiger sGC-Stimulator charakterisiert. Er stimulierte bei einer Konzentration von 100 µM die isolierte sGC 30- bis 40-fach und zeigte in Kom-

bination mit NO-freisetzenden Verbindungen eine starke synergistische Wirkung, während nach Oxidation oder Entfernung der prosthetischen Häm-Gruppe der stimulierende Effekt ausblieb.^[54–57]

YC-1 (1) wies in zahlreichen pharmakologischen Studien ein vielversprechendes Profil auf. Neben seiner relativ schwachen sGC-stimulierenden Wirkung zeigte es jedoch ein schlechtes pharmakokinetisches Profil sowie fehlende Spezifität, da sich herausstellte, dass es Phosphodiesterasen inhibiert und zahlreiche cGMP-unabhängige Effekte moduliert.^[47] Daher war eine weitere Optimierung von Wirkstärke, pharmakokinetischen Eigenschaften und Spezifität erforderlich, um das volle therapeutische Potenzial dieser neuen Arzneimittelklasse erschließen zu können.

2.2. Erste Fortschritte in Richtung hochspezifischer wirkstarker sGC-Stimulatoren

Zur systematischen Optimierung der Struktur von YC-1 wurden basierend auf diesen ersten Ergebnissen bei Bayer ausführliche Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung (structure–activity relationship, SAR) durchgeführt. Die *in vitro*-Wirkstärke der Verbindungen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt, einem Test zur Bildung von cGMP in sGC überexprimierenden CHO-Zellen (CHO = Chinese hamster ovary) und einem funktionellen Assay basierend auf der Inhibition der durch Phenylephrin induzierten Kontraktion an Kaninchen-Aortenringen.^[58] Ein erster Durchbruch bezüglich einer verbesserten Wirkstärke resultierte aus dem Ersatz der Benzylindazol-Einheit von YC-

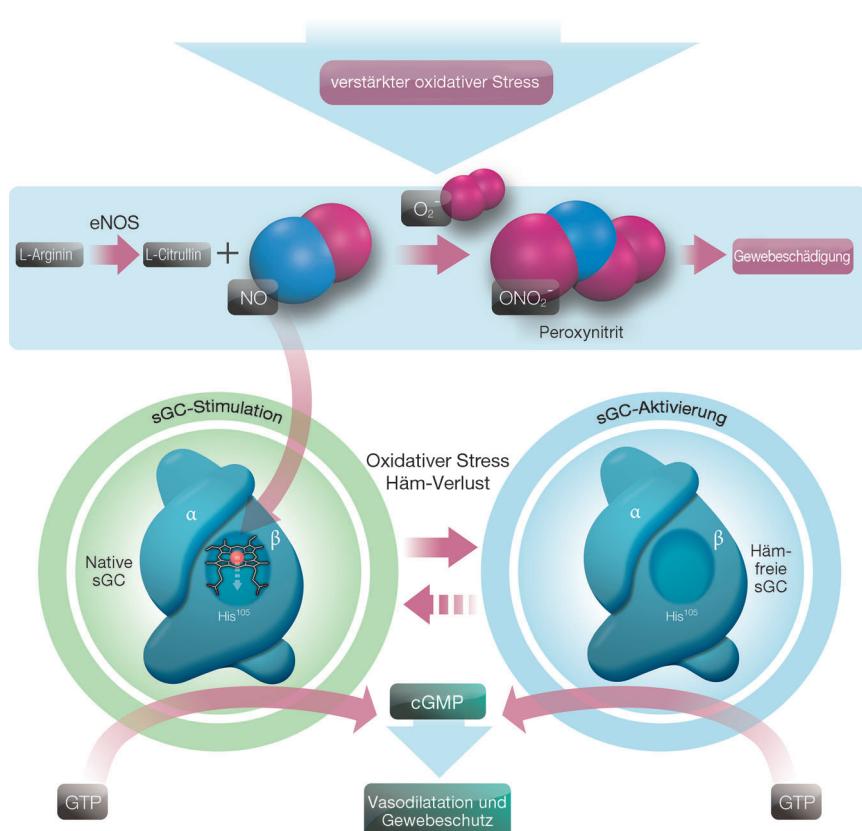


Abbildung 2. Wirkorte der löslichen Guanylatcyclase-Stimulatoren und -Aktivatoren sind zwei verschiedene Zustände der sGC: die NO-sensitive, reduzierte native sGC und die NO-unsensitive, Häm-freie sGC. sGC-Stimulatoren stabilisieren den Nitrosyl-Häm-Komplex der reduzierten sGC (links dargestellt) und weisen einen starken Synergismus mit NO auf. sGC-Aktivatoren dagegen binden an die Häm-freie Form (rechts dargestellt) oder ersetzen das prothetische Häm der sGC und schützen die sGC vor proteasomalem Abbau.^[47]

1 durch (2-Fluorbenzyl)pyrazolopyridin und, noch wichtiger, dem Austausch des (Hydroxymethyl)furan-Restes durch eine 5-substituierte 4-Aminopyrimidin- oder 4,6-Diaminopyrimidin-Gruppe.^[59] Kristallstrukturanalysen zeigten eine coplanare Anordnung dieses Biarylsystems, was für eine hohe Wirkstärke anscheinend von Bedeutung ist. Das 5-Cyclopropyl-4-aminopyrimidin-Derivat BAY 41-2272 (2; Schema 1) wies eine stärkere sGC-stimulierende Wirkung auf, mit einer IC_{50} von $0.3\text{ }\mu\text{M}$ für die Kontraktion der Kaninchen-Aortenringe (YC-1, $IC_{50}=10\text{ }\mu\text{M}$) und einer minimalen effektiven Konzentration (MEC) von $0.03\text{ }\mu\text{M}$ für die Bildung von cGMP in CHO-Zellen (YC-1, MEC = $10\text{ }\mu\text{M}$). Im Gegensatz zu YC-1 handelt es sich bei BAY 41-2272 um einen hochspezifischen sGC-Stimulator, der keine relevante Inhibition von Phosphodiesterasen zeigte.^[27,35] Während sich die 1-(2-Fluorbenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-Einheit dieser neuen Leitserie als essenziell für eine starke sGC-stimulierende Wirkung erwies, erlaubte die Pyrimidin-Einheit eine Fülle an Variationen. Weitere Studien führten zu dem 4,6-Diamino-5-morpholino-Analogon BAY 41-8543 (3), das eine dreimal höhere Wirkstärke bei der Phenylephrin-induzierten Kontraktion der Kaninchen-Aortenringe aufwies ($IC_{50}=0.10\text{ }\mu\text{M}$).

BAY 41-2272 und BAY 41-8543 wiesen jedoch bei Ratten eine geringe metabolische Stabilität und orale Bioverfügbarkeit auf, und BAY 41-2272 zeigte eine starke Inhibition/Induktion von Cytochrom-P450(CYP)-Enzymen, welche im Fremdstoffwechsel eine wichtige Funktion ausüben.^[60] Die Inhibition/Induktion von CYP-Enzymen durch Arzneimittel birgt das Risiko, dass sich die Exposition begleitend eingenommener Medikamente verändert. Obwohl diese Eigenschaften eine Weiterentwicklung ausschlossen, wurden beide Verbindungen in zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen als Hilfsmittel zur Erforschung dieser neuartigen Arzneimittelklasse genutzt, was in mehr als 150 Publikationen von verschiedenen Forschergruppen auf der ganzen Welt dargelegt wurde.

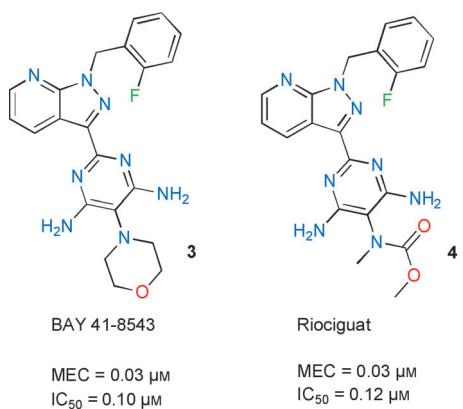
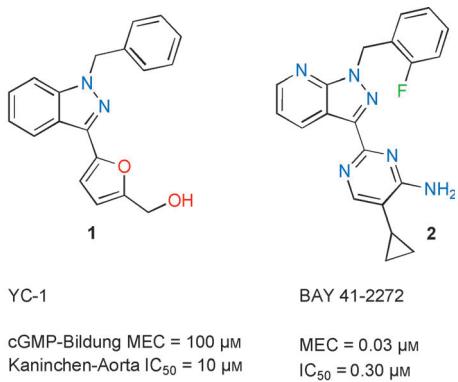
Ein weiteres, von Selwood et al. vom University College London begonnenes Optimierungsprogramm auf der Grundlage von YC-1 als Leitstruktur führte zur Identifizierung von CFM-1571 (5) (Schema 2).^[61] Diese Verbindung wurde als schwacher, aber spezifischer Stimulator der sGC charakterisiert (Stimulation von gereinigter sGC, $EC_{50}=5.5\text{ }\mu\text{M}$; Thrombozytenaggregation, $IC_{50}=2.8\text{ }\mu\text{M}$). Bei Ratten wurde jedoch nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit von 12% beobachtet, und es

wurde keine Weiterentwicklung dieser Serie veröffentlicht.

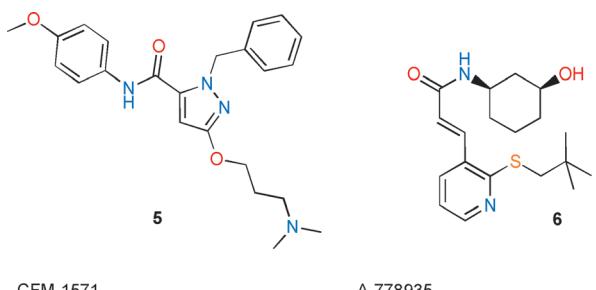
2003 veröffentlichten Wissenschaftler der Firma Abbott eine neuartige Klasse von sGC-Stimulatoren auf der Basis von *ortho*-Sulfanyl-substituierten Cinnamylamiden.^[62] A-778935 (6) (Schema 2) und andere Analoge sind zwar strukturell nicht mit YC-1 verwandt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie die sGC nach einem ähnlichen Wirkmodus stimulieren, nämlich unabhängig von und in Synergie mit NO, wofür die Anwesenheit einer reduzierten Häm-Gruppe notwendig ist. A-778935 stimmulierte die isolierte sGC NO-unabhängig etwa 20-fach stärker als YC-1.^[63] Da seit 2006 keine weiteren Fortschritte bei dieser Verbindungsklasse bekannt wurden, ist davon auszugehen, dass das Programm eingestellt wurde.

2.3. Entdeckung und Entwicklung von Riociguat

Studien zur Identifizierung der Metaboliten von BAY 41-2272 und BAY 41-8543 belegten einen oxidativen Metabolismus am Cyclopropyl- bzw. Morpholino-Substituenten.^[64] Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Verbindungen mit kleinen lipophilen Substituenten an der Pyrimidin-C5-Position (BAY 41-2272) Derivate mit großen



Schema 1. sGC-Stimulatoren YC-1 (1), BAY 41-2272 (2), BAY 41-8543 (3) und Riociguat (4).



CFM-1571	A-778935
Aktivierung von gereinigter sGC EC ₅₀ = 5.5 μ m (YC-1 IC ₅₀ = 4.1 μ m in diesem Test)	Aktivierung von gereinigter sGC EC ₅₀ = 1.1 μ m (YC-1 IC ₅₀ = 19.5 μ m in diesem Test)

polareren 5-Substituenten keine relevante CYP-Inhibition aufwiesen (BAY 41-8543). Weitere Variationen mit anderen polaren, potenziell stabileren Substituenten an der Pyrimidin-C5-Position führten schließlich zur Identifizierung des *N,O*-Dimethylcarbamats **4** (Schema 1), BAY 63-2521 [Internationaler Freiname (INN): Riociguat].^[60]

Riociguat wies keine relevante CYP-Wechselwirkung auf bei einem hervorragenden pharmakokinetischen Profil einschließlich einer guten oralen Bioverfügbarkeit in verschiedenen Tierarten.

In vitro stimulierte Riociguat gereinigte, rekombinante sGC um das bis zu 73-fache (von 0.1 auf 100 μ M) und wies das typische sGC-Stimulator-Profil auf: eine starke NO-unabhängige Enzymaktivierung, synergistische Wirkung in Kombination mit NO-freisetzenden Substanzen, die gleichzeitig vom Vorliegen der reduzierten prosthetischen Häm-Einheit abhing.^[65]

Bei wachen, spontan hypertensiven Ratten führte die orale Gabe von Riociguat zu einer lang anhaltenden, dosis-abhängigen Blutdrucksenkung. Im Gegensatz zu Nitraten entwickelt sich nach Langzeitgabe keine Toleranz und außerdem wirkt die Substanz auch an Ratten, die eine Nitrat-toleranz entwickelt haben. Insbesondere wurde Riociguat in verschiedenen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie (PH) untersucht, darunter in einem Mausmodell, bei dem die Tiere einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren und ein Rattenmodell mit subkutaner Injektion von Monocrotaline.^[65-67] Das Pyrrolizidinalkaloid Monocrotaline stellt das toxische Hauptprinzip von *Crotalaria spectabilis* dar und wird zur Erzeugung einer experimentellen pulmonalen Hypertonie verwendet.^[68] In diesen experimentellen Modellen verbesserte Riociguat die pulmonale Hämodynamik und verhinderte die pathologischen Umbauprozesse, wie z. B. die Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie und Muskularisierung der kleinen Lungenarterien oder machte sie sogar teilweise rückgängig.^[66] Basierend auf seinem Gesamtprofil mit hervorragender Wirkstärke, Spezifität, Wirksamkeit und Sicherheit wurde Riociguat als Kandidat für die Entwicklung zur Behandlung verschiedener Formen von pulmonaler Hypertonie (PH) ausgewählt.

Bei PH handelt es sich um eine schwere, fortschreitende und lebensbedrohliche Erkrankung, bei der der Druck in den Lungenarterien infolge einer Vasokonstriktion signifikant erhöht ist, was zu Insuffizienz des rechten Herzens und schließlich zum Tode führen kann. Patienten mit PH entwickeln eine signifikant reduzierte Belastungstoleranz und leiden unter einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität. Die häufigsten Symptome der pulmonalen Hypertonie sind Kurzatmigkeit, Erschöpfung, Schwindel und Ohnmacht, die sich allesamt bei Belastung verschlechtern.^[69]

Entsprechend der klinischen Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Dana Point) gibt es je nach Grunderkrankung fünf verschiedene Krankheitstypen: pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), pulmonale Hypertonie infolge einer Linksherzerkrankung (z. B. PH-LVD), pulmonale Hypertonie aufgrund einer Lungenerkrankung und/oder Hypoxämie (z. B. PH-COPD oder PH-ILD), chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) und pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen.^[70,71] Die aktuell zur Verfügung stehenden pharmakologischen Therapien sind nur für die Behandlung einer dieser fünf Krankheitstypen, nämlich der pulmonal-arteriellen Hypertonie zugelassen.^[69]

Riociguat ist der erste sGC-Stimulator, der den Übergang vom Tiermodell zu kontrollierten klinischen Studien an Patienten erfolgreich geschafft hat. In den kürzlich vorgestellten randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Phase-III-Studien an Patienten mit den PH-Unterformen pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) und chronische thromboembolische

lische PH (CTEPH) erreichte Riociguat den primären Endpunkt, eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit (6-Minuten-Gehtest, 6 MWD).^[72-75] Riociguat zeigte eine signifikante Verbesserung beim 6 MWD im Vergleich zu Placebo (+ 36 m, PAH; + 46 m, CTEPH) (Abbildung 3).

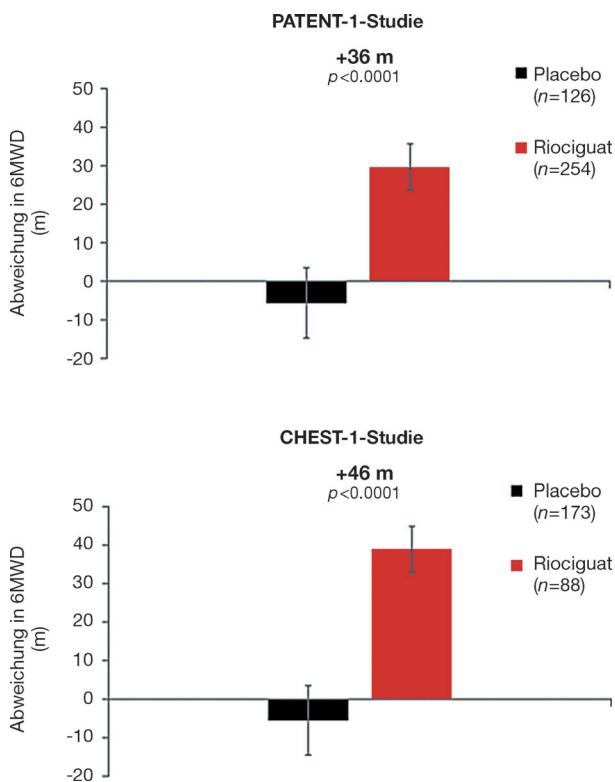


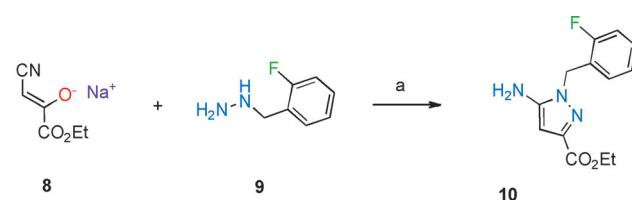
Abbildung 3. Mittlere Veränderung beim 6-Minuten-Gehtest (6MWD); primärer Endpunkt in Woche 12 ($p < 0.0001$) bei Studie PATENT-1 (PAH) und in Woche 16 ($p < 0.0001$) bei Studie CHEST-1 (CTEPH). Die Balken stellen Gruppenmittel und Standardfehler dar.^[73]

Darüber hinaus wurden auch bei den sekundären Endpunkten Verbesserungen beobachtet, beispielsweise bei der pulmonalen Hämodynamik, der Funktionsklasse und der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung. Bemerkenswerterweise ist Riociguat das erste Medikament, das bei zwei lebensbedrohlichen PH-Formen (CTEPH und PAH) seine Wirksamkeit durchgehend bewiesen hat.

Außer bei PAH und CTEPH zeigte Riociguat auch in Proof-of-Concept-Studien an Patienten, die unter PH infolge einer Linksherzinsuffizienz, einer interstitiellen Lungenerkrankung oder einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung litten, klinische Wirkungen.^[67,73] Diese vielversprechenden Ergebnisse legen nahe, dass sGC-Stimulatoren einen wertvollen neuen Therapieansatz für die unterschiedlichen Formen dieser Erkrankungen darstellen könnten.

2.4. Synthese von sGC-Stimulatoren

Das Amidinzwischenprodukt **7** (Schema 3) diente als gemeinsame Vorstufe für die Synthese von BAY 41-2272, BAY 41-8543, Riociguat und vielen anderen analogen Verbindungen.

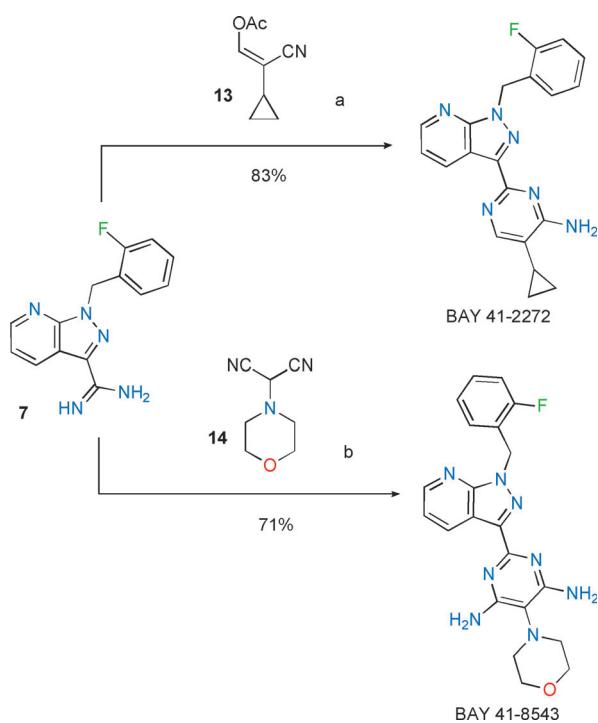


Schema 3. Synthese des Zwischenprodukts **7**. Reagenzien und Bedingungen: a) TFA, Dioxan, Rückfluss; b) 3-(Dimethylamino)acrolein, TFA, Rückfluss; c) NH_3 , MeOH, RT; d) TFAA, Py, RT; e) 1. NaOMe , MeOH, RT; 2. NH_4Cl , AcOH, Rückfluss.

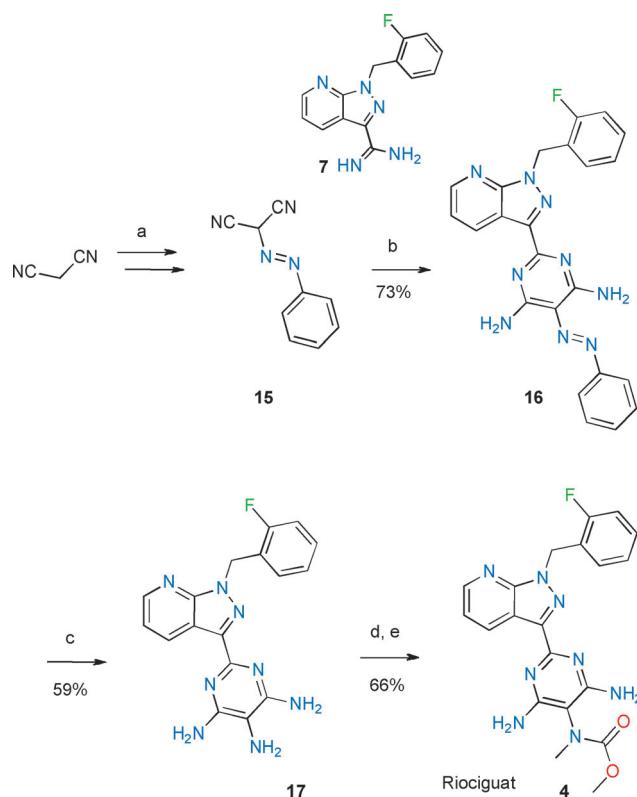
Zur Synthese des Amidins **7** wurde aus Ethylcyanpyruvat (**8**) und 2-Fluorbenzylhydrazin (**9**) Aminopyrazol **10** hergestellt. Durch anschließende Cyclokondensation des Rohprodukts mit 3-(Dimethylamino)acrolein entstand Pyrazolopyridin **11** in einer Ausbeute von insgesamt 50 %. Danach wurde die Carbonsäureester-Einheit durch klassische Amidbildung und Dehydratisierung in eine Nitrilgruppe umgewandelt, sodass **12** entstand. Eine Pinner-Reaktion der Cyangruppe von **12** mit Natriummethanolat und die anschließende Substitution mit Ammoniak ergab Amidin **7** in einer Ausbeute von insgesamt 35 % über fünf Stufen ausgehend von leicht erhältlichen Ausgangsmaterialien.

Durch Umsetzung von Amidin **7** mit unterschiedlich aktivierte Acrylnitril-Bausteinen wie z.B. Enolacetat **13** im Fall von BAY 41-2272 wurden monoaminosubstituierte Pyrimidine hergestellt (Schema 4). BAY 41-8543 und andere diaminosubstituierte Pyrimidine erhielt man durch Kondensation von Amidin **7** mit substituierten Malondinitrilen (z.B. **14**).

Zur Herstellung der 4,5,6-Triaminopyrimidin-Vorstufe von Riociguat wurde Phenyldiazo-substituiertes Malondinitril **15** (das erstmals 1905 von Hantzsch beschrieben wurde)^[76] mit Amidin **7** in Gegenwart von Natriummethanolat in *N,N*-Dimethylformamid zu 5-(Phenyldiazo)pyrimidin **16** umgesetzt (Ausbeute: 73 %) (Schema 5). Durch nachfolgende Raney-Nickel-katalysierte Reduktion entstand 4,5,6-Triaminopyrimidin **17**. Die 5-Aminogruppe in **17** reagierte selektiv mit Methylchlorformiat zu dem entsprechenden Carbamat in hoher Ausbeute. Nach Deprotonierung mit LiHMDS führte die nachfolgende N-Methylierung mit Iodmethan zu dem N-Methylcarbamat Riociguat (**4**). Diese Sequenz erwies sich als sicher und geeignet für die Herstellung im Industriemaßstab und wird mit leichten Abwandlungen zur Herstellung von Riociguat in Mengen von mehreren 100 kg verwendet.



Schema 4. Synthese von BAY 41-2272 und BAY 41-8543. Reagenzien und Bedingungen: a) Toluol, Rückfluss; b) (in Substanz), 100°C.



Schema 5. Synthese von Riociguat (4). Reagenzien und Bedingungen: a) PhNH_2 , NaNO_2 , NaOAc , wässrige HCl , Ethanol, 0°C; b) NaOMe , DMF, 110°C; c) H_2 , Raney-Nickel, 65 bar, DMF; d) ClCO_2Me , Pyridin, 0°C bis RT; e) LiHMDS , THF, 0°C; dann MeI , 0°C.

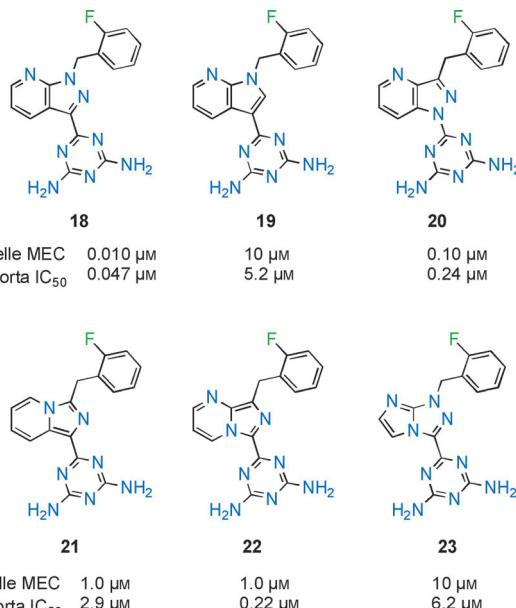
2.5. Arbeiten an sGC-Stimulatoren der nächsten Generation

Durch das zunehmende Wissen über das biochemische Profil der sGC-Stimulatoren, ihrer vielversprechenden pharmakologischen Wirkungen und des klinischen Erfolgs von Riociguat haben verschiedene Firmen Programme zur weiteren Erforschung der SAR der pyrimidinosubstituierten Pyrazolopyridine und zur Identifizierung neuer Leitserien der sGC-Stimulatoren aufgelegt.

2.5.1. Abwandlung der Pyrazolopyridin-Einheit

Die Optimierung des molekularen Grundgerüsts durch bioisosteren Austausch stellt einen üblichen Ansatz in der medizinischen Chemie dar.^[77] Für eine rasche Analogisierung ist die Identifizierung essentieller Elemente des Grundgerüsts unerlässlich. Idealerweise liegt der Schwerpunkt auf einfachen Modifikationen, die in kurzen Sequenzen zugänglich sind.

Da die 2,4-Diamino-1,3,5-triazin-Einheit (z.B. in der hochwirksamen Verbindung **18**, Schema 6) ausgehend von



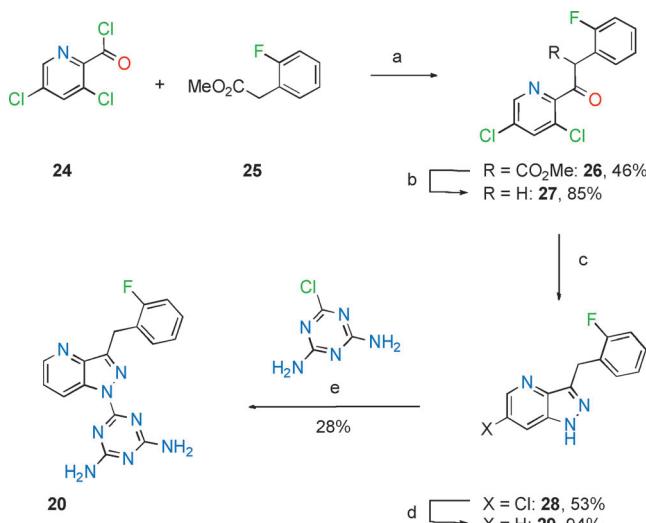
Schema 6. Modifikation des Pyrazolopyridin-Kerns.

einer Cyan- oder Carbonsäureester-Gruppe mithilfe einer einzigen synthetischen Transformation erhalten werden kann, eignet sie sich erheblich besser für die rasche Gerüstoptimierung als die N-Alkoxy carbonyl-substituierte Triaminopyrimidin-Einheit (wie in Riociguat), die ausgehend vom Ester **11** sieben Syntheseschritte benötigt (Schema 3, Schema 5).

Um unverzichtbare von weniger wichtigen Strukturmerkmalen des Kernfragments zu unterscheiden, wurden bestimmte Elemente der Reihe nach weggelassen. Der zu 7-Azaindol **19** führende Ersatz eines einzelnen Ringstickstoffs resultierte beispielsweise im Verlust der nahezu gesamten Aktivität. Das Umdrehen des fünfgliedrigen Rings im Pyrazolopyridin und damit die Anknüpfung des Benzylsubstituenten

tuenten an ein Kohlenstoff- anstelle eines Stickstoffatoms wie in **20** führte zu einer um das 5- bis 10-fach geringeren sGC-Stimulation.^[78] Das weitere Verschieben des Stickstoffatoms in die Brückenposition, exemplifiziert durch **21**, resultierte in einer Abnahme der Wirkstärke um das 10-Fache im Vergleich zu **20**. Interessanterweise erwies sich das verwandte Kernfragment von **22** in dem funktionellen Assay als wirksameres Analogon. Verbindung **23**, ein repräsentatives Beispiel für Analoge mit einem kondensierten 5,5-heterobicyclischen Kern, ist praktisch inaktiv.^[79]

Die Synthese von *1H*-Pyrazolo[4,3-*b*]pyridin **20** begann mit der Umsetzung von Säurechlorid **24** und Phenylessigester **25** zu β -Ketoester **26** (Schema 7). Nach Decarboxylierung zu



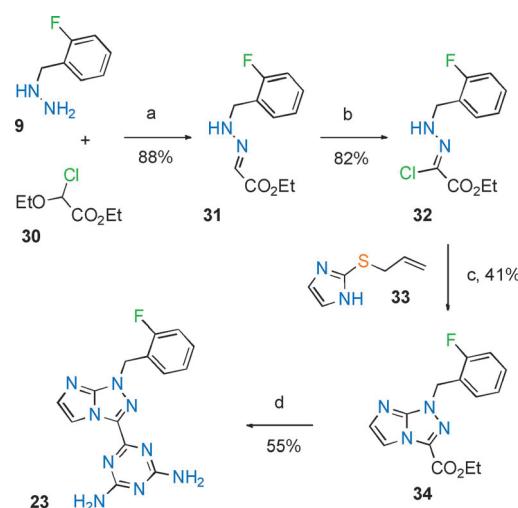
Schema 7. Synthese von **20**. Reagentien und Bedingungen:

- LiHMDS, THF, -78°C ;
- NaCl, H₂O, DMSO, MW, 150°C ;
- N₂H₄·H₂O, Py, DMAP, MW, 160°C ;
- H₂, Et₃N, Pd/C, EtOH;
- [Pd₂dba₃], XPhos, Cs₂CO₃, Toluol, 90°C .

27 lieferte die Cyclisierung mit Hydrazin in Pyridin als Lösungsmittel in Gegenwart katalytischer Mengen 4-DMAP Pyrazolopyridin **28**. Der verbleibende Chlorsubstituent wurde durch Hydrogenolyse entfernt und der Diaminotriazin-Rest durch eine Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung mit dem entstandenen Pyrazolopyridin **29** verknüpft, sodass **20** erhalten wurde.^[79]

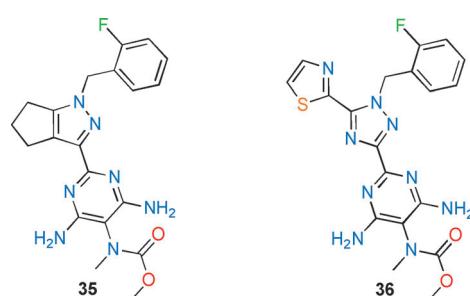
Die Synthese des Derivats **23** mit kondensiertem 5,5-Ringsystem (Schema 8) basiert auf einer 1,3-dipolaren Cycloaddition über Nitrilimine, deren Entstehung bei Behandlung von Hydrazonoylhalogeniden wie **32** mit einer Base postuliert wird. Das Benzylhydrazon **31** von Ethylglyoxylat wurde durch Kondensation von 2-Fluorbenzylhydrazin **9** mit Ethylchlor(ethoxy)acetat **30** hergestellt und mit *N*-Chlorsuccinimid zu **32** in hoher Ausbeute chloriert. Die nachfolgende Reaktion mit (Allylsulfanyl)imidazol **33** lieferte das bicyclische **34** in einer Ausbeute von 41 %. Durch die abschließende Einführung der Triazin-Kopfgruppe wurde die Synthese von **23** abgeschlossen.

2011 legte Ironwood Pharmaceuticals sGC-Stimulatoren mit gesättigten Ringsystemen, z.B. einem 1,4,5,6-Tetrahydrocyclopenta[*c*]pyrazol als zentralem Kern offen



Schema 8. Synthese von **23**. Reagentien und Bedingungen: a) wässrige HCl, Dioxan, RT; b) NCS, EtOAc, 60°C ; c) Et₃N, Dioxan, Rückfluss; d) Biguanid, MeOH, Rückfluss.

(Schema 9).^[80] Es wurde jedoch berichtet, dass die wirksamste Verbindung **35**, ein mit Riociguat eng verwandtes Derivat, in einem funktionellen Test an thorakalen Aortenringen weniger wirksam war als die Referenzverbindung BAY 41-2272.

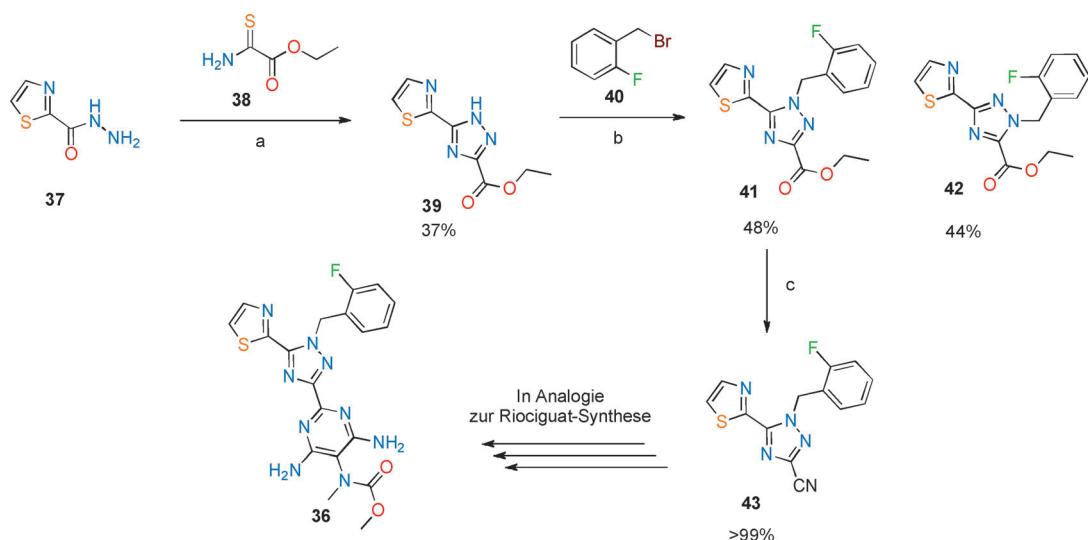


Schema 9. sGC-Stimulatoren von Ironwood Pharmaceuticals.

In einer 2012 veröffentlichten späteren Patentanmeldung publizierte dieselbe Arbeitsgruppe weitere optimierte Analoge mit einem zentralen 1,2,4-Triazol-Motiv und verschiedenen heteroaromatischen Einheiten als Substituenten in der 5-Position wie beispielsweise das Thiazolderivat **36** (Schema 9).^[81-82] Die wirksamsten Derivate wiesen laut Beiträgen eine EC₅₀ von weniger als 1 μM in dem vorstehend genannten funktionellen thorakalen Aortenring-Test auf.

Zu Beginn der Synthese von **36** (Schema 10) wurde Thiazolcarbohydrazid **37** mit Thioamid **38** zu dem entsprechenden 1,2,4-Triazol **39** kondensiert. Durch anschließende Benzylierung mit **40** entstand eine Mischung der regioisomeren Triazole **41** und **42** im Verhältnis von nahezu 1:1. Nach Abtrennung wurde **41** in einer Reaktionssequenz eingesetzt, die der bei der Riociguat-Synthese angewendeten Route stark ähnelte (Schema 3 und 5), was letztendlich zu Verbindung **36** führte.

Bislang wurden keine klinischen Studien zu diesen Verbindungen bekannt.



Schema 10. Formalsynthese des sGC-Stimulators **36**. Reagentien und Bedingungen: a) NH_4Cl , EtOH, 110°C (geschlossenes Gefäß); b) NaH , DMF, RT; c) NH_3 , MeOH, NaCN (kat.), 90°C (geschlossenes Gefäß).

2.5.2. Ersatz der Aminopyrimidin-Gruppe

Wissenschaftler bei Pfizer beschrieben kürzlich ihre Bemühungen, die Aminopyrimidin-Einheit der sGC-Stimulatoren auszutauschen.^[83] Ihre Grundüberlegung basierte auf der Annahme, dass sich durch die Einführung eines sauren Heterocyclus als „südlicher“ Gruppe die Löslichkeit verbessern würde, dabei aber Wirkstärke und Selektivität erhalten blieben. Gleichzeitig führten sie ein Imidazopyridin anstelle eines Pyrazolopyridin-Bicyclus ein.

Es stellte sich heraus, dass trifluormethylsubstituiertes 1,2,4-Triazol **44** (Schema 11) in einem human-sGC-cGMP-

Löslichkeit und Stabilität in humanen Lebermikrosomen zeigte.^[83]

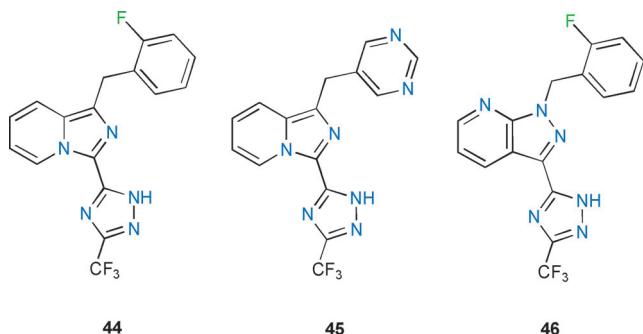
Ein analoges Triazol **46** mit einem Pyrazolopyridin-Kern erwies sich im cGMP-Assay als signifikant wirksamer ($\text{EC}_{50} = 60 \text{ nm}$) und im Relaxationstest mit Ratten-Aortenringen als geringfügig potenter ($\text{IC}_{50} = 33 \text{ nm}$) als sein Imidazopyridin-Gegenpart **44**. Triazol **46** erwies sich in humanen Lebermikrosomen als stabil; die Löslichkeit bei pH 6.5 war jedoch im Vergleich zu BAY 41-8543 (**3**) nur leicht verbessert. Bislang wurde von keiner klinischen Weiterentwicklung dieser Verbindung berichtet.

Eine ähnliche Strategie verfolgte Bayer; die Ergebnisse wurden kürzlich von Griebenow et al. veröffentlicht.^[84] Ausgehend von einer tetrazolhaltigen Verbindung **47** mit einer guten Wasserlöslichkeit bei allerdings geringer Wirkstärke^[59] wurden verschiedene andere fünfgliedrige Heterocyclen synthetisiert (Schema 12). Wie für Thiadiazolon **49**, Oxadiazolon **50** und die Triazolone **53** und **54** gezeigt, konnte die Potenz um eine Größenordnung erhöht werden; es zeichneten sich jedoch nur sehr wenige Analoge durch eine signifikant verbesserte Löslichkeit in Wasser im Bereich von $> 200 \text{ mg L}^{-1}$ aus.

2.5.3. Jüngste Entwicklungen aus der Patentliteratur

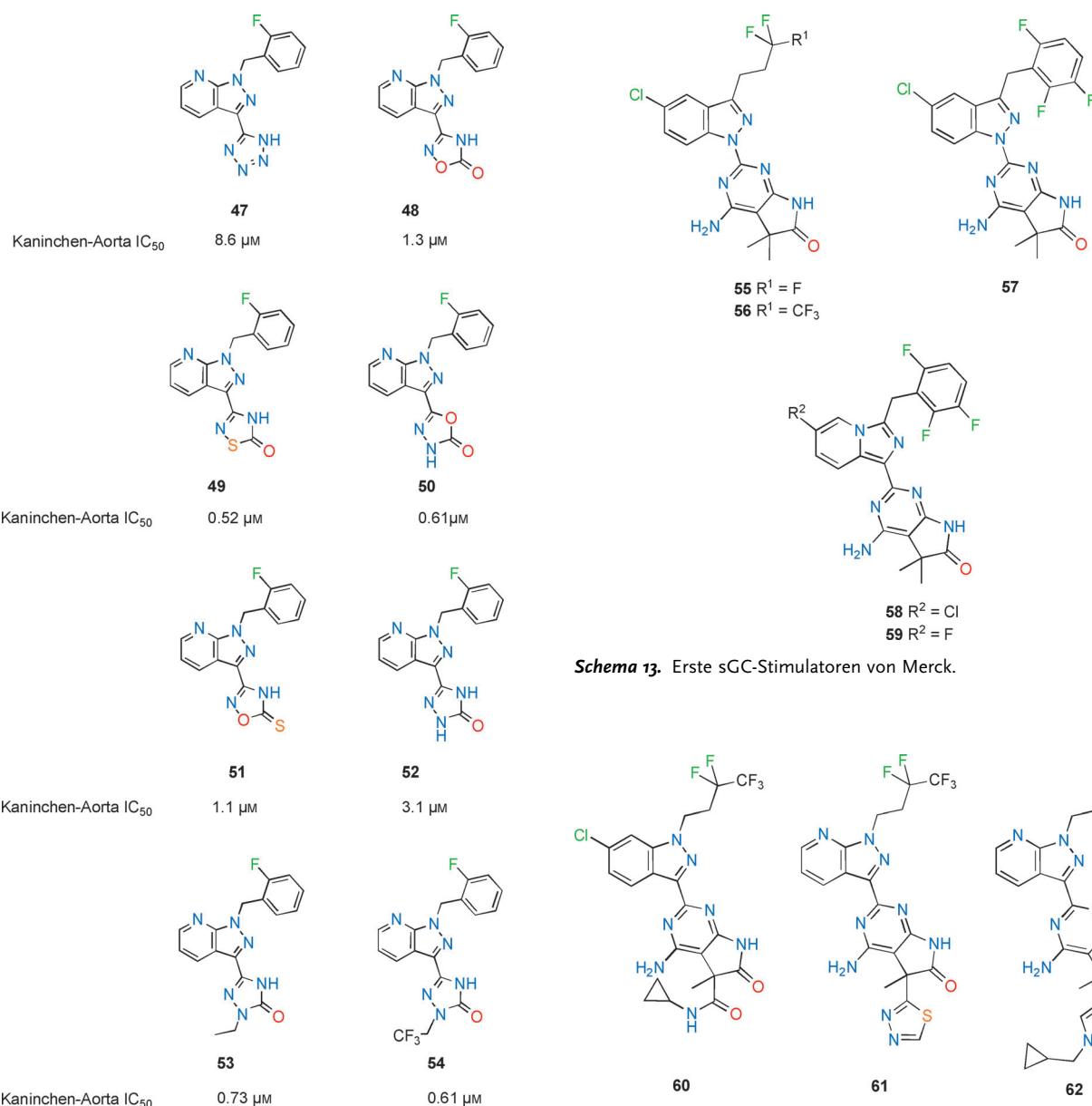
Über einen anderen Ansatz zur Modifikation von sGC-Stimulatoren berichteten 2010 Forscher der Firma Merck.^[85] Sie offenbarten Pyrimidine mit einem kondensierten Dimethylpyrrolidin-2-on-Ringsystem, z.B. die in Schema 13 gezeigten Verbindungen. Hier wurden verschiedene lipophile Kopfgruppen eingesetzt (z.B. 2,3,6-Trifluorbenzyl sowie das stark fluorierte 3,3,4,4,4-Pentafluorbutyl).

Zur Optimierung dieser Verbindungen berichtete dieselbe Arbeitsgruppe von Derivaten mit erhöhter Polarität, z.B. die sGC-Stimulatoren in Schema 14. Hier wurde eine der Methylgruppen des Pyrrolidin-2-on-Systems durch ein Amid oder eine kleine heteroaromatische Gruppe ersetzt.^[86]



Schema 11. 1,2,4-Triazole von Pfizer.

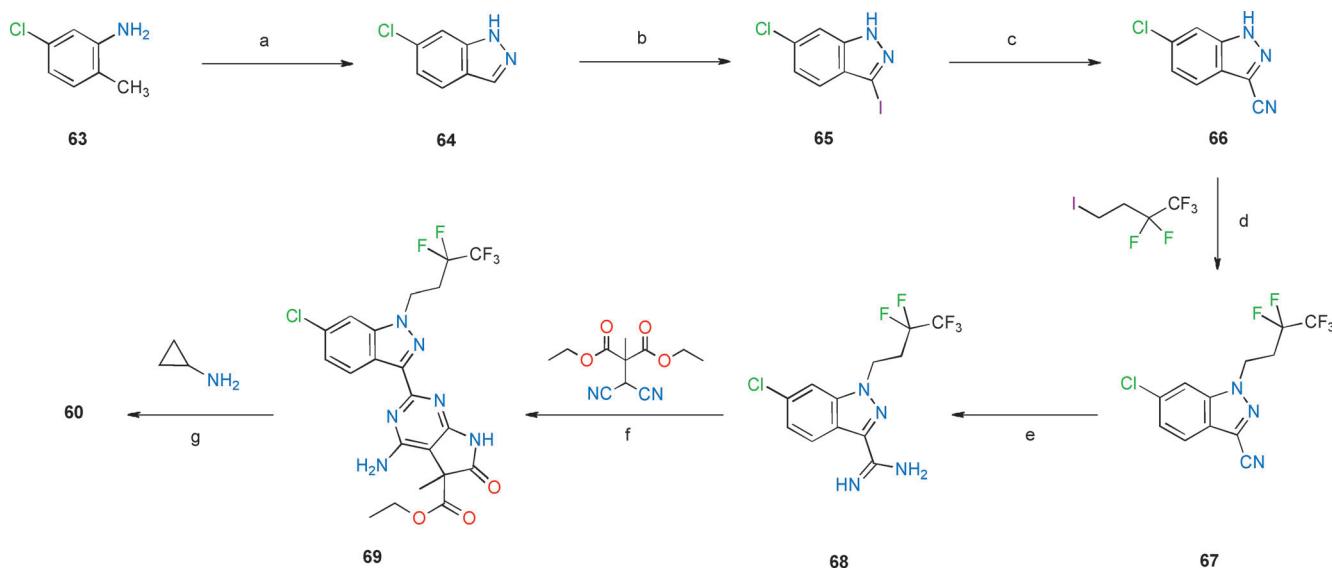
Bildungstest etwa 10mal weniger wirksam war als BAY 41-8543 (**3**; $\text{EC}_{10} = 470 \text{ nm}$, verglichen mit 44 nm bei BAY 41-8543) und in einem Relaxationstest mit Ratten-Aortenringen etwa 4mal weniger wirksam war (40 nm verglichen mit 10 nm bei BAY 41-8543). Bei Austausch des „nördlichen“ Fluorophenylsubstituenten durch eine Pyrimidinylgruppe wurde ein weiteres, verbessertes Analogon (Triazol **45**) identifiziert, das in dem Ratten-Aortenringtest zwar eine etwas geringere Wirkstärke aufwies ($\text{IC}_{50} = 60 \text{ nm}$), jedoch eine verbesserte



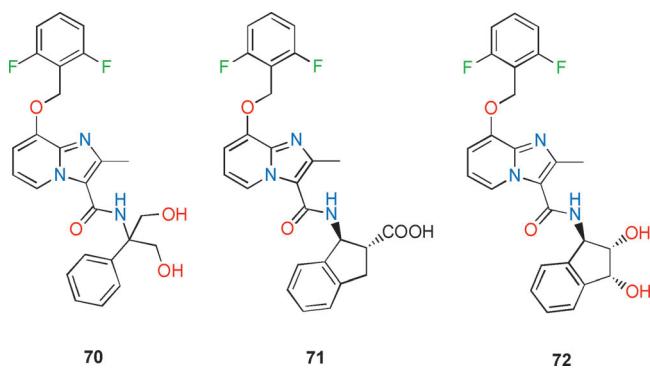
Die Synthese von Verbindung **60** begann mit Cyanindazol **66** und wurde nach Standardverfahren in fünf Schritten, beginnend mit Anilin **63** aufgebaut (Schema 15). Nach Alkylierung von **66** mit 1,1,1,2,2-Pentafluor-4-iodbutan wurde die Cyangruppe von **67** durch eine Trimethylaluminium-vermittelte Aminierung in ein Amidin umgewandelt. Anschließend wurde das Amidin **68** in einem Schritt mit Diethyl(dicyan-methyl)(methyl)malonat zu einem anellierten fünfgliedrigen Lactam **69** kondensiert. Die Aminolyse des Esters in **69** ergab schließlich den sGC-Stimulator **60** als racemische Mischung.

Es wurde berichtet, dass Verbindung **60** bei oraler Gabe an spontan hypertensive Ratten in einer Dosis von 0.3 mg kg⁻¹ den systolischen Blutdruck um max. 77 mm Hg senkte.^[86] Eine Weiterentwicklung einer dieser Verbindungen in klinischen Studien wurde bislang nicht bekanntgegeben.

Mit Ausnahme der schwach wirksamen Cinnamylamide sind bislang sämtliche sGC-Stimulator-Klassen mit der ersten Generation der sGC-Stimulatoren von Bayer strukturell verwandt. Im Jahr 2012 machte die Firma Astellas jedoch eine neue Serie von sGC-Stimulatoren publik, die ein Imidazo[1,2-*a*]pyridin-Gerüst aufwiesen (Schema 16).^[87] Als bemerkenswerte Ähnlichkeit zu den vorstehend genannten Pyrazolopyridin-sGC-Stimulatoren enthalten diese Verbindungen eine fluorierte Benzyl-Kopfgruppe. In dieser Serie scheint sich vorzugsweise ein 2,6-Difluorbenzyloxy-Substituent als wirksam zu erweisen. Es wurden mehr als 800 Amidderivate der Imidazo[1,2-*a*]pyridine veröffentlicht. Weitere Studien müssen zeigen, wie diese neuartigen sGC-Stimulatoren im Vergleich zu den Pyrazolopyridinen wie Riociguat abschneiden.



Schema 15. Synthese des sGC-Stimulator **60** von Merck. Reagentien und Bedingungen: a) 1. Ac_2O , KOAc , Benzol, RT; 2. $t\text{BuONO}$, 80°C ; 3. LiOH , MeOH , THF , H_2O , RT; b) NIS , MeCN , 60°C ; c) $\text{Zn}(\text{CN})_2$, Zn -Pulver, $[\text{Pd}_2\text{dba}_3]/\text{dppf}$ (kat.), DMA, 120°C ; d) K_2CO_3 , MeCN , Rückfluss; e) NH_4Cl , AlMe_3 , Toluol, RT bis 110°C ; f) KHCO_3 , $i\text{PrOH}$, 80°C ; g) MeOH , 50°C .

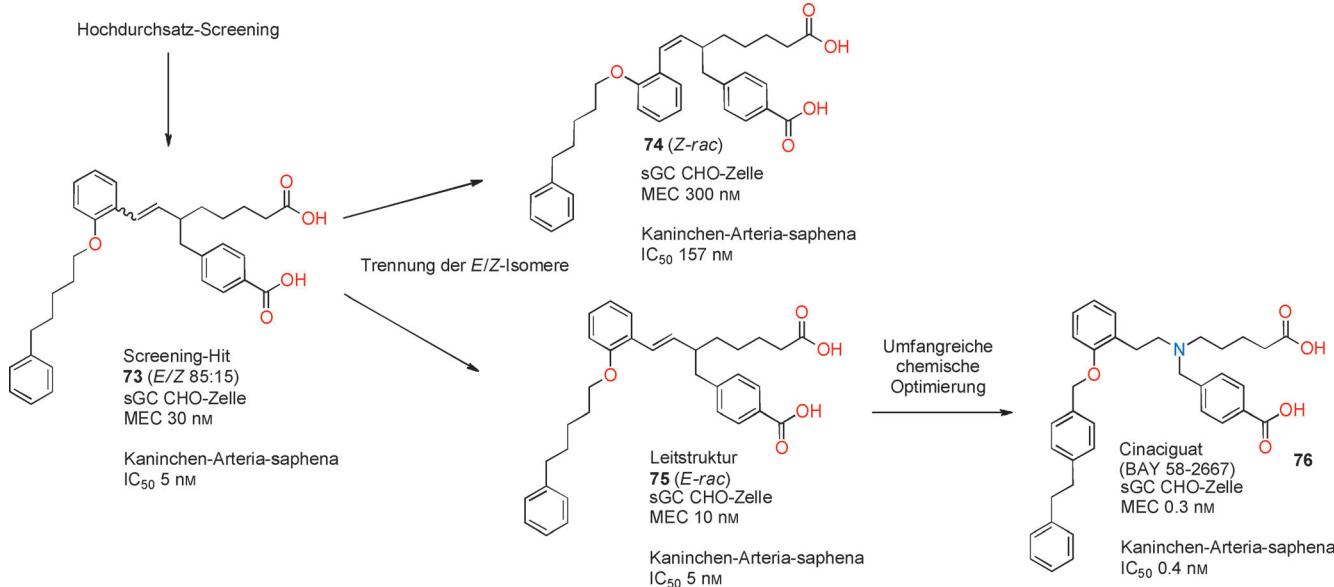


Schema 16. Imidazo[1,2-a]pyridine von Astellas.

3. sGC-Aktivatoren

3.1. Entdeckung der sGC-Aktivatoren

Nach Entdeckung der NO-unabhängigen, Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren versuchten Wissenschaftler bei Bayer 1997, durch ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) neue sGC-Stimulator-Leitstrukturen zu identifizieren. Hierzu wurde ein auf sGC überexprimierenden CHO-Reporterzelllinien basierendes Assay-System verwendet.^[58] Überraschenderweise wurde im Vergleich zu den beschriebenen sGC-Stimulatoren eine völlig andersartige neue Dicarbonsäure-Leitstruktur **73** identifiziert, welche die sGC hochwirksam aktivierte (Schema 17). Weitere mechanistische In-vitro-Untersuchun-



Schema 17. Entdeckung der neuen Klasse von sGC-Aktivatoren durch HTS unter Anwendung sGC überexprimierender CHO-Reporterzellen.

gen ergaben ein anderes pharmakologisches Profil als das der sGC-Stimulatoren. Die Dicarbonsäure **73** aktivierte die sGC nicht nur NO-unabhängig, sondern auch Häm-unabhängig. Basierend auf den unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften wurde die neue Verbindungsklasse als sGC-Aktivatoren bezeichnet.

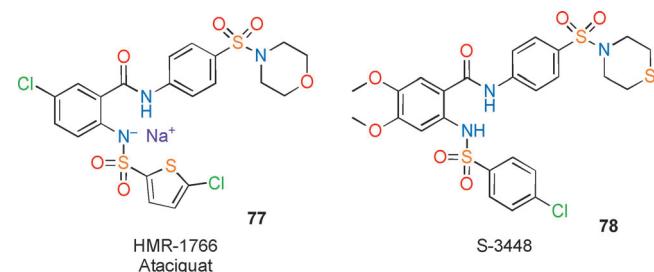
Diese unerwartete Entdeckung erwies sich als Hilfsmittel für die weitere Ausarbeitung der wissenschaftlichen These, dass die Bioaktivität der sGC redoxreguliert ist und dies der Schlüssel zur Pathogenese zahlreicher Herzkreislauferkrankungen sein könnte. Genauer gesagt lieferte dies eine erstklassige Gelegenheit, Medikamente zu entwickeln, welche selektiv an die oxidierte, Häm-freie sGC binden, welche durch den Einfluss von oxidativem Stress bei vielen Herzkreislauferkrankungen entsteht.^[27]

Nach Charakterisierung des Screening-Hits **73** stellte sich heraus, dass es sich bei dem Hit um ein racemisches Isomergemisch (85:15 E/Z) handelt. Nach Trennung der E- und Z-Isomere zeigte das racemische E-Isomer **75** eine 30-fach stärkere Wirkung als das racemische Z-Isomer **74**. Die anschließende Trennung der Enantiomere offenbarte, dass die Wirkstärke des R,E-Isomers von **75** um das 70-fache größer ist als die des entsprechenden S-Enantiomers. Darüber hinaus zeigte die Dicarbonsäure **75** auch eine vielversprechende Invitro-Wirkstärke an der isolierten rekombinanten sGC sowie an vorkontrahierten *Arteria-saphena*-Ringen (Kaninchen).^[88] Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurde ein umfangreiches chemisches Optimierungsprogramm um die Leitstruktur gestartet mit dem Ziel, einen für die intravenöse Gabe geeigneten klinischen Kandidaten zu identifizieren. Der Austausch der zentralen Allyleinheit durch eine Ethylamino-Verknüpfung sowie die Modifikation der Phenylpentyl-Seitenkette führte schließlich zur Entdeckung des klinischen Kandidaten BAY 58-2667 (**76**; INN: Cinaciguat).^[46,89-94]

Das pharmakologische Profil von Cinaciguat wurde in verschiedenen In-vivo-Modellen für Myokardinfarkt, chronische Niereninsuffizienz, arterielle und pulmonale Hypertonie sowie chronische Herzinsuffizienz untersucht. In einem experimentellen Hundemodell für chronische Herzinsuffizienz (HF) führte die intravenöse Gabe von Cinaciguat zu einer dosisabhängigen Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens bei gleichzeitigem Anstieg der Herzleistung und des renalen Blutflusses ohne weitere neurohumorale Aktivierung.^[95]

Auf Grundlage dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde eine nichtrandomisierte unverblindete multizentrische Phase-IIa-Studie an Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz (ADHF) durchgeführt. Die intravenöse Dauerinfusion mit Cinaciguat zeigte eine gute Verträglichkeit und führte ähnlich wie in den beschriebenen experimentellen Hundemodell mit chronischer Herzinsuffizienz zu einer Verbesserung der kardiopulmonalen Hämodynamik. In dem sich daran anschließenden klinischen Phase-IIb-Programm wurde die Wirkung von Cinaciguat in drei randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Studien an ADHF-Patienten untersucht.^[96] Die klinische Entwicklung von Cinaciguat wurde jedoch aufgrund von Schwierigkeiten bei der Kontrolle des Blutdrucks – was bei ADHF-Patienten unvorteilhaft sein kann – beendet.^[97-99]

2001 veröffentlichten Forscher von Hoechst Marion Roussel Anthranilsäure-Derivate, die eine neuartige Strukturklasse darstellten und die oxidierte und/oder Häm-freie Form der sGC aktivierten.^[100] Die am besten beschriebenen Beispiele sind HMR 1766 (**77**; INN: Ataciguat) und S-3448 (**78**; Schema 18).



Schema 18. sGC-Aktivatoren von Hoechst Marion Roussel: Ataciguat (**77**) und S-3448 (**78**).

Die Inhibition der Phenylephrin-induzierten Kontraktion der Aortenringe bei der Ratte durch die beiden Verbindungen ist nur moderat bis schwach ($IC_{50} = 0.46 \mu M$ bzw. $0.52 \mu M$),^[101] die pharmakologische Wirksamkeit von Ataciguat und S-3448 wurde jedoch in verschiedenen In-vivo-Modellen der Atherosklerose und peripheren arteriellen Verschlusskrankheit belegt. Die chronische Behandlung von diabetischen Ratten (Streptozotocin-induzierte Diabetes) mit Ataciguat verbesserte die endotheliale Funktion und normalisierte die Thrombozytenaktivierung.^[102] Darüber hinaus wurde bei mit Ataciguat behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen eine Reduktion der Atherosklerose und eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation beobachtet.^[103]

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit im Stadium II zeichnet sich hauptsächlich durch eine belastungsinduzierte Muskelschwäche aus. Ataciguat verbesserte die ischämiebedingte Muskelschwäche bei ZDF-Ratten (ZDF = Zucker Diabetic Fatty) mit unilateraler Hinterlaufischämie als experimentellem Modell der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.^[104]

Basierend auf diesen Daten wurde Ataciguat in einer klinischen Phase-II-Studie an Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit untersucht. Bislang wurden noch keine Ergebnisse veröffentlicht. Im Februar 2009 wurde die Studie ohne weitere Erklärung eingestellt.

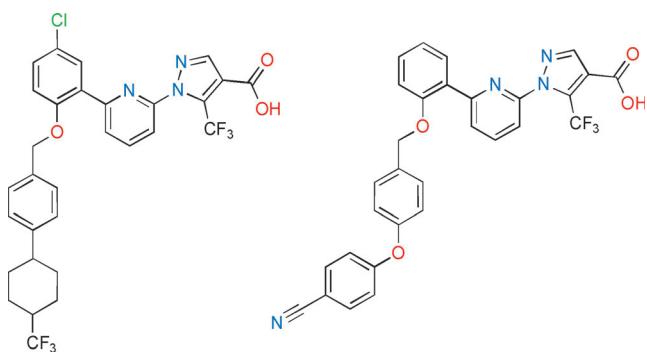
Darüber hinaus wurde Ataciguat in einer Phase-II-Studie an Patienten mit neuropathischen Schmerzen untersucht. Jedoch scheint die klinische Entwicklung eingestellt worden zu sein.

3.2. Aktivitäten hinsichtlich sGC-Aktivatoren der nächsten Generation

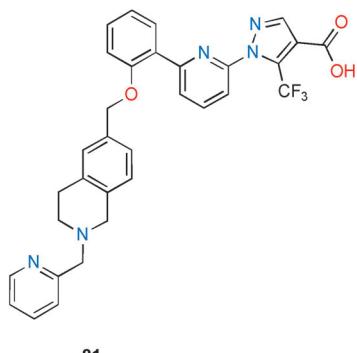
In den letzten Jahren hat sich die Suche nach neuen sGC-Aktivatoren zunehmend zu einem kompetitiven Forschungsfeld entwickelt. In der jüngsten Patentliteratur wurde über verschiedene Ansätze berichtet. Interessanterweise

enthalten alle sGC-Aktivatoren der zweiten Generation eine Monocarbonsäure-Einheit.

2009 veröffentlichten Merck^[105] (Verbindung **79**) und GlaxoSmithKline (GSK)^[106] (Verbindung **80**) ausgesprochen ähnliche sGC-Aktivatoren mit einer identischen 5-(Trifluormethyl)pyrazol-4-carbonsäure-Einheit an einem Pyridingerüst (Schema 19). Noch jüngeren Datums sind die von Boehringer Ingelheim offenbarten verwandten 5-(Trifluormethyl)pyrazol-4-carbonsäuren (Verbindung **81**) mit hoher In-vitro-Wirksamkeit^[107]



79 80

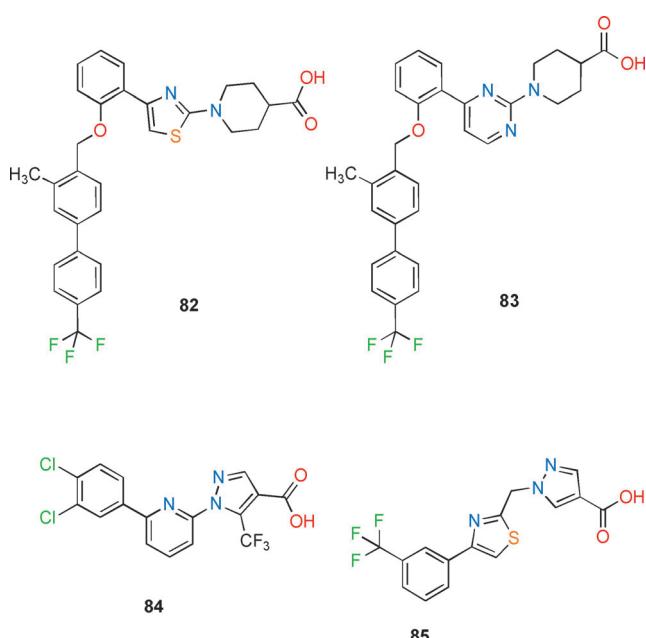


Schema 19. sGC-Aktivatoren von Merck, GSK und Boehringer Ingelheim

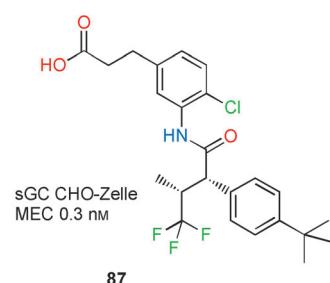
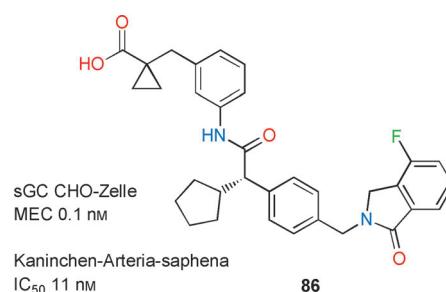
Im Jahr 2010 wurden von GSK zwei weitere sGC-Aktivator-Serien, nämlich Thiazolylpiperidincarbonsäuren^[108] (z. B. **82**) und Pyrimidinylpiperidincarbonsäuren^[109] (z. B. **83**) beschrieben (Schema 20). Es wird berichtet, dass die In-vitro-Wirkstärke im Bereich der vorstehend genannten Verbindungen liegt.

Darüber hinaus wurde in Patentanmeldungen von GSK^[110] (z. B. **84**) und Takeda^[111] (z. B. **85**) über Verbindungen mitkürzeren, weniger lipophilen Endgruppen berichtet. Insgesamt haben diese Verbindungen zwar eine geringere In-vitro-Wirkstärke, jedoch verfügen sie aufgrund des geringeren Molekulargewichts möglicherweise über verbesserte metabolische und pharmakokinetische Eigenschaften (DMPK).

Bayer offenbarte ebenfalls Monocarbonsäuren mit neuartigen Strukturmerkmalen, wobei der Schwerpunkt auf ver-



Schema 20. Weitere sGC-Aktivatoren von GSK und Takeda aus der Patentliteratur



Schema 21 3-Phenylpropionsäure-sGC-Aktivatoren von Bayer

zweigten 3-Phenylpropionsäure-Derivaten wie **86** lag (Schema 21).^[112,113] Mit dem Ziel der Verbesserung des DMPK-Profiles dieser Verbindungen wurden verwandte niedermolekulare 3-Phenylpropionsäuren hergestellt, beispielsweise **87**.^[114-116]

Bislang wurde noch nicht über eine klinische Entwicklung eines dieser neuen sGC-Aktivatoren berichtet.

4. Strukturbiologie

4.1. Strukturbiologie der sGC und derzeitiges Verständnis ihres Aktivierungsmechanismus

Zum Zeitpunkt der Leitstrukturoptimierung der sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren standen keine Röntgenstrukturen der vollständigen sGC oder ihrer Domänen zur Verfügung. Aus diesem Grund konnten keine Informationen aus dem In-silico-Ligandendesign genutzt werden. Stattdessen war man ausschließlich auf iterative Zyklen aus De-novo-Synthese und pharmakologischer und pharmakokinetischer Testung angewiesen. In den letzten 10 Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen Fortschritte im Verständnis des Aktivierungsmechanismus und des strukturellen Aufbaus der sGC erzielt. Die kürzlich erfolgte Aufklärung des Bindungsmodus des sGC-Aktivators Cinaciguat (siehe Abschnitt 4.3) ebnet nun den Weg für die Erforschung der sGC-Aktivierung auf molekularer Ebene.^[117]

Bei der sGC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit (Abbildung 4).^[118] Die am häufigsten auftretenden Isoformen der

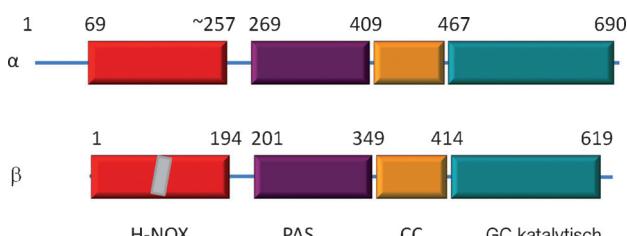


Abbildung 4. Domänenarchitektur der heterodimeren sGC; die α -Untereinheit besteht aus 690 Aminosäuren, die β -Untereinheit aus 619 Aminosäuren. Das Häm befindet sich in der H-NOX-Domäne der β -Untereinheit (graues Feld).

Untereinheiten sind $\alpha 1$ (kodiert vom humanen Gen *GUCY1A3*) und $\beta 1$ (kodiert vom humanen Gen *GUCY1B3*), in unterschiedlichen Geweben existieren aber auch andere Isoformen. Knockout-Studien legen nahe, dass hauptsächlich das $\alpha 1\beta 1$ -Heterodimer für die NO-induzierte vasodilatatorische Wirkung der sGC verantwortlich ist.^[119] Das $\alpha 2\beta 1$ -Heterodimer weist eine spezifischere Gewebeverteilung auf und zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Heterodimer mit dem Protein PSD-95 wechselwirkt.^[120,121] In einer Studie wurde nachgewiesen, dass der sGC-Stimulator BAY 41-2272 (2) diese Isoform ebenfalls aktiviert.^[122] Beim sGC-Aktivator Cinaciguat (76) wurde *in vitro* eine Isoform-spezifische Aktivität gemessen: Die aktivierende Wirkung auf das $\alpha 1\beta 1$ -Heterodimer war stärker als die auf $\alpha 2\beta 1$.^[121]

Darüber hinaus zeigt sich eine physiologische Rolle der Homodimere. Zwar sind diese katalytisch inaktiv, jedoch scheint die sGC-Aktivität über das Gleichgewicht zwischen Homo- und Heterodimeren reguliert zu sein.^[44] Jüngste Ergebnisse deuten ferner darauf hin, dass die einzelnen Untereinheiten eine eigenständige Wirkung auf die Androgenregulation und den Zellzyklus aufweisen.^[123,124]

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit sind in vier Domänen unterteilt (Abbildung 4). Die $\beta 1$ -Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Häm-bindenden Domäne, die eng mit einer Familie Häm-haltiger und NO- sowie Sauerstoff-bindender Enzyme verwandt ist; sie wird als H-NOX-Domäne bezeichnet. Die $\beta 1$ -H-NOX-Domäne der sGC ist deren Rezeptor für zweiatomige Gase; neben NO bindet auch CO, nicht aber O₂, an das Häm-Eisen. His105 fungiert als fünfter Ligand für das Eisen-Ion und spielt eine entscheidende Rolle bei der sGC-Aktivierung. Über die N-terminalen Domänen der $\alpha 1$ -Untereinheit ist hingegen nur wenig bekannt, eine Häm-Bindung an diese Domäne ist jedoch unwahrscheinlich, da die meisten der Häm-verankernden Aminosäuren der $\beta 1$ -Untereinheit in der $\alpha 1$ -Untereinheit fehlen.

An die H-NOX-Domäne schließen sich zwei Domänen an, die nach heutigem Wissen für die Bildung eines physiologisch funktionellen und stabilen Dimers von Bedeutung sind: eine Domäne mit einer PAS-artigen Faltung (benannt nach den drei Proteinen Per/Arnt/Sim) und eine Coiled-coil-Domäne. Die C-Termini der α - und β -Untereinheiten sind zu den katalytischen Domänen der Adenylatcyclasen homolog und für die Cyclisierung von GTP zu cGMP verantwortlich. Diese Domänen sind nur in einem heterodimeren Komplex katalytisch aktiv, da sich das aktive Zentrum an der Grenze zwischen den beiden homologen Untereinheiten befindet und Aminosäuren der Alpha- und Betaketten umfasst.^[125–128]

Zwar steht die Kristallstruktur der α - und β -Untereinheit von sGC nicht in voller Länge zur Verfügung, die meisten Domänen verwandter Proteine oder der sGC selbst wurden allerdings kristallisiert und liefern wertvolle Erkenntnisse über die Organisation und Aktivierung von sGC (Abbildung 5 zeigt die verfügbaren Strukturinformationen sowie eine mögliche Anordnung der Untereinheiten).^[125,127–131] Die Kristallstrukturen der PAS-Domäne des STHK-Proteins^[125] und der Coiled-coil-Domäne von Ratten-sGC^[129] zeigen, dass beide Domänen an der Heterodimerisierung von sGC beteiligt zu sein scheinen. Weitere Studien deuten auf direkte Wechselwirkungen der katalytischen Domäne mit der H-NOX-Domäne hin.^[132,133] Diese Ergebnisse wurden kürzlich durch 3D-Simulationen auf der Grundlage von Kleinwinkel-Beugungsexperimenten und Experimenten, bei denen die Proteinketten chemisch vernetzt werden, weiter gestützt.^[134]

Einige Tage vor Fertigstellung dieses Aufsatzes wurde vom – nomen est omen – Structural Genomics Consortium (SGC) in Oxford/Großbritannien die erste Kristallstruktur einer mutierten heterodimeren katalytischen Domäne der humanen sGC veröffentlicht.^[128]

Die dort aufgeklärte Röntgenstruktur der katalytischen $\alpha 1/\beta 1$ -Domäne (Auflösung: 2.08 Å) umfasst ein Dimer, das an strukturell bereits bekannte Säugetier-Adenylatcyclasen und Guanylatcyclasen von Bakterien und Algen erinnert.^[127,131] Insgesamt liegt das $\alpha 1/\beta 1$ -Heterodimer wahrscheinlich in einer inaktiven Konformation vor. Die Überlagerung mit einer aktiven Adenylatcyclase-Struktur legt nahe, dass bei Aktivierung eine erhebliche Umstrukturierung des sGC-Heterodimers notwendig sein müsste, bei der einzelne Strukturelemente um bis zu 10 Å ihre Position verändern.

Für die H-NOX-Domäne ist die Röntgenstruktur der humanen Isoform zwar nicht verfügbar, es wurden jedoch

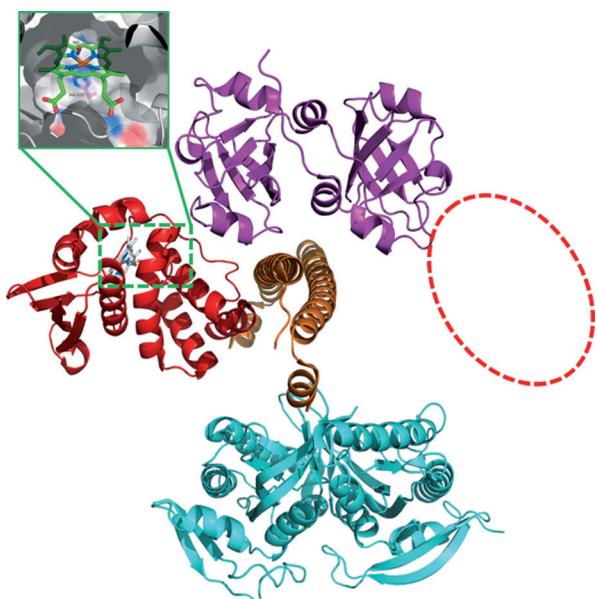


Abbildung 5. Eine mögliche 3D-Anordnung aller strukturell bekannter Domänen der sGC oder homologer Enzyme; β -H-NOX-Domäne (rot) mit gebundenem Häm (PDB-Code 2OOC),^[130] PAS-Domäne (violet, 2P04),^[125] CC-Domäne (orange, 3HLS)^[129] und katalytische Domäne (türkis, 3UVJ).^[128] Die α -H-NOX-Domäne ist als leerer rotes Ellipsoid dargestellt, da in der Proteindatenbank^[48] keine ausreichend homologe Struktur verfügbar ist. Die Bindungsstelle des Häms in der β -H-NOX-Domäne ist vergrößert dargestellt.

Homologe aus unterschiedlichen Bakterienstämmen strukturell untersucht.^[40,41,130] Die der humanen sGC am stärksten ähnelnde H-NOX-Domäne ist die von *Nostoc* sp. (*Ns* H-NOX) mit einer Sequenzidentität von 35 %. In der NO-freien (inaktivierten) Struktur befindet sich die Häm-Einheit zwischen einer kleinen α -Helix- und einer größeren α/β -Subdomäne. Ein konserviertes Histidin (His105) fungiert als fünfter Ligand für das fünffach koordinierte Eisenzentrum.

Voraussetzung für eine vollständige sGC-Aktivierung sind die Bindung von NO an das Häm-Eisenzentrum (Oxidationsstufe Fe^{2+}) unter Bildung eines sechsfach koordinierten intermediären Komplexes und die anschließende Dissoziation von His105, was zu einem fünffach koordinierten Zustand führt. Neuere Studien diskutieren jedoch, dass zur Auslösung der Signaltransduktion unter Umständen keine vollständige Dissoziation notwendig ist.^[135] Die Konformationsänderung in der H-NOX-Domäne setzt sich in die heterodimere katalytische Domäne fort, wodurch die Produktion von cGMP verstärkt wird. Als Bindeglied zwischen der NO-Bindung und der sGC-Aktivierung wurde eine Spannungsverminderung des Häm-Kofaktors bei der Dissoziation von His105 (oder Verlängerung der Fe-His-Bindung) in Kombination mit Bewegungen der N-Termini vorgeschlagen^[136] und mit einer sich entspannenden Feder bildhaft verglichen.^[137]

Die Dissoziation von His105 bei der NO-Bindung ist ein Beispiel für den thermodynamischen *trans*-Effekt (gelegentlich auch als *trans*-Einfluss bezeichnet, d.h. Schwächung der zu einem Liganden *trans*-ständigen Bindung).^[138] Dieser Effekt spiegelt bei der sGC die Konkurrenz der σ -Donor-

orbitale von NO und His105 um das Eisen- d_{z^2} -Orbital wider, wobei NO als stärkerer Donor die Bindungsenergie des schwächeren Donors His105 reduziert.^[139] CO bindet ebenfalls an Häm-Eisen, sein erheblich schwächerer *trans*-Effekt reicht jedoch nicht aus, um die Dissoziation von His105 auszulösen.^[140,141] Daher bewirkt CO nur eine schwache sGC-Aktivierung.

Neben dem *trans*-Effekt von NO (der von einigen Autoren als „negativer *trans*-Effekt“ bezeichnet wird) sind wahrscheinlich weitere Strukturmerkmale im Umfeld der Häm-Bindungsstelle ursächlich für die im Vergleich zu anderen Häm-haltigen Enzymen ungewöhnliche Fähigkeit von sGC die Eisen-His-Bindung zu spalten. Die Verminderung von Spannung, die benachbarte Seitenketten auf His105 ausüben, könnte einer dieser zusätzlichen Einflussfaktoren sein.^[142] Eine detailliertere Diskussion dieser Faktoren und Studien zu verwandten Häm-haltigen Enzymen würde den Rahmen dieser Übersicht jedoch sprengen.

Eine weitere Komplexitätsebene ergibt sich aus Hinweisen auf die Existenz einer zweiten, weniger affinen Bindungsstelle für NO. Einige Arbeitsgruppen haben belegt, dass die Umwandlung des sechsfach koordinierten Zwischenzustands in den fünffach koordinierten aktiven Nitrosyl-Häm-Komplex von der Konzentration an freiem NO abhängt. Dieser Befund legt eine zweite Bindungsstelle für NO an der sGC nahe.^[118,143–145]

Die stöchiometrische Bindung von NO an den Häm-Kofaktor führt zu einer gering ausgeprägten Enzymaktivierung. Eine wesentlich höhere katalytische Aktivität wird erzielt, wenn entweder zusätzliches NO oder sGC-Stimulatoren wie YC-1 (**1**) oder BAY 41-2272 (**2**) vorhanden sind.^[143,146] Darüber hinaus wurde eine allosterische Modulation der Dauer und Intensität einer Enzymaktivierung durch Nukleotide (z.B. GTP, ATP) beobachtet.^[147] In einigen der zahlreichen spektroskopischen Studien, die die NO-Häm-Wechselwirkung näher beleuchten,^[148,149] wurden die durch die Bindung von sGC-Stimulatoren am Enzym ausgelösten Strukturveränderungen untersucht. Mit Resonanz-Raman-Spektroskopie konnten zwischen der Bindung des ersten NO an das Häm und dem Vorliegen von überschüssigem NO keine Unterschiede im Spektrum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu traten in Gegenwart von sGC-Stimulatoren signifikante Veränderungen auf, vermutlich aufgrund einer Veränderung der Häm-Geometrie und einer geringfügigen Modifikation des Fe-N-O-Winkels.^[146]

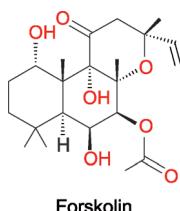
Studien, die die Wechselwirkung zwischen Kohlenstoffmonoxid (CO), YC-1 (**1**) und sGC analysieren, stützen ebenfalls den indirekten Wirkmechanismus der sGC-Stimulatoren. Zwar stimuliert die CO-Bindung sGC nur schwach, doch es konnte an anderen Spezies gezeigt werden, dass die Kombination von CO mit YC-1 (**1**) das Enzym ähnlich stark aktivieren kann wie NO.^[27,55,150] Ein möglicher Mechanismus ist die Verlangsamung der NO- und CO-Dissoziation durch YC-1 (**1**).^[150] Der Effekt wurde nicht nur *in vitro*, sondern auch in Studien mit verschiedenen Geweben von Schweinen und Ratten sowie in menschlichen Thrombozyten beobachtet.^[151–153]

4.2. Studien zur Aufklärung der strukturellen Basis für die sGC-Stimulation

Bis heute liegen keine Röntgendiffraktionsdaten vor, die die Bindungsstelle und den Wirkmechanismus der sGC-Stimulatoren erklären. Unterschiedlichste experimentelle Ansätze zur Lokalisierung der Bindungsstelle der sGC-Stimulatoren (z.B. Bindungsstudien mit sGC-Mutanten, Raman-Spektroskopie oder Photoaffinitäts-Markierungsstudien mit künstlichen Analoga) lieferten bisher widersprüchliche Daten.

Basierend auf UV/Vis-Spektroskopiestudien wurde eine direkte Wechselwirkung der sGC-Stimulatoren wie z.B. BAY 41-2272 (**2**) mit der prosthetischen Häm-Gruppe ausgeschlossen.^[154] In jüngerer Zeit legten Untersuchungen mit Resonanz-Raman-Spektroskopie nahe, dass die Zugabe von YC-1 oder BAY 41-2272 (**2**) zu NO-gebundener sGC eine Veränderung der Häm-Geometrie auslöst.^[146] Diese Veränderung spiegelt unter Umständen die Stimulator-induzierte Verschiebung hin zu einer aktiveren sGC-Konformation wider, aber nicht notwendigerweise eine direkte Wechselwirkung des Liganden mit der Häm-Gruppe.

Durch die dimere Natur der ACs und sGCs bildet sich neben der echten Nukleotid Bindestelle eine weitere, pseudosymmetrische Tasche in der katalytischen Einheit aus. Diese Kavität ist aber katalytisch inaktiv, da die entscheidenden Aminosäuren fehlen, die für die Bildung von cGMP oder cAMP relevant sind. Im Falle der ACs ist diese pseudosymmetrische Tasche die Bindungsstelle des bekannten allosterischen AC-Stimulators Forskolin (Strukturformel siehe Abbildung 6), eines von der indischen Bundnessel (*Coleus forskohlii*) erzeugten Diterpens.^[155]



Forskolin

Abbildung 6. Chemische Struktur des bekannten Adenylylatcyclase(AC)-Stimulators Forskolin.

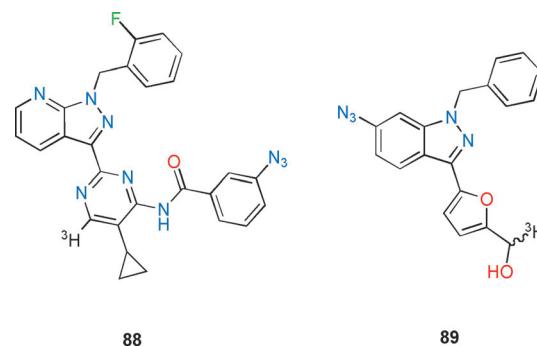
Vorliegen zweier Nukleotid-Bindungsstellen an der sGC. Außerdem wurde in Verdrängungsexperimenten von Nukleotidanalogen durch YC-1 (**1**) und den sGC-Stimulator BAY 41-2272 (**2**) gezeigt, dass beide Verbindungen um eine dieser beiden Bindestellen konkurrieren.^[157]

In der vor kurzem aufgeklärten Kristallstruktur der katalytischen $\alpha\beta\gamma$ -Domäne,^[128] die vermutlich eine inaktive Konformation zeigt, ist die „Forskolin-artige“ Bindungsstelle kollabiert. In einem berechneten Modell der aktiven Konformation öffnet sich jedoch eine zusätzliche Bindungstasche (kleiner als in AC), in der sGC-Effektormoleküle binden könnten.

Trotz der Existenz der beiden Bindungsstellen zeigten frühere Studien, dass die Aktivität der isolierten katalytischen sGC-Domänen durch YC-1 (**1**) und BAY 41-2272 (**2**)

nicht beeinflusst wird. Dieser Befund deutet darauf hin, dass das katalytische Zentrum keine sGC-Stimulatoren bindet.^[158] Dazu passt, dass ein um die katalytische Domäne verkürztes sGC-Konstrukt des Tabakschwärmers (*Manduca sexta*) auf sGC-Stimulatoren wie YC-1 (**1**) reagiert.

Die In-situ-Erzeugung eines hochreaktiven Ligandenradikals oder Nitrens in Gegenwart des fraglichen Proteins stellt eine übliche Methode zur Kartierung von Bindungsstellen dar. Um weitere Daten zum Wirkmodus der sGC-Stimulatoren zu erhalten, wurde ein tritiertes Analogon **88** von BAY 41-2272 (**2**) mit einem Photoaffinitäts-Marker an der primären Aminogruppe synthetisiert (Schema 22).^[159] Zur Einführung der Tritiummarkierung wurde zunächst eine



Schema 22. Tritierter sGC-Stimulator **88** und tritiertes YC-1-Analog **89** für Photoaffinitäts-Markierungsstudien mit sGC.

bromierte Vorstufe für den Einsatz in einer Palladium-katalysierten Debromierung unter einer Tritiumatmosphäre synthetisiert. Anschließend erfolgte die Acylierung mit 3-Azidobenzoylchlorid zu Verbindung **88** mit einer spezifischen Aktivität von 7.9 Ci mmol^{-1} ($292 \text{ GBq mmol}^{-1}$).

Verbindung **88** wies ein sGC-Stimulatorprofil auf, das dem von BAY 41-2272 (**2**) stark ähnelt.^[159] Dieses Ergebnis stimmt mit dem allgemeinen SAR-Trend überein, dass sterisch anspruchsvolle Gruppen an der Pyrimidin-Aminogruppe akzeptiert werden. Aufgrund der Auswahl dieser Stelle für die Photoaffinitätsmarkierung und des Befundes, dass das pharmakologische Profil im Vergleich zu BAY 41-2272 (**2**) unbeeinträchtigt ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass Verbindung **88** in einer Weise an sGC bindet, die für Stimulatoren typisch ist. Die photoaktive Azidogruppe ist relativ weit entfernt von den für die SAR wichtigen „nördlichen“ und zentralen Abschnitten des Moleküls.

Die Bestrahlung der Verbindung **88** in Gegenwart von sGC führte zu einer beinahe exklusiven Markierung der α -Untereinheit von sGC, die in Gegenwart von BAY 41-2272 (**2**) signifikant reduziert war, was die Konkurrenz um eine gemeinsame Bindungsstelle unterstreicht. Die Fragmentierung des markierten Rattenproteins sowie die anschließende Abtrennung und Sequenzierung zeigten, dass Verbindung **88** an der α -Untereinheit an Cys238 und Cys243 gebunden war. Beide Aminosäuren befinden sich entweder am C-Terminus der α -H-NOX-Domäne oder in der Linkerregion zwischen der α -H-NOX- und der α -PAS-Domäne.

In einer ähnlichen Studie wurde das tritierte Photoaffinitätsanalogon **89** von YC-1 (Schema 22) zusammen mit sGC bestrahlt.^[160] Die Synthese von **89** wurde ausgehend von

Azido-YC-1 durch Oxidation (MnO_2) zu dem entsprechenden Furancarbaldehyd und anschließende Reduktion mit tritiertem Natriumborhydrid erreicht. Auch hier wurde die bevorzugte Markierung der α -Untereinheit beobachtet. Die Verdrängung durch YC-1 (**1**) war jedoch gering, was auf einen anderen Bindungsmodus für **89** im Vergleich zu YC-1 (**1**) deutet.^[160]

Ohne Kenntnis einer Kristallstruktur eines vollständigen sGC-Stimulator-Komplexes kann nicht nachgewiesen werden, ob die Verbindungen nur an die α -Untereinheit oder zumindest teilweise auch an die β -Untereinheit binden. Nachfolgende Mutationsstudien der α -Untereinheit zeigten keine Wirkung auf die BAY 41-2272-induzierte Aktivierung von sGC, was eine Bindungsstelle auf der α -Untereinheit in Frage stellt.^[27]

Ferner wurde eine autoinhibitorische Wechselwirkung zwischen der C-terminalen katalytischen Domäne und der N-terminalen H-NOX-Domäne diskutiert, die durch überschüssiges NO und sGC-Stimulatoren abgeschwächt werden könnte.^[133]

Man kann zusammenfassen, dass sGC-Stimulatoren ihre Wirkung durch allosterische Modulation ausüben, die eine aktive sGC-Konformation stabilisiert. Ob sich sGC-Stimulatoren tatsächlich in Forskolin-ähnlicher Weise an die katalytische Domäne von sGC oder eher an die Kontaktfläche zwischen der katalytischen Domäne und der H-NOX-Domäne binden, bleibt offen. Zur Aufklärung der genauen Bindungsstelle sind weitere Studien notwendig.

4.3. Strukturelles Verständnis der sGC-Aktivierung

Im Gegensatz zu sGC-Stimulatoren, deren Bindungsmodus noch ungeklärt ist, existiert für die Bindung der Aktivatoren an sGC ein zuverlässiges Modell. Es wurde bereits früh postuliert, dass Cinaciguat an die H-NOX-Domäne von sGC bindet und mit Häm um dessen Bindungsstelle konkurriert.^[41] Die Häm-Gruppe von sGC ist über ihren axialen Liganden His105 und das spezifische sGC-Häm-Bindungsmotiv Tyr135-Ser137-Arg139 (Y-S-R) an die β -Untereinheit gebunden.^[41-43, 126, 161, 162] Die auf Aktivitäts-, Bindungs-, Mutations- und Spektroskopiestudien beruhende „Konkurrenz“-Hypothese wurde durch strukturelle Übereinstimmungen, die zeigen, dass Cinaciguat die räumliche Struktur des sGC-Porphyrin-Liganden nachahmen kann, gestützt.^[42] Wertvolle Erkenntnisse lieferten die Kristallstrukturen der H-NOX-Domäne von *Nostoc* sp. im Komplex mit Cinaciguat^[117] und einem ihm sehr ähnlichen Analogon.^[163] Wie postuliert verdrängt Cinaciguat das Häm aus seiner Bindungsstelle (Abbildung 7); bei der Bindung wird His105 um etwa 0.7 Å aus seiner „inaktiven“ Häm-gebundenen Konformation verschoben. Die Folge davon ist, dass die Helix, in der das His105 lokalisiert ist, um ca. 3° gedreht wird. Diese Drehung der Helix führt zu einer großen Umorientierung des gesamten Bereichs, was die Oberfläche des Proteins derart verändert, dass kein Aktivierungssignal mehr übertragen werden kann.^[133] Die Strukturdaten wurden durch Mutagenesestudien weiter gestützt.^[117] Interessanterweise zeigt das dem Cinaciguat sehr ähnliche Analogon eine festere Bindung ans sGC,

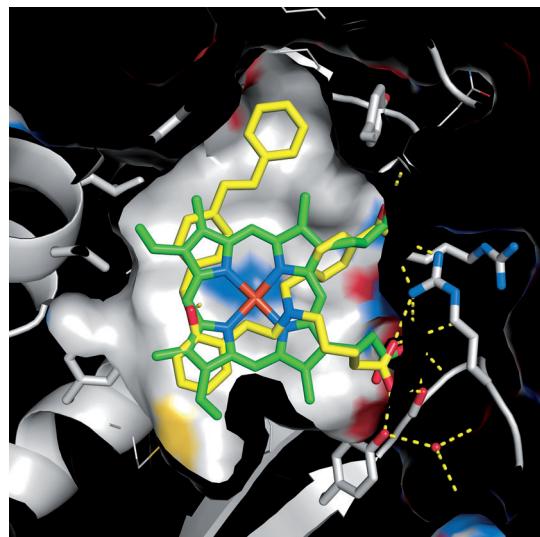


Abbildung 7. Röntgenstruktur der β -H-NOX-Domäne von *Nostoc* sp., wobei Cinaciguat (gelb) mit Häm (grün) überlagert ist. Die Röntgenstrukturen belegen eindeutig die konkurrierende Bindung von Cinaciguat an das Häm sowie die Nachahmung der Häm-Carbonsäuren durch die von Cinaciguat.

was zu einer insgesamt geordneteren Kristallstruktur führt. Hier ist die Veränderung der gesamten Region und der Oberfläche von sGC in dieser Region weniger stark ausgeprägt.^[163]

Die letzten Jahre haben für das Verständnis der dreidimensionalen Struktur von sGC sowie ihrer Aktivierung einen enormen Wissenszugewinn geliefert. Insbesondere die Bindung und den Wirkmechanismus der sGC-Aktivatoren wie Cinaciguat versteht man heute viel besser. Trotzdem bleiben noch viele Fragen unbeantwortet und weitere Studien über die Aktivierung und katalytische Aktivität von sGC sind nach wie vor von größter Bedeutung für das Verständnis und die Modulation dieses Schlüsselenzyms.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Häm-abhängige sGC-Stimulatoren und Häm-unabhängige sGC-Aktivatoren stellen neuartige therapeutische Optionen für Herz-Lungen-Erkrankungen mit endothelialer Dysfunktion dar. Als am weitesten entwickelter sGC-Stimulator wurde Riociguat vor kurzem in klinischen Phase-III-Studien zu pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) und chronischer thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) untersucht. Derzeit werden weitere präklinische und klinische Studien durchgeführt, und die Zukunft wird das vollständige Potenzial dieses neuartigen Wirkprinzips zeigen.

Nach den anfänglichen Misserfolgen von Cinaciguat und Ataciguat haben sGC-Aktivatoren in letzter Zeit erneut die Aufmerksamkeit auf sich gezogen, und viele Unternehmen sind neu in dieses Forschungsgebiet eingestiegen. Die Perspektive der spezifischen Aktivierung Häm-freier sGC bei Krankheiten, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, erscheint sehr verlockend und verspricht die Bereitstellung neuartiger Therapien für verschiedene Erkrankungen.

Eingegangen am 28. März 2013

- [1] M. J. Plater, *Bull. Hist. Chem.* **2010**, *35*, 40–45.
- [2] S. O'Connor, *J. Automat. Chem.* **1993**, *15*, 9–12.
- [3] A. S. Pina, A. Hussain, A. C. A. Roque, *Methods Mol. Biol.* **2010**, *572*, 3–12.
- [4] A. Nobel, US57175A, **1866**.
- [5] A. Nobel, US78317A, **1868**.
- [6] A. Nobel, US141455A, **1873**.
- [7] N. Marsh, A. Marsh, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 313–319.
- [8] W. Murrell, *Lancet* **1879**, *1*, 80–81.
- [9] W. B. Fye, *Clin. Cardiol.* **1995**, *18*, 426–427.
- [10] N. Ringertz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 925–928.
- [11] A. Daiber, T. Muenzel, T. Gori, *Adv. Pharmacol.* **2010**, *60*, 177–227.
- [12] T. Muenzel, T. Gori, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 251–259.
- [13] W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3203–3207.
- [14] F. Murad, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1976–1989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1856–1868.
- [15] R. F. Furchtgott, P. D. Cherry, J. V. Zawadzki, D. Jothianandan, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1984**, *6*, S336–343.
- [16] W. Martin, R. F. Furchtgott, G. M. Villani, D. Jothianandan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, *237*, 529–538.
- [17] R. F. Furchtgott, P. M. Vanhoutte, *FASEB J.* **1989**, *3*, 2007–2018.
- [18] D. Y. Gruetter, C. A. Gruetter, B. K. Barry, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 2943–2950.
- [19] D. B. McNamara, P. J. Kadowitz, A. L. Hyman, L. J. Ignarro, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1980**, *58*, 1446–1456.
- [20] C. A. Gruetter, B. K. Barry, D. B. McNamara, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, *214*, 9–15.
- [21] C. A. Gruetter, D. Y. Gruetter, J. E. Lyon, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *219*, 181–186.
- [22] L. J. Ignarro, H. Lippton, J. C. Edwards, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, C. A. Gruetter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *218*, 739–749.
- [23] E. H. Ohlstein, K. S. Wood, L. J. Ignarro, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 187–198.
- [24] L. J. Ignarro, J. N. Degnan, W. H. Baricos, P. J. Kadowitz, M. S. Wolin, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *718*, 49–59.
- [25] L. J. Ignarro, J. B. Adams, P. M. Horwitz, K. S. Wood, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4997–5002.
- [26] L. J. Ignarro, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2002–2013; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1882–1892.
- [27] O. V. Evgenov, P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. H. W. Schmidt, J.-P. Stasch, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 755–768.
- [28] H. H. Schmidt, U. Walter, *Cell* **1994**, *78*, 919–925.
- [29] U. R. Schwarz, U. Walter, M. Eigenthaler, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1153–1161.
- [30] P. Sinnnaeve, J. D. Chiche, Z. Nong, O. Varenne, P. N. Van, H. Gillijns, D. Collen, K. D. Bloch, S. Janssens, *Circ. Res.* **2001**, *88*, 103–109.
- [31] Z. Li, X. Xi, M. Gu, R. Feil, R. D. Ye, M. Eigenthaler, F. Hofmann, X. Du, *Cell* **2003**, *112*, 77–86.
- [32] M. C. Cerra, D. Pellegrino, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 585–599.
- [33] P. R. B. Evora, P. M. Evora, A. C. Celotto, A. J. Rodrigues, E. E. Joviliano, *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 1207–1214.
- [34] M. T. Gladwin, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2330–2332.
- [35] M. Hoenicka, C. Schmid, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2008**, *6*, 287–301.
- [36] C. S. Packer, *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 302–303.
- [37] F. B. M. Priviero, R. C. Webb, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2010**, *56*, 229–233.
- [38] N. D. Roe, J. Ren, *Vasc. Pharmacol.* **2012**, *57*, 168–172.
- [39] B. Mayer, D. Koesling, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 546–548.
- [40] P. Nioche, V. Berka, J. Vipond, N. Minton, A. L. Tsai, C. S. Raman, *Science* **2004**, *306*, 1550–1553.
- [41] P. Pellicena, D. S. Karow, E. M. Boon, M. A. Marletta, J. Kuriyan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12854–12859.
- [42] P. M. Schmidt, M. Schramm, H. Schroder, F. Wunder, J.-P. Stasch, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3025–3032.
- [43] B. Wedel, P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Bohme, G. Schultz, D. Koesling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2592–2596.
- [44] U. Zabel, C. Hausler, M. Weeger, H. H. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18149–18152.
- [45] U. Zabel, M. Weeger, M. La, H. H. Schmidt, *Biochem. J.* **1998**, *335*, 51–57.
- [46] H. H. H. W. Schmidt, P. M. Schmidt, J.-P. Stasch, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, *191*, 309–339.
- [47] J.-P. Stasch, A. J. Hobbs, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, *191*, 277–308.
- [48] a) F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542; b) T. C. Mou, N. Masada, D. M. Cooper, S. R. Spang, *Biochemistry* **2009**, *15*, 3387–3397.
- [49] L. S. Hoffmann, P. M. Schmidt, Y. Keim, C. Hoffmann, H. H. H. W. Schmidt, J.-P. Stasch, *PLoS One* **2011**, *6*, e23596.
- [50] J.-P. Stasch, P. M. Schmidt, P. I. Nedvetzky, T. Y. Nedvetzky, K. H. S. Arun, S. Meurer, M. Deile, A. Taye, A. Knorr, H. Lapp, H. Mueller, Y. Turgay, C. Rothkegel, A. Tersteegen, B. Kemp-Harper, W. Mueller-Esterl, H. H. H. W. Schmidt, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2552–2561.
- [51] S. Meurer, S. Pioch, T. Pabst, N. Opitz, P. M. Schmidt, T. Beckhaus, K. Wagner, S. Matt, K. Gegenbauer, S. Geschka, M. Karas, J.-P. Stasch, H. H. H. W. Schmidt, W. Mueller-Esterl, *Circ. Res.* **2009**, *105*, 33–41.
- [52] Y. Sharkovska, P. Kalk, B. Lawrenz, M. Godes, L. S. Hoffmann, K. Wellkisch, S. Geschka, K. Relle, B. Hocher, J.-P. Stasch, *J. Hypertens.* **2010**, *28*, 1666–1675.
- [53] S. Yoshina, A. Tanaka, S.-C. Kuo, *Yakugaku Zasshi* **1978**, *98*, 204–209.
- [54] C.-C. Wu, F.-N. Ko, S.-C. Kuo, F.-Y. Lee, C.-M. Teng, *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1973–1978.
- [55] A. Friebe, G. Schultz, D. Koesling, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6863–6868.
- [56] A. Mülsch, J. Bauersachs, A. Schäfer, J.-P. Stasch, R. Kast, R. Busse, *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 681–687.
- [57] M. Hoenicka, E.-M. Becker, H. Apeler, T. Sirichoke, H. Schroder, R. Gerzer, J.-P. Stasch, *J. Mol. Med.* **1999**, *77*, 14–23.
- [58] F. Wunder, J.-P. Stasch, J. Huetter, C. Alonso-Alija, J. Hueser, E. Lohrmann, *Anal. Biochem.* **2005**, *339*, 104–112.
- [59] A. Straub, J. P. Stasch, C. Alonso-Alija, J. Benet-Buchholz, B. Ducke, A. Feurer, C. Fürstner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 781–784.
- [60] J. Mittendorf, S. Weigand, C. Alonso-Alija, E. Bischoff, A. Feurer, M. Gerisch, A. Kern, A. Knorr, D. Lang, K. Muenter, M. Radtke, H. Schirok, K.-H. Schlemmer, E. Stahl, A. Straub, F. Wunder, J.-P. Stasch, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 853–865.
- [61] D. L. Selwood, D. G. Brummell, J. Budworth, G. E. Burtin, R. O. Campbell, S. S. Chana, I. G. Charles, P. A. Fernandez, R. C. Glen, M. C. Goggin, A. J. Hobbs, M. R. Kling, Q. Liu, D. J. Madge, S. Millerais, K. L. Powell, K. Reynolds, G. D. Spacey, J. N. Stables, M. A. Tatlock, K. A. Wheeler, G. Wishart, C.-K. Woo, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 78–93.

- [62] L. N. Miller, M. Nakane, G. C. Hsieh, R. Chang, T. Kolasa, R. B. Moreland, J. D. Brioni, *Life Sci.* **2003**, *72*, 1015–1025.
- [63] M. Nakane, T. Kolasa, R. Chang, L. N. Miller, R. B. Moreland, J. D. Brioni, *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *102*, 231–238.
- [64] A. Straub, J. Benet-Buchholz, R. Frode, A. Kern, C. Kohlsdorfer, P. Schmitt, T. Schwarz, H.-M. Siefert, J.-P. Stasch, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1711–1717.
- [65] R. T. Schermuly, J. P. Stasch, S. S. Pullamsetti, R. Middendorff, D. Mueller, K. D. Schlueter, A. Dingendorf, S. Hackemack, E. Kolosioneck, C. Kaulen, R. Dumitrascu, N. Weissmann, J. Mittendorf, W. Klepetko, W. Seeger, H. A. Ghofrani, F. Grimminger, *Eur. Respir. J.* **2008**, *32*, 881–891.
- [66] M. Lang, B. Kojonazarov, X. Tian, A. Kalymbetov, N. Weissmann, F. Grimminger, A. Kretschmer, J.-P. Stasch, W. Seeger, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, *PLoS One* **2012**, *7*, e43433.
- [67] J.-P. Stasch, P. Pacher, V. Evgenov Oleg, *Circulation* **2011**, *123*, 2263–2273.
- [68] P. M. Werchan, W. R. Summer, A. M. Gerdes, K. H. McDouough, *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, H1328–1336.
- [69] D. S. O'Callaghan, L. Savale, D. Montani, X. Jais, O. Sitbon, G. Simonneau, M. Humbert, *Nat. Rev. Cardiol.* **2011**, *8*, 526–538.
- [70] D. Montani, D. S. O'Callaghan, X. Jais, L. Savale, D. Natali, A. Redzepi, S. Hoette, F. Parent, O. Sitbon, G. Simonneau, M. Humbert, *Eur. Respir. Rev.* **2009**, *18*, 272–290.
- [71] G. Simonneau, I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z.-C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, R. Souza, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *54*, S43–54.
- [72] J. P. Stasch, O. Evgenov, *Handbook of Experimental Pharmacology: Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension*, Band 218 (Hrsg.: O. V. Evgenov, J. P. Stasch, M. Humbert), Springer, Heidelberg, **2013**.
- [73] a) M. T. Tse, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 896; b) H. A. Ghofrani, N. Galie, F. Grimminger, E. Grünig, M. Humbert, Z.-C. Jing, A. M. Keogh, D. Langleben, M. O. Kilama, A. Fritsch, D. Neuser, L. J. Rubin, *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 330–340; c) H. A. Ghofrani, A. M. D'Armini, F. Grimminger, M. M. Hoeper, P. Jansa, N. H. Kim, E. Mayer, G. Simonneau, M. R. Wilkins, A. Fritsch, D. Neuser, G. Weimann, C. Wang, *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 319–329.
- [74] H. A. Ghofrani, N. Galie, F. Grimminger, M. Humbert, A. Keogh, D. Langleben, D. Neuser, M. O. Kilama, L. Rubin, *Chest* **2012**, *142*, 1027A.
- [75] H. A. Ghofrani, F. Grimminger, M. Hoeper, N. Kim, E. Mayer, D. Neuser, J. Pena, G. Simonneau, M. Wilkins, *Chest* **2012**, *142*, 1023A.
- [76] A. Hantzsch, K. J. Thompson, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 2266–2276.
- [77] H. Sun, G. Tawa, A. Wallqvist, *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 310–324.
- [78] H. Schirok, J. Mittendorf, J.-P. Stasch, F. Wunder, F. Stoll, K.-H. Schlemmer, Bayer Healthcare AG, Germany, WO 2008031513, **2008**.
- [79] H. Schirok, J. Mittendorf, J.-P. Stasch, F. Wunder, (Bayer Healthcare AG, Germany), WO 2008061657, **2008**.
- [80] J. Moore, J. Jia, T. Nakai, C. Kim, T. W.-H. Lee, J. Yang, Ironwood Pharmaceuticals, Inc., USA, WO2011115804A1, **2011**.
- [81] C. Kim, T. Nakai, T. W.-H. Lee, J. Moore, N. R. Perl, J. Rohde, Ironwood Pharmaceuticals, Inc., USA, WO2012064559A1, **2012**.
- [82] C. Kim, T. Nakai, L. T. Wai-Ho, J. Moore, N. R. Perl, J. Rohde, R. R. Iyengar, A. Mermerian, Ironwood Pharmaceuticals, Inc., USA, WO2012003405A1, **2012**.
- [83] L. R. Roberts, P. A. Bradley, M. E. Bunnage, K. S. England, D. Fairman, Y. M. Fobian, D. N. A. Fox, G. E. Gymer, S. E. Heasley, J. Molette, G. L. Smith, M. A. Schmidt, M. A. Tones, K. N. Dack, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6515–6518.
- [84] N. Griebelnow, H. Schirok, J. Mittendorf, A. Straub, M. Follmann, J.-P. Stasch, A. Knorr, K.-H. Schlemmer, G. Redlich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1197–1200.
- [85] L. L. Brockunier, J. Guo, E. R. Parmee, S. Raghavan, K. Rosauer, J. E. Stelmach, D. R. Schmidt, Merck Sharp & Dohme Corp., USA, WO2010065275A1, **2010**.
- [86] S. Raghavan, J. E. Stelmach, C. J. Smith, H. Li, A. Whitehead, S. T. Waddell, Y.-H. Chen, S. Miao, O. A. Ornoski, J. Garfunkle, X. Liao, J. Chang, X. Han, J. Guo, J. A. Groeper, L. L. Brockunier, K. Rosauer, E. R. Parmee, Merck Sharp & Dohme Corp., USA, WO2011149921A1, **2011**.
- [87] Y. Koga, K. Maeno, I. Sato, Y. Imamura, T. Hanazawa, M. Iida, K. Ohne, K. Imamura, T. Watanabe, E. Nozawa, H. Shibata, Astellas Pharma Inc., Japan, WO2012165399A1, **2012**.
- [88] J.-P. Stasch, P. Schmidt, C. Alonso-Aluja, H. Apeler, K. Dembowsky, M. Haerter, M. Heil, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiss, M. Schramm, W. Schroeder, H. Schroder, E. Stahl, W. Steinke, F. Wunder, *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 773–783.
- [89] C. Alonso-Aluja, M. Haerter, M. Hahn, J. Pernerstorfer, S. Weigand, J.-P. Stasch, F. Wunder, Bayer Aktiengesellschaft, Germany, WO2002070462, **2002**.
- [90] C. Alonso-Aluja, M. Heil, D. Flubacher, P. Naab, J.-P. Stasch, F. Wunder, K. Dembowsky, E. Perzborn, E. Stahl, Bayer AG, Germany, WO2001019776, **2001**.
- [91] C. Alonso-Aluja, M. Heil, D. Flubacher, P. Naab, J.-P. Stasch, F. Wunder, K. Dembowsky, E. Perzborn, E. Stahl, Bayer AG, Germany, DE19943639, **2001**.
- [92] M. Haerter, M. G. Hahn, C. Hirth-Dietrich, A. Knorr, E. Stahl, J.-P. Stasch, F. Wunder, Bayer AG, Germany, DE10109859, **2002**.
- [93] S. Bartel, M. Hahn, W. A. Moradi, E.-M. Becker, T. Roelle, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, A. Knorr, Bayer Healthcare AG, Germany, WO2007045369, **2007**.
- [94] S. Bartel, M. Hahn, W. A. Moradi, E.-M. Becker, T. Roelle, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, A. Knorr, D. Lang, Bayer Healthcare AG, Germany, WO2007045433, **2007**.
- [95] G. Boerrigter, L. C. Costello-Boerrigter, A. Cataliotti, H. Lapp, J.-P. Stasch, J. C. Burnett, *Hypertension* **2007**, *49*, 1128–1133.
- [96] H. Lapp, V. Mitrovic, N. Franz, H. Heuer, M. Buerke, J. Wolfertz, W. Mueck, S. Unger, G. Wensing, R. Frey, *Circulation* **2009**, *119*, 2781–2788.
- [97] E. Erdmann, M. J. Semigran, M. S. Nieminen, M. Gheorghiade, R. Agrawal, V. Mitrovic, A. Mebazaa, *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 57–67.
- [98] M. Gheorghiade, S. J. Greene, G. Filippatos, E. Erdmann, R. Ferrari, P. D. Levy, A. Maggioni, C. Nowack, A. Mebazaa, *Eur. J. Heart Failure* **2012**, *14*, 1056–1066.
- [99] A. A. Voors, D. J. van Veldhuisen, *Eur. J. Heart Failure* **2012**, *14*, 955–956.
- [100] U. Schindler, H. Strobel, K. Schönafinger, *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1260–1268.
- [101] U. Schindler, K. Schönafinger, H. Strobel, Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Germany, WO 2000002851, **2000**.
- [102] M. van Eickels, S. Wassmann, A. Schäfer, J. Bauersachs, H. Strobel, H. Rütten, *BMC Pharmacol.* **2007**, *7*, S4.
- [103] S. Wassmann, M. van Eickels, T. Czech, M. Oelze, H. Strobel, G. Nickenig, *Eur. Heart J.* **2006**, 27.
- [104] A. Schäfer, J. Bauersachs, *Drugs Future* **2007**, *32*, 731.
- [105] A. R. Bittner, C. J. Sinz, J. Chang, R. M. Kim, J. W. Mirc, E. R. Parmee, Q. Tan, Merck & Co., Inc., USA, WO 2009032249, **2009**.
- [106] A. M. J. Bouillot, N. Dodic, F. J. Gellibert, O. Mirguet, Smithkline Beecham Corporation, USA, WO 2009071504, **2009**.
- [107] J. B. Brenneman, J. D. Huber, B. C. Raudenbush, C. R. Sarko, Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany, WO 2012122340, **2012**.

- [108] A. M. J. Bouillot, N. Dodic, F. J. Gellibert, O. Mirguet, Smith-Kline Beecham Corporation, USA; GlaxoSmithKline LLC, WO 2010015652, **2010**.
- [109] A. M. J. Bouillot, N. Dodic, F. J. Gellibert, O. Mirguet, Smith-Kline Beecham Corporation, USA, WO 2010015653, **2010**.
- [110] T. Boyer, N. Dodic, B. Evans, B. E. Kirk, Smithkline Beecham Corporation, USA, WO 2009068652, **2009**.
- [111] N. Matsunaga, Y. Nakada, Y. Ohba, H. Nakagawa, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Japan, WO 2009123316, **2009**.
- [112] M. G. Hahn, E.-M. Becker, A. Knorr, D. Schneider, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, F. Stoll, S. Heitmeier, K. Muentner, N. Griebenow, T. Lampe, S. El Sheikh, V. M.-J. Li, Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft, Germany, DE 102008018675, **2009**.
- [113] T. Lampe, M. Hahn, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, S. Heitmeier, N. Griebenow, S. El Sheikh, V. M.-J. Li, E.-M. Becker, F. Stoll, A. Knorr, Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft, Germany, WO 2010102717, **2010**.
- [114] M. Hahn, T. Lampe, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, V. M.-J. Li, E.-M. Becker, F. Stoll, A. Knorr, E. Woltering, Bayer Intellectual Property GmbH, Germany, WO 2012139888, **2012**.
- [115] T. Lampe, M. G. Hahn, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, S. E. Sheikh, V. M.-J. Li, E.-M. Becker, F. Stoll, A. Knorr, P. Kolkhof, E. Woltering, Bayer Pharma Aktiengesellschaft, Germany, WO 2012076466, **2012**.
- [116] T. Lampe, M. Hahn, J.-P. Stasch, K.-H. Schlemmer, F. Wunder, S. E. Sheikh, V. M.-J. Li, E.-M. Becker, F. Stoll, A. Knorr, Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft, Germany, WO 2011051165, **2011**.
- [117] F. Martin, P. Baskaran, X. Ma, P. W. Dunten, M. Schaefer, J. P. Stasch, A. Beuve, F. van den Akker, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22651–22657.
- [118] E. R. Derbyshire, M. A. Marletta, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 533–559.
- [119] D. Groneberg, P. Konig, A. Wirth, S. Offermanns, D. Koesling, A. Friebel, *Circulation* **2010**, *121*, 401–409.
- [120] M. Russwurm, N. Wittau, D. Koesling, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44647–44652.
- [121] N. Haase, T. Haase, J. R. Kraehling, S. Behrends, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1676–1683.
- [122] M. Koglin, J.-P. Stasch, S. Behrends, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 1057–1062.
- [123] C. Cai, S. Y. Chen, Z. Zheng, J. Omwancha, M. F. Lin, S. P. Balk, L. Shemshedini, *Oncogene* **2007**, *26*, 1606–1615.
- [124] P. Pifarré, M. A. Baltrons, I. Földi, A. García, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1719–1730.
- [125] X. Ma, N. Sayed, P. Baskaran, A. Beuve, F. van den Akker, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1167–1178.
- [126] C. Rothkegel, P. M. Schmidt, D. J. Atkins, L. S. Hoffmann, H. H. Schmidt, H. Schroder, J. P. Stasch, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 1181–1190.
- [127] J. J. Tesmer, S. R. Sprang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 713–719.
- [128] C. K. Allerston, F. von Delft, O. Gileadi, *PLoS One* **2013**, *8*, e57644.
- [129] X. Ma, A. Beuve, F. van den Akker, *BMC Struct. Biol.* **2010**, *10*, 2.
- [130] X. Ma, N. Sayed, A. Beuve, F. van den Akker, *EMBO J.* **2007**, *26*, 578–588.
- [131] A. Rauch, M. Leipelt, M. Russwurm, C. Steegborn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15720–15725.
- [132] T. Haase, N. Haase, J. R. Kraehling, S. Behrends, *PLoS One* **2010**, *5*, e11617.
- [133] J. A. Winger, M. A. Marletta, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4083–4090.
- [134] B. G. Fritz, S. A. Roberts, A. Ahmed, L. Breci, W. Li, A. Weichsel, J. L. Brailey, V. H. Wysocki, F. Tama, W. R. Montfort, *Biochemistry* **2013**, *52*, 1568–1582.
- [135] Z. Dai, E. R. Farquhar, D. P. Arora, E. M. Boon, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7984–7993.
- [136] X. Hu, L. B. Murata, A. Weichsel, J. L. Brailey, S. A. Roberts, A. Nighorn, W. R. Montfort, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20968–20977.
- [137] C. Olea, Jr., M. A. Herzik, Jr., J. Kuriyan, M. A. Marletta, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 881–887.
- [138] A. Pidcock, R. E. Richards, L. M. Venanzi, *J. Chem. Soc. A* **1966**, 1707–1710.
- [139] L. E. Goodrich, F. Paulat, V. K. Praneeth, N. Lehnert, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6293–6316.
- [140] J. R. Stone, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5636–5640.
- [141] L. E. Goodrich, N. Lehnert, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *118*, 179–186.
- [142] C. He, S. Neya, M. Knipp, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8559–8575.
- [143] S. P. Cary, J. A. Winger, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13064–13069.
- [144] E. R. Derbyshire, M. A. Marletta, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, *191*, 17–31.
- [145] A. Friebel, M. Russwurm, E. Mergia, D. Koesling, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15253–15257.
- [146] M. Ibrahim, E. R. Derbyshire, A. V. Soldatova, M. A. Marletta, T. G. Spiro, *Biochemistry* **2010**, *49*, 4864–4871.
- [147] M. Russwurm, D. Koesling, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4443–4450.
- [148] T. C. Bellamy, J. Wood, J. Garthwaite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 507–510.
- [149] D. P. Ballou, Y. Zhao, P. E. Brandish, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12097–12101.
- [150] Siehe Lit. [136].
- [151] A. Schröder, P. Hedlund, K. E. Andersson, *J. Urol.* **2002**, *167*, 1892–1896.
- [152] B. E. McLaughlin, M. L. Chretien, C. Choi, J. F. Brien, K. Nakatsu, G. S. Marks, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2000**, *78*, 343–349.
- [153] A. Friebel, F. Mullershausen, A. Smolenski, U. Walter, G. Schultz, D. Koesling, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 962–967.
- [154] J. P. Stasch, E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowsky, A. Feurer, R. Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiss, H. Schroder, W. Schroeder, E. Stahl, W. Steinke, A. Straub, M. Schramm, *Nature* **2001**, *410*, 212–215.
- [155] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1997**, *278*, 1907–1916.
- [156] M. Lamothe, F. J. Chang, N. Balashova, R. Shirokov, A. Beuve, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3039–3048.
- [157] F. J. Chang, S. Lemme, Q. Sun, R. K. Sunahara, A. Beuve, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11513–11519.
- [158] E. R. Derbyshire, N. B. Fernhoff, S. Deng, M. A. Marletta, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7519–7524.
- [159] E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, R. Gerzer, T. Minuth, U. Pleiss, P. Schmidt, M. Schramm, H. Schroder, W. Schroeder, W. Steinke, A. Straub, J. P. Stasch, *BMC Pharmacol.* **2001**, *1*, 13.
- [160] K. W. Hering, J. D. Artz, W. H. Pearson, M. A. Marletta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 618–621.
- [161] P. M. Schmidt, C. Rothkegel, F. Wunder, H. Schroder, J. P. Stasch, *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *513*, 67–74.
- [162] Y. Zhao, J. P. Schelvis, G. T. Babcock, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4502–4509.
- [163] V. Kumar, F. Martin, M. G. Hahn, M. Schaefer, J. S. Stamler, J. P. Stasch, F. van den Akker, *Biochemistry* **2013**, *52*, 3601–3608.