

NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase

Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch

geb. am: 18. August 1954 in: Hessisch-Oldendorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. Henning Schröder
2. Prof. Dr. Harald Schmidt
3. Prof. Dr. Heimo Ehmke

Halle (Saale), den 11. Juni 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005163

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005163>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse.....	4
2.1	YC-1 als Leitstruktur für NO-unabhängige Stimulatoren der sGC.....	4
2.1.1	Charakterisierung von YC-1 an der hochgereinigten, rekombinanten sGC.....	4
2.1.2	Wirkung von YC-1 an einer neu generierten sGC-CHO-Zelllinie.....	6
2.1.3	VASP als Marker einer YC-1 Wirkung in Thrombozyten.....	8
2.2	Neue NO-unabhängige, aber Häm-abhängige Stimulatoren der sGC.....	9
2.2.1	Identifizierung der sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543....	9
2.2.2	Charakterisierung der sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 <i>in vitro</i>	11
2.2.3	Charakterisierung der kardiovaskulären Wirkungen der sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 <i>in vivo</i>	13
2.2.4	Identifizierung der NO-unabhängigen regulatorischen Einheit an der sGC.....	16
2.3	NO- und Häm-unabhängige Aktivatoren der sGC.....	18
2.3.1	Identifizierung NO- und Häm-unabhängiger Aktivatoren der sGC.....	18
2.3.2	Charakterisierung des sGC Aktivators BAY 58-2667 <i>in vitro</i>	19
2.3.3	Charakterisierung der kardiovaskulären Wirkungen von BAY 58-2667 <i>in vivo</i>	21
2.3.4	Identifizierung der NO- und Häm-unabhängigen regulatorischen Einheit an der sGC.....	21
3	Ausblick.....	24
4	Literaturverzeichnis.....	31
5	Curriculum vitae.....	40
6	Erklärung.....	41
7	Danksagung.....	42
8	Veröffentlichte Originalarbeiten.....	43
9	Anhang: Der Habilitationsschrift zu Grunde liegende Veröffentlichungen.....	48

1 Einleitung

Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) als wichtigem und ubiquitärem Regulator verschiedenster physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im menschlichen Körper ist ein äußerst fesselndes Kapitel der jüngsten Forschungsgeschichte und wurde 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie an Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad gewürdigt (Furchgott, 1999; Ignarro 1999; Murad 1999). Ihre Arbeiten führten dazu, dass aus dem Atemgift und Umweltschadstoff NO eines der wichtigsten Signalmoleküle der Medizin geworden ist (zur Übersicht siehe Ignarro 2000; Mayer 2000). Auch die organischen Nitrate, wie z. B. Nitroglycerin, die seit mehr als 130 Jahren erfolgreich zur Behandlung der Angina pectoris als auch der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt werden, wirken im Körper über die Freisetzung von NO (Brunton, 1867; Ignarro, 2002). Der wichtigste Rezeptor für NO ist die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die somit eine Schlüsselfunktion bei der NO-vermittelten Signalübertragung einnimmt. Durch die katalytische Umwandlung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) (Arnold et al., 1977; Waldman und Murad, 1987) reguliert die sGC die Steuerung verschiedener cGMP-abhängiger Effektorsysteme wie Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanäle (zur Übersicht siehe Biel et al., 1998; Eigenthaler et al., 1999; Juilfs et al., 1999; Hofmann et al, 2000; Beavo und Brunton, 2002). Die Aktivierung dieser Effektorsysteme macht die sGC zu einem Schlüsselenzym bei der Vasodilatation, der Plättchenreaktivität und der zentralen sowie peripheren Neurotransmission (zur Übersicht siehe Moncada et al., 1991; Garthwaite und Boulton, 1995; Denninger und Marletta, 1999; Ignarro et al., 1999; Ignarro, 2000; Mayer 2000; Bellamy und Garthwaite, 2002).

Die sGC, ein α/β -Heterodimer, wurde bisher in zwei Isoformen (α_1/β_1 und α_2/β_1) auf Proteinebene in verschiedenen Spezies nachgewiesen, wobei die meisten enzymologischen Untersuchungen an der ubiquitär vorkommenden α_1/β_1 -Isoform durchgeführt wurden (zur Übersicht siehe Denninger und Marletta, 1999; Russwurm und Koesling, 2002). Während die C-terminal liegenden katalytischen Domänen beider Untereinheiten große Homologien zu anderen Zyklasten aufweisen, zeichnet sich die einzigartige Struktur der N-terminalen Region verantwortlich für die Bindung der prosthetischen Häm-Gruppe, die den Angriffspunkt für NO darstellt, und somit zur Aktivierung durch NO führt. Die Häm-Gruppe zeigt ein Absorptionsmaximum bei 431 nm, die Soret-Bande, die auf ein fünffach-koordiniertes Häm-Eisen mit einem Histidin als axialem Liganden hinweist. Die sGC enthält ein Häm pro

Heterodimer, welches über das His-105 der β_1 -Untereinheit komplexiert ist. Da Häm-freie sGC durch Protoporphyrin IX, welches strukturell dem fünffach-koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex ähnlich ist, aktiviert werden kann, wurde gefolgert, dass für die Stimulierung der sGC ein fünffach-koordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex erforderlich ist (Ignarro et al., 1982, 1984; Stone und Marletta, 1994). Diese und andere Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Bindung von NO an der sechsten Koordinationsstelle, des im Basalzustands penta-koordinierten Histidyl-Häm-Komplexes, über eine hexa-koordinierte Zwischenstufe letztendlich durch Spaltung der Histidin-Häm-Bindung zu einem penta-koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex (mit einem Absorptionsmaximum bei 398 nm) führt (Stone und Marletta, 1996; Kharitonov et al., 1997; Sharma und Magde, 1999). Die Lösung der Bindung des Häm-Eisens vom Histidin induziert Konformationsänderungen an der sGC, die mit einer über 200-fachen Aktivierung des Enzyms einhergehen. Auf der anderen Seite ist die Spaltung der Histidin-Eisen-Bindung zwar nötig, aber nicht ausreichend für eine Aktivierung, da eine Mutante ohne dieses proximale Histidin und damit ohne Histidin-Eisen-Bindung keine gesteigerte katalytische Aktivität besitzt (Foerster et al., 1996). Die Bindung von NO an das Häm-Eisen und das daraus resultierende Lösen der Histidin-Eisen-Bindung ist der bisher bekannte Hauptmechanismus der physiologischen Aktivierung der sGC (Zhao et al., 1999; Bellamy et al., 2002; Ballou et al., 2002).

Obwohl die organischen Nitrate, wie z. B. Nitroglycerin, Isorbiddinitrat und Isosorbidmononitrat, zu den Standardtherapeutika neben den β -Rezeptorenblockern und Calciumantagonisten zur Behandlung der Angina Pectoris gehören, haben sie eine Reihe von Nachteilen. Eine deutliche Einschränkung bei der therapeutischen Anwendung ist die rasche Entwicklung einer Nitrattoleranz bei wiederholter Gabe. Wie diese Nitrattoleranz zustande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt (Parker, 1989; Elkayam, 1991; Münzel et al., 1996; Thadani, 1997; Asirvatham, 1998; Hobbs, 2002). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde jedoch beschrieben, dass eine verminderte metabolische Aktivierung durch eine mitochondriale Aldehyddehydrogenase in den glatten Muskelzellen einer Nitrattoleranz zu Grunde liegt (Chen et al., 2002; Ignarro, 2002). Organische Nitrate zeigen im Gegensatz zu NO selbst in vitro keine Thrombozyten-aggregationshemmende Wirkung und auch in der Klinik wurde keine relevante antithrombozytäre Wirkung beobachtet. Im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen sind die Thrombozyten nicht in der Lage aus organischen Nitraten NO oder NO-Spezies durch Biokonversion zu bilden (Feelisch 1998; Martin et al., 2000; Hobbs, 2002). Solch eine zusätzliche Wirkkomponente ist wünschenswert und sollte zumindest

theoretisch einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung haben; denn in grossen Studien wurde an diesem Patientenkollektiv gezeigt, dass es unter dem Einfluss des Thrombozytenaggregationshemmers Aspirin zu einer deutlichen Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse und Todesfälle kommt (Juul-Moller et al., 1992; Aronov, 1999). Darüber hinaus zeigen sich unter der Anwendung von organischen Nitraten zahlreiche Nebenwirkungen, wobei die häufigste der sogenannte Nitratkopfschmerz ist, der auf das durch Biokonversion freigesetzte NO zurückgeführt wird (Thomsen und Olesen, 2001). Insofern sollten Substanzen, die die gleichen hämodynamischen Wirkungen wie organische Nitrate besitzen, ohne deren Nebenwirkungsprofil, kombiniert mit einer antithrombozytären Wirkung aus pharmakologischer und medizinischer Sicht für die Behandlung der koronaren Herzerkrankung vorteilhaft sein. Die Suche nach NO-unabhängigen Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase sowie deren pharmakologische Charakterisierung als auch die Identifizierung neuer regulatorischer Einheiten am Enzym war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Mit YC-1 wurde ein Thrombozytenaggregationshemmer identifiziert, der seine Wirkung über eine intrazelluläre cGMP-Erhöhung in den Thrombozyten entfaltet (Ko et al., 1994; Wu et al., 1995; 1997). Kurz nach dieser Entdeckung wurde von uns und anderen gezeigt, dass YC-1 ein direkter NO-unabhängiger Stimulator der sGC ist. Zusätzlich zeigte sich zu dieser direkten sGC-Stimulation ein Synergismus mit NO (Friebe et al., 1996; Mülsch et al., 1997, Anlage 9.1; Hoenicka et al., 1999, Anlage 9.2). Mit YC-1 war also eine Substanz gefunden worden, die die sGC über einen neuen NO-unabhängigen Mechanismus aktiviert. Inzwischen sind eine ganze Reihe weiterer biochemischer und pharmakologischer Arbeiten zu YC-1 erschienen (zur Übersicht siehe Becker, 2000; Friebe und Koesling, 2000). Ausgehend von YC-1 als chemischer Leitstruktur haben wir NO-unabhängige, aber Häm-abhängige sGC-Stimulatoren identifiziert (BAY 41-2272 und BAY 41-8543), die sowohl spezifischer als auch *in vitro* und *in vivo* deutlich potenter sind. Darüber hinaus wurde mit einem High-throughput Screening ein Aminodicarboxylsäurederivat (BAY 58-2667) gefunden, das die sGC NO- und Häm-unabhängig über einen bisher unbekanntem Mechanismus aktiviert. Diese beiden neuen pharmakologischen Prinzipien wurden *in vitro* und *in vivo* evaluiert und ihr Potenzial für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen aufgezeigt. Ferner gelang uns mittels Photoaffinitätslabel-Studien die entsprechenden bisher unbekanntem regulatorischen Regionen an der sGC zu lokalisieren.

2 Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse

2.1 YC-1 als Leitstruktur für NO-unabhängige Stimulatoren

2.1.1 Charakterisierung von YC-1 an der hochgereinigten, rekombinanten sGC

Vgl. Anlage 9.1 und 9.2

Zur Expression der α_1/β_1 sGC der Ratte wurde ein Baculovirus/Sf9-Zellsystem verwendet, welches große Mengen an biologisch aktivem Enzym produziert (Buechler et al., 1995; Gupta et al., 1997). Das verwendete Expressions- und Reinigungsverfahren wurde so optimiert, dass wir ein Enzym mit den bisher höchsten beschriebenen spezifischen Aktivitäten reproduzierbar herstellen konnten (Hoenicka et al., 1999, Anlage 9.2). Dabei wurde das Verhältnis beider Viren, die die jeweiligen Untereinheiten (α_1 und β_1) kodieren, so gewählt, dass wir einen möglichst großen Anteil katalytisch aktiven Häm-haltigen Enzyms erzielten (Buechler et al., 1991; Harteneck et al., 1991). Unser Expressions- und Reinigungssystem führte zu einem Häm-haltigen Enzym ohne Notwendigkeit weiterer Häm-Rekonstitutionsschritte. Der von uns bestimmte Häm-Gehalt wies übereinstimmend mit früheren Ergebnissen am gereinigten Rinderlungenenzym ein stöchiometrisches Verhältnis von einem Häm pro Heterodimer auf (Gerzer et al., 1981; Stone und Marletta, 1994; Wedel et al., 1994; Zhao und Marletta, 1997; Zhao et al., 1998). Somit ist das vorgestellte Baculovirus/Sf9-Zellsystem in Kombination mit der beschriebenen Reinigung geeignet, größere Mengen hochreiner Häm-haltiger sGC herzustellen.

An der hochgereinigten, rekombinanten sGC zeigte YC-1 eine konzentrationsabhängige Stimulation der sGC von 10-300 μ M, wogegen DEA/NO schon ab 10 nM das Enzym aktivierte. Interessanterweise zeigte YC-1 in Kombination mit DEA/NO über die gesamte Spanne der Konzentrations-Wirkungskurve synergistische Wirkungen hinsichtlich der sGC Aktivität mit einer Verringerung der EC_{50} -Werte von DEA/NO und YC-1 um ca. eine Zehnerpotenz. Die Wirkung von YC-1 und DEA/NO auf die Stimulation der sGC konnte durch ODQ, einem gut untersuchten selektiven und potenten sGC Inhibitor, der das Häm-Eisen der sGC oxidiert (Garthwaite et al., 1995; Schrammel et al., 1996; Feelisch et al., 1999), nahezu komplett gehemmt werden.

Dass YC-1 ein direkter Stimulator der sGC ist, wurde gleichzeitig von uns und anderen erstmals am isolierten Rinderlungenenzym gezeigt (Friebe et al., 1996; Mülsch et al., 1997,

Anlage 9.1). Die Aktivierungskinetik der sGC in Anwesenheit verschiedener GTP-Konzentrationen nach Stimulation durch YC-1 zeigte eine geringe Erniedrigung des K_M -Wertes und eine deutliche Erhöhung des V_{max} -Wertes. Die Aktivierung der sGC ist reversibel, wie durch entsprechende Verdünnungsuntersuchungen gezeigt werden konnte (Mülsch et al., 1997, Anlage 9.1). Die Expression und Reinigung der humanen sGC unter Verwendung rekombinanter Isoformen und deren Aktivierung durch YC-1 ist erst kürzlich beschrieben worden (Zabel et al., 1999; Lee et al., 2000; Kosarikov et al., 2001a; Martin et al., 2001).

Im Gegensatz zu DEA/NO und SNP stimuliert YC-1 die sGC nicht durch Freisetzung von NO. Darüber hinaus legen die synergistischen Wirkungen zwischen YC-1 und NO den Schluss nahe, dass YC-1 die sGC nicht über eine direkte Interaktion mit dem Häm-Eisen der prosthetischen Häm-Gruppe aktiviert. Während die Basalaktivität und damit die katalytische Region der sGC durch die Entfernung des Häms nicht verändert wurde, ging die Stimulation der sGC durch SNP, YC-1 und deren Kombination jedoch in Abwesenheit der Häm-Gruppe nahezu vollständig verloren. Da für die Stimulation der sGC durch YC-1 die Anwesenheit der Häm-Gruppe am Enzym erforderlich ist, wurde die Wirkung von YC-1 auf die Stimulation der sGC durch Protoporphyrin IX untersucht. Protoporphyrin IX verdrängt das Häm aus seiner Bindung und aktiviert die sGC, indem es die aktive Häm-Konformation imitiert (Ignarro et al., 1982; 1984). Auch mit Protoporphyrin IX zeigte YC-1 eine synergistische Wirkung. Somit aktiviert YC-1 einerseits das Häm-haltige Enzym direkt und macht andererseits das Enzym empfindlicher gegenüber NO oder Protoporphyrin IX (Mülsch et al., 1997, Anlage 9.1; Hoenicka et al., 1999, Anlage 9.2).

In Konzentrationen, die die sGC-Aktivität signifikant erhöhen, zeigte YC-1 in An- oder Abwesenheit von NO keinen Einfluss auf das jeweilige Häm-Spektrum des Enzyms, was auf eine allosterische Regulation des Enzyms durch YC-1 ohne direkte Interaktion mit dem Häm-Eisen hinweist. Zusammenfassend zeigen unsere Studien, dass YC-1 die hochreine, rekombinante sGC über einen neuen unbekanntenen Mechanismus NO-unabhängig und Häm-abhängig stimuliert. Zahlreiche weitere Arbeiten zum Wirkmechanismus von YC-1 an der sGC sind in der Zwischenzeit erschienen, die diese NO-Unabhängigkeit und Häm-Abhängigkeit belegen (Friebe und Koesling, 1998; Stone und Marletta, 1998; Kharitonov et al., 1999; Koesling, 1999; Denninger et al., 2000; Kosarikov et al., 2001b; Mayer und Koesling, 2001). Lediglich in einer erst kürzlich erschienenen Arbeit wird spekuliert, dass

neben der Häm-abhängigen Komponente eine, wenn auch sehr geringe, Häm-unabhängige Komponente an der sGC Aktivierung durch YC-1 beteiligt ist (Martin et al., 2001).

2.1.2 Wirkung von YC-1 an einer neu generierten sGC-CHO-Zelllinie

Vgl. Anlage 9.3

Mit der Erstellung einer stabilen sGC überexprimierenden CHO-Zelllinie wurde ein einfaches und sensitives Hilfsmittel entwickelt, um die verschiedenen sGC-Stimulatortypen, wie YC-1 und NO-Donoren, auch auf zellulärer Ebene zu charakterisieren (Becker et al., 1999, Anlage 9.3). Unter Verwendung dieses neuen Bioassays ist man bei der Charakterisierung der sGC-Stimulatoren einerseits nicht mehr auf die sehr aufwendige Isolierung des Enzyms und andererseits nicht mehr auf transiente Transfektionen oder Primärzellen angewiesen. Darüber hinaus konnte ausgehend von dieser Zelllinie ein Screening-System zur Suche nach weiteren, bisher unbekanntem sGC-Aktivatoren etabliert werden (siehe 2.3.1).

CHO-Zellen wurden mit beiden Untereinheiten der sGC der Ratte stabil transfiziert, da in mehreren Studien gezeigt wurde, dass die gleichzeitige Expression beider Untereinheiten für ein katalytisch aktives Enzym notwendig ist (Buechler et al., 1991; Harteneck et al., 1991). Der Proteingehalt des exprimierten Enzyms lag bei der stabilen Transfektion erwartungsgemäß deutlich niedriger als bei transient transfizierten Zellen. Trotzdem konnten, nach Anreicherung über einen Ionenaustauscherschritt, beide sGC Untereinheiten im Western-Blot mit eigens dafür generierten polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Bestätigt wurde die gelungene Kotransfektion in den CHO-Zellen auch durch die sGC-Aktivitätstests.

Bei der Untersuchung von NO-Donoren und YC-1 an dieser neuen Zelllinie wurden vergleichbare Ergebnisse gefunden wie an der hochreinen sGC. DEA/NO (0,01-3 μM), SNP (1-10 μM) und YC-1 (1-10 μM) zeigten eine konzentrationsabhängige Aktivierung der sGC mit einem maximal 16-fachen (3 μM DEA/NO), 8-fachen (10 μM SNP) und 6-fachen (10 μM YC-1) Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel. DEA/NO und SNP zeigten in Kombination mit YC-1 über den getesteten Konzentrationsbereich eine synergistische Wirkung. Dabei wurde der cGMP-Gehalt durch die Stimulorkombinationen 51-fach (1 μM DEA/NO und 3 μM YC-1) bzw. 64-fach (10 μM SNP und 10 μM YC-1) erhöht. Im Vergleich zum gereinigten Enzym ist die beobachtete synergistische Wirkung schon bei niedrigeren

Konzentrationen zu beobachten. So zeigte die sGC-CHO-Zelllinie eine deutliche Antwort schon bei einer DEA/NO Konzentration von 10 nM und einer YC-1 Konzentration von 1 μ M mit stark ausgeprägt synergistischer Wirkung. Damit reagiert diese Zelllinie hinsichtlich der Testung von sGC-Stimulatoren mindestens so empfindlich wie das gereinigte Enzym.

Die cGMP-erhöhenden Wirkungen in den sGC-CHO-Zellen durch einzelne Stimulatoren oder deren Kombination konnte durch ODQ nahezu komplett gehemmt werden. Ähnliche Untersuchungen zur Hemmung des stimulierten cGMP-Anstiegs durch ODQ in vaskulären Glattmuskelzellen und Endothelzellen kamen zum gleichen Ergebnis (Mülsch et al., 1997, Anlage 9.1; Schmidt et al., 2001). Die an der sGC-CHO-Zelllinie gezeigte Stimulation durch NO und YC-1 wurde auch an einem Primärzellsystem bestätigt. YC-1 und NO erhöhten in primären Endothelzellen konzentrationsabhängig die intrazellulären cGMP-Spiegel (Wohlfahrt et al., 1999; Becker, 2000; Abate et al., 2001; Schmidt et al., 2001). Allerdings sind Primärzellsysteme nur bedingt zur Charakterisierung der sGC-Stimulatoren auf zellulärer Ebene geeignet. So wurde für Endothelzellen eine basale NO-Freisetzung beschrieben, die nicht nur durch eNOS-Aktivatoren sondern auch über physikalische Stimulatoren, wie z.B. Scherkräfte induziert werden kann (Fleming et al., 1998). Eine eNOS-unabhängige NO-Freisetzung durch YC-1 (Wohlfahrt et al., 1999) konnte nicht bestätigt werden (Schmidt et al., 2001). Im Gegensatz zu Endothelzellen ist die gesteigerte endogene NO-Produktion in Glattmuskelzellen hauptsächlich eine Folge der Aktivierung der Transkription des iNOS Gens (Schini-Kerth und Vanhoutte, 1995). Somit sind die für YC-1 gemessenen Wirkungen letztendlich die Summe aus direkter Wirkung von YC-1 am Enzym und Synergismus mit endogenem NO. RFL-6 Zellen, die oft als zelluläres sGC-Testsystem für NO-Donoren genutzt wurden, zeigten eine deutliche fortschreitende Abschwächung der cGMP-Antwort nach Stimulation mit NO-Donoren von Passage zu Passage (Schröder et al., 1988). Diese Beobachtung unterstreicht die Vorteile eines stabilen sGC überexprimierenden Zellsystems, um verschiedene NO-Donoren und direkte sGC-Stimulatoren auf zellulärer Ebene charakterisieren zu können.

2.1.3 VASP als Marker einer YC-1 Wirkung in Thrombozyten

Vgl. Anlage 9.4

Mit Thrombozyten stand uns ein weiteres gut charakterisiertes natives Zellsystem zur Verfügung, um die Wirkung beider sGC Stimulatortypen, YC-1 und NO, auf die thrombozytäre sGC über die Messung des intrazellulären cGMP-Spiegels und den Phosphorylierungsgrad des Vasodilator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) zu untersuchen. VASP wurde als wichtiges Substrat der Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase G (PKG) in menschlichen Thrombozyten beschrieben (Halbrügge et al., 1990; Smolenski et al., 1998a; Schwarz et al., 2001). Neben seiner hohen Konzentration in Thrombozyten kommt es auch in vaskulären glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten vor (Eigenthaler et al., 1999; Oelze et al., 2000; Mülsch et al., 2001; Ibarra-Alvarado et al., 2002; Schulz et al., 2002). Die Phosphorylierung an Ser-157 führt zu einer Verschiebung der Molekulargewichtsbande in der SDS-Gelelektrophorese von 46 nach 50 kDa (Smolenski et al., 1998b) und kann im Gel nach Proteinfärbung oder im Western-Blot nach Detektion des VASP mit entsprechenden Antikörpern quantitativ bestimmt werden (Butt et al., 1994; Eigenthaler et al., 1999). Eine ebenfalls geeignete Methode zur Untersuchung der NO/sGC/cGMP/PKG-Signalkaskade, ist die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von VASP am Ser-239 mit einem monoklonalen Antikörper, der VASP nur erkennt, wenn dieses von der PKG bevorzugte Serin phosphoryliert vorliegt (Smolenski et al., 1998b). Die VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten korreliert mit der Inhibition der Fibrinogenbindung an das Integrin α IIb β 3 und der Hemmung der Thrombozytenaggregation (Halbrügge et al., 1990; Horstrup et al., 1994; Schwarz et al., 2001). So wurde auch in VASP-knockout-Mäusen wie erwartet eine abgeschwächte Plättchenfunktion beobachtet (Aszódi et al., 1999; Hauser et al., 1999).

An gewaschenen Thrombozyten von Mensch und Ratte konnte mit beiden sGC-Stimulatortypen (NO und YC-1) eine konzentrationsabhängige Zunahme der VASP-Phosphorylierung *in vitro* gezeigt werden. Die Kombination von YC-1 und NO-Donoren zeigte deutliche synergistische Wirkungen auf die Phosphorylierung des VASP an Ser-239 und an Ser-157 über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. So bewirkte YC-1 an Thrombozyten von Mensch und Ratte eine Verschiebung der Konzentrations-Phosphorylierungskurve zu niedrigeren Konzentrationen der verwendeten NO-Donoren um mindestens den Faktor 10. Das Ausmaß der Phosphorylierung korrelierte mit der Stimulation

der sGC, deren Aktivität über den Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel bestimmt wurde. So wurde mit YC-1 (0,3-100 μM) ein maximal 4-facher, mit SNP (0,3-30 μM) ein maximal 10-facher und mit DEA/NO (1-300 nM) ein maximal 20-facher cGMP-Anstieg in menschlichen Thrombozyten gemessen. Die Kombination von SNP (30 μM) bzw. DEA/NO (300 nM) mit YC-1 (1 μM) in einer Konzentration, die nur geringe Wirkungen auf die cGMP-Spiegel hatte (2-fach), führte zu einer 46- bzw. 117-fachen Stimulation der sGC-Aktivität.

Die Bedeutung der *In-vitro*-Ergebnisse wurde unter *In-vivo*-Bedingungen überprüft. So zeigte sich eine Stunde nach oraler Gabe von YC-1 mit hohen Dosierungen (100 und 300 mg/kg p.o.) in gewaschenen Thrombozyten der behandelten Ratten eine Zunahme der VASP-Phosphorylierung an Ser-239. Im gleichen Dosisbereich verlängerte YC-1 nach oraler Gabe die Blutungszeit bei Ratten. Diese Wirkungen von YC-1 auf die Thrombozyten sind wahrscheinlich einerseits auf eine direkte Stimulation der sGC und andererseits einer Steigerung der Empfindlichkeit der sGC gegenüber endogenem NO zurückzuführen. Diese Ergebnisse gehen mit der *in vitro* beschriebenen anti-aggregatorischen Wirkung von YC-1 einher (Ko et al., 1994; Wu et al., 1995, 1999; Teng et al., 1997; Friebe et al., 1998).

Die beobachtete *In-vitro*- und *In-vivo*-Phosphorylierung von VASP, die beschriebenen anti-aggregatorischen Wirkungen und die beobachtete Verlängerung der Blutungszeit bestätigen nicht nur die mögliche Rolle von VASP als Bindeglied zwischen der sGC/cGMP-Signalkaskade und der Thrombozytenaggregation, sondern unterstreichen auch die Bedeutung von YC-1 als Leitstruktur für eine neue Klasse anti-aggregatorischer Substanzen.

2.2 Neue NO-unabhängige, aber Häm-abhängige Stimulatoren der sGC

2.2.1 Identifizierung der sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543

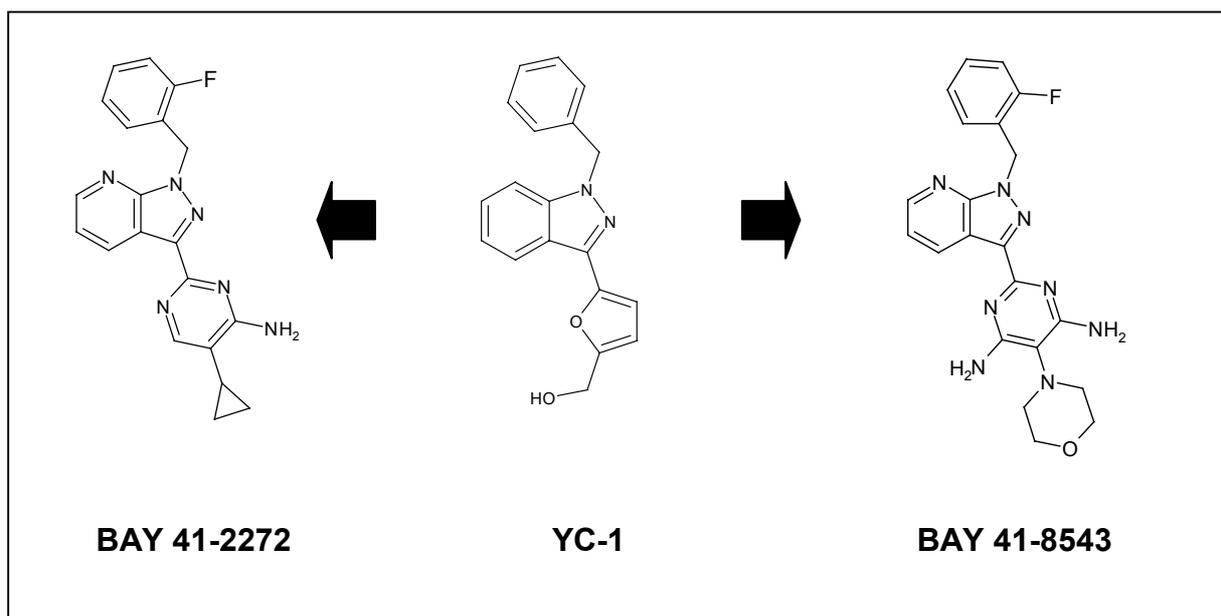
Vgl. Anlagen 9.5, 9.6 und 9.8

Auf der Suche nach NO-unabhängigen Stimulatoren der sGC identifizierten wir aus ca. 2000 neu synthetisierten Verbindungen (Robyr et al., 1998; Straub et al., 1998, 2000a, 2000b, 2000c, 2000d, 2001b; Feurer et al., 2000) die Pyrazolopyridinderivate BAY 41-2272 und BAY 41-8543 als vielversprechendste Kandidaten (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; 2002a; Anlage 9.8). Ausgehend von dem Indazolderivat YC-1 als chemischer Leitstruktur (Ko et al., 1994, Wu et al., 1995) wurde für die chemische Strukturoptimierung die Wirkung der neu synthetisierten Substanzen auf die sGC-Aktivität und deren vasorelaxierende Wirkung *in vitro*

an isolierten Gefäßen herangezogen. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen um diesen neuen Typ von sGC-Stimulatoren wurden im Detail von uns beschrieben (Straub et al., 2001, Anlage 9.6). BAY 41-2272 und BAY 41-8543 sind in verschiedenen *In-vitro*-Systemen um den Faktor 100 bis 1000 potenter als YC-1 und darüber hinaus sehr wirkstark nach oraler Gabe.

Die Leitstruktur YC-1 besitzt neben der direkten Wirkung auf die sGC eine zusätzliche PDE5 inhibitorische Wirkung (Friebe et al., 1998; Galle et al., 1999). Im Gegensatz hierzu zeigten BAY 41-2272 und BAY 41-8543 bis zu einer Konzentration von 10 mM keine signifikante Inhibition der cGMP spezifischen Phosphodiesterasen PDE5 und PDE9 wie auch der cGMP metabolisierenden Phosphodiesterasen PDE1 und PDE2. Damit konnte erstmals das therapeutische Potenzial einer spezifischen sGC-Stimulation unter Verwendung von BAY 41-2272 und BAY 41-8543 aufgezeigt werden (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; 2002a, Anlage 9.8; 2002b, Anlage 9.9). In einem kürzlich erschienenen Editorial über unsere Arbeiten zu den NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren wurde das therapeutische Potenzial dieser Substanzen beschrieben und kommentiert (Hobbs, 2002). Da das pharmakologische Profil von BAY 41-8543, mit Ausnahme einer stärkeren Wirksamkeit nach oraler Gabe, dem von BAY 41-2272 gleicht, werden im folgenden Text vorwiegend die Ergebnisse mit BAY 41-8543 beschrieben.

Von der Leitstruktur zur Wirksubstanz



2.2.2 Charakterisierung der sGC-Stimulatoren BAY 41-2272 und BAY 41-8543 *in vitro*

Vgl. Anlagen 9.5, 9.6 und 9.8

BAY 41-2272 und BAY 41-8543 aktivierten die hochgereinigte sGC konzentrationsabhängig von 0,1 nM bis 100 µM mit einer maximalen Stimulation um den Faktor 43 bzw. 92. In Kombination mit NO (generiert durch die NO-Donoren DEA/NO, SNP bzw. SIN-1) zeigten BAY 41-2272 und BAY 41-8543 über einen weiten Konzentrationsbereich eine synergistische Wirkung auf die Aktivität der sGC (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; Straub et al., 2001, Anlage 9.6; Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8). Obwohl BAY 41-2272 und BAY 41-8543 die sGC nicht so stark stimulierten wie NO selbst (um einen Faktor über 200; Koesling, 1999), sind Konzentrationen von 10-100 nM ausreichend, um über die sGC-Stimulation einen biologisch relevanten cGMP-Anstieg zu induzieren. Der sGC-Inhibitor ODQ hemmte nahezu komplett die Wirkungen von BAY 41-2272 und BAY 41-8543 auf die Aktivität der sGC. Im Gegensatz dazu war diese Stimulation durch Zugabe der NO-Scavenger PTIO und Oxyhämoglobin erwartungsgemäß nicht hemmbar.

NO stimuliert die sGC über die Bildung eines Nitrosyl-Häm-Komplexes. Entfernung der Häm-Gruppe durch das Detergenz Tween-20 führt zu einer NO-insensitiven Form der sGC, ohne dass dadurch die Basalaktivität des Enzyms zerstört wird (Friebe et al., 1996). Ebenso wie NO stimulierten auch BAY 41-2272 und BAY 41-8543 das Häm-freie Enzym nicht. Um zu untersuchen, ob BAY 41-2272 und BAY 41-8543 direkt mit der prosthetischen Häm-Gruppe interagieren, wurde das UV/VIS Spektrum der gereinigten rekombinanten sGC unter nicht-stimulierten und NO-stimulierten Bedingungen aufgenommen. NO verursachte eine charakteristische Verschiebung der Soret-Bande zu einer niedrigeren Wellenlänge, während die Zugabe von BAY 41-2272 oder BAY 41-8543 zu keinerlei Veränderung sowohl beim nicht-stimulierten als auch beim NO-stimulierten Enzym führte. Damit ist im Gegensatz zu NO eine direkte Interaktion von BAY 41-2272 und BAY 41-8543 mit dem Häm-Eisen der sGC nahezu ausgeschlossen. Da andererseits BAY 41-2272 und BAY 41-8543 am Häm-freien Enzym inaktiv sind, handelt es sich bei der sGC-Stimulation durch diese Pyrazolopyrimidin-Derivate wie bei YC-1 um einen NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen Mechanismus der Aktivierung (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8).

Nicht nur am isolierten Enzym, sondern auch an primären Endothelzellen induzierte BAY 41-8543 einen konzentrationsabhängigen cGMP-Anstieg und zeigte sowohl in Kombination mit exogenem NO (SIN-1) als auch mit endogen freigesetztem NO (induziert durch Bradykinin) eine synergistische Wirkung (Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8).

An humanen Thrombozyten wurde die Wirkung von BAY 41-8543 auf die cGMP-Spiegel und den VASP-Status untersucht. BAY 41-8543 (0,1-30 μ M) induzierte, wie auch SNP (0,1-30 μ M) und DEA/NO (1-300 nM), eine konzentrationsabhängige cGMP-Erhöhung und eine VASP-Phosphorylierung. In Kombination führten BAY 41-8543 und NO-Donoren zu einem deutlich überadditiven Anstieg des cGMP-Spiegels und der VASP-Phosphorylierung in den humanen Thrombozyten. Mit YC-1 wurden ähnliche Ergebnisse auf den intrazellulären cGMP-Spiegel und die VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten erzielt, wobei die Wirkung von BAY 41-8543 allerdings stärker ausgeprägt war (Becker et al., 1999, Anlage 9.4). Somit ist BAY 41-8543 einerseits ein direkter Stimulator der cGMP/PKG/VASP-Signalkaskade und verstärkt andererseits die Wirkung von NO an der sGC in Thrombozyten. Parallel zur Aktivierung der cGMP/PKG/VASP-Signalkaskade zeigte BAY 41-8543 eine anti-aggregatorische Wirkung. An gewaschenen humanen Thrombozyten hemmte BAY 41-8543 die durch Kollagen und das Thromboxanmimetikum U-46619 induzierte Aggregation mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8).

BAY 41-8543 wirkte stark vasorelaxierend an der Arteria saphena (Kaninchen), der Aorta (Kaninchen), der Koronararterie (Schwein) und der Femoralvene (Hund) mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich. BAY 41-8543 war an diesen Gefäßen im allgemeinen deutlich potenter als Natriumnitroprussid und Nitroglycerin. An der Kaninchenaorta ist BAY 41-8543 um den Faktor 100 potenter als die Leitstruktur YC-1 (Mülsch et al., 1997, Anlage 9.1; Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8). Am Langendorff-Herz senkte BAY 41-8543 den koronaren Perfusionsdruck, ohne den links-ventrikulären Druck und die Herzfrequenz zu beeinflussen (Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8).

Eine deutliche Einschränkung bei der therapeutischen Anwendung von organischen Nitraten, ist die rasche Entwicklung einer Nitrattoleranz bei wiederholter Gabe (Parker, 1989; Elkayam, 1991; Münzel et al., 1996). Aus diesem Grunde wurde die relaxierende Wirkung von BAY 41-8543 an isolierten Aortenringen von normalen und Nitrat-toleranten Ratten untersucht. Bemerkenswerterweise war die relaxierende Wirkung von BAY 41-8543 an normalen und

toleranten Aortenringen gleich. Offensichtlich ist die sGC an der Entstehung einer Nitrattoleranz nicht entscheidend beteiligt. Darüber hinaus zeigen diese *In-vitro*-Ergebnisse, dass BAY 41-8543 eine neuartige Klasse von Therapeutika repräsentiert, die in der Lage sind, eine bestehende Nitrattoleranz zu durchbrechen.

2.2.3 Charakterisierung der kardiovaskulären Wirkungen der sGC-Stimulatoren

BAY 41-2272 und BAY 41-8543 *in vivo*

Vgl. Anlagen 9.5, 9.6, 9.9 und 9.10

Die starke vasodilatorische Wirkung von BAY 41-8543 *in vitro* konnte auch *in vivo* gezeigt werden. Am narkotisierten Hund führte eine intravenöse Bolusinjektion von BAY 41-8543 zu einer dosisabhängigen Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks und einem Anstieg des koronaren Blutflusses. Der gleichzeitige Anstieg der Sauerstoffsättigung im Koronarvenensinusblut unter BAY 41-8543 ist ein weiterer Indikator dieser Koronardilatation und zeigt, dass die Sauerstoffzufuhr zum Herzen dessen Nachfrage übertrifft. Im Unterschied zu Nitroglycerin zeigte BAY 41-8543 keine signifikante Wirkung auf das venöse System und damit auf die Vorlast (Stasch et al., 2002b, Anlage 9.9).

Wir untersuchten auch eine mögliche Interaktion von BAY 41-8543 und Nitroglycerin in narkotisierten Hunden, insbesondere im Hinblick auf die blutdrucksenkende Wirkung beider Substanzen. Die intravenöse Gabe von Nitroglycerin während einer Dauerinfusion von BAY 41-8543 löste eine Senkung des mittleren Blutdrucks aus, die geringer ausfiel als in Abwesenheit von BAY 41-8543. Dieser Effekt könnte durch hormonelle oder neurale Mechanismen erklärt werden, die *in vivo* einer zu starken Blutdrucksenkung entgegenwirken. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass es in der klinischen Entwicklung von BAY 41-8543 bei gleichzeitiger Applikation von Nitroglycerin zu einem außerordentlich starken Blutdruckabfall kommen könnte. Wurde jedoch der durch BAY 41-8543 induzierte Blutdruckabfall am narkotisierten Hund durch eine gleichzeitige Infusion von Noradrenalin antagonisiert, dann verursachte Nitroglycerin eine stärkere Blutdrucksenkung im Vergleich zu dessen Gabe in Abwesenheit von BAY 41-8543. Dies könnte auf eine gewisse synergistische Wirkung von NO und BAY 41-8543 hindeuten, wie sie bereits in den *In-vitro*-Untersuchungen beobachtet wurde (Stasch et al., 2002b; Anlage 9.9).

An narkotisierten, normotensiven Ratten führte die intravenöse Injektion von BAY 41-8543 zu einer starken und langanhaltenden Blutdrucksenkung mit einer minimal wirksamen Dosis

von 10 µg/kg i.v.. Um eine ähnlich blutdrucksenkende Wirkung durch YC-1 zu erzielen, ist aufgrund seiner deutlich schwächeren vasodilatatorischen Wirkung *in vitro* eine 500-fach höhere Dosierung erforderlich (Mülsch et al., 1997; Rothermund et al., 2000; Straub et al., 2001a, Anlage 9.6). Darüber hinaus betrug die Dauer der blutdrucksenkenden Wirkung von 5 mg/kg i.v. YC-1 an narkotisierten Ratten nur ca. 6 Minuten, während die blutdrucksenkende Wirkung von 10 µg/kg i.v. BAY 41-8543 über mehr als zwei Stunden anhielt (Stasch et al., 2002b, Anlage 9.9).

YC-1 zeigte nach oraler Gabe (300 mg/kg p.o.) keine signifikante blutdrucksenkende Wirkung an Ratten. Deshalb war eines unserer Ziele beim strukturellen Optimierungsprozess die Identifizierung von Verbindungen mit einer starken und lang anhaltenden blutdrucksenkenden Wirkung nach oraler Gabe (Straub et al., 2001a, Anlage 9.6). An narkotisierten, normotensiven Ratten senkte BAY 41-8543 den Blutdruck mit einer minimal effektiven Dosis von 0,3 mg/kg p.o.. Darüber hinaus zeigte BAY 41-8543 eine dosisabhängige und langanhaltende antihypertensive Wirkung an wachen, spontan hypertensiven Ratten (SHR) mit einer minimal effektiven Dosis von ebenfalls 0,3 mg/kg p.o.. Der beobachtete dosisabhängige Anstieg der Herzfrequenz war reflektorisch bedingt, da keine direkte Wirkung von BAY 41-8543 am Langendorff-Herz beobachtet wurde. Nach oraler Gabe von 3 mg/kg wurde eine 24-stündige Senkung des Blutdrucks beobachtet. BAY 41-8543 war sowohl an der narkotisierten, normotensiven Ratte als auch an der wachen, spontan hypertensiven Ratte ca. dreifach potenter als BAY 41-2272 (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; Stasch et al., 2002b, Anlage 9.9).

Erst kürzlich konnten wir zeigen, dass BAY 41-2272 und BAY 41-8543 *in vivo* unterschiedliche Metabolite durch Oxidation an dem 5-Pyrimidinyl-cyclopropyl- bzw. Morpholino-Rest bilden (Straub et al., 2002; Anlage 9.10). Diese Metabolite aktivierten die sGC direkt, zeigten einen Synergismus mit NO, waren stark vasorelaxierend und induzierten nach intravenöser Gabe an narkotisierten Ratten vergleichbare blutdrucksenkende Wirkungen wie deren Muttersubstanzen. Aufgrund ihres Vorhandenseins im Plasma von Ratten nach systemischer Gabe von BAY 41-2272 bzw. BAY 41-8543 könnten sie an deren Gesamtwirkung *in vivo* beteiligt sein (Straub et al., 2002; Anlage 9.10).

Trotz der weitverbreiteten Anwendung organischer Nitrate bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung limitiert die Toleranzentwicklung bei chronischer Gabe den therapeutischen

Wert dieser Substanzklasse (Parker, 1989; Münzel et al., 1996; Feelisch, 1998). Eine dreitägige Behandlung mit organischen Nitraten führt zu einer starken Induktion einer Nitratoleranz bei Ratten (Mülsch et al., 2001). Deshalb untersuchten wir die blutdrucksenkende Wirkung von BAY 41-8543 an wachen, spontan hypertensiven Ratten über vier Tage. Die Dosis war so gewählt, dass nach 24 Stunden, d.h. zum Zeitpunkt der nächsten Substanzgabe, der Blutdruck noch nicht wieder Basalwerte erreicht hatte. Die maximale Blutdrucksenkung nach jeder Substanzgabe war nahezu gleich. Diese Untersuchung zeigt, dass BAY 41-8543 im Gegensatz zu organischen Nitraten keine Toleranzwirkung an wachen Ratten induziert (Stasch et al., 2002b, Anlage 9.9).

Die Relevanz der anti-aggregatorischen Wirkung von BAY 41-8543 an Thrombozyten *in vitro* konnte auch auf die *In-vivo*-Situation übertragen werden (Stasch et al., 2002b, Anlage 9.9). Wir konnten nach oraler Gabe von BAY 41-8543 eine signifikante Verlängerung der Blutungszeit an Ratten beobachten, bei einer 300-fach niedrigeren Dosierung als mit YC-1. (Becker et al., 1999, Anlage 9.4). BAY 41-8543 reduzierte nach oraler Gabe auch die Thrombusbildung im FeCl₃-Thrombose Modell an der Ratte. Der cGMP-Anstieg in den Thrombozyten, die Inhibition der Plättchenaggregation, die VASP-Phosphorylierung, die antithrombotische Wirkung und die Verlängerung der Blutungszeit zeigen das Potenzial von BAY 41-8543 für die Entwicklung einer neuen Klasse von anti-aggregatorischen Substanzen.

NO wird in Endothelzellen bei der Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) freigesetzt, eine Reaktion, die durch L-Argininderivate, wie z.B. L-NAME, gehemmt werden kann. Sowohl eine akute als auch eine chronische Hemmung der NO-Synthese führt zu einem Blutdruckanstieg in verschiedenen Tierspezies und experimentellen Tiermodellen (Morton et al., 1993; Navarro et al., 1994; Zatz und Baylis, 1998). In einem therapeutisch relevanten „high renin, low NO“ Hypertoniemodell haben wir die Langzeitwirkungen einer sGC-Stimulation auf hämodynamische und hormonale Parameter untersucht. Transgene Ratten mit einem zusätzlichen Renin-Gen (TGR(mRen2)27) sind ein sehr empfindliches Modell zur Untersuchung der kardiovaskulären Wirkung von Substanzen, die mit dem NO/sGC-System interagieren (Hirth-Dietrich et al., 1994; Gardiner et al., 1998). Der systolische Blutdruck stieg in diesen Renin-transgenen Ratten unter L-NAME Behandlung während des Beobachtungszeitraums von fünf Wochen um 40 mmHg an. Dieser Blutdruckanstieg konnte komplett durch die zusätzliche Behandlung mit dem sGC-Stimulator BAY 41-8543 verhindert werden. Am Ende der Studie nach fünf Wochen waren

als Ausdruck einer nierenprotektiven Wirkung in der mit BAY 41-8543 behandelten Gruppe die Reninaktivität, und die Spiegel von Aldosteron, Harnstoff und Creatinin im Plasma signifikant niedriger als in der unbehandelten Gruppe. Diese protektive Wirkung von BAY 41-8543 wurde auch durch eine signifikante Reduktion der Mortalität begleitet (Stasch et al., 2002b; Anlage 9.9).

In einem experimentellen Herzinsuffizienzmodell wurden die kardioresalen und humoralen Wirkungen einer intravenösen Infusion von BAY 41-2272 untersucht (Boerrigter et al., 2002). Die Herzinsuffizienz wurde an Hunden durch schnelles ventrikuläres Pacing mit einem Schrittmacher über 10 Tage induziert. Im Vergleich zu den Ausgangswerten reduzierte BAY 41-2272 signifikant den mittleren arteriellen Blutdruck, den pulmonalen arteriellen Druck sowie den pulmonalen kapillaren Verschlussdruck. Darüber hinaus zeigte die Substanz eine diuretische Wirkung. Der sGC-Stimulator führte zu einer deutlichen Entlastung des Herzens unter Beibehaltung der Herzleistung, ohne dass es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kam. Das in dieser Studie gefundene Wirkprofil von BAY 41-2272 könnte die sGC-Stimulatoren nicht nur für die Behandlung der koronaren Herzerkrankung und der Hypertonie, sondern auch für die Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz attraktiv machen.

2.2.4 Identifizierung der NO-unabhängigen regulatorischen Einheit an der sGC

Vgl. Anlagen 9.5, 9.7 und 9.11

Durch eine Photoaffinitätslabeling-Studie wurde eine neue regulatorische Einheit an der sGC für NO-unabhängige Stimulatoren identifiziert (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5). Für diese Untersuchung wurde ein BAY 41-2272-Derivat mit einer Tritiummarkierung und einer photolabilen Azidogruppe synthetisiert (³H-PAL). Dieses Photoaffinitätslabel zeigte eine mit BAY 41-2272 vergleichbare Charakteristik an der isolierten sGC, wie NO-Unabhängigkeit und Häm-Abhängigkeit der Stimulation (Becker et al., 2001, Anlage 9.7). UV-Bestrahlung der mit ³H-PAL inkubierten hochgereinigten sGC führte nach gelchromatographischer Trennung zu einer Lokalisation der Markierung nahezu ausschließlich an der α_1 -Untereinheit des Enzyms. Diese Bindung konnte durch Vorinkubation mit unmarkiertem PAL, YC-1 und BAY 41-2272 nahezu komplett unterbunden werden, was auf eine spezifische Bindung des ³H-PAL schließen lässt. Der sGC-Inhibitor ODQ verhinderte ebenfalls eine Markierung der sGC, vermutlich über eine durch Oxidation des Eisens (Garthwaite et al., 1995; Brunner et al.,

1996; Schrammel et al., 1996) induzierte Veränderung der 3D-Konformation, die die Bindungstasche verzerrt oder zerstört.

Für die weitere Charakterisierung der NO-unabhängigen regulatorischen Stelle wurde die mit ^3H -PAL markierte sGC mittels einer Bromcyanspaltung fragmentiert. Das ^3H -PAL band an ein Bromcyanfragment der α_1 -Untereinheit, bestehend aus den Aminosäuren 236-290. Nach Sequenzierung dieses Fragments konnte das ^3H -PAL an den Cysteinen 238 und 243 lokalisiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zum Teil konservierten Aminosäuren in der Nähe der Cysteine 238 und 243 der α_1 -Untereinheit eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Enzymaktivität durch diesen neuen Typ von sGC-Stimulatoren spielt. Sicherlich ist der Mechanismus der sGC-Aktivierung deutlich komplizierter als die einfache Interaktion mit einer oder zwei Aminosäuren, zumal die am His-105 der β_1 -Untereinheit gebundene Häm-Gruppe, wie gezeigt, an der Aktivierung des Enzyms durch BAY 41-2272 essenziell beteiligt ist. Die definitive Beteiligung der identifizierten Sequenz bzw. ihrer näheren Umgebung an einer regulatorischen Einheit und auch ihre Interaktion mit der Häm-Region wird letztendlich erst durch Mutationsanalysen und Kokristallisationsstudien gezeigt werden können.

Die Untersuchungen von BAY 41-2272 an der NO-sensitiven α_2/β_1 -Isoform und ihren N-terminalen α_2 -Deletionsmutanten beleuchten die PAL-Ergebnisse von einer anderen Seite her. Obwohl die PAL-bindende Region in der α_2 -Untereinheit nur schwach konserviert ist (Yuen et al., 1990; Hartneck et al., 1991; Russwurm et al., 1998; Mayer und Koesling, 2001), konnten wir zeigen, dass das α_2/β_1 heterodimere Isoenzym ebenfalls durch BAY 41-2272 aktiviert wird (Koglin et al., 2002; Anlage 9.11). Deletionsanalysen mit der α_2 -Untereinheit und Koexpression mit der β_1 -Untereinheit im Baculovirus/Sf9-System deuten darauf hin, dass im Bereich der N-terminalen Aminosäuren 104-247 der α_2 -Untereinheit die BAY 41-2272 und YC-1 bindende Region liegt und unterstützen somit unsere Photoaffinitätslabel-Ergebnisse.

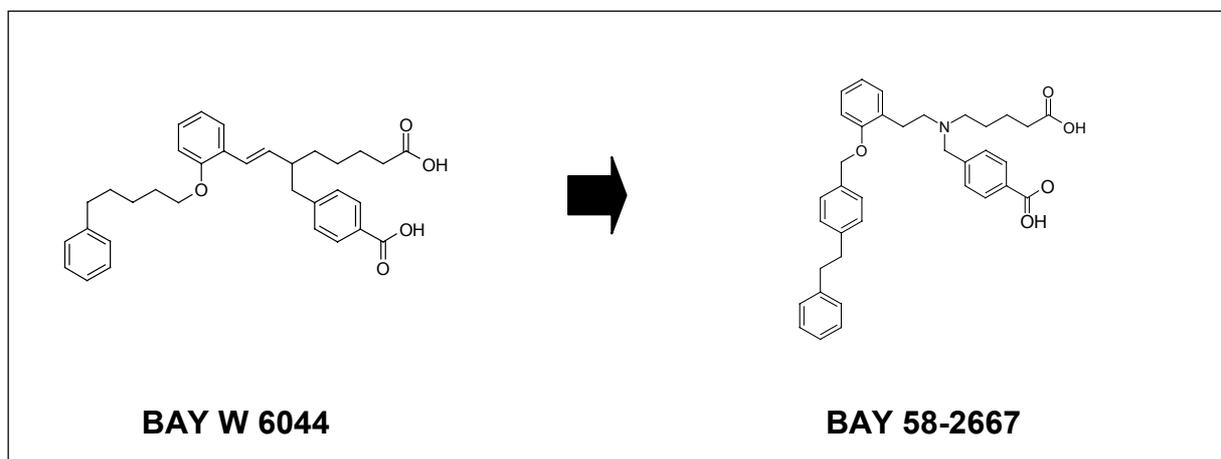
2.3 NO- und Häm-unabhängige Aktivatoren der sGC

2.3.1 Identifizierung NO- und Häm-unabhängiger Aktivatoren der sGC

Vgl. Anlage 9.3 und 9.12

Mit einem High-throughput Screening von ca. 250.000 Substanzen wurden neue chemische Leitstrukturen gesucht, die die lösliche Guanylatzyklase aktivieren. Dafür wurde ein zellulärer Assay entwickelt, bestehend aus einer sGC überexprimierenden CHO-Zelle (Becker et al., 1999, Anlage 9.3), einem cGMP-sensitiven Kationenkanal (CNG2, Weyand et al., 1994) und Aequorin (Stables et al., 2000). Als Folge einer sGC-Aktivierung und einer daraus resultierenden intrazellulären cGMP-Erhöhung wird in dieser Zelle der cGMP-sensitive Kationen-Kanal geöffnet, Calciumionen strömen in die Zelle und führen zur Aequorin-vermittelten Biolumineszenz, die mit einer CCD-Kamera gemessen wird. Wir entdeckten mit diesem High-throughput Screening-System mit BAY W 6044 eine chemische Klasse von bisher unbekannten sGC-Aktivatoren, die Aminodicarboxylsäuren (Alonso-Alija et al., 2001a, 2001b, 2001c). Nach Optimierung der Leitstruktur BAY W 6044 durch die Synthese von ca. 800 Verbindungen konnten wir BAY 58-2667 als den wirkstärksten Vertreter dieser Klasse identifizieren (Alonso-Alija, 2001d). Überraschenderweise fanden wir, dass diese Aminodicarboxylsäurederivate die sGC sowohl NO-unabhängig als auch unabhängig von der am Enzym befindlichen Häm-Gruppe aktivieren. Die biologische Aktivität dieser Substanzen beruht auf einem völlig neuen Mechanismus der Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Mit BAY 58-2667 wurde auch eine Substanz identifiziert, die ein einzigartiges pharmakologisches *In-vitro*- und *In-vivo*-Profil besitzt. Darüber hinaus konnte eine neue NO- und Häm-unabhängige regulatorische Region an der sGC identifiziert und charakterisiert werden (siehe hierzu auch Hobbs, 2002).

Von der Leitstruktur zur Wirksubstanz



2.3.2 Charakterisierung des sGC-Aktivators BAY 58-2667 *in vitro*

Vgl. Anlage 9.12

Wir untersuchten die Wirkungen von BAY 58-2667 auf die sGC-Aktivität sowohl allein als auch in Anwesenheit von NO und dem sGC-Inhibitor ODQ. BAY 58-2667 (1 nM - 10 μ M) zeigte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der sGC mit einer maximal 37-fachen Stimulation. Obwohl BAY 58-2667 die sGC nicht so stark aktivierte wie NO (um einen Faktor über 200, Koesling, 1999), ist eine Konzentration von 1 nM BAY 58-2667 ausreichend, um einen biologisch relevanten cGMP-Anstieg zu induzieren (Stasch et al., 2001, Anlage 9.5). In Kombination mit DEA/NO zeigte BAY 58-2667 im Gegensatz zu YC-1, BAY 41-2272 und BAY 41-8543 nur eine additive und keine synergistische Wirkung auf die sGC-Aktivität.

BAY 58-2667 aktivierte das Häm-freie Enzym konzentrationsabhängig (1 nM bis 10 μ M) mit einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 190 (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12). Im Gegensatz dazu stimulierten YC-1, BAY 41-2272 und BAY 41-8543 die Häm-freie sGC nicht (Hoenicka et al., 1999, Anlage 9.2; Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8).

NO zeigte die charakteristische Verschiebung der Soret-Bande zu niedrigeren Wellenlängen, während die Zugabe von BAY 58-2667 zu keiner Veränderung der Soret-Bande sowohl des nicht-stimulierten (431 nm) als auch des NO-stimulierten Enzyms (398 nm) führte. Somit zeigt BAY 58-2667 im Gegensatz zu NO keine Interaktion mit dem Häm-Eisen der sGC. Da BAY 58-2667, auch im Gegensatz zu YC-1, BAY 41-2272 und BAY 41-8543, das Häm-freie Enzym aktiviert (Hoenicka et al., 1999, Anlage 9.2; Stasch et al., 2001, Anlage 9.5; Stasch et al., 2002a, Anlage 9.8), schließen wir, dass BAY 58-2667 die sGC über einen bisher unbekanntem NO- und Häm-unabhängigen Mechanismus aktiviert (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12).

Untersuchungen an der gereinigten sGC zeigten, dass der sGC-Inhibitor ODQ in einer NO-kompetitiven Weise an das Enzym bindet, das Häm-Eisen oxidiert, welches anscheinend zu einer irreversiblen Inhibition des Enzyms führt (Garthwaite et al., 1995; Schrammel et al., 1996). Erwartungsgemäß zeigte ODQ, auf Grund der Häm-Unabhängigkeit von BAY 58-2667, keine Inhibition des durch BAY 58-2667 aktivierten Enzyms. Interessanterweise

wurde sogar eine Aktivitätssteigerung in Anwesenheit von ODQ beobachtet. Da BAY 58-2667 die sGC in einer NO- und Häm-unabhängigen Weise aktiviert, könnte diese Substanz auch ein wichtiges Hilfsmittel für das Verständnis des Mechanismus der sGC-Aktivierung sein und darüber hinaus für die Messung der sGC-Aktivität in biologischen Materialien unabhängig vom Oxidationsstatus des Häms geeignet sein.

BAY 58-2667 ist einer der stärksten Vasodilatoren. An der mit Phenylephrin vorkontrahierten Arteria saphena (Kaninchen) zeigte BAY 58-2667 eine Relaxation mit einem IC_{50} -Wert von 0,4 nM, während für BAY 41-2272 und die NO-Donoren, SNP und SIN-1, IC_{50} -Werte von 62 nM, 620 nM und 1100 nM erhalten wurden. Auch am Langendorff-Herz steigerte BAY 58-2667 konzentrationsabhängig den koronaren Perfusionsfluß, ohne den linksventrikulären Druck und die Herzfrequenz zu beeinflussen (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12).

Substanzen, die die sGC über einen NO-unabhängigen Weg aktivieren, können deutliche Vorteile gegenüber der bestehenden Nitrattherapie zeigen. Um abzuklären, ob die vasorelaxierende Wirkung unter Nitrat-toleranten Bedingungen erhalten bleibt, wurde die relaxierende Wirkung von BAY 58-2667 an isolierten Arterien von normalen und Nitrat-toleranten Kaninchen untersucht. Das Vorhandensein einer Nitrat-toleranz wurde durch die deutlich abgeschwächte vasorelaxierende Wirkung von Nitroglycerin an den toleranten Gefäßen im Vergleich zu dessen Wirkung an normalen Gefäßen gezeigt. Bemerkenswerterweise war die durch BAY 58-2667 induzierte Vasorelaxation an den toleranten und nicht toleranten Arterien nahezu gleich. Diese Ergebnisse zeigen, dass BAY 58-2667 eine neue Klasse von Therapeutika repräsentiert, die unter Nitrat-toleranten Bedingungen wirken und das Problem der Toleranzentwicklung bei chronischer Nitrattherapie überwinden könnten.

Eine Aktivierung der sGC in Thrombozyten führt zu einem cGMP-Anstieg und einer Thrombozytenaggregationshemmung (Becker et al., 1999, Anlage 9.4; Teng et al., 1997; Hobbs, 2000). So hemmte BAY 58-2667 konzentrationsabhängig die durch das Thromboxanmimetikum U-46619 oder Kollagen induzierte Plättchenaggregation in humanem Plättchen-reichen Plasma (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12).

2.3.3 Charakterisierung der kardiovaskulären Wirkungen von BAY 58-2667 *in vivo*

Vgl. Anlage 9.12

Die *in vitro* beobachteten Wirkungen auf die Blutgefäße und Thrombozyten zeigten sich auch in den *In-vivo*-Untersuchungen. BAY 58-2667 führte an wachen, spontan hypertensiven Ratten, die mit einem radiotelemetrischen System für die kontinuierliche Aufzeichnung von hämodynamischen Parametern ausgerüstet waren, zu einer deutlichen antihypertensiven Wirkung. Nach oraler Gabe von 3 und 10 mg/kg wurde eine maximale Blutdrucksenkung von 20 mmHg bzw. 31 mmHg beobachtet. Die Wirkung hielt über 8 Stunden an. Parallel wurde ein reflektorischer Anstieg der Herzfrequenz beobachtet.

Nach oraler Gabe von BAY 58-2667 beobachteten wir eine signifikante Verlängerung der Blutungszeit an Ratten, die allerdings geringer ausfiel als die von Acetylsalicylsäure. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass BAY 58-2667 im FeCl₃-Thrombose Modell an der Ratte dosisabhängig die Thrombosebildung reduzierte. Parallel wurde *ex vivo* eine signifikante dosisabhängige cGMP-Erhöhung in den Thrombozyten gemessen.

Das hämodynamische Wirkprofil von BAY 58-2667 war dem von Nitroglycerin am narkotisierten Hund sehr ähnlich. Beide Substanzen induzierten eine deutliche Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Zusätzlich senkten beide Substanzen den diastolischen Druck in der Arteria pulmonalis und den mittleren Druck im rechten Vorhof. Damit ist BAY 58-2667 die erste Substanz, die das gleiche hämodynamische Profil wie organische Nitrate besitzt, indem es *in vivo* sowohl die arteriellen wie auch die venösen Gefäße dilatiert. Darüber hinaus war die Wirkdauer von BAY 58-2667 deutlich länger als die von Nitroglycerin. Diese Ergebnisse zeigen das Potenzial von BAY 58-2667 als einem Repräsentanten einer neuen Klasse von anti-aggregatorisch und vasodilatierend wirksamen Substanzen.

2.3.4 Identifizierung der NO- und Häm-unabhängigen regulatorischen Einheit an der sGC

Vgl. Anlage 9.12

Um die Bindungsregion von BAY 58-2267 an der sGC zu lokalisieren, wurde eine Photoaffinitätslabel-Studie durchgeführt. In den chemischen Grundkörper von BAY 58-2667 wurde eine photolabile Azidogruppe und eine Tritiummarkierung eingeführt (³H-PAL). Die

unmarkierte Verbindung zeigte an der isolierten sGC die gleiche Charakteristik wie BAY 58-2667. Die sGC wurde mit ^3H -PAL inkubiert, UV-bestrahlt und aufgearbeitet. Nach gelelektrophoretischer Trennung zeigte das Autoradiogramm eine Radiomarkierung an der α_1 - und an der β_1 -Untereinheit, die durch einen Überschuss an unmarkiertem PAL nahezu komplett inhibiert werden konnte. Die Anwesenheit eines deutlichen Überschusses von BAY 41-2272 oder DEA/NO bei der Bestrahlung von ^3H -PAL und sGC führte zu keiner Veränderung im Markierungsmuster. Wurde jedoch die Bestrahlung an der Häm-freien oder an der durch ODQ oxidierten Form der sGC durchgeführt, so ergab sich eine Verschiebung der Radioaktivität von der α_1 - zur β_1 -Untereinheit. Für die weitere Lokalisation der Bindungsregion von ^3H -PAL wurde die markierte sGC durch Bromcyan gespalten. Die Peptidfragmente wurden über eine hochauflösende 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf Membranen für die spätere Sequenzierung geblottet. Nach Sequenzierung und Bestimmung der Radioaktivität konnten wir die Markierung an der Aminosäure 371 der α_1 - Untereinheit und in der Region der Aminosäuren 231-310 der β_1 -Untereinheit detektieren. Diese Photoaffinitätslabel-Studien legen nahe, dass die an der α_1 - und β_1 -Untereinheit der sGC identifizierten Regionen an der Bindung und Aktivierung der sGC durch BAY 58-2667 beteiligt sein könnten.

Alignment-Analysen zeigen, dass die identifizierten Aminosäuren innerhalb einer hochkonservierten Region der sGC zwischen den verschiedenen Spezies liegen. Allerdings muss man bedenken, dass der Mechanismus der sGC-Aktivierung sicherlich komplexer ist als eine einfache Interaktion mit einzelnen wenigen Aminosäuren. So wäre aufgrund der räumlichen Distanz zwischen der photolabilen Azidogruppe und dem Pharmakophor der Verbindung eine kovalente Bindung von ^3H -PAL an reaktive Aminosäuren etwas außerhalb der Bindungstasche nicht ausgeschlossen. Dennoch nehmen wir an, dass die markierten Aminosäuren im direkten Zugangsbereich des ^3H -PAL sind, da einerseits keine anderen Aminosäuren markiert wurden und andererseits eine Diffusion des Radiolabels über einen weiten Bereich ausgeschlossen werden kann. Man könnte annehmen, dass BAY 58-2667 die dreidimensionale Struktur beider sGC-Untereinheiten über seine Carboxylfunktionen so beeinflusst, dass es einen Übergangskomplex stabilisiert und dadurch die katalytische Aktivität steigert. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass beide Carboxylfunktionen im Molekül für die Wirkung von BAY 58-2667 und deren Analoga essenziell sind (Alonso-Alija et al., 2001a, 2001b, 2001c, 2001d). Ob die identifizierten Aminosäuren in der Bindungstasche oder lediglich in unmittelbarer Nähe davon liegen, wird

sich erst zeigen, wenn Kokristallisationsstudien, wie z.B. für die Adenylatzyklase mit Forskolin, vorliegen (Tesmer et al., 1997).

Mittels Radiosynthese wurde ^3H -BAY 58-2667 für Bindungsstudien an der sGC hergestellt. Aus diesen Bindungsstudien wurde eine hochaffine Bindungsstelle ($K_d = 3,2 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 470 \text{ pmol/mg Protein}$) identifiziert. Interessanterweise führte eine Präinkubation des Enzyms mit ODQ zu einer Verdopplung des B_{max} -Wertes. Verdrängungs-Untersuchungen, die in Abwesenheit und Anwesenheit von ODQ durchgeführt wurden, ergaben K_i -Werte von $6,3 \text{ nM}$ bzw. $6,5 \text{ nM}$. ^3H -BAY 58-2667 ließ sich durch die Zugabe von BAY 41-2272 nicht von der sGC verdrängen. Auch diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass BAY 41-2272 und BAY 58-2667 verschiedene und voneinander unabhängige Bindungsstellen an der sGC besetzen (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12). Damit konnte erstmals auch mittels klassischer Bindungsstudien eine neue regulatorische Einheit an der sGC charakterisiert und deren Beeinflussung durch ODQ gezeigt werden (Stasch et al., 2002c, Anlage 9.12).

3 Ausblick

Unser Wissen über die sGC als dem wichtigsten NO-Rezeptor ist in den letzten Jahren langsam, aber kontinuierlich angewachsen; dies gilt insbesondere für den Häm-vermittelten Aktivierungsmechanismus (Zhao et al., 1998; Ignarro, 1999; Ignarro et al., 1999; Murad, 1999; Koesling und Friebe, 2000; Ballou et al., 2002; Bellamy et al., 2002; Zabel et al., 2002). Noch vor fünf Jahren lautete der Titel eines Reviews „Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling“ (Hobbs, 1997). Als Gründe, warum die Guanylatzyklase lange im Schatten der besser untersuchten Adenylatzyklase lag, wurden u.a. die komplexe Struktur des Enzyms und die damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Produktion und Reinigung angeführt sowie das Fehlen von Substanzen die ausser NO und CO mit diesem Enzym spezifisch interagieren können.

Ausgehend von Untersuchungen mit dem Thrombozytenaggregationshemmer YC-1 am Rinderlungenenzym, an dem wir und andere die sGC stimulierende Wirkung von YC-1 erstmals zeigen konnten, charakterisierten wir an der hochreinen rekombinanten sGC der Ratte YC-1 als NO-unabhängigen und Häm-abhängigen sGC-Stimulator näher (Friebe et al., 1996; Mülsch et al., 1998; Hoenicka et al., 1999). Für diese mechanistischen Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus und die Photoaffinitätslabel-Studien am rekombinanten Enzym musste die sGC in einem System exprimiert und gereinigt werden, das für die Gewinnung von hochreinem Häm-haltigen Enzym im Milligramm Bereich geeignet ist. Neben der direkten sGC-Stimulation zeigt YC-1 in Kombination mit NO synergistische Wirkungen am gereinigten Enzym. Die mechanistischen und spektroskopischen Untersuchungen mit YC-1 als Prototyp NO-unabhängiger sGC-Stimulatoren lassen auf eine allosterische Regulation des Häm-haltigen Enzyms ohne direkte Interaktion mit der Häm-Region schliessen. Allerdings ist die intakte Häm-Gruppe für die sGC-Stimulation durch YC-1 essenziell. Auch an einer neu generierten stabilen sGC überexprimierenden CHO-Zelllinie konnten wir zeigen, dass YC-1 das Enzym zum einen direkt aktiviert und es zum anderen empfindlicher gegenüber seinem physiologischen Aktivator NO macht.

Auf der Suche nach im Vergleich zum Indazolderivat YC-1 deutlich wirkstärkeren NO-unabhängigen Stimulatoren der sGC identifizierten wir aus ca. 2000 neu synthetisierten Verbindungen die deutlich potenteren Pyrazolopyridinderivate BAY 41-2272 und BAY 41-8543. Im Gegensatz zu YC-1 zeigen beide Verbindungen keine Inhibition

metabolisierender Phosphodiesterasen. Damit konnte erstmals das therapeutische Potenzial einer spezifischen sGC-Stimulation *in vitro* und *in vivo* evaluiert werden. Diese Pyrazolopyridinderivate stimulieren die sGC wie YC-1 über einen NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen Mechanismus.

BAY 41-8543 stimuliert die hochgereinigte sGC im nanomolaren Bereich, induziert einen cGMP-Anstieg in sGC-CHO-Zelllinien, in Endothelzellen und Thrombozyten und zeigt darüber hinaus einen Synergismus mit NO in diesen *In-vitro*-Systemen. BAY 41-8543 ist an Arterien, Koronararterien und Venen eine stark vasorelaxierende Substanz und am Langendorff-Herz koronardilatierend wirksam. BAY 41-8543 ist ein Inhibitor der Thrombozytenaggregation, wobei die Wirkung im Plättchen-reichen Plasma gegenüber dem an gewaschenen Thrombozyten aufgrund der Plasma-Protein-Bindung der Substanz geringer ist. Parallel wird eine cGMP-Erhöhung und eine Phosphorylierung von VASP beobachtet. Die *in vitro* beobachtete vasorelaxierende und anti-aggregatorische Wirkung konnte auch *in vivo* in entsprechenden Modellen bestätigt werden.

Die Substanz hat ausgeprägte blutdrucksenkende Eigenschaften. So senkt Bay 41-8543 an narkotisierten Ratten sowohl nach intravenöser als auch oraler Gabe dosisabhängig den Blutdruck. Auch an wachen, spontan hypertensiven Ratten wird eine deutliche Blutdrucksenkung induziert, die bei hohen Dosierungen über 24 Stunden lang anhält. Am narkotisierten Hund führen intravenöse Bolusinjektionen von BAY 41-8543 zu einer dosisabhängigen Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks und einem Anstieg des koronaren Blutflusses. Dieses hämodynamische Profil könnte für die Behandlung von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung durchaus nützlich sein. Solch ein hämodynamisches Profil (Blutdrucksenkung und Anstieg des koronaren Blutflusses) ist charakteristisch für andere Substanzen, die sich seit Jahren im klinischen Einsatz zur Behandlung der Hypertonie und Angina pectoris befinden, wie z. B. die Calciumantagonisten und Dipyridamol (Akinoboye et al., 2001). Im Unterschied zu Nitroglycerin zeigt BAY 41-8543 keine signifikante Wirkung auf das venöse System und damit auf die kardiale Vorlast.

Trotz der weitverbreiteten Anwendung von organischen Nitraten bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung limitiert die Toleranzentwicklung bei chronischer Gabe den therapeutischen Wert dieser Substanzklasse (Feelisch, 1998; Münzel et al., 1996; Parker,

1989). Aus diesen Gründen sollten Substanzen, die die sGC in einer NO-unabhängigen Weise stimulieren können, deutlich Vorteile gegenüber der konventionellen Nitrattherapie aufweisen (Hobbs, 2000, 2002). Andererseits sollten NO-unabhängige sGC-Stimulatoren auch in der Lage sein, bei bestehender Nitrattoleranz ihre Wirkung zu entfalten. Genau diese therapeutisch relevanten Eigenschaften wurden für BAY 41-8543 tierexperimentell gezeigt. Einerseits kann BAY 41-8543 seine Wirkung an Nitrat-toleranten Gefäßen noch voll entfalten und andererseits zeigt sich im Langzeitversuch bei mehrfacher Gabe von BAY 41-8543 keine Toleranzentwicklung. Diese Untersuchungen zeigen auch, dass die sGC an einer Nitrattoleranz anscheinend nicht beteiligt ist. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass für die Bioaktivierung von Nitroglycerin und auch für die Entstehung einer Nitrattoleranz die mitochondriale Aldehyddehydrogenase verantwortlich ist (Chen et al., 2002; Ignarro, 2002). Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit der fehlenden Toleranzentwicklung der sGC-Stimulatoren und Aktivatoren und deren Wirkung bei bereits bestehender Nitrattoleranz.

Die Relevanz der anti-aggregatorischen Wirkung von BAY 41-8543 an Thrombozyten *in vitro* zeigte sich *in vivo* in einer Verlängerung der Blutungszeit sowie in einer Reduktion der Thrombusbildung im FeCl₃-Thrombosemodell. Die therapeutische Gesamtwirkung von BAY 41-8543, gemessen als anti-aggregatorische und vasodilatatorische Wirkung, zeigt sich auch in einem Langzeitversuch in einem „low NO, high renin“ Hypertoniemodell an der Ratte in einer Prävention des Blutdruckanstieges, einer nierenprotektiven Wirkung und einer Reduktion der Mortalität.

Die Identifizierung einer neuen regulatorischen Einheit an der sGC für NO-unabhängige Stimulatoren war durch eine Photoaffinitätsmarkierung, unter Verwendung eines Tritium-markierten BAY 41-2272-Derivats, möglich. Die Sequenzanalyse des entsprechenden radioaktiven Peptides ergab, dass die Radiomarkierung an den Cysteinen 238 und 243 der α_1 -Untereinheit gebunden war. Diese Region könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität spielen und der Angriffspunkt für diesen neuen Typ von sGC-Stimulatoren sein. Der Mechanismus der sGC-Aktivierung ist sicherlich komplexer als die einfache Interaktion mit ein oder zwei Aminosäuren, zumal die am His-105 der β_1 -Untereinheit befindliche Häm-Gruppe für die Aktivierung des Enzyms durch BAY 41-2272 und BAY 41-8543 beteiligt ist. Das ist auch durch die Untersuchungen mit den sGC-Stimulatoren an der α_2/β_1 -Isoform der sGC gezeigt worden. Die definitive Bestimmung der identifizierten Sequenz als regulatorische Einheit und auch ihre Interaktion mit der Häm-Gruppe wird

letztendlich erst durch Mutationsanalysen und Kokristallisationsstudien möglich sein. Bisher ist die Kristallisation der sGC jedoch noch nicht geglückt.

In einem High-throughput Screening von ca. 250.000 Verbindungen und anschließender chemischer Optimierung wurde BAY 58-2667 als neuer Typ von NO-unabhängigen Aktivatoren der sGC identifiziert. Im Gegensatz zu YC-1, BAY 41-2272 und BAY 41-8543 aktiviert BAY 58-2667 die sGC unabhängig von der prosthetischen Häm-Gruppe. Am isolierten Gefäß gehört BAY 58-2667 mit einem IC₅₀-Wert im subnanomolaren Bereich zu den stärksten bisher bekannten Vasodilatoren. Auch am Langendorff-Herz wird eine starke koronardilatierende Wirkung beobachtet. Wie bereits für BAY 41-8543 tierexperimentell gezeigt, repräsentiert auch BAY 58-2667 eine neue Klasse von Therapeutika, die unter Nitrat-toleranten Bedingungen wirken und das Problem der Toleranzentwicklung bei chronischer Nitrattherapie überwinden könnten.

Erstmals wurde mit BAY 58-2667 eine Substanz identifiziert, die am narkotisierten Hund das gleiche hämodynamische Wirkprofil wie organische Nitrate zeigt, indem es sowohl arterielle wie venöse Gefäße dilatiert. Darüber hinaus ist die Wirkdauer von BAY 58-2667 deutlich länger als die von Nitroglycerin. An wachen, spontan, hypertensiven Ratten zeigt sich eine deutliche und langanhaltende antihypertensive Wirkung der Substanz nach oraler Gabe.

Eine *in vitro* beobachtete starke Inhibition der Aggregation sowohl an gewaschenen Thrombozyten als auch im plättchenreichen Plasma zeigt sich auch *in vivo* in einer Verlängerung der Blutungszeit sowie einer Reduktion der Thrombusbildung in einem Thrombosemodell. Dies könnte ein weiterer Vorteil der NO-unabhängigen Aktivatoren der sGC gegenüber den organischen Nitraten, wie z. B. Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat und Isosobidmononitrat sein; denn diese zeigen aufgrund der fehlenden Biokonversion zu NO in den Thrombozyten keine nennenswerten anti-aggregatorischen Eigenschaften *in vitro* und haben auch klinisch keine relevanten anti-aggregatorischen Eigenschaften. Diese Ergebnisse zeigen das Potenzial von BAY 58-2667 als Repräsentant einer neuen Klasse von vasodilatierend und antiaggregatorisch wirksamen Substanzen.

Die Charakteristik der sGC-Aktivierung durch BAY 58-2667, die Bindungsuntersuchungen und die Photoaffinitätslabel-Studien belegen die Existenz einer weiteren NO- und Häm-unabhängigen regulatorischen Einheit an der sGC und zwar in der Region der Aminosäuren

371 (α_1 -Untereinheit) und 231-310 (β_1 -Untereinheit), die die katalytische Aktivität des Enzyms moduliert. Diese Ergebnisse können einen neuen Zugang zum Verständnis der sGC-Regulation und zur Beeinflussung dieses Signaltransduktionsweges eröffnen.

Charakteristika der sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren auf molekularer Ebene

Typ	Bindungsregion an der sGC	Wirkung an der sGC		
		\pm Häm-Gruppe	+ ODQ	+ NO
sGC-Stimulator BAY 41-2272 BAY 41-8543	α_1 : 238-243	Häm-abhängig	Inhibition	Potenzierung
sGC-Aktivator BAY 58-2667	α_1 : 371 β_1 : 231-310	Häm-unabhängig	Verstärkung	Addition

Die Identifizierung der NO-unabhängigen Stimulatoren vom Typ des BAY 41-2272 und vom Typ des BAY 58-2667 einerseits und die Entdeckung der entsprechenden regulatorischen Einheiten an der Guanylatzyklase andererseits führen zu der Frage nach möglichen endogenen Liganden an diesen Bindungsstellen und deren möglicher physiologischer Bedeutung bei der Regulation der löslichen Guanylatzyklase. Solche endogenen Liganden sind bisher nicht bekannt; jedoch könnte die Suche danach ein zukünftiges attraktives Forschungsgebiet sein (Mayer und Koesling, 2001; Hobbs, 2002). Erstmals ist es uns im Rahmen dieser Untersuchungen gelungen, einen klassischen Radioliganden-Bindungsassay an der Guanylatzyklase zu etablieren, der zumindest für die Suche nach endogenen Substanzen vom Typ des BAY 58-2667 verwendet werden könnte. Das Auffinden eines oder mehrerer solcher endogener Faktoren könnte sicherlich zum weiteren grundlegenden physiologischen Verständnis der Wirkungsweise dieses Enzyms beitragen.

Eine Vielzahl von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems ist mit einer unzureichenden Aktivierung des NO/sGC-Systems verknüpft (zur Übersicht siehe Mayer, 2000; Ignarro, 2000; Gewaltig und Kojda, 2002; Maxwell, 2002). Man nimmt an, dass eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere Superoxid, mit den verschiedenen Stufen des NO/sGC-Signalweges interagiert. Dieses Phänomen wurde z. B. bei der

Arteriosklerose, der Hypertonie und der Herzinsuffizienz gefunden. Darüber hinaus könnte man spekulieren, dass dieser „oxidative Stress“ auch zu einer Oxidation des Häm-Eisens an der sGC führt. Somit könnte die Oxidationsstufe des Häm-Eisens bei den verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen, da endogenes NO an einem oxidierten Häm-Eisen seine Wirkung nicht mehr entfalten kann. BAY 58-2667 stimuliert im Gegensatz zu bisher bekannten Stimulatoren, wie z.B. YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543 und NO-Donoren auch dann die lösliche Guanylatzyklase, wenn das Eisen des Häms in der dreiwertigen Oxidationsstufe vorliegt. Es bleibt abzuwarten, welchen Wert diese zusätzliche Häm-unabhängige Komponente der sGC-Aktivatoren bei der Pharmakotherapie entwickeln wird. Neben dem potentiellen therapeutischen Einsatz ließe sich mit dieser Substanz auch erstmals ein Diagnostikum zur Identifizierung einer löslichen Guanylatzyklase mit oxidiertem Häm-Eisen bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen und Erkrankungen entwickeln.

Für die hier beschriebenen neuen pharmakologischen Prinzipien gibt es viele mögliche therapeutische Anwendungen. Sie könnten neue Therapieansätze insbesondere zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung, der Hypertonie und der Herzinsuffizienz, darstellen. Eine unzureichende Aktivierung des NO/sGC-Systems liegt auch bei Erkrankungen wie Apoplex, Arteriosklerose und erektiler Dysfunktion vor. Darüber hinaus geht eine reduzierte sGC-Aktivierung auch mit der Pathogenese von Asthma, primärer pulmonaler Hypertonie, kognitiven Störungen und Leberfibrose einher. Aufgrund einer cGMP-vermittelten antiproliferativen und antimigrativen Wirkung könnten diese Therapieprinzipien auch zur Restenoseprophylaxe oder für die lokale Applikation gebunden an koronare Stents nach Ballonkatheterisierung geeignet sein (Garthwaite und Boulton, 1995; Moncada und Higgs, 1995; Yamada et al., 1996; Hoenicka und Gerzer, 1997; Petermann et al., 1999; Failli et al., 2000; Hobbs, 2000; Bischoff et al., 2002; Brioni et al., 2002; Kalsi et al., 2002; Maxwell, 2002; Mizusawa et al., 2002; Tulis et al., 2002). Das therapeutische Potenzial der hier vorgestellten NO-unabhängigen sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren sowie deren Vorteile gegenüber den organischen Nitraten ist in einem kürzlich erschienenen Editorial zu unseren Arbeiten unter dem Titel „Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited“ deutlich herausgestellt worden (Hobbs, 2002). Mit den NO-unabhängigen, aber Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren sowie den NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren haben wir wertvolle Instrumente in den Händen, um den für die Physiologie und Pathophysiologie so bedeutenden NO/sGC-Signalweg näher

zu untersuchen. Darüber hinaus bleibt abzuwarten, ob es gelingt, hieraus neue Therapeutika für eine Vielzahl von Erkrankungen am Menschen zu entwickeln.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind ein weiteres Beispiel dafür, wie pharmakologisch wirksame Substanzen unser physiologisches und pathophysiologisches Verständnis erweitern können. Pharmakologisch aktive Prinzipien sind wichtige Hilfsmittel für Physiologie und Pathophysiologie; früher war die umgekehrte Sichtweise vorherrschend. Es stand die physiologische Abklärung im Vordergrund, auf deren Basis dann rational neue Arzneimittel entwickelt wurden. Dieses Umdenken wird ermöglicht durch den rational begründeten Einsatz von molekularbiologischen und zellbiologischen Verfahren und der Identifizierung von Substanzen in High-throughput Screening-Systemen. Auch wenn diese Vorgehensweise nicht zur Regel wird, beleuchtet sie dennoch schlaglichtartig die Bedeutung pharmakologischer Methoden und Denkansätze für das Verständnis physiologischer Prozesse.

4 Literaturverzeichnis

- Abate A, Ashenafi M, Oberle S, Schöder H. YC-1 inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E₂ formation in macrophages: a cGMP-independent effect. *Acta. Physiol. Scand.* 1999; 167: 64.
- Akinboboye OO, Idris O, Chou RL, Sciacca RR, Cannon PJ, Bergmann SR. Absolute quantitation of coronary steal induced by intravenous dipyridamole. *Am. J. Cardiol.* 2001; 37: 109-116.
- Alonso-Alija C, Heil M, Flubacher D, Naab P, Stasch J-P, Wunder F, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E. Novel dicarboxylic acid derivatives with pharmaceutical properties. *WO-0119355-A 2001.03.22.* 2001a.
- Alonso-Alija C, Heil M, Flubacher D, Naab P, Stasch J-P, Wunder F, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E. Novel derivatives of dicarboxylic acid having pharmaceutical properties. *WO-0119776-A 2001.03.22.* 2001b.
- Alonso-Alija C, Heil M, Flubacher D, Naab P, Stasch J-P, Wunder F, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E. Novel dicarboxylic acid derivatives with pharmaceutical properties. *WO-0119778-A 2001.03.22.* 2001c.
- Alonso-Alija C, Heil M, Flubacher D, Naab P, Stasch J-P, Wunder F, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E. Novel derivatives of dicarboxylic acid having pharmaceutical properties *WO-0119780-A 2001.03.22.* 2001d.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 3203-3207.
- Aronow WS. Antiplatelet agents in the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in older patients with vascular disease. *Drugs Aging.* 1999; 15: 91-101.
- Asirvatham S, Sebastian C, Thadani U. Choosing the most appropriate treatment of stable angina: Safety considerations. *Drug Saf.* 1998; 19: 23-44.
- Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou X-H, Ny L, Andersson K-E, Kehrel B, Offermanns S, Fässler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999; 18: 37-48.
- Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 12097-12101.
- Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 710-718.
- Becker EM, Wunder F, Kast R, Robyr C, Hoenicka M, Gerzer R, Schröder H, Stasch J-P. Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase overexpressing CHO cell line. *Nitric Oxide.* 1999; 3: 55-66.
- Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch J-P. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; 35: 390-397.
- Becker EM. Biochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Stimulation der löslichen Guanylatcyclase durch YC-1. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.* 2000.

- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schroeder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch J-P. Identification of the NO-independent regulatory site of the direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacology*. 2001; 1: 13.
- Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 507-510.
- Biel M, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F, Zong X. Cyclic nucleotide-gated channels, mediators of NO: cGMP-regulated processes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 1998; 358: 140-144.
- Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch J-P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces NO dependent penile erection in vivo. *Urology*. 2003; 61: 464-467.
- Boerrigter G, Costello LC, Cataliotti A, Tsurunda T, Harty G, Lapp H, Stasch J-P, Burnett JC. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation*. 2003; 107: 686-689.
- Brioni JD, Nakane M, Hsieh GC, Moreland RB, Kolasa T, Sullivan JP. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erection dysfunction. *Int. J. Impotence Res*. 2002; 14: 8-14.
- Brunton, TL. Use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet*. 1867; 1857: 561-564.
- Brunner F, Schmidt K, Nielsen EB, Mayer B. Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1996; 277: 48-53.
- Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991; 174: 351-357.
- Buechler WA, Singh S, Aktas J, Mueller S, Murad F, Gerzer R. High-level expression of biologically active soluble guanylate cyclase using the baculovirus system is strongly heme-dependent. *Adv. Pharmacol*. 1995; 34: 293-303.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 14509-14517.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 8306-8311.
- Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*. 1999; 1411: 334-350.
- Denninger JW, Schelvis JP, Brandish PE, Zhao Y, Babcock GT, Marletta MA. Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry*. 2000; 39: 4191-4198.
- Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U, Pilz RB. Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 1999; 135: 173-209.
- Elkayam U. Tolerance to organic nitrates: evidence mechanisms, clinical relevance, and strategies for prevention. *Ann. Int. Med*. 1991; 114: 667-377.
- Failli P, DeFranko RM, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, Batignani G, Guerra CT, Laffi G, Gentilini P, Pinzani M. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000; 119: 479-492.

- Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358: 113-122.
- Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HHHW. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-*a*]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol. Pharmacol.* 1999; 56: 243-253.
- Feurer A, Straub A, Fürstner C, Stasch J-P, Perzborn E, Hütter J, Dembowsky K. Novel heterocyclyl-methyl-substituted pyrazoles. *WO-002195-A 2000.04.20.* 2000.
- Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluids sheer stress. *Circ. Res.* 1998; 82: 680-695.
- Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schulz G, Koesling D. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of α_1 and β_1 subunits. *Eur. J. Biochem.* 1996; 240: 380-386.
- Friebe A, Schulz G, Koesling D. Sensitizing soluble guanylate cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.* 1996; 15: 6863-6868.
- Friebe A, Koesling D. Mechanism of YC-1 induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 1998; 53: 123-127.
- Friebe A, Müllershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54: 962-967.
- Furchgott RF. Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 1999; 111: 1990-2000.
- Galle J, Zabel U, Hübner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HHHW. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cGMP levels and phosphodiesterase activity. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 127: 195-203.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennet T. The contribution of nitric oxide to cardiovascular status and responses to vasodilators in conscious, hypertensive, transgenic ((mRen-2)27) rats. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124: 299-306.
- Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57: 683-706.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1*H*[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 184-188.
- Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55: 250-260.
- Gerzer R, Hofmann F, Schultz G. Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylyl cyclase from bovine lung. *Eur. J. Biochem.* 1981; 116: 479-486.
- Gupta G, Kim J, Yang L, Sturley SL, Danziger RS. Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus. *Protein Expr. Purif.* 1997; 10: 325-330.
- Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 3088-3093.

- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Boehme E, Schultz G. Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylate cyclase. Interchangeability of the α -subunit of the enzyme. *FEBS Lett.* 1991; 292: 217-222.
- Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, Zimmer M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 8120-8125.
- Hirth-Dietrich C, Stasch J-P, Ganten D, Luft FC. Renal effects of captopril and nitrendipine in transgenic rats with an extra renin gene. *Hypertension.* 1994; 23: 626-631.
- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.* 1997; 18: 484-491.
- Hobbs A J. Soluble guanylate cyclase. *Emerging Ther. Targets.* 2000; 4: 735-749.
- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 637-640.
- Hoenicke M, Gerzer R. Lösliche Guanylatzyklen: Schlüsselenzyme zum therapeutischen Einsatz des Prinzips NO. *Internist.* 1997; 38: 427-437.
- Hoenicke M, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schröder H, Gerzer R, Stasch J-P. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J. Mol. Med.* 1999; 77: 14-23.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* 2000; 113: 1671-1676.
- Horstrup K, Jablonka B, Hönig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser¹⁵⁷ in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur. J. Biochem.* 1994; 225: 21-25.
- Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO, Mameghani A, Schmidt HHHW. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 312-319.
- Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylyl cyclase by protoporphyrin IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982; 79: 2870-2873.
- Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 1984; 17: 267-274.
- Ignarro LJ. Stickstoffmonoxid: Ein einzigartiges endogenes Signalmolekül in der Gefäßbiologie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 1999; 111: 2002-2013.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 34: 879-886.
- Ignarro LJ (Hrsg.). Nitric oxide. Biology and Pathophysiology. *Academic Press San Diego, USA.* 2000.
- Ignarro LJ. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 7816-7817.
- Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Baevø JA. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1999; 135: 67-104.
- Juul-Møller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosen A, Serensen S, Omblus R. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. *Lancet.* 1992; 340: 1421-425.

- Kalsi JS, Rees RW, Hobbs AJ, Kell PD, Ralph DJ, Moncada S, Celtek S. Bay 41-2272, a novel NO-independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum. *Int. J. Impotence Res.* 2002; 14 (Suppl. 3): S2.
- Kharitonov VG, Russwurm M, Magde D, Sharma VS, Koesling D. Dissociation of nitric oxide from soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 239: 284-286.
- Kharitonov VG, Sharma VS, Magde D, Koesling D. Kinetics and equilibria of soluble guanylate cyclase ligation by CO: effect of YC-1. *Biochemistry.* 1999; 38: 10699-10706.
- Ko FN, Wu C-C, Kuo S-C, Lee F-Y, Teng C-M. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood.* 1994; 84: 4226-4233.
- Koglin M, Stasch J-P, Behrends S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide sensitive soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 292: 1057-1062
- Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods.* 1999; 19: 485-493.
- Koesling D, Friebe A. Enzymology of soluble guanylyl cyclase. *L J Ignarro (Ed.) Nitric Oxid: Biology and Pathobiology, Academic Press, San Diego, USA.* 2000; pp. 485-493.
- Kosarikov DN, Young P, Uversky VN, Gerber NC. Human soluble guanylate cyclase: functional expression, purification and structural characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001a; 388: 185-197.
- Kosarikov DN, Lee JM, Uversky UN, Gerber NC. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J. Inorg. Biochem.* 2001b; 87: 267-276.
- Lee YC, Martin E, Murad F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97; 10763-10768.
- Martin DD, Tong JS, Parker JD. Platelet cyclic GMP responses to nitroglycerin. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2000; 14: 419-425.
- Martin E, Lee YC, Murad F. YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98, 12938-12942.
- Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular disease. *Nitric Oxide.* 2002; 6: 101-124.
- Mayer B (Hrsg.). Nitric oxide. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.* 2000.
- Mayer B, Koesling D. cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 22: 546-548.
- Mizusawa H, Hedlund P, Brioni JD, Sullivan JP, Andersson KE. Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. *J. Urol.* 2002; 167: 2276-2281.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-142.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995; 9: 1319-1330.
- Morton JJ, Beattie EC, Speirs A, Gulliver F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J. Hypertens.* 1993; 11: 1083-1088.
- Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch J-P, Kast R, Busse R: Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 681-689.

- Mülsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Smolenski A, Walter U, Stasch J-P, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Münzel T. Effects of in vivo nitroglycerine treatment on activity and expression of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation*. 2001; 10: 2188-2194.
- Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, Harrison DG. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 1465-1470.
- Murad F. Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 1999; 111: 1976-1989.
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 16841-16845.
- Navarro J, Sanchez A, Saiz J, Ruilope LM, Garcia-Estan J, Romero JC, Moncada S, Lahera V. Hormonal, renal and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: R1516-R1521.
- Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Münzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2000; 87: 999-1005.
- Parker JO. Nitrate tolerance in angina pectoris. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1989; 2: 823-829.
- Petermann H, Vogl S, Schulze E, Dargel R. Chronic liver injury alters basal and stimulated nitric oxide production and 3H-thymidine incorporation in cultured sinusoidal endothelial cells from rats. *J. Hepatol.* 1999; 31: 284-292.
- Robyr C, Straub A, Niewohner U, Jaetsch T, Feurer A, Kast R, Stasch J-P, Perzborn E, Hütter J, Dembowski K: Use of condensed (heteroaryl-substituted)1-benzal-3-pyrazol derivatives for treating special diseases of the cardiovascular and central nervous systems. *WO-9816223-A 98.04.23*. 1998.
- Rothermund L, Friebe A, Paul M, Koesling D, Kreutz R. Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 130: 205-208.
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 1998; 335: 125-130.
- Russwurm M, Koesling D. Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 230: 159-164.
- Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM. Nitric oxide syntheses in vascular cells. *Exp. Physiol.* 1995; 80: 885-905.
- Schmidt K, Schrammel A, Koesling D, Mayer B. Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59: 220-224.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 1996; 50: 1-5.
- Schröder H, Leitmann DC, Bennet BM, Waldman SA, Murad F. Glyceryltrinitrate-induced desensitization of guanylate cyclase in cultured lung fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 245: 413-418.

- Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmüller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Münzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002; 105: 1170-1175.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62: 1153-1161.
- Sharma VS, Madge D. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. *Methods*. 1999; 19: 494-505.
- Smolenski A, Burkhardt M, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998a; 358: 134-139.
- Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Hoscuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 1998b; 273: 20029-20035.
- Stables J, Mattheakis LC, Chang R, Rees S: Recombinant aequorin as reporter of changes in intracellular calcium in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 2000; 327: 456-71.
- Stasch J-P, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*. 2001; 401: 212-215.
- Stasch J-P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002a; 135: 333-343.
- Stasch J-P, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002b; 135: 344-355.
- Stasch J-P, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* 2002c; 136: 773-783.
- Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylyl cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33: 5636-5640.
- Stone JR, Marletta MA. Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry* 1996; 35: 1093-1099.
- Stone JR, Marletta MA. Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem. Biol.* 1998; 5: 255-261.
- Straub A, Robyr C, Niewohner U, Jaetsch T, Feurer A, Kast R, Stasch J-P, Perzborn E, Hütter J, Dembowsky K. New heterocyclomethyl-substituted pyrazol derivatives. *WO-9816507-A 98.04.23*. 1998.
- Straub A, Feurer A, Fürstner C, Alonso-Alija C, Stasch J-P, Perzborn E, Hütter J, Dembowsky K, Stahl E. 3-(4-amino-5-ethylpyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4b]pyridine. *WO-0006567-A 2000.02.10*. 2000a.
- Straub A, Feurer A, Alonso-Alija C, Stahl E, Stasch J-P, Hütter J, Dembowsky K. Substituted pyrazole derivatives. *WO-0006568-A 2000.02.10*. 2000b.

- Straub A, Feurer A, Alonso-Alija C, Stasch J-P, Perzborn E, Hütter J, Dembowski K, Stahl E: Substituted pyrazole derivatives condensing with six-membered heterocyclic rings. *WO-0006569-A 2000.02.10*. 2000c.
- Straub A, Feurer A, Alonso-Alija C, Stahl E, Stasch J-P, Perzborn E, Dembowski K, Kern A: Substituted pyrazole derivatives. *WO-0066582-A 2000.11.09*. 2000d.
- Straub A, Stasch J-P, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, Fürstner C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001a; 11: 781-784.
- Straub A, Alonso-Alija C, Kern A, Stasch J-P, Dembowski K: Substituted pyrazole derivative. *WO-0183490-A 2001.11.08*. 2001b.
- Straub A, Benet-Buchholz J, Fröde R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, Siefert H-M, Stasch J-P. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 1711-1717.
- Teng CM, Wu CC, Ko F-N, Lee FY, Kuo SC. YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 320: 161-166.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs α -GTP γ S. *Science.* 1997; 278: 1907-1916.
- Thandani U. Nitrate tolerance, rebound, and their clinical relevance in stable angina pectoris, unstable angina, and heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1997; 10: 735-742.
- Thomsen LL, Olesen J. Nitric oxide in primary headaches. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14: 315-321.
- Tulis DA, Bohl Masters KS, Lipke EA, Schiesser RL, Evans AJ, Peyton KJ, Durante W, West JL, Schaefer AI. YC-1-mediated vascular protection through inhibition of smooth muscle cell proliferation and platelet function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 291: 1014-1021.
- Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 1987; 39: 163-196.
- Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D. Mutation of His-105 in the β 1 subunit yields a nitric-oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 2592-2596.
- Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature.* 1994; 368: 859-63.
- Wohlfart P, Malinski T, Ruetten H, Schindler U, Linz W, Schoenafinger K, Strobel H, Wiemer G. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128: 1316-1322.
- Wu CC, Ko F-N, Kuo S-C, Lee FY, Teng CM. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116: 1973-1978.
- Wu CC, Ko F-N, Teng CM. Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 231: 412-416.
- Wu CC, Ko F-N, Kuo S-C, Lee FY, Teng CM. YC-1 potentiates the antiplatelet effect of hydrogen peroxide via sensitization of soluble guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 381: 185-191.

- Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, Kameyama T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience*. 1996; 74: 365-374.
- Yuen PST, Potter LR, Garbers DL. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*. 1990; 29: 10872-10878.
- Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt HHHW. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem. J*. 1998; 335: 51-57.
- Zabel U, Häusler C, Weeger M, Schmidt HHHW. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using glutathione S-transferase affinity-tagged subunits. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 18149-18152.
- Zabel U, Kleinschmitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Müller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer J-E, Schmidt HHHW. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nature Cell Biol*. 2002; 4: 307-311.
- Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*. 1998; 32: 958-964.
- Zhao Y, Marletta MA. Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 1997; 36: 15959-15964.
- Zhao Y, Schelvis JPM, Babcock GT, Marletta MA. Identification of histidine 105 in the $\beta 1$ subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 1998; 37: 4502-4509.
- Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 14753-14758.

5 Curriculum vitae

Name:	Dr. rer. nat. Johannes-Peter Stasch
Geburtsdatum/-ort:	18. August 1954 in Hessisch-Oldendorf
Adresse:	Alfred-Nobel-Straße 109, 42651 Solingen
Familienstand:	Verheiratet, 3 Kinder
Schulbildung:	
April 1961 – März 1965:	Katholische Volksschule in Hameln
April 1965 – Mai 1973:	Schiller-Gymnasium in Hameln, Abitur
Chemiestudium:	
Oktober 1973 – Dezember 1978:	Universitäten Hannover und Würzburg
Diplomarbeit:	Physikalische Chemie, Universität Würzburg
Thema:	<i>Photoaktivierung von homogenen Katalysatoren</i>
Zivildienst:	
November 1978 – Februar 1980:	Aufbau eines neurochemischen Labors in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg. Analytische Arbeiten auf dem Gebiet der Neuropeptide und Neurotransmitter
Naturwissenschaftliche Promotion:	
März 1980 – Juni 1983:	Neurologische Universitätsklinik Würzburg und Institut für Anorganische Chemie der Universität Bielefeld
Thema:	<i>Sila-Piperidine und silylierte Piperidine mit potentieller Antiparkinsonaktivität – Synthesen, Rezeptorbindungsstudien und Einflüsse auf die chemische Signalübertragung im ZNS</i>
Pharmaziestudium:	
Juni 1980 – Mai 1983:	Universität Würzburg
Juli 1983 – Dezember 1983:	Raths-Apotheke in Hameln
Januar 1984 – Juni 1984:	Pharma Hameln GmbH in der Qualitätskontrolle
August 1984:	Approbation als Apotheker
Wissenschaftlicher Werdegang:	
September 1984:	Laborleiter im Institut für Herz-Kreislauf-Forschung der Bayer AG in Wuppertal: Biochemie, Zellkulturen, isolierte Organe und <i>in vivo</i> Pharmakologie
Juni 1991:	Anerkennung als Apotheker für das Fach Arzneimittelinformation und Ermächtigung zur Weiterbildung auf diesem Gebiet
Seit Oktober 1995:	Leitung interdisziplinärer Projektteams zur Auffindung und präklinischen Entwicklung von cGMP-beeinflussenden Substanzen und Kinase- Inhibitoren für die Therapie von Herz-Kreislauf-erkrankungen

6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), November 2002

Dr. Johannes-Peter Stasch

7 Danksagung

Der überwiegende Teil der hier vorgelegten Arbeiten wurde am Institut für Herzkreislauf-Forschung der Bayer AG in Wuppertal durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt dem Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. Matthias Schramm, der es mir ermöglichte, mit meinem Labor und einem Projektteam, die Voraussetzungen für die hier vorgelegte Arbeit zu schaffen. Ich möchte Herrn Schramm auch für die prägenden und begeisternden Diskussionen, sowie das kreative Klima in seinem Institut danken, durch welches das Auffinden, die Charakterisierung und Etablierung dieser pharmakologischen Wirkprinzipien erst möglich war.

Herrn Prof. Dr. Henning Schröder, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für sein stetes Interesse an der Arbeit und für seine bereitwillige Unterstützung des Habilitationsverfahrens.

Viele Menschen haben zum Erfolg der NO-unabhängigen Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase und damit auch dieser Arbeit beigetragen. Mein herzlicher Dank gilt meinen Kollegen bei der Bayer AG, in Wuppertal, aus der medizinischen Chemie, der Biotechnologie, der Screeningtechnologie, der Pharmakokinetik, der Toxikologie und der Pharmakologie für ihre Unterstützung, Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima. Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner ehemaligen Doktorandin Dr. Eva Maria Becker und meinem Doktoranden Peter Schmidt, sowie den Mitarbeitern Christel Diederichs, Bernhard Ducke, Ralf Hartkopf, Yvonne Keim, Anja Maile und Annelore Schmidt für ihren enormen Arbeitseinsatz, ihre stetige Leistungsbereitschaft und nicht zuletzt ihrer Herzlichkeit.

Ganz persönlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre moralische Unterstützung und ihr Interesse bedanken.

8 Veröffentlichte Originalarbeiten

1. Strohmeier W, Stasch J-P. Photoaktivierung und Photosensibilisierung des homogenen Hydrierungs-Katalysators $\text{IrCl}(\text{CO})\text{P}(\text{i-C}_3\text{H}_7)_3$. *Z. Naturforsch.* 1979; 34b: 755-758.
2. Przuntek H, Stasch J-P, Graf M, Pflughaupt KW, Gropp N, Witteler M. A simplified radioimmunological method for the determination of human β -endorphin in cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 1981; 224: 203-210.
3. Gerlach M, Jutzi P, Stasch J-P, Przuntek H. Synthese und pharmakologische Eigenschaften von 4,4-Diphenyl-4-sila-piperidinen. *Z. Naturforsch.* 1982; 37b: 657-662.
4. Neuser D, Stasch J-P, Witteler M, Kuhn W, Gerlach M, Jutzi P, Przuntek H. The interactions of 1-alkyl-4,4-diphenylpiperidines with opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1983; 87: 315-318.
5. Gerlach M, Jutzi P, Stasch J-P, Przuntek H. Synthese und pharmakologische Eigenschaften von silylierten Dopaminen und 4,4-Diphenylpiperidinen. *Z. Naturforsch.* 1983; 38b: 237-242.
6. Neuser D, Lesch KP, Stasch J-P, Przuntek H. Beta-endorphin-, leucine enkephalin- and methionine enkephalin-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Eur. Neurol.* 1984; 23: 73-81.
7. Witteler M, Stasch J-P, Neuser D, Kuhn W, Ruß H, Przuntek H. Effect of tocainide on the concentrations of norepinephrine, dopamine, serotonin and histamine in rat brain and its binding affinity to neuroreceptors. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 1985; 35: 787-789.
8. John A, Stasch J-P, Neuser D, Morich FJ, Hirth C. The use of a monoclonal antibody to measure plasma atriopeptins in rat. *Life Sci.* 1986; 38: 1991-1997.
9. Hirth C, Stasch J-P, John A, Kazda S, Morich FJ, Neuser D, Wohlfeil S. The renal response to acute hypervolemia is caused by atrial natriuretic peptides. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1986; 8: 268-275.
10. Stasch J-P, Hirth C, Kazda S, Wohlfeil S. The elevation of cyclic GMP as a response to acute hypervolemia is blocked by monoclonal antibodies against atrial natriuretic peptides. *Eur. J. Pharmacol.* 1986; 129: 165-168.
11. Stasch J-P, Neuser D, John A, Hein D, Heuck K, Morich FJ. The use of a monoclonal antibody for the determination of atrial natriuretic peptides in human plasma. *Klin. Wochenschr.* 1987; 65: 533-537.
12. Theiss G, John A, Morich FJ, Neuser D, Schröder W, Stasch J-P, Wohlfeil S. Alpha-hANP is the only form of circulating ANP in humans. *FEBS Letters.* 1987; 218: 159-162.
13. Stasch J-P, Kazda S, Hirth C, Morich FJ. Role of nisoldipine on blood pressure, cardiac hypertrophy and atrial natriuretic peptides in SHR. *Hypertension.* 1987; 10: 303-307.
14. Stasch J-P, Hirth C, Kazda S, Neuser D. The reduction of renin and aldosterone as a response to acute hyper-volemia is blocked by a monoclonal antibody directed against atrial natriuretic peptides. *Life Sci.* 1988; 42: 511-516.

15. Stasch J-P, Ruß H, Schacht U, Witteler M, Neuser D, Gerlach M, Leven M, Kuhn W, Jutzi P, Przuntek H. 4,4-Diphenylpiperidine derivatives and their sila analogues. A comparative study of their interaction with neural receptor binding sites and synaptosomal monoamine uptake. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 1988; 8: 1075-1078.
16. Neuser D, Stasch J-P, Morich FJ. Modulation of atrial natriuretic peptide induced cGMP accumulation by arginine-vasopressin in the cultured renal epithelial cell line LLC-PK₁. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 146: 341-344.
17. Knorr A, Laguna C, Stasch J-P. Modulation by chronic nifedipine of plasma atrial natriuretic peptide, cell Na⁺ transport and plasma volume in rats with renal hypertension. *J. Hypertens.* 1988; 6: 839-844.
18. Stasch J-P, Steinke W, Kazda S, Neuser D. Autoradiographic localization of 125-I-endothelin in rat tissues. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 1989; 1: 59-61.
19. Stasch J-P, Grote H, Kazda S, Hirth-Dietrich C. Dynorphin stimulates ANP release in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 159: 101-102.
20. Stasch J-P, Hirth-Dietrich C, Kazda S, Neuser D. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptide in vitro and in vivo. *Life Sci.* 1989; 45: 869-875.
21. Stasch J-P, Kazda S, Neuser D. Different effects of ANP and sodium nitroprusside on cyclic GMP extrusion of isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 174: 279-282.
22. Drexler H, Hirth-Dietrich C, Stasch J-P, Mayo G, Traub C, Wohlfeil S, Just H. Vasodilatory action of endogenous atrial natriuretic factor in a rat model of chronic heart failure as determined by monoclonal ANF-antibody. *Circ. Res.* 1990; 66: 1371-1380.
23. Stasch J-P, Hirth-Dietrich C, Kazda S, Neuser D. Role of endogenous ANP on endocrine and exocrine function. *Peptides.* 1990; 11: 577-582.
24. Neuser D, Zaiss S, Stasch J-P. Endothelin receptors in cultured epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 176: 241-243.
25. Neuser D, Knorr A, Stasch J-P, Kazda S. Mitogenic activity of endothelin-1 and -3 on vascular smooth muscle cells is inhibited by atrial natriuretic peptides. *Artery.* 1990; 17: 311-324.
26. Stasch J-P, Kazda S, Hirth-Dietrich C, Neuser D. Effects of nisoldipine on atrial natriuretic peptides, blood pressure and cardiac hypertrophy in Dahl rats. *Clin. Exptl. Hypertens.* 1990; A12: 1419-1436.
27. Neuser D, Hirth-Dietrich C, Stasch J-P, Kazda S. Influence of calcium-antagonists on renal function and secondary hyperparathyroidism in acute renal failure in rats. *Renal Failure* 1990; 12: 221-225.
28. Stasch J-P, Steinke W, Kazda S, Neuser D. Autoradiographic localization of ¹²⁵I-big endothelin-1 in rat tissues. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 1991; 41: 478-480.
29. Neuser D, Steinke W, Dellweg HG, Kazda S, Stasch J-P. ¹²⁵I-endothelin and ¹²⁵I-big endothelin-1 in rat tissues: autoradiographic localization and receptor binding. *Histochemistry.* 1991; 95: 621-628.
30. Drexler H, Hirth-Dietrich C, Stasch J-P, Neuser D, Groß R, Kauczor H-U, Just H, Kazda S. Endogenous atrial natriuretic peptide is involved in the natriuresis following sodium loading in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1991; 25: 558-564.

31. Heidemann F, Steinke W, Pleiss U, Theiss G, Voges K-P, Kazda S, Gerzer R, Stasch J-P. Autoradiographic localization of (¹²⁵I)-C-ANP compared to (¹²⁵I)-ANP in rat tissue. *Histochemistry*. 1991; 96: 317-321.
32. Benz G, Henning R, Stasch J-P. 1,3-Dipolare Cycloaddition als Schlüsselreaktion für die Synthese potenter Renininhibitoren. *Angew. Chem.* 1991; 103: 1735-1737.
33. Gerlach M, Ruß H, Winkler J, Witzmann K, Traber J, Stasch J-P, Riederer P, Przuntek H. Effects of nimodipine on the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced depletions in the biogenic amine levels in mice. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1993; 43: 413-415.
34. Hirth-Dietrich C, Stasch J-P, Ganten D, Luft F-C. Renal effects of captopril and nitrendipine in transgenic rats with an extra renin gene. *Hypertension*. 1994; 23: 626-631.
35. Stasch J-P, Hirth-Dietrich C, Frobel K, Wegner M. Prolonged endothelin blockade prevents hypertension and cardiac hypertrophy in SHR-SP. *Amer. J. Hypertens.* 1995; 8: 1128-1134.
36. Stasch J-P, Knorr A, Wegner M, Hirth-Dietrich C. Prolonged inhibition of neutral endopeptidase 24.11 by sinorphan in SHR-SP. *Hypertens. Res.* 1995; 18: 137-143.
37. Wegner M, Stasch J-P, Hirth-Dietrich C, Dressel J, Voges K-P, Kazda S. Interaction of an endopeptidase inhibitor with an ANP-C receptor ligand in anaesthetized dogs. *Clin. Exp. Hypertens.* 1995; 17: 861-876.
38. Wegner M, Hirth-Dietrich C, Knorr A, Dressel J, Ganten D, Stasch J-P. Cardiorenal consequences of dual angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition in transgenic rats with an extra renin gene. *Hypertens. Res.* 1996; 19: 151-159.
39. Wegner M, Hirth-Dietrich C, Stasch J-P. Role of neutral endopeptidase in AV fistular rat model of heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1996; 31: 891-898.
40. Stasch J-P, Hirth-Dietrich C, Ganten D, Wegner M. Renal and antihypertensive effects of neutral endopeptidase inhibition in transgenic rats with an extra renin gene. *Am. J. Hypertens.* 1996; 9: 795-802.
41. Wegner M, Ganten D, Stasch J-P. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the effects of natriuretic peptides in renin transgenic rats. *Hypertens. Res.* 1996; 19: 229-238.
42. Stasch J-P, Knorr A, Hirth-Dietrich C, Krämer T, Hübsch W, Sander E, Frobel K, Kazda S. Long-term blockade of the angiotensin II receptor (AT₁) in renin transgenic rats, salt-loaded Dahl rats, and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1997; 47: 1016-1023.
43. Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch J-P, Kast R, Busse R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 681-689.
44. Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Stasch J-P, Knorr A, Ettlbrück S, Böhm M. Angiotensin receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition improve diastolic dysfunction and Ca²⁺-ATPase expression in the sarcoplasmic reticulum in hypertensive cardiomyopathy. *J. Hypertension*. 1997; 15: 1001-1009.

45. Kojda G, Kottenberg K, Stasch J-P, Schrör K, Noack E. Positive inotropic effect of exogenous and endogenous NO in hypertrophic rat hearts. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122: 813-820.
46. Böhm M, Zolk O, Flesch M, Schiffer F, Schnabel P, Stasch J-P, Knorr A. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac β -adrenergic signal transduction. *Hypertension.* 1998; 31: 747-754.
47. Hoenicka M, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schröder H, Gerzer R, Stasch J-P. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J. Mol. Med.* 1999; 77: 14-23.
48. Becker EM, Wunder F, Kast R, Robyr C, Hoenicka M, Gerzer R, Schröder H, Stasch J-P. Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase overexpressing CHO cell line. *Nitric Oxide.* 1999; 3: 55-66.
49. Warnholtz A, Nickering G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch J-P, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. Evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999; 99: 2027-2033.
50. Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch J-P. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): mediator of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; 35: 390-397.
51. Mülsch A, Oelze M, Klöss S, Mollnau H, Töpfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch J-P, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Münzel T. Effects of *in vivo* nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation.* 2001; 103:2188-2194.
52. Stasch J-P, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feuerer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001; 410:212-215.
53. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schroeder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch J-P. Identification of the NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1. *BMC Pharmacology.* 2001; 1:13.
54. Straub A, Stasch J-P, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feuerer A, Fürstner C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11:781-784.
55. Wassmann S, Laufs U, Stamenkovics D, Linz W, Ahlbory K, Bäumer AT, Stasch J-P, Rösen R, Böhm M, Nickening G. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation.* 2000; 105: 2083-2091.
56. Stasch J-P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feuerer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135:333-343.

57. Stasch J-P, Dembowski K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 344-355.
58. Straub A, Benet-Buchholz J, Fröde R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, Siefert H-M, Stasch J-P. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 1711-1717.
59. Koglin M, Stasch J-P, Behrends S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 295: 1057-1062.
60. Stasch J-P, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 773-783.
61. Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch J-P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces NO-dependent penile erection *in vivo*. *Urology.* 2003; 61: 464-467.
62. Boerrigter G, Costello LC, Cataliotti A, Tsuruda T, Harty G, Lapp H, Stasch J-P, Burnett JC. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation.* 2003; 107: 686-689.
63. Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch J-P. A receptor binding assay for NO- and heme-independent activators of soluble guanylate cyclase. *Anal. Biochem.* 2003; 314: 162-165.

9 Anhang: Der Habilitationsschrift zu Grunde liegende Veröffentlichungen

- 1 Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, **Stasch J-P**, Kast R, Busse R: Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 681-689.
- 2 Hoenicka M, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schröder H, Gerzer R, **Stasch J-P**. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J. Mol. Med.* 1999; 77: 14-23.
- 3 Becker EM, Wunder F, Kast R, Robyr C, Hoenicka M, Gerzer R, Schröder H, **Stasch J-P**. Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase overexpressing CHO cell line. *Nitric Oxide* 1999; 3: 55-66.
- 4 Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, **Stasch J-P**. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; 35: 390-397.
- 5 **Stasch J-P**, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001; 401: 212-215.
- 6 Straub A, **Stasch J-P**, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, Fürstner C. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001; 11: 781-784.
- 7 Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiß U, Schmidt P, Schramm M, Schroeder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, **Stasch J-P**. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacology.* 2001; 1: 13.
- 8 **Stasch J-P**, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 333-343.
- 9 **Stasch J-P**, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 344-355.

- 10 Straub A, Benet-Buchholz J, Fröde R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, Siefert H-M, **Stasch J-P**. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 1711-1717.
- 11 Koglin M, **Stasch J-P**, Behrends S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide sensitive soluble guanylyl cylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 292: 1057-1062.
- 12 **Stasch J-P**, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 773-783.