

**Arzneistoffentwicklung:
Screening-Methoden zur Evaluierung pharmakokinetischer
und pharmakodynamischer Parameter**

**Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
-Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften-
der Universität des Saarlandes**

**von
Christiane Beatrice Anna Scherer
Saarbrücken
2007**

Diese Arbeit entstand unter Anleitung von Prof. Dr. Rolf W. Hartmann in der Fachrichtung der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes (UDS) von Juni 2002 bis Oktober 2006.

Tag des Kolloquiums:

07 Mai 2007

Dekan:

Prof. Dr. Ulrich Müller

Berichtersteller:

Prof. Dr. Rolf W. Hartmann, UDS

Jun.-prof. Dr. Claus Jacob, UDS

Meiner Familie !

Hauptverzeichnis

<u>Gesamtverzeichnis</u>	2
<u>Einleitung</u>	14
<u>Zielsetzung</u>	49
<u>Ergebnisse</u>	50
<u>Diskussion</u>	170
<u>Zusammenfassung</u>	199
<u>Summary</u>	207
<u>Material und Methoden</u>	214
<u>Abkürzungen</u>	264
<u>Literaturverzeichnis</u>	268
<u>Anhang</u>	285

Gesamtverzeichnis

Einleitung

1	Die Arzneistoffentwicklung	14
1.1	Perorale Absorption	16
1.1.1	Eigenschaften des Intestinums	17
1.1.2	Eigenschaften des zellulären Modells Caco-2	18
1.1.2.1	Anwendbarkeit und Limitationen des Caco-2-Modells in der Vorhersage der peroralen Aufnahme potentieller Arzneistoffe	20
2	Die Bedeutung von Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS/MS) in der Arzneistoffentwicklung	
2.1	Entwicklung der Technologie	22
2.2	Instrumenteller Aufbau und Prinzipien von LC/MS/MS	
2.3	Ionenquellen und Ionisierungsmechanismen	23
2.3.1	Elektrosprayionisierung (ESI)	24
2.3.2	Chemische Ionisierung unter atmosphärischem Druck (APCI)	28
2.3.3	Massenspektrometer und Scanmodi	
2.3.3.1	Triple Quadrupol- Instrumente	30
2.4	Anwendung von LC/MS(/MS) in der Arzneistoffentwicklung	32
3	Arzneistofftarget Steroidhormone	33
3.1	Sexualhormone	35
3.1.1	Allgemeine Physiologie und Pathophysiologie	
3.1.2	Arzneistofftarget 5α -Reduktase (5α R)	
3.1.2.1	Charakterisierung der 5α R	
3.1.2.2	Pathophysiologie der 5α R und therapeutische Ansätze	36
	- Benigne Prostatahyperplasie (BPH), Prostatakarzinom (PC)	
	- Therapie androgenabhängiger benignen und malignen Tumore mit 5α R-Inhibitoren	37
3.1.3	Arzneistofftarget 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ1 (17β -HSD1)	

3.1.3.1	Charakterisierung der 17 β -HSD1	38
3.1.3.2	Pathophysiologie der 17 β -HSD1 und therapeutische Ansätze	39
	- Mammakarzinom	
	- Endometriose	40
	- Therapie estrogenabhängiger benigner und maligner Tumore mit 17 β -HSD1-Inhibitoren	
3.2	Gluco- und Mineralocorticoide	
3.2.1	Physiologie und Pathophysiologie	42
3.2.2	Aldosteronsynthese (CYP11B2) und Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1)	44
3.2.2.1	Charakterisierung von CYP11B2 und CYP11B1	
3.2.2.2	Pathophysiologie eines Aldosteronüberschusses und therapeutische Ansätze	46
	- Herzinsuffizienz und Myokardfibrose	
	- Traditionelle therapeutische Ansätze	47
	- Therapie von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose mit CYP11B2-Inhibitoren	48
	<u>Zielsetzung</u>	49
	<u>Ergebnisse</u>	
1	Etablierung und Optimierung des Caco-2 Modells und der LC/MS/MS-Analytik der Proben des Systems	
1.1	Caco-2 Modell	50
1.1.1	Etablierung des Caco-2 Modells	
1.1.1.1	Traditionelles Transportmodell/ Validierung mit Referenzen	51
1.1.1.2	Optimierung des Transportmodells	54
	- Multiple dosing statt single dosing	
	- Erhöhung der Inkubationsdauer von 1h auf 3h	56
	- Reduktion der Kultivierungszeit von 21 Tagen auf 10 Tage	58

1.2	Analyse der biologischen Proben per LC/MS/MS	60
1.2.1	Probenaufarbeitung für LC/MS/MS	
1.2.1.1	Probenaufarbeitung per Festphasenextraktion (SPE)	61
1.2.1.2	Probenaufarbeitung per Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)	
	- Etablierung von LLE-Methoden für verschiedene Verbindungen	
	- Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben	62
	- LLE-Prozedur	63
	- Validierung der LLE-Prozedur	64
	- Kalibrierfunktionen nach LLE aus basolateraler Matrix	65
	- Kalibrierfunktionen nach LLE aus apikaler Matrix	67
1.2.1.3	Probenaufarbeitung per Schaltventilmethode (divert valve)	69
	- Kalibrierfunktionen nach Schaltventilextraktion (DV)	
	aus Puffergemisch (apikal/ basolateral wie 1/1)	70
1.2.2	LC/MS/MS-Analytik	72
	- Chromatogramme	73
	- Massenspektren (Selected Reaction Monitoring- Modus)	74
2	5α-Reduktase-Projekt	
2.1	Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes	76
	- Substanzklassen der besten Inhibitoren	77
2.2	Perorale Verfügbarkeit ausgewählter Säuren	78
2.2.1	Caco-2 Modell	
	- Entwicklung der Probenaufarbeitung für Caco-2-Proben	79
	- Kalibrierfunktionen nach LLE aus basolateraler Matrix	
	- Kalibrierfunktionen nach LLE aus apikaler Matrix	80
	- Kalibrierfunktionen nach Entsalzung per Schaltventil aus Puffergemisch („apikal/basolateral“ wie „1/1“ [v/v])	81
	- Verfügbarkeit im Caco-2 Modell	82
2.2.2	Verfügbarkeit in vivo	83
2.3	Hybridhemmkonzept	84
2.3.1	Perorale Verfügbarkeit ausgewählter Ester im Caco-2 Modell	86
	- Permeabilität im Caco-2 Modell	87

2.3.2	Untersuchung der Ursachen der mangelnden Esterpermeabilität im Caco-2 Modell	89
2.3.2.1	Test auf Efflux durch P-gp	
	- Allgemeine Bedeutung von P-gp in der Absorption von Substanzen	
	- Bedeutung von P-gp in der Absorption der 5 α -Reduktase-Inhibitoren	
	- Fazit	91
2.3.2.2	Test auf Permeabilitätsverbesserung durch Cyclodextrine	
	- Eigenschaften von Cyclodextrinen	92
	- Allgemeine Bedeutung von Cyclodextrinen in der Absorption von Substanzen	93
	- Bedeutung von Cyclodextrinen in der Absorption der 5 α -Reduktase-Inhibitoren	95
	- Herstellung der Caco-2-Inkubationslösungen mit Cyclodextrinen	
	- Validierung der LC/MS-Detektion durch Messung von Kalibrierfunktionen	
	- Caco-2 Tests mit Cyclodextrinen als Absorptionsverbesserer	96
	- Komplexierungsverhalten von β -Me-CD mit 3a	99
	- Fazit	100
2.3.2.3	Test auf Permeabilitätsverbesserung durch Strukturmodifikationen	
	- Suche des die Permeabilität limitierenden Faktors	101
	- Korrelation zwischen Hydrophilie und Permeabilität	
	- Korrelation zwischen Hydrophobizität und Permeabilität	102
	- Strukturmodifikationen zur Absenkung der Lipophilie und Erhöhung der Permeabilität (passiv transzellulär)	103
2.3.3	Aufnahme der Ester in DU145-Zellen als Modell der Prostata (Targetorgan)	
	- Ansatz	105
	- Testung	
	- Fazit	106
2.3.4	Stabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren	108
2.3.4.1	Voraussetzungen	

2.3.4.2	In vitro-Modelle zur Vorhersage der Stabilität	
	- Stabilität im Caco-2-Transportsystem	111
	- Stabilität in Caco-2-Homogenat	
	- Stabilität in humanem Plasma	113
	- Stabilität in humanem BPH-Homogenat	114
	- Stabilität in DU145-Zellen	115
3	17β-HSD1-Projekt	116
3.1	Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes	
3.2	Pharmakophormodell der Inhibitoren	117
3.3	Verfügbarkeit im Caco-2 Modell	118
3.4	Perorale Verfügbarkeit in vivo im Rattenmodell	121
	- Durchführung der in vivo-Tests	
	- Perorale Kinetik	122
	- Überprüfung der metabolischen Stabilität von EZ128B und EZ227 in vitro an Rattenlebermikrosomen	123
3.5	Aufnahme der 17 β -HSD1-Inhibitoren in MCF7-Zellen als Modell eines möglichen Targetorgans (Mammakarzinom)	125
3.5.1	Aufnahmestudien per Fluoreszenzmessung	126
3.5.2	Aufnahmestudien per LC/MS/MS	128
	- Auswahl des Testsets	129
	- Intrazellulärer Gehalt der Inhibitoren in MCF-7-Zellen	
4	CYP11B2-Projekt	131
4.1	Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes	
4.2	Substanzklassen der besten Inhibitoren	132
4.3	Verfügbarkeit im Caco-2 Modell	134
4.3.1	Cassette dosing der CYP11B2-Inhibitoren	
4.3.1.1	Ansatz	134
4.3.1.2	Etablierung des Cassette dosings	136
	- Vorversuch	
	- Erweitertes cassette dosing	137
	- Cassette dosing mit MV45 als Referenz	138

	- Überprüfung der cassette dosing- Ergebnisse niedrig permeabler Inhibitoren per single dosing	142
	- Fazit	
4.3.2	Single dosing von CYP11B2-Inhibitoren	143
	- Verbindungen des Typs der Leitstruktur I	
	- Verbindungen des Typs der Leitstruktur II	144
4.4	Perorale Verfügbarkeit in vivo im Rattenmodell	146
4.4.1	Durchführung der in vivo-Tests	
4.4.2	Perorale Kinetik verschiedener Testsets (1-4)	147
4.4.2.1	Perorale Verfügbarkeit von Testset 1 in vivo	
	- Überprüfung der metabolischen Stabilität von Testset 1 in vitro an hepatischen Mikrosomen	148
4.4.2.2	Perorale Verfügbarkeit von Testset 2 in vivo	150
4.4.2.3	Perorale Verfügbarkeit von Testset 3 in vivo	151
4.4.2.4	Perorale Verfügbarkeit von Testset 4 in vivo	152
	- Fazit	153
4.5	In vitro- Aktivität an den Rattenenzymen CYP11B1 und CYP11B2	154
4.6	In vivo- Aktivität an den Rattenenzymen CYP11B1 und CYP11B2	156
4.6.1	Testprinzip und Durchführung	
	- Kathetermodell	
	- Wahl der Testkonzentrationen	
	- Testdurchführung	157
4.6.2	In vivo- Profil der Hormonspiegel	158
	- Effekt von ACTH auf die Corticoidlevel	
	- Absenkung der Aldosteron- und Corticosteronlevel durch Fadrozol, MV18 und SU20A	159
	- Effekt von Fadrozol (4mg/kg)	
	- Effekt von MV18 (40mg/kg)	160
	- Effekt von SU20A (40mg/kg)	161
	- Übersicht über die Hemmwirkung von Fadrozol, MV18 und SU20A in vivo im katheterisierten Rattenmodell	162
	- Fazit	

5	Vorhersage der peroralen Absorption heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2	164
5.1	PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay)	
5.2	PAMPORE (PAMPA mit Poren)	165
5.3	Caco-2 Modell	
5.4	Vergleich der Permeabilitäten in den verschiedenen Modellen	166□
	- Testset	167
	- Permeabilitäten in vitro	168
	- Fazit	169

Diskussion

	Präklinische Studien zur Arzneistoffentwicklung	170
1	Anwendung des Caco-2 Modells in der Arzneistoffentwicklung	171
1.1	Etablierung des traditionellen Caco-2 Modells	
1.2	Optimierungen des traditionellen Caco-2 Modells	173
1.3	Etablierung und Optimierung der LC/MS/MS- Analytik der biologischen Proben	175
1.3.1	Rationelle Probenaufarbeitung	175
1.3.2	LC/MS/MS- Analytik	177
2	5α-Reduktase-Projekt	179
2.1	Ziel und Ansatz des Projektes	
2.2	In vitro- Modelle zur Evaluierung des Hybridkonzeptes nach peroraler Applikation	180
2.2.1	Gewebespezifische Permeabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren	
2.2.2	Gewebespezifische Stabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren	184
2.3	Fazit des Projektes	186

3	17β-HSD1-Projekt	188
3.1	Ziel und Ansatz des Projektes	188
3.2	In vitro- Modelle zur Evaluierung des Konzeptes nach peroraler Applikation	
3.2.1	Caco-2 Modell	189
3.2.2	Perorale Kinetik in vivo	
3.2.3	Stabilität gegenüber Rattenlebermikrosomen	190
3.2.4	MCF7-Modell	
3.3	Fazit des Projektes	192
4	CYP11B2-Projekt	193
4.1	Ziel und Ansatz des Projektes	
4.2	In vitro- Modelle zur Evaluierung des Konzeptes nach peroraler Applikation	
4.2.1	Caco-2 Modell	194
4.2.2	Perorale Kinetik in vivo	195
4.2.3	Stabilität gegenüber Rattenlebermikrosomen	195
4.2.4	Aktivität der Inhibitoren an den Rattenenzymen	
4.3	Fazit des Projektes	197
5	Vorhersage der peroralen Absorption heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2	198
5.1	Ziel und Ansatz des Projektes	
5.2	Korrelation zwischen PAMPA, PAMPORE und Caco-2	
5.3	Fazit des Projektes	
<u>Zusammenfassung</u>		
1	Etablierung und Optimierung des Caco-2 Modells und der LC/MS/MS-Analytik der Proben des Systems	199
2	5 α -Reduktase-Projekt	200
3	17 β -HSD1-Projekt	202
4	CYP11B2-Projekt	204
5	Vorhersage der peroralen Verfügbarkeit heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2	206

Summary

1	Establishment and Optimisation of the Caco-2 Model and of the Analytical Procedure LC/MS/MS	207
2	5 α -Reductase- Project	208
3	17 β -HSD1-Project	210
4	CYP11B2-Project	212
5	Prediction of Peroral Availability of Heterogeneous Compounds in Vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2	213

Material und Methoden

1	Material	214
1.1	Chemikalien und Reagenzien	214
1.2	Zelllinien und Gewebe	216
1.2.1	Caco-2	
1.2.2	MCF-7	
1.2.3	Nebennierenrinden (NNR) von Ratten	
1.3	Zellkulturmedien, Puffer und Standardlösungen	217
1.3.1	Zellkulturmedien	
1.3.1.1	DMEM (für Caco-2)	
1.3.1.2	RPMI (für MCF-7)	
1.3.2	Puffer	
1.3.2.1	Transportpuffer (für Caco-2)	
	- Apikaler Puffer	
	- Basolateraler Puffer	218
1.3.2.2	PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)	
1.3.2.3	KRBG-Puffer (Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glucose für NNR)	
1.3.3	Standardlösungen	219
1.3.3.1	Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	
1.3.3.2	Lucifer Yellow- Lösungen (lichtinstabil!)	
1.3.3.3	Referenzen für Caco-2-Tests	
	- Stammlösungen	
1.3.3.4	Lösungen für NNR-Test	
	-Stammlösungen	

1.4	Materialien	220
1.4.1	Materialien für Zellkultur	
1.4.2	Materialien für Analytik	
1.4.3	Geräte	221
2	Methoden	223
2.1	Zellkultur	
2.1.1	Herstellung der Kulturmedien	
2.1.2	Kultivierung der Zelllinien	
2.1.2.1	Caco-2	
2.1.2.2	MCF-7	224
2.1.3	Passagieren der Zellen	
2.1.3.1	Caco-2	
2.1.3.2	MCF-7	225
2.1.4	Kryokonservierung der beiden eukaryotischen Zelllinien	
2.1.5	Auftauen der beiden eukaryotischen Zelllinien	226
2.1.6	Zellzahlbestimmung	227
2.1.6.1	Elektronische Zellzahlbestimmung	
2.2	Handling der Rattennebenieren (NNR)	229
2.3	Analytische Messverfahren	230
2.3.1	LC/MS/MS	
2.3.1.1	Optimierung der Massenspektrometrie	
	- Massenkalisierung mit 1,3,6-Polytyrosin im Bereich von 30-1400 Da	
	- Substanzspezifische Optimierung der MS-Geräteparameter	
	- Wahl der zu detektierenden Masse	232
	- Ionisationseffizienz: Matrixeffekte und Ionisierungsadditive	
2.3.1.2	Optimierung der HPLC- Methode	234
	- Anforderungen an die HPLC- Methode	
	- Parameter einer HPLC- Methode	
2.3.1.3	HPLC-MS- Methoden	235
	- Probenaufarbeitungsmethoden	
	- Validierung	

2.3.2	Konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM)	237
2.3.2.1	Messprinzip	
	- Vorteile der Methode gegenüber regulärer Mikroskopie	
	- Anwendung	238
2.3.2.2	CLSM- Messung	
	- Reinigung der Deckgläschen für die Zellkultur	
	- Zelltest und CLSM- Messung	239
2.3.3	Gamma- Counter	240
	- Prinzip und Anwendung	
	- J ¹²⁵ -Messung	
2.4	- Durchführung der biologischen Tests	241
2.4.1	Caco-2-Transporttest als in vitro- Modell der humanen peroralen Absorption/ Bioverfügbarkeit	
	- Einsäen der Transwellplatten für die Transporttests	
	- Wachstumskontrolle per TEER-Messung (Transepithelial Electrical Resistance)	242
	- Durchführung der Caco-2-Permeationstests	243
2.4.1.1	Lucifer Yellow (LY)- Permeationstest zur Integritätskontrolle am Testende	244
2.4.1.2	Berechnung und Bedeutung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten (Papp)	246
2.4.1.3	Probenaufarbeitung der Caco-2-Transporttests zur Analyse per LC/MS/MS	247
2.4.2	Caco-2-Homogenat als Modell für Stabilitätstests bzgl. des intestinalen bzw. hepatischen first pass-Metabolismus nach peroraler Applikation eines Wirkstoffs	248
2.4.2.1	Kultivierung und Homogenisierung der Zellen	
2.4.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	
2.4.2.3	Bestimmung der totalen Esteraseaktivität mit PNPA (Para-Nitrophenylacetat)	250
	- Testprinzip	
	- Testdurchführung	
2.4.2.4	Bestimmung der spezifischen Esteraseaktivität gegenüber Forschungssubstanzen	251

2.4.3	Bestimmung des intrazellulären Gehalts verschiedener Verbindungen in MCF-7-, Caco-2- und DU145-Zellen	252
	- Testprinzip	
	- Testdurchführung	
2.4.4	Pharmakokinetikstudien in vivo nach peroraler Applikation verschiedener Forschungssubstanzen in der Ratte	254
	- Testprinzip	
	- Testdurchführung	254
2.4.4.1	Aufarbeitung der Plasmaproben für die LC/MS-Analyse	
2.4.5	Hemmung von CYP11B2/ CYP11B1 an Nebennierenfragmenten der Ratte in vitro (Biosynthese von Aldosteron/ Corticosteron)	256
	- Testdurchführung und Analyse der Proben	
2.4.6	Hemmung von CYP11B2/ CYP11B1 in vivo am Rattenmodell (Biosynthese von Aldosteron/ Corticosteron)	258
	- Testprinzip	
	- Testdurchführung	
	- Aufarbeitung der Blutproben für die Analyse per Radioimmunoassay (RIA-Test)	259
	- Durchführung der RIA-Tests	259
	<u>Abkürzungen</u>	264
	<u>Literaturverzeichnis</u>	268
	<u>Anhang</u>	285

Einleitung

1 Die Arzneistoffentwicklung

Arzneistoffentwicklung ist der Prozess der Generierung und Evaluierung aller notwendigen Informationen (von Verbindungen und Datenbanken), um die Fähigkeit einer neuen chemischen Verbindung (New Chemical Entity; NCE), ein sicherer und effektiver Arzneistoff zu werden, zu bestimmen [Sinz et al., 2002]. Vor der Synthese müssen aus den geplanten NCEs die entscheidenden Informationen *in silico* gewonnen und kombiniert beurteilt werden (z.B. durch QSAR, MD, MM), um letztendlich die potentielle Eignung einer geplanten Verbindung als Arzneistoff im Menschen abschätzen zu können. Eine weitere Herausforderung besteht darin, den effizientesten und exaktesten Weg der Synthese der für das jeweilige Target geplanten NCEs zu finden (rational drug design, combinatorial chemistry).

Da dieser Prozess von einer NCE zum Arzneistoff sehr langwierig und kostenintensiv ist, müssen bereits auf einer sehr frühen Entwicklungsstufe Verbindungen mit überlegenen pharmakodynamischen (Aktivität) und pharmakokinetischen Eigenschaften ((L)ADME-Tox) selektiert werden. Dazu benötigt man geeignete Screening-Methoden mit einem möglichst hohen Durchsatz, um die Qualität und die Anzahl der Arzneistoffkandidaten auch ökonomisch zu optimieren.

Das Screening nach neuen Verbindungen mit den gewünschten Eigenschaften erfolgt meist sequentiell (selten parallel) nach dem Ausschlussprinzip, wobei generell sukzessive *in silico*-, *in vitro*- und *in vivo*- Untersuchungen durchgeführt werden. Das Pyramidenmodell nach Rossi [Rossi et al., 2002] stellt dabei die Quervernetzung der einzelnen Technologien auf dem Weg zum erfolgreichen drug design dar, wobei deutlich wird, dass keine Technologie wichtiger ist als die andere, sondern dass alle in gleichem Maß voneinander abhängen (s. Abbildung 1 „Pyramide der Arzneistoffentwicklung nach Rossi“). Besitzt eine Verbindung auf einer höheren Entwicklungsstufe der Pyramide ungünstige Eigenschaften, fällt sie zur weiteren, umfassenderen Optimierung auf eine der niedrigeren Stufen zurück oder sie entfällt als möglicher Arzneistoffkandidat, falls ihr Profil nicht weiter verbessert werden kann. Umgekehrt kann keine Verbindung an die Spitze der Pyramide gelangen, ohne alle darunter liegenden Etagen passiert zu haben.

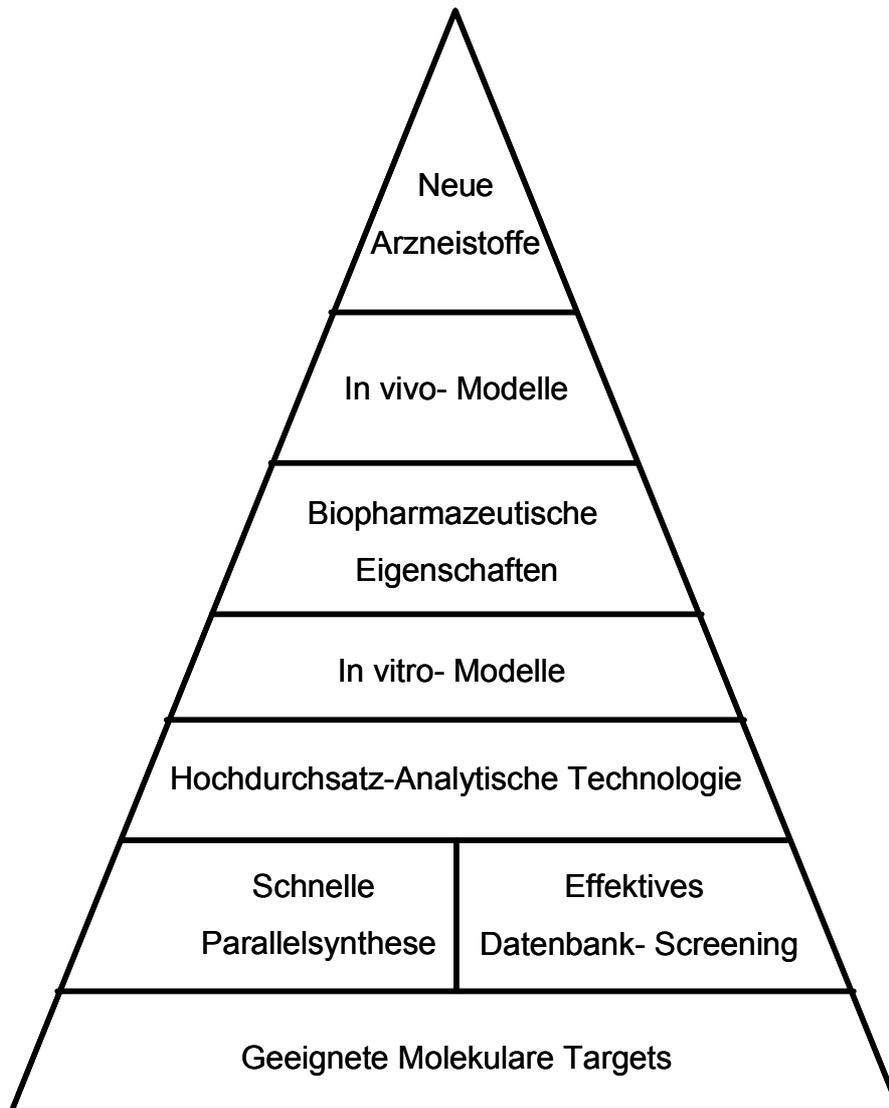


Abbildung 1: Pyramide der Arzneistoffentwicklung

[modifiziert nach Rossi et al., 2002]

Zwei Methoden, die innerhalb dieses Prozesses der Arzneistoffentwicklung aufgrund ihrer hohen Effizienz in der Forschung sehr weite Verbreitung gefunden haben, sind das pharmakokinetische in vitro-Modell der Caco-2-Zellen (colon carcinoma –Zellen) zur Vorhersage der peroralen Absorption von Verbindungen und die analytische Technologie LC/MS (liquid chromatography/ mass spectrometry), d.h. Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit verschiedenen Arten der Massenspektrometrie.

1.1 Perorale Absorption

Perorale Applikation ist die wichtigste und die bevorzugte Art der therapeutischen Verabreichung niedermolekularer Verbindungen. Die orale Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe hängt dabei von zahlreichen Faktoren ab, wie z.B. von ihren physikochemischen Eigenschaften, ihrer Metabolisierbarkeit durch Enzyme des intestinalen Lumens und Epithels sowie der Leber (first pass-Metabolismus), von der Spezifität für aktive Transportsysteme der Absorption und des Effluxes (z.B. P-gp) des intestinalen Epithels, sowie von der Anatomie und der Physiologie des Gastrointestinaltraktes (GI(T)) [Ghan et al., 1997; Csaky et al., 1984; Madara et al., 1987; Jackson et al., 1987; Hillgren et al., 1995; Cordon-Cardo et al., 1990; Siegers et al., 1991].

Da sowohl der Zustand des GIT als auch die Prozesse der Absorption und des Transportes von Molekülen durch diese biologische Schlüsselbarriere sehr komplex sind, ist es allerdings oft nicht möglich, die perorale Verfügbarkeit einer Verbindung allein anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften und molekularen Deskriptoren (wie z.B. Azidität, Löslichkeit, Molekülgröße, Lipophilie, Ionisierungsgrad, Wasserstoffbrückendonor- und akzeptoreigenschaften, Polare Oberfläche (PSA)) *in silico* (theoretische Methoden) vorherzusagen. Stattdessen muss das physiologische Verhalten eines Moleküls generell empirisch (experimentelle Methoden) unter Einsatz von *in vitro*-, und *in vivo*- Modellen überprüft werden [Ghan et al., 1997; Le Ferrec et al., 2001].

Im Hinblick darauf werden zur Präselektion von potentiell peroral gut verfügbaren Verbindungen zunächst *in vitro*-Modelle eingesetzt, da sie die Möglichkeit bieten, Ursachen geringer Absorption und Verfügbarkeit systematisch und unter reduzierter Komplexität weitgehend abzuklären. Ein solches minimalistisches *in vitro*-Modell sind z.B. Caco-2-Zellen, die hauptsächlich dazu verwendet werden, den Beitrag der biologischen Barriere des intestinalen Epithels zur Aufnahme von Molekülen in den Blutkreislauf zu untersuchen [Ghan et al., 1997]. Endgültigen Aufschluss über die perorale Verfügbarkeit von Verbindungen geben allerdings erst die in einem späteren Stadium der Arzneistoffentwicklung einzusetzenden, komplexeren *in vivo*-Modelle.

1.1.1 Eigenschaften des Intestinums

Der Hauptort der Absorption einer Verbindung aus dem GIT ist der Dünndarm (Intestinum) [Artursson et al., 1991]. Ihre Absorption aus dessen Lumen wird dabei hauptsächlich durch die verschiedenen Schichten der Mucosa gesteuert (s. Abbildung 2 „Aufbau der intestinalen Mucosa“), und zwar durch die luminal unmittelbar an die apikalen Zellmembranen angrenzende Mucus/Wasserschicht (mucus/ABL (aqueous boundary layer)), die Epithelzellschicht (columnar absorptive cells) und die Lamina propria, die stark mit Blut- und Lymphgefäßen durchsetzt ist [Artursson et al., 1991]. Hierbei stellen die Mucus/Wasserschicht und die Epithelzellschicht die wichtigsten Barrieren zur Substanzaufnahme dar; die darunter liegenden Gewebe sind alle relativ durchlässig für die meisten Verbindungen [Jackson et al., 1987].

Die Mucus/Wasserschicht selbst hat geringere Auswirkungen auf die Absorption. Kleine hydrophile Moleküle diffundieren generell schnell durch den Mucusfilm, während größere Moleküle langsamer passieren [Wilson et al., 1989]. Stärker limitiert wird die Absorption hingegen durch die Komponenten des epithelialen Zellmonolayers, wie die Zellmembranen (transzelluläre Route), die interzellulären Verbindungen (tight junctions: parazelluläre Route) und die vielfältigen aktiven Transportsysteme (uptake and efflux) für zahlreiche Substanzklassen.

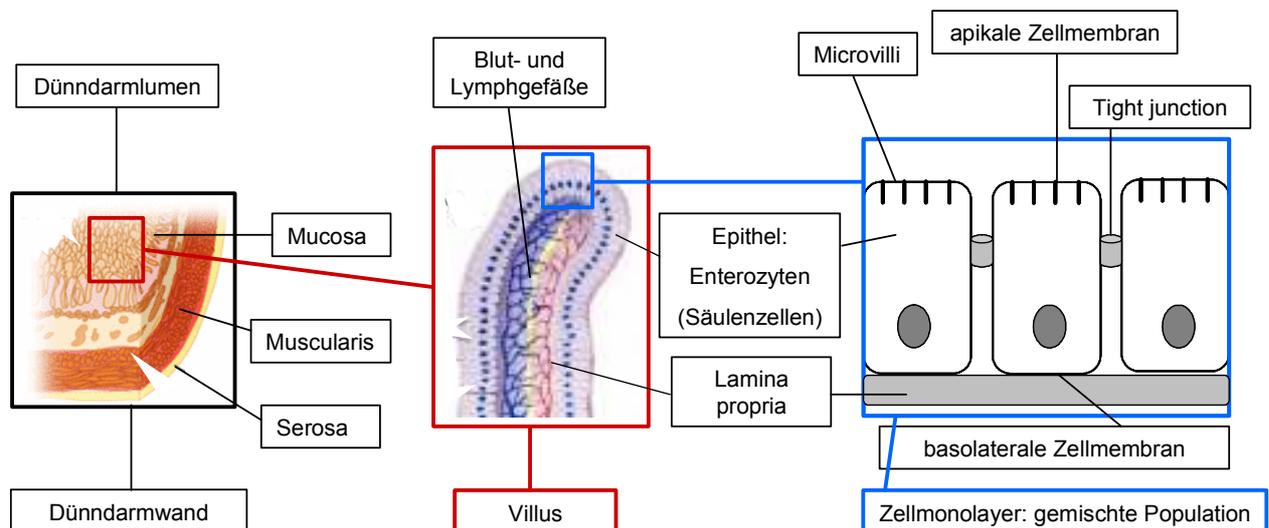


Abbildung 2: Aufbau der intestinalen Mucosa

Wird eine Verbindung passiv durch die Mucosa transportiert, hängt der passive Transportweg stark von den Moleküleigenschaften ab. Generell werden lipophile

Verbindungen, die sich leicht in der Zellmembran verteilen, in hohem Ausmaß transzellulär transportiert [Martin et al., 1981]; hydrophile und geladene Moleküle hingegen können sich schlechter in die Zellmembranen einlagern und wandern konvektiv (solvent drag) oder diffusiv (Konzentrationsgradient) durch die interzellulären, mit wässriger Lösung gefüllten Poren [Friedman et al., 1986]. Da jedoch der Anteil dieser Kanäle an der Gesamtoberfläche der apikalen Membranen nur ca. 0,01% ausmacht, und die Porenradien je nach Darmabschnitt nur 0,3- 0,8nm betragen, können ausschließlich sehr kleine Moleküle passieren, und die Transportrate ist viel geringer als beim transzellulären Weg [Powell et al., 1987; Pappenheimer et al., 1987; Madara et al., 1977]. Diese Route hat jedoch trotzdem wichtige Bedeutung für den Arzneistofftransport (z.B. Atenolol).

Der aktive absorptive Transport erfolgt ebenfalls weniger häufig als die transzelluläre Aufnahme, er kann allerdings auch in hohem Ausmaß erfolgen (z.B. Ketoprofen [Laitinen et al., 2003]). Die Vorhersage einer aktiven Absorption ist aufgrund ihrer Komplexität allerdings schwierig.

Weitere wichtige Barrieren für die perorale Absorption von Substanzen sind die metabolisierenden Enzyme des Intestinums (luminal, intrazellulär und an der Bürstensaummembran (brush border membranes) lokalisiert), sowie die Effluxproteine [Le Ferrec et al., 2001; Chan et al., 2004].

1.1.2 Eigenschaften des zellulären Modells Caco-2

Die Caco-2 Zelllinie entstammt einem humanen kolorektalen Adenokarzinom [<http://www.dsmz.de>]. Ihre Verwendung als Modell der intestinalen Barriere (Mucosa) rührt daher, dass die Zellen unter konventionellen Zellkulturbedingungen spontan wie Enterozyten differenzieren und konfluent auf mikroporösen Membranen (z.B. Polycarbonat, Polyester, Zellulose mit oder ohne Kollagenbeschichtung) in Transwellkammern wachsen (s. Abbildung 3 „Caco-2-Modell und Transportwege“). Hierdurch erlangt das System eine hohe Ähnlichkeit zum Epithel der Mucosa des Dünndarms [Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989; Artursson et al., 1990; Wilson et al., 1990; Hilgers et al., 1990; Artursson et al., 1991; Cogburn et al., 1991].

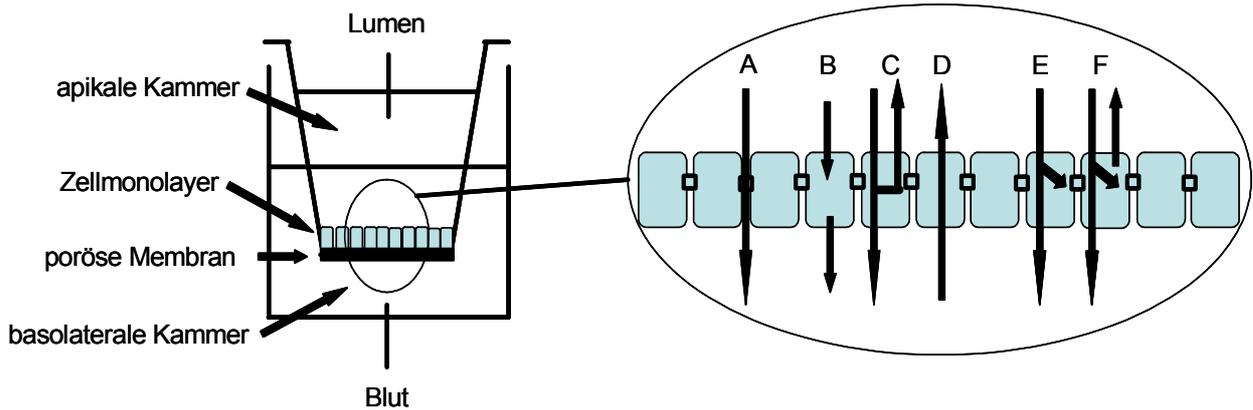


Abbildung 3: Caco-2-Modell und Transportwege

Linker Teil der Abbildung: apikale Kammer repräsentiert das Lumen des GIT; basolaterale Kammer repräsentiert das Kapillar- und Lymphsystem des GIT

Rechter Teil der Abbildung: Transportwege: A: parazellulär- begrenzt durch tight junctions, B: transzellulär: passiv, aktiv oder per Transzytose; C: teilweiser apikaler Efflux ohne vorherige Absorption; D: apikaler Efflux zur intestinalen Clearance von Verbindungen aus dem Blutkreislauf, E: intrazellulärer Metabolismus und Aufnahme der Metaboliten ins Blut; F: intrazellulärer Metabolismus und teilweiser Efflux von Verbindungen und ihrer Metaboliten [Chan et al., 2004; Artursson, 1991]

Das Modell ermöglicht es, die Passage intestinaler zellulärer Barrieren durch verschiedenste Verbindungen zu untersuchen. Ebenso wie in vivo müssen die Zellen passiv transzellulär, passiv parazellulär, durch Transzytose, durch aktiven Transport oder durch gemischte Transportformen überquert werden [Artursson et al., 2001; Chan et al., 2004]. Dazu exprimieren Caco-2-Zellen zahlreiche aktive Transportsysteme des intestinalen Epithels, z.B. für Zucker, Aminosäuren, Dipeptide und Gallensäuren [Blais et al., 1987; Smith et al., 1991; Yoshioka et al., 1991; Hu et al., 1990; Dantzig et al., 1990]. Auch einige metabolisierende Enzyme der „brush border membranes“ und intrazellulär lokalisierte Enzyme wie Aminopeptidasen, Carboxylesterasen, Alkalische Phosphatasen, Sucrasen, Dipeptidylaminopeptidasen und γ -Glutamyltranspeptidasen sind in Caco-2-Zellen vorhanden [Pinto et al., 1983; Teruko et al., 2005; Imai et al., 2005]. Daneben existieren Enzyme sowohl des oxidativen Phase I-Metabolismus, wie CYP1A1 und CYP3A4 [Rosenberg et al., 1993; Boulenc et al., 1992; Sergent-Engelen et al., 1993; Prueksaritanont et al., 1996; Nakamura et al., 2003] als auch des Phase II-Metabolismus, wie Glutathion-S-Transferase, Glucuronidase und Sulfotransferase [Sergent-Engelen et al., 1993; Peters et al., 1989; Baranczyk-Kuzma et al., 1991; Bjorge et al., 1991; Abid et al., 1995].

1.1.2.1 Anwendbarkeit und Limitationen des Caco-2-Modells in der Vorhersage der peroralen Aufnahme potentieller Arzneistoffe

Die Verwendung des Caco-2-Modells bietet zahlreiche Vorteile (Ghan et al., 1997). In erster Linie dient es als schnelles Screening-Werkzeug für Absorptionsstudien, es liefert aber auch Informationen über Metabolisierung und Transport von Wirkstoffen durch die intestinale Mucosa auf zellulärer Ebene. Weiterhin gibt es Aufschluss über die Toxizität von Testverbindungen gegenüber der Mucosa. Im Unterschied zu Tiermodellen entstehen auch nicht durch Interspeziesunterschiede (hinsichtlich der Morphologie und Physiologie der intestinalen Zellen) bedingte, falsche Ergebnisse. Das Modell ersetzt viele Tierversuche, was sowohl ethisch als auch finanziell von großem Vorteil ist.

Die beste Korrelation zwischen Caco-2-Permeabilität und humaner Absorption besteht für gut permeable Verbindungen, die die Zellen zumeist passiv transzellulär überqueren [Artursson, et al., 2001]. Außerdem ist dies auch quantitativ die häufigste Transportroute, weshalb die Zellen trotz ihrer Limitationen generell als in vitro-Modell für die intestinale Aufnahme von Wirkstoffen Verwendung finden [Artursson et al., 1991].

Eine geringere Korrelation zwischen Caco-2-Permeabilität und humaner Absorption besteht für weniger gut permeable Verbindungen, da hier die limitierenden Faktoren für die Verwendung des Caco-2-Modells stärker zum Tragen kommen [Ghan et al., 1997]. Die Durchlässigkeit der interzellulären Verbindungen (tight junctions) in Caco-2 Zellen ist geringer als im menschlichen Darm, wodurch der parazelluläre Transport von Wirkstoffen im Modell niedriger ist als in vivo [Artursson et al., 2001; Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989; Artursson et al., 1990]. Außerdem fehlt die zusammenhängende Mucuschicht des Intestinums, da keine mucinproduzierenden Becherzellen im Caco-2-Monolayer vorhanden sind [Kearney et al., 1987; Niv et al., 1989]; die apikal adhärente Wasserschicht bildet sich allerdings aus, aber ihr hemmender Einfluss auf die Absorption wird durch Bewegung der Caco-2-Monolayer während der Testinkubationen reduziert [Hidalgo et al., 1991; Karlsson, et al., 1991]. Ebenso entfallen die physiologischen Einflüsse wie intestinale Motilität und Verweildauer im Darm auf die Absorption. Weiterhin ist die Gesamtabsorptionsoberfläche pro theoretischem Darmabschnitt in dem „planaren“ Zellmodell viel geringer als in dem stark gefalteten in vivo-System Darm.

Bei der Verwendung der Caco-2-Zellen als metabolisches Modell für den Dünndarm muss zudem beachtet werden, dass zwar die Expression zahlreicher Enzyme in beiden biologischen Systemen qualitativ übereinstimmt, sich jedoch quantitativ erheblich unterscheidet. So werden z.B. die CYP-Enzyme des Phase I-Metabolismus in Caco-2-Zellen in erheblich geringerem Ausmaß gebildet als in vivo [Prueksaritanont et al., 1996; Nakamura et al., 2003]. Auch entspricht das Carboxylesterasemuster der Caco-2-Zellen eher demjenigen der Leber als dem des Intestinums [Imai et al., 2005]. Die tatsächliche perorale Verfügbarkeit einer Verbindung kann also endgültig nur in vivo (im Menschen) festgestellt werden. Zeigt eine Verbindung jedoch bereits niedrige Permeabilität in Caco-2, ist eine hohe perorale Verfügbarkeit unwahrscheinlich.

Wenn man alle diese Limitationen bei der Interpretation der Ergebnisse des Caco-2-Modells berücksichtigt, stellen die Zellen ein exzellentes System zur Vorhersage der peroralen Permeabilität dar; sie sind außerdem eines der besten zur Zeit verfügbaren zellulären Modelle für Transportstudien [Artursson et al., 2001].

2 Die Bedeutung von Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS/MS) in der Arzneistoffentwicklung

2.1 Entwicklung der Technologie

Die Kopplung der „kondensierten Phasen-Domäne“ des LC-Systems mit der „Hochvakuumdomäne“ des MS-Systems war analytischen Wissenschaftlern aufgrund technischer Probleme jahrelang nicht möglich [Korfmacher et al., 2005; Niessen et al., 1999]. Da die ehemals wichtigste Standardtechnik GC/MS (Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie) jedoch nur für die Analytik von ca. 20 Prozent der pharmazeutisch interessanten Verbindungen geeignet ist (unpolare, flüchtige Verbindungen), war die Entwicklung von LC/MS für die Analyse von polaren ionischen Verbindungen ein entscheidender Durchbruch in der Arzneistoffentwicklung [Rossi et al., 2002].

2.2 Instrumenteller Aufbau und Prinzipien von LC/MS/MS

Ein LC/MS-System besteht generell aus einem Steuerungscomputer, einem Autosampler, einem (oder mehreren) HPLC-System(en), einer Ionenquelle (als interface) und einem massenspektrometrischen Teil [Korfmacher et al., 2005] (s. Abbildung 4 „Schematischer Aufbau einer HPLC/MS/MS-Apparatur“).

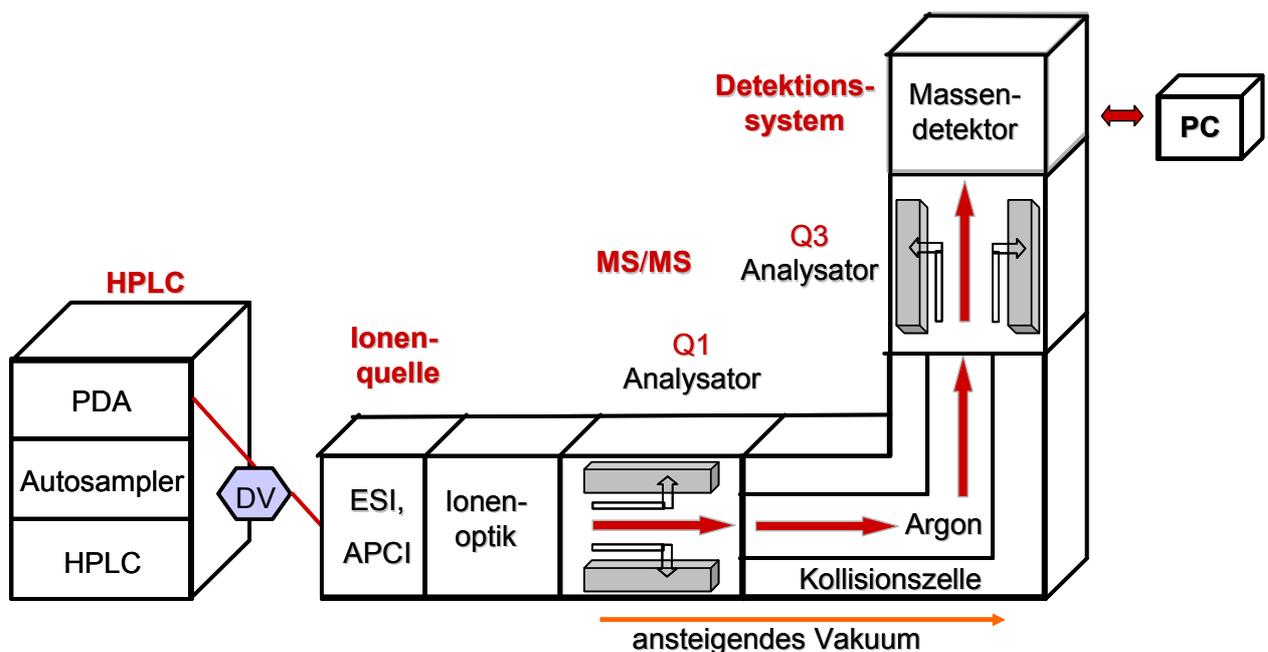


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer HPLC/MS/MS- Apparatur

(PDA: photodiode array-detector, DV: Schaltventil, PC: Steuerungs- und Auswertecomputer)

Damit die Verknüpfung der beiden analytischen Systeme bei der LC/MS-Technologie zu hochqualitativen Ergebnissen führt, müssen zahlreiche HPLC-Parameter- anders als bei der traditionellen UV-Detektion- angepasst werden [Ackermann et al., 2002; Tiller et al., 2003; Murphy et al., 2002; Hsieh et al., 2003]. Die entscheidende Rolle des HPLC-Systems in dieser instrumentellen Kombination besteht in der Aufreinigung und Trennung der flüssigen, meist biologischen Proben und in der Ermöglichung der reproduzierbaren Quantifizierung. Der große Vorteil der Massenspektrometrie besteht in der im Vergleich zur UV-Detektion um Potenzen gesteigerten Sensitivität und in der stark erhöhten Selektivität [Rossi et al., 2002].

2.3 Ionenquellen und Ionisierungsmechanismen

Zur Verknüpfung des HPLC- mit dem MS-System existieren verschiedene Arten von Ionenquellen, die als interface zwischen dem Eluenten der analytischen HPLC-Säule und dem jeweiligen, ebenfalls variablen Massenspektrometertyp dienen. Die beiden häufigsten Arten von Ionenquellen, die aufgrund ihrer breiten Anwendbarkeit bereits zum Standardequipment in der pharmazeutischen Industrie gehören, sind „electrospray ionisation“ (ESI) und „atmospheric pressure chemical ionisation“ (APCI) [Korfmacher et al., 2005]. In beiden erfolgt die Ionisierung unter atmosphärischem Druck (atmospheric pressure ionisation: API), wobei die Ionisierung nichtflüchtiger Verbindungen und die Eliminierung des Solvents viel effektiver sind als unter Vakuum. Ebenfalls zur Ionenbildung nötig sind Hochspannung und Hitze. Die entstandenen desolvatisierten Ionen werden nach Passage der Ionenquelle unter ansteigendem Vakuum in das entsprechende Massenspektrometersystem eingeleitet.

Die ESI wird hauptsächlich zur Analyse polarer Verbindungen bis zu einem Molekulargewicht von bis zu ca. 5000 Dalton verwendet [Rossi et al., 2002]. Dazu gehören z.B. biologische Polymere (Peptide, Proteine, Nucleotide), Pharmazeutika (und ihre Metaboliten), sowie industrielle Polymere (z.B. Polyethylenglykole).

Die APCI wird primär eingesetzt, um unpolare bis mittelpolare Verbindungen eines Molekulargewichtes von bis zu ca. 1000 Dalton zu analysieren [Rossi et al., 2002]).

Beide Verfahren überschneiden sich jedoch für polare bis mittelpolare Moleküle in einem weiten Bereich [Lehmann et al., 1996; Dissertation Becker, 2005] und es ist mit beiden möglich, eine sehr weite Massenskala zu erfassen, da besonders

Makromoleküle mehrfach geladen sind, und im Massenspektrum das Masse-Ladungsverhältnis (m/z) erfasst wird.

2.3.1 Elektrosprayionisierung (ESI)

Die Ionisierung der Analyten läuft in einer ESI-Ionenquelle nach folgendem Schema ab (s. Abbildung 5 „Mechanismus der Elektrosprayionisierung“).

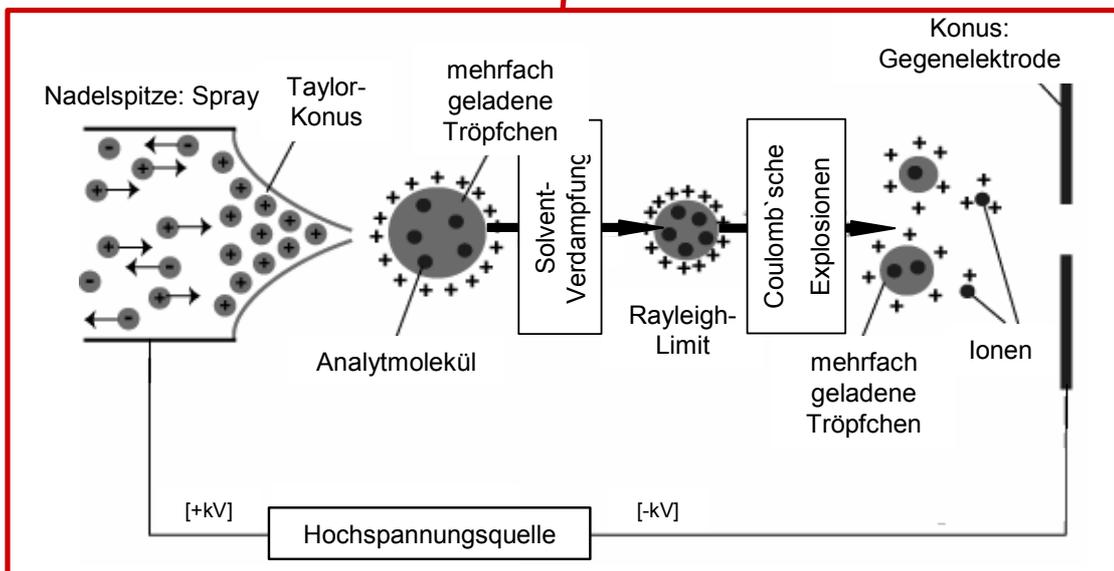
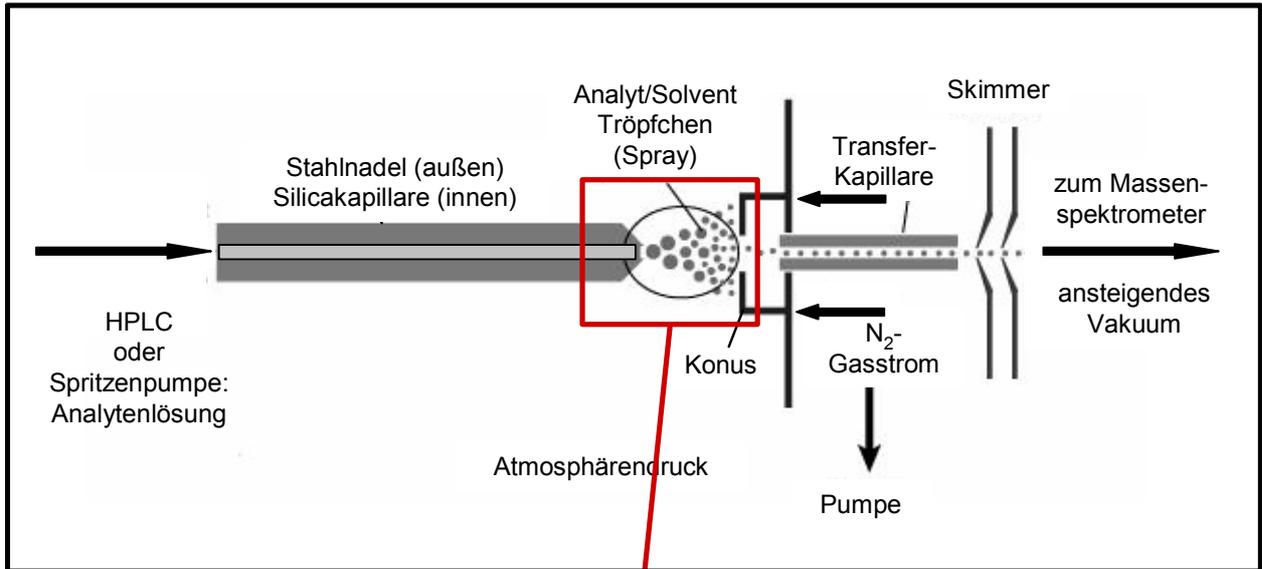


Abbildung 5: Mechanismus der Elektrosprayionisierung (ESI)

[modifiziert nach „<http://www.chm.bris.ac.uk>“]

(kV: Kilovolt)

Ein an einer Düse (Nadel) angelegtes Hochspannungsfeld (3-5kV) führt zur Aufladung des durch Spray(en) vernebelten Effluenten der HPLC-Säule. Dadurch entstehen geladene Tröpfchen (Durchmesser $3\mu\text{M}$), die letztendlich nach verschiedenen Modellvorstellungen Ionen freisetzen.

Die ältere Theorie, das Modell des geladenen Rückstandes (charged residue model (CRM)), stammt von Dole [Dole et al., 1968]. Sie geht davon aus, dass aufgrund der großen Oberflächenladung [Fenn et al., 1993] (Rayleigh'sche Stabilitätsgrenze) der Tröpfchen durch eine Serie von Coulomb-Explosionen immer kleinere, geladene Tröpfchen entstehen, die schließlich jeweils nur noch ein Analytenmolekül enthalten, aus denen dann durch Desolvatisierung freie gasförmige Ionen freigesetzt werden, die einfach oder multiple geladen sein können.

Das neuere Modell zur Ionenbildung stammt von Iribarne und Thomson und wird als Ionenemissionsmodell (ion evaporation model (IEM)) bezeichnet [Iribarne et al., 1976; Thomson et al., 1979; Iribarne et al., 1983]. Hier geht man von einer direkten Ionenemission aus den hochgeladenen Tröpfchen aus, die jeweils eine hohe Anzahl an geladenen Analytenmolekülen enthalten.

Jede der beiden Theorien kann teilweise durch experimentelle Daten bestätigt werden. Außerdem werden in beiden Fällen die entstandenen Ionen entsprechend ihrer Ladung in Richtung des Massenspektrometers fokussiert und innerhalb des MS-Systems aufgrund ihrer Massen und ihrer Ladungen getrennt und detektiert [Lehmann et al., 1996]. Hierbei kann man jeweils den positiven oder negativen Ionenpolaritätsmessmodus verwenden.

Bei ESI wird die optimale Wahl dieses Modus stark durch die Polarität der in der Analysenlösung „vorgeformten“ Ionen beeinflusst: Saure Analyten bilden negative Ionen, Basen positive. Zur Förderung dieser Ionenpräformation in den Lösungen setzt man ihnen flüchtige, gering konzentrierte Ionisierungsadditive wie z.B. Eisessig (1% [v/v]), Ammoniumacetat (10-50mM), Ammoniumformiat (10-50mM), Ammoniumhydroxid (1% [m/v]), Triethylamin (0,1% [v/v]) oder Trifluoressigsäure (0,1% [v/v]) zu. Da die anschließende Ionenbildung in der Gasphase effektiver ist, wenn die Ladung der Analyten in der Lösung mit derjenigen an der Tröpfchenoberfläche übereinstimmt, wird generell eine positiv aufgeladene ESI-Nadel (positiver Modus) zur Messung positiver Ionen verwendet und umgekehrt (negativ für negativ). Die Analytenionen können einfach oder mehrfach geladen sein. Dies hängt von der Struktur des Analyten und der Art des Trägersolvens ab. Das

Lösemittel limitiert außerdem die Sensitivität. Generell wird der ESI-Prozess beeinflusst durch die Größe und die Oberflächenladung der Tröpfchen, die Oberflächenspannung, die Flüchtigkeit des Solvens und die Solvatisierungsstärke der Ionen.

Günstige Bedingungen für den Elektrosprayprozess sind kleine Tröpfchen mit niedriger Oberflächenspannung, hohe Flüchtigkeit, schwache Ionensolvatisierung, hohe Oberflächenladung und niedrige Leitfähigkeit. Organische Lösemittel wie Acetonitril, Methanol und Isopropanol sind besser geeignet als Wasser. Als Lösemittelzusätze zur Optimierung des pH-Wertes werden ausschließlich schwache, flüchtige Säuren und Basen eingesetzt; starke und nicht flüchtige Säuren und Basen sollten als Zusätze möglichst vermieden werden. Die Salzkonzentration sollte nicht zu hoch sein ($< 100\text{mM}$) und es sollten möglichst keine nichtflüchtigen Bestandteile der Analysenlösungen in die Ionenquelle gelangen, da diese sich irreversibel im massenspektrometrischen Teil niederschlagen (Quadrupole), was zur Beeinträchtigung der Sensitivität und Selektivität der Messungen führt.

Generell wird ESI nach Möglichkeit im positiven Modus eingesetzt, da hier die Verneblung in der Ionenquelle stabiler ist als im negativen Modus. Bei einer negativ aufgeladenen Kapillarspitze kommt es nämlich leichter zu Entladungen und Hochspannungsüberschlägen. Diese würden zu instabilen Ionenströmen führen, d.h. die Reaktionen der Analytenmoleküle in der Gasphase würden sich nicht reproduzierbar verändern und wären nicht mehr konstant, d.h. nicht verwendbar für Identifizierungen und Quantifizierungen [Lehmann et al., 1996]. Um dies zu vermeiden, sollte daher im Negativ-Ionen-Betrieb die angelegte Potentialdifferenz je nach Lösungsmittel (im Vergleich zum Positiv-Ionen-Betrieb) um 30-50% herabgesetzt werden.

Die häufigsten im positiven Modus gebildeten Ionen sind Addukte mit Protonen $[\text{M}+\text{H}]^+$, mit Ammoniumionen $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, mit Natrium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oder Kalium $[\text{M}+\text{K}]^+$ und Eisen $[\text{M}+\text{Fe}]^{2+}$ (s. Tabelle 1 „Beispiel der Ionenbildung bei ESI“). Es können aber auch dimere Moleküle und Molekülfragmente (z.B. Verlust von Wasser, CO_2) entstehen, oder Ionen können mehrfach angelagert werden wie z.B. bei $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$. Entsprechend werden im negativen Modus z.B. Protonen abgespalten $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$; die Bildung einfach oder mehrfach (z.B. Peptide) geladener Moleküle ist auch hier möglich.

Positiver Ionisationsmodus	$M + H^+ \rightarrow (M+H^+)^+$
Negativer Ionisationsmodus	$MH \rightarrow (M - H^+)^- + H^+$

Tabelle 1: Beispiel der Ionenbildung bei ESI

M: Analyt; H: Wasserstoff

2.3.2 Chemische Ionisierung unter atmosphärischem Druck (APCI)

Die APCI ist eine chemische Ionisation unter Atmosphärendruck. Die Ionen werden hier folgendermaßen produziert (s. Abbildung 6 „Chemische Ionisierung bei atmosphärischem Druck“).

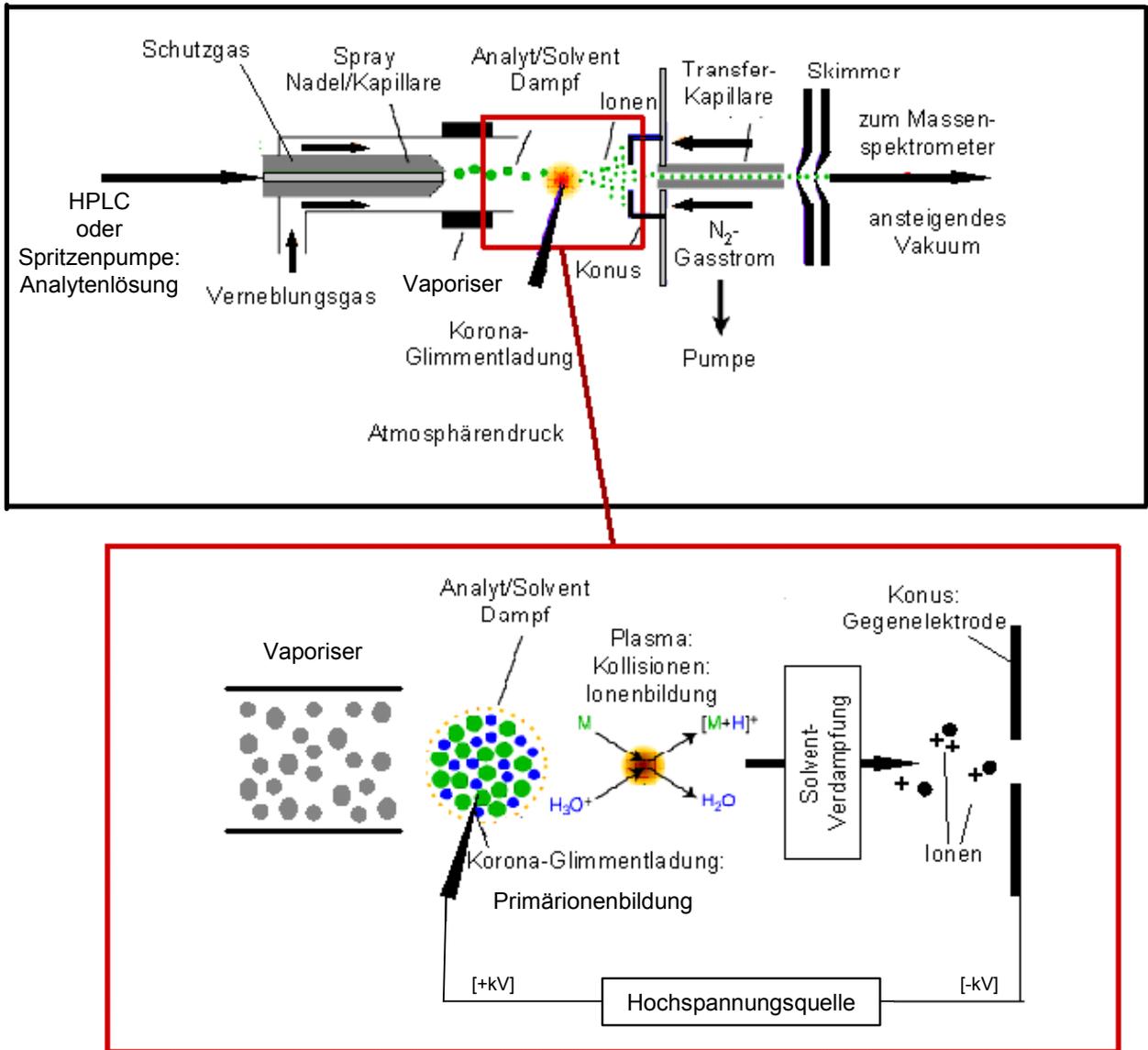


Abbildung 6: Chemische Ionisierung bei atmosphärischem Druck (APCI)

[modifiziert nach „<http://www.chm.bris.ac.uk>“]

(kV: Kilovolt)

Anhand einer Düse wird die Analytenlösung zu einem feinen Nebel versprüht, dessen Tröpfchen dann in einer Hochtemperaturröhre verdampft werden (Vaporiser, Heizblock). Am Ausgang dieser Röhre ist eine Platinnadel (Korona) angebracht, an

der durch Anlegen von Hochspannungen Glimmentladungen erzeugt werden. Diese produzieren aus Lösungsmitteln und Schutzgas (hier Stickstoff) reaktive Ionen, die dann wiederum durch eine Serie chemischer Reaktionen die Analytenmoleküle ionisieren [Niessen et al., 2003; Hsieh et al., 2003]. Die Ionenbildung erfolgt hier also ausschließlich in der Gas- bzw. Plasmaphase. Daher spielen die Aziditäten von Analyten und Solventien in der Gasphase- nicht in der flüssigen Phase- eine entscheidende Rolle beim APCI-Prozess.

APCI kann ebenso wie ESI im negativen oder positiven Polaritätsmodus verwendet werden. Im positiven Messmodus, erfolgt die Ionisierung der Probe durch eine Serie chemischer Reaktionen, die mit einer elektroneninitiierten Kationenbildung startet. Diese Kationen führen dann sukzessive zur Entstehung weiterer Ionen (z.B. Addukte mit Protonen $[M+H]^+$) (s. Tabelle 2 „Beispiel der Ionenbildung bei APCI mit Stickstoffgas (N_2) im positiven Ionisationsmodus“).

Primäre Ionenbildung	$e^- + N_2 \rightarrow N_2^{+\cdot} + 2e^-$
Sekundäre Ionenbildung	$N_2^{+\cdot} + H_2O \rightarrow N_2 + H_2O^{+\cdot}$
	$H_2O^{+\cdot} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + HO\cdot$
Protonentransfer	$H_3O^+ + M \rightarrow (M+H)^+ + H_2O$

**Tabelle 2: Beispiel der Ionenbildung bei APCI mit Stickstoffgas (N_2)
im positiven Ionisationsmodus**

M: Analyt; H: Wasserstoff; e^- : Elektron; N: Stickstoff; O: Sauerstoff

Im negativen Messmodus hingegen erfolgt die Ionisierung der Analyten nach einer elektroneninitiierten Anionenbildung typischerweise durch Abstraktion eines Protons, dabei entsteht z.B. $[M-H]^-$. Es können aber auch Cluster mit negativen Reaktandgasen gebildet werden, wobei z.B. $[M+NH_2]^-$ oder $[M+Cl]^-$ entstehen [Lehmann et al., 1996]. Generell wird jedoch auch bei APCI der positive Modus bevorzugt, da das Verfahren einen stärkeren Ionenstrom produziert, v.a. für Moleküle mit basischen Strukturkomponenten wie z.B. Stickstoffen. Nur für saure Verbindungen, wie z.B. Carbonsäuren und Alkohole ist der negative Modus besser geeignet, da er ein geringeres Hintergrundrauschen besitzt und daher oft selektiver ist. Die Ionisierungstechnik ist außerdem im Vergleich zu ESI sehr robust gegenüber Art und Stärke der verwendeten Puffer (geringerer Einfluss von Salzen).

2.3.3 Massenspektrometer und Scanmodi

Es existieren vielfältige Typen von Massenspektrometern, deren Leistungsspektrum jeweils einem bestimmten analytischen Interesse angepasst ist. Die häufigsten „Basistypen“ sind single Quadrupole-, time-of-flight- (TOF), triple Quadrupole-, und ion trap- Massenspektrometer. Sie dienen der einfachen Identifizierung der Masse, der exakten Massenbestimmung durch hochaufgelöste Massenspektren, der selektiven Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen und ihrer Metaboliten, sowie der Strukturaufklärung [Ackermann et al., 2002; Korfmacher et al., 2005; Cox et al., 2001; Cox et al., 2005]. Daneben existieren auch Hybridsysteme der Basistypen, die die analytischen Möglichkeiten noch erweitern [Cox et al., 2001; Cox et al., 2005].

2.3.3.1 Triple Quadrupol- Instrumente

Für ADME-PK-Screenings findet von den Hybridsystemen die triple quadrupole-Technik die breiteste Anwendung. Hierbei können sowohl single mass spectrometer scan modes (Q1MS, Q3MS) als auch MS/MS-scan modes (product, parent, neutral loss) verwendet werden. Dabei wird die Art des Scanmodus dadurch bestimmt, welche Spannung an die seriell geschalteten Quadrupole angelegt wird. Die Ionentrennung erfolgt in einem Hochfrequenzfeld.

Ein Quadrupol-Analysator besteht aus einer Anordnung vier paralleler Metallstäbe hyperbolischen Profils. Zur Massenanalyse (Scanmodus) werden eine Gleichspannungsrampe und eine Wechselspannung an die Stäbe angelegt. Gegenüber liegende Stäbe zeigen die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung; nebeneinander liegende Stäbe zeigen die entgegengesetzte Polarität der Gleichspannung und eine um 180 Grad versetzte Phase der Wechselspannung.

Beim Scannen werden Gleichspannung und Amplitude des Wechselfeldes (im Radiofrequenzbereich) erhöht, ihr Verhältnis zueinander wird jedoch konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen beschreiben die Ionen beim Durchqueren der Stabanordnung Oszillationen. Bei einem bestimmten Potential- und Frequenzzustand werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z - Wert (Masse/Ladung- Verhältnis) auf einer stabilen Flugbahn durch das Stabsystem gehalten; alle anderen werden aussortiert [Lehmann et al., 1996].

Scan Modus	Quadrupol 1 (Q1): hyperbolisches Profil	Quadrupol 2 (Q2): quadratisches Profil ¹	Quadrupol 3 (Q3): hyperbolisches Profil
Q1MS	Scan ²	unselektive Transmission	unselektive Transmission
Q3MS	unselektive Transmission	unselektive Transmission	Scan
Product	selektive Transmission	Fragmentierung der Ionen aus Q1, Transmission aller Fragmente	Scan
Parent	Scan	Fragmentierung der Ionen aus Q1, Transmission aller Fragmente	selektive Transmission
Neutral Loss	Scan	Fragmentierung der Ionen aus Q1, Transmission aller Fragmente	Scan

Tabelle 3: Funktionen der Quadrupole eines triple Quadrupol- Instruments bei verschiedenen Scanmodi

¹: Kollisionszelle: Kollision mit Argongas führt zur Ionenfragmentierung

²: Durchlass aller oder selektierter Ionen, die in der Ionenquelle bzw. einem der Quadrupole entstanden sind

Mit Hilfe dieser Scanmodi können verschiedene Scantypen durchgeführt werden. Die wichtigsten sind: „full scan“, selected ion monitoring (SIM) und selected reaction monitoring (SRM). Beim full scan wird das komplette Massenspektrum eines Analyten aufgenommen. Er dient z.B. zur Massenbestimmung, zu Identitätsnachweisen und zu Strukturaufklärungen. Bei SIM werden nur eins bzw. mehrere ausgewählte Ionen detektiert, weshalb der Modus sehr sensitiv und selektiv ist und zur Spurenanalyse bzw. zur schnellen Identifizierung eines Targetmoleküls in Gemischen dient. Seine Selektivität ist allerdings geringer als die von SRM, da dieser letztere Modus spezifische Reaktionen von parent ions zu product ions darstellt. SRM dient jedoch ebenso wie SIM der Spurenanalyse aus komplexen Mischungen

und der Identifizierung von Targetanalyten. Die Sensitivität von SRM ist jedoch schlechter als diejenige von SIM, da eine Fragmentierung nie zu 100% erfolgt, womit die detektierte Endionenanzahl bei SRM geringer ist.

2.4 Anwendung von LC/MS(/MS) in der Arzneistoffentwicklung

Seit es gelungen ist, API mit LC/MS/MS zu koppeln, nutzen v.a. pharmazeutische Wissenschaftler die hohe Selektivität, die qualitativen und quantitativen Informationen, die hohe Sensitivität und breite Einsetzbarkeit der Technologie in fast allen pharmazeutisch interessanten Bereichen [Rossi et al., 2002]. Ihre häufigste Anwendung findet sie in metabolischen und kinetischen (DMPK-) Studien [Korfmacher et al., 2005; Caldwell et al., 2000; Eddershaw et al., 2000; Roberts et al., 2001]. Hierbei werden die biologischen Proben zahlreicher in vitro- ADME-screenings und präklinischer in vivo- ADME-PK-screenings analysiert [Korfmacher et al., 2005]. So kann LC/MS z.B. zur high throughput (HTS)-Messung von Caco-2- oder Blutplasma- Proben verwendet werden, da die Technologie die Möglichkeit bietet, zahlreiche Analyten und ihre Metaboliten innerhalb derselben Probe simultan zu detektieren und zu quantifizieren, was eine enorme Zeitersparnis im Vergleich zu anderen analytischen Verfahren bedeutet [Rossi et al., 2002].

3 Arzneistofftarget Steroidhormone

Es gibt drei Hauptklassen von Steroidhormonen- die Sexualhormone, die Mineralo- und die Glucocorticoide. Ihre Biosynthese erfolgt aus Cholesterol und findet v.a. in den Testes und Ovarien bzw. in den Nebennieren statt; sie werden jedoch auch in peripheren Geweben wie Fettgewebe, Gehirn [Gangloff et al., 2001; Bulun et al., 2001], Blutgefäßen und Herz produziert [Hatakeyama et al., 1994; Gomez-Sanchez et al., 1997b; Delacraye et al., 2000; Satoh et al., 2002] (s. Abbildung „Biosynthese der Steroidhormone“). Die Freisetzung der Steroidhormone wird durch physiologische Regelkreise zwischen Hypophyse, Hypothalamus und Erfolgsorgan gesteuert.

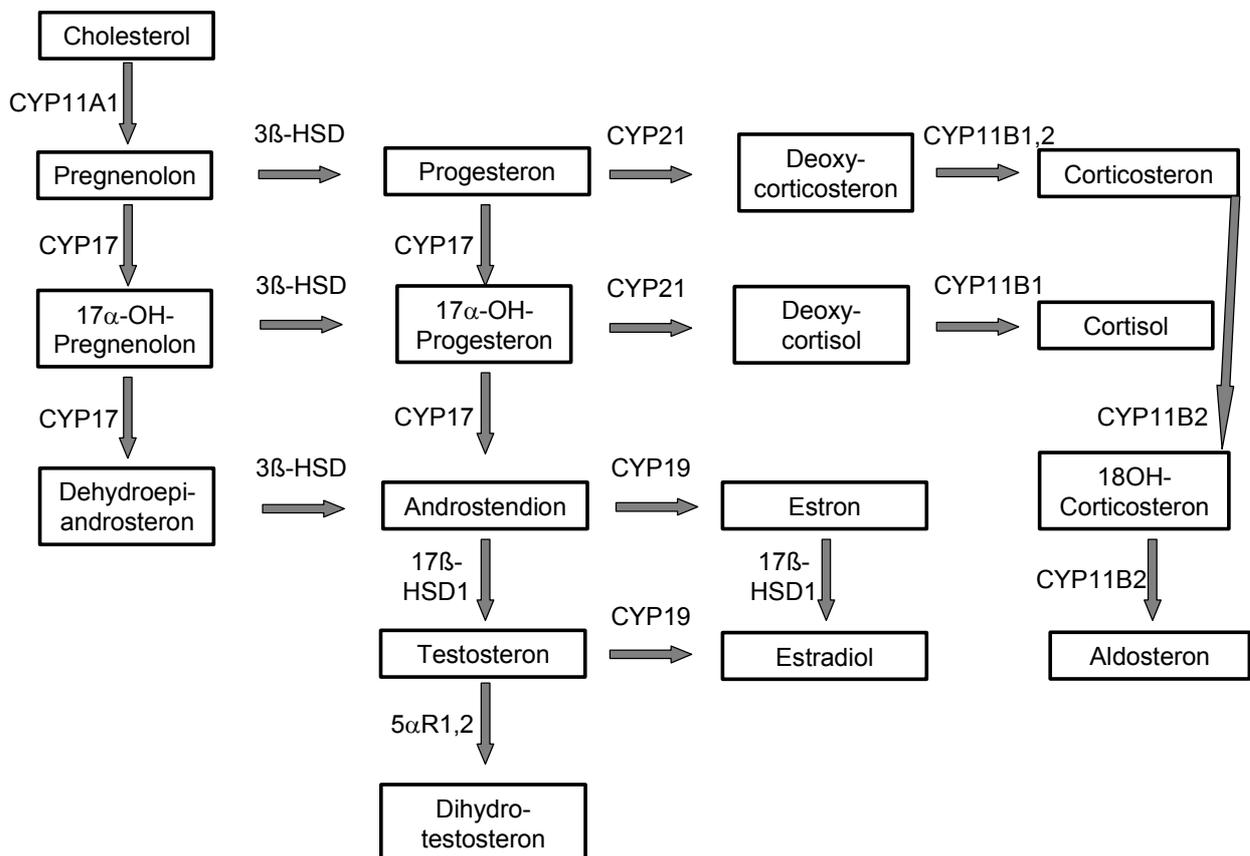


Abbildung 7: Biosynthese der Steroidhormone

CYP11A1: Desmolase; CYP17: 17 α -Hydroxylase-C_{17,20}-Lyase; 3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase; 17 β -HSD1: 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ1; 5 α R1,2: 5 α -Reduktase Typ1,2; CYP21: Steroid-21-Hydroxylase; CYP19: Aromatase; CYP11B1: Steroid-11 β -Hydroxylase; CYP11B2: Aldosteronsynthase

Neben ihren essentiellen physiologischen Funktionen kommt den Steroidhormonen auch eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie bestimmter Erkrankungen zu. Daher versucht man, zur Therapie dieser Erkrankungen die durch die Hormone ausgeübten Effekte zu reduzieren, indem man die Entfaltung ihrer intrinsischen Aktivität am Wirkort verhindert. Ein Ansatz hierbei ist die Blockade eines Rezeptors gegenüber einem physiologischen Botenstoff, ein anderer Ansatz ist die gezielte Hemmung der Produktion des Botenstoffs, d.h. die therapeutischen Targets sind hierbei die für die jeweilige Biosynthese verantwortlichen Enzyme.

Die Hemmung der Biosynthese besitzt gegenüber der Rezeptorblockade entscheidende Vorteile, die auf der Absenkung der Plasmaspiegel der Hormone beruhen. Die Dosis des Biosyntheseinhibitors müsste im Unterschied zu einem kompetitiven Rezeptorantagonisten nicht so häufig angepasst werden, da es nicht zu einer längerfristigen Akkumulation des Hormons bzw. einer „down-regulation“ der Biosynthese des physiologischen Effektors oder einer „up-regulation“ der Rezeptorexpression kommen würde. Somit gäbe es auch keine Nebenwirkungen aufgrund unphysiologisch erhöhter Hormonspiegel bzw. erhöhter therapeutischer Dosen des Rezeptorantagonisten, die sich z.B. in einer Verschlechterung des Krankheitsbildes bzw. in Toxizität widerspiegeln würden.

Essentiell bei beiden Ansätzen- sowohl der Rezeptorblockade als auch der Biosynthesehemmung- ist die Selektivität, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Im Idealfall würde ausschließlich das Target gehemmt werden- beim letzteren Ansatz also das Enzym, das für den letzten Schritt in der Biosynthesekette des jeweiligen Hormons verantwortlich ist. Dieses Prinzip wurde sowohl bei den therapeutischen Targets 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase, 5 α -Reduktase und Aldosteronsynthase verfolgt, auf die noch im folgenden näher eingegangen werden wird.

Die gänzliche Vermeidung unerwünschter Wirkungen ist bisher allerdings in keinem der bekannten Ansätze zu erreichen, da es für viele Rezeptoren mehrere Effektoren (Agonisten, Antagonisten) gibt und umgekehrt derselbe Effektor an verschiedenen Rezeptoren mit unterschiedlicher Aktivität angreifen kann. Außerdem treten die Stoffwechselwege auch in gesunden Zellen auf.

3.1 Sexualhormone

3.1.1 Allgemeine Physiologie und Pathophysiologie

Androgene (männliche Steroidhormone) und Estrogene (weibliche Steroidhormone) bewirken die Ausbildung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale. Ebenso haben sie entscheidende Funktionen bei den geschlechtsspezifischen Körperfunktionen und Verhaltensweisen. Ihre Wirkung entfalten sie durch Bindung eines intrazellulär gebildeten Hormon-Rezeptor-Komplexes an einen DNA-Abschnitt d.h. über Translationsmodulation [Beato et al., 2000].

Pathophysiologisch sind Androgene und Estrogene am Voranschreiten hormonabhängiger Erkrankungen wie z.B. Benigner Prostatahyperplasie (BPH) [Carson et al., 2003] und Prostatakarzinom (PC) [Huggins et al., 2002], bzw. Endometriose [Bulun et al., 2001] und Mammakarzinom [Gunnarsson et al., 2001] beteiligt, was ihre Rolle in verschiedenen therapeutischen Ansätzen erklärt.

3.1.2 Arzneistofftarget 5α -Reduktase ($5\alpha R$)

3.1.2.1 Charakterisierung der $5\alpha R$

Die 5α -Reduktase ($5\alpha R$) existiert im Menschen in zwei Isoformen, der $5\alpha R1$ und der $5\alpha R2$ [Andersson et al., 1990; Andersson et al., 1991; Jenkins et al. 1992; Labrie et al., 1992]. Es handelt sich um nukleär bzw. mikrosomal membranständige Proteine [Span et al. 1996], die sehr hydrophob sind und den Kofaktor NADPH benötigen. Die beiden Enzyme unterscheiden sich im Wesentlichen in Aminosäuresequenz (Homologie 54,1%), Aminosäureanzahl (259 bzw. 254), Gen und pH-Optimum [Dissertation Panter, 2004]. Ihre physiologische Funktion besteht generell in der irreversiblen Reduktion von 4-en-3-Oxosteroiden zu 5α -3-Oxoverbindungen, also auch in der Umwandlung von Testosteron (T) in das potenteste humane Androgen Dihydrotestosteron (DHT). Das Isoenzym Typ1 existiert v.a. in der Peripherie wie Leber und Haut (Genitalhaut, Kopfhaut); das Isoenzym Typ 2 kommt hauptsächlich zentral in der Prostata (und in den Nebenhoden) vor [Thigpen et al., 1993]. Die Enzyme existieren aber auch in anderen Geweben wie Niere, Muskelzellen, Haarfollikeln, zerebralem Kortex, Auge und Plazenta [Thigpen et al., 1993; Shirakawa et al., 2004; Lehlé et al., 1999; Aumüller et al., 1996; Habib et al., 1998; Bayne et al., 1999; Rocha et al. 2000].

3.1.2.2 **Pathophysiologie der 5 α R und therapeutische Ansätze**

Aufgrund unphysiologisch gesteigerter 5 α R-Aktivität entstehende, hohe DHT-Spiegel verursachen und fördern androgenabhängige Erkrankungen wie Benigne Prostatahyperplasie, Prostatakarzinom, Akne, Hirsutismus und androgenetische Alopezie [Bartsch et al., 2002].

➤ **Benigne Prostatahyperplasie (BPH), Prostatakarzinom (PC)**

Unter BPH (auch Prostataadenom oder Prostatahypertrophie) versteht man eine gutartige Wucherung des Prostatagewebes. Der häufigste gutartige Tumor hat eine Inzidenz von 50% bei Männern über 50 Jahren [Geller et al, 1995; McConnell et al., 1992]. Symptome sind schmerzhaftes, gehäuftes aber erschwertes Wasserlassen. Durch die allmähliche Obstruktion der Harnröhre kann es bis zu einem tödlichen renalen Rückstau kommen. Die traditionelle Therapie besteht im fortgeschrittenen Stadium in einem chirurgischen Eingriff (z.B. transurethrale Resektion). Ein neueres Verfahren ist die endoskopische Laser-Vaporisation der Prostata. Die traditionelle medikamentöse Therapie besteht v.a. aus GnRH-Agonisten, Androgenrezeptorantagonisten, α_1 -Rezeptorantagonisten, und steroidalen 5 α R-Inhibitoren [Keetch et al., 1995; McConnell et al., 1998].

PC ist außerdem die häufigste Krebserkrankung bei Männern [Robert Koch Institut, 2004]. Es handelt sich um eine bösartige Wucherung des Prostatagewebes, die ebenfalls androgenabhängig ist. Die Ursache ihrer Entstehung ist weitestgehend unklar, diskutiert werden jedoch die Faktoren Alter und genetische Prädisposition [Reichard et al., 1999]. Unspezifische Symptome wie Blasenentleerungsstörungen, Knochenschmerzen, Gewichtsverlust und Blutarmut treten erst im fortgeschrittenen Stadium auf. Meist erfolgt eine starke Metastasierung in die Lymphknoten, Knochen und die Lunge, wodurch eine hohe Mortalitätsrate auftritt (innerhalb von 5 Jahren ca. 20-70% je nach Streuungsgrad). Deshalb ist die Früherkennung durch PSA-Sceenings (Prostata Specific Antigen) sehr wichtig [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2006].

Die Therapie von PC im fortgeschrittenen Stadium besteht stets in einer radikalen Prostatektomie, sowie Radiotherapie. Eine Absenkung der Androgenspiegel durch Orchiektomie [Huggins et al., 1941] und 5 α -Reduktaseinhibitoren [Eisenberger et al., 2004] ist ebenfalls Erfolg versprechend, wobei letztere Methode viel schonender ist.

Andere ebenfalls mit 5 α -Reduktaseinhibitoren therapierbare, androgenabhängige Erkrankungen sind Akne, Hirsutismus und androgenetische Alopezie, auf die in diesem Rahmen aber nicht näher eingegangen werden soll [Dissertation Panter, 2004].

➤ **Therapie androgenabhängiger benigner und maligner Tumore mit 5 α R-Inhibitoren**

Eine Möglichkeit zur Therapie androgenabhängiger Erkrankungen besteht in der Absenkung der DHT-Spiegel, da hierdurch ein hemmender Einfluss auf die Entwicklung und die Progression der Krankheitsbilder ausgeübt wird, die durch erhöhte Konzentrationen des Androgens forciert werden [Bartsch et al., 2002]. Wenn die DHT-Spiegel abgesenkt werden, geht also die androgenabhängige Wucherung benignen (BPH) und malignen (PC) Gewebes zurück.

Die zu diesem Zweck häufigsten, klinisch verwendeten steroidalen 5 α R-Inhibitoren sind Finasterid, das selektiv das Typ 2-Isoenzym der 5 α R hemmt [McConnell et al., 1992] und Dutasterid, das die Isoenzyme Typ 1 und 2 hemmt (duale Hemmung), wodurch es noch effektiver die DHT-Spiegel absenkt (>90%) [Bramson et al., 1997]. Zusätzlich ist zeitweise dennoch ein chirurgischer Eingriff, eine Chemotherapie oder eine Radiotherapie nötig.

Im Arbeitskreis wurden zur Therapie der androgenabhängigen Erkrankungen innovative, nichtsteroidale Inhibitoren entwickelt [Picard et al., 2000; Picard et al., 2002; Dissertation Picard, 2002], um die steroidalen Nebenwirkungen der klinisch eingesetzten Verbindungen zu verhindern [Sawada et al., 1999].

Außerdem wurde das völlig neue Konzept der Hybridhemmung aufgestellt [Streiber et al., 2005], wobei nur eine Verbindung dem Patienten appliziert werden soll, die in der Peripherie selektiv gegen den hier vermehrt auftretenden Typ1 der 5 α R wirken soll. Nach selektivem Metabolismus zu einer anderen Verbindung- idealerweise hauptsächlich im Targetorgan selbst- soll dieser zweite Wirkstoff dann in der Prostata den hier dominierenden Typ2 des Isoenzym hemmen.

Im Hinblick auf dieses Konzept wurden die selektive Aktivität und gewebespezifische Stabilität verschiedener Ester und ihrer korrespondierenden, durch Esterasen freigesetzten Carbonsäuren, in vitro bereits nachgewiesen [Streiber et al., 2005].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden ob das Hybridkonzept auch nach peroraler Applikation realisierbar ist.

3.1.3 Arzneistofftarget 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ1 (17 β -HSD1)

3.1.3.1 Charakterisierung der 17 β -HSD1

Die humane 17 β -HSD1 (oder Plazentaestradioldehydrogenase) wurde 1956 zum ersten Mal beschrieben [Langer et al., 1956] und gehört zur Familie der Short Chain Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR-Familie) [Gangloff et al., 2001; Jornvall et al., 1995]. Zu dieser Enzymfamilie gehören außerdem die Isoenzyme 2 bis 4 und 6 bis 8 der 17 β -HSD [Jornvall et al., 1995; Peltoketo et al., 1999], sowie die 3 β -HSD/ Ketosteroidisomerase (KSR) und die 11 β -HSD [Penning et al., 1997].

Alle Isoenzyme besitzen essentielle Funktionen in der Steroidbiosynthese (s. Abbildung 8 „Funktionen der Isoformen von 17 β -HSD in der Steroidbiosynthese“ [Diplomarbeit Erika Ziegler, 2005]).

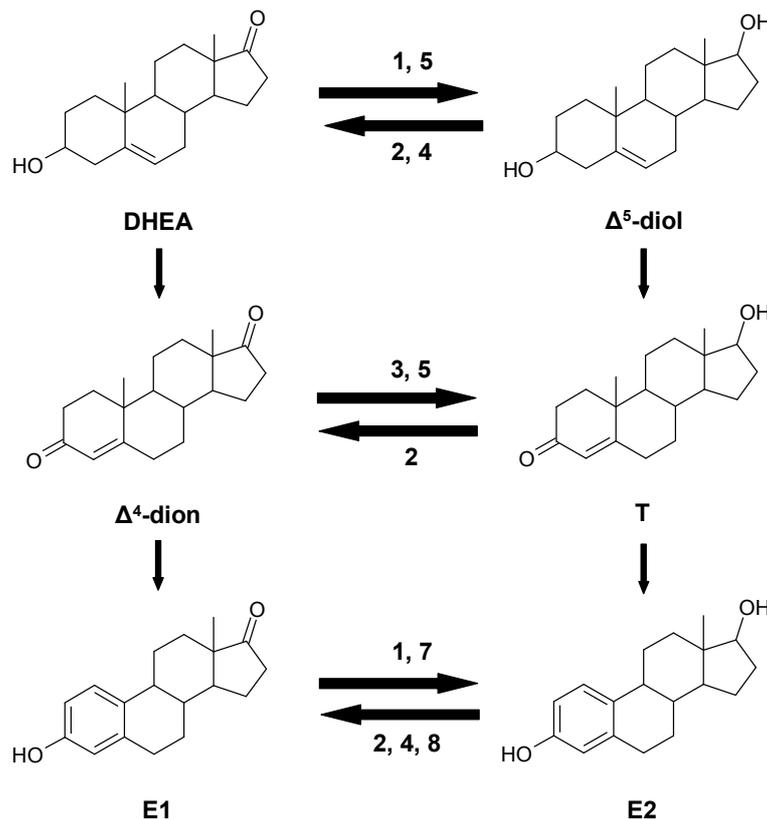


Abbildung 8: Funktionen der Isoformen von 17 β -HSD in der Steroidbiosynthese

17 β -HSD-Isoformen: gekennzeichnet durch Zahlen; DHEA: Dehydroepiandrosteron; Δ^5 -diol: 5-Androsten-3 β , 17 β -diol; Δ^4 -dion: 4-Androsten-3,17-dion; T: Testosteron; E1: Estron; E2: Estradiol

Die Hauptfunktion der 17 β -HSD1 besteht in der Umwandlung von Estron in das viel potentere Estrogen Estradiol, in geringem Ausmaß katalysiert es allerdings auch die

Bildung von 5-Androsten-3 β ,17 β -diol aus Dehydroepiandrosteron [Poirier et al., 2003]. 17 β -HSD2 katalysiert hauptsächlich die Rückreaktionen der 17 β -HSD1, aber auch die Rückbildung von 4-Androsten-3,17-dion aus Testosteron

Die Expression der Isoenzyme der 17 β -HSD erfolgt v.a. in Plazenta, Leber, Ovarien, Endometrium, Prostata und peripheren Geweben wie Brustkrebszellen und Fettgewebe [Penning et al., 1997].

Es liegen Röntgenstrukturen des nackten 17 β -HSD1-Enzyms und der Kokristallisate mit dem Substrat (Estron) bzw. dem (Kofaktor) NADPH vor. Das lösliche zytosolische Nichtmetallenzym besteht aus 327 Aminosäuren.

3.1.3.2 Pathophysiologie der 17 β -HSD1 und therapeutische Ansätze

Da die Aktivität (Expression) der 17 β -HSD1 in malignem Brust- und Endometriumgewebe (Mammakarzinom, Endometriumkarzinom) sowie in Endometriosegewebe deutlich gesteigert ist, kommt es dort zu erhöhten intrazellulären Estradiolkonzentrationen [Miyoshi et al., 2001]. Dies führt wiederum zur Stimulation der Proliferation des Tumorgewebes, wodurch die mögliche Rolle von 17 β -HSD1 als Targetenzym zur Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen deutlich wird.

Da die 17 β -HSD1 in geringem Ausmaß auch an der Androgenbiosynthese beteiligt ist, käme sie auch als potentiell Target für androgenabhängige Erkrankungen in Frage, worauf in diesem Rahmen jedoch nicht eingegangen werden soll.

➤ Mammakarzinom

Die am weitesten verbreitete estrogenabhängige Erkrankung (ca. 25%) ist der Brustkrebs [Gangloff et al., 2001]. Dabei handelt es sich um einen von den (Epithel-) Zellen der Drüsenläppchen oder Milchgänge ausgehenden bösartigen Tumor, der über das Lymphsystem auch leicht in Lunge, Leber, Knochen und Haut metastasiert. Von den Tumoren sind etwa 70% Hormonrezeptor-positiv, d.h. ihr Wachstum wird durch Estrogene stimuliert. Bei Frauen zwischen dem 30. und dem 60. Lebensjahr ist Brustkrebs die häufigste Todesursache in der westlichen Welt, jährlich sterben ca. 19.000 Frauen an Brustkrebs und es gibt ca. 0,11% Neuerkrankungen [Robert-Koch-Institut, 2006]. Deshalb ist die Früherkennung durch Mammographie- Screenings und eventuelle Biopsien sehr wichtig. Traditionelle Therapien sind weiträumige

chirurgische Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Außerdem werden Estrogenrezeptorantagonisten (z.B. Tamoxifen) oder Aromatasehemmer (z.B. Arimidex) eingesetzt.

➤ **Endometriose**

Unter Endometriose versteht man eine gutartige Wucherung der Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) außerhalb der Gebärmutter (Uterushöhle) mit einer Inzidenz von ca. 10% aller Frauen. Das Gewebe kann sich auf den unteren Bauch- und Beckenraum ausbreiten und befällt auch die Eierstöcke, die Scheidenwand und den Darm [WHO]. Es verändert sich hormonabhängig mit dem Menstruationszyklus. Die wichtigsten Symptome sind Schmerzen und Infertilität. Eine sichere Diagnose ist nur durch eine Laparoskopie möglich; es existiert noch keine effektive Therapie außer der operativen Entfernung.

➤ **Therapie estrogenabhängiger benigner und maligner Tumore mit 17 β -HSD1-Inhibitoren**

Mit Hilfe geeigneter Inhibitoren des Enzyms 17 β -HSD1 könnten die Plasmaspiegel von Estradiol abgesenkt werden, wodurch im Optimalfall die Regression des estradiolabhängig gewucherten, malignen oder benignen Gewebes erfolgen würde. Die Rückreaktion von Estradiol zu Estron durch 17 β -HSD2 sollte nicht gehemmt werden, damit bereits im erkrankten Gewebe vorhandenes Estradiol (über Bildung oder Aufnahme) auch weiterhin abgebaut werden könnte (zusätzlich zur Hemmung seiner Neusynthese). Der Beweis des innovativen therapeutischen Ansatzes in vivo steht noch aus, da sich die im Arbeitskreis völlig neu entwickelten, nichtsteroidalen Inhibitoren in der präklinischen Optimierungsphase befinden. Außerdem existieren noch keine klinisch verwendeten 17 β -HSD1-Inhibitoren.

Der entscheidende Vorteil der neuen Inhibitoren gegenüber traditionell bei estrogenabhängigen Erkrankungen eingesetzten Aromatase- (CYP19) Hemmstoffen und Estrogenrezeptorantagonisten, wäre ihr geringeres Nebenwirkungspotential. Dieses kommt dadurch zustande, dass 17 β -HSD1-Inhibitoren hauptsächlich im Targetgewebe wirken würden, da dort eine Überexpression von 17 β -HSD1 erfolgt. Außerdem sind die 17 β -HSD1-Inhibitoren selektiver als CYP19-Hemmstoffe, weil sie ausschließlich in den letzten Schritt der Estrogenbiosynthese eingreifen. Somit wäre die neue Hemmstoffklasse nicht nur post-, sondern sogar auch prämenopausal

einsetzbar. Auch im Vergleich zu bereits klinisch eingesetzten steroidal-
Estrogenrezeptorantagonisten wäre mit viel geringeren steroidal-
Nebenwirkungen zu rechnen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten präklinische Studien zur Pharmakokinetik der neuen
Inhibitor-klasse durchgeführt werden.

3.2 Gluco- und Mineralocorticoide

3.2.1 Physiologie und Pathophysiologie

Glucocorticoide und Mineralocorticoide gehören neben den Androgenen zu den Hormonen der Nebennierenrinde. Die Glucocorticoide werden überwiegend in der Zona fasciculata gebildet, die Mineralocorticoide stammen v.a. aus der Zona glomerulosa und die Androgene aus der Zona reticularis. Alle Stoffe mit glucocorticoider oder mineralocorticoider Wirkung sind Derivate des Pregnans und besitzen 21 Kohlenstoffatome (s. Abbildung 9 „Biosynthese der Gluco- und Mineralocorticoide“) [Forth et al., 1996].

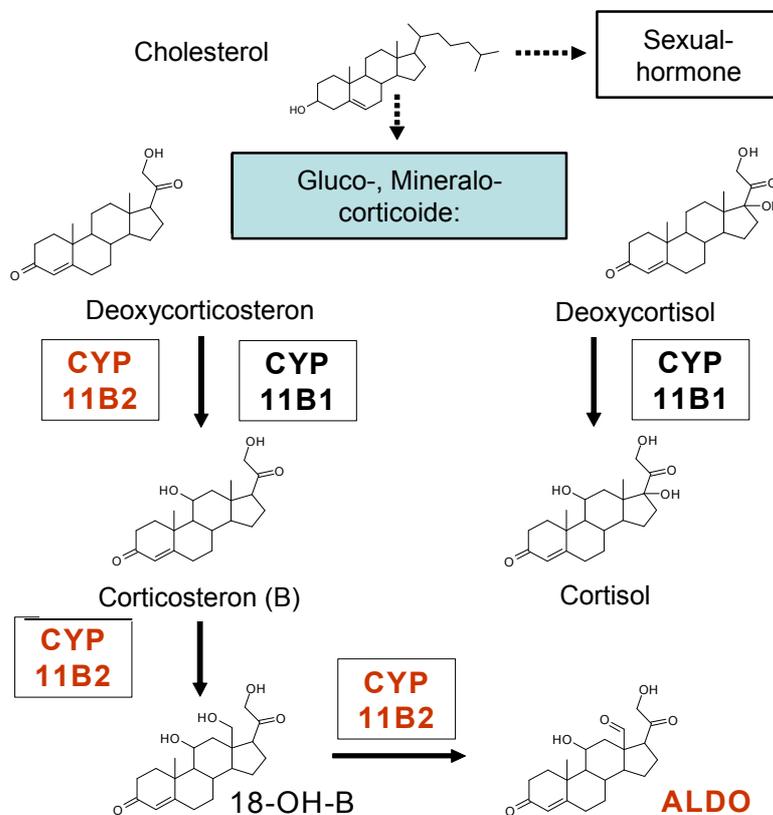


Abbildung 9: Biosynthese der Gluco- und Mineralocorticoide

18-OH-B: 18-Hydroxycorticosteron; ALDO: Aldosteron;

CYP11B1: Steroid-11 β -Hydroxylase; CYP11B2: Aldosteronsynthase

Glucocorticoide regulieren den Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen; so fördern sie die Gluconeogenese, wirken katabol und lipolytisch. Außerdem werden sie bei Stress vermehrt ausgeschüttet und besitzen antiphlogistische, immunsuppressive und hypokalzämische Eigenschaften. Ihre

Synthese und Sekretion wird durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert, dessen Freisetzung wiederum einem hypothalamisch-hypophysären Regelkreis unterliegt. Hohe Glucocorticoidkonzentrationen führen durch eine zentrale negative Rückkopplung zu einer verringerten Ausschüttung von ACTH. Bei Störungen dieses Regelkreises kommt es zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z.B. Morbus Addison (Mangel an Glucocorticoiden) oder Morbus Cushing (Überschuss an Glucocorticoiden). Die physiologisch wichtigsten humanen Glucocorticoide sind Cortisol, Corticosteron und Cortison. Ihre Freisetzung unterliegt einem circadianen Rhythmus [Forth et al., 1996].

Die wichtigsten humanen Mineralocorticoide sind Aldosteron (ALDO) und 11-Deoxycorticosteron (DOC); letzterem kommt jedoch nur eine geringe Bedeutung zu, da es viel geringer konzentriert vorliegt und viel weniger mineralocorticoid wirksam ist als Aldosteron. Ihre Freisetzung wird durch drei Mechanismen reguliert, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die Konzentrationen von Natrium/Kalium und die Konzentration von ACTH. Bei renaler Minderperfusion wird über den Sympathikus das RAAS aktiviert und es kommt zu einer verstärkten Aldosteronausschüttung und Natriumrückresorption, wodurch das effektive zirkulierende Volumen und somit auch der Blutdruck ansteigen. Ebenso stimulieren Hyperkalämie, Hyponaträmie und ACTH-Ausschüttung die Aldosteronsekretion in den Blutkreislauf.

Aldosteron erhöht die Expression von Natriumkanälen in der luminalen Zellmembran sowie diejenige von Na^+ - K^+ -ATPase-Einheiten in der basolateralen Zellmembran des distalen Nephrons, des Dickdarmepithels, sowie der Schweiß- und Speicheldrüsen. Dadurch werden die Na^+ - und Wasserresorption aus dem Blut, und die K^+ -, Mg^{2+} - bzw. H^+ - Sekretion ins Blut gefördert.

Folglich kommt es bei pathologischem Hyperaldosteronismus, der z.B. durch nephrotisches Syndrom, Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose ausgelöst wird, zu Hyponaträmie, Hypokalämie, Ödemen, Hypertonie und metabolischer Alkalose [Forth et al., 1996].

3.2.2 Aldosteronsynthese (CYP11B2) und Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1)

3.2.2.1 Charakterisierung von CYP11B2 und CYP11B1

CYP11B2 (Aldosteronsynthese) und CYP11B1 (Steroid-11 β -Hydroxylase) sind die Schlüsselenzyme der Corticoidbiosynthese. Sie gehören zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450) [Omura, et al., 1964a und 1964b). Alle Vertreter dieser Enzymfamilie enthalten als prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum ein b-Typ Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) mit einem sechsfach koordinierten Eisenion (Fe^{3+}), wobei das jeweilige Substrat nur an einer der Koordinationsstellen angreift. Die restlichen Interaktionen finden mit Stickstoffen des Porphyringerüsts und einem Cystein an der Thiolatgruppe statt. Wie die meisten CYP-Enzyme sind sie Monooxygenasen, d.h. sie übertragen ein Sauerstoffatom auf ihr Substrat (Ausnahme: Thromboxan A2-Synthetase: Isomerase [Wang et al., 2002]) (s. Abbildung 10 „Reaktionszyklus der Monooxygenasen“).

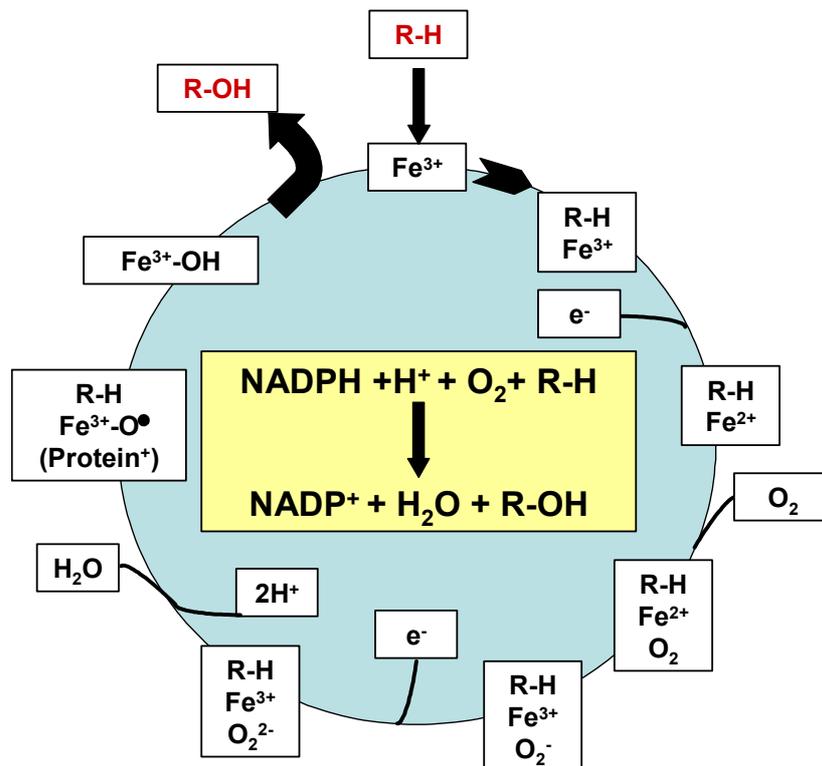


Abbildung 10: Reaktionszyklus der Monooxygenasen

gelbes Feld: Bruttoreaktionsgleichung; R-H: Substrat; R-OH: hydroxyliertes Substrat; e^- :Elektronen; Übertragung der e^- aus Elektronenpool (NADH, Adrenodoxinreduktase [FAD] und Adrenodoxin [2Fe-2S] [Lambeth et al., 1982]) auf das Häm-Eisen des CYP-Enzyms [modifiziert nach Forth et al., 1996]

Die an der Mineralo- und Glucocorticoidbiosynthese beteiligten Enzyme CYP11B2 und CYP11B1 gehören der Klasse I der CYP-Enzyme an und sind daher an die innere Mitochondrienmembran gebunden [Kawamoto et al., 2002; Graham-Lorence et al., 1996]. Ihre Aktivität hängt von der Interaktion mit zwei löslichen Komponenten ab, die die benötigten Elektronen liefern- einer flavinhaltigen, NADPH- (oder NADH-) abhängigen Ferredoxin-Reduktase und einem Eisen-Schwefel-Protein (Adrenodoxin). Beide humanen Enzyme besitzen sowohl eine hohe funktionelle Ähnlichkeit als auch eine über 93%-ige Homologie der Aminosäuresequenzen [Taymans et al., 1998].

Das Hauptsubstrat von CYP11B2 ist Deoxycorticosteron (DOC), aus dem durch 11 β -Hydroxylierung Corticosteron (B) gebildet wird, das dann durch 18-Hydroxylierung zu 18-Hydroxycorticosteron (18-OHB) reagiert. Letzteres wird schließlich durch eine weitere Hydroxylierung und Wasserabspaltung zu Aldosteron (ALDO) umgesetzt [Mornet et al., 1989]. Außerdem besitzt CYP11B2 eine geringe 11 β -Hydroxylase-Aktivität gegenüber Deoxycortisol (RSS) [Denner et al., 1995a; Fisher et al., 2001].

Im Gegensatz dazu besitzt CYP11B1 zwei „gleichwertige“ Substrate- DOC und Deoxycortisol- kann diese aber ausschließlich in 11 β -Position hydroxylieren, sodass „B“ bzw. Cortisol entstehen [Mornet et al., 1989, Kawamoto et al., 1992].

Die Biosyntheseprodukte Aldosteron und Cortisol greifen am Mineralocorticoidrezeptor (MR) an, bei dem es sich um einen intrazellulär, epithelial lokalisierten Transkriptionsfaktor handelt. Nach Bindung eines Steroids an den Rezeptor kommt es zur Translokation des Komplexes in den Nucleus, wo er nach Bindung an die DNA die Transkription moduliert. Die genomische Wirkung erfolgt somit zeitverzögert, es gibt jedoch auch eine schnelle nicht-genomische Wirkung, die vermutlich auf Membranrezeptoren zurückzuführen ist [Lösel et al., 2004].

Um eine spezifische Aldosteronwirkung zu ermöglichen, muss mit dem MR ein weiteres Enzym koexprimiert werden, das die Cortisolwirkung verhindert, da der Rezeptor eine ähnlich hohe Affinität zu Gluco- und Mineralocorticoiden aufweist und außerdem Cortisol physiologisch im 100- bis 1000-fachen Überschuss zu Aldosteron vorliegt. Es handelt sich um die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ2 (11 β -HSD2), eine Short-Chain-Dehydrogenase, die Cortisol zu dem am MR inaktiven Cortison oxidiert (Funder et al., 1998; Funder et al., 2004; Mazocchi et al., 1998).

CYP11B2 wird überwiegend in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde exprimiert, sie entsteht jedoch auch in nicht-epithelialen Geweben

wie Herz, Gefäßwänden und Hippocampus [Hatakeyama et al., 1994; Gomez-Sanchez et al., 1997b; Delacayre et al., 2000; Satoh et al. 2002]. Im Unterschied hierzu wird CYP11B1 hauptsächlich in den Zellen der Zona fasciculata der Nebennierenrinde exprimiert.

3.2.2.2 Pathophysiologie eines Aldosteronüberschusses und therapeutische Ansätze

Hohe Aldosteronspiegel über pathophysiologische Regelkreise sind besonders mit Herzinsuffizienz und Myokardfibrose assoziiert [Brilla et al., 2000a und 2000b].

➤ Herzinsuffizienz und Myokardfibrose

Unter Herzinsuffizienz versteht man eine verringerte Pumpleistung des morphologisch veränderten Herzens, wodurch die Blutversorgung des Organismus beeinträchtigt wird. Es kommt z.B. zur renalen Minderperfusion, im schlimmsten Fall zum Herz- und Kreislaufversagen. Leider wird zudem das Fortschreiten der Erkrankung durch körpereigene Regulationsmechanismen (wie z.B. das RAAS-systemisch und lokal [Thai et al., 1989; Varo et al., 1999]), die physiologisch die Pumpleistung des Herzens verstärken sollen, pathophysiologisch noch gefördert. Unter physiologischen Bedingungen würden diese Regelkreise eine kurzfristig auftretende, verringerte Herzleistung kompensieren; bei chronischer Herzinsuffizienz, d.h. dauerhaft verringertem Auswurfvolumen, bewirken sie jedoch das Gegenteil. Durch eine pathophysiologische Aktivierung des RAAS über eine renale Minderperfusion kommt es zur verstärkten Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebenniere, das die Natrium- und Wasserrückresorption aus dem Harn fördert. Da die Herzleistung jedoch chronisch geschädigt ist, führt dieses erhöhte Blutvolumen nicht zu einer besseren Durchblutung, sondern es kommt zu einem kumulativen venösen Rückstau, wodurch das Herz immer stärker belastet wird. Es besteht also ein Circulus vitiosus (s. Abbildung „Circulus Vitiosus bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose“) [Brilla et al., 2000a und 2000b].

Unter Myokardfibrose versteht man eine fibrotische Strukturveränderung des Myokards, die sich in einer Abnahme der Elastizität und Verhärtung des Herzmuskels äußert [Lijnen et al., 2000; Funder et al., 2004]. Durch Aldosteron werden das Wachstum kardialer Fibroblasten und die Kollagenneusynthese stimuliert, wodurch das Krankheitsbild einer vorliegenden Myokardfibrose

voranschreitet [Young et al., 1998; Delcayre et al., 2000; Zannad et al., 2000; Lijnen et al., 2000]. Es kommt auch zu einer Kollagenanreicherung im Interstitium.

Beide Effekte forcieren eine Funktionsverschlechterung des Herzens (s. Abbildung 11 „Circulus Vitiosus bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose“).

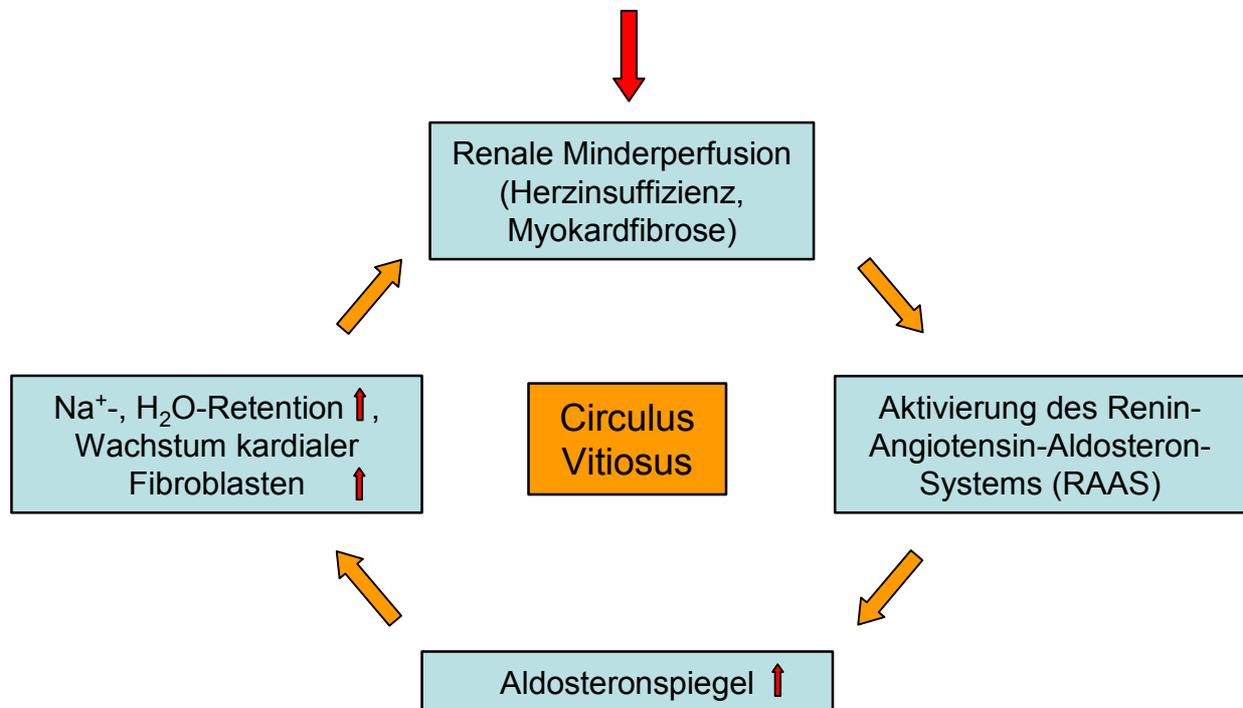


Abbildung 11: Circulus Vitiosus bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose

➤ Traditionelle therapeutische Ansätze

Zur Basistherapie dieser Erkrankungen, die mit einer hohen Mortalitätsrate (>10%) verbunden sind, werden Digitalis-Glycoside, Diuretika, ACE-Hemmer und ATII₁-Rezeptorantagonisten eingesetzt. Da diese Medikamente jedoch keinerlei Einfluss auf die Aldosteronspiegel haben, kommt es mit der Zeit zu einem pathophysiologischen Aldosteron-Escape [Pitt et al., 1995] und der „Circulus Vitiosus“ der pathophysiologischen Aldosteronwirkung verstärkt sich weiter.

Ein neuerer Ansatz zur Therapie von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose ist die zusätzliche Gabe von Mineralocorticoidrezeptor (MR)- Antagonisten wie Spironolacton (Aldactone®) und Eplerenon (Inspra®), deren Nutzen in den klinischen Studien RALES (Randomised Aldactone Elevation Study) und EPHEsus (Eplerenone`s Heart Failure Efficacy and Survival Study) untersucht wurde.

In RALES wurde herausgefunden, dass die Mortalität durch signifikante Hemmung der ALDO-Wirkung um 30% gesenkt werden konnte [Pitt et al., 1999; Zannad et al., 2000]. Allerdings traten bei 10% der Patienten schwerwiegende steroidale Nebenwirkungen, wie z.B. Gynäkomastie, Dysmenorrhoe und Brustschmerzen auf [Brilla et al., 1997; MacFadyen et al., 1997; Mantero and Lucarelli, 2000; Soberman and Weber, 2000]. Außerdem wurden durch die MR-Antagonisten schwerwiegende Hyperkalämien ausgelöst, die mit zahlreichen Todesfällen assoziiert waren [Juurlink et al. 2004]. Die Ergebnisse von RALES konnten im Jahr 2003 durch die EPHEBUS-Studie untermauert werden.

➤ **Therapie von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose mit CYP11B2-Inhibitoren**

Um das schwerwiegende Nebenwirkungsprofil der MR-Antagonisten zu vermeiden, und um den „Circulus Vitiosus“ der pathophysiologischen Aldosteronwirkung zu durchbrechen, wurde im Arbeitskreis ein völlig neuer therapeutischer Ansatz entwickelt, nämlich die Hemmung der Aldosteronsynthese (CYP11B2).

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung von CYP11B2-Inhibitoren war nicht nur ihre Potenz, sondern auch ihre Selektivität gegenüber dem Schlüsselenzym der Corticoidbiosynthese, der Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1) (Homologie der Aminosäuresequenzen 93% [Dissertation Müller-Vieira, 2005]). Die Selektivität ist sehr wichtig, um Störungen im Glucocorticoidstoffwechsel zu vermeiden. Auf den theoretisch möglichen, therapeutischen Einsatz von CYP11B1-Inhibitoren bei Morbus Cushing soll in diesem Rahmen nicht eingegangen werden; es existieren auch noch keine klinisch eingesetzten CYP11B1-Hemmstoffe.

Nachdem es gelungen war, gegenüber dem humanem CYP11B2 hochpotente und im Vergleich zu CYP11B1 hochselektive Verbindungen herzustellen (Testsystem: stabil transfizierte V79MZ-Zellen [Ulmschneider et al., 2005a und 2005b; Voets et al., 2004 und 2006; Dissertation Müller-Vieira, 2005]), sollten diese als potentielle neue Therapeutika für Herzinsuffizienz und Myokardfibrose weiter optimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Verbindungen zur weiteren präklinischen Selektion in vitro und in vivo, sowohl auf dem Gebiet der Pharmakodynamik als auch im Bereich der Pharmakokinetik untersucht.

Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel der Projekte des Arbeitskreises basiert auf ihrem pharmazeutisch-medizinischen Hintergrund und besteht in der rationalen Entwicklung von Arzneistoffkandidaten für die klinische Prüfung.

In diesem Zusammenhang werden verschiedene therapeutische Targets verfolgt, im besonderen Prostatakarzinom (CYP17, 5 α -Reduktase), Benigne Prostatahyperplasie (5 α -Reduktase), Mammakarzinom und Endometriose, (CYP19, 17 β -HSD1), sowie Herzinsuffizienz bzw. Myokardfibrose (CYP11B2). Für diese Krankheiten existieren entweder bereits therapeutische Ansätze, die im Arbeitskreis noch optimiert werden sollen, oder es wurden im Arbeitskreis völlig innovative Ansätze (z.B. Hybridinhibition der 5 α -Reduktase, CYP11B2 als Target) entwickelt. Der große Vorteil der Arbeitsgruppe besteht dabei in ihrem umfassenden methodischen Spektrum, das sich von rationalen Verfahren (Modelling, virtuellem Screening) über Synthese und biologische Testung- in vitro als auch in vivo- erstreckt. Durch diese unmittelbare Verknüpfung verschiedenster Kompetenzen, wird in der präklinischen Entwicklung die schnelle, effiziente Selektion von hits und leads ermöglicht.

Gegenstand dieser Arbeit war in diesem Kreislauf innerhalb verschiedener Projekte (der Targets) schwerpunktmäßig die Untersuchung der in vitro- Pharmakokinetik, es wurden allerdings auch der in vitro-Metabolismus und die in vitro-Pharmakodynamik, sowie die in vivo-Pharmakokinetik untersucht. Die Auswahl der getesteten Verbindungen erfolgte stets rational und die Ergebnisse dienten als Richtlinie für darauf aufbauende Screenings und Synthesen.

Im Rahmen der in vitro-Pharmakokinetik sollten Verbindungen der oben genannten Teilprojekte im Caco-2 Modell auf Permeabilität getestet werden, das generell zur Vorhersage der peroralen Verfügbarkeit im Menschen dient. Anhand dieses Darmmodells sollte außerdem die metabolische Stabilität verschiedener Prodrugs (Ester, Peptide) im 5 α -Reduktase-Projekt untersucht werden.

Um die Aktivität ausgewählter humaner CYP11B2-Inhibitoren in vitro herauszufinden, sollte zudem ein in vitro-Test mit Nebennierenrinden der Ratte reetabliert werden. Weiterhin sollten die in ihrem in vitro- Gesamtprofil am vielversprechendsten Verbindungen der Teilprojekte im Rattenmodell im Hinblick auf ihre in vivo- Pharmakokinetik und teilweise auch auf ihre Pharmakodynamik überprüft werden.

Ergebnisse

1 Etablierung und Optimierung des Caco-2 Modells und der LC/MS/MS-Analytik der Proben des Systems

1.1 Caco-2 Modell

1.1.1 Etablierung des Caco-2 Modells

Um präklinische Studien hinsichtlich potentieller peroraler Verfügbarkeit verschiedener Substanzklassen durchführen zu können, sollte das in vitro-Modell Caco-2 (colon cancer cells) eingesetzt werden. Dieses wird dafür aufgrund seiner guten Korrelation zur humanen Absorption generell akzeptiert (Artursson et al, 2001). Das System sollte aus Gründen der experimentellen Handhabung im 12-well-Format (Transwellsystem Corning Costar®, s. Abbildung 1 "Transwellplatte") eingesetzt werden. Zur Standardisierung wurden bei jedem Test Referenzsubstanzen mit untersucht, da es sich um eine polyklonale Zelllinie handelt. Dabei wurden normalerweise die Verbindungen einzeln appliziert, um Interaktionen zu vermeiden. Die Testung erfolgte außerdem in Triplica zur Berücksichtigung der Standardabweichung zwischen den einzelnen biologischen Systemen (Transwells, Transwellplatten). Es wurde außerdem darauf geachtet, möglichst Zellen der gleichen Charge und Passagen zum Einsäen der Platten zu verwenden, um möglichst ähnliche Monolayer-Populationen zu erhalten.



Abbildung 1: Transwellplatte

1.1.1.1 Traditionelles Transportmodell/ Validierung mit Referenzen

Die Caco-2 Zellen wurden in modifiziertem „Dulbecco`s Modified Eagle“- Medium (DMEM, s. Material und Methoden) in Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert. Nachdem die Zellen 60-80% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie abgelöst, in DMEM resuspendiert und in einer Konzentration von $6,4 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 eingesetzt [Laitinen et al., 2003] (s. „Material und Methoden“). Anschließend wurden die Zellen, um konfluente Monolayer auszubilden, für mindestens 21 Tage, bzw. solange bis sie eine hinreichende Dichte (Differenzierungsgrad, Transportbarriere) erreicht hatten, kultiviert. Das Wachstum wurde anhand der Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes (TEER) zweimal wöchentlich überprüft und sollte am Vortag eines Transporttests bei $500-600\Omega$ liegen. Die in jedem Assay zusammen mit den Forschungssubstanzen zu testenden Referenzen wurden anhand ihrer Transporteigenschaften ausgewählt, um das häufigste Transportspektrum für Wirkstoffe abzudecken (s. „Einleitung“). Die Integrität der Zellmonolayer wurde am Ende jedes Tests durch Lucifer Yellow überprüft [Alsensz et al., 2003].

Zunächst wurden Ketoprofen (aktiv transzellulär: H^+ -Kotransporter, hohe Permeabilität [Laitinen et al., 2003]), Testosteron (passiv transzellulär, hohe Permeabilität [Alsensz et al., 2003]) und Ranitidin-HCl (gemischter Transport: passiv parazellulär [Gan et al., 1993] und P-gp-Efflux [Collet et al., 1999], niedrige Permeabilität) verwendet. Ranitidin-HCl wurde allerdings nur solange eingesetzt, wie die Referenzen einzeln appliziert wurden, da außer den drei Referenzen so auch eine unbekannte Substanz pro Transwellplatte untersucht werden konnte (eigentlich sollten auf jeder Platte Referenzen mit getestet werden). Die Permeabilität der Forschungssubstanzen wurde dann jeweils anhand der Membrangängigkeit der Referenzen mittels der P_{app} -Werte (apparente Permeabilitätskoeffizienten; Berechnung s. „Material und Methoden“) klassifiziert (s. Tabelle 1 „Permeabilität der Referenzen I“).

Verbindung ¹	$P_{app} (A \rightarrow B)$ ² [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	basolaterale Konzentration [µM] [MW ± rel. SD] ³	Wiederfindungsrate [%] [MW]
Ketoprofen (H ⁺ -Kotransporter)	28,5 ± 12,9	5,0 ± 3,6	75,3
Ranitidin-HCl (parazellulär, P-gp)	0,1 ± 4,5	0,1 ± 4,3	91,0
Testosteron (transzellulär)	27,9 ± 7,3	4,3 ± 4,8	44,3

Tabelle 1: Permeabilität der Referenzen I:

21 Tage-Kultur, Single dosing, 1h Inkubation

¹Startkonzentration im Donor: 50µM,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Nachdem die Applikation der Referenzen als Gemisch geplant war, wurde die Referenz Ranitidin durch zwei andere Verbindungen ersetzt, die jeweils nur einem Transportmechanismus unterliegen. Deren Permeabilität wurde ebenfalls zunächst im „single dosing“ untersucht. Es handelte sich um Atenolol als passiv parazellulär transportierte Substanz [Tannergren et al., 2001] und um Erythromycin als P-gp-Substrat [Yee et al., 1997] (s. Tabelle 2 „Permeabilität der Referenzen II“).

Diese Verbindungen, die bevorzugt unter Nutzung nur einer Transportroute den Caco-2-Monolayer überqueren können, lassen eindeutigere Rückschlüsse auf den jeweiligen Zustand (Differenzierungsgrad, Integrität) des zellulären Monolayers zu als solche, die gemischten Transportmechanismen unterliegen. So könnte man z.B. bei veränderten Transporteigenschaften von Ranitidin nicht wissen, ob die Ursache dafür eine abweichende parazelluläre Barriere (Porengröße, Öffnungsgrad der „Tight Junctions“) oder ein verändertes Expressionsmuster von P-gp (quantitativ bzw. qualitativ) wäre. Bei einem veränderten Transportverhalten von Atenolol bzw. Erythromycin hingegen wären die Ursachen einfacher zu identifizieren.

Verbindung ¹	$P_{app (A>B)}$ ² [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	basolaterale Konzentration [µM] [MW ± rel. SD] ³	Wiederfindungsrate [%] [MW ± rel. SD] ³
Ketoprofen	22,5 ± 3,9	4,8 ± 3,8	65,5 ± 6,4
Atenolol (parazellulär)	0,1 ± 6,7	0,1 ± 16,9	95,7 ± 5,9
Testosteron	21,5 ± 4,8	4,5 ± 5,4	29,6 ± 6,0
Erythromycin (P-gp Substrat)	N.D. ⁴	N.D. ⁴	83,8 ± 1,8

Tabelle 2: Permeabilität der Referenzen II:

21 Tage-Kultur, Single dosing, 1h Inkubation

¹Startkonzentration im Donor: 50µM,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Das Ergebnis zeigt, dass die Permeabilitäten der Verbindungen Ketoprofen und Testosteron im gleichen Bereich bleiben, sich jedoch zwischen verschiedenen Assays ändern. Wenn es sich um aktive Transportwege handelt, sind die Abweichungen meist höher als bei passiv transportierten Verbindungen, da sich bei der polyklonalen Zelllinie v.a. die Enzymexpressionsrate ändert- weniger die Morphologie der Zellmembranen.

1.1.1.2 Optimierung des Transportmodells

➤ Multiple dosing statt single dosing

Um den Substanzdurchsatz pro Transwellplatte zu erhöhen, sollten die Referenzen statt wie bisher einzeln („single dosing“) im Gemisch („multiple dosing“ oder „cassette dosing“) appliziert werden. Dies ist ein weit verbreitetes Verfahren für pharmakokinetische Präscreenings in vitro [Laitinen et al., 2003; Tannergren et al., 2001]. Dennoch muss die Eignung des jeweiligen Modells erst überprüft werden, da es zu Interaktionen kommen kann, die das Transportverhalten beeinflussen. Solche Wechselwirkungen sind bei den gewählten Referenzen allerdings relativ unwahrscheinlich, da die Verbindungen unterschiedliche Transportwege benutzen (s. Tabelle 3 „Multiple dosing der Referenzen“).

Verbindung ¹	$P_{app (A>B)}$ ² [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	basolaterale Konzentration [µM] [MW ± rel. SD] ³	Wiederfindungsrate [%] [MW ± rel. SD] ³
Ketoprofen	27,3 ± 1,6	6,6 ± 1,3	62,5 ± 7,2
Atenolol	0,2 ± 4,8	0,1 ± 4,1	94,3 ± 8,1
Testosteron	22,0 ± 8,0	4,6 ± 6,8	28,5 ± 1,5
Erythromycin	N.D. ⁴	N.D. ⁴	86,0 ± 2,6

Tabelle 3: Multiple dosing der Referenzen:

21 Tage-Kultur, 1h Inkubation

¹Startkonzentration im Donor: 50µM,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

⁴nicht detektierbar

Die absoluten Permeabilitäten der Verbindungen haben sich beim „multiple dosing“ im Vergleich zum „single dosing“ kaum verändert; sie liegen im selben Klassifizierungsbereich (niedrig, mittel, hoch permeabel) und die Reihenfolge stimmt überein. Somit ist es möglich, die Referenzen im Gemisch zu applizieren, um Permeabilitätsscreenings von Forschungssubstanzen mit höherem Probendurchsatz vornehmen zu können. Die Referenzen dienen außerdem dazu, die enorme

Interlaborvariabilität abzuschätzen [Hidalgo et al., 2001] und das laborinterne Transportsystem möglichst zur Anwendung zu standardisieren.

Zusätzlich gibt es allgemeine Richtlinien zur Einschätzung der potentiellen peroralen Verfügbarkeit einer Verbindung anhand ihrer Caco-2-Permeabilität (s. Tabelle 4 „Klassifizierungen der Permeabilität“) [Artursson et al., 1991, Yee et al., 1997].

Literatur	P_{app}^1 [$X \cdot 10^{-6}$ cm/sec]	Humane perorale Absorption [% von Dosis].	Klassifizierung nach Permeabilität
Artursson et al, 1991	>1	100	hoch
	0,1-1	1-100	mittel
	<0,1	<1	niedrig
Yee et al., 1997	>10	70-100	hoch
	1-10	20-70	mittel
	<1	0-20	niedrig

Tabelle 4: Klassifizierungen der Permeabilität

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient im Caco-2 Modell

Wie man erkennen kann, sind auch die in der Literatur gesetzten Grenzen der Klassifizierung relativ weit und modellabhängig.

➤ **Erhöhung der Inkubationsdauer von 1h auf 3h**

Ein weiterer kritischer Faktor des traditionellen Caco-2-Systems außer des „single dosings“ war die kurze Dauer des Transporttests nach „Yee et al.“, die zunächst nur eine Stunde betrug, wobei die Probenziehung (s. „Material und Methoden“) je nach 0min, 15min, 30min und 60min erfolgte. Diese kurze Inkubationszeit war riskant für die Beurteilung der Permeabilität relativ lipophiler Verbindungen, da diese einem „kinetischen Shift“ unterliegen können. D.h., dass diese sich zuerst in den zellulären Membranen einlagern und dann zeitverzögert in relativ hohen Konzentrationen die Zellbarrieren überqueren [Dissertation Dossou, 2006]. Deren Fähigkeit, zelluläre Systeme zu passieren, würde somit bei einer zu niedrigen Inkubationszeit unterschätzt werden, man käme also zu einem falsch negativen Ergebnis. Andererseits genügt diese kurze Inkubationsdauer für schnell permeierende Verbindungen, die nicht die Tendenz haben, sich in biologischen Membranen anzureichern.

Da die im Arbeitskreis untersuchten Verbindungen jedoch alle relativ lipophil sind ($\log P > 3$), war es sinnvoll, die Inkubationsdauer auf 3h zu erhöhen. Die Probenziehung erfolgte nun nach 0min, 1h, 2h und 3h (s. Tabelle 5 „Permeabilität der Referenzen III“).

Verbindung ¹	$P_{app(A>B)}$ ² [$X \cdot 10^{-6}$ cm/sec] [MW \pm rel. SD] ³	basolaterale Konzentration [μ M] [MW \pm rel. SD] ³	Wiederfindungsrate [%] [MW \pm rel. SD] ³
Ketoprofen	24,8 \pm 5,6	14,5 \pm 7,8	39,7 \pm 8,7
Atenolol	0,1 \pm 6,2	0,1 \pm 12,8	88,4 \pm 5,1
Testosteron	16,8 \pm 5,6	9,4 \pm 5,4	40,7 \pm 10,1
Erythromycin	N.D. ⁴	N.D. ⁴	83,7 \pm 7,2

Tabelle 5: Permeabilität der Referenzen III:

21 Tage-Kultur, Multiple dosing, 3h Inkubation

¹Startkonzentration im Donor: 50 μ M,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert \pm relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Die verlängerte Inkubationsdauer beeinflusst die P_{app} -Werte der schnell permeierenden Referenzen kaum. Allerdings ändert sich die Wiederfindung im System, da die Substanzen mehr Zeit haben die Zellen zu überwinden bzw. sich in den Zellen anzureichern; mit der Zeit könnten sich auch Sättigungsgleichgewichte einstellen.

Es wurde außerdem versucht, die Transporttests über 4 bis 6 Stunden durchzuführen, was sich jedoch als unmöglich herausstellte, da die Integrität der Zellmonolayer nach diesen Zeiten bereits nachließ. Dies zeigte sich an den zur Integritätskontrolle nach jedem Assay mit Forschungsverbindungen durchgeführten Permeabilitätstest mit dem parazellulären Marker Lucifer Yellow (s. „Material und Methoden“). Der Durchgang des Fluoreszenzfarbstoffes (innerhalb von 30 min) durch die Caco-2-Monolayer lag nach diesen längeren Inkubationszeiten über dem Grenzwert von $P_{app} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm/sec}$. Eine längere Inkubationsdauer als 3h ist für die meisten Verbindungen auch nicht nötig, da die durchschnittliche Magendarmpassagezeit beim Menschen innerhalb dieses Bereichs liegt.

➤ **Reduktion der Kultivierungszeit von 21 Tagen auf 10 Tage**

Ein weiterer kritischer Faktor des traditionellen Caco-2-Transportmodells war die lange Kultivierungszeit der Monolayer von 21 Tagen, da hierdurch stark der Durchsatz bzw. die Testflexibilität eingeschränkt wurden. Aus diesen Gründen sollte versucht werden, die Zeit zwischen Planung und Durchführbarkeit der Transporttests zu reduzieren.

Es existieren verschiedene Modelle zur Reduktion der Kulturdauer auf bis zu 3 Tage (z.B. „3-Day Biocoat[®] HTS Caco-2 Assay System“, BD Biosciences). Der Nachteil dieser Ansätze besteht jedoch darin, dass spezielle Zusätze zu den Zellkulturmedien (Wachstumsfaktoren) oder besondere Zellkulturgefäße verwendet werden müssen, um innerhalb dieser kurzen Zeit relativ konfluente und differenzierte Monolayer zu erhalten [Yamashita et al., 2002]. Es entstehen im Vergleich zu dem traditionellen Modell also enorme Zusatzkosten [Alsenz et al., 2003]. Außerdem verändern sich auch teilweise die zellulären Transporteigenschaften.

Deshalb sollte die traditionelle Methode im Rahmen eines angemessenen Kosten-Nutzen-Aufwandes optimiert werden. D.h. die Kultivierung sollte auf die traditionelle Weise erfolgen, aber eine schnellere Differenzierung der Zellen- zum Differenzierungsgrad des bisher eingesetzten 21-Tage Modells- sollte erreicht werden. Optimal hierfür erschien der Ansatz, eine höhere Zellzahl in die Transwellplatten einzusäen (jetzt $1,6 \cdot 10^5$ statt bisher $6,4 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2) und gleichzeitig die Kultivierungsdauer auf 10-14 Tage zu reduzieren, wodurch die Transporteigenschaften der Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben sollten [Alsenz et al., 2003]. Das verkürzte System wurde dann anhand der bereits untersuchten Referenzen validiert (s. Tabelle 6 „Reduzierte Kultivierungszeit“).

Verbindung ¹	$P_{app (A>B)}$ ² [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	basolaterale Konzentration [µM] [MW ± rel. SD] ³	Wiederfindungsrate [%] [MW ± rel. SD] ³
Ketoprofen	18,5 ± 3,9	10,6 ± 4,1	38,5 ± 2,6
Atenolol	0,1 ± 1,8	0,1 ± 9,5	89,1 ± 1,9
Testosteron	13,3 ± 2,6	7,1 ± 2,0	46,3 ± 7,2
Erythromycin	N.D. ⁴	N.D. ⁴	70,4 ± 2,8

Tabelle 6: Reduzierte Kultivierungszeit:

10 Tage-Kultur, Multiple dosing, 3h Inkubation

¹Startkonzentration im Donor: 50µM,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Die relativ geringen Unterschiede zwischen dem 21- und dem 10-Tagemodell zeigen, dass die Zellen nach der verkürzten Kulturzeit aufgrund ihrer höheren Einsäichte offenbar hinreichend differenziert sind, um den Transport der Referenzen im gleichen Ausmaß zu bewältigen. Das verkürzte Modell ermöglicht somit eine flexiblere Versuchsplanung und ist kostengünstiger.

1.2 Analyse der biologischen Proben per LC/MS/MS

Ziel jedes analytischen Verfahrens ist es, mit möglichst geringerem Aufwand ein den Anforderungen genügendes, reproduzierbares Ergebnis zu erzielen. Um zu solchen validen Resultaten zu kommen, ist die adäquate Probenaufarbeitung eine Grundvoraussetzung.

1.2.1 Probenaufarbeitung für LC/MS/MS

Zunächst wurde versucht, die Proben der Caco-2-Tests ohne jegliche Aufarbeitung direkt zu injizieren und nach Ionisierung bei Atmosphärendruck per Massenspektrometrie nachzuweisen. Hierbei wurde die Ionisation jedoch durch den Salzgehalt des Transportpuffers und durch von den Zellen freigesetzte Proteine so stark gestört (Oberflächeneffekte s. „Einleitung“), dass die Ergebnisse keinesfalls für Quantifizierungen geeignet waren. Die Substanzen konnten zwar identifiziert werden, die Gehaltsbestimmungen waren jedoch nicht aussagekräftig (s. Abbildung 2 „Kalibrierfunktion von Ketoprofen in Puffer ohne Probenaufarbeitung“). Zur Auswertung der Proben durch UV-Spektroskopie waren sie größtenteils zu niedrig konzentriert.

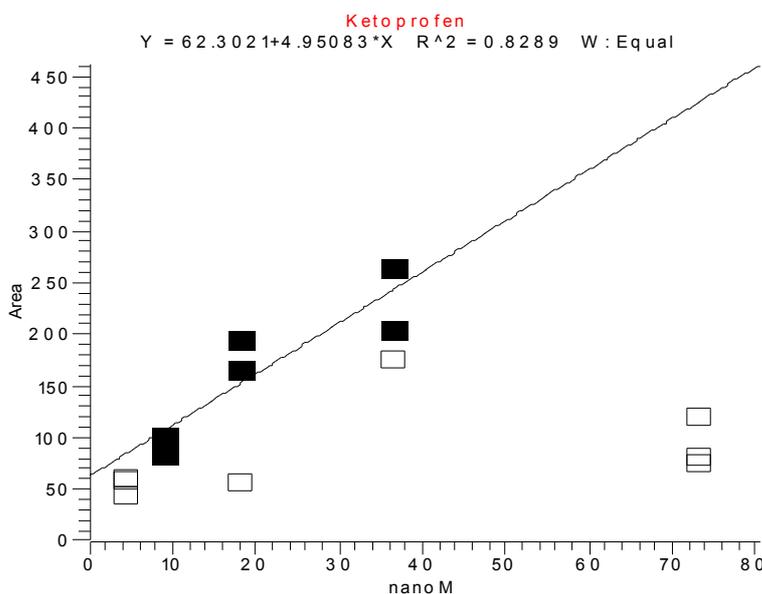


Abbildung 2: Kalibrierfunktion von Ketoprofen in Puffer ohne Probenaufarbeitung

(pro Konzentration drei Messungen:

schwarz ausgefüllte Quadrate= Messpunkte zur Festlegung der Bestgerade,

leere Quadrate= ausgeschlossene Messpunkte)

Man kann erkennen, dass die Detektion nicht reproduzierbar ist und teilweise bei der Mehrfachinjektion derselben Lösung völlig zusammenbricht, da die Ionisierung durch Matrixeffekte (v.a. Salz) gestört ist. Es war somit nötig, vor der Injektion der Proben in die Ionenquelle des massenspektrometrischen Teils eine adäquate Methode zur Probenaufarbeitung zu finden.

1.2.1.1 Probenaufarbeitung per Festphasenextraktion (SPE)

Die Methode wurde für verschiedene Verbindungen getestet, sie ist jedoch sehr zeitintensiv, da für jede Verbindung eine neue Methode entwickelt werden muss (Art der stationären Phase, Konditionierung, Wahl des Elutionsgemisches, Optimierung eines geeigneten internen Standards). Außerdem sind die Kosten für Festphasenkartuschen verhältnismäßig hoch und die Probenmenge aus den Caco-2-Tests ist sehr gering (max. 140 µl, da Entnahmenvolumen im Test = 150 µl), um eine nicht automatisierte Standardextraktion durchzuführen. Aus diesen Gründen wurde eine Alternative gesucht. Diese sollte zunächst in der Flüssig-Flüssig-Extraktion bestehen.

1.2.1.2 Probenaufarbeitung per Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist ein sehr verbreitetes und gut geeignetes Verfahren, um organische Verbindungen aus wässrigen Matrices (z.B. biologische Proben) zu isolieren und anzureichern. Die Grundlage bildet der Stas-Otto-Gang, in dem Verbindungen je nach Azidität, Polarität und Lipophilie bei einem geeigneten pH-Wert mit dem entsprechenden organischen Lösungsmittel aus heterogenen wässrigen Gemischen selektiv angereichert werden. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass sie viel kostengünstiger ist als die SPE.

Die LLE besitzt allerdings auch Nachteile. Sie ist relativ optimierungs- und zeitintensiv, da für jede Verbindung geeignete Extraktionsmittel und geeignete interne Standards gefunden werden müssen. Außerdem muss nach der Extraktion generell das Lösungsmittel abgedampft werden, um die Proben zur Messung aufzukonzentrieren, was Zeit beansprucht.

Aufgrund der genannten Vorteile wurde das Verfahren jedoch als beste zu diesem Zeitpunkt verfügbare Methode zur Aufbereitung der Caco-2 Proben für verschiedene Verbindungen etabliert.

➤ **Etablierung von LLE-Methoden für verschiedene Verbindungen**

Bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen ist es generell nötig, interne Standards einzusetzen, um experimentelle Schwankungen zu eliminieren. Die hier verwendeten internen Standards (s. Tabelle 7 „Testverbindungen und Interne Standards“) wurden nach möglichst ähnlichen physikochemischen Merkmalen zur eigentlichen Testverbindung aus der vorhandenen Substanzbibliothek ausgewählt. Richtlinien waren hierbei Azidität, Polarität, Substanzklasse (Grundgerüst, funktionelle Gruppen) und Molekulargewicht. Je besser diese Eigenschaften zwischen Testverbindung und internem Standard übereinstimmen, desto ähnlicher ist ihr chromatographisches Verhalten und somit auch ihre Phasenverteilung bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die Ähnlichkeit darf natürlich nicht so hoch sein, dass es zu analytischen Differenzierungsproblemen kommt. Für die LC/MS/MS-Analyse muss man die Verbindungen entweder anhand ihrer chromatographischen oder mittels ihrer massenspektrometrischen Eigenschaften unterscheiden können.

Testsubstanz	Interner Standard
Ketoprofen	Naproxen
Ranitidin-HCl	Metoclopramid-HCl
Testosteron	Androstendion

Tabelle 7: Testverbindungen und Interne Standards

❖ **Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben**

Zunächst wurden separate Stammlösungen der Verbindungen und ihrer internen Standards in DMSO hergestellt (ca. 5mM; s. „Material und Methoden“, Permeabilitätstests). Aus diesen Stammlösungen der Verbindungen wurden dann jeweils in apikalem und in basolateralem Puffer Verdünnungsreihen für die Kalibrierlösungen angesetzt (alle Bestimmungen erfolgten in Triplica). Die Konzentrationen betragen für jede Kalibrierfunktion (apikal und basolateral) 0,15, 0,29, 0,59, 1,17, 2,34, 4,69, 9,37, 18,75, 37,5 und 75 µM. Dieser Bereich wurde so gewählt, um oberhalb des maximal zu erwartenden Gehalts der Caco-2 Proben zu liegen (Startlösung der Permeationstest generell 50µM) und um die Möglichkeit

abzudecken, dass bei schlecht permeablen Substanzen nur 1% der Substanz aus der Startlösung des Donorkompartimentes ins Akzeptorkompartiment gelangt (d.h. bei 50µM im Donor => 0,25µM im Akzeptor bei Verteilungsgleichgewicht). Unterhalb von 1% sind die Substanzen als niedrig permeabel einzuordnen.

Auf dieselbe Weise, aber ausgehend von anderen, separat eingewogenen Stammlösungen der Testverbindungen wurden die Qualitätskontrollproben hergestellt. Ihre Konzentrationen wurden im unteren, mittleren und oberen Bereich der Kalibrierstandards gewählt.

Die Stammlösungen der internen Standardverbindungen wurden mit Methanol, dem 10mM Ammoniumacetat zugesetzt worden war, auf eine Konzentration von 5µM verdünnt (in allen Lösungen derselbe Restgehalt an DMSO). Die verwendeten internen Standards waren OR19 für Testverbindung OR65, Naproxen für Ketoprofen, Metoclopramid-HCl für Ranitidin-HCl und Androstendion für Testosteron.

❖ LLE-Prozedur

Zu 100µl Caco-2 Probe, Kalibrierlösung oder Qualitätskontrollprobe wurden je 100µl des 5µM internen Standards, 20µl 1N-HCl (Ausnahme: Ranitidin-HCl: 1N-NaOH) und 1ml Diethylether (Ausnahme: Ranitidin-HCl: Dichlormethan) gegeben.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden je 100µl apikaler oder basolateraler Puffer mit je 100µl Methanol (das 10mM Ammoniumacetat enthielt) sowie je 20µl 1N-HCl und 1ml Diethylether versetzt (Matrix).

Nach rigorosem vertikalem Schütteln (Eppendorf-Schüttler) zur Extraktion für 20min, wurde zur Phasentrennung 5min bei 21.000g zentrifugiert. Die wässrige Phase der Etherextraktionen (unten) wurde nun in einem Aceton-Trockeneisbad (-78°C) für ca. 10min ausgefroren und die organischen Überstände wurden per Pasteurpipetten in braune Schraubglasvials (1,8ml-Vials für die HPLC) transferiert (bei Dichlormethanextraktionen: untere Phase ohne Ausfrieren entnommen). Dann wurde das Solvent zur Aufkonzentrierung der Analyten bei Raumtemperatur unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Die Rückstände der Caco-2 Proben, der Kalibrierlösungen und der Qualitätskontrollproben wurden zur Analyse in je 100µl Methanol, das 10mM Ammoniumacetat enthielt, für 10min im Ultraschallbad resolubilisiert.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten (100%-Wert) der Verbindungen, wurden die Rückstände der Matrix in je 100µl Methanol, das 10mM Ammoniumacetat sowie

die Testverbindungen und den jeweiligen internen Standard enthielt (Konzentrationen s. Extraktion) entsprechend resolubilisiert.

Alle resolubilisierten Lösungen wurden mittels Eppendorf-Pipetten zur Analyse (Injektion per Autosampler) in HPLC-Schnappvials mit konischen 150µl-Mikroeinsätzen überführt.

❖ Validierung der LLE-Prozedur

Die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode wurde durch die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Verbindungen bei verschiedenen Konzentrationen in apikaler und basolateraler Matrix (unterer, mittlerer, oberer Kalibrierbereich: 2,34, 9,38 und 37,5 µM) belegt. Die Wiederfindungsraten wurden durch den Vergleich extrahierter Proben mit nach der Extraktion mit Verbindung versetzter Matrix berechnet (s. Tabelle 8 „Wiederfindungsraten“). Sie müssen für dieselbe Verbindung in allen Konzentrationen übereinstimmen.

Verbindung	Wiederfindung aus apikal [MW ± rel. SD] ¹	Wiederfindung aus basolateral [MW ± rel. SD] ¹
Ketoprofen	101,9 ± 2,7	79,5 ± 0,7
Ranitidin-HCl	81,2 ± 6,2	74,0 ± 3,3
Testosteron	101,3 ± 3,3	99,4 ± 3,1

Tabelle 8: Wiederfindungsraten

¹Mittelwert ± relative Standardabweichung

Im Folgenden sind die entsprechenden Kalibrierfunktionen der Verbindungen mit ihrem jeweiligen internen Standard nach Flüssig-Flüssig-Extraktion aus basolateraler bzw. apikaler Matrix abgebildet (s. Abbildungen 3-5 bzw. 6-8). Sie zeigen ebenfalls die Validität des Verfahrens.

❖ Kalibrierfunktionen nach LLE aus basolateraler Matrix

Abbildung 3: Ketoprofen mit internem Standard Naproxen

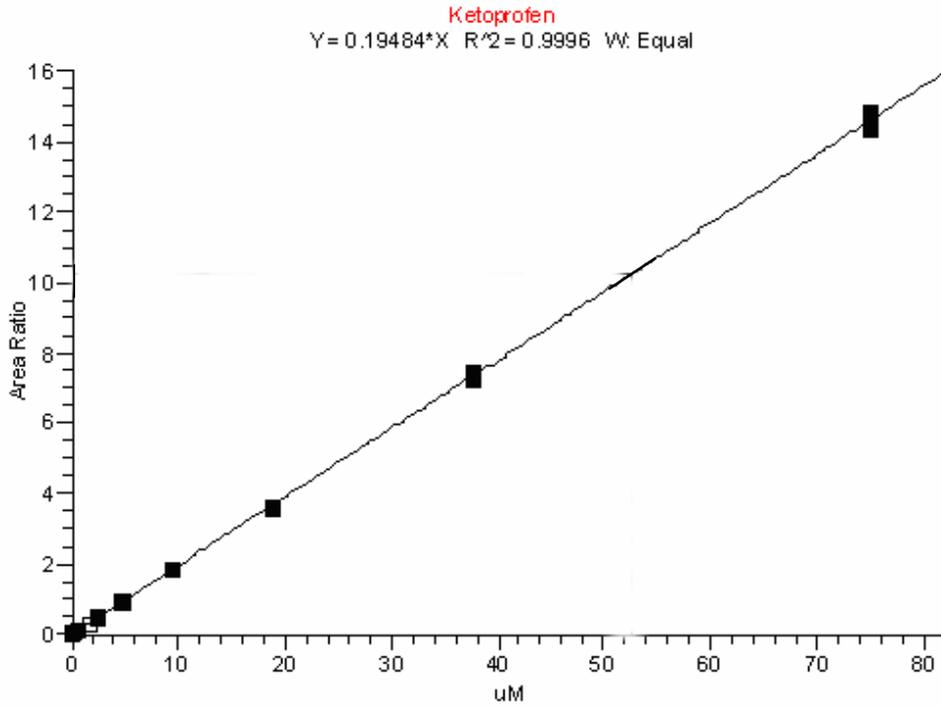


Abbildung 4: Ranitidin-HCl mit internem Standard Metoclopramid-HCl

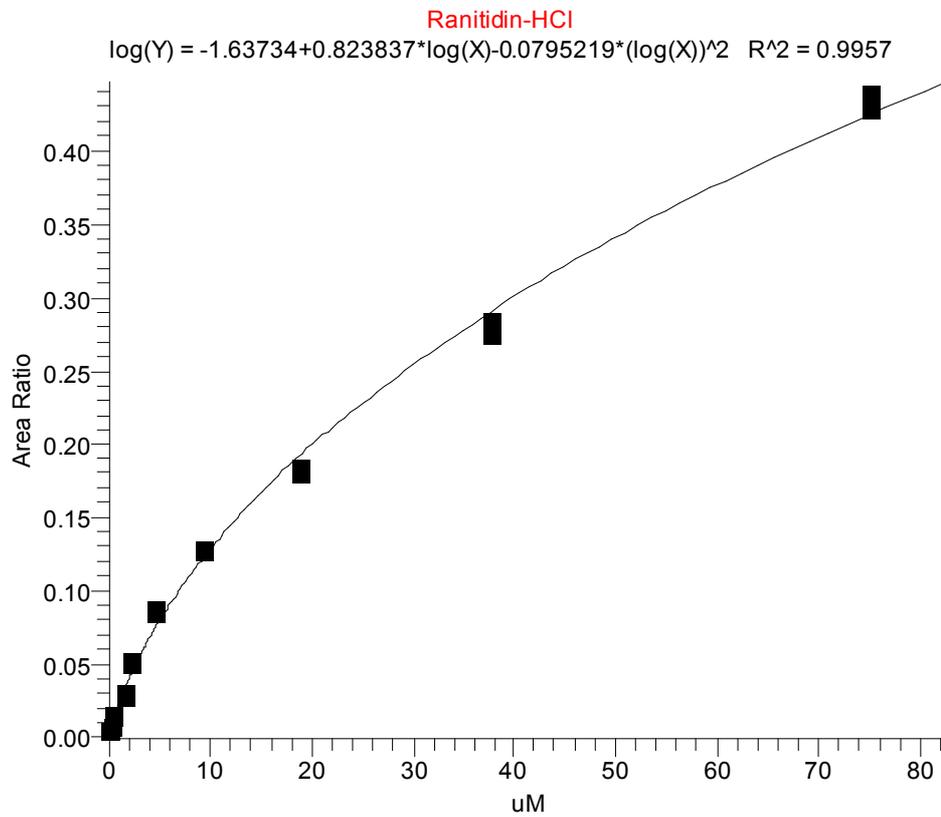
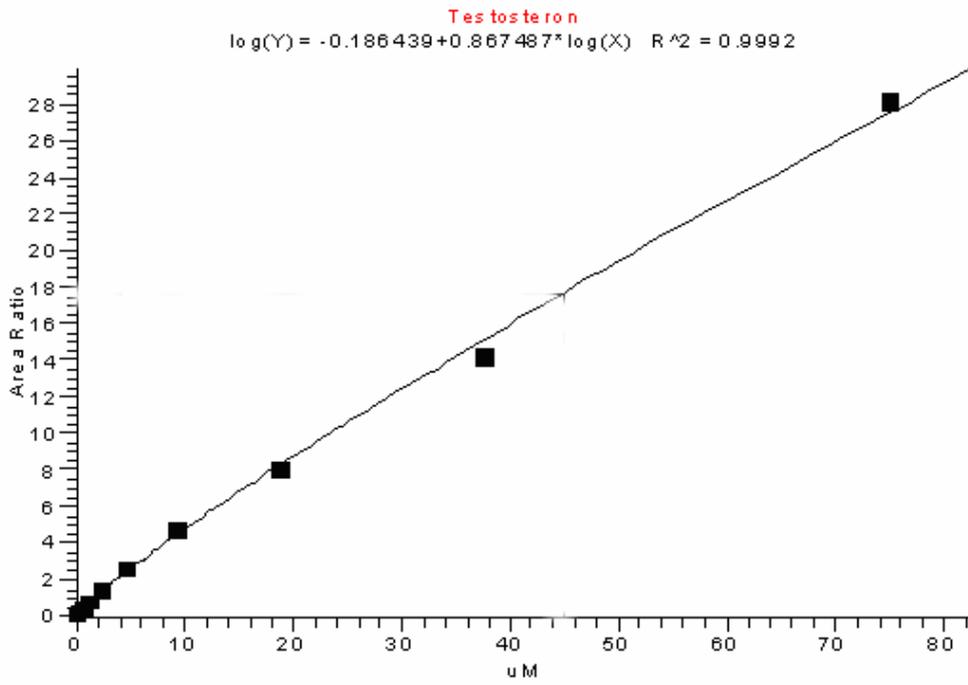


Abbildung 5: Testosteron mit internem Standard Androstendion



❖ Kalibrierfunktionen nach LLE aus apikaler Matrix

Abbildung 6: Ketoprofen mit internem Standard Naproxen

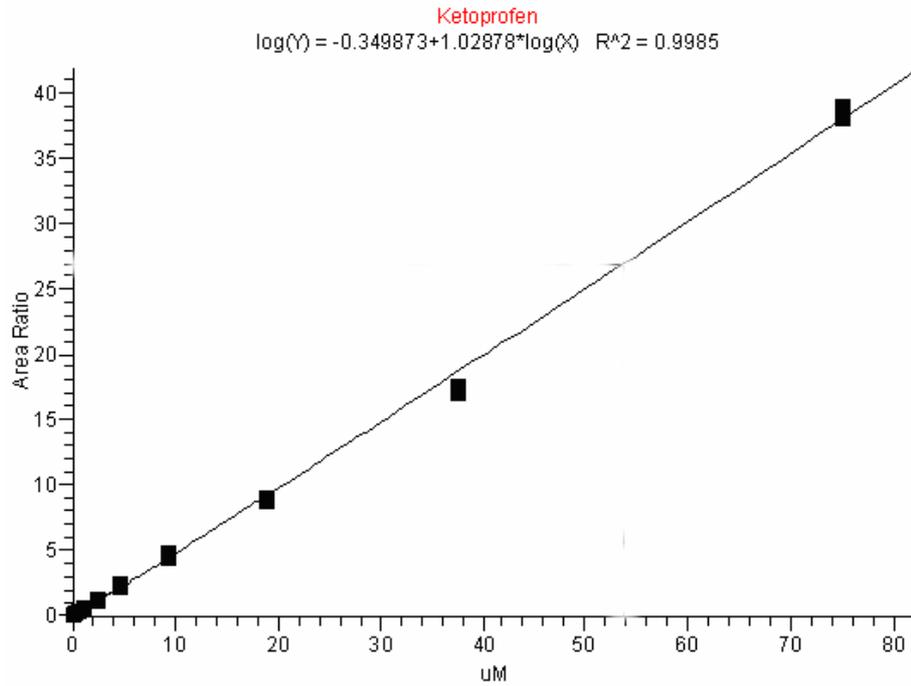


Abbildung 7: Ranitidin-HCl mit internem Standard Metoclopramid-HCl

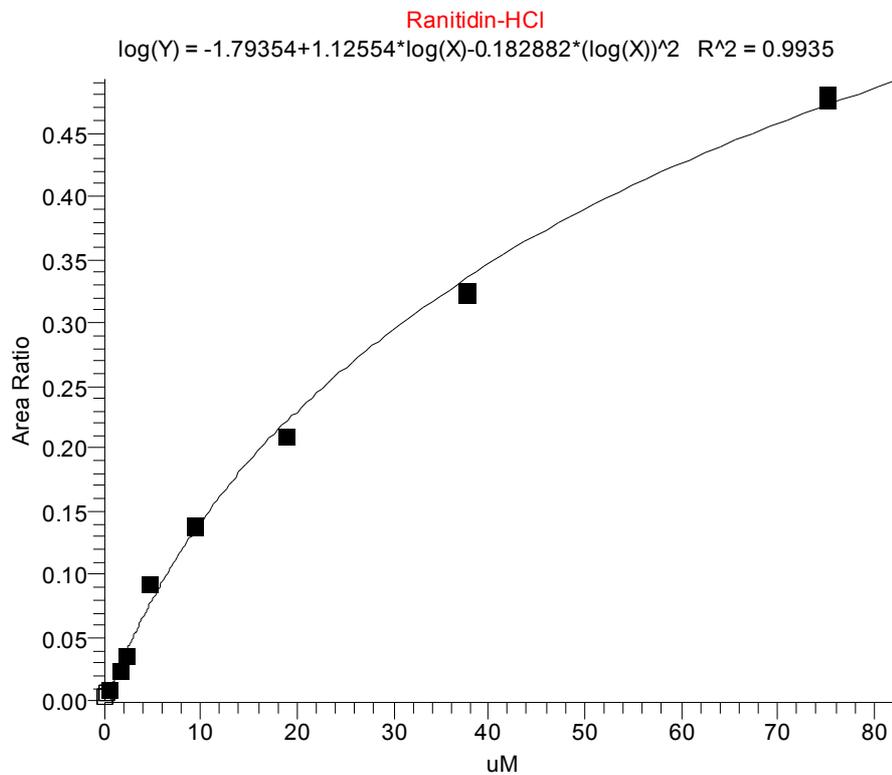
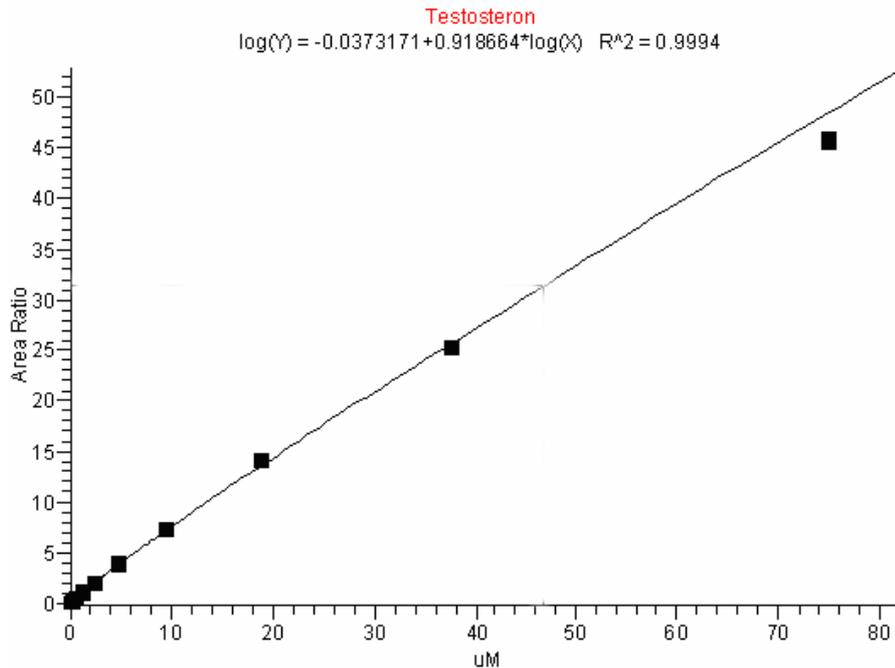


Abbildung 8: Testosteron mit internem Standard Androstendion

Wie man sieht, besteht bei der LLE mit geeigneten internen Standards innerhalb des Kalibrierbereichs eine sehr gute Korrelation zwischen der gewählten Konzentration einer Probe und der response im Detektor des Massenspektrometers. Der Korrelationskoeffizient r^2 liegt für alle Kalibrierfunktionen über 0,99. Da die Methode jedoch sehr aufwendig (Optimierung, Zeit für experimentelles Bearbeiten) ist, eignet sie sich kaum für einen nicht automatisierten, hohen Probendurchsatz. Sie sollte daher nur im Bedarfsfall, z.B. bei der Extraktion aus komplexeren biologischen Matrices angewendet werden.

Da es jedoch erstrebenswert war, einen höheren Durchsatz für die Analyse der Caco-2 Proben zu erzielen, sollte eine einfachere, den Ansprüchen dieser weniger komplexen Matrix (Transportpuffer, wenig Proteine) genügende Methode gefunden werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich die Schaltventilmethode [Laitinen et al., 2003, Larger et al., 2002] prinzipiell zur Aufarbeitung der Caco-2-Proben der in dieser Arbeit untersuchten Referenzen und Forschungssubstanzen eignet.

1.2.1.3 Probenaufarbeitung per Schaltventilmethode (divert valve method)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der online-Entsorgung wässriger biologischer Proben vor ihrer Einleitung in die Ionenquelle des massenspektrometrischen Teils einer LC/MS/MS-Apparatur [Larger et al., 2002]. Dabei wird die unaufgearbeitete Probe (für die ESI mit Ionisationsadditiv (Modifier) versetzt) in das HPLC-System injiziert. Nach einer chromatographischen Trennung der Puffersalze von den Analyten zu Beginn des chromatographischen Laufs wird der Säuleneffluent, in dem der überwiegende Teil des Salzes gelöst ist, über ein Schaltventil zunächst in den Abfall geleitet (ca. 1min: hydrophiles Lösungsmittelgemisch). Das Salz gelangt somit nicht in die Ionenquelle, wo es störende Einflüsse auf die Ionisation (besonders bei ESI, weniger bei APCI [Constantopoulos et al., 1999]) und somit die massenspektrometrische response nehmen könnte. Nach Ableitung dieses Störfaktors werden nach Umschalten desselben Schaltventils die Analyten mit einem höheren organischen Lösungsmittelanteil von der chromatographischen Säule eluiert und in die Ionenquelle und danach ins massenspektrometrische System eingeleitet.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode ist also ein hinreichender Lipophilieunterschied zwischen Matrixkomponenten (v.a. Puffersalzen) und Analyten, d.h. ihre chromatographische Trennbarkeit. Hierdurch können störende Probenkomponenten vor der Einleitung der Analyten in die Ionenquelle hinreichend entfernt werden. Damit die Methode für eine reproduzierbare Analytik ausreicht, müssen allerdings außer den Salzen auch andere die Detektion beeinträchtigende Komponenten wie z.B. Proteine und oberflächenaktive Stoffe (in störender Konzentration) in der biologischen Probe fehlen.

Zur zusätzlichen Zeitersparnis (weniger Messzeit durch Reduktion der Anzahl der Proben) wurden die Konzentrationen der Analyten aus Puffergemischen (Verdünnung wie „1/1“ in „apikal/ basolateral“ [v/v]) gemessen. Hierdurch wurden die Caco-2-Proben zwar um Faktor 2 verdünnt, was aber für kinetisch interessante, mittel permeable Verbindungen immer noch zur Detektion genügt. Gleichzeitig wurde aber die Anzahl der Kalibrierlösungen im Vergleich zu den vorangehenden Probenaufarbeitungen halbiert, wo für jede Matrix (apikal und basolateral) Kalibrierfunktionen gemessen werden mussten. Außerdem lag die Obergrenze des Kalibrierbereichs jetzt niedriger (25µM), was zusätzlich die Probenzahl reduzierte.

Die Kalibrierfunktionen sind im Folgenden dargestellt (s. Abbildungen 9-11).

➤ **Kalibrierfunktionen nach Schaltventilextraktion (DV) aus Puffergemisch (apikal/ basolateral wie 1/1)**

Abbildung 9: Ketoprofen mit internem Standard Naproxen

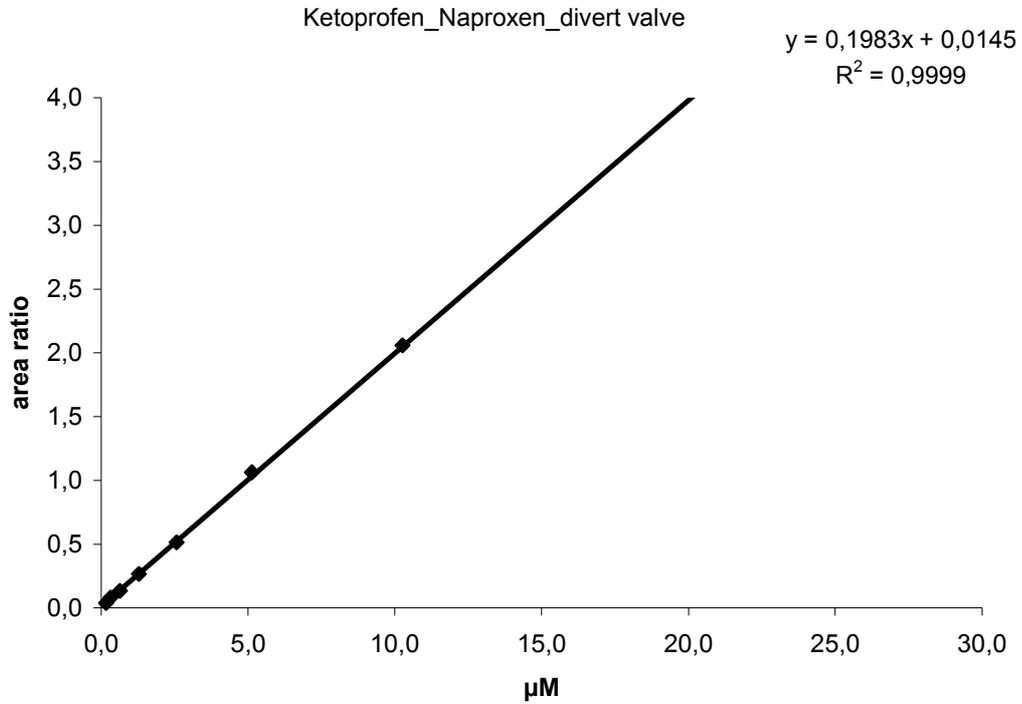


Abbildung 10: Ranitidin-HCl mit internem Standard Metoclopramid-HCl

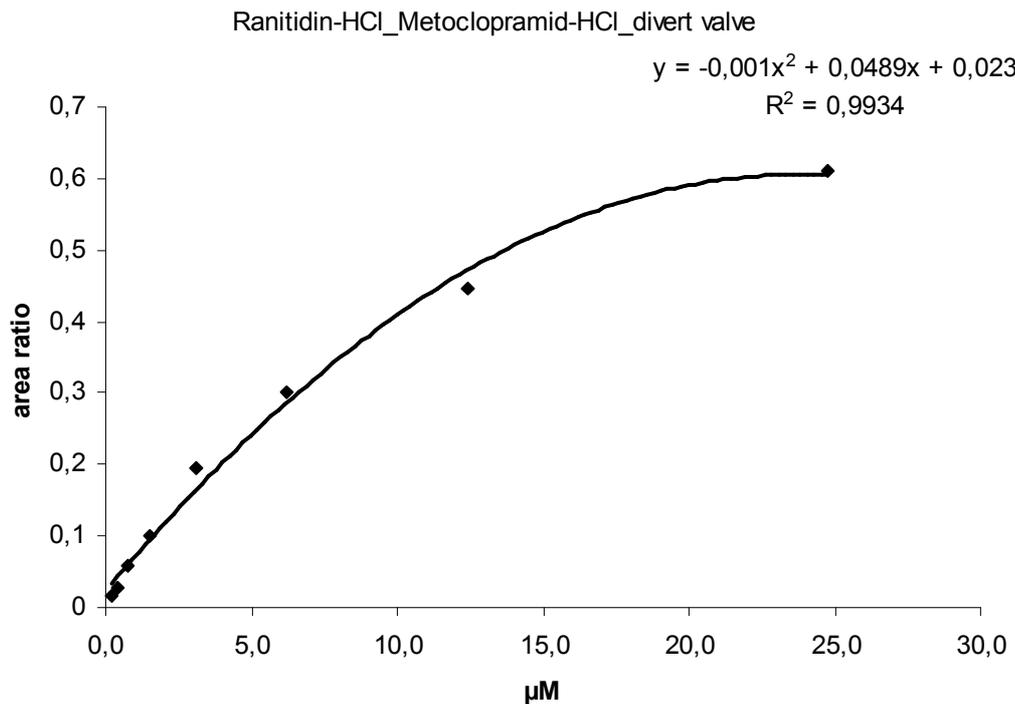
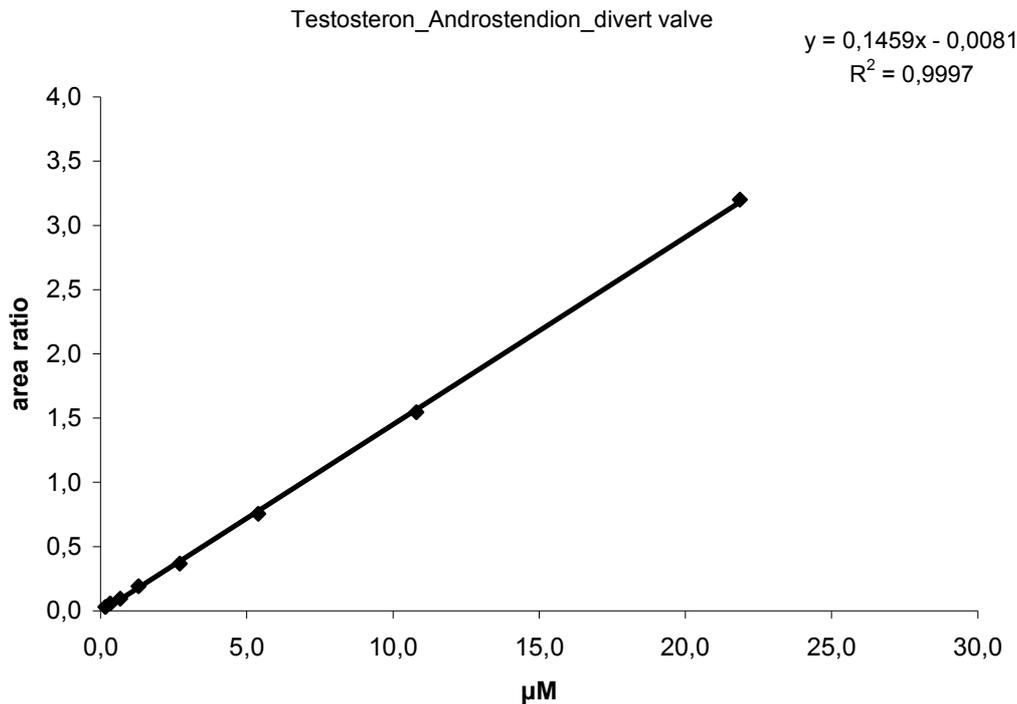


Abbildung 11: Testosteron mit internem Standard Androstendion

Man erkennt an den guten Korrelationen zwischen Konzentration und Detektion der Kalibrierfunktionen, dass die Schaltventilmethode sehr gut zur Messung der Caco-2 Proben mit den eingesetzten Testverbindungen geeignet ist. Somit ist eine enorme experimentelle und analytische Zeitersparnis möglich.

Die Kalibrierfunktionen entsprechen allerdings nicht den Funktionen der Flüssigextraktionen. Dies ist jedoch auch nicht für die analytische Genauigkeit erforderlich, da Proben und Kalibrierlösungen generell immer aus der gleichen Matrix und nach der gleichen „Behandlung“ gemessen werden sollen. Die Unterschiede im Verlauf der Kalibrierfunktionen der beiden Methoden können auf dem unterschiedlichen Salzgehalt der Proben beruhen, sie können allerdings auch durch gerätespezifische Parameter (z.B. Sauberkeit der Quadrupole) hervorgerufen werden. Diese Fehlerquelle wird dadurch eliminiert, dass man bei Quantifizierungen immer im selben Lauf mit unbekanntem Proben (bei längeren Messzeiten eventuell mehrmals) Kalibrierproben mitmisst.

1.2.2 LC/MS/MS- Analytik

Die Analyse der Proben nach der Probenaufarbeitung erfolgte nach Entwicklung der MS- und der HPLC-Methoden (Vorgehensweise s. „Material und Methoden“), nach Auswahl substanzspezifischer Ionen oder Fragmente per MS (bei bestimmten Einstellungen: z.B. Kollisionsenergie, tube lens offset) und Optimierung des HPLC-Gradienten. Es wurde generell mit ESI (Elektrospray Ionisation) und RP-Chromatographie (Reversed Phase) gearbeitet (eluotrope Reihe: Wasser< Methanol< Acetonitril), da diese für die untersuchten Verbindungen am besten geeignet waren.

Ziel aller Methoden war die höchstmögliche Selektivität (MS-detektor und chromatographische Trennung), hinreichende Sensitivität, kurze Retentionszeiten und Validität der Methoden. Für Quantifizierungen wurden generell der SRM- oder der SIM-Modus (s. Tabelle 9: „Beispiele für per ESI-MS/MS detektierte Ionen“) verwendet.

Verbindung	Parent Ion [M+H] ⁺	Product Ion [M+H] ⁺
Ketoprofen	255,24	208,93
Ranitidin-HCl	315,25	102,15
Testosteron	289,20	109,15

Tabelle 9: Beispiele für per ESI-MS/MS detektierte Ionen

Die Quantifizierung der Verbindungen erfolgte anhand der Integration der Peakflächen der Chromatogramme; ihre Identifizierung erfolgte über die dazugehörigen Massenspektren. Nachfolgend sind einige Beispiele für Chromatogramme mit den dazugehörigen SRM-Spektren angeführt (s. Abbildungen 12-14 und 15-17).

❖ Chromatogramme

Abbildung 12: Ketoprofen

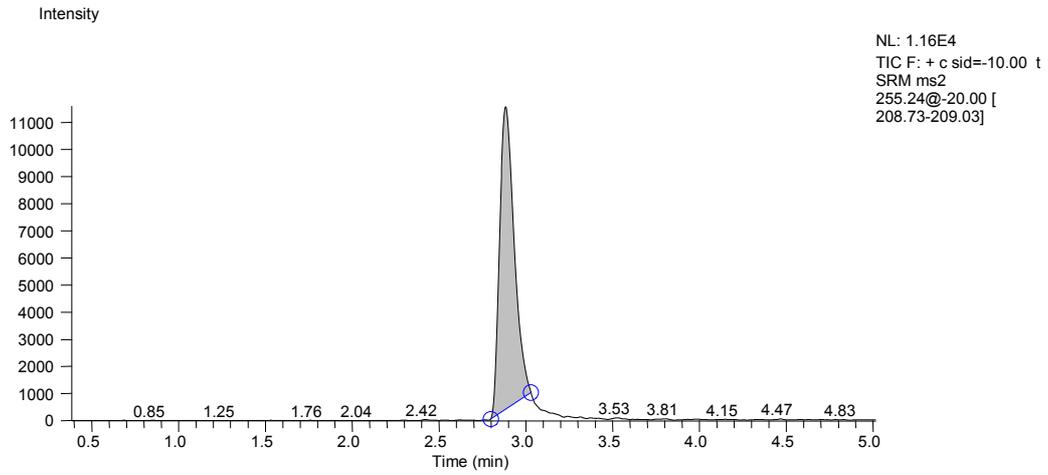


Abbildung 13: Ranitidin-HCl

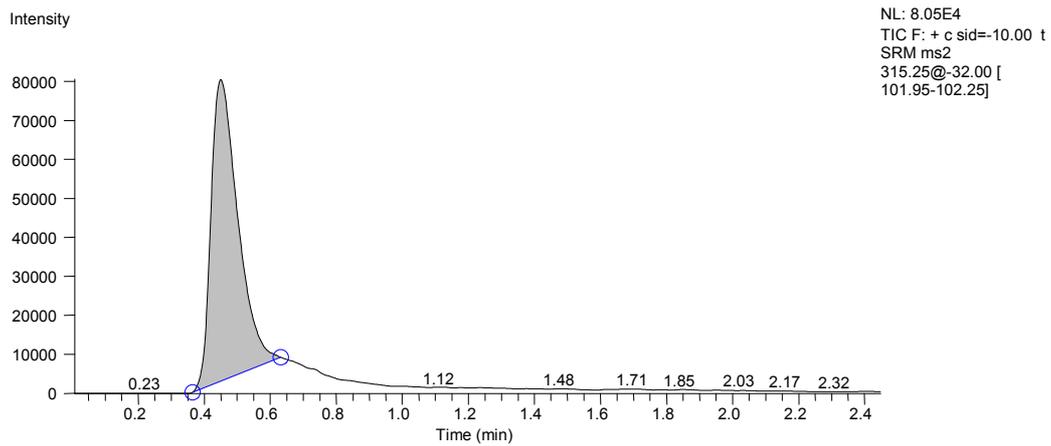
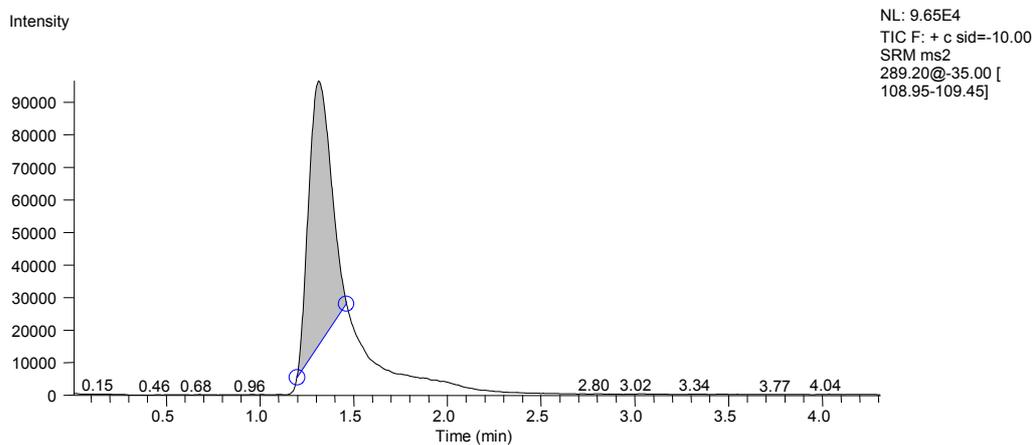


Abbildung 14: Testosteron



❖ **Massenspektren (Selected Reaction Monitoring- Modus)**

Abbildung 15: Ketoprofen

Relative Abundance

F: + c sid=-10.00 t SRM ms2 255.24@-20.00 [208.73-209.03]

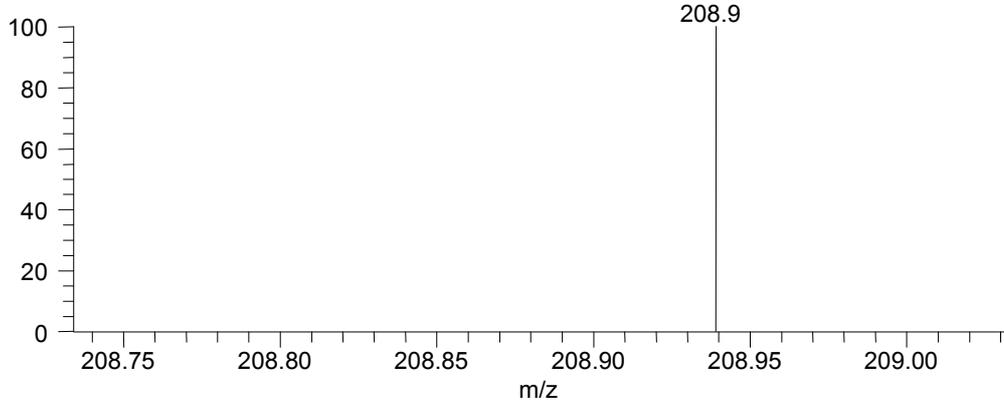


Abbildung 16: Ranitidin-HCl

Relative Abundance

F: + c sid=-10.00 t SRM ms2 315.25@-32.00 [101.95-102.25]

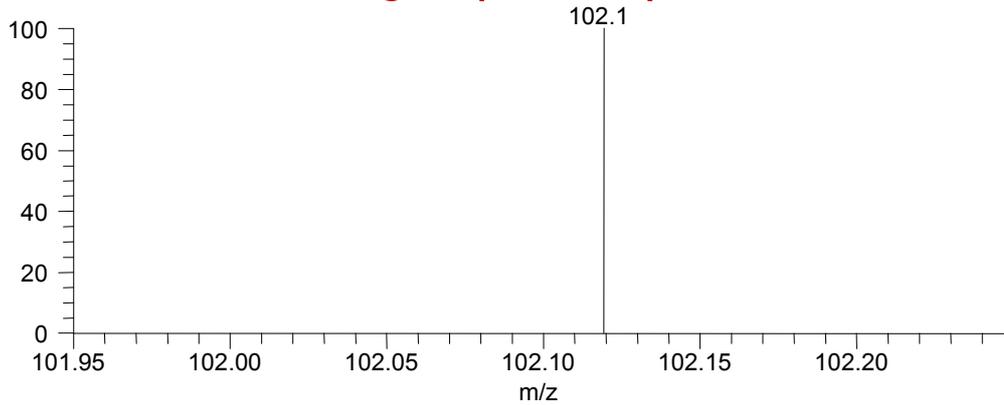
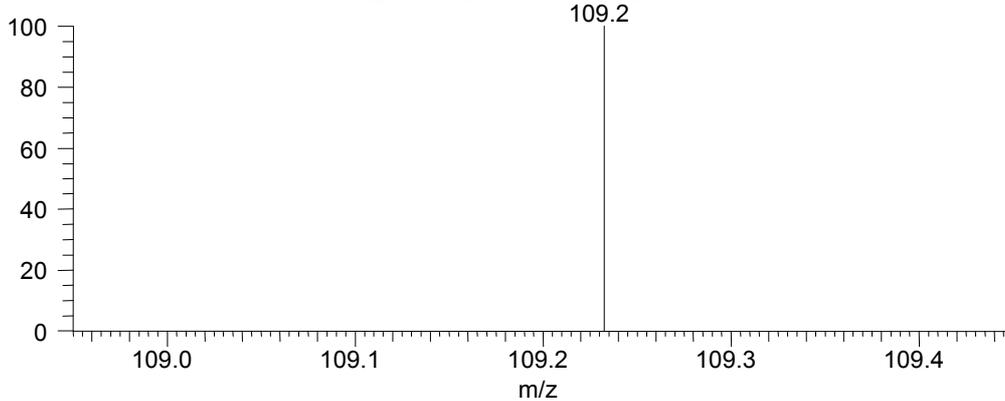


Abbildung 17: Testosteron

Relative Abundance

F: + c sid=-10.00 SRM ms2 289.20@-35.00 [108.95-109.45]



Ein weiterer großer Vorteil dieser Analysenmethode ist, dass man aufgrund der hohen Selektivität (MRM-Modus) mehrere Verbindungen simultan messen kann, was ebenfalls eine Zeitersparnis und eine Ersparnis an benötigtem Probevolumen (z.B. biologischer Proben) bei Gemischen bedeutet [Hakala et al., 2003]. Dieses Verfahren wurde daher auch für die Analyse der Caco-2 Referenzen im „cassette dosing approach“ und für die Messung der Kalibriergeraden angewendet.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde stets durch Dreifachinjektionen aller Proben kontrolliert, wobei die Standardabweichungen immer unter 10% lagen. Die Richtigkeit der Messungen wurde durch die Qualitätskontrollproben belegt.

2 5 α -Reduktase-Projekt

Nachdem das Caco-2 Modell und die prinzipielle Methodik zur LC/MS/MS-Analytik etabliert und validiert worden waren, wurden die Verfahren zur in vitro-Vorhersage der peroralen Bioverfügbarkeit von Forschungssubstanzen verschiedener Teilprojekte des Arbeitskreises (z.B. 5 α -Reduktase) angewendet.

2.1 Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes

Wie schon in der Einleitung erläutert existiert das Enzym 5 α -Reduktase in zwei Isoformen (Typ1 und Typ2), die irreversibel 4-en-3-Oxosteroide zu 5 α -3-Oxoverbindungen umwandeln. So produzieren sie auch das potenteste humane Androgen Dihydrotestosteron aus Testosteron (s. Abbildung 18 „Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron“).

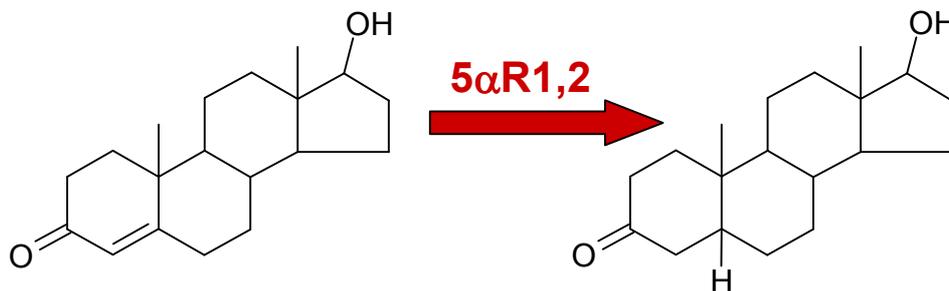


Abbildung 18: Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron

Der Ansatz des Projektes besteht darin, androgenabhängige Krankheiten wie z.B. BPH (Benigne Prostatahyperplasie) und PC (Prostatakarzinom) durch Hemmung der Biosynthese von Dihydrotestosteron zu therapieren. In diesem Zusammenhang wurden hochpotente, nichtsteroidale 5 α -Reduktase-Inhibitoren entwickelt. Außerdem wurde ein innovatives therapeutisches Konzept entwickelt- das Hybridkonzept.

➤ **Substanzklassen der besten Inhibitoren**

Es wurden u.a. zwei hochpotente Substanzklassen zur Hemmung der 5 α -Reduktase entwickelt: die Phenoxybenzoylphenyllessigsäuren (s. Abbildung 19 „Leitstruktur I“; [Dissertation Ola Ibrahim Abdel Salem, 2003]) und die 2`-substituierten, 4-(4`-carboxybenzyliden)-N-acyl-piperidine (s. Abbildung 20 „Leitstruktur II“; [Dissertation Franck Picard, 2002]).

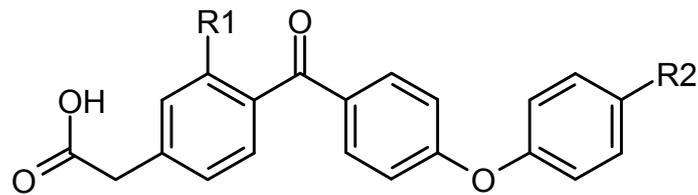


Abbildung 19: Leitstruktur I

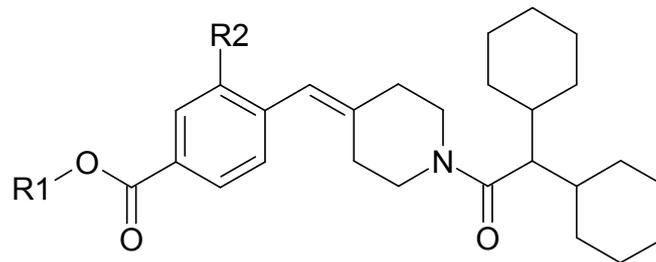


Abbildung 20: Leitstruktur II

Im Anschluss wurden ausgewählte Verbindungen der beiden Substanzklassen näher untersucht.

2.2 Perorale Verfügbarkeit ausgewählter Säuren

2.2.1 Caco-2 Modell

Zunächst wurde jeweils eine hochpotente Verbindung der beiden Substanzklassen als Modell zur Untersuchung der Permeabilität im Caco-2 Modell ausgewählt; es handelte sich um OR65 und FP7 (s. Tabelle 10 „Modellsubstanzen“).

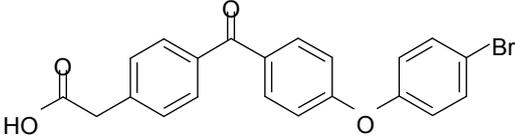
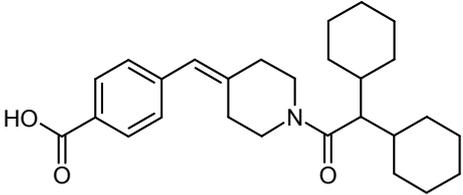
Verbindung	Struktur
OR65	
FP7	

Tabelle 10: Modellsubstanzen

Für beide Substanzen wurde zunächst die Analytik für Caco-2-Proben entwickelt und validiert (s. Abbildungen 21-26); im Anschluss wurden Caco-2 Permeabilitätstests durchgeführt.

➤ **Entwicklung der Probenaufarbeitung für Caco-2-Proben**

❖ **Kalibrierfunktionen nach LLE aus basolateraler Matrix**

Abbildung 21: OR65 mit internem Standard OR19

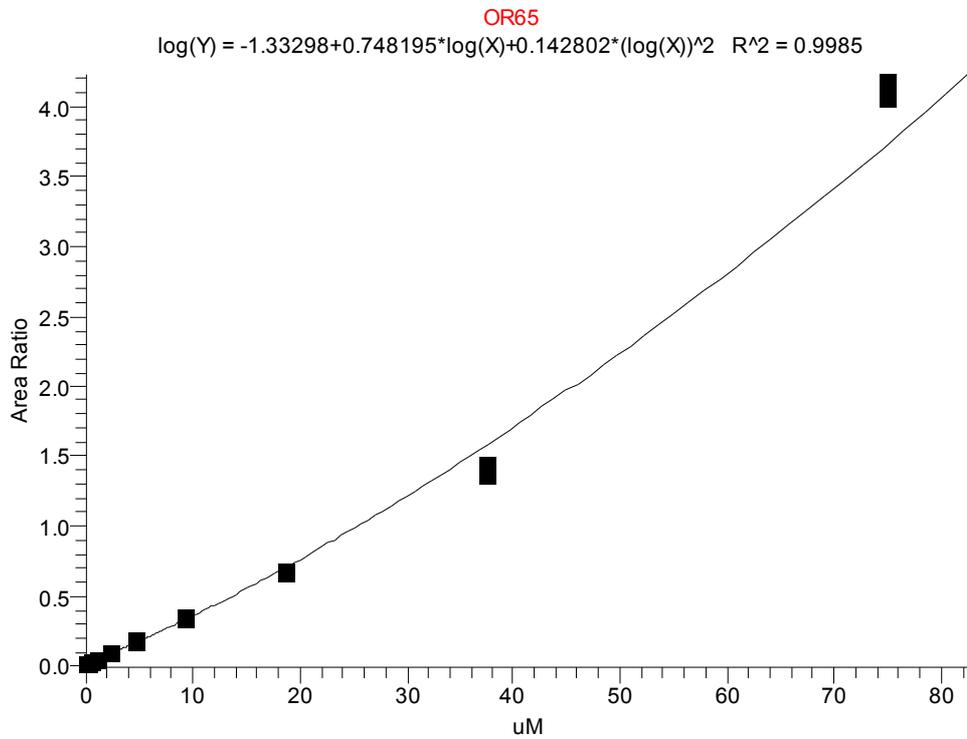
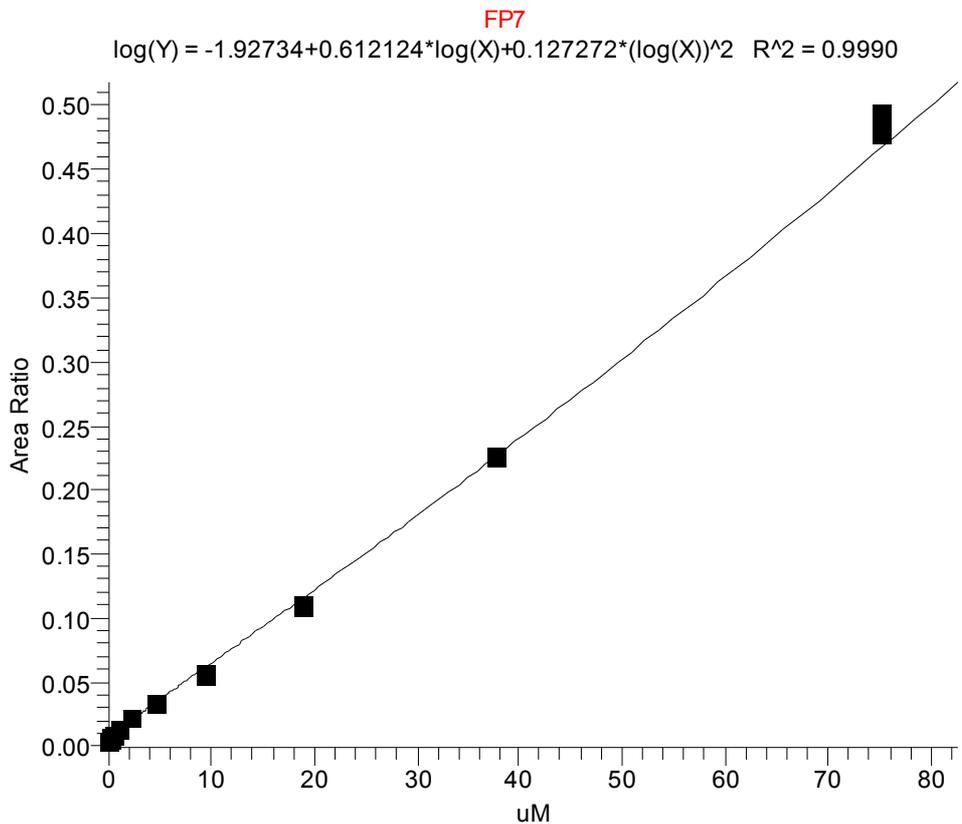


Abbildung 22: FP7 mit internem Standard FP42



❖ Kalibrierfunktionen nach LLE aus apikaler Matrix

Abbildung 23:OR65 mit internem Standard OR19

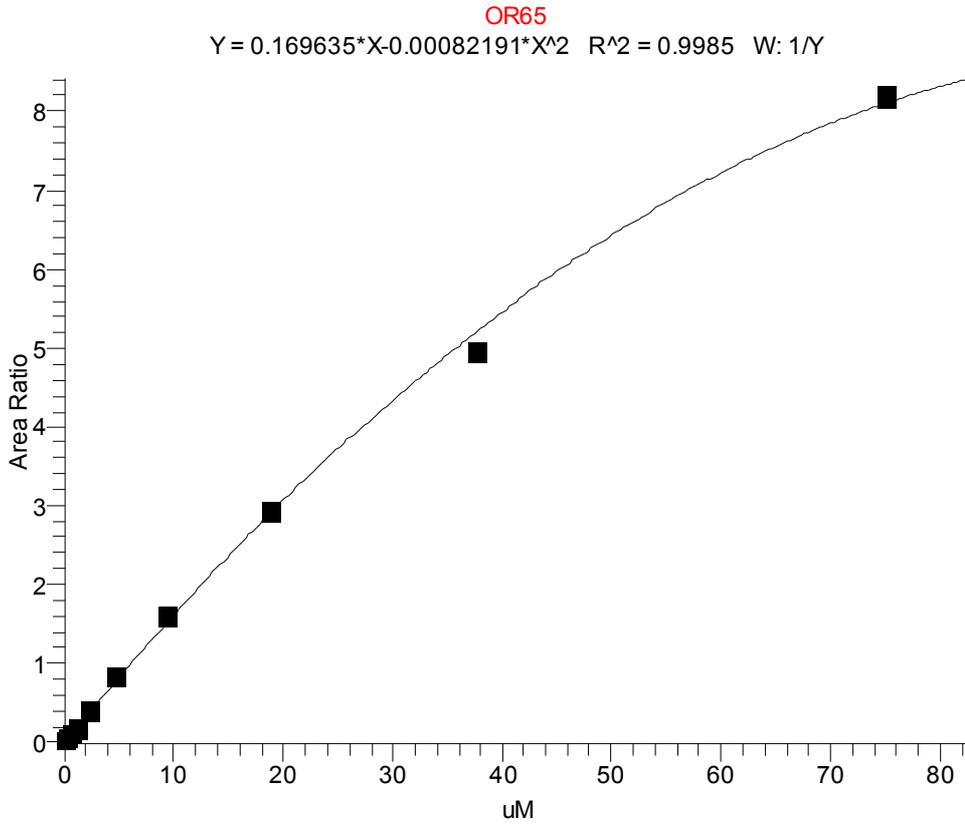
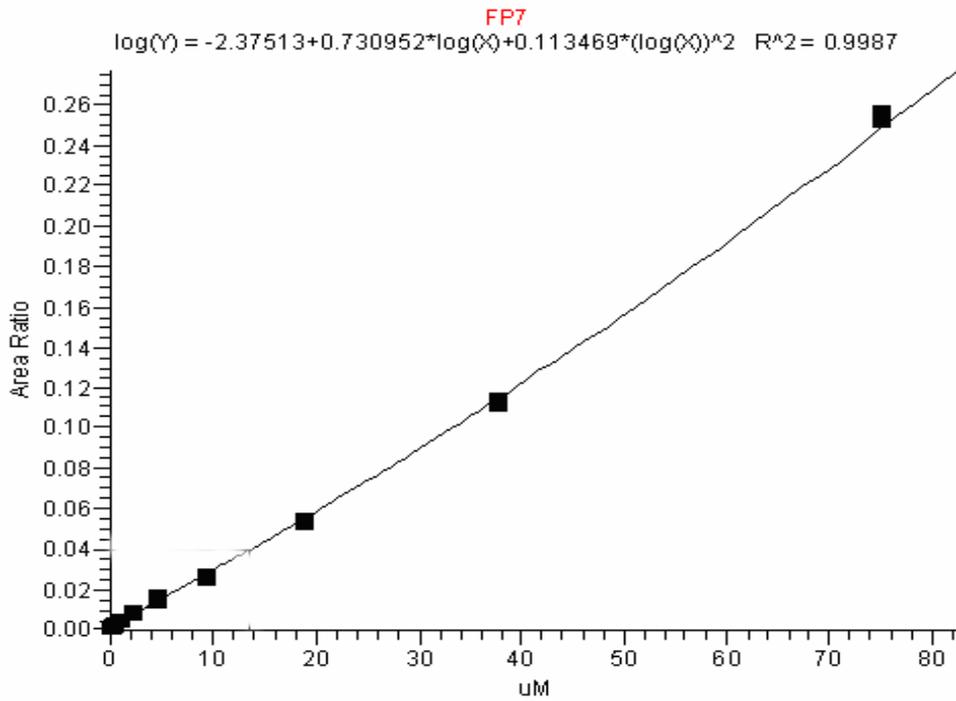


Abbildung 24:FP7 mit internem Standard FP42



❖ **Kalibrierfunktionen nach Entsalzung per Schaltventil aus Puffergemisch („apikal/basolateral“ wie „1/1“ [v/v])**
Abbildung 25:OR65 mit internem Standard OR19

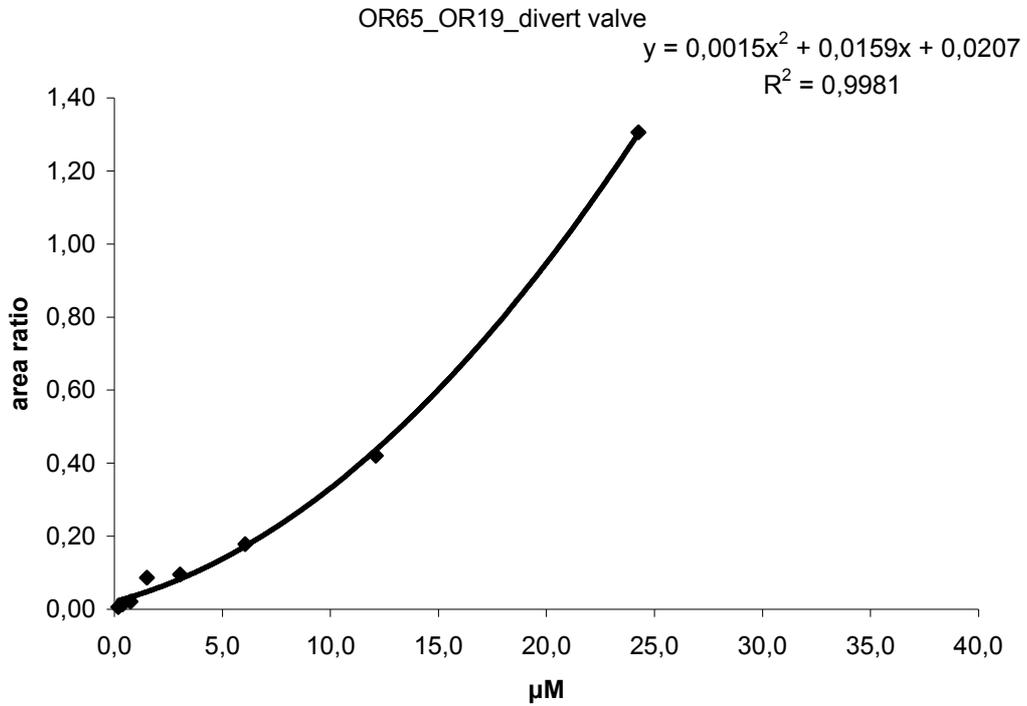
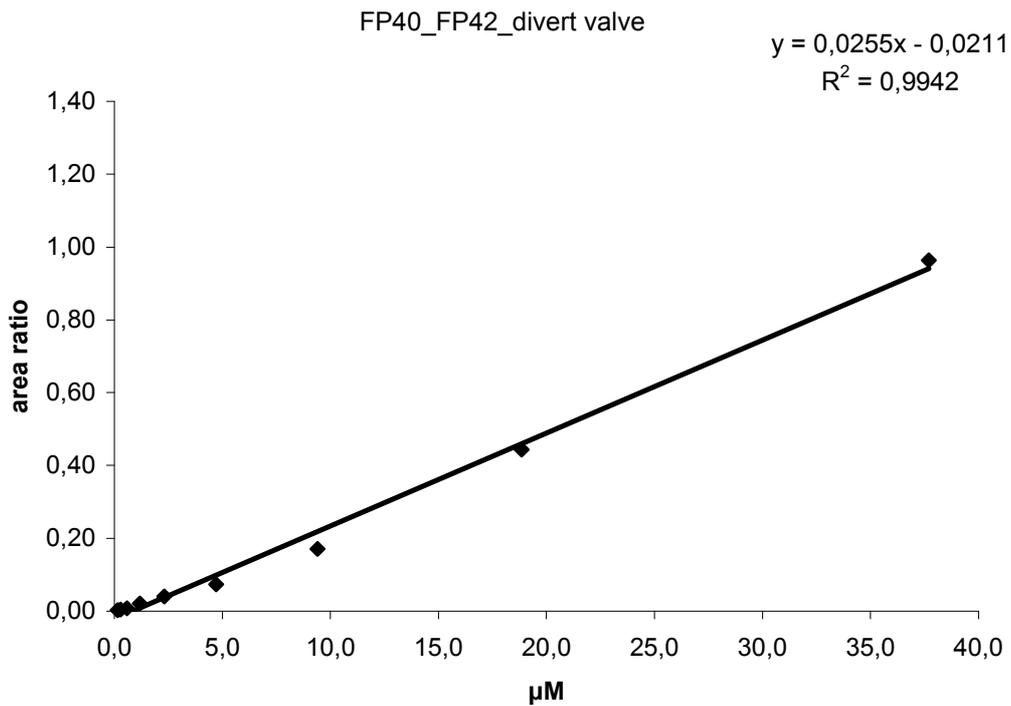


Abbildung 26:FP7 mit internem Standard FP42



➤ **Verfügbarkeit im Caco-2 Modell**

Nachdem die Methoden optimiert und validiert waren, wurden Caco-2 Tests durchgeführt und die Proben analysiert. Beide Verbindungen waren gut verfügbar (s. Tabelle 11 „Permeabilität im Caco-2 Modell“); FP7 im hohen Permeabilitätsbereich, OR65 im oberen mittleren Bereich.

Verbindung	$P_{app (A>B)}^2$ [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
FP7	14,2 ± 0,8
OR65	6,9 ± 1,3

Tabelle 11: Permeabilität im Caco-2 Modell

¹Startkonzentration im Donor: 50µM,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Da es sich bei beiden Substanzen um Carbonsäuren handelt, die bei physiologischem pH-Wert geladenen sind, war die gute Membrangängigkeit zunächst erstaunlich. Sie deutet auf einen aktiven Transportmechanismus hin (Monocarbonsäuretransporter [Hidalgo et al., 1996, Ogihara et al., 1996], Organischer Anionentransporter [Mizuno et al., 2003]); dieses Phänomen wurde jedoch nicht näher untersucht, da es für die Studie nicht von Interesse war.

Zur näheren Untersuchung der Kinetik wurden nach diesen guten in vitro-Ergebnissen auch in vivo-Versuche durchgeführt.

2.2.2 Verfügbarkeit in vivo

Die Kinetik von OR65 wurde nach peroraler Applikation (40mg/kg) in männlichen Ratten untersucht (Pharmacelsus CRO). Plasmaproben wurden über 24h gesammelt und per LC/MS/MS analysiert und die kinetischen Parameter wurden bestimmt. Zunächst stiegen die Plasmaspiegel in allen 5 Tieren des Versuchs kontinuierlich an und erreichten ihr Maximum (c_{max}) von 21 bis 48 $\mu\text{g/ml}$ nach 6 bis 8 Stunden (t_{max}). Danach fielen die Plasmaspiegel wieder kontinuierlich ab, aber die Substanz war immer noch nach 24h nachweisbar. Die Halbwertszeit betrug 5,5h bei einer Clearance von 119 ml/kg/h. Die Verbindung wurde also langsam absorbiert und relativ langsam eliminiert (hepatischer Fluss 2160 ml/kg/h), da sie entweder stark an Plasmaproteine gebunden wird oder metabolisch relativ stabil ist [Salem et al., 2006]. Die Verbindung war also gut in vivo verfügbar, was auch indirekt durch eine frühere Aktivitätsstudie bestätigt werden kann, in der durch die subkutane Applikation der Verbindung in einer Dosis von 9,2 mg/kg das Prostatagewicht von Ratten um 35% abgesenkt werden konnte [Pharmacelsus CRO, internal report].

Die perorale Kinetik von FP7 wurde nicht in vivo untersucht, da in dieser Substanzklasse (Leitstruktur II) in der Zwischenzeit ein Hybridhemmkonzept entwickelt wurde, das aufgrund mangelnder Homologien zwischen den humanen und den ratteneigenen Enzymen (in Ratten sind nur die Säuren wirksam, nicht aber die Ester) in der Ratte nicht beweisbar ist. Allerdings wurde in früheren Studien die Aktivität der Verbindung bezüglich der Reduktion des Prostatagewichtes von Ratten in vivo nach intraperitonealer Applikation und peroraler Applikation in jeweils einer Dosis von 11,3 mg/kg untersucht, was ein indirekter Beweis für ihre Verfügbarkeit ist, da ein deutlicher Effekt erzielt wurde. Die perorale Applikation führte zu 36%-iger Reduktion des Prostatagewichtes, die subkutane Applikation zu 49%-iger Abnahme [Picard et al., 2002].

2.3 Hybridhemmkonzept

Für die Langzeittherapie chronischer Erkrankungen wie BPH ist die perorale Applizierbarkeit der Wirkstoffe erstrebenswert. Daher wurden verschiedene perorale in vivo-Tests in Ratten zur Reduktion des Prostatagewichtes durchgeführt [Picard et al., 2002], um die Applizierbarkeit auf diesem Weg zu untersuchen. In diesen Studien waren jedoch die Carbonsäuren weniger aktiv als erwartet obwohl sie im in vitro-Test (Rattenprostatahomogenat) hochpotent waren, was auf eine mögliche niedrige Membrangängigkeit in vivo zurückgeführt wurde (s. Abbildung 20 „Leitstruktur II“). Deshalb wurden als Prodrugs verschiedene Carbonsäureester hergestellt (physiologisch ungeladen: voraussichtlich besser membrangängig), die dann möglichst nach erfolgter Membranpassage im Zielorgan durch Esterasen gespalten werden sollten, um das aktive Agens- die Säure- freizusetzen. Die Reduktion des Prostatagewichtes nach peroraler Applikation des Methylesters von FP7 war jedoch nicht höher als die der Säure [Pharmacelsus CRO, internal report].

In späteren Studien wurde dann überraschenderweise festgestellt, dass die Ester hochpotente Inhibitoren der humanen 5α -Reduktase waren (allerdings zeigten sie schlechte Hemmwirkung am Rattenenzym) [Dissertation Streiber, 2006]. Außerdem stellte sich heraus, dass die Säuren im Vergleich zu ihren korrespondierenden Estern eine hohe Selektivität gegenüber dem humanen Typ2-Isoenzym zeigten (die Säuren zeigten auch Aktivität am Rattenenzym Typ2). Aus diesem Befund wurde das innovative Hybridhemmkonzept entwickelt (s. Abbildung 27 „Hybridhemmkonzept der 5α -Reduktase“).

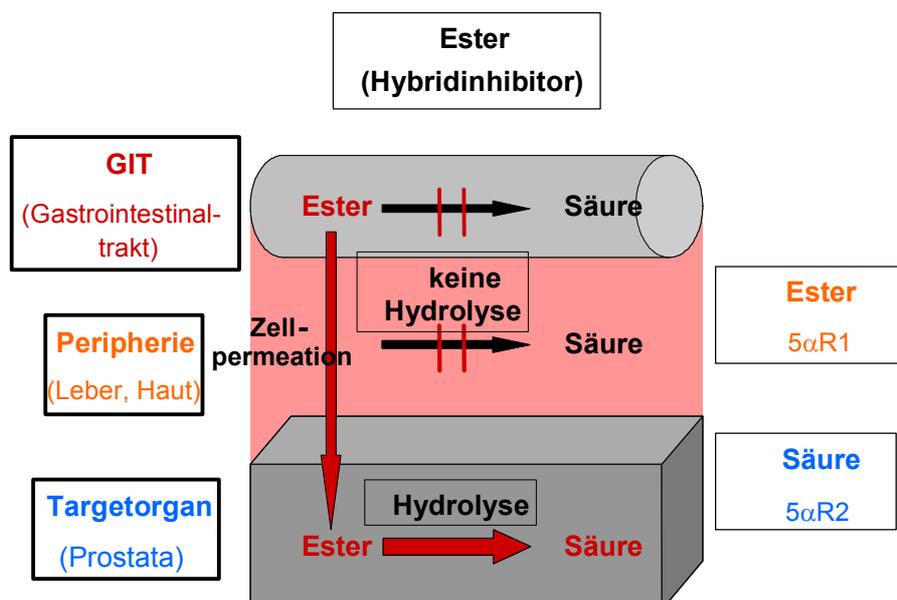


Abbildung 27: Hybridhemmkonzept der 5α -Reduktase

Die Ester (s. Abbildung 20 „Leitstruktur II“) könnten also im Menschen gemäß der innovativen Theorie in der Peripherie (bevorzugt peroral) als Hybridinhibitoren appliziert werden. Hier sollten sie- möglichst ohne gespalten zu werden- das humane Isoenzym Typ 1 hemmen und relativ stabil bis ins Targetorgan gelangen, um dann dort in hohem Ausmaß ihre jeweilige korrespondierende Carbonsäure freizusetzen, die das in der Prostata vermehrt vorkommende Isoenzym Typ2 hochpotent hemmen würde. Der große Vorteil des Prinzips wäre also, dass man nur eine Verbindung applizieren müsste, die gleichzeitig als Drug und als Prodrug wirken würde (Hybridinhibitor). Man müsste also nur einmal die Pharmakokinetik optimieren und nur einfache klinische Studien durchführen. Der Vorteil gegenüber den bereits klinisch verwendeten dualen Inhibitoren wäre das aufgrund der höheren Selektivität zu erwartende, geringere Nebenwirkungspotential der Hybridinhibitoren.

Zur Verifizierung des innovativen Modells wurden verschiedene in vitro-Systeme verwendet. Ein „proof of concept“ in vivo war leider aufgrund mangelnder Interspezieshomologie zwischen Mensch und Ratte nicht möglich (Homologie der Aminosäuresequenz der Isoenzyme bei Typ 1: 60%; bei Typ2: 77% [Dissertation Panter, 2004]). Dazu müssen noch ein geeignetes Modell bzw. in der Ratte wirksame Hybridinhibitoren gefunden werden.

2.3.1 Perorale Verfügbarkeit ausgewählter Ester im Caco-2 Modell

Um das Hybridkonzept realisieren zu können, müssen die Carbonsäureester in der Peripherie applizierbar und relativ stabil gegenüber peripheren Esterasen sein. Der bevorzugte Applikationsweg wäre peroral. Zur Untersuchung der gastrointestinalen Permeabilität und Stabilität wurden die am humanen Enzym potentesten Verbindungen ausgewählt (s. Abbildung 28 „5 α -Reduktase-Inhibitoren“). Außerdem wurden zum Vergleich bzw. zur Bestätigung des aktiven Transportes die korrespondierenden Säuren einiger Ester mitgetestet.

Die Säuren könnten auch alleine zur BPH-Therapie eingesetzt werden, wenn sie gut peroral verfügbar wären, falls das auf der Verabreichung der Ester basierende Hybridkonzept peroral nicht realisierbar wäre.

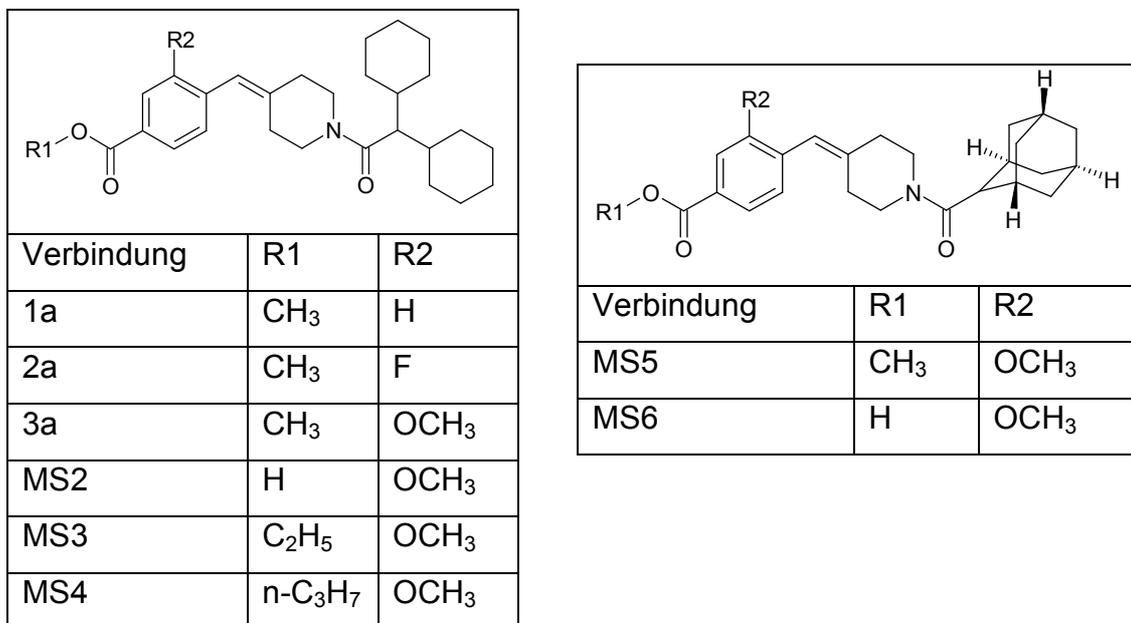


Abbildung 28: 5 α -Reduktase-Inhibitoren

➤ **Permeabilität im Caco-2 Modell**

Die Permeabilität der Verbindungen wurde anhand des optimierten Caco-2 Modells untersucht und die Analyse der Proben erfolgte per LC/MS/MS (Schaltventilmethode) (s. Tabelle 12 „Permeabilität im Caco-2 Modell“). Die Validierung der Messungen erfolgte wie oben beschrieben (durch Qualitätskontrollproben und externe Standards zur Detektionskontrolle).

Verbindung	$P_{app}^1_{(A>B)2}$ [$X \cdot 10^{-6} \text{cm/sec}$] [MW \pm rel. SD] ³
1a	0,4 \pm 0,1
2a	N.D. ⁴
3a	N.D. ⁴
MS2	8,0 \pm 1,6
MS3	N.D. ⁴
MS4	N.D. ⁴
MS5	N.D. ⁴
MS6	34,5 \pm 2,5

Tabelle 12: Permeabilität im Caco-2 Modell

¹ apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert \pm relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Alle ausgewählten Ester (1a-3a, MS3-5) zeigten eine niedrige bzw. nicht detektierbare Absorption im Caco-2-Modell. Da eine so niedrige Caco-2 Permeabilität bei passiv transzellulär transportierten Substanzen allerdings gut mit einer schlechten humanen peroralen Bioverfügbarkeit korreliert [Lennernäs et al., 1998; Artursson et al., 1991], sollte dieses Problem näher untersucht und nach Möglichkeit beseitigt werden. Als mögliche Ursachen wurden Efflux durch das Glycoprotein P (P-gp) und mangelnde Permeabilität der Ester wegen ihrer relativ hohen Lipophilie in Betracht gezogen. Die logP-Werte der Ester liegen nämlich alle

über 5 [Dissertation Dossou, 2006], was laut „Lipinski`s rule of 5“ eigentlich die Obergrenze der Lipophilie für passiv transzelluläre Permeabilität ist.

Nach Aufklärung der Ursache der mangelnden Permeabilität sollte dann entweder durch P-gp-Inhibitoren oder durch Absorptionsverbesserer der Transport der Ester über die vermutete passiv transzelluläre Route verbessert werden, um das Hybridkonzept auf dem peroralen Weg zu ermöglichen.

Die beiden Carbonsäuren MS2 und MS6 zeigten hingegen eine mittlere bis hohe Permeabilität, was die Hypothese der aktiven Aufnahme der Carbonsäuren (z.B. über Monocarbonsäuretransporter) erneut manifestiert. Die Adamantylverbindung MS6 wird sogar noch besser aufgenommen als die Dicyclohexylderivate, was eventuell auf ihre höhere Kompaktheit zurückzuführen ist, wodurch sie eventuell besser in die Bindetasche des Carriers passt. Falls ein gemischter Transport vorliegt, wäre die größere Kompaktheit (näher an Kugelform: kleinere Oberfläche) für einen teilweise passiv transzellulären Transport ebenfalls günstiger.

2.3.2 Untersuchung der Ursachen der mangelnden Esterpermeabilität im Caco-2 Modell

2.3.2.1 Test auf Efflux durch P-gp

➤ Allgemeine Bedeutung von P-gp in der Absorption von Substanzen

Die Aufnahme verschiedenster Verbindungen (z.B. von Arzneistoffen, Nährstoffen, Peptiden) aus dem Dünndarm wird durch Transportenzyme der Enterozyten kontrolliert. Dabei fördern Influxtransporter (z.B. PEPT1, OAT, OCT) die Aufnahme aus dem Darmlumen in die systemische Zirkulation; Effluxtransporter (z.B. MRP, MDR) fördern die Sekretion aus der systemischen Zirkulation in den Darm, d.h. die Ausscheidung [Mizuno et al., 2003]. Eine besondere Bedeutung bei dieser Ausscheidung besitzt Glycoprotein P (P-gp), da es stark exprimiert wird und eine sehr breite Substratspezifität aufweist, womit es die Absorption zahlreicher Verbindungen (z.B. Arzneistoffe) limitiert, was zu einer „drug resistance“ führen kann [Mizuno et al., 2003].

P-gp ist ein glykosyliertes, transmembranäres Protein (170 kDa), das in zahlreichen Geweben exprimiert wird und gehört zur Familie der ATP-binding cassette transporter-Familie [Luciani et al., 2002].

➤ Bedeutung von P-gp in der Absorption der 5 α -Reduktase-Inhibitoren

Der Efflux zweier Modellverbindungen- eines Esters (1a) und einer Säure (FP7)- sollte untersucht werden. Als Referenzen wurden das bekannte P-gp-Substrat Erythromycin und der P-gp-Inhibitor Verapamil eingesetzt [Saito et al., 2000, Laitinen et al., 2003]. Die Inkubation wurde nach dem optimierten Schema durchgeführt. Allerdings wurde die Permeabilität der Verbindungen nicht nur von apikal nach basolateral (absorptive Richtung), sondern auch von basolateral nach apikal (sekretorische Richtung) untersucht. Zur Hemmung des P-gp-Effluxes wurde den entsprechenden Donorlösungen der Testverbindungen Verapamil (500 μ M) zugesetzt und mit inkubiert (nach der Präinkubation in HBSS). Die Probenziehung erfolgte nach 0min, 1h, 2h und 3h (s. „Optimierung der Caco-2-Tests“ und „Material und Methoden“) und die Permeabilitäten wurden bestimmt (s. Tabelle 13 „Test auf Efflux durch P-gp“).

Verbindung	$P_{app}^{1(A>B)}$ ² [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ⁴	$P_{app}^{1(B>A)}$ ³ [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD]	$P_{app}^{1(A>B)}$ mit Verapamil [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD]
FP7	14,2 ± 0,8	12,3 ± 0,6	32,7 ± 2,1
1a	0,4 ± 0,1	N.D.	0,2 ± 0,1
Erythromycin	N.D. ⁵	21,9 ± 1,0	0,6 ± 0,2

Tabelle 13: Test auf Efflux durch P-gp

¹ apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Transport von basolateral nach apikal,

⁴Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁵nicht detektierbar

Wie erwartet zeigt die Referenzsubstanz Erythromycin ohne P-gp-Inhibitor keine messbare Permeabilität in der absorptiven Richtung und eine hohe Permeabilität in der sekretorischen Richtung [Saito et al., 2000], wodurch die P-gp-Expression der Caco-2 Monolayer nachgewiesen wird. Durch Zusatz des Effluxinhibitors Verapamil steigt seine Absorption an.

Die Carbonsäure FP7 scheint zunächst vom Verhältnis zwischen absorptiver und sekretorischer Permeation her kein Substrat des Effluxproteins zu sein. Ihre Absorption im Gemisch mit Verapamil steigt jedoch deutlich an, was zeigt, dass sie doch ein P-gp-Substrat ist, wenn auch ein schwaches. Dies hätte auf die Therapie von BPH (gutartiges Gewebe der Prostata, Aufnahme aus gesundem Gastrointestinaltrakt) jedoch keinen nachteiligen Einfluss, da Effluxproteine bekanntermaßen in Krebszellen (z.B. in Caco-2) überexprimiert werden [Hidalgo et al., 1996].

Die Permeabilität des Carbonsäureesters 1a war mit und ohne P-gp-Inhibitor sehr niedrig, woraus geschlossen werden kann, dass er kein Substrat des Effluxproteins ist, da der P-gp-Inhibitor gemäß der Ergebnisse der anderen Substanzen in hinreichender Konzentration eingesetzt wurde (500µM). Es wurde folglich davon ausgegangen, dass die anderen Ester (2a, 3a) auch keinem Efflux unterliegen, da die strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen sehr hoch ist.

➤ **Fazit**

Nachdem als Ursache für eine mangelnde Absorption der Ester der Efflux per P-gp ausgeschlossen worden war, wurde die hohe Lipophilie der Verbindungen als Hauptursache angenommen, da der logP-Wert aller Verbindungen über 5 lag (Lipinski's rule of 5). Daher sollten nun transzelluläre Absorptionsverbesserer getestet werden.

2.3.2.2 Test auf Permeabilitätsverbesserung durch Cyclodextrine

➤ Eigenschaften von Cyclodextrinen

Cyclodextrine sind ringförmige, enzymatische Abbauprodukte von Stärke (durch Glykosyltransferasen), die aus 1,4- α -D(+)-glykosidischen Glucopyranose-Einheiten bestehen (s. Abbildung 29 „Einheiten der Cyclodextrine“).

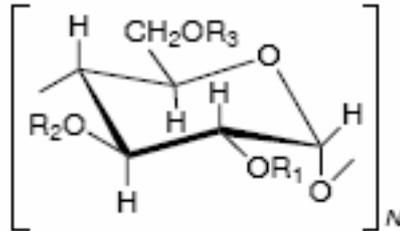


Abbildung 29: Einheiten der Cyclodextrine

Die häufigsten Typen sind verschieden substituierte (an R_1 , R_2 , R_3) 6-, 7-, oder 8-gliedrige Ringe, die als α -, β -, oder γ -Cyclodextrine bezeichnet werden (s. Abbildung 30 „ β -Cyclodextrine“). Sie bilden Hohlräume von 0,5- 0,8nm Durchmesser.

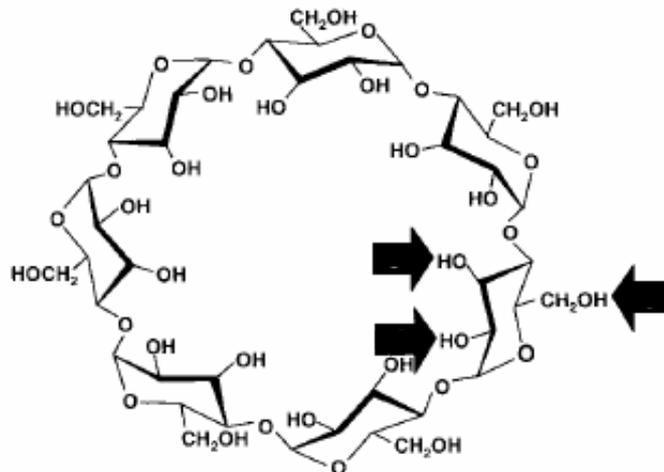


Abbildung 30: β -Cyclodextrine

(Pfeile: Substituierte Positionen [Uekama et al., 1998])

Es werden drei Hauptgruppen von Cyclodextrinen je nach Substitutionsmuster unterschieden: hydrophile, hydrophobe und ionisierbare Derivate [Uekama et al., 1998]. Bei den hydrophilen Cyclodextrinen bestehen die Reste aus Methylgruppen, Hydroxyalkylgruppen oder Zuckern. Hydrophobe Cyclodextrine sind alkyliert (Alkane > Methylkette) und acyliert, ionisierbare Cyclodextrine tragen Carboxylat- oder Sulfatreste.

➤ **Allgemeine Bedeutung von Cyclodextrinen in der Absorption von Substanzen**

Die Cyclodextrine wurden 1891 erstmals von Villiers isoliert. Sie wurden 1903 von Schardinger als zyklische Oligosaccharide charakterisiert und Pringsheim zeigte zwischen 1911 und 1935, dass sie in wässrigen Lösungen stabile Komplexe mit anderen Verbindungen ausbilden können. Danach (1954) fand Cramer heraus, dass die Einschlussverbindungen von Gastmolekülen in die Cyclodextrine (= Wirtsmoleküle) unter Ausbildung elektrostatischer, nicht-kovalenter Wechselwirkungen entstehen [Gröger et al., 2001; Cram et al., 1998]. Dabei nehmen die Cyclodextrine hydrophobe Verbindungen in ihre konische (nicht zylindrische) hydrophobe Kavität auf, während sie mit ihrer äußeren, hydrophilen Oberfläche in Wechselwirkung mit dem wässrigen Milieu (Wassermolekülen) der Umgebung stehen (s. Abbildung 31 „Modellvorstellung der Cyclodextrine als Transportsystem“).

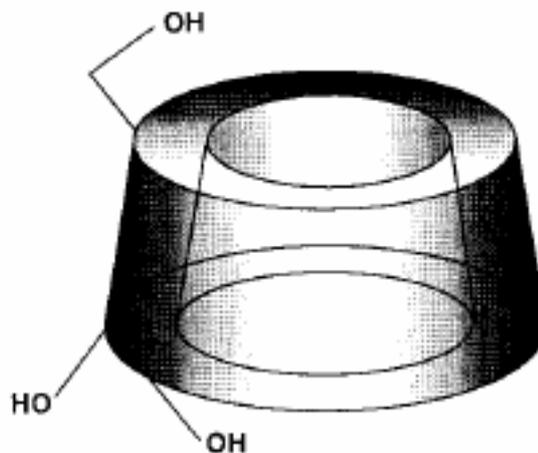


Abbildung 31: Modellvorstellung der Cyclodextrine als Transportsystem

(hydrophobe Kavität für Gast, hydrophile äußere Oberfläche)

Aufgrund dieser Fähigkeit der Cyclodextrine mit Gastmolekülen reversible Einschlussverbindungen auszubilden (drug carrier, host), finden sie u.a. umfassende pharmazeutische Anwendung als Lösungsvermittler in wässrigem Milieu und als Absorptionsverbesserer (z.B. peroral, transdermal). Bei der Absorptionsverbesserung transportieren sie das Gastmolekül zur biologischen Membran, ohne dass es eine den Eintritt in die Membran störende Hydrathülle (Wasserstoffbrückenbindungen) ausbilden kann. Sie geben den Gast direkt in die Membran ab (shuttle).

Voraussetzung für die Effektivität eines Cyclodextrins zur Absorptionsverbesserung eines Gastmoleküls ist also, dass sich ein Komplex ausbilden kann, der stabil genug zum Transport zur Membran ist, aber dessen Dissoziationskonstante hoch genug ist, um das Molekül an die biologische Membran abzugeben.

Außerdem können die Cyclodextrine sich in die biologischen Membranen einlagern, wodurch sie deren Fluidität erhöhen [Shah et al., 2004] und somit die Permeabilität lipophiler Verbindungen steigern.

Es existieren auch schon Arzneistoffe, deren perorale Verfügbarkeit durch Kombination mit Cyclodextrinen erhöht wird (Bsp. Brexidol®-Tabletten). Dabei werden die Cyclodextrine nicht bzw. in vernachlässigbarer Konzentration in die systemische Zirkulation aufgenommen.

Am besten auf ihre Unbedenklichkeit untersucht sind die beta-Cyclodextrine. Sie wurden 1997 in den USA in die GRAS-Liste (generally recognized as safe) aufgenommen und werden auch in Lebensmitteln und kosmetischen Produkten verwendet [Gröger et al., 2001].

➤ **Bedeutung von Cyclodextrinen in der Absorption der 5α -Reduktase-Inhibitoren**

❖ **Herstellung der Caco-2-Inkubationslösungen mit Cyclodextrinen**

Es wurden Stammlösungen der Testverbindungen in DMSO und Stammlösungen der verschiedenen Cyclodextrine in apikalem Inkubationspuffer hergestellt. Diese wurden dann mit apikalem Inkubationspuffer auf die gewünschten Testkonzentrationen verdünnt. Die Verbindungen standen dabei in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zu den Cyclodextrinen. Verwendet wurden β -Cyclodextrin, 3-Methyl- β -Cyclodextrin und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. Zur Komplexbildung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

❖ **Validierung der LC/MS-Detektion durch Messung von Kalibrierfunktionen**

Zur Sicherstellung, dass die Cyclodextrine, da sie grenzflächenaktive Substanzen sind, nach Probenaufarbeitung die Detektion per LC/MS/MS nicht nachteilig beeinflussen, wurden Kalibrierfunktionen mit und ohne CD aufgenommen. Zur Probenaufarbeitung wurden die Lösungen, um die im Sauren instabilen Cyclodextrinkomplexe [Gröger et al., 2001; Loftsson, 1998] vor der Injektion schon weitgehend zu zerstören mit 1N-HCl versetzt (5%v/v). Durch die anschließende Wechselwirkung mit der chromatographischen Säule wurden die restlichen Cyclodextrinkomplexe weitgehend zerstört und per Schaltventil vor der Injektion in die Ionenquelle entfernt. Dies wurde auch durch die Detektion per UV nachgewiesen, da kein Cyclodextrinpeak mehr vorhanden war. Die Detektion per MS war nicht möglich, da die Masse der Komplexe oberhalb des Massenbereichs des TSQ-Quantums liegt. Die getesteten Proben enthielten die für den Caco-2- Test geplanten Cyclodextrine in den maximalen Konzentrationen in apikalem Puffer: β -Cyclodextrin (1,8%*m/v*), 3-Methyl- β -Cyclodextrin (5%*m/v*) und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (5%*m/v*). Der Einfluss niedrigerer Konzentrationen auf die Detektion wurde vorerst nicht getestet, da er als geringer eingestuft wurde. Er sollte später untersucht werden, falls sich die hohe Cyclodextrinkonzentration als störend erwiesen hätte. Als Gastmolekül wurde die Verbindung „1a“ eingesetzt (s. Abbildung 32: „Kalibrierfunktionen von 1a \pm Cyclodextrin“).

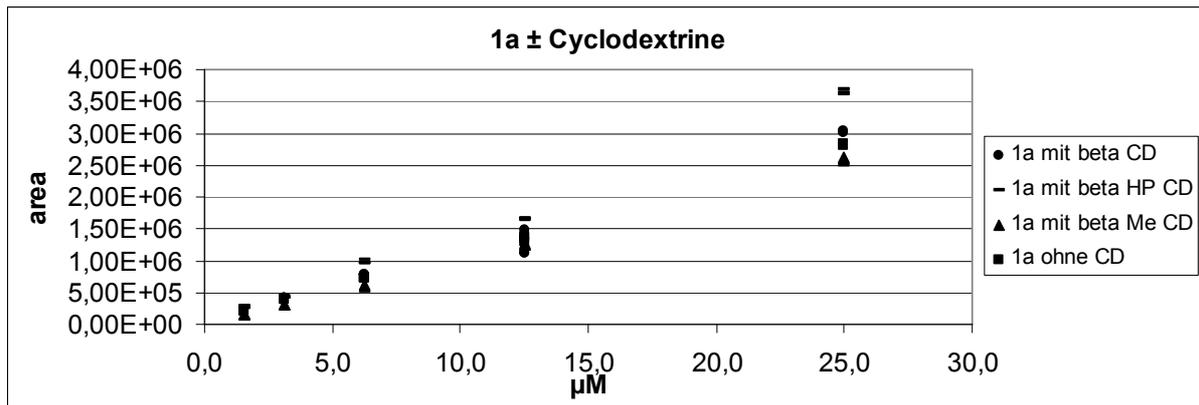


Abbildung 32: Kalibrierfunktionen von 1a ± Cyclodextrin

Alle Kalibriergeraden lagen im gleichen Bereich und verliefen mit geringen Abweichungen nach der gleichen Funktion. Die Konstanz der Detektion wurde durch Dreifachinjektion aller Proben kontrolliert.

Nachdem somit die konstante, ungestörte Detektion gesichert war, wurden Caco-2-Tests mit den Cyclodextrinen unter dem Aspekt der Absorptionsverbesserung [Hovgaard et al., 1995] durchgeführt.

❖ Caco-2 Tests mit Cyclodextrinen als Absorptionsverbesserer

Untersucht wurden die Ester 1a, 2a und 3a mit den drei genannten Cyclodextrinen in den üblichen Konzentrationen für Caco-2-Tests: β -Cyclodextrin in einer Konzentration von 1,8% [m/v], da es darüber nicht löslich und zytotoxisch ist [Hovgaard et al., 1995; Uekama et al., 1998]), 3-Methyl- β -Cyclodextrin und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in einer Konzentration von 5% [m/v]. Außerdem wurde der Einfluss auf die Permeabilität in einem Verhältnis von Cyclodextrin zu Ester von „1 zu 1“ untersucht, um herauszufinden, welche Funktion die Cyclodextrine hier beim Transport erfüllen- nur einen „shuttle“ [Gröger et al., 2001; Loftsson et al., 1998] oder auch eine Änderung der Membranstruktur [Grosse et al., 1998; Shah et al., 2004].

Wenn die Gastmoleküle mit den Cyclodextrinen stöchiometrische 1:1-Komplexe bilden würden, dann müsste die Verbesserung der Permeabilität bei einem äquimolaren Verhältnis von Inhibitor zu Cyclodextrin genauso hoch sein, wie bei Verabreichung eines hohen Cyclodextrin-Überschusses von 1,8% bzw. 5% (molarer Überschuss von CD zu Inhibitor: β -CD: >300, β -Me-CD: >700, β -HP-CD: >600). Falls die Permeabilitätsverbesserung mit dem hohen Überschuss jedoch höher ausfallen

sollte, dann würden entweder keine stöchiometrischen 1:1-Komplexe gebildet werden, oder die Cyclodextrine hätten noch einen zusätzlichen Einfluss auf die Zellmembranen der Donorseite des Caco-2 Modells (bzw. auf das Applikationskompartiment der Cyclodextrine).

Zunächst wurde ein verkürzter Caco-2-Test nur über zwei Stunden durchgeführt, um das Risiko einer eventuellen Membranschädigung durch die Cyclodextrinbelastung möglichst gering zu halten. Die Testverbindungen wurden als Komplexe mit den Cyclodextrinen im Donorkompartiment mit den Zellen koinkubiert. Laut Lucifer Yellow-Kontrolle waren die Zellmonolayer nach Testende noch alle intakt, d.h. die Ergebnisse bezüglich der Membrangängigkeit der Ester waren aussagekräftig.

Dieser erste Test wurde mit der Modellverbindung 1a mit einem Überschuss der verschiedenen Cyclodextrine durchgeführt. Die Verbindung konnte jedoch in keiner Kombination im Akzeptorkompartiment nachgewiesen werden, was vermutlich an der zu kurzen Inkubationsdauer lag. Die Wiederfindung im System zu Testende hatte sich allerdings verändert (s. Tabelle 14 „Wiederfindungsrate von 1a mit verschiedenen CDs nach 2h im Caco-2-Test“).

Verbindung 1a	Wiederfindung [%] [MW \pm rel. SD] ¹
ohne CD ²	82,1 \pm 1,0
mit 1,8% [m/v] β -CD ³	64,2 \pm 0,2
mit 5% [m/v] β -Me-CD ⁴	45,0 \pm 2,3
mit 5% [m/v] β -HP-CD ⁵	80,0 \pm 1,1

Tabelle 14:

Wiederfindungsrate von 1a mit verschiedenen CDs nach 2h im Caco-2-Test

¹Mittelwert \pm relative Standardabweichung,

²Cyclodextrin,

³ β -Cyclodextrin,

⁴ β -Methyl-Cyclodextrin,

⁵ β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin

Man erkennt, dass sich die Wiederfindung von FP7a im Caco-2 Transportsystem bei allen Cyclodextrinen unterscheidet. Je niedriger die Wiederfindung einer Verbindung im System im Vergleich zur Kontrolle ohne Cyclodextrin-Zusatz ist, desto höher ist die vermutete intrazelluläre Konzentration von FP7a, d.h. desto stärker ist die absorptionsfördernde Wirkung des Cyclodextrins. Demnach zeigte β -Me-CD den besten absorptionsfördernden Effekt für Verbindung 1a, was vermutlich auf die beste Komplexierung des Esters zurückzuführen ist. Da sich dieses Cyclodextrin also offensichtlich am besten eignet, um die Permeabilität der Substanzklasse zu erhöhen, wurde es in den folgenden Studien bei verschiedenen Estern als Modellabsorptionsverbesserer verwendet (s. Tabelle 15 „Caco-2 Permeabilität der Ester mit β -Me-CD“).

In den folgenden Caco-2 Tests wurde der Effekt von β -Me-CD auf die Permeabilität der Verbindungen 1a, 2a und 3a entweder äquimolar oder in einem Cyclodextrin-Überschuss untersucht. Um messbare Konzentrationen an Ester im Akzeptorkompartiment zu erreichen, wurde die Inkubationszeit zudem auf drei Stunden erhöht, was laut Lucifer Yellow-Kontrolle der Integrität der Monolayer nicht schadete.

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW \pm rel. SD] ³		
Molares Verhältnis von „Verbindung: β -Me-CD“	1:0 (ohne CD)	1:762 (5% m/v)	1:1 (äquimolar)
1a	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	⁵ -
2a	⁴ N.D.	0,4 \pm 0,2	⁵ -
3a	⁴ N.D.	6,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1

Tabelle 15: Caco-2 Permeabilität der Ester mit β -Me-CD

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert \pm relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar,

⁵nicht getestet

Für Verbindung 1a und 2a ergab sich keine merkliche Verbesserung der Permeabilität bei Verwendung eines Cyclodextrin-Überschusses. Eine deutliche Steigerung des Transports ins Akzeptormedium durch die Zugabe von 5% β -Me-CD wurde allerdings bei Verbindung 3a erzielt, wobei der Ester mittlere Permeabilität erreichte. Auch bei einer äquimolaren Mischung gelang eine leichte Verbesserung des Transportes, der Ester war niedrig permeabel. Die Komplexierung von 3a mit β -Me-CD scheint also am günstigsten zu verlaufen. Da die Permeationssteigerung mit dem Überschuss allerdings deutlich höher ist, liegt entweder keine 1:1-Komplexierung vor, oder zusätzliche Membraneffekte spielen eine Rolle.

➤ **Komplexierungsverhalten von β -Me-CD mit 3a**

Um das Komplexierungsverhalten von 3a mit β -Me-CD näher aufzuklären, wurden Komplexierungstests mit verschiedenen Cyclodextrinkonzentrationen durchgeführt. Nachdem der Ester mit den verschiedenen Konzentrationen an β -Me-CD eine Stunde lang bei 37°C in apikalem Puffer gerührt worden war (Stammlösungen in DMSO bzw. Aqua bidest.), war das Maximum (Plateauphase) der jeweiligen Komplexierungsreaktion erreicht. Der komplexierte Anteil wurde nach direkter Injektion (Spritzenpumpe) per UV detektiert, der freie Ester wurde per MS gemessen. In Übereinstimmung beider Verfahren kam man zu folgendem Ergebnis (s. Tabelle 16 „Komplexierung von 3a mit β -Me-CD“).

Molares Verhältnis von „3a : β -Me-CD“ ¹	Komplexierter Anteil an 3a [%] [MW \pm rel. SD] ²
1:0	0,3 \pm 0,4
1:1	37,7 \pm 1,3
1:10	80,0 \pm 0,2
1:762	98,5 \pm 0,1

Tabelle 16: Komplexierung von 3a mit β -Me-CD

¹nach 1h (Plateauphase),

²Mittelwert \pm relative Standardabweichung

Das Ausmaß der Komplexierung des Esters nimmt mit steigender Konzentration an β -Methylcyclodextrin zu. Es wird also kein stöchiometrischer 1:1-Komplex gebildet, sondern viele Cyclodextrinmoleküle komplexieren ein Estermolekül. Da die Permeabilitätssteigerung mit dem Überschuss an CD allerdings unverhältnismäßig höher ist als mit einer äquimolaren Konzentration (nicht nur Faktor „98,5%/ 37,7%“), kann hier von einer doppelten Funktion des Cyclodextrins ausgegangen werden: zum einen als shuttle [Gröger et al., 2001; Loftsson et al., 1998], zum anderen als Strukturveränderer der biologischen Membran (Fluiditätserhöhung [Grosse et al., 1998]).

➤ **Fazit**

Das Verfahren, die Permeabilität der Inhibitoren im Caco-2 Test durch Cyclodextrine zu verbessern, konnte hiermit als geeignet befunden werden. Es besteht also sicherlich auch die Möglichkeit- nach weiteren Optimierungen- die Ester zur Umsetzung des Hybridkonzeptes in vivo peroral verfügbar zu machen. Studien hierzu sind geplant.

2.3.2.3 Test auf Permeabilitätsverbesserung durch Strukturmodifikationen

Ein anderer Ansatz um die Permeabilität der hochpotenten Ester zu erhöhen, waren Strukturmodifikationen der Leitstruktur 1a [Dissertation Picard, 2002] (s. Abbildung 33 „Leitstruktur für Strukturmodifikationen: Verbindung 1a“).

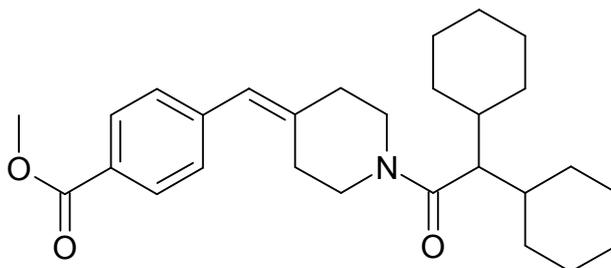


Abbildung 33: Leitstruktur für Strukturmodifikationen: Verbindung 1a

➤ Suche des die Permeabilität limitierenden Faktors

Um die Art der benötigten Strukturmodifikation herauszufinden, wurden zunächst verschiedene in silico-Modelle [Dissertation Dossou, 2006] im Vergleich mit experimentellen Daten der Ester verwendet.

❖ Korrelation zwischen Hydrophilie und Permeabilität

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen Hydrophilie und Permeabilität im PAMPA-Test untersucht. Die wichtigsten molekularen Deskriptoren hierbei waren PSA (polar surface area), HBA (hydrogen bonding acceptor), HBD (hydrogen bonding donor) und Löslichkeit. Die Anzahl der Wasserstoffbrückendonatoren (HBD) stimmte bei allen Estern überein und hatte somit keinen erkennbaren Einfluss auf die unterschiedliche Permeabilität in PAMPA. Die Löslichkeit korrelierte gut mit der Permeabilität, da aber nicht bekannt ist, wie sie berechnet werden kann, wurde sie für Strukturmodifikationen nicht in Betracht gezogen.

Die Entscheidung, dass die Hydrophilie nicht der begrenzende Faktor der Permeabilität ist, wurde schließlich anhand der polaren Oberfläche (PSA) und den Eigenschaften der Ester als Wasserstoffbrückenakzeptoren (HBA) gefällt [Dissertation Dossou, 2006]. Die PSA lag für alle Ester, unabhängig davon, ob sie gut oder schlecht permeabel in PAMPA waren, in einem engen Bereich bei 57-69 Å² der „cut off“ liegt laut Literatur bei 120 Å². Die Anzahl der

Wasserstoffbrückenakzeptoren lag mit einem Maximum von vier weit unter der laut Lipinski festgelegten Grenze von zehn [Bohets et al., 2001].

Somit liegen alle berechenbaren Hydrophilieparameter innerhalb des erlaubten Bereichs und müssen nicht verändert werden, um die Absorption zu verbessern. Stattdessen wurde als alternativ möglicher, begrenzender Faktor der Permeabilität die Hydrophobizität betrachtet.

❖ **Korrelation zwischen Hydrophobizität und Permeabilität**

Die wichtigsten Deskriptoren der Lipophilie (Hydrophobizität) sind der chromatographische hydrophobe Index (CHI), der pH-metrische LogP (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) und der berechnete AlogP₉₈. Mit Hilfe dieser Parameter kann per Computersimulation die Lipophilie von Molekülen bzw. ihrer Fragmente basierend auf Datenbanken (hier: ACD-Datenbank) vorhergesagt werden (wichtige Modelle: Hansch, Hammett, Free Wilson). Bei der Korrelation der Lipophilie mit PAMPA-Ergebnissen zeigte sich deutlich, dass Substanzen mit einem CHI > 100 und einem pH-metrischen logP > 5,3 eine deutlich schlechtere Permeabilität im PAMPA-Test besitzen als die anderen. Daraus wurde geschlossen, dass die Lipophilie der permeabilitätslimitierende Faktor dieser Substanzklasse ist (s. Abbildung „Leitstruktur für Strukturmodifikationen: Verbindung 1a“). Somit sollte versucht werden, die Lipophilie der Verbindungen zu verringern, möglichst ohne die Pharmakophorstruktur (Verbindung 1a) zu beeinträchtigen, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden. Da der größte Lipophiliebeitrag von 1a (Gesamtlipophilie des Moleküls: AlogP 6,13) von dem Fragment der Dicyclohexylgruppe (Lipophilie des Fragmentes: AlogP 4,54) ausgeht, wurde dieser Molekülteil modifiziert.

➤ **Strukturmodifikationen zur Absenkung der Lipophilie und Erhöhung der Permeabilität (passiv transzellulär)**

Es wurden drei Ester (DU1-3) synthetisiert, deren Lipophilie im Vergleich zur Leitstruktur 1a (AlogP98= 6,13) (s. Abbildung 33) möglichst weit abgesenkt werden sollte, um die Permeabilität zu verbessern (s. Tabelle 17 „Ester mit verringerter Lipophilie“). Gleichzeitig sollten die neuen Verbindungen jedoch strukturell möglichst wenig von der Leitstruktur abweichen, um einen bestmöglichen Erhalt der Leitstruktur anzustreben.

Verbindung	Struktur	AlogP98
UD1		5,35
UD2		4,56
UD3		4,62

Tabelle 17: Ester mit verringerter Lipophilie

(AlogP: berechneter Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient)

Die Lipophiliereduktion bei Verbindung UD1 war am geringsten, da durch die Verbrückung der beiden Cyclohexylreste nur die Gesamtoberfläche des Moleküls verringert wurde, indem seine Kompaktheit gesteigert wurde. Die Absenkung der Hydrophobizitäten von UD2 und UD3 war viel höher, da jeweils über ein neu eingeführtes Heteroatom (O, N) verbrückt wurde, das zur Vergrößerung der PSA führte. Die Gefahr eines Aktivitätsverlustes im Vergleich zu Verbindung 1a war hierdurch allerdings ebenfalls erhöht, da durch die Heteroatome zusätzliche Wechselwirkungen mit der Bindungstasche auftreten.

Nach ihrer Synthese wurde die Permeabilität der weniger lipophilen Ester im Caco-2-Test untersucht. Es wurde erwartet, dass die Membrangängigkeit der Ester umso stärker ansteigen würde, je geringer ihre Lipophilie wäre. Allerdings musste hierbei auch noch berücksichtigt werden, dass die stickstoffverbrückte Verbindung bei physiologischem pH-Wert teilweise protoniert vorliegen würde, wodurch die passiv transzelluläre Permeabilität wieder abnehmen müsste (s. Tabelle 18 „Caco-2 Permeabilität der strukturmodifizierten Ester“).

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
UD1	0,2 ± 0,1
UD2	28,1 ± 7,5
UD3	15,6 ± 3,9

Tabelle 18: Caco-2 Permeabilität der strukturmodifizierten Ester

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Die Lipophiliereduktion von UD1 gegenüber Verbindung 1a reichte leider nicht aus, um eine Verbesserung der Permeabilität zu erreichen. Die Absorption der Ester UD2 und UD3 konnte im Vergleich zur Leitstruktur allerdings stark verbessert werden- sie erreichten hohe Permeabilitätswerte.

Die Permeabilitätsverbesserung der stickstoffhaltigen Verbindung war erwartungsgemäß aufgrund ihrer teilweisen Ionisierung bei pH 7,4 etwas niedriger als die des nicht ionisierten sauerstoffhaltigen Moleküls, lag aber immer noch in einem hohen Bereich. Vom pharmakokinetischen Gesichtspunkt aus wären diese Verbindungen also voraussichtlich gut geeignet, um das Hybridkonzept auf peroralem Weg in vivo zu realisieren.

Leider ging diese gelungene kinetische Optimierung mit einem starken Aktivitätsverlust in vitro einher (HEK-Modell: hamster embryonal kidney cells [Dissertation Streiber, 2006]), obwohl die Strukturmodifikationen so gering wie möglich gehalten worden waren. Somit sind die neuen Ester doch keine potentiellen

Kandidaten für eine in vivo-Testung, auch wenn das Konzept sich hinsichtlich der Permeabilitätsverbesserung bewährt hat.

2.3.3 Aufnahme ausgewählter 5 α -Reduktase-Inhibitoren in DU145-Zellen als Modell der Prostata (Targetorgan)

➤ Ansatz

Um peroral am Wirkort verfügbar zu sein, müssen Verbindungen aber nicht nur die Darmzellen, sondern auch die Zellen des Targetorgans überwinden können. Dies wurde anhand eines weiteren in vitro-Modells untersucht. Dazu wurde die DU145-Zelllinie (Prostatakarzinomzellen) als Permeationsmodell fürs Targetorgan eingesetzt.

➤ Testung

Die Zellkultivierung, Inkubation und Probenaufarbeitung wurde nach „Kang et al., 2004“ durchgeführt. Um die Aufnahme verschiedener Ester zu untersuchen, wurden die Zellen am Tag vor dem Test in Zellkulturschalen in einer Konzentration von $1,6 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät, um bis zum nächsten Tag Konfluenz zu erreichen. Die konfluenten Zellen wurden dann für 6 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium abgetrennt und die Zellen wurden mehrfach gewaschen, um an der Zellmembran anhaftende Moleküle zu entfernen, die zu einem falsch positiven Ergebnis führen könnten. Die Waschlösungen wurden separat gesammelt und die Zellen wurden dann per Ultraschall homogenisiert. Die Testverbindungen aus allen drei Fraktionen wurden per Festphasenextraktion angereichert. Der Gehalt wurde per LC/MS/MS bestimmt (s. Tabelle 19 „Aufnahme von Verbindung 1 und 1a- 3a in DU145-Zellen“). Es wurden sowohl die drei potentesten Ester als auch die Säure der Leitstruktur (FP7) als Referenz untersucht.

Verbindung	Aufnahme in DU145 [%] [MW \pm SD] ¹
FP7 ²	0,1 \pm 0,01
1a ³	3,4 \pm 0,2
2a ³	5,5 \pm 0,3
3a ³	18,3 \pm 0,3

Tabelle 19: Aufnahme von Verbindung 1 und 1a- 3a in DU145-Zellen

¹Mittelwert \pm Standardabweichung, ^{2,3} Strukturen s. Tabelle 10 bzw. Abbildung 28

Die Ester 1a-3a konnten alle in einer hinreichenden Menge in die DU145-Zellen eindringen- am besten wurde der methoxylierte Methylester 3a aufgenommen. Im Gegensatz dazu konnte die Säure FP7 nur in einer sehr geringen Menge intrazellulär nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz zum Caco-2 Modell, dass die Ester im DU145 Modell besser die Membranen überwinden als die Säure lässt sich unterschiedlich erklären. Einerseits kann die Ursache die unterschiedliche Morphologie der Zellmembranen der beiden Zelllinien sein, andererseits fehlt in DU145-Zellen ein aktiver Transportmechanismus für Monocarbonsäuren, weshalb die physiologisch deprotonierte Säure FP7 nur schwer die Membranen überwinden kann. Außerdem ist die Säure ein P-gp-Substrat, was bei dieser als Modell der Prostata eingesetzten Krebszelllinie durchaus die intrazelluläre Konzentration der Säure reduzieren kann. In vivo würde dieses Problem bei der Therapie Benigner Prostatahyperplasie jedoch kaum zum Tragen kommen wird, da P-gp bekanntermaßen in Krebszellen überexprimiert wird (Hidalgo et al., 1996].

➤ **Fazit**

Die Ergebnisse des in vitro-Modells fürs Targetorgan würden also durchaus für eine Aufnahme der Ester in die Prostata sprechen, d.h. das Hybridkonzept könnte voraussichtlich hinsichtlich dieses Gesichtspunktes realisiert werden.

2.3.4 Stabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren

2.3.4.1 Voraussetzungen

Zur Realisierung des Hybridkonzeptes nach peroraler Applikation, müssen die Ester nicht nur hinreichende Membrangängigkeit besitzen, sondern sie müssen auch gewebespezifische Stabilität besitzen (s. Abbildung 27 „Hybridhemmkonzept der 5 α -Reduktase“). Konkret müssen sie stabil genug während der gastrointestinalen Passage sein (durchschnittliche Dauer: 3h), um in die systemische Zirkulation zu gelangen. Außerdem müssen die Ester im Plasma stabil genug sein, um die dort verstärkt vorkommende 5 α -Reduktase Typ1 hochpotent hemmen zu können. Weiterhin müssen sie die strukturellen Voraussetzungen erfüllen, um im Zielorgan (Prostata) intrazellulär gespalten zu werden, damit die korrespondierende Säure in hinreichender Konzentration entsteht und dann hochpotent die dort vermehrt exprimierte 5 α -Reduktase Typ2 hemmen kann.

2.3.4.2 In vitro-Modelle zur Vorhersage der Stabilität

Um diese Voraussetzungen des Hybridkonzeptes abzuklären, wurden verschiedene in vitro-Modelle zur Simulation der in vivo Situation verwendet (s. Tabelle 20 „In vitro-Modelle zur präklinischen Validierung des Hybridkonzeptes nach peroraler Applikation hinsichtlich Stabilität“).

In vitro-Modell	In vivo-Situation
Caco-2-Zellen, -Homogenat	gastrointestinale Verfügbarkeit
humanes Plasma	systemische Verfügbarkeit der Ester
humanes BPH-Homogenat, DU145-Zellen	Verfügbarkeit der Säuren im Targetorgan

Tabelle 20: In vitro-Modelle zur präklinischen Validierung des Hybridkonzeptes nach peroraler Applikation hinsichtlich Stabilität

Die perorale Verfügbarkeit ist zur Umsetzung des Konzeptes zwar nicht essentiell aber wünschenswert, weshalb sie erst nach Abschluss der Tests in den anderen Organmodellen betrachtet wurde. Um die Stabilitäten der Testverbindungen gegenüber Esterasen (und Peptidasen) zwischen den verschiedenen Modellen miteinander vergleichen zu können, wurde ihre totale Esteraseaktivität gegenüber para-Nitrophenylacetat (PNPA) auf denselben Wert (10,7nmol/(min·mg)) eingestellt. Das Testset wurde erweitert, da inzwischen im Arbeitskreis zahlreiche, nach rationalen Gesichtspunkten (hinsichtlich Aktivität) synthetisierte Verbindungen hinzugekommen waren- sowohl Ester als auch Amide (s. Tabelle 21 „Erweiterung des Testsets der Stabilität“). Es wurden auf der Suche nach neuen Strukturen erstmals auch Amide hergestellt, da sie ebenfalls eine hohe negative Ladungsdichte an derselben Bindungsstelle wie die Ester besitzen, was laut Bindungstheorie der 5 α -Reduktase [Dissertation Picard, 2002] essentiell ist.

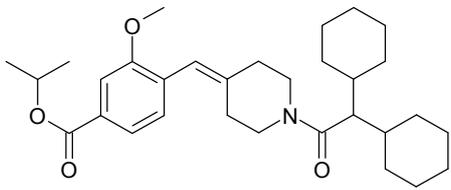
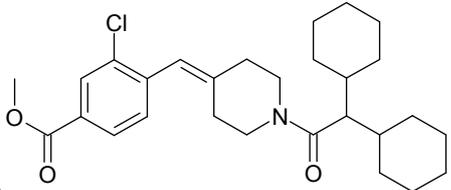
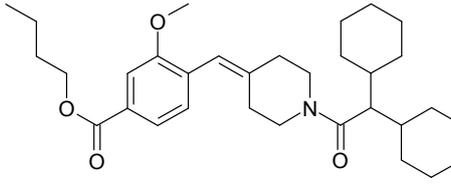
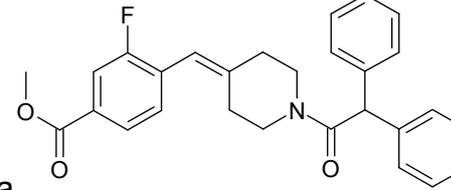
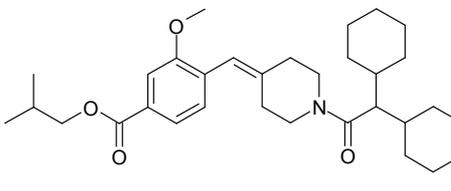
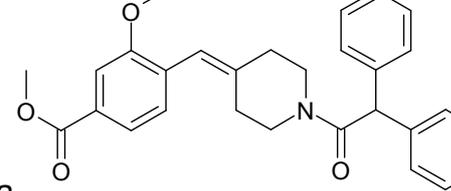
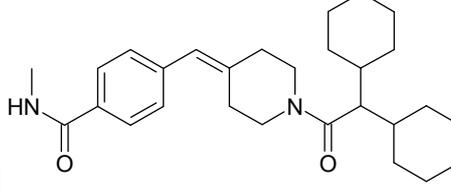
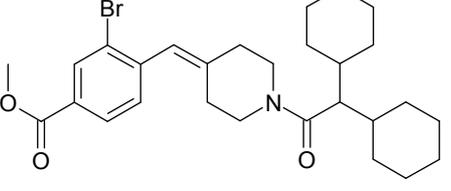
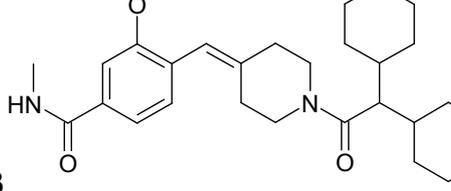
Verbindung, Struktur	Verbindung, Struktur
<p>MS1d</p> 	<p>MS9a</p> 
<p>MS1e</p> 	<p>FP13a</p> 
<p>IBE</p> 	<p>FP14a</p> 
<p>MS4a</p> 	<p>Z1</p> 
<p>MS7a</p> 	<p>Z3</p> 

Tabelle 21: Erweiterung des Testsets zur Untersuchung der Stabilität

➤ **Stabilität im Caco-2-Transportsystem**

Die Stabilität wurde für Verbindung 1a-3a zunächst im Caco-2-Transportmodell untersucht; dabei konnte nach 3 Stunden keine Säure detektiert werden. Da dies jedoch dadurch begründet sein könnte, dass die Ester schlecht die Zellmembranen überqueren können, bzw. dass die eventuell intrazellulär gebildete Säure nicht hinreichend nach außen abgegeben werden könnte, wurden die Stabilitätstests, um diese Probleme zu umgehen, auf Zellhomogenat umgestellt. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Homogenat ist die verlängerbare Inkubationsdauer, was mit intakten Zellen nur sehr begrenzt möglich ist.

➤ **Stabilität in Caco-2-Homogenat**

Die Stabilität verschiedener Ester und Amide wurde im Caco-2-homogenat untersucht (s. Abbildung 34 „Stabilität in Caco-2-Homogenat“). Die Bestimmung der Esteraseaktivität wurde laut „Material und Methoden“ durchgeführt. Der prozentuale Anteil der Ester im Vergleich zur Ausgangslösung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (3h, 6h, 24h) bestimmt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine normale Magen-Darmpassage 3h lang dauert. D.h., wenn nach 6h noch hinreichende Konzentrationen an Ester vorhanden sind, werden die Substanzen vermutlich in vivo peroral verfügbar sein, auch wenn sich die Esterasemuster unterscheiden (qualitativ und quantitativ). Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass das Esterasemuster der Zellen nicht nur dem intestinalen, sondern auch dem hepatischen Muster in vivo sehr nahe kommt [Imai, et al., 2005]. Das Modell gibt also einen ersten Hinweis auf den gesamten first pass-Metabolismus- auch intestinal [Shah et al., 2006].

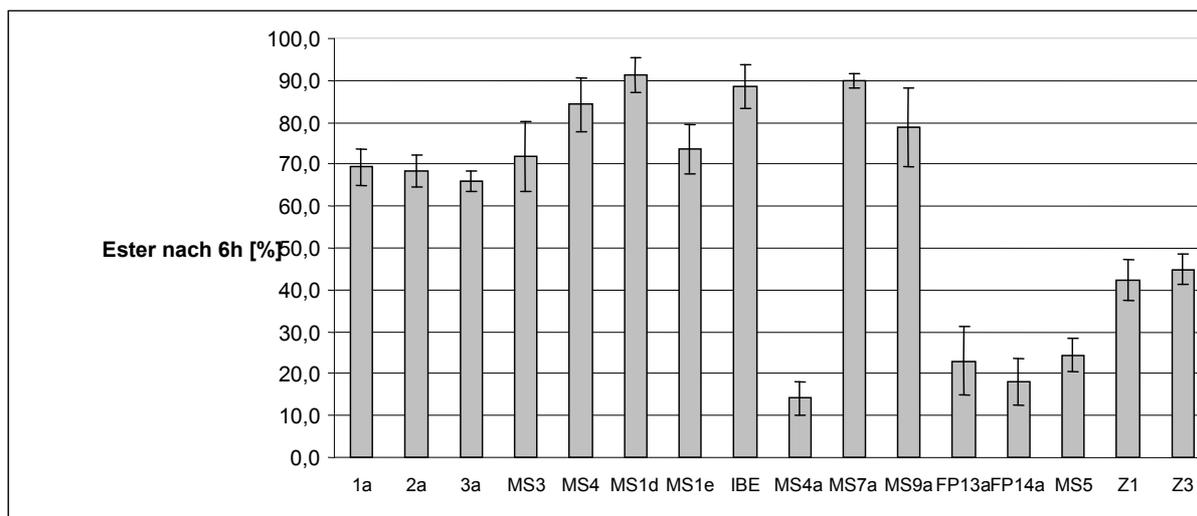


Abbildung 34: Stabilität in Caco-2-Homogenat

Wie man erkennen kann, war von den meisten Estern nach 6h noch über 50% vorhanden, was eine hinreichende Konzentration für perorale Verfügbarkeit sein sollte. Die beste Stabilität zeigten die Dicyclohexylester, weniger stabil waren Ester mit anderen Resten wie z.B. Dipropyl-, Diphenyl- und Adamantyl-. Diese waren aufgrund ihrer Struktur und Elektronendichte eventuell leichter durch Esterasen und Peptidasen angreifbar. Am instabilsten war MS4a. Die Amide Z1 und Z3 waren auch weniger stabil als die Dicyclohexylester, aber noch in einem guten Bereich (ca. 45%). Die meisten Verbindungen wären somit von Seiten ihrer Stabilität her geeignete Kandidaten für die perorale Applikation.

➤ **Stabilität in humanem Plasma**

Die Stabilität der Verbindungen in Plasma- als größtem peripheren Kompartiment- wurde ebenfalls untersucht [Dissertation Streiber, 2006]. Es wurden jeweils einige Verbindungen als Vertreter der jeweiligen Substanzklasse getestet (s. Abbildung 35 „Stabilität in humanem Plasma“).

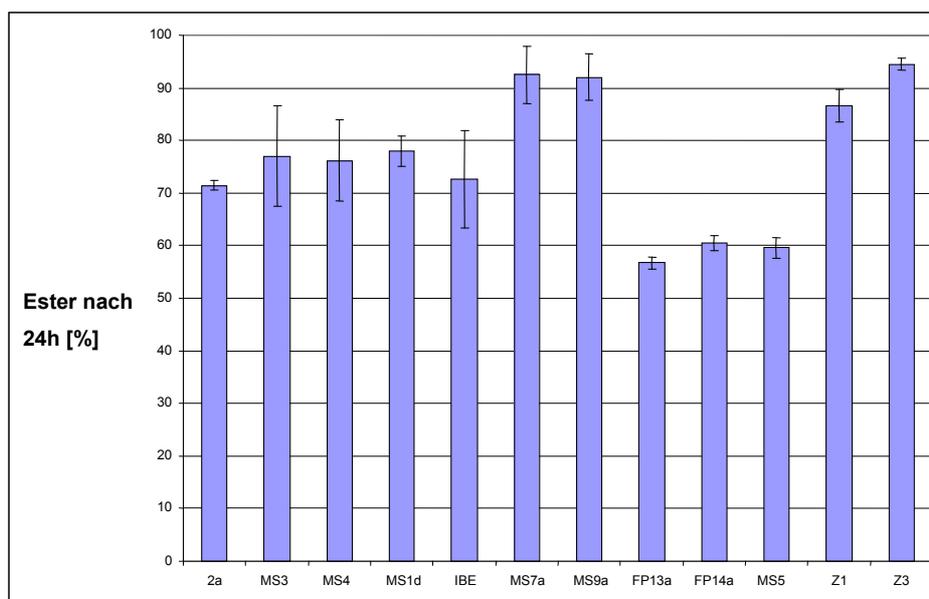


Abbildung 35: Stabilität in humanem Plasma

Innerhalb von 24 Stunden waren alle Substanzen sehr stabil, eine einmalige Applikation der Substanzen am Tag würde also ausreichen.

Es wurden zwischen 50% und 95% der Ester nach der Inkubation mit Plasma wiedergefunden. Am stabilsten gegenüber dem enzymatischen Abbau (v.a. durch Esterasen und Peptidasen) waren MS7a, MS9a und die beiden Amide Z1 und Z3. Die geringste Stabilität nach 24 Stunden besaß FP13a (verbleibender Anteil an Ester 56%)

Alle Substanzen wären also für eine periphere Hemmung der 5 α -Reduktase 1 sehr gut verfügbar.

➤ **Stabilität in humanem BPH-Homogenat**

Für das Hybridkonzept muss außerdem die hinreichende Spaltung der Ester im Targetorgan (der Prostata) gewährleistet sein. Dies wurde mittels humanen Prostatagewebes- BPH-Homogenat- untersucht [Dissertation Streiber, 2006].

Hier wurden die Verbindungen innerhalb von 24h deutlich unter Freisetzung ihrer korrespondierenden Carbonsäuren hydrolysiert (s. Abbildung 36 „Stabilität in humanem BPH-Homogenat“).

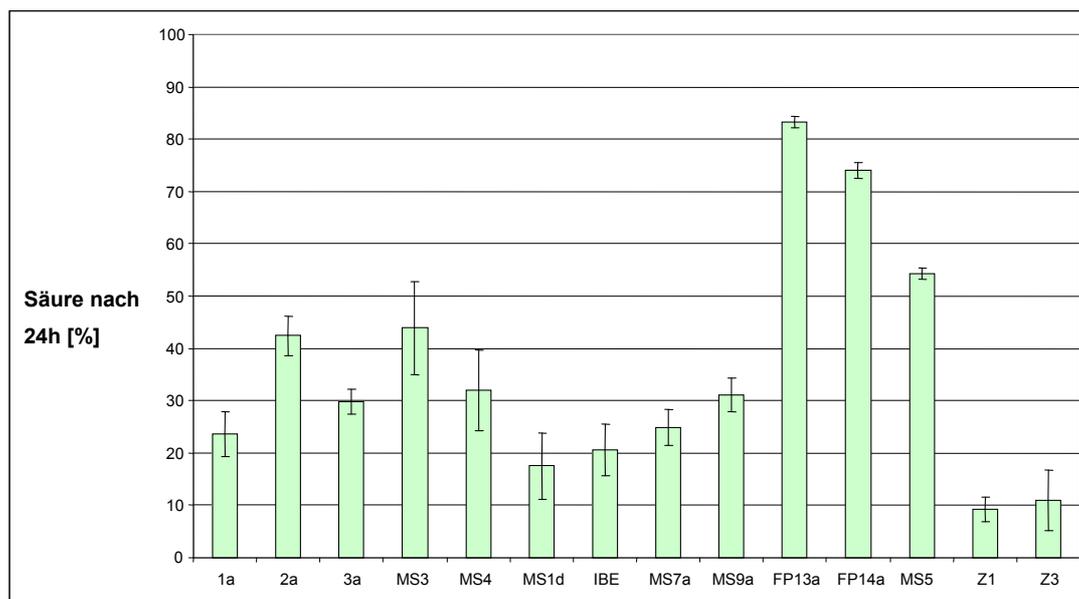


Abbildung 36: Stabilität in humanem BPH-Homogenat

Am labilsten war der Ester FP13a (verbleibender Anteil an Ester 16%, entstandene Säure: 84%), am stabilsten war das Amid Z1 (verbleibender Anteil an Ester 91%, entstandene Säure nur 9%).

Die Ester wurden also überwiegend in einer hinreichenden Menge (>20%) gespalten, um eine voraussichtlich effektive Dosis an Säure freizusetzen. Die Amide Z1 und Z3 waren hingegen ziemlich stabil (Freisetzung der korrespondierenden Säure nur ca. 10%), wären somit also weniger gut für das Hybridkonzept geeignet.

Dieses Profil der Ester im Targetgewebe wäre also ebenfalls vorteilhaft für das Hybridkonzept, da offensichtlich ein für den Ansatz günstiges, unterschiedliches, spezifisches Esterasemuster in den Geweben vorliegt. Dies zeigt sich darin, dass zwar alle Gewebe auf die gleiche totale Esteraseaktivität eingestellt worden sind, aber die Verbindungen in unterschiedlichem Ausmaß hydrolysiert werden.

➤ **Stabilität in DU145-Zellen**

Die gute Verfügbarkeit der Säure durch starke Spaltung der korrespondierenden Ester am Wirkort sollte außer in BPH-Homogenat zusätzlich in einem zellulären Modell des Zielgewebes untersucht werden, um kinetische Effekte in die Betrachtung mit einbeziehen zu können. Dazu wurde die DU145-Zelllinie verwendet, da es sich im Unterschied zur Prostata-Primärkultur um ein sehr robustes zelluläres Modell handelt. Außerdem unterscheidet sich die einzige verfügbare, immortalisierte BPH-Zelllinie in ihren Eigenschaften ebenfalls von BPH-Gewebe [Hayward, et al., 1995]- ihre Verwendung hätte also keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der DU145-Zelllinie.

Da die hinreichende Spaltung der Ester allerdings schon in BPH-Homogenat gezeigt worden war, wurde sie nun in DU145 nur an den drei potentesten potentiellen Hybridinhibitoren überprüft. Die Verbindungen wurden für 6h mit den Zellen inkubiert und im Anschluss wurden der extrazelluläre und der intrazelluläre Säuregehalt bestimmt (s. Tabelle 22 „Stabilität der Ester 1a- 3a in DU145-Zellen“).

Verbindung	Freigesetzte Säure _{extrazellulär} [MW ± SD] ¹ [%]	Freigesetzte Säure _{intrazellulär} [MW ± SD] ¹ [%]
1a	16,1 ± 3,5	0,65 ± 0,3
2a	11,8 ± 2,3	1,06 ± 0,2
3a	2,1 ± 0,3	0,05 ± 0,01

Tabelle 22: Stabilität der Ester 1a- 3a in DU145-Zellen

¹Mittelwert ± Standardabweichung

Die Ergebnisse des BPH-Modells sind prinzipiell auf das DU145-Modell übertragbar. Alle Ester werden in der Targetzelllinie gespalten, am besten wird auch hier die Säure aus dem Ester 2a intrazellulär freigesetzt (am Wirkort). Bei allen Estern wird die Säure allerdings auch extrazellulär gefunden, was entweder auf einen Effluxmechanismus der Krebszellen zurückgeht (s. Caco-2-Test: Säure ist P-gp-Substrat) oder auf extrazelluläre Spaltung des Esters. Beides wäre jedoch kein Hindernis für das Hybridkonzept, da es durch das extrazelluläre Vorkommen von Säure nicht gestört wird. Es muss nur eine hinreichende intrazelluläre Konzentration (minimale therapeutische Dosis) an Säure vorhanden sein.

3 17 β -HSD1-Projekt

3.1 Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes

Wie schon in der Einleitung erläutert, existiert die 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase in mehreren Isoformen, von denen allerdings zur Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen nur der Typ I gehemmt werden soll, um die Biosynthese des potentesten Estrogens- Estradiol- zu hemmen (s. Abbildung 37 „Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen durch Absenkung der Estradiolkonzentration“).

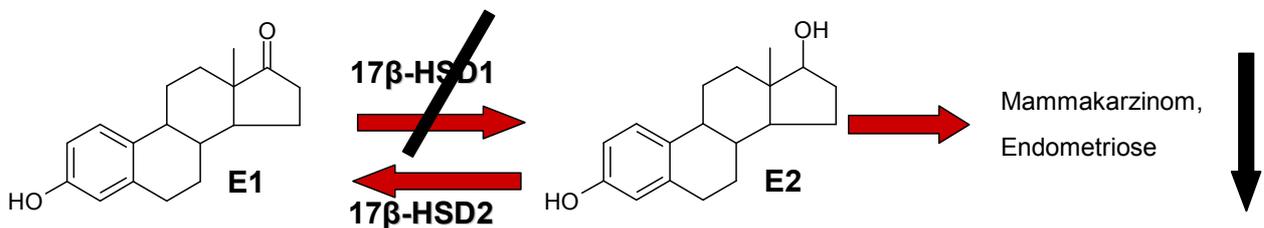


Abbildung 37: Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen durch Absenkung der Estradiolkonzentration

E1: Estron, E2: Estradiol

Der innovative Ansatz im Arbeitskreis besteht darin, nichtsteroidale, selektive 17 β -HSD1-Inhibitoren zu entwickeln, die im Unterschied zu den traditionellen therapeutischen Ansätzen mit steroidalen Inhibitoren (z.B. Aromatasehemmer und Estrogenrezeptorantagonisten) zahlreiche Vorteile hätten.

Die 17 β -HSD1-Inhibitoren könnten nicht nur post-, sondern auch prämenopausal eingesetzt werden, da sie hauptsächlich peripher am Targetorgan wirken würden, wo das Enzym verstärkt exprimiert wird. Außerdem würden die Verbindungen im Unterschied zu den traditionellen Aromatasehemmern auch nicht die komplette Estrogenbiosynthese hemmen, sondern nur diejenige von Estradiol. Weiterhin wären keine steroidalen Nebenwirkungen zu erwarten. Aufgrund dieses günstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses wären sie auch bei „gutartigen“ estrogenabhängigen Erkrankungen wie z.B. Endometriose einsetzbar.

3.2 Pharmakophormodell der Inhibitoren

Die Inhibitoren stellen nichtsteroidale Analoga zu Estradiol (Substrat) dar. Sie sollen außerdem möglichst geringe Affinität zum Estrogenrezeptor aufweisen. Da sie allerdings keiner einheitlichen Substanzklasse angehören, erfolgte die Synthese der neuen Verbindungen nicht per Orientierung an einzelnen Leitstrukturen, sondern hinsichtlich eines allgemeinen Pharmakophormodells, das auf der Kristallstruktur des Enzyms mit seinem Substrat beruht (s. Abbildung 38 „Schematische Darstellung der Inhibitoren“).

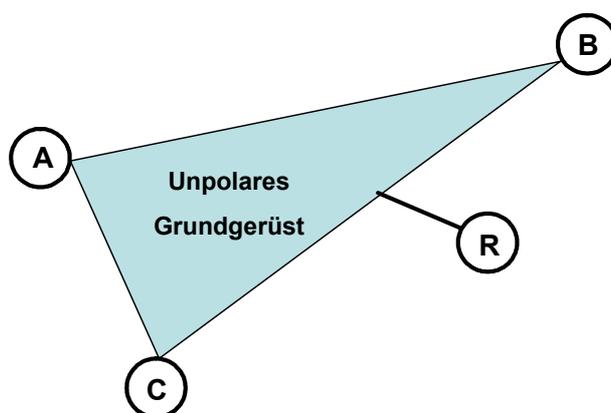


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Inhibitoren

[Diplomarbeit Erika Ziegler, 2005]

- A: Wasserstoffbrückenakzeptor oder –donor: stellvertretend für 3`-OH-Gruppe des Steroids
 B: Wasserstoffbrückenakzeptor: stellvertretend für Ketogruppe an C17 des Steroids
 C: polare Gruppe: Interaktion mit Tyr218, Ser222 und Asn152 im hydrophoben aktiven Zentrum von 17 β -HSD1
 R: Substituent der mit Aminosäuren im unpolaren Eintrittskanal des Enzyms interagiert
 Entfernungen: A-B: 10-12 Å, A-C: 5-6,5 Å, B-C: 6-8 Å

Aufgrund späterer Modellierungsergebnisse wurde das Pharmakophormodell jedoch noch erweitert, sodass außer dem unpolaren Grundgerüst auch fünfgliedrige Heterozyklen (mit N, S, O) miteinbezogen wurden, die mit zwei einfach hydroxylierten Phenolen substituiert sind.

3.3 Verfügbarkeit im Caco-2 Modell

Da auch zur Therapie der genannten estrogenabhängigen Erkrankungen die perorale Applikationsroute bevorzugt werden würde, wurden die an 17 β -HSD1 potentesten und gegenüber 17 β -HSD2 selektivsten Inhibitoren [Enzymtest, Dissertation Erika Ziegler, 2006] im Caco-2 Modell auf ihre Membrangängigkeit untersucht (s. Tabellen 23-24 „Testset im Caco-2 Modell“).

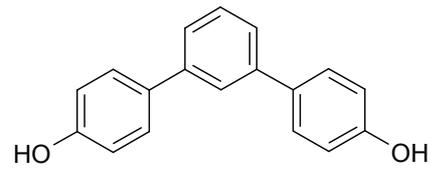
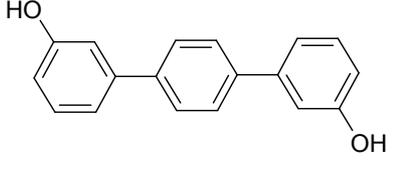
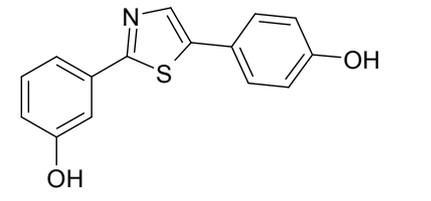
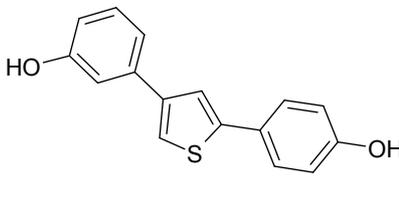
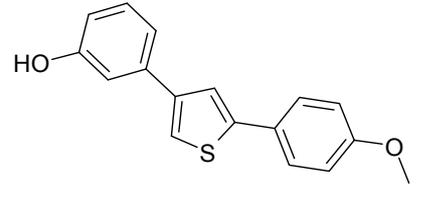
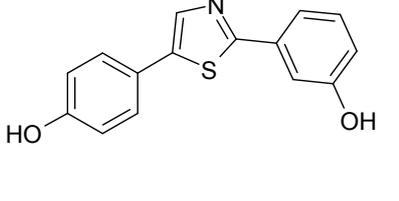
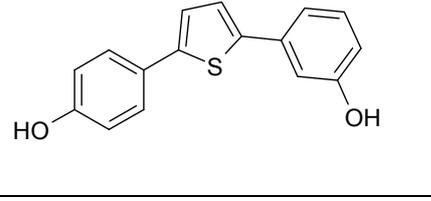
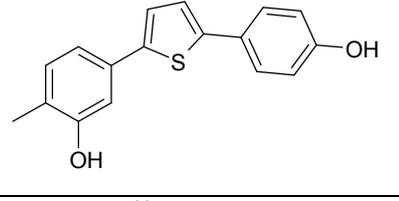
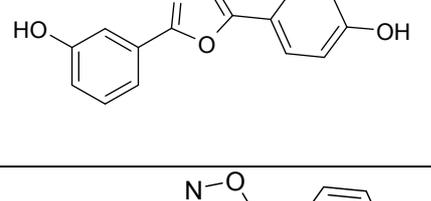
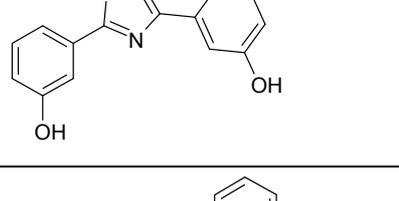
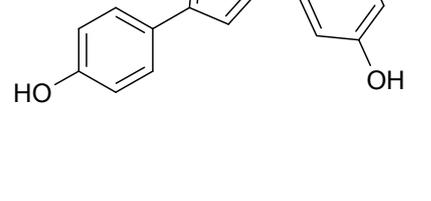
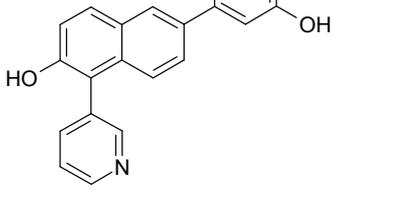
Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
AO-3D		AO-5	
EJB100A		EJB114A	
EJB114B		EJB102C	
EJB110A		EJB139A	
EJB159C		EJB161A	
EJB69P		EZ128B	

Tabelle 23: Testset im Caco-2 Modell

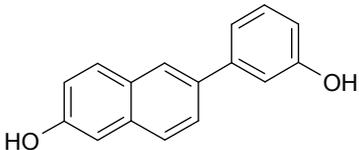
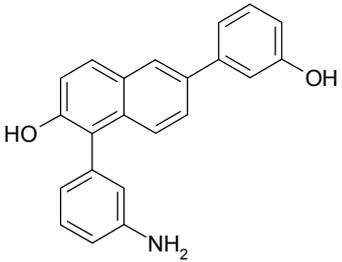
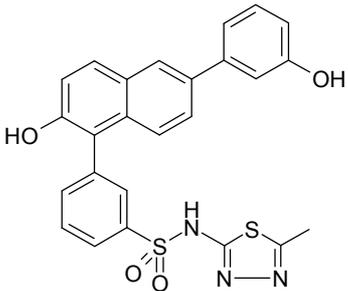
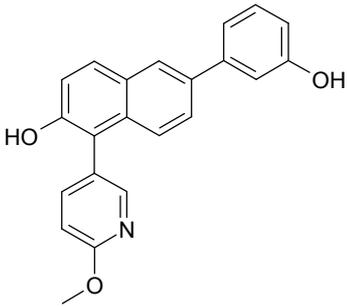
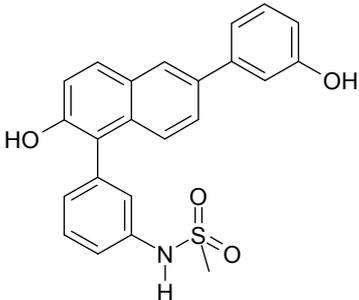
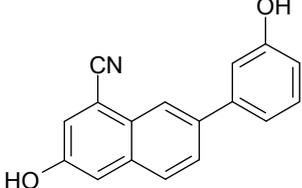
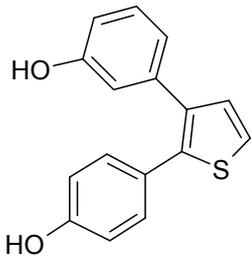
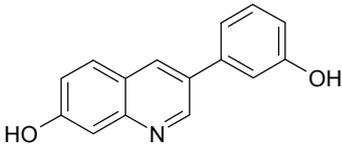
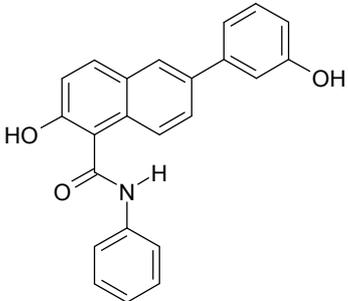
Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
EZ13E		EZ227	
EZ247		EZ140A	
EZ141B		MX8	
OAS59		SOM19C	
TD10C			

Tabelle 24: Testset im Caco-2 Modell (Fortsetzung)

Die Verbindungen unterschiedlicher Struktur wurden auf ihre Permeabilität im Caco-2 Modell untersucht, um ihre perorale Absorption in vivo abschätzen zu können. Die Verbindungen wurden alle nach dem Prinzip des „single dosing“ getestet (s. Tabelle 25 „Permeabilitäten im Caco-2-Transportmodell“).

Verbindung	P_{app}^1 (A>B) ² -single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	Verbindung	P_{app}^1 (A>B) ² -single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
AO-3D	12,6 ± 7,2	EZ 128B	13,8 ± 6,2
AO-5	12,5 ± 9,0	EZ 13E	8,9 ± 4,9
EJB 100A	11,7 ± 8,1	EZ 227	16,4 ± 8,9
EJB 114A	14,4 ± 8,3	EZ 247	1,5 ± 8,1
EJB 114B	13,4 ± 6,4	EZ140A4	7,8 ± 0,3
EJB102C	7,8 ± 2,5	EZ141B	18,8 ± 1,4
EJB110A	22,0 ± 1,0	MX 8	4,4 ± 8,0
EJB139A	24,2 ± 6,9	OAS-59	11,5 ± 7,7
EJB159C	7,9 ± 0,8	SOM19C	3,5 ± 0,5
EJB161A	3,6 ± 0,5	TD10C	1,5 ± 0,2
EJB69P	7,3 ± 0,9		

Tabelle 25: Permeabilitäten im Caco-2-Transportmodell

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Die Permeabilität aller untersuchten Verbindungen der verschiedenen Substanzklassen lag im Caco-2 Modell im mittleren ($1 < P_{app} < 10 \cdot 10^{-6} \text{cm/sec}$) bis hohen ($10 \cdot 10^{-6} \text{cm/sec} < P_{app}$) Bereich. Daher wurden sie auch als in vivo gut peroral verfügbar eingestuft. Da das in vitro-Modell jedoch nur zur Präselektion für die viel komplexere in vivo-Testung eingeordnet werden kann, wurden zur näheren Bestimmung der peroralen Kinetik in vivo-Tests am Rattenmodell durchgeführt. Dazu wurden zunächst die beiden im hauseigenen Enzymtest am potentesten und gegenüber 17 β -HSD1 selektivsten Verbindungen ausgesucht, dabei handelte es sich um EZ227 und EZ128B.

3.4 Perorale Verfügbarkeit in vivo im Rattenmodell

➤ **Durchführung der in vivo- Tests**

Rattenmodell

Die Testung erfolgte an männlichen Wistar-Ratten (Janvier, France) mit einem Gewicht zwischen 261-290g. Die Tiere wurden bei 20-22°C Raumtemperatur in einem 12-stündig alternierenden Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten (Pharmacelsus CRO).

Zum Zweck der späteren Blutentnahme wurde den Tieren unter Narkose (Ketamin, Xylazin) 14 Tage vor der kinetischen Studie eine Kanüle mit Silikonkatheter in die rechte Halsvene implantiert. Unmittelbar vor den Blutentnahmen während der Kinetikuntersuchung, wurden die Ratten an ein Probeentnahmesystem mit Gegengewicht angeschlossen, sodass die Tiere sich weiterhin frei bewegen konnten.

Verabreichung der Testverbindungen

Die Verbindungen EZ128B und EZ227 wurden jeweils in einer Konzentration von 10mg/ml separat in 50% Labrasol® (v/v) in Millipore mit 0,9% Natriumchlorid (m/v_{gesamt}) gelöst. Danach wurden die Lösungen den Testtieren peroral mit einer Fütterungsnadel verabreicht (50mg/kg bzw. 5ml/kg). Pro Verbindung wurde die Kinetik in 5 Tieren untersucht.

Probenentnahme

Nach Verabreichung der Inhibitoren wurden Blutproben von je 200µl nach 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h und 24h in heparinisierte Gefäße entnommen und auf Eis gestellt. Danach wurde aus ihnen durch Zentrifugation bei 3000g (10min, 4°C) Plasma gewonnen (s. „Material und Methoden“). Die Plasmaproben wurden bis zu ihrer Analyse per LC/MS/MS bei -20°C gelagert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der Software „PK-Solutions 2.0“ [Summit Research Services, Montrose, USA].

➤ **Perorale Kinetik**

Durch die Aufnahme von Plasmaspiegel-Zeit-Kurven wurden die wichtigsten kinetischen Parameter der beiden Verbindungen bestimmt, und zwar die maximale Plasmakonzentration (c_{\max}), der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (t_{\max}), die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), die Clearance (Cl) und die „area under the curve“ (Plasmaspiegel-Zeit-Kurve, AUC) (s. Tabelle 26 „Perorale Kinetik von EZ128B und EZ227 in vivo“).

Dabei gibt die c_{\max} einen Anhaltspunkt für die Absorbierbarkeit einer Verbindung, t_{\max} gibt Auskunft über die Geschwindigkeit ihres Anflutens. Die $t_{1/2}$ gibt an, wie lange eine Verbindung im Plasma vorhanden ist (Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Substanz schon aus dem Plasma eliminiert wurde: durch Phase I- oder Phase II-Metabolismus). Die Clearance beschreibt die dosisabhängige Entfernung einer frei verfügbaren Verbindung aus einem gewissen Blutvolumen pro Zeit durch Leber und Nieren ($Cl = \text{Dosis}/\text{AUC}$). Die AUC ist ein Maß für die Bioverfügbarkeit einer Verbindung [Smith et al., 2006]

	Verbindung	
Parameter	EZ128B	EZ227
c_{\max} [ng/ml]	15,7	44,1
t_{\max} [h]	2,0	2,0
$t_{1/2}$ [h]	1,5	1,6
Cl [l/kg/h]	246	149
AUC [ng/ml*h]	203	337

Tabelle 26: Perorale Kinetik von EZ128B und EZ227 in vivo

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration;

t_{\max} : Zeit, nach der c_{\max} erreicht wird;

$t_{1/2}$: Halbwertszeit;

Cl: Clearance;

AUC: area under the curve;

Entgegen der sehr guten Voraussage anhand des Caco-2 Modells waren beide Verbindungen geringer verfügbar. Dennoch besitzen sie in vivo ein mittelmäßiges kinetisches Profil, da sie eine mittlere c_{\max} und AUC besitzen.

Von einer guten Verfügbarkeit im Menschen kann erfahrungsgemäß (in diesem Modell) erst ab einer AUC von 500 ng/ml*h in der Ratte ausgegangen werden, da sie generell im Menschen um Faktor 7 höher liegt. Die t_{max} und die $t_{1/2}$ liegen in einem sehr guten Bereich.

Mögliche Ursachen für die Divergenz der Modelle hinsichtlich der peroralen Verfügbarkeit liegen in multiplen Transportwegen im viel komplexeren in vivo-Modell, oder im schnellen Metabolismus der Verbindungen, worauf die relativ hohe Clearance (im Vergleich zu CYP11B2-Inhibitoren) hindeuten könnte. Um zu untersuchen, ob die Verbindungen einem schnellen Phasen-Metabolismus unterliegen, wurde ihre Stabilität an Rattenlebermikrosomen untersucht.

➤ **Überprüfung der metabolischen Stabilität von EZ128B und EZ227 in vitro an Rattenlebermikrosomen**

Um eine Aussage über die Geschwindigkeit der Metabolisierung der Substanzen zu erhalten, wurde ihre Halbwertszeit in vitro mittels Rattenlebermikrosomen (Sprague Dawley, male Pool, BD Gentest, Woburn, USA) bestimmt (Pharmacelsus CRO).

Die Substanzen wurden in Acetonitril gelöst und mit einer Suspension von Mikrosomen in Phosphatpuffer (pH7,4) und NADP-regenerierendem System bei 37°C für 60min inkubiert. Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden Proben nach 0, 15, 30 und 60min entnommen und die Umsetzung durch Acetonitrilfällung abgestoppt (s. Tabelle 27 „Metabolische Stabilität in vitro“). Die Analyse der Proben auf den Restgehalt der Substanzen im Verhältnis zur Ausgangskonzentration erfolgte per LC/MS/MS.

Verbindung	Halbwertszeit $t_{1/2}$ MW ¹ [min]
EZ128B	13,6
EZ227	49,8
Diazepam	40,8
Diphenhydramin	6,8

Tabelle 27: Metabolische Stabilität in vitro

¹Mittelwert; relative Standardabweichungen <10%

Verbindung EZ128B weist *in vitro* eine relativ niedrige metabolische Stabilität auf. Ihre Halbwertszeit ist nur wenig besser als diejenige der schnell metabolisierten Referenz Diphenhydramin. Die Stabilität von EZ227 gegenüber dem mikrosomalen Abbau ist hingegen sogar noch höher als die der langsam metabolisierten Referenz Diazepam, sie liegt in einem sehr guten Bereich.

Beide Forschungssubstanzen liegen also im selben Bereich wie eingesetzte Arzneistoffe.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denjenigen *in vivo*, so korrelieren sie für EZ128B gut, für EZ227 allerdings wenig. Außer diesem mikrosomalen Phase I-Metabolismus *in vitro* müssen also noch andere Effekte für die vergleichsweise niedrige Verfügbarkeit *in vivo* verantwortlich sein. Als mögliche Ursachen dafür kommen multiple Transportwege (Efflux, aktive Aufnahme, Interspezies-Unterschiede) oder schneller Phase II-Metabolismus (Glucuronidierung, Sulfatierung der Phenole, [Smith et al., 2006]) *in vivo* in Frage. Auf ersteres würden die niedrigen c_{max} -Werte hinweisen, auf letzteres deutet die relativ hohe Clearance hin.

3.5 Aufnahme der 17 β -HSD1-Inhibitoren in MCF7-Zellen als Modell eines möglichen Targetorgans (Mammakarzinom)

Im arbeitskreisinternen Enzymtest hochpotente Verbindungen zeigten eine unerwartet niedrige Aktivität in einem zellulären Test einer externen Kooperationsgruppe mit transfizierten (17 β -HSD1 bzw. 17 β -HSD2) MCF7-Zellen (s. Tabelle 28 „Aktivität ausgewählter 17 β -HSD-Inhibitoren im Enzymtest und im Zelltest“) [Dissertation Erika Ziegler, 2006].

Verbindung	Enzymtest IC ₅₀ [μ M] ³	Zelltest ¹ Hemmung [%] ³
EZ128B	0,02	-0,4
EJB100A	0,18	20,0
MX8	0,12	13,1

Tabelle 28:

Aktivität ausgewählter 17 β -HSD-Inhibitoren im Enzymtest und im Zelltest

¹Inkubation mit 1 μ M Inhibitor für 30min,

²prozentuale Hemmung bei 1 μ M Inhibitor,

³Mittelwerte, relative Standardabweichung < 10%

Da die Verbindungen am nackten 17 β -HSD1-Enzym sehr potent waren, ist es erstaunlich, dass im Zelltest ihre Aktivität so stark abnimmt. Mögliche Ursachen hierfür wären die Expression des falschen Enzyms im Zelltest, eine schnelle metabolische Inaktivierung der Verbindungen (z.B. Phase II) oder ihre mangelnde Membrangängigkeit. Die Substanzen könnten auch, obwohl sie im Caco-2 Modell gut permeabel sind, aufgrund morphologischer Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien trotzdem schlecht in die transfizierten MCF7-Zellen aufgenommen werden. Um dies abzuschätzen, wurden Aufnahmestudien ausgewählter Verbindungen möglichst verschiedener Struktur mit einer hauseigenen MCF7-Zelllinie, die zugleich als Modell des Targetorgans diente, durchgeführt. Diese Zelllinie könnte sich zwar in ihren Eigenschaften (z.B. morphologisch) immer noch stark von der externen transfizierten Zelllinie unterscheiden (vgl. hausinterne HEK1- und HEK2-Zelllinie), aber ihre Ähnlichkeit untereinander wäre höher als die zu Caco-2, womit die Übertragbarkeit der Testergebnisse steigen würde.

3.5.1 Aufnahmestudien per Fluoreszenzmessung

Da einige der Substanzen aufgrund ihrer Struktur Fluorochrome sind (z.T. Planarität, elektronenreiche und elektronenarme funktionelle Gruppen), sollte ihre intrazelluläre Lokalisation durch die hochsensitive dreidimensional bildgebende Technologie der Konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) bestimmt werden (s. „Material und Methoden“).

Da die Messwellenlänge des verwendeten Mikroskops im grünen Fluoreszenzbereich bei 485nm Excitation und 535nm Emission liegt, wurden zunächst die UV-Absorptionsspektren aller potenten Inhibitoren aufgenommen, um festzustellen, welche Substanzen bei der benötigten Wellenlänge fluoreszieren könnten. Mit dieser ersten Auswahl an Substanzen wurden dann Fluoreszenzmessungen in dem benötigten Wellenlängenbereich in der für die späteren Inkubationstests verwendeten Matrix durchgeführt (Victor-Wallac-Platereader, s. „Material und Methoden“). Die Verbindungen mit der stärksten Fluoreszenz wurden dann mit MCF-7-Zellen inkubiert, um ihre Aufnahme per CLSM zu untersuchen (s. Abbildung 39 „Testset für zelluläre Aufnahmestudien per CLSM“).

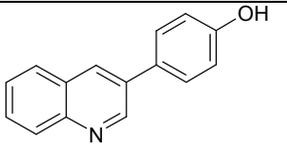
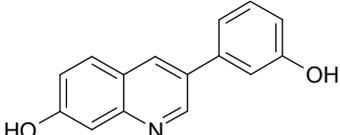
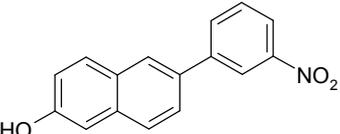
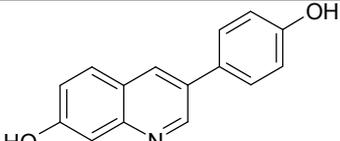
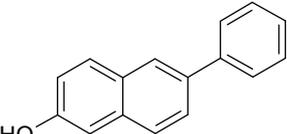
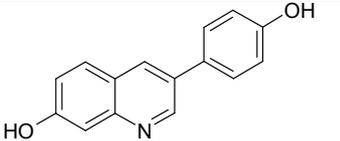
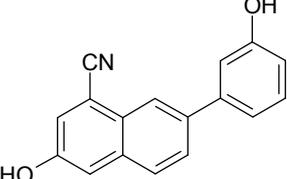
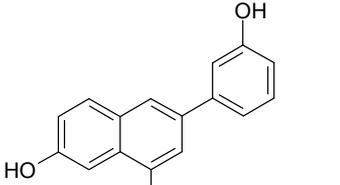
Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
EZ2		SOM19C	
EZ55B		SOM10D	
EZ100C		SOM17B	
MX8		TM6	

Abbildung 39: Testset für zelluläre Aufnahmestudien per CLSM

Diese Verbindungen wurden alle in einer Konzentration von 50µM während 3 Stunden bezüglich ihrer Aufnahme in MCF7-Zellen- und als Referenz teilweise auch in Caco-2-Zellen- getestet (s. „Material und Methoden“).

Leider konnten im MCF7- Test nicht alle Verbindungen per CLSM intrazellulär detektiert werden. Daher wurde vermutet, dass diese Substanzen bei der hohen Anregungslichtintensität des Mikroskops instabil sind. Dies konnte dann auch durch Stabilitätstests bei Licht und Raumtemperatur bestätigt werden, wobei die Fluoreszenzintensität innerhalb zweier Tage deutlich abnahm.

Deutliche Fluoreszenz nach dem Inkubationstest sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zeigten SOM19C, SOM10D und EZ100C (s. Abbildung 40 „Intrazelluläre Lokalisation von SOM19C“). SOM19C konnte intrazellulär sogar noch bei einer Konzentration im Inkubationsmedium von 6,25µM nachgewiesen werden, sowohl in Caco-2 als auch in MCF7-Zellen; SOM10D und EZ100C nur bis zu einer Konzentration von 12,5µM. Bei Caco-2 war die Fluoreszenzintensität sogar noch etwas höher als in MCF7-Zellen- vermutlich aufgrund unterschiedlicher Morphologie der Zellmembranen.

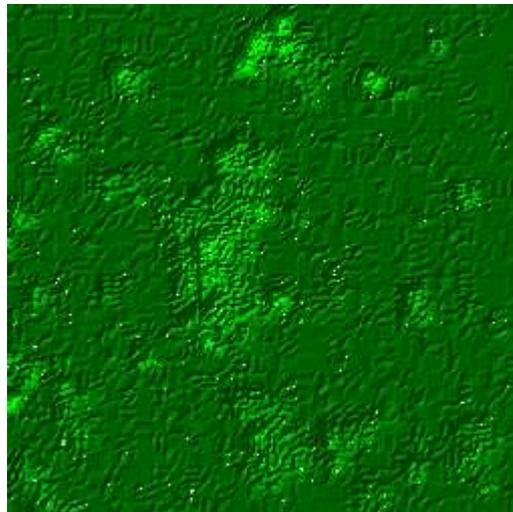


Abbildung 40: Intrazelluläre Lokalisation von SOM19C

Nachdem die Substanzklasse also mit Hilfe dreidimensionaler Aufnahmen eindeutig intrazellulär nachgewiesen werden konnte, sollte der intrazelluläre Gehalt bestimmt werden.

Bei dem Versuch, den intrazellulären Gehalt der Verbindungen per CLSM zu bestimmen, stellte sich heraus, dass dies leider nicht möglich war, da in zellfreien

Kalibrierlösungen keine Fluoreszenz messbar war (die Lichtinstabilität ist in zellfreiem Milieu höher als innerhalb des reduzierenden Milieus von Zellen). Die Quantifizierung per Victor-Wallac-Platereader war aufgrund seiner mangelnden Sensitivität nicht möglich. Außerdem stellte sich durch Fluoreszenzmessungen per Victor-Wallac-Platereader in Gegenwart von Proteinen (FKS) heraus, dass die Intensitäten sich offensichtlich aufgrund von Wechselwirkungen mit den Proteinen deutlich verändern. Da dieser Effekt schwer eliminierbar ist, wurde beschlossen, den intrazellulären Gehalt strukturell möglichst verschiedener Verbindungen als Modelle für ihre jeweilige Substanzklasse per LC/MS/MS zu bestimmen (s. Abbildung 41 „Testset für zelluläre Aufnahmestudien per LC/MS/MS“).

3.5.2 Aufnahmestudien per LC/MS/MS

Bei Verwendung dieser Methode zur intrazellulären Quantifizierung der Inhibitoren wird zwar der zellmembrangebundene Anteil der Verbindungen nicht erfasst, sie gibt aber einen guten Anhaltspunkt über das Ausmaß der Membrangängigkeit- die Aufnahme ins Zellinnere. Untersucht wurde die Aufnahme von EZ128B, EZ247, EJB100A, MX8 und SOM19C.

Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
EZ128B		EZ247	
EJB100A		MX8	
SOM19C			

Abbildung 41: Testset für zelluläre Aufnahmestudien per LC/MS/MS

➤ **Auswahl des Testsets**

Durch die Aufnahmestudien von EZ128B, EJB100A und MX8 konnte direkt untersucht werden, ob die Ursache der mangelnden Aktivität im Zelltest (s. Tabelle 28 „Aktivität ausgewählter 17 β -HSD1-Inhibitoren im Enzymtest und im Zelltest“) eine mangelnde Membrangängigkeit ist. Verbindung EZ247 ist eine am nackten Enzym hochpotente Substanz (IC₅₀ an 17 β -HSD1: 0,03 μ M) als Modell für eine weitere Substanzklasse; SOM19C war die derzeitige Substanz mit der stärksten intrazellulären Fluoreszenz bei CLSM- Messungen.

➤ **Intrazellulärer Gehalt der Inhibitoren in MCF-7-Zellen**

Die MCF7-Zellen wurden für 3h mit jeweils 50 μ M einer Substanz inkubiert (s. „Material und Methoden“), danach wurden die Zellen gewaschen und homogenisiert und die Konzentrationen im Überstand (vereinigt mit den Waschlösungen) als auch im Zellhomogenat wurden nach Flüssigextraktion per LC/MS/MS bestimmt (s. Tabelle 29 „MCF7-Aufnahmestudien per LC/MS/MS“).

Verbindung	Intrazelluläre Konzentration [μ M] MW \pm rel SD ¹
SOM19C	4,3 \pm 0,3
EZ128B	1,5 \pm 9,5
EJB100A	3,7 \pm 7,4
MX8	8,3 \pm 8,5
EZ247	0,3 \pm 10,4

Tabelle 29: MCF7-Aufnahmestudien per LC/MS/MS

¹Mittelwert \pm relative Standardabweichung

Aus diesem Aufnahmetest geht hervor, dass alle Substanzen in die untransfizierten MCF-7-Zellen aufgenommen werden. Der höchste intrazelluläre Gehalt wurde für MX8 gefunden (16,6%), am wenigsten permeierte EZ247 ins Zellinnere (0,6%).

Wenn man die intrazellulären Konzentrationen von EZ128B, EJB100A und MX8 mit ihren IC₅₀-Werten im zellfreien Test korreliert, lässt sich ihre fast völlig fehlende

Aktivität im Zelltest anhand dieses Modells nur partiell mit mangelnder Aufnahme in die Zellen begründen.

Mögliche Ursachen für die fehlende Aktivität im externen Modell mit 17 β -HSD1-transfizierten MCF7-Zellen wären demnach die dort gewählte niedrigere Inkubationsdauer (30min) und die niedrige Testkonzentration (0,1-1 μ M). Außerdem kämen eventuell eine durch die Transfektion im Aufbau stark veränderte Zellmembran als Aufnahmehindernis oder ein schnellerer Metabolismus der Substanzen in Frage.

4 CYP11B2-Projekt

Im Rahmen meiner projektübergreifenden Arbeit wurden auch präklinische Studien im Bereich der Aldosteronsynthese (CYP11B2) durchgeführt.

4.1 Physiologische Grundlage und therapeutischer Ansatz des Projektes

Die Aldosteronsynthese (CYP11B2) katalysiert als einziges Enzym die beiden letzten Stufen der Biosynthese von Aldosteron, also des potentesten Mineralocorticoids im Menschen. D.h. CYP11B2 ist das Schlüsselenzym der humanen Mineralocorticoidbiosynthese (s. „Einleitung“).

Bei verschiedenen Erkrankungen wie z.B. Herzinsuffizienz und Myokardfibrose kommt es aufgrund physiologischer Regelkreise (z.B. RAAS) zu einer die Krankheitsbilder verschlimmernden, pathophysiologischen Aldosteronwirkung (s. „Einleitung: Circulus Vitiosus“). Traditionell wurde deshalb versucht, die Aldosteronwirkung mit Antagonisten am Mineralocorticoidrezeptor zu unterdrücken (klinische Studien: RALES, EPHESUS). Da dies jedoch die Aldosteronspiegel nicht absenkte, und es außerdem zu gefährlichen Nebenwirkungen kam (tödliche Hyperkalämien), wurde im Arbeitskreis ein völlig neues Konzept entwickelt- die Hemmung der Biosynthese von Aldosteron (CYP11B2) durch nichtsteroidale CYP11B2-Inhibitoren. Dieser neue Ansatz impliziert also eine Bekämpfung der Ursache, statt der Blockade der Wirkung eines weiterhin im System präsenten biologisch aktiven Effektors (s. Abbildung 42 „Schema zur Therapie von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose“).

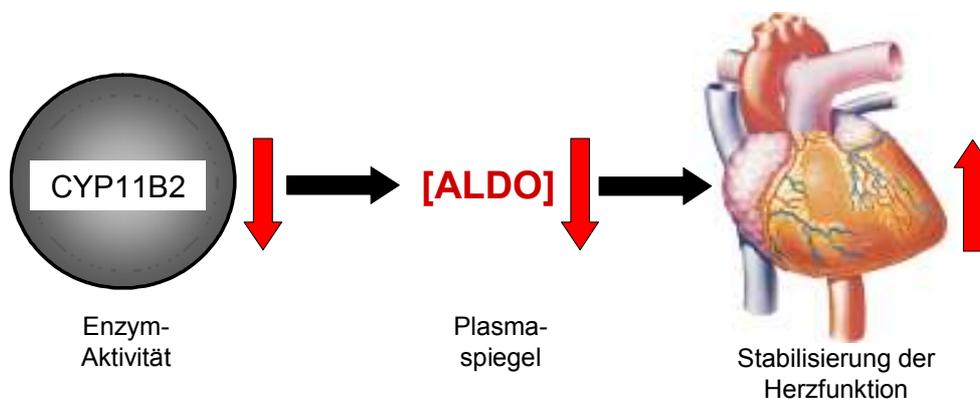


Abbildung 42: Schema zur Therapie von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose

CYP11B2: Aldosteronsynthese; [ALDO]: Plasmaspiegel von Aldosteron

Der entscheidende Vorteil dieses neuen Therapieansatzes ist somit die Durchbrechung des „Circulus Vitiosus“ der pathophysiologischen Aldosteronwirkung. Außerdem sind die zu erwartenden Nebenwirkungen der hochselektiven, nichtsteroidalen CYP11B2-Inhibitoren viel geringer als die der traditionellen (steroidalen) Mineralocorticoidrezeptorantagonisten.

Zur umfassenden präklinischen Selektion der besten der neu entwickelten Inhibitoren wurden verschiedene *in vitro*- und *in vivo*- Screenings hinsichtlich der Pharmakodynamik und der Pharmakokinetik durchgeführt.

4.2 Substanzklassen der besten Inhibitoren

Die wichtigsten untersuchten Verbindungsklassen waren heteroarylsubstituierte Naphthaline bzw. heteroarylsubstituierte Dihydro-naphthaline und -indane (s. Abbildung 43 „CYP11B2-Inhibitor-Leitstrukturen I“), sowie Imidazolymethylen-tetrahydronaphthaline, Imidazolymethylenindane, (Pyridylmethylen)tetrahydronaphthaline und -indane (s. Abbildung 44 „CYP11B2-Inhibitor-Leitstrukturen II“).

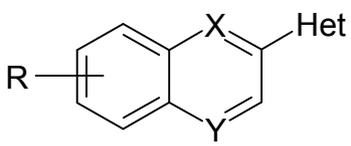
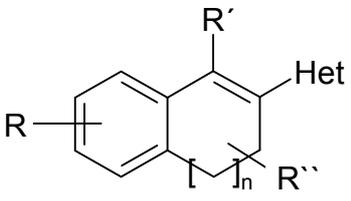
Leitstrukturen	Substitutionsmuster
	Het: 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 5-Pyrimidyl, 1-Imidazolyl, 5-Imidazolyl, 5-(N-Me)-Imidazolyl, 5-Oxazolyl X: CH, N Y: CH, N R: H, Br, Cl, OH, OMe, OEt, OPr, OBn, CN, COOMe, CONH ₂ , CONHMe
	Het: 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 1-Imidazolyl n: 0, 1 R: H, OMe R': H, Me, Et R'': H, Me, Et

Abbildung 43: CYP11B2-Inhibitor-Leitstrukturen I

[Voets et al., 2005 und 2006]

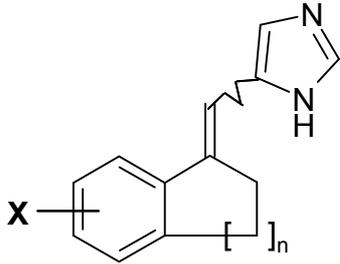
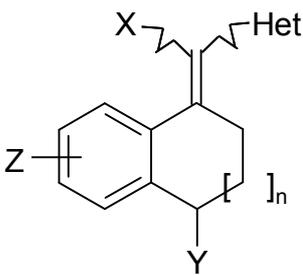
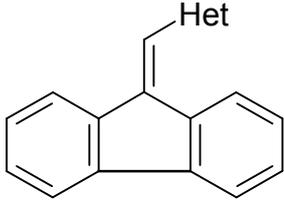
Leitstrukturen	Substitutionsmuster
	<p>n: 1,2 X: H, CN, F, Cl, Br E- oder Z-Isomer</p>
	<p>n: 0, 1 Het: 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 5-Pyrimidyl, 5-Thiazolyl, 4-Chinolinyl, 5-Chinolinyl, 4-Isochinolinyl X: H, CH₃ Y: H, CH₃, C₂H₅ Z: H, F, Cl, Br, OCH₃, OC₂H₅, OBn, CH₃</p>
	<p>  : E- oder Z-Isomer - - - : mit oder ohne Bindung</p>

Abbildung 44: CYP11B2-Inhibitor-Leitstrukturen II

[Ulmschneider et al., 2005a und 2005b]

4.3 Verfügbarkeit im Caco-2 Modell

Da bei chronischen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und Myokardfibrose eine Langzeittherapie indiziert ist, wäre auch hier eine perorale Applizierbarkeit der CYP11B2-Inhibitoren wünschenswert. Diese sollte, wie in den anderen Teilprojekten des Arbeitskreises, zunächst im besten verfügbaren in vitro-Modell für perorale Absorption- den Caco-2-Monolayern- überprüft werden.

Dazu wurden aus beiden Leitstrukturklassen einige der im transfizierten V79-Zellmodell [Dissertation Müller-Vieira, 2006] potentesten und selektivsten Verbindungen ausgewählt (s. Tabellen 30-31 „Testset der „Leitstrukturen I“ im Caco-2-Transportmodell“).

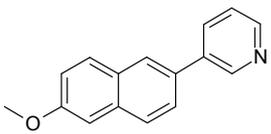
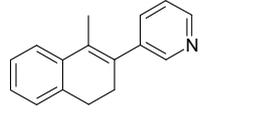
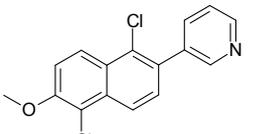
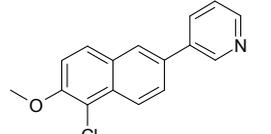
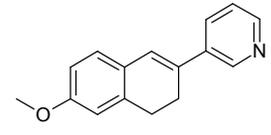
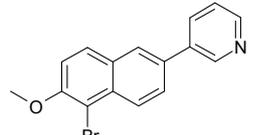
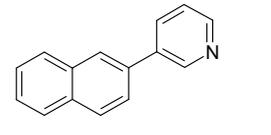
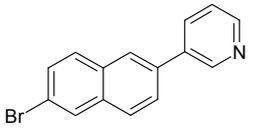
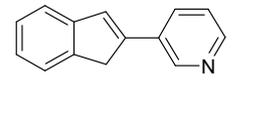
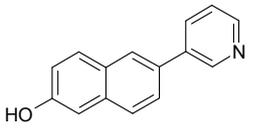
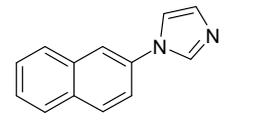
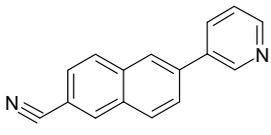
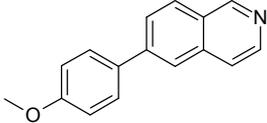
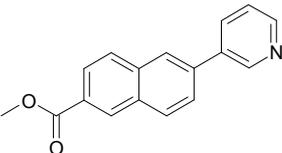
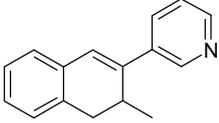
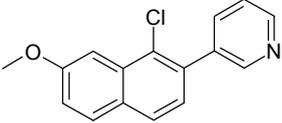
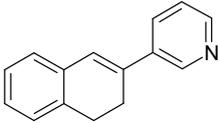
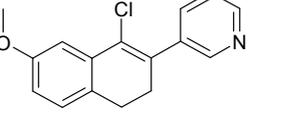
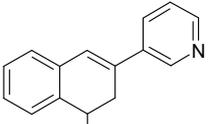
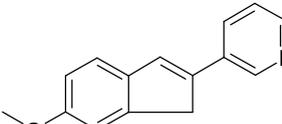
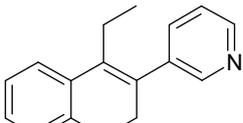
Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
MV23		MV51	
MV41		MV38	
MV45		MV42	
MV22		MV31	
MV26		MV28	
MV20		MV55	

Tabelle 30: Testset der „Leitstrukturen I“ im Caco-2-Transportmodell

Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
MV64		MV57	
MV46		MV40	
MV18		MV39	
MV44		MV49	
MV65			

**Tabelle 31: Testset der „Leitstrukturen I“ im Caco-2-Transportmodell
(Fortsetzung)**

4.3.1 „Cassette dosing“ der CYP11B2-Inhibitoren

4.3.1.1 Ansatz

Da es sich beim überwiegenden Anteil der Patientenklientel des Projektes um ältere, multimorbide Patienten handelt, die unter Multitherapie stehen, sollte ein „cassette dosing approach“ (= „multiple dosing approach“) im Caco-2-Transportmodell für die Verbindungen etabliert werden. Dieses Verfahren ist außerdem bei Präscreenings aus rationellen Gründen üblich. So werden in einem frühen Entwicklungsstadium die besten Verbindungen eines Gemisches durch die Konkurrenz um (eventuell gleiche) Transportwege ausgefiltert.

Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass es durch gegenseitige Interaktionen zu falsch positiven (Transporterinduktion) oder falsch negativen Ergebnissen (kompetitive Konkurrenz um Transportwege, Hemmung aktiver Transporter) kommen kann.

Da die Mehrzahl der Arzneistoffe allerdings den passiv transzellulären Transportweg nutzt, und nur eine begrenzte Anzahl von Verbindungen (hier maximal fünf) im Gemisch appliziert wird, ist es relativ unwahrscheinlich, dass es zu solchen Beeinträchtigungen kommt. Trotzdem sollte in jedem Gemisch eine Referenzverbindung mitgetestet werden, um die Transportergebnisse zusätzlich zu untermauern.

4.3.1.2 Etablierung des „Cassette dosings“

➤ Vorversuch

Zunächst wurden nur drei Verbindungen hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens bei Einzelapplikation („single dosing“) im Vergleich zur Applikation als Gemisch („multiple- oder cassette dosing“) miteinander verglichen (s. Tabelle 32 „Vorversuch zum „cassette dosing““).

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -multiple [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV23	9,0 ± 3,8	7,9 ± 0,6
MV41	2,1 ± 2,6	2,2 ± 2,5
MV45	13,5 ± 1,6	12,0 ± 3,0

Tabelle 32: Vorversuch zum cassette dosing

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Die Permeabilitäten von MV23 und MV45 nehmen bei einer Applikation im Gemisch im Vergleich zur Einzeltastung leicht ab, die Permeabilität von MV41 verändert sich nicht. Die schwache Abnahme des Transportes von MV23 und MV45 könnte auf einer Konkurrenzsituation der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen um einen Carrier beruhen, d.h. ihr Transport verläuft scheinbar nicht ausschließlich über den passiv transzellulären Weg. Das Verhalten von MV41 bleibt unverändert, da sie scheinbar nicht mit den beiden anderen Verbindungen interagiert.

Alle Verbindungen bleiben jedoch bei beiden Applikationsarten im gleichen Klassifizierungsbereich der Permeabilität (MV45: hoch, MV23: hoch, MV41: mittel), und die Reihenfolge ihrer Membrangängigkeit (MV45>MV23>MV41) ändert sich nicht. Daher erscheint die Methode geeignet, um mit erhöhtem Durchsatz kinetische Präscreenings der CYP11B2-Inhibitor-Klasse durchzuführen.

➤ **Erweitertes „cassette dosing“**

Um die Anwendbarkeit der Methode für die Verbindungsklasse weiter zu untersuchen bzw. abzusichern, wurde das Testset von 3 auf 5 Verbindungen erweitert (s. Tabelle 33 „Erweitertes „cassette dosing““). Außerdem würde der Durchsatz mit einer höheren Verbindungsanzahl pro Gemisch weiter steigen. Mehr Verbindungen sollten allerdings nicht simultan mit den Caco-2 Monolayern inkubiert werden, um falsch negative Ergebnisse durch eine mögliche Sättigung eventuell durch die Substanzen genutzter, aktiver Transportsysteme zu vermeiden.

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -multiple [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV23	N.G. ⁴	4,5 ± 3,0
MV41	N.G. ⁴	2,5 ± 2,4
MV45	N.G. ⁴	4,8 ± 3,9
MV22	5,5 ± 4,2	2,9 ± 0,1
MV26	7,9 ± 0,5	6,6 ± 1,9

Tabelle 33: Erweitertes cassette dosing

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁴nicht erneut getestet

Die Permeabilitäten von Verbindung MV41 und MV26 nehmen im Gemisch im Vergleich zur Einzelverabreichung nicht merklich ab, was darauf hindeutet, dass die strukturell zum restlichen Testset unterschiedlichen Verbindungen keinen Interaktionen bezüglich ihrer Membranpassage unterliegen.

Die Permeabilität der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen MV23, MV45 und MV22 nimmt hingegen im 5er-Gemisch im Vergleich zum 3-er-Gemisch ab, was auf eine Konkurrenzsituation im Transport hinweist. Die Permeabilität dieser Verbindungen würde also bei einer Verabreichung im Gemisch unterschätzt werden. Da die Reihenfolge und die Klassen der Permeabilitäten jedoch gleich bleiben, ist das „cassette dosing“-Modell durchaus einsetzbar, wenn man eine Referenz zur Abschätzung des Ausmaßes der Interaktionen mittestet.

➤ **Cassette dosing mit MV45 als Referenz**

Aus den obigen Gründen wurde als Referenz für die Testung weiterer Gemische (s. Tabellen 34-36 „Testmix 1“ bis „Testmix 3“) die im „single dosing“ hoch permeable Verbindung MV45 ausgewählt.

Wenn die Permeabilität der Referenz (oder jeder anderen Verbindung) im Gemisch im Vergleich zur Einzelapplikation sinkt, ist das ein Indiz für Interaktionen mit strukturell ähnlichen Verbindungen, d.h. deren Membrangängigkeit könnte im „single dosing“ höher liegen als im Gemisch. Alternativ könnte auch durch die anderen Verbindungen des Sets ein am Transport von MV45 beteiligter Uptake-Carrier gehemmt werden, was allerdings relativ unwahrscheinlich ist, da die Konzentration der einzelnen Verbindungen zur totalen Hemmung eines Transportenzym zu gering ist, und es vermutlich nicht durch mehrere Verbindungen gleichzeitig gehemmt werden würde. Die partielle Hemmung eines Carriers wäre allerdings vorstellbar.

Ein Anstieg der Permeabilität der Referenz (oder jeder anderen Verbindung) im Gemisch im Vergleich zur Einzelapplikation ist nicht zu erwarten, da hierzu entweder die Hemmung eines Effluxenzymes erfolgen müsste, oder ein Uptake-Transporter induziert werden müsste. Ersteres ist aus Konzentrationsgründen unwahrscheinlich, letzteres ist aufgrund der kurzen Inkubationsdauer (3h) nicht realistisch.

Falls es das Ziel wäre, die Permeabilität jeder Verbindung möglichst exakt zu bestimmen, müssten die Verbindungen also einzeln getestet werden. Da es in der Arzneistoffentwicklung jedoch um eine schnelle Einordnung nach rationellen Kriterien geht, ist aus obigen Gründen eine zusätzliche einzelne Testung nur bei im Gemisch niedrig permeablen Substanzen sinnvoll, nicht bei den mittel bis hoch permeablen. Wenn nämlich die Permeabilität einer Verbindung im Gemisch hoch ist, ist sie es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch bei Einzelapplikation.

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -multiple [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV45	15,1 ± 1,2
MV20	12,6 ± 0,6
MV64	13,4 ± 1,3
MV46	11,0 ± 5,2
MV18	14,6 ± 4,6

Tabelle 34: Testmix 1

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

In „Testmix 1“ sind sich strukturell MV45, MV46 und MV18 am ähnlichsten. Da sich die Permeabilität der Referenz MV45 im Vergleich zum „single dosing“ allerdings nicht geändert hat, scheinen keine Interaktionen vorzuliegen, die sich auf die Membrangängigkeit auswirken. Außerdem liegen alle getesteten Verbindungen im Gemisch im oberen Permeabilitätsbereich, weshalb sie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch einzeln appliziert gut membrangängig sind. Die Ergebnisse des Testmix 1 müssen also nicht durch zusätzliche Einzeltestung überprüft werden.

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -multiple [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV45	3,6 ± 1,8
MV51	3,4 ± 1,7
MV38	1,5 ± 4,3
MV42	1,0 ± 7,7
MV31	1,2 ± 4,7

Tabelle 35: Testmix 2

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Im Testmix 2 sind sich die Verbindungen MV45 und MV51, sowie MV38, MV42 und MV31 untereinander am ähnlichsten. Es liegen offensichtlich Wechselwirkungen vor, da die Membrangängigkeit von MV45 im Vergleich zur Einzelapplikation deutlich abgesunken ist. Die single- Permeabilität der Verbindungen ist also deutlich höher einzuschätzen.

MV51 liegt bei single dosing somit voraussichtlich im mittleren bzw. im hohen Permeabilitätsbereich, da kein falsch positives Ergebnis (Überschätzung der Permeabilität) im „multiple dosing“ zu erwarten ist, sie muss also nicht zusätzlich einzeln getestet werden.

Für die relativ niedrig permeablen Verbindungen MV38, MV42 und MV31 könnte allerdings ein falsch negatives Ergebnis im „multiple dosing“ vorliegen. Da ihre potentiellen Permeabilitätsänderungen im „single dosing“ aufgrund ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen nicht abschätzbar sind, wurden die drei im Gemisch relativ niedrig permeablen Verbindungen zusätzlich im „single dosing“ untersucht (s. Tabelle 37 „Überprüfung der single-Permeabilität von im Gemisch niedrig permeablen Verbindungen“).

Verbindung	$P_{app}^{1(A>B)^2}$ -multiple [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV45	4,7 ± 4,5
MV28	17,4 ± 1,0
MV55	10,8 ± 5,9
MV57	N.D.
MV40	0,5 ± 7,8

Tabelle 36: Testmix 3¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,²Transport von apikal nach basolateral,³Mittelwert ± relative Standardabweichung,⁴nicht detektierbar

In Testmix 3 haben alle Verbindungen die gleiche Grundstruktur, tragen aber unterschiedliche funktionelle Gruppen. Interaktionen zwischen ihnen sind also möglich, worauf auch die reduzierte Membrangängigkeit von MV45 hindeutet. Da MV28 und MV55 allerdings schon im Gemisch hoch permeabel sind, müssen sie aus den oben genannten Gründen nicht zusätzlich einzeln getestet werden. Die Permeabilität der im Gemisch niedrig membrangängigen Verbindungen ist wiederum nicht abschätzbar und muss per Einzelapplikation überprüft werden (s. Tabelle 37 „Überprüfung der single-Permeabilität von im Gemisch niedrig permeablen Verbindungen“).

➤ **Überprüfung der „cassette dosing“- Ergebnisse niedrig permeabler Inhibitoren per „single dosing“**

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ - single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV31	0,2 ± 1,5
MV38	1,5 ± 2,7
MV40	0,5 ± 3,9
MV42	1,0 ± 0,3
MV57	N.D.

Tabelle 37: Überprüfung der single-Permeabilität von im Gemisch niedrig permeablen Verbindungen

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung,

⁴nicht detektierbar

Die in den verschiedenen Testmischungen (Testmix 1 bis Testmix 3) niedrig permeablen Verbindungen wurden zur Sicherheit zusätzlich im „single dosing“ getestet. Die Membrangängigkeit von allen lag auch hier im niedrigen Bereich. Insgesamt konnten die Ergebnisse des cassette dosings also auf das single dosing übertragen werden.

➤ **Fazit**

Somit erscheint das rationalisierte Verfahren des „multiple dosings“ für kinetische Präscreenings der Substanzklasse als geeignet, um gute und schlechte Kandidaten aus einem Set schnell auszufiltern.

Legt man jedoch Wert auf eine möglichst exakte Einteilung ist die Einzelapplikation sicherer, auch wenn diese kaum den physiologischen Gegebenheiten im Darm (Konkurrenzsituation zwischen verschiedenen Substanzen) entspricht.

4.3.2 „Single dosing“ von CYP11B2-Inhibitoren

➤ Verbindungen des Typs der Leitstruktur I (s. Abbildung 43)

Später wurde noch ein kleines Set weiterer Verbindungen auf seine Permeabilität untersucht. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Substanzen wurde im „single dosing“ getestet (s. Tabelle 38 „Single-Permeabilität weiterer Verbindungen“).

Verbindung	$P_{app}^1 (A>B)^2$ -single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
MV39	3,9 ± 3,8
MV44	16,6 ± 0,5
MV49	12,5 ± 1,4
MV65	21,6 ± 2,8

Tabelle 38: Single-Permeabilität weiterer Verbindungen

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Die Permeabilität von MV39 lag im unteren bis mittleren Bereich, diejenige der anderen Verbindungen war hoch. Die hoch permeablen Verbindungen besäßen vermutlich also auch in vivo gute Absorptionseigenschaften- MV39 eher schlechte.

➤ **Verbindungen des Typs der Leitstrukturen II (s. Abbildung 44)**

Außer den Substanzen der Leitstrukturen I, wurden als Modellverbindungen auch ausgewählte Verbindungen der Leitstrukturen II auf ihre Verfügbarkeit im Caco-2-Transportmodell untersucht. (s. Tabelle 39 „Testset der „Leitstrukturen II“ im Caco-2-Transportmodell“).

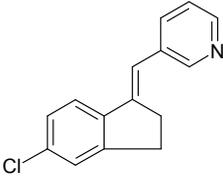
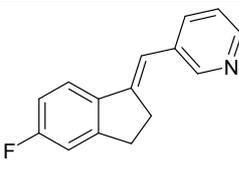
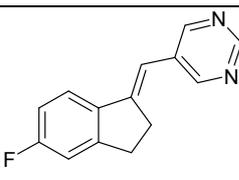
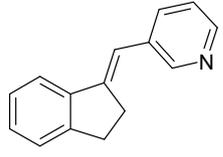
Verbindung	Struktur
SU1A	
SU11A	
SU20A	
TS3	

Tabelle 39: Testset der „Leitstrukturen II“ im Caco-2-Transportmodell

Die Verbindungen wurden ebenfalls im „single dosing“ getestet, da nur ein kleines Testset vorgesehen war (s. Tabelle 40 „Permeabilität von Verbindungen des Typs der Leitstrukturen II“).

Verbindung	P_{app}^1 (A>B) ² - single [X*10 ⁻⁶ cm/sec] [MW ± rel. SD] ³
SU1A	13,2 ± 0,7
SU11A	12,9 ± 0,7
SU20A	21,0 ± 1,1
TS3	17,1 ± 1,9

Tabelle 40: Permeabilität von Verbindungen des Typs der Leitstrukturen II

¹apparenter Permeabilitätskoeffizient,

²Transport von apikal nach basolateral,

³Mittelwert ± relative Standardabweichung

Das Ergebnis der Caco-2-Transporttests war, dass die Verbindungsklasse hoch permeabel ist, also voraussichtlich in vivo peroral gut verfügbar wäre.

Die potentiell in vivo gut verfügbaren Kandidaten sollten daher auf der nächst höheren Screening-Stufe der Kinetik- dem Rattenmodell- getestet werden.

4.4 Perorale Verfügbarkeit in vivo im Rattenmodell

Aufgrund der Ergebnisse des pharmakokinetischen Präscreenings im Caco-2-Transportmodell und der Aktivitäts- und Selektivitätsergebnisse gegenüber der humanen CYP11B2 in V79-Zellen [Ulmschneider et al., 2005; Voets et al., 2005], wurden die besten Kandidaten für einen Test auf perorale Bioverfügbarkeit in vivo ausgewählt. Die in vivo-Testung sollte in Ratten erfolgen, da dieses Modell weit verbreitet ist. Aus rationellen Gründen sollte die Testung außerdem nach dem „cassette dosing“-Prinzip erfolgen.

Bei Verwendung des Modells müssen natürlich die Interspezies-Unterschiede zum Menschen berücksichtigt werden, wobei nicht immer eine hohe Korrelation vorliegt. So ist die Absorption in kleinen Säugern z.B. Ratten viel schneller als im Menschen, ebenso wie die Elimination [Smith et al. 2006]. Die Versuche geben allerdings trotzdem eine sehr wertvolle Vorinformation im Prozess der Arzneistoffentwicklung.

4.4.1 Durchführung der in vivo-Tests

Es wurden separate Lösungen der Substanzen angefertigt und dann maximal Fünf-Komponentengemische in physiologischer Kochsalzlösung mit 10% DMSO hergestellt. Diese wurden den Tieren (fünf Tiere pro Kassette) mit einer Fütterungsnadel appliziert (5ml/kg Körpergewicht), die Konzentration der einzelnen Verbindungen betrug 1mg/ml. Es wurden insgesamt vier Sets von Verbindungen getestet, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten (0- 24h) Blutproben entnommen wurden (Testset 1 bis Testset 4, Pharmacelsus CRO). Zur Analyse des daraus gewonnenen Plasmas per LC/MS/MS wurde als interner Standard MV65 zugesetzt (Aufarbeitung der Plasmaproben s. „Material und Methoden“). Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der Software „PK-Solutions 2.0“ [Summit Research Services, Montrose, USA].

4.4.2 Perorale Kinetik verschiedener Testsets

Durch Aufnahme von Plasmaspiegel- Zeit- Kurven wurden die kinetischen Parameter von insgesamt 17 Verbindungen bestimmt (teilweise Doppelbestimmung zur Kontrolle) (s. Tabellen 41, 43-45 „Perorale Kinetik in vivo I-IV“). Ermittelt wurden die maximale Plasmakonzentration (c_{\max}), der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (t_{\max}), die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), die Clearance (Cl), die „area under the curve“ (Fläche unter der Plasmaspiegel- Zeit- Kurve: AUC), und die hepatische Extraktion (E_h) der Verbindungen aus dem Plasma. Die hepatische Extraktion (E) ist der Anteil einer verfügbaren Verbindung, der über die Leber ausgeschieden wird; er ist abhängig von Clearance (Cl) und Blutfluss (Q) durch die Extraktionsorgane ($E=Cl/Q$).

Die Bedeutung der anderen Parameter wurde bereits im Zusammenhang mit der peroralen in vivo-Testung von 17 β -HSD1-Inhibitoren erläutert [Smith et al., 2006].

4.4.2.1 Perorale Verfügbarkeit von Testset 1 in vivo

	Verbindung				
Parameter	MV18	MV23	MV45	SU11A	TS3
c_{\max} [ng/ml]	3940	222	43	5562	5644
t_{\max} [h]	1	1	2	1	1
$t_{1/2}$ [h]	3,0	5,4	15,4	2,6	2,6
Cl [l/kg/h]	0,2	3,2	6,8	0,2	0,1
AUC [ng/ml*h]	29189	1543	739	33879	38192
E_h [%]	7,3	60,0	75,8	6,4	5,7

Tabelle 41: Perorale Kinetik in vivo I

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration;

t_{\max} : Zeit, nach der c_{\max} erreicht wird;

$t_{1/2}$: Halbwertszeit;

Cl: Clearance;

AUC: area under the curve;

E_h : hepatische Extraktion

Bei der Auswertung der peroralen Kinetik dieser Verbindungen fiel auf, dass die besten Verbindungen die maximal erwarteten AUC- bzw. c_{\max} - Werte um Faktor 10

überstiegen. Dabei handelte es sich nicht um ein analytisches Problem, da die Quantifizierungen mehrfach in voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt wurden. Die Ursache war also entweder eine höhere Dosierung oder eine verzögerte hepatische Eliminierung (s. vergleichsweise niedrige hepatische Extraktion [%] der Verbindungen MV18, SU11A, und TS3).

Die Verbindungen MV18, SU11A und TS3 können jedenfalls als gut verfügbar angesehen werden. (Zur Absicherung der absoluten Verfügbarkeit wurde als Modell MV18 allerdings erneut getestet (s. „Testset 4, Tabelle 45“).) Sie wurden gut absorbiert, da sie eine kurze Anflutungszeit besaßen. Weiterhin wurden die Verbindungen innerhalb eines adäquaten Zeitrahmens eliminiert (CI).

MV23 und MV45 sind auch gut verfügbar, wenn man sie isoliert betrachtet, im Vergleich zu den restlichen Verbindungen des Sets sind sie allerdings niedrig verfügbar.

Die Korrelation zu den Caco-2 Tests ist für MV18, SU11A und TS3 gut, da dort alle Verbindungen als gut verfügbar prognostiziert wurden. Die beiden anderen Verbindungen entsprechen- wenn man sie im Gemisch als niedrig verfügbar betrachtet- nicht der in vitro- Prognose, was vermutlich auf ihre starke hepatische Extraktion zurückzuführen ist.

Die in vivo- Ergebnisse sind jedoch aufgrund ihrer höheren Komplexität generell aussagekräftiger sind als in vitro- Vorhersagen.

➤ **Überprüfung der metabolischen Stabilität von Testset 1 in vitro an hepatischen Mikrosomen**

Um die möglichen Ursachen für das Auftreten der unerwartet hohen Plasmaspiegel einiger Verbindungen von Testset 1 (s. Tabelle 41) zu überprüfen, und um zusätzliche Aussagen zum Metabolismus zu gewinnen, wurden Stabilitätstests der beiden am besten verfügbaren und der beiden am wenigsten verfügbaren Verbindungen mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt (Male Pool, Gentest, Woburn, USA; s. Tabelle 42 „Metabolische Stabilität in vitro“).

Verbindung	Halbwertszeit $t_{1/2}$ MW ¹ [min]
MV23	93
MV45	67
SU11A	71
TS3	67

Tabelle 42: Metabolische Stabilität in vitro

¹Mittelwert; relative Standardabweichungen <10%

Die Verbindungen wiesen alle eine gute metabolische Stabilität auf, da diejenige im Menschen ca. um Faktor 7 höher liegt als in diesem Modell. Die Stabilität ($t_{1/2}$) gegenüber den Mikrosomen korrelierte jedoch relativ wenig mit der peroralen Verfügbarkeit in vivo (AUC und E_h), da sie in vitro für alle Verbindungen im gleichen Bereich lag. Die ungewöhnlich hohen Plasmaspiegel von SU11A und TS3 in vivo müssen also eine andere Ursache als den hepatischen Phase I- Metabolismus haben.

Eventuell werden in vivo Transportenzyme, die zur Elimination benötigt werden von den Substanzen und ihren Metaboliten gehemmt, oder die Verbindungen hemmen synergistisch den Metabolismus durch die in vivo viel niedriger als in vitro konzentrierten hepatischen CYP-Enzyme.

4.4.2.2 Perorale Verfügbarkeit von Testset 2 in vivo

Parameter	Verbindung			
	MV31	MV51	SU1A	SU20A
c_{\max} [ng/ml]	39	8	54	138
t_{\max} [h]	1	1	2	1
$t_{1/2}$ [h]	6,0	6,8	4,0	1,6
Cl [l/kg/h]	22,7	156,5	17,0	8,1
AUC [ng/ml*h]	221	32	294	616
E_h [%]	91,3	98,6	88,7	79,0

Tabelle 43: Perorale Kinetik in vivo II

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration;

t_{\max} : Zeit, nach der c_{\max} erreicht wird;

$t_{1/2}$: Halbwertszeit;

Cl: Clearance;

AUC: area under the curve;

E_h : hepatische Extraktion

Die perorale Verfügbarkeit dieses Testsets war relativ niedrig. Die einzige Verbindung, die eine sehr gute Kinetik zeigte, war SU20A. Sie hatte eine gute AUC (gute Bioverfügbarkeit ab 500) und die restlichen Parameter waren auch günstig. MV31 und SU1A zeigten ein mittelgutes kinetisches Profil; dasjenige von MV51 war ungünstig, was darauf zurückzuführen sein könnte das MV51 relativ schnell eliminiert wurde, worauf die hohe Clearance hindeutet.

Bei allen Verbindungen war die hepatische Extraktion ziemlich hoch, was zusätzlich auf einen schnellen Metabolismus hinwies.

Da diese Parameter kaum per Caco-2 abschätzbar sind, ist die Korrelation zu dem in vivo- Modell in diesem Set relativ niedrig.

4.4.2.3 Perorale Verfügbarkeit von Testset 3 in vivo

Parameter	Verbindung				
	Fadrozol	MV22	MV26	MV28	MV39
c_{\max} [ng/ml]	487	374	339	13	11
t_{\max} [h]	1	1	1	1	1
$t_{1/2}$ [h]	4,0	10,7	7,1	40,4	5,9
Cl [l/kg/h]	1,8	4,2	5,2	37,4	166,1
AUC [ng/ml*h]	2839	1179	961	134	30
E_h [%]	45,0	66,3	70,7	94,5	98,7

Tabelle 44: Perorale Kinetik in vivo III

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration;

t_{\max} : Zeit, nach der c_{\max} erreicht wird;

$t_{1/2}$: Halbwertszeit;

Cl: Clearance;

AUC: area under the curve;

E_h : hepatische Extraktion

In diesem und im folgenden Testset wurde als Referenz Fadrozol- ein klinisch eingesetzter Aromatasehemmer- mitappliziert, um die Ergebnisse mit den Forschungssubstanzen direkt (modellabhängig) vergleichen zu können. Dadurch konnte man feststellen, dass Verbindung MV22 und MV26 ebenfalls ein sehr günstiges kinetisches Profil aufweisen. Sie besitzen hohe AUC- und c_{\max} - Werte und gute Halbwertszeiten sowie gute Clearance-Werte. Außerdem ist ihre hepatische Extraktionsrate niedriger als bei den anderen bisher getesteten Verbindungen, allerdings etwas höher als bei Fadrozol. Beide Forschungsverbindungen wären also potentielle Kandidaten für eine perorale Langzeittherapie. Das kinetische Profil von MV28 und MV39 war hingegen relativ ungünstig. Dies entsprach für MV39 der Prognose des Caco-2 Tests (niedrige Permeabilität in Caco-2), für MV28 allerdings nicht (hohe Permeabilität in Caco-2), was vermutlich durch die hohe Clearance in vivo verursacht wird.

4.4.2.4 Perorale Verfügbarkeit von Testset 4 in vivo

Parameter	Verbindung				
	Fadrozol	MV18	MV41	MV44	MV49
c_{\max} [ng/ml]	454	440	19	161	23
t_{\max} [h]	1	1	1	1	1
$t_{1/2}$ [h]	2,2	4,9	67,8	5,3	1,3
Cl [l/kg/h]	1,4	2,2	13,9	5,1	72,1
AUC [ng/ml*h]	3575	2236	359	972	69
E_h [%]	39,3	51,0	86,6	70,4	98,7

Tabelle 45: Perorale Kinetik in vivo IV

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration;

t_{\max} : Zeit, nach der c_{\max} erreicht wird;

$t_{1/2}$: Halbwertszeit;

Cl: Clearance;

AUC: area under the curve;

E_h : hepatische Extraktion

In diesem Testset wurde die bereits in Testset 1 (s. Tabelle 41) untersuchte Verbindung MV18 stellvertretend für MV18, SU11A und TS3 erneut untersucht, um deren kinetisches Profil abzusichern. Die Validierung der Testergebnisse erfolgte durch die simultane Applikation der Referenz Fadrozol. Durch die zweimalige Testung von Fadrozol (Testset 3 und Testset 4) wurde es zudem möglich, grob die Interassay-Schwankungen abzuschätzen. Es stellte sich heraus, dass sie gering waren, was sowohl zeigte, dass die Testdurchführung validiert war, als auch dass wenig Interaktionen innerhalb der Verbindungen der Testsets auftraten, die das kinetische Profil beeinflussten.

In Testset 4 zeigte sich, dass die Annahmen aus dem ersten Test zutrafen, dass MV18 ein sehr günstiges kinetisches Profil besitzt, und dass die AUC der Verbindung um Faktor 10 niedriger ist als in Testset 1 bestimmt. Dies ist auch auf die beiden anderen Substanzen SU11A, und TS3 übertragbar. Ihr kinetisches Gesamtprofil ist dennoch nur geringfügig schlechter als dasjenige von Fadrozol, was sie zu hochinteressanten Leitstrukturen für weitere Studien macht. Ebenfalls ein günstiges

Profil besaß MV44, weniger gut war MV41. Relativ ungünstig waren die Eigenschaften von MV49.

Eine absolute Aussage über die ADME- Parameter (Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination) war allerdings nicht möglich, da hierzu zusätzlich zur peroralen Studie die obigen Parameter nach intravenöser Applikation bestimmt werden müssten. Die erhaltenen Ergebnisse sind trotzdem sehr wertvoll für weitere Optimierungen.

➤ **Fazit**

Nachdem die grundlegenden kinetischen Daten der pharmakodynamisch „interessantesten“ Verbindungen (bzgl. Aktivität, Selektivität) bestimmt worden waren, sollten nun die im bisherigen Gesamtprofil (Kinetik und Dynamik) günstigsten Verbindungen weiterentwickelt werden.

Dazu sollten zunächst anhand eines komplexeren in vitro-Modells (als dem bisher verwendeten V79-Zelltest [Dissertation Müller-Vieira, 2005]) die besten Kandidaten für einen Aktivitätstest in vivo- als proof of concept- selektiert werden. Als Modell wurde ein in vitro-Test an Rattennebennierenstücken ausgewählt [Dissertation Grün, 1994] und reetabliert.

4.5 In vitro- Aktivität an den Rattenzymen CYP11B1 und CYP11B2

Nachdem einige der getesteten Verbindungen eine sehr günstige perorale Kinetik in vivo besaßen, wurden trotz der Interspezies- Homologieunterschiede (Mensch-Ratte) von CYP11B1 und CYP11B2 in vivo- Aktivitätstests ins Auge gefasst. Es sollte versucht werden, an Ratten einen „proof of concept“ des neuen Ansatzes in vivo durchzuführen. Um dazu die potentesten Verbindungen am Rattenzym auszusuchen, sollten einige der in vitro am humanen Enzym hochaktiven (V79-Zellen) und in vivo gut verfügbaren Verbindungen zuvor in vitro auf ihre Aktivität am Rattenzym untersucht werden. Dazu wurde ein Ratten-Nebennierentest etabliert [modifiziert nach Dissertation Grün, 1994] und die Proben wurden per LC/MS/MS analysiert (s. Abbildung 45 „Hemmung der Aldosteron- und Corticosteronbiosynthese in vitro“).

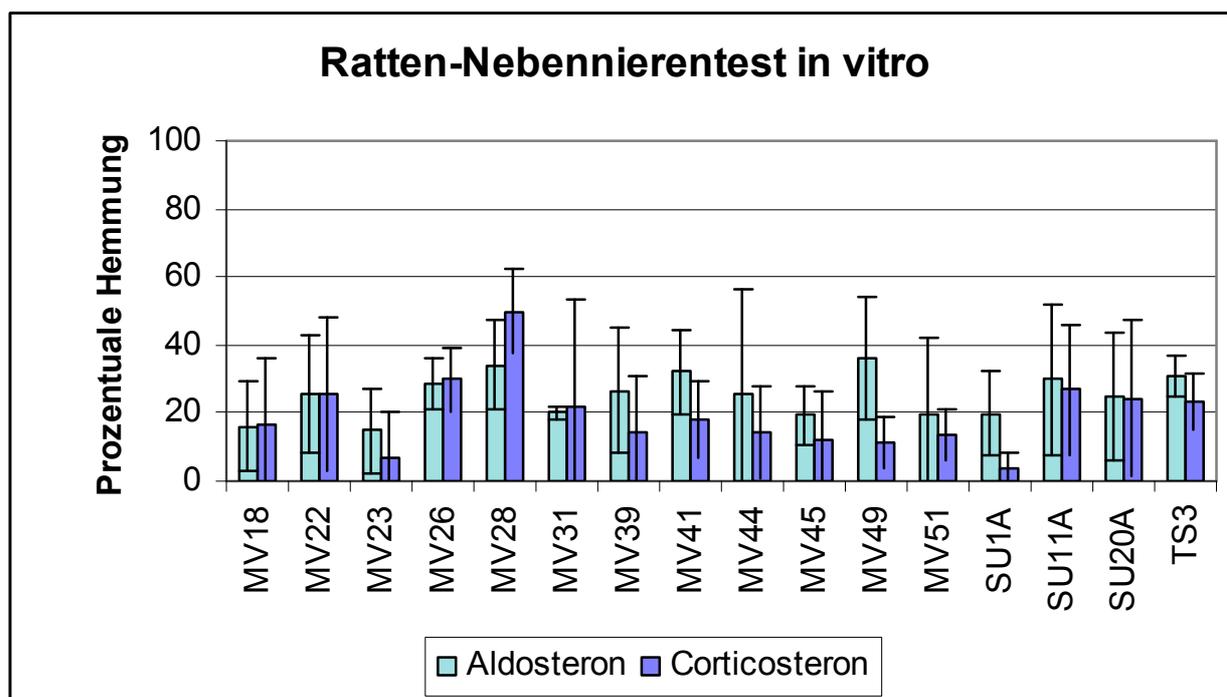


Abbildung 45:

Hemmung der Aldosteron- und Corticosteronbiosynthese in vitro

(IC₅₀ von Fadrozol: für Aldosteron: 45,21µM; für Corticosteron >100µM,

Testkonzentration der Hemmstoffe: 100µM)

Da die Hemmwirkung der Referenz Fadrozol nicht der Literatur entsprach [Häusler et al., 1989: IC₅₀ von Fadrozol: für Aldosteron: 1µM, für Corticosteron: 100µM], konnte nicht abgeschätzt werden, ob die Verbindungen nur modellabhängig kaum hemmen,

oder ob sie aufgrund niedriger Interspezies- Homologien keine Hemmwirkung am Rattenenzym zeigen. Daher konnte der in vitro-Test nicht zur pharmakodynamischen Präselektion für einen in vivo- Aktivitätstest dienen.

Folglich wurden zwei Verbindungen verschiedener Substanzklassen mit einem sehr günstigen pharmakokinetischen Profil in vivo, sowie einer sehr hohen Aktivität und Selektivität in vitro (V79-Zellen, humane Enzyme) für einen in vivo- Test ausgesucht. Dabei handelte es sich um MV18 und SU20A.

4.6 In vivo- Aktivität an den Rattenenzymen CYP11B1 und CYP11B2

Da die perorale Verfügbarkeit von MV18 und SU20A sehr gut war, sprach nichts gegen einen Aktivitätstest in vivo, da eine möglicherweise auftretende mangelnde Wirksamkeit nicht auf die mangelnde Präsenz der Moleküle am Wirkort (Bioverfügbarkeit) zurückgeführt werden könnte, sondern nur auf die Pharmakodynamik.

So wurden MV18 und SU20A also jeweils als Stellvertreter einer Substanzklasse getestet (s. Tabelle 30-31 „Leitstrukturen I“ und Tabelle 39 „Leitstrukturen II“). Außerdem wurde parallel zur Validierung der Testergebnisse Fadrozol als Referenz mit untersucht, deren Wirksamkeit bereits in früheren in vivo- Studien belegt worden war [Dissertation Müller-Vieira, 2005].

4.6.1 Testprinzip und Durchführung

➤ **Kathetermodell**

Die Testung wurde am katheterisierten Rattenmodell (Halsvenenkatheter) durchgeführt, was gegenüber traditionellen Modellen (unterschiedliche Kontrolltiere und Testtiere) den enormen Vorteil besitzt, dass interindividuelle Schwankungen erfasst werden können, weil jedes Tier als seine eigene Kontrolle dient. Die Aussagekraft dieses Modells ist also höher als diejenige von traditionellen, gepoolten Testmethoden.

Es wurden von jedem Individuum die Basislevel der Hormone Aldosteron und Corticosteron, die ACTH- stimulierten Level und die Level nach Inhibitorapplikation untersucht (s. „Material und Methoden“). Zur Überprüfung der anhaltenden ACTH- Stimulation während der Testdauer und zur Abschätzung der circadianen Schwankungen der Hormonlevel dienten zusätzliche Kontrolltiere, denen nur Matrix ohne Inhibitor appliziert wurde.

➤ **Wahl der Testkonzentrationen**

Die beiden Forschungsverbindungen MV18 und SU20A sollten in einer höheren Konzentration eingesetzt werden als Fadrozol. Als Richtlinie hierfür galten die Verhältnisse der im in vitro-Test (V79-Zellen) erhaltenen Hemmwerte (IC_{50}) aller drei Verbindungen gegenüber der humanen Aldosteronsynthase.

Somit sollte Fadrozol- wie bereits in vivo erprobt- in einer effektiven Dosis von 4mg/kg appliziert werden, die Dosen von MV18 und SU20A sollten entsprechend des

Faktors der IC_{50} -Werte im V79-Zelltest (Quotient Forschungssubstanz/Fadrozol) jeweils bei 40mg/kg liegen.

Aufgrund dieser hohen Konzentrationen mussten für die beiden Aldosteronsynthaseinhibitoren zunächst Löslichkeitsstudien durchgeführt werden. MV18 war gut löslich in physiologischer Kochsalzlösung, SU20A löste sich nicht ohne Zusatz von Lösungsvermittlern. Es wurden verschiedene bekannte Zusätze verwendet, wie z.B. DMSO, Polyethylenglycole oder Cyclodextrine; die Verbindung löste sich jedoch hinreichend nur nach Erwärmen in einem Gemisch aus 50% Millipore [v/v], 25% DMSO [v/v] und 25% Solutol[®] [v/v] mit 0,9% NaCl [m/v_{gesamt}]. Alle Inhibitorlösungen wurden intraperitoneal verabreicht.

➤ **Testdurchführung**

Die Testung der Inhibitoren dauerte zwei Tage und erfolgte nach Stimulation der Corticoidproduktion mit ACTH. Im Anschluss an die Inhibitorverabreichung wurden nach 1h, 2h, 4h und 8h Blutproben entnommen und nach Aufarbeitung (Plasmagewinnung) auf ihren Gehalt an Aldosteron und Corticosteron untersucht (s. Tabelle 46 „Testschema“). Die Corticoidlevel wurden per RIA (Radioimmunoassay, s. „Material und Methoden“) bestimmt (s. Abbildungen 46-53).

Uhrzeit	Testtag1	Uhrzeit	Testtag2
10:00	Anschluss der Katheter	07:30	Anschluss der Katheter
16:00	1. Blutprobe: Grundlevel	9:30	2. Blutprobe: Stimulierte Level
16:30	Stimulation mit ACTH (subkutan 1mg/kg)	10:00	Verabreichung der Inhibitoren (bei Kontrolltieren nur Matrix)
17:00	Abklemmen der Katheter	11:00	3. Blutprobe: Gehemmte Level
		12:00	4. Blutprobe: Gehemmte Level
		14:00	5. Blutprobe: Gehemmte Level
		18:00	6. Blutprobe: Gehemmte Level

Tabelle 46: Testschema

4.6.2 *In vivo*- Profil der Hormonspiegel

➤ **Effekt von ACTH auf die Corticoidlevel**

Die subkutane Applikation von ACTH erhöhte die Aldosteronspiegel der verschiedenen Tiere von 245 ± 228 pg/ml auf 1495 ± 322 pg/ml (um Faktor 2,7 bis 14,5). Die Corticosteronspiegel stiegen von 71 ± 41 ng/ml auf 498 ± 126 ng/ml an (um Faktor 2,6 bis 28,3). Diese erhöhten Level blieben auch über die gesamte Testdauer erhalten, was durch die Kontrolltiere abgesichert wurde (s. Abbildungen 46-47 „Kontrolltiere- Aldosteronspiegel“ und „Kontrolltiere- Corticosteronspiegel“).

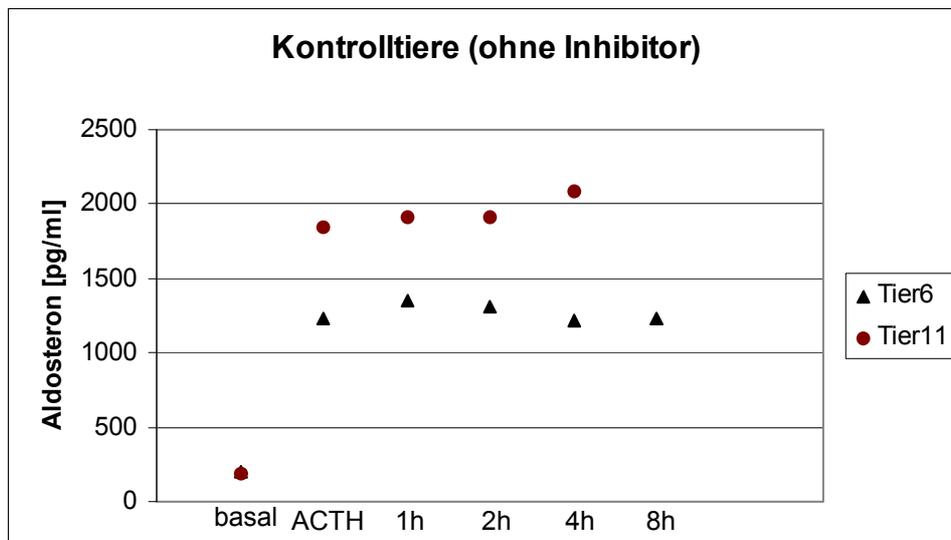


Abbildung 46: Kontrolltiere- Aldosteronspiegel

(Ausreißer: Tier 6, Wert nach 8h entfällt)

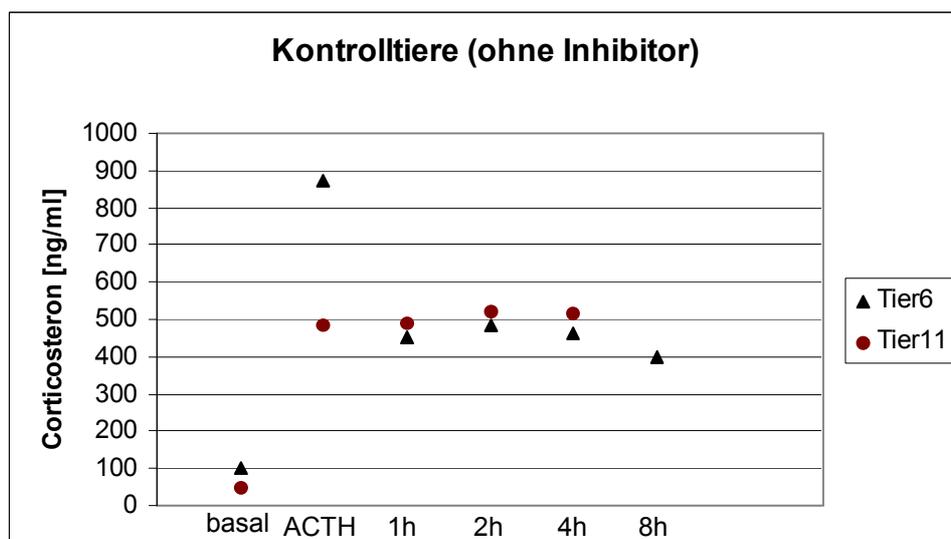


Abbildung 47: Kontrolltiere- Corticosteronspiegel

(Ausreißer: Tier 6, ACTH- Wert)

➤ **Absenkung der Aldosteron- und Corticosteronlevel durch Fadrozol, MV18 und SU20A**

❖ **Effekt von Fadrozol (4mg/kg)**

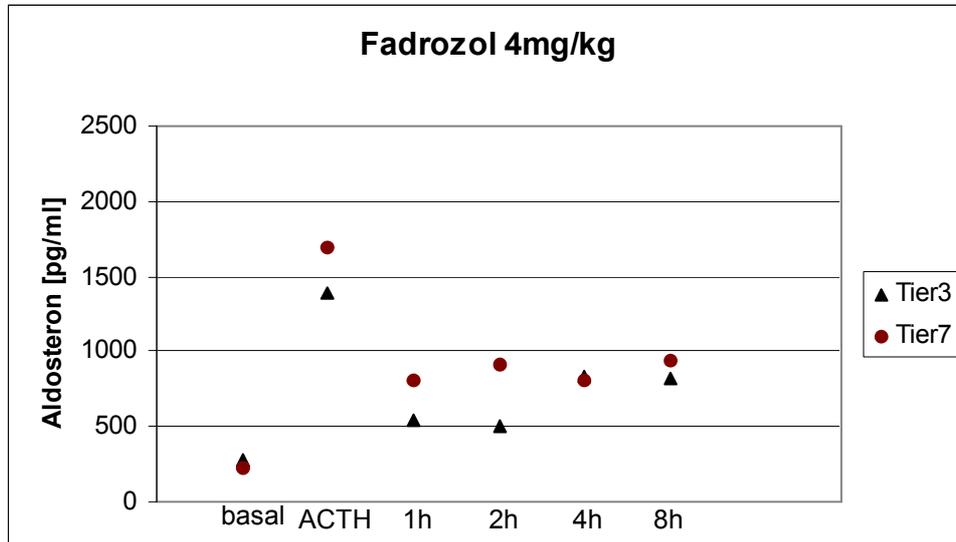


Abbildung 48: Absenkung der Aldosteronspiegel durch Fadrozol

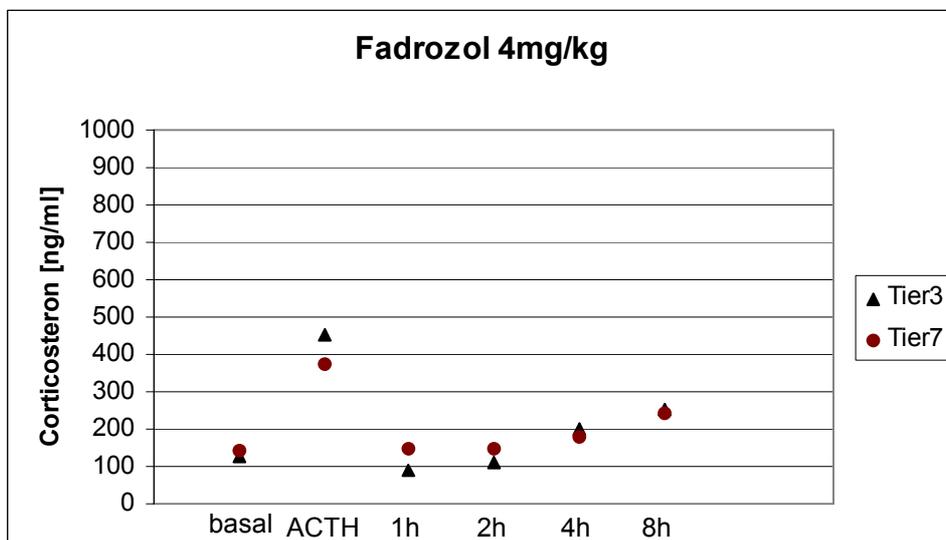


Abbildung 49: Absenkung der Corticosteronspiegel durch Fadrozol

Sowohl die Aldosteron- als auch die Corticosteronbiosynthese konnten durch Fadrozol stark abgesenkt werden. Die Absenkung der ACTH- stimulierten Plasmaspiegel betrug eine Stunde nach Applikation des Inhibitors für Aldosteron 68%, für Corticosteron 100%. Danach nahm die Hemmwirkung mit zeitabhängiger Elimination von Fadrozol wieder ab, sodass die Hemmung nach 8 Stunden für

Aldosteron bei 51% und für Corticosteron bei 58% lag, was aber immer noch eine deutliche Wirkung zeigte. Dieses Wirkstoffprofil wäre also durchaus für eine perorale Applikation bei einmaliger bis zweimaliger Applikation pro Tag geeignet, je nachdem wie hoch hier die kinetische Interspezieskorrelation zwischen Ratten und Menschen ist.

❖ Effekt von MV18 (40mg/kg)

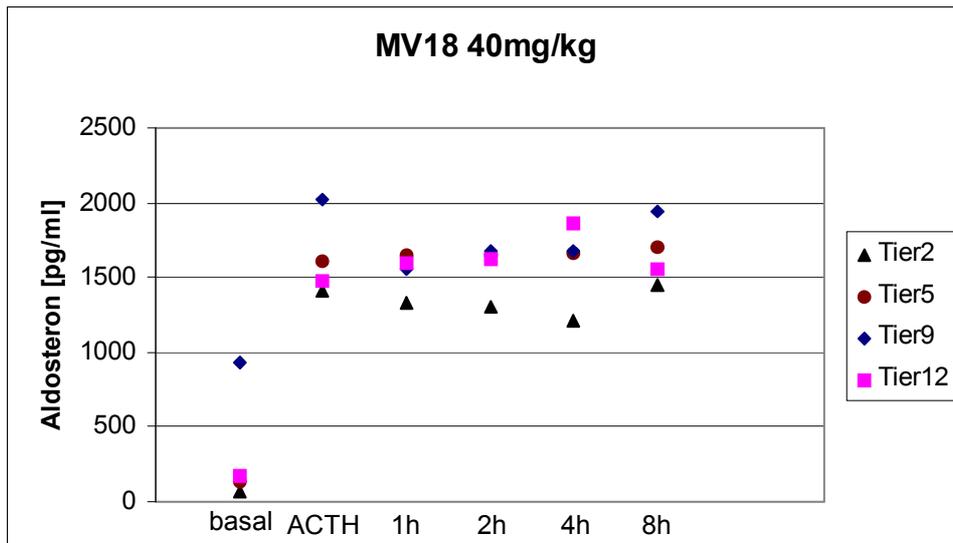


Abbildung 50: Absenkung der Aldosteronspiegel durch MV18

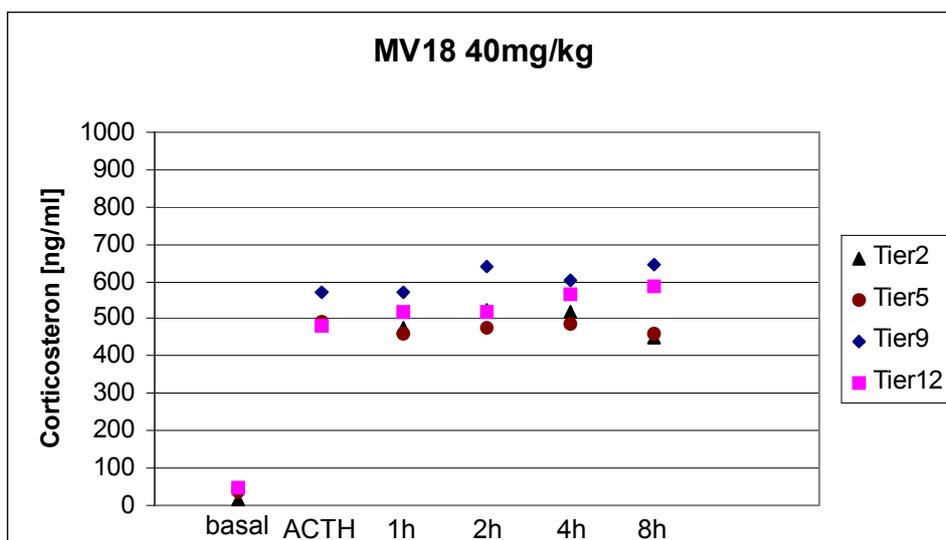


Abbildung 51: Absenkung der Corticosteronspiegel durch MV18

Die Reduktion der Plasmaspiegel beider Hormone durch MV18 war leider sehr gering. Bei manchen Tieren konnte gar kein Effekt auf die Biosynthese der Corticoide

festgestellt werden, bei anderen Individuen war eine leichte Absenkung der Konzentrationen zu verzeichnen, was allerdings auch auf die circadianen Schwankungen zurückgeführt werden kann.

❖ Effekt von SU20A (40mg/kg)

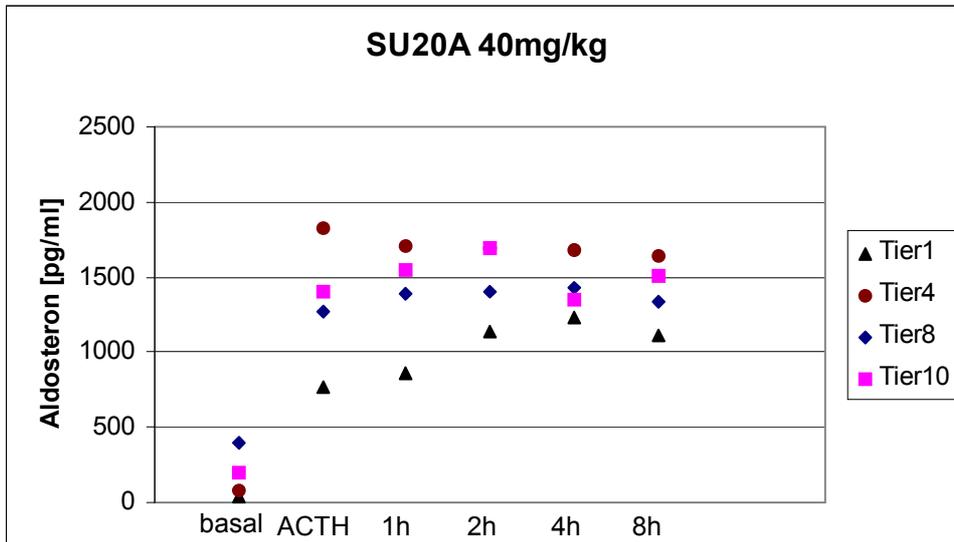


Abbildung 52: Absenkung der Aldosteronspiegel durch SU20A

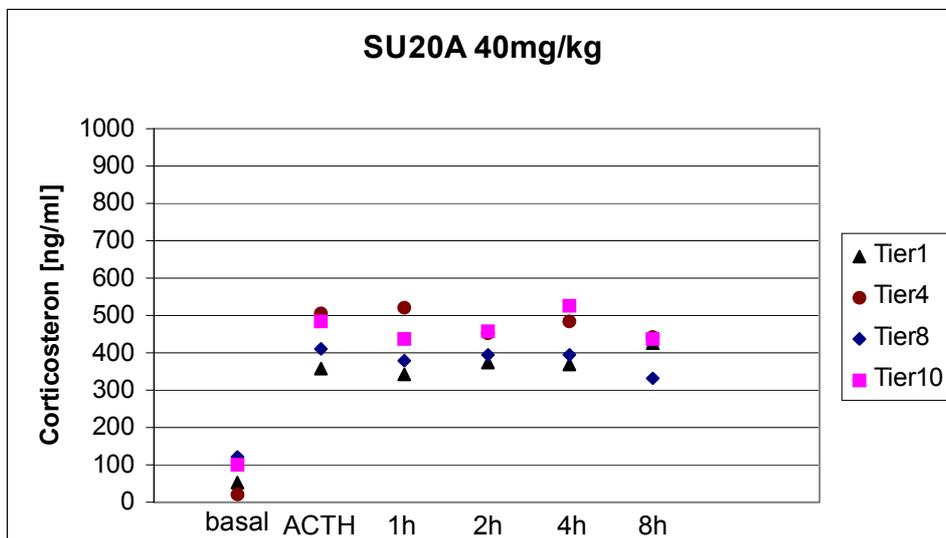


Abbildung 53: Absenkung der Corticosteronspiegel durch SU20A

Das Ergebnis von MV18 trifft auch auf SU20A zu. Es ist keine deutliche Aktivität im Rattenmodell erkennbar. Eine Übersicht über die prozentuale Hemmung der Corticoid- Biosynthese ist in folgender Tabelle aufgelistet (s. Tabelle 47).

❖ Übersicht über die Hemmwirkung von Fadrozol, MV18 und SU20A

Inhibitor	Zeit nach Applikation des Inhibitors	Prozentuale Hemmung [%] [MW ± rel. SD] ¹	
		Aldosteronbiosynthese	Corticosteronbiosynthese
Fadrozol	1h	68,0 ± 5,5	103,9 ± 4,7
	2h	66,6 ± 9,1	100,4 ± 2,8
	4h	55,5 ± 3,6	80,8 ± 2,5
	8h	51,5 ± 0,2	58,6 ± 1,2
MV18	1h	-5,6 ± 5,1	6,4 ± 3,1
	2h	-7,7 ± 7,5	5,1 ± 3,1
	4h	-1,3 ± 6,4	-0,7 ± 3,3
	8h	-1,2 ± 5,1	17,9 ± 3,7
SU20A	1h	-2,1 ± 3,4	3,0 ± 3,0
	2h	-2,2 ± 4,4	-6,3 ± 3,2
	4h	-6,1 ± 10,3	-7,8 ± 3,8
	8h	-4,9 ± 0,8	-5,9 ± 7,1

¹Mittelwert ± relative Standardabweichung

Tabelle 47:

**Übersicht über die Hemmung der Corticoidbiosynthese in vivo im
katheterisierten Ratten Modell**

➤ **Fazit**

Die beiden Forschungssubstanzen MV18 und SU20A zeigten im Rattenmodell keine signifikante Aktivität am CYP11B1 bzw. CYP11B2-Enzym, was vermutlich auf der relativ niedrigen Interspezies- Homologie von 64,5 bzw. 69,6 Prozent [Dissertation Müller-Vieira, 2005] beruht.

Daher sind, um trotzdem einen Wirksamkeitsnachweis in vivo erbringen zu können, Studien im Gange, um Verbindungen zu finden, die höhere Aktivität am Rattenzym

besitzen. Dazu werden momentan Versuche durchgeführt, um beide Rattenenzyme (CYP11B1 und CYP11B2) in V79-Zellen zu exprimieren, wodurch man ein schnelles Screeningmodell zur Verfügung hätte, dessen Ergebnisse zudem direkt vergleichbar mit denen der human transfizierten V79-Zellen wären. Außerdem werden neue Verbindungsklassen entwickelt, die eventuell auch an den Rattenenzymen wirken. Es sollen zwar keine Wirkstoffe für die Ratte entwickelt werden, aber das Modell soll nach Möglichkeit aufgrund seiner einfachen Handhabbarkeit weiterverwendet werden, um einen „proof of concept“ erbringen zu können, was Voraussetzung für klinische Studien ist.

5 Vorhersage der peroralen Absorption heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2

5.1 PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay)

Bei dem Verfahren handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren zur Untersuchung der Permeabilität von Substanzen durch künstliche Membranen in Transwellsystemen [Kansy et al., 1998]. Dieses Modell soll einen ersten Eindruck über die passiv transzelluläre Membrangängigkeit bzw. die perorale Absorbierbarkeit von Verbindungen in vivo vermitteln. Sind die Substanzen in diesem Test hoch permeabel, wird davon ausgegangen, dass sie auch in der Lage sind, physiologische Membranen zu überwinden. Können sie die künstlichen Membranen allerdings nicht überwinden, könnten die Verbindungen trotzdem passiv parazellulär bzw. aktiv transzellulär physiologische Membranen passieren.

Für die Untersuchung der Substanzen wurde das Testverfahren nach „Zhu et al., 2002“ verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte per UV-Spektroskopie mittels eines Mikrotiter-Platereaders (Spectramax Plus³⁸⁴, Molecular Devices).

Die Klassifizierung nach der Permeabilität erfolgte nach „Kansy et al., 1998“, wobei je nach Membrangängigkeit in PAMPA eine potentielle perorale Absorption in vivo vorhergesagt wird (s. Tabelle 48 „Klassifizierung der Permeabilität laut PAMPA“).

PAMPA-Flux [%]	Humane p.o.-Absorption ¹ [%]	Klassifizierung
<5	0-30	niedrig
5-25	30-70	mittel
25-100	70-100	hoch

Tabelle 48: Klassifizierung der Permeabilität laut PAMPA

¹p.o.: peroral

5.2 PAMPORE (PAMPA mit Poren)

Das Testprinzip und die Durchführung des PAMPORE- Tests entsprechen prinzipiell denjenigen des PAMPA- Tests. Der entscheidende Unterschied besteht allerdings darin, dass sich in den künstlichen Membranen des PAMPORE- Modells Poren mit näherungsweise physiologischem Durchmesser befinden. Dadurch erhöht sich die Aussagekraft dieses Assays im Vergleich zu PAMPA insofern, dass hier auch die passiv parazelluläre Absorption von Verbindungen vorhergesagt werden kann. Vergleicht man die Permeabilität eines Substanzsets in PAMPA mit derjenigen in PAMPORE, kann man die parazellulär transportierten Substanzen daran erkennen, dass sie im ersteren Test nicht bzw. viel schlechter membrangängig sind als im letzteren. Die Klassifizierung nach der potentiellen peroralen Absorption erfolgt ähnlich wie bei PAMPA [Pharmacelsus CRO] (s. Tabelle 49 „Klassifizierung der Permeabilität laut PAMPORE“).

PAMPORE- Flux [%]	Humane p.o.- Absorption [%]	Klassifizierung
<20	0-30	niedrig
20-70	30-70	mittel
70-100	70-100	hoch

Tabelle 49: Klassifizierung der Permeabilität laut PAMPORE

¹p.o.: peroral

5.3 Caco-2 Modell

Das humane, zelluläre Modell wurde schon ausführlich beschrieben (s. „Einleitung“ und „Ergebnisse“).

Es besitzt aufgrund seiner höheren Komplexität im Vergleich zu den beiden künstlichen Membransystemen eine viel bessere Aussagekraft in der Vorhersage der potentiellen peroralen Absorption in vivo. Es berücksichtigt auch zahlreiche aktive Transporteigenschaften der Enterozyten. Sein Durchsatz ist allerdings bei nicht automatisierter Handhabung viel beschränkter als derjenige der beiden anderen in vitro-Modelle, weshalb auch die beiden viel weniger komplexen Modelle immer noch

bei Vorabscreenings zum Einsatz kommen. Die Wahl des in vitro- Systems hängt also davon ab, welchen Anspruch man an die Aussagekraft der Ergebnisse stellt.

5.4 Vergleich der Permeabilitäten in den verschiedenen Modellen

Um bei einem hausinternen heterogenen Substanzset möglichst schnell zu untersuchen, bei welchen Verbindungsklassen vermutlich überwiegend passiv transzellulärer Transport, passiv parazellulärer Transport oder aktive Transportmechanismen von Bedeutung sind, wurde ihre Permeabilität in den drei verschiedenen in vitro- Modellen untersucht. Die Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Modelle war außerdem interessant für die Auswahl des je Substanzklasse rationellsten Screeningverfahrens.

Bei hoher Korrelation der Modelle könnte das einfachste System mit dem höchsten Durchsatz für spätere Screenings der Substanzklassen verwendet werden.

Andererseits wäre es bei niedriger Korrelation z.B. bei aktiv transportierten Substanzen im Anschluss nicht nötig, bei der Synthese weiterer Verbindungen derselben Klasse so rigorose Anforderungen an die physikochemischen Eigenschaften (Lipinski's rule of 5) zu stellen, wie es bei passiv permeablen Verbindungen der Fall ist.

➤ **Testset**

Als Testverbindungen wurden hochpotente Substanzen der arbeitskreisinternen Teilprojekte CYP17 und CYP19 verwendet (s. Tabelle 50 „Testset zur Korrelation von PAMPA, PAMPORE und Caco-2“).

Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
BW70		GW22	
EB4		GW91	
EB8		GW114	
GW104		MM16	

Tabelle 50: Testset zur Korrelation von PAMPA, PAMPORE und Caco-2

Die Permeabilität der Verbindungen wurde in den drei Modellen im „single dosing“ untersucht und verglichen (s. Tabelle 51 „Permeabilitäten in PAMPA, PAMPORE und Caco-2“). Die Analyse der PAMPA- und PAMPORE- Proben (Pharmacelsus CRO) erfolgte per UV-Spektroskopie, diejenige der Caco-2- Proben per LC/MS/MS.

➤ **Permeabilitäten in vitro**

Verbindung	PAMPA		PAMPORE		Caco-2	
	Flux [%] MW ± rel. SD ¹	Klasse	Flux [%] MW ± rel. SD	Klasse	P _{app} ² [cm/sec] MW ± rel. SD	Klasse
BW70	9 ± 3	m ³	20 ± 3	m	N.D. ⁶	n
EB4	12 ± 4	m	22 ± 3	m	19,1 ± 7,1	h
EB8	2 ± 1	n ⁴	2 ± 1	n	7,9 ± 3,8	m
GW22	13 ± 8	m	26 ± 4	m	17,3 ± 1,1	h
GW91	8 ± 3	m	15 ± 3	m	0,5 ± 11,5	n
GW104	23 ± 9	m	19 ± 1	m	8,9 ± 12,1	m
GW114	7 ± 1	n	9 ± 1	n	0,2 ± 0,1	n
MM16	37 ± 2	h ⁵	29 ± 4	m	3,3 ± 7,1	m

Tabelle 51: Permeabilitäten in PAMPA, PAMPORE und Caco-2

¹ Mittelwert ± relative Standardabweichung,

² apparenter Permeabilitätskoeffizient,

³ mittel permeabel,

⁴ niedrig permeabel,

⁵ hoch permeabel,

⁶ nicht detektierbar

Vergleicht man die Klassifizierung der Permeabilitäten der Verbindungen laut PAMPA und PAMPORE, so korrelieren sie sehr gut, d.h. die Verbindungen nutzen nicht den parazellulären Transportweg durch die hydrophilen Poren, sondern eher den passiv transzellulären Weg durch die lipophilen Zellmembranen. Der einzige Unterschied besteht für MM16, die bei PAMPORE weniger permeabel ist, vermutlich da die lipophile Membranoberfläche hier geringer ist als in PAMPA, aber die Verbindung diesen lipophilen Transportweg bevorzugt nutzt.

Die Korrelation der beiden Membransysteme mit dem zellulären System Caco-2 ist ebenfalls hoch. Es gibt keine starken Unterschiede zwischen den

Permeabilitätsklassen; die vorhandenen Differenzen beruhen vermutlich auf verschiedener Zusammensetzung der Membranen, abweichender Porengröße und eventuell aktiven Transportmechanismen.

➤ **Fazit**

Bei den Verbindungsklassen dieses Substanzsets wäre es also prinzipiell möglich, ihre potentielle perorale Absorbierbarkeit anhand des rationellen PAMPA-Tests abzuschätzen, obwohl natürlich trotzdem das komplexere Modell Caco-2 aussagekräftiger bleibt.

Diskussion

Präklinische Studien zur Arzneistoffentwicklung

Auf dem langwierigen, kostspieligen Weg der Arzneistoffentwicklung ist es wichtig, nach einem rationellen Konzept zu arbeiten. Dabei kommen verschiedene Methoden zum Einsatz, die bis zur Wirkstofffindung in einem ständigen Informationskreislauf miteinander stehen (s. Abbildung 1 „Entwicklungsstufen im Screening nach Wirkstoffen für die klinische Prüfung“).

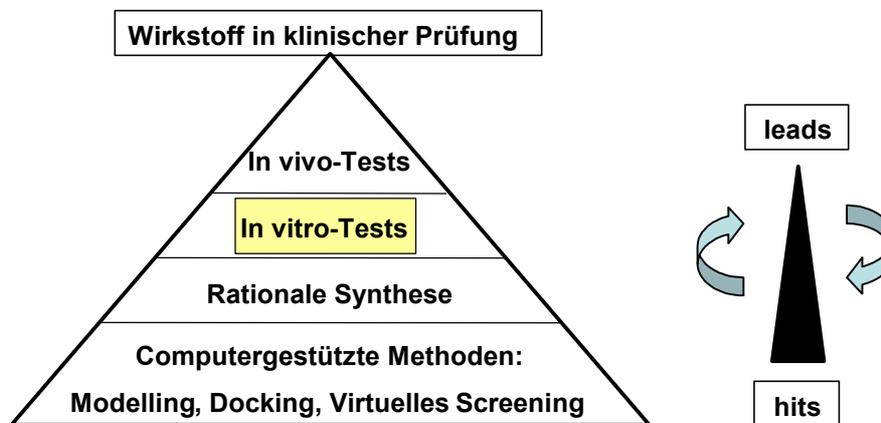


Abbildung 1: Entwicklungsstufen im Screening nach Wirkstoffen für die klinische Prüfung

Es werden je nach Target zunächst per Computer einige hits aus Datenbanken ausgewählt und synthetisiert. Ihre Aktivität und Verfügbarkeit am Wirkort wird dann zu einer ersten Selektion von leads mit Hilfe von in vitro-Modellen getestet. Verbindungen, die hier ein gutes Profil besitzen werden im Anschluss anhand von in vivo-Modellen untersucht und nach umfassenderen Kriterien selektiert, wobei man Kandidaten für die klinische Prüfung zu finden versucht.

Ist eine Substanz in einem der Modelle schlecht, fällt sie auf die vorherige Stufe der Untersuchungen zurück und es muss eine erneute Optimierung auf niedrigerem Niveau erfolgen. Dabei ist es essentiell, möglichst zeitnah zur Pharmakodynamik auch die Pharmakokinetik zu optimieren, da nur solche Verbindungen als Arzneistoffkandidaten in Frage kommen, die nicht nur aktiv am Target sondern auch gleichzeitig in vivo am Wirkort verfügbar sind.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag innerhalb dieses Entwicklungsprozesses von Arzneistoffen für die klinische Prüfung auf in vitro-Vorhersagen der Kinetik. Es wurden allerdings auch pharmakodynamische Studien in vitro und in vivo durchgeführt. Außerdem wurde die Kinetik verschiedener Substanzen in vivo genauer untersucht.

1 Anwendung des Caco-2 Modells in der Arzneistoffentwicklung

Das Caco-2 Modell (colon cancer) stellt momentan das Standard-in vitro-System für Permeabilitätsscreenings dar [Alsenz et al., 2003]. Es dient zur präklinischen Vorhersage der peroralen Absorption von Verbindungen über die Mucosa des menschlichen Intestinums in vivo [Artursson et al., 2001] und wird trotz der generellen Restriktionen von in vitro-Modellen aus ethischen und rationellen Gründen (Reduktion von Tierversuchen und Kosten) zur Präselektion von Substanzen anhand ihres kinetischen Profils eingesetzt.

1.1 Etablierung des traditionellen Caco-2 Modells

Da die Darmzelllinie Caco-2 polyklonal ist [Alsenz et al., 2003], und sich daher die Eigenschaften verschiedener Chargen und Passagen der Zellen unterscheiden können, muss das System für jedes Labor neu etabliert und validiert werden. Zudem müssen die Eigenschaften der Monolayer für jeden Transporttest überprüft werden [Hidalgo et al., 2001].

Daher wurde zunächst das traditionelle Transportmodell nach „Yee et al., 1997“ etabliert. Hierbei wurden die Caco-2 Zellen in Transwellkammern eingesät und zur Ausbildung konfluenter, hinreichend differenzierter Monolayer für 21 Tage kultiviert. Ihr fortschreitendes Wachstum wurde während der gesamten Kulturdauer durch Messung des transepithelialen, elektrischen Widerstandes (TEER) überprüft. Dieser steigt mit zunehmender Konfluenz der Zellen an, da hierdurch der Stromfluss (Elektrolytaustausch auf parazellulärem Weg) zwischen der apikalen und der basolateralen Kammer abnimmt. Der TEER erreicht bei intakten Transportsystemen nach einer gewissen Kulturdauer sein Maximum (laborintern 500-600 Ω), das die geeignete Dichte der Monolayer (tight junctions) zur Permeabilitätstestung indiziert. Der maximale TEER bleibt für ca. eine Woche konstant, während der sich die Eigenschaften der Caco-2-Monolayer auch nicht maßgeblich verändern, und fällt

danach wieder ab, da die Zellen aufgrund der ungünstiger werdenden Lebensbedingungen absterben.

Außer durch den TEER wurden die Eigenschaften der differenzierten Monolayer zusätzlich mit Hilfe bekannter Referenzsubstanzen überprüft, um ihren Differenzierungsgrad hinsichtlich verschiedener Transportwege in jedem Test abzusichern. Für diese Validierung wurden Referenzen ausgewählt, die die häufigsten möglichen Transportwege und -klassen abdecken sollten: Atenolol für den parazellulären Transport in geringem Ausmaß, Testosteron für den passiv transzellulären Weg in hohem Ausmaß, Ketoprofen für den aktiv transzellulären Weg (Protonenkotransporter) in hohem Ausmaß und Erythromycin als Substrat des Effluxproteins Glycoprotein P (absorptiv niedrig permeabel). In vorangehenden Tests wurde aus Gründen des Substanzdurchsatzes statt Atenolol und Erythromycin nur eine gemischt membrangängige Referenz eingesetzt, und zwar Ranitidin. Da diese Verbindung jedoch verschiedene Transportwege nutzt (parazellulär und P-gp-Efflux), wurde sie nachdem der Durchsatz per cassette dosing optimiert worden war, durch die beiden anderen Verbindungen ersetzt, die keinem gemischten Transport unterliegen. Dies hat den Vorteil, dass man die Transporteigenschaften der Monolayer differenzierter überprüfen zu kann. Bei Ranitidin wäre nämlich bei einem veränderten Ausmaß des Transportes der Verbindung über die Monolayer die Ursache nicht eindeutig. Es kämen sowohl eine veränderte Expression von P-gp als auch eine andere Porengröße der Monolayer in Frage.

Generell dienten die Referenzsubstanzen, nachdem ihr Permeationsverhalten demjenigen der Literatur entsprach, der Klassifizierung der Permeabilität von Forschungssubstanzen, sowie der Nivellierung von Interassay-Schwankungen.

Zur weiteren Absicherung der Testergebnisse wurde am Ende jedes Permeationstests die Integrität der Zellmonolayer mit Hilfe des parazellulären Markers Lucifer Yellow untersucht. Lag dessen Permeabilität innerhalb des Sollbereichs, konnten falsch positive Ergebnisse für die Forschungssubstanzen, die durch zu hohe Durchlässigkeit der Monolayer zustande kommen könnten, ausgeschlossen werden.

1.2 Optimierungen des traditionellen Caco-2 Modells

Da das traditionelle Testsystem [Yee et al., 1997] relativ aufwendig ist, sollte es optimiert werden. Wesentliche Restriktionen des traditionellen Modells sind der niedrige Substanzdurchsatz pro Transwellplatte bedingt durch das 12-well-Format und die Applikation der Testverbindungen per single dosing, die kurze Inkubationsdauer von einer Stunde, sowie die lange Kultivierungsdauer der Zellen vor der Testung.

Um den Durchsatz zu erhöhen, sollte zunächst nur für die Referenzsubstanzen untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht sie im Gemisch zu applizieren („multiple“ oder „cassette dosing“). Dazu wurden ihre Permeabilitäten im Caco-2 Modell nach „single dosing“ und nach „multiple dosing“ miteinander verglichen.

Mögliche Ursachen für die Erniedrigung der Membrangängigkeit einer Verbindung durch eine andere wären z.B. irreversible oder kompetitive Hemmung eines absorptiven Transportenzym. Eine Steigerung der Permeabilität einer im Gemisch applizierten Verbindung wäre z. B. durch Induktion eines absorptiven Carriers (z.B. Protonenkotransporter) oder durch Hemmung eines Effluxtransporters (z.B. P-gp) möglich. Ersteres ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da eine Enzyminduktion innerhalb des kurzen Zeitrahmens der Inkubationen (1h- 3h) auszuschließen ist. Außerdem wäre eine Steigerung der Absorption durch Hemmung des Effluxes in diesem Set laut Literatur nicht zu erwarten.

Es traten offenbar keine den Transport beeinflussenden Interaktionen zwischen den Substanzen auf, was darauf zurückzuführen ist, dass sie unterschiedliche Transportwege nutzen. Das Fehlen von Interaktionen musste aber dennoch experimentell abgesichert werden, obwohl es schon in Voraus angenommen worden war.

Die Umstellung von „single dosing“ auf „multiple dosing“ war somit für die Referenzen erfolgreich und wurde fortan generell angewendet. Sie ermöglichte eine Verdreifachung des Durchsatzes an Forschungssubstanzen pro Transwellplatte (12-well-Format) im Vergleich zum „single dosing“ der Referenzen (Testung stets in Triplica). Eine weitere Steigerung des Testdurchsatzes durch die Wahl eines höheren Transwellformats war aufgrund des manuellen Handlings nicht möglich. Es konnten allerdings parallel zwei Platten getestet werden.

Der nächste zu optimierende Parameter war die Dauer der Transporttests. Durch die kurze Inkubationszeit des traditionellen Modells (1h) könnte nämlich die Permeabilität der häufig relativ lipophilen Forschungssubstanzen unterschätzt werden, da diese durch Anreicherung in den Zellmembranen zeitverzögert, aber dennoch hinreichend absorbiert werden könnten (kinetischer Shift). Daher wurden Tests durchgeführt, um unter Berücksichtigung von Zellintegrität und physiologischer Magen-Darm-Passagezeit die Inkubationszeit auszudehnen.

Der maximale Zeitrahmen, innerhalb dessen die Zellintegrität laut Lucifer Yellow völlig gewährleistet war, lag bei drei Stunden; nach 4 bis 6 Stunden war die Permeabilität des parazellulären Markers zu hoch. Da die optimierte Testdauer jedoch einer durchschnittlichen humanen gastrointestinalen Verweildauer entspricht, wurden alle folgenden Tests auf 3h ausgedehnt. Wenn Verbindungen innerhalb dieser Inkubationsspanne die Zellbarrieren noch nicht überwinden konnten, ist es relativ unwahrscheinlich, dass sie es in vivo tun werden.

Ein weiterer optimierbarer Faktor in der Permeabilitätstestung mit Caco-2 Monolayern war die Flexibilität der Testplanung, wozu die Kulturdauer verkürzt werden sollte. Dazu existieren verschiedene Ansätze, wie z.B. Nährmedien mit Wachstumsfaktoren und spezielle Kulturplatten. Diese Verfahren sind jedoch alle mit einer erheblichen Kostenerhöhung verbunden. Daher wurde versucht, die Kultivierungsdauer ohne Zusatzkosten durch eine erhöhte Einsäcdichte der Caco-Zellen zu verringern. Es gelang durch eine Steigerung der initialen Zellzahl von $6,3 \cdot 10^4$ auf $1,6 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 ihre Anzuchtzeit in den Transwellsystemen von 21 auf 10 Tage zu verkürzen [Alsenz et al., 2003]. Validiert wurde dies mittels TEER-Messung und anhand der Referenzsubstanzen.

Durch die reduzierte Kultivierungsdauer konnte die Flexibilität der Testung verdoppelt werden und es wurden außerdem Kosten für die Zellkultivierung gespart, da die gleichen Medien und Transwellsysteme verwendet wurden wie im traditionellen Modell.

1.3 Etablierung und Optimierung der LC/MS/MS-Analytik der biologischen Proben

Parallel zur biologischen Testung musste natürlich auch eine adäquate Methode zur Analyse der anfallenden Proben etabliert werden. Hierbei handelte es sich um LC/MS/MS, die aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile, wie z.B. hoher Sensitivität bei Quantifizierungen (bis zum picomolaren Bereich), hoher Selektivität bei Identifizierungen von Verbindungen aus komplexen Gemischen (durch verschiedene Scan Modi) und hohen Probendurchsatzes, auch industriell im großen Maßstab Anwendung findet [Korfmacher et al., 2005]

Da die analytische Methode allerdings auch sehr empfindlich gegenüber bestimmten Störungen ist (wie z.B. Matrixeffekten, die die Ionisierung nichtreproduzierbar beeinflussen) müssen alle Messungen validiert werden.

Daher wurden zunächst die Effekte der biologischen Matrices, in denen eine Verbindung detektiert werden sollte, untersucht und dann eine angemessene Probenaufarbeitung zur Eliminierung des jeweiligen Störpotentials (Salze, oberflächenaktive und nichtflüchtige Komponenten der Matrices) entwickelt.

1.3.1 Rationelle Probenaufarbeitung

Aufgabe der Probenaufarbeitung für die LC/MS/MS-Analytik ist es, mit möglichst geringem Aufwand (Kosten, Zeit) valide, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Es war nicht möglich, die Caco-2 Proben ohne Probenaufarbeitung zu vermessen, da durch ihren hohen Salzgehalt (Transportpuffer) die Ionisation der Analyten und somit die Quantifizierungen (über die Fläche und Intensität der chromatographischen Peaks der Ionen) in nicht reproduzierbarer Weise gestört wurden [Constantopoulos et al., 1999]. Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Elektrosprayionisation (ESI) zu erkennen; er trat weniger bei Chemischer Ionisation (APCI) auf, was auf den verschiedenen (postulierten) Ionisierungsmechanismen beruht [Dole et al., 1968; Iribarne et al., 1976]: Die Bildung der nackten Ionen, die ins Massenspektrometer eingeleitet werden sollen, erfolgt bei ESI aus geladenen Tröpfchen, an deren Oberfläche sich die ionisierten Moleküle der Testlösung befinden. Konkurriert an dieser Oberfläche nun ein großer Überschuss an Salz mit den Analytenmolekülen um die Freisetzung in die Gasphase, nimmt die Ionenbildung der Analyten im Vergleich ab. Genauso wird die Ionisierung auch durch Detergentien behindert, da sie die Oberflächenspannung der geladenen Tröpfchen herabsetzen, die jedoch in

einem gewissen Bereich liegen muss, um gasförmige Ionen freisetzen zu können. Bei APCI hingegen erfolgt die Ionenbildung weitgehend durch Glimmentladung in der Gasphase, weshalb die Salze weniger Einfluss haben.

Trotz dieser Restriktionen wurde bei den untersuchten Verbindungen vornehmlich ESI statt APCI eingesetzt, da sie besser für die Testsubstanzen geeignet war. Außerdem muss man für nahezu alle analytischen Methoden biologische Proben vor ihrer Analyse aufarbeiten- der Mehraufwand war also vertretbar.

Zunächst wurde Festphasenextraktion getestet, da sie sehr gute Ergebnisse liefert. Sie wurde dann allerdings trotz guter Ergebnisse aufgrund des hohen Material- und Zeitaufwandes für Methodenentwicklung und Durchführung (laborintern nicht automatisierbar) nicht weiter verwendet.

Folglich wurde die kostengünstigere Flüssig-Flüssig-Extraktion für einige Verbindungen etabliert, unter anderem für die Caco-2-Referenzen. Auch sie lieferte sehr gute, reproduzierbare Ergebnisse, was durch Kalibriergeraden und Qualitätskontrollproben überprüft wurde. Allerdings ist die Methode aufgrund des hohen Zeitaufwandes für die Methodenentwicklung (Wahl geeigneter interner Standards und Extraktionsmittel, Zeit zum Abdampfen) ebenfalls schlecht automatisierbar bzw. schlecht für den höheren Probendurchsatz geeignet.

Deshalb wurde nach einer schnelleren Alternative zur Probenaufbereitung der Caco-2-Proben gesucht, bei denen der hauptsächliche Störfaktor für die LC/MS/MS-Analytik der hohe Salzgehalt ist. (Für die Analyse von Substanzen aus komplexeren biologischen Matrices, wie z.B. Plasma, blieb die Flüssig-Flüssigextraktion die Methode der Wahl.) Folglich wurde die Eignung einer Schaltventilmethode zur online-Entsalzung der Caco-2 Proben im Zeitfenster zwischen flüssigchromatographischer Trennung und Injektion in die Ionenquelle getestet [Caldwell et al., 1998]. Dazu wurden alle zu vermessenen Proben und Standards auf den gleichen Salzgehalt eingestellt, indem sie jeweils mit apikalem oder basolateralem Transportpuffer verdünnt wurden (1 zu 1). Dann wurden sie nach Zusatz von Ionisierungsadditiv per HPLC chromatographisch auf einer Reversed Phase-Säule getrennt. Um möglichst viel Salz aus den Proben zu entfernen, wurde bei jedem chromatographischen Lauf mit einem möglichst hohen Wasseranteil begonnen und der Effluent der Säule für ca. eine Minute per Schaltventil in den Abfall geleitet. Nach dieser Entsalzung wurde die Position des Schaltventils so geändert, dass der HPLC-Effluent (mit den bis zu diesem Zeitpunkt an der stationären Phase

zurückgehaltenen Analyten)- mittels eines höheren organischen Lösungsmittelanteils im Elutionsgemisch- in die Ionenquelle des massenspektrometrischen Teils eingeleitet wurde. Hier sollte nun ungestört (ohne Salze) die Ionisierung und die Analyse der Testverbindungen erfolgen können.

Wie ein Vergleich der Ergebnisse der Schaltventilmethode mit denen der Flüssig-Flüssigextraktion zeigte, war erstere ebenfalls sehr gut zur Analyse der Caco-2-Proben geeignet. Da hier außerdem der Probendurchsatz am höchsten war, wurde sie fortan generell zur Analyse der Testverbindungen aus den Caco-2-Transporttests verwendet.

1.3.2 LC/MS/MS-Analytik

Nachdem adäquate Probenaufarbeitungsmethoden etabliert worden waren, mussten für alle Verbindungen parallel noch die HPLC- und MS-Methoden entwickelt werden (z.T. kam es natürlich zu Überlappungen der Methodenentwicklungen).

Generell wurden zunächst die MS-Parameter in verschiedenen reinen Lösungsmitteln nach direkter Injektion (ohne Säule) jeder einzelnen Substanz optimiert. Dazu wurden für jede Verbindung spezifische Ionen ausgewählt (Addukte, Pseudomolekularionen, Fragmentionen) und ihre Detektionsparameter wurden optimiert. Analog zum Lösemittel wurde die Verbindung dann in ihrer biologischen Matrix mit und ohne Probenaufarbeitung untersucht, um die Einflüsse der Matrix auf die Detektion abzuschätzen.

Für Quantifizierungen wurde generell der SRM-Modus (selected reaction monitoring) verwendet, der sehr selektiv und sensitiv ist. In manchen Fällen wurde auch der SIM-Modus (selected ion monitoring) eingesetzt, um die Sensitivität noch zu steigern.

Im Anschluss wurde dann die HPLC- Methode (mit oder ohne Schaltventil) optimiert, um mit möglichst kurzen Laufzeiten, möglichst sensitive (Detektionslimit), selektive (eventuell chromatographische Trennung) Quantifizierungen durchführen zu können. Die Wahl der mobilen Phasen und ihrer Zusätze wird natürlich durch die Kopplung mit der Massenspektrometrie vorgegeben. Es können nicht alle Lösungsmittel und Puffer verwendet werden wie bei der traditionellen UV-Detektion.

Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen durch Dreifachinjektionen derselben Proben (Kalibrierstandards und unbekannte Proben) überprüft und die Richtigkeit durch Qualitätskontrollproben getestet.

Die entscheidenden Vorteile der Kombination der beiden analytischen Techniken (HPLC mit MS) waren die Möglichkeit, mit einer viel höheren Selektivität und Sensitivität auch mehrere Verbindungen simultan in einem Lauf zu quantifizieren (was mit den separierten Techniken nur in geringerem Masse möglich wäre), die enorme Ersparnis von Messzeit, sowie die Eignung für den Nachweis der meisten pharmazeutisch interessanten Verbindungen.

Der einzige wesentlich beschränkende Faktor der Technik ist die Methodenentwicklung.

2 5 α -Reduktase-Projekt

2.1 Ziel und Ansatz des Projektes

Das Ziel des Projektes ist die Entwicklung von Arzneistoffen zur Therapie androgenabhängiger Erkrankungen wie z.B. Benigner Prostatahyperplasie oder Prostatakarzinom.

Dazu soll durch die Hemmung der beiden Isoenzyme der 5 α -Reduktase (Typ1 und Typ2) die Biosynthese von Dihydrotestosteron als dem potentesten humanen Androgen weitgehend unterbunden werden. Dadurch soll das Wachstum des entarteten Gewebes zurückgehen bzw. die Gewebe sollen sogar schrumpfen.

Die Effizienz dieses Prinzips wurde bereits mit klinisch eingesetzten, steroidal Inhibitoren der 5 α -Reduktase bewiesen. Dabei zeigte der duale Inhibitor Dutasterid noch höhere Wirksamkeit als der selektive Typ2-Inhibitor Finasterid. Allerdings kam es aufgrund der steroidal Strukturen beider Verbindungen zu erheblichen Nebenwirkungen.

Daher wurden im Arbeitskreis neue, nichtsteroidale 5 α -Reduktase-Inhibitoren entwickelt, um das Nebenwirkungspotential zu verringern [Dissertation Salem, 2003; Dissertation Picard, 2002]. Dabei wurde eine hochpotente Substanzklasse entwickelt, deren Carbonsäuren hochselektiv den Typ2 des Enzyms hemmen. Die korrespondierenden (Methyl-)Ester dieser Carbonsäuren hemmen hingegen hochselektiv den Typ1 des Enzyms (s. Ergebnisse: Leitverbindungen 1a-3a). Aus dieser Beobachtung wurde ein innovatives Hemmkonzept entwickelt- das Hybridkonzept [Streiber et al., 2005]. Die Idee des Konzeptes ist es, die Ester als Hybridinhibitoren in der Peripherie (peroral oder intravenös) zu verabreichen, wo sie hochpotent als Drug den dort vermehrt vorkommenden Typ1 der 5 α -Reduktase hemmen sollen. Außerdem sollten die Ester in der Peripherie möglichst stabil sein, um gleichzeitig in hoher Konzentration in der Funktion eines Prodrugs unverändert ins Targetorgan (die Prostata) zu gelangen. Hier sollen sie in hinreichendem Ausmaß ihre korrespondierende Säure freisetzen, die dann als Drug hochpotent die lokal vermehrt exprimierte 5 α -Reduktase Typ2 hemmen könnte.

Die Hybridinhibitoren wären also durch die Hemmung beider Isoenzyme der 5 α -Reduktase nicht nur ebenso effizient wie ihre bereits klinisch eingesetzten dualen Inhibitoren, sondern sie hätten aufgrund ihrer hochselektiven Aktivität voraussichtlich sogar ein geringeres Nebenwirkungspotential gegenüber anderen Enzymen.

Genauso wie die dualen Hemmstoffe hätten auch Hybridinhibitoren den Vorteil, dass mit ihnen im Unterschied zu selektiven Hemmstoffen der einzelnen Isoenzyme, nur einmal die Kinetik optimiert werden müsste und nur einmal klinische Studien durchgeführt werden müssten.

2.2 In vitro- Modelle zur Evaluierung des Hybridkonzeptes nach peroraler Applikation

2.2.1 Gewebespezifische Permeabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren

2.2.1.1 Caco-2 Modell

Um die Verfügbarkeit der 5 α R-Inhibitoren am Wirkort zu gewährleisten, müssen sie in der Lage sein, biologische Barrieren zu überwinden. Folglich müssen sie zur peroralen Applizierbarkeit aus dem Darm aufgenommen werden können und zur Wirksamkeit innerhalb der Prostata u.a. die Membranen des Zielorgans überwinden können.

Die Absorption der Säuren im Caco-2 Modell war erstaunlicherweise hoch, obwohl sie physiologisch ionisiert vorliegen. Der hohe Transport kann also vermutlich auf die Nutzung eines aktiven Transporters (z.B. des Monocarbonsäuretransporters) erklärt werden. Außerdem unterliegen die Säuren einem schwachen Efflux durch P-gp, was jedoch für die in vivo-Situation irrelevant ist, da P-gp in Krebszellen (z.B. Caco-2) überexprimiert wird und die Verbindungen in vivo primär zur Therapie von gutartigem BPH-Gewebe eingesetzt werden sollen.

Die Säuren wären also potentielle Kandidaten zur BPH-Therapie durch Hemmung der 5 α R-Typ 2 nach peroraler Applikation in vivo.

Im Gegensatz dazu war die Absorption der korrespondierenden Ester der Verbindungsklasse im traditionellen Caco-2-Transportmodell niedrig. Die Verbindungen würden also voraussichtlich in geringem Ausmaß auf der peroralen Route in die systemische Zirkulation aufgenommen werden können, d.h. das Hybridkonzept könnte auf peroralem Weg nicht realisiert werden. Da dies jedoch für Langzeittherapien der bevorzugte Applikationsweg wäre, sollte die Ursache der mangelnden Esterpermeabilität herausgefunden und nach Möglichkeit behoben werden.

Daher wurde zunächst überprüft, ob die Verbindungsklasse einem Efflux durch P-gp unterliegt, um gegebenenfalls den Efflux zur Steigerung der Permeabilität zu hemmen. Die Ester waren jedoch keine P-gp-Substrate, da sowohl der sekretorische apparente Permeabilitätskoeffizient sehr niedrig war, als auch die absorptive Permeabilität der Modellverbindung 1a nicht durch Kombination mit dem P-gp-Inhibitor Verapamil gesteigert werden konnte.

Daher wurde als nächste Option die Effizienz von Cyclodextrinen als Absorptionsverbesserer für die potentiellen Hybridinhibitoren untersucht. Dazu wurde der Effekt verschiedener Cyclodextrine (β -Cyclodextrin, 3-Methyl- β -Cyclodextrin und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin) auf die Membranpassage der Ester 1a, 2a und 3a im Caco-2 Modell in den üblichen Konzentrationen (äquimolar, 1,8% und 5% m/v) getestet.

Das beste Ergebnis wurde in der Kombination der Verbindung 3a mit 5% 3-Methyl- β -Cyclodextrin erreicht. Der Ester erreichte so nach 3h den mittleren Permeabilitätsbereich im Caco-2-Modell, was eine günstige Prognose für die Absorption in vivo zulässt.

Dass die Absorption des Esters 3a allerdings nur in Kombination mit einem hohen molaren Überschuss an 3-Methyl- β -Cyclodextrin (>700-fach) deutlich gesteigert werden konnte, deutet auf eine mehrfache Funktion des Absorptionsverbesserers hin. Er dient zum einen der Komplexierung und dem Shuttle des Esters zur biologischen Membran (ohne Ausbildung einer Hydrathülle) [Uekama et al., 1998], zum anderen führt er zur Erhöhung der Fluidität der biologischen Membran durch Einlagerung [Shah et al., 2004].

Zur näheren Aufklärung der Beobachtung wurden daher Komplexierungsstudien der Verbindung 3a mit 3-Methyl- β -Cyclodextrin in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:1; 1:10; 1:762) durchgeführt. Die höchste Menge an Ester wurde dabei mit der größten Konzentration an Cyclodextrin (=maximal im Caco-2 Test einsetzbare Konzentration) komplexiert, d.h. die Komplexbildung verlief nicht stöchiometrisch. Da die Permeabilitätssteigerung im Caco-2 Modell mit dem Cyclodextrinüberschuss im Vergleich zur äquimolaren Inkubation aber höher war als der Faktor der durch die unterschiedlichen Cyclodextrinkonzentrationen komplexierten Anteile an Ester, ist ein zusätzlicher permeabilitätssteigernder Membraneffekt zu vermuten. (Die mangelnde Integrität der Transportsysteme kann nicht in Erwägung gezogen werden, da die Integrität nach jedem Test per Lucifer Yellow kontrolliert wurde.)

Im Überblick ist die Verwendung von Absorptionsverbesserern prinzipiell zur Steigerung der Membrangängigkeit der Substanzklasse geeignet, es besteht aber noch Optimierungsbedarf. Außerdem ist gegen den Einsatz bestimmter Cyclodextrine in vivo nichts einzuwenden, da sie weit verbreitet in Kosmetika, Lebensmitteln und Arzneistoffen Anwendung finden (z.B. Brexidol®-Tabletten: 20mg Piroxicam, 171,2mg β -Cyclodextrin [Rote Liste, 2006]; GRAS-Liste, USA, 2006).

Da durch diesen Ansatz das Problem der niedrigen peroralen Absorption zwar behoben werden konnte, die Ursache der mangelnden Esterpermeabilität aber nicht eindeutig geklärt und auch nicht beseitigt worden war, wurden weitere Untersuchungen mit den potentiellen Hybridinhibitoren unternommen. Dabei stellte sich durch in silico-Korrelation der PAMPA-Permeabilität mit verschiedenen molekularen Deskriptoren heraus, dass die Membrangängigkeit durch die hohe Lipophilie der Ester limitiert wird ($\log P > 5$). Je höher die Lipophilie der Ester wurde, desto geringer war ihre Permeabilität in PAMPA. Demzufolge wurde ein anderer Ansatz zur Permeabilitätsverbesserung getestet, und zwar die Absenkung der Lipophilie durch minimalistische Strukturmodifikation der Leitstruktur 1a (s. „Ergebnisse“). Die Struktur sollte zwar hinreichend verändert werden, um einen Anstieg der passiv transzellulären Permeabilität zu erreichen, gleichzeitig sollte aber versucht werden, das Pharmakophor und somit die Aktivität der Verbindung weitestmöglich zu konservieren [Dissertation Dossou, 2006].

Mit dieser Intension wurden die beiden Dicyclohexylreste von 1a verbrückt (s. Ergebnisse „UD 1-3“). Einmal wurden sie direkt verbrückt, zweimal über ein Heteroatom (Stickstoff oder Sauerstoff). Im ersteren Fall reichte die Absenkung der Lipophilie nicht aus, um die passiv transzelluläre Membrangängigkeit der Ester zu verbessern, in den beiden letzteren Fällen stieg die Permeabilität stark an, da die $\log P$ -Werte bei beiden in gleichem Ausmaß unter 5 abgesenkt wurden. Die Membrangängigkeit des sauerstoffverbrückten Esters war sogar noch etwas höher als die des stickstoffverbrückten, da letzterer bei physiologischem pH-Wert teilweise protoniert vorliegt. Beide Verbindungen waren hoch permeabel.

Die Strukturmodifikationen gingen jedoch leider mit einem deutlichen Aktivitätsverlust einher. Somit führte die Methode aus dem kinetischen Blickwinkel zum Erfolg, nicht aber vom dynamischen Gesichtspunkt aus. Das Prinzip wäre also prinzipiell zur Verbesserung der passiv transzellulären Membranpassage geeignet, es müsste aber

noch die Balance zwischen Erhalt der Aktivität und Steigerung der Permeabilität gefunden werden.

2.2.1.2 DU145 Modell

Die Prostatakrebszelllinie DU145 wurde als Modell fürs Targetorgan eingesetzt. Somit ist die Membrangängigkeit der Verbindungen in diesem Modell Voraussetzung für die Verfügbarkeit und Aktivität der Substanzen in vivo.

Im Unterschied zum Caco-2 Modell waren die Ester 1a-3a hier überraschend gut permeabel, was vermutlich auf der unterschiedlichen Morphologie der Zelllinien beruht (andere Zusammensetzung der Zellmembranen). Es wurden alle Ester innerhalb der Zellen detektiert, am höchsten war die Konzentration von Verbindung 3a (18,3%). Die Ester wären somit voraussichtlich gut verfügbar im Targetorgan.

Die als Referenz mit getestete Carbonsäure 1 hingegen war in DU145- Zellen niedrig permeabel (0,1%), da hier im Unterschied zu Caco-2 Zellen kein aktiver Transportmechanismus vorhanden ist. Ob sie in vivo im Targetorgan aktiv wäre (abhängig von Bioverfügbarkeit), würde also stärker als bei den Estern von ihrer effektiven Dosis abhängen.

2.2.2 Gewebespezifische Stabilität der 5 α -Reduktase-Inhibitoren

Voraussetzung für die Realisierbarkeit des Hybridkonzeptes wäre nicht nur die Aufnahme der Ester aus der Peripherie ins Targetorgan, sondern auch die gewebespezifische Stabilität der Ester. Da die bevorzugte Applikationsroute der perorale Weg ist, sollten die Ester also- stabil gegenüber dem first pass Metabolismus- aus dem Gastrointestinaltrakt in die systemische Zirkulation aufgenommen werden können, im Blut stabil bleiben und hier die 5 α -Reduktase Typ1 hemmen. Danach müssten sie in die Prostata aufgenommen und intrazellulär unter Freisetzung der gegen 5 α -Reduktase Typ2 aktiven korrespondierenden Carbonsäure hydrolysiert werden. Die perorale Applizierbarkeit der Ester ist allerdings keine Voraussetzung für die Realisierbarkeit des Hybridkonzeptes- prinzipiell wäre jede periphere Applikationsform geeignet.

2.2.2.1 Caco-2 Modell

Um zu evaluieren, ob das Hybridkonzept auch auf dem für Langzeittherapien (BPH) bevorzugten, peroralen Applikationsweg realisierbar wäre, wurde die Stabilität der Ester in Caco-2-Zellen (colon cancer cells) untersucht, sowohl im gastrointestinalen Transportmodell als auch im Zellhomogenat.

Während der Transporttests im Caco-2 Modell (3h) konnte keine Spaltung der Ester detektiert werden. Da dies jedoch auf eine intrazelluläre Anreicherung der Säuren nach ihrer Freisetzung aus den Estern oder auf die geringe Permeabilität der Ester (d.h. Freisetzung auf der basolateralen Seite unterhalb des Detektionslimits) zurückgeführt werden könnte, musste die Annahme, dass die Ester im Darmmodell hinreichend stabil sind, zusätzlich im Homogenat untersucht werden. Weitere Vorteile des Homogenates waren die viel weniger eingeschränkte Inkubationsdauer (24h) und der Wegfall der zellulären Membranen, in denen sich die lipophilen Verbindungen eventuell anreichern könnten.

Es stellte sich heraus, dass alle Verbindungen über 6h, was der doppelten Dauer einer durchschnittlichen gastrointestinalen Passagezeit entspricht, im Homogenat sehr stabil waren, obwohl hier die freie Enzymkonzentration höher ist als im zellulären Modell. Am stabilsten waren die Dicyclohexyl-substituierten Ester (z.B. Verbindung 1a, 2a, 3a, MS2), von denen nach der Inkubation jeweils noch über 60% ungespalten waren. Weniger stabil waren die Amide Z1 und Z3, die nur noch zwischen 40-50% ungespalten waren. Die Ursache hierfür war eventuell ein

zusätzlicher Angriff durch Peptidasen. Noch weniger stabil waren FP13a, FP14a und MS5, bei denen die Dicyclohexylgruppe durch eine Diphenyl- bzw. eine Adamantylgruppe ersetzt worden war, wodurch sie offenbar besser zugänglich (sterisch, elektronisch) für einen enzymatischen Abbau waren. Am instabilsten war MS4a, bei der die Dicyclohexylgruppe durch eine Dipropylgruppe ersetzt worden war. Von ihr waren nach 6h nur noch 10-20% vorhanden.

Insgesamt gibt jedoch die Stabilität der meisten Ester nicht nur einen ersten Hinweis auf die gute Verfügbarkeit (zur Absorption) innerhalb des Gastrointestinaltraktes (Stabilität gegen den intestinalen first pass Metabolismus), sondern auch auf die Stabilität gegenüber dem hepatischen first pass Metabolismus, da das Carboxylesterasemuster der Caco-2 Zellen demjenigen der Leber sehr ähnlich ist [Imai et al., 2005].

Den in vitro-Ergebnissen zufolge wären also zahlreiche der Verbindungen während der gastrointestinalen Passage stabil.

2.2.2.2 *Humanes Plasma und BPH-Homogenat*

Alle untersuchten Ester waren in Plasma über 24h hoch stabil (alle Ester zu über 50% ungespalten), d.h. sie könnten in vivo sowohl den in diesem Kompartiment verstärkt exprimierten Typ 1 der 5α R hemmen, als auch wären sie als Prodrugs für die Aufnahme ins Targetorgan in hinreichender Konzentration verfügbar.

Im Unterschied dazu konnte ihre gute Spaltung durch Esterasen (Peptidasen) in humanem BPH-Homogenat gezeigt werden (meiste Ester: Freisetzung von über 20% Säure). Somit würden also am Wirkort die hochpotenten 5α R2-Inhibitoren in hoher Konzentration freigesetzt werden.

Folglich wären die grundlegenden Voraussetzungen zur Realisierung des Hybridkonzeptes hinsichtlich der gewebespezifischen Stabilität erfüllt.

2.2.2.3 *DU145 Modell*

Zusätzlich zu den Ergebnissen im BPH-Homogenat wurde dennoch die Freisetzung der Säuren in einem zellulären Modell des Targetorgans- DU145-Zellen untersucht. Der Vorteil bei der Verwendung der humanen Prostatakrebszelllinie gegenüber BPH-Homogenat ist, dass ein komplexeres intaktes zelluläres System vorliegt, in dem auch die Membrangängigkeit der Ester Einfluss auf die Stabilitätsergebnisse hat, und in dem die Enzymkonzentrationen physiologischer (niedriger konzentriert) sind als in

BPH-Homogenat. Es wurden keine zur Immortalisierung transfizierten BPH-Zelllinien oder Primärkulturen verwendet, da deren höhere Ähnlichkeit mit physiologischem BPH-Gewebe nicht garantiert ist [Hayward et al., 1995] bzw. da sie im Vergleich zu DU145-Zellen sehr schwierig zu handhaben sind [Bayne et al., 1998].

Die Ester 1a-3a setzten alle intrazellulär ihre korrespondierenden Säuren frei. Es wurde zwar auch Säure außerhalb der Zellen gefunden (durch Efflux oder extrazelluläre Spaltung), dies stellt jedoch kein Hindernis für das Hybridkonzept dar. Somit wurden die Ergebnisse des BPH-Homogenats durch das DU145-Modell untermauert und um den kinetischen Gesichtspunkt der zellulären Aufnahme erweitert.

2.3 Fazit des Projektes

Den in vitro-Ergebnissen zu Folge kämen ausgewählte Ester- nach peripherer Applikation- zur Etablierung des innovativen Hybridhemmkonzeptes beider Isoenzyme der 5 α -Reduktase an einem geeigneten in vivo-Modell in Frage.

Die Permeabilität der Ester durch Caco-2 Zellen war zwar zunächst relativ gering, sie konnte jedoch durch Cyclodextrine und Strukturmodifikationen in hohem Masse verbessert werden.

Bestimmte Ester zeigen gute Membrangängigkeit am Modell des Targetorgans, den DU145-Zellen, d.h. sie könnten voraussichtlich gut in die Prostata aufgenommen werden.

Außerdem besitzen ausgewählte Ester gewebsspezifische Stabilität. D.h. dass in den jeweiligen Geweben bzw. Kompartimenten ein anderes Esterasemuster vorliegen muss, da obwohl die totale Esteraseaktivität der Homogenate und des Plasmas auf den gleichen Level eingestellt worden war [10nmol/min*mg], die Verbindungen unterschiedlich stark gespalten wurden. Sie wurden in der Peripherie, d.h. in Caco-2-Homogenat und in humanem Plasma während des erforderlichen Zeitrahmens kaum gespalten und wären somit verfügbar für die Aufnahme aus dem Magendarmtrakt in die systemische Zirkulation bzw. für die Hemmung der 5 α -Reduktase Typ1 in der Peripherie. Im Targetorgan hingegen, d.h. in BPH-Homogenat und in DU145-Zellen wurden hinreichende Mengen der korrespondierenden Säuren aus den Estern freigesetzt und könnten somit das hier verstärkt exprimierte Isoenzym Typ2 hochpotent hemmen. Dies zeigt, dass trotz der generell breiten Substratspezifität und

Vielfalt von Esterasen ausgewählte 5α -Reduktase-Inhibitoren nach dem Hybridkonzept erfolgreich eingesetzt werden könnten.

Somit sind alle Ergebnisse der in vitro-Evaluierung des Hybridkonzeptes auf dem peroralen Weg viel versprechend. Ein „proof of concept“ in vivo an einem geeigneten Modell steht allerdings noch aus. Die Ratte ist hierzu leider nicht geeignet, da die Ester aufgrund mangelnder Interspezies-Homologie zum Menschen kaum Aktivität am Nagerenzym Typ1 aufweisen. Allerdings konnte die Aktivität der Säuren am Isoenzym Typ2 in diesem Modell in vivo schon nachgewiesen werden [Dissertation Picard, 2002], was der Möglichkeit zur Realisierung des Konzeptes in einem anderen Modell vom kinetischen Aspekt aus Raum lässt.

3 17 β -HSD1-Projekt

3.1 Ziel und Ansatz des Projektes

Ziel des Projektes ist die Behandlung estrogenabhängiger Erkrankungen wie z.B. Endometriose und Mammakarzinom. Dazu wurde ein neuer Ansatz etabliert, und zwar die Entwicklung nichtsteroidaler Inhibitoren der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ1 (in Form von Estradiolanaloga) zur Unterbindung der Biosynthese Estradiols, des potentesten Estrogens. Die durch das Isoenzym Typ2 katalysierte Rückreaktion von Estradiol zu Estron soll nicht gehemmt werden, damit im erkrankten Gewebe vorhandenes Estradiol (aufgenommen oder gebildet) unverändert abgebaut werden kann. Die neue Wirkstoffklasse soll zudem möglichst geringe Affinität zum Estrogenrezeptor (ER α : estrogene Effekte; ER β : antiphlogistische Effekte, aber hohe Homologie zu ER α) besitzen, um seine Aktivierung zu vermeiden.

Durch die nichtsteroidalen 17 β -HSD1-Inhibitoren würde also in vivo das estradiolstimulierte Wachstum der entarteten Gewebe abnehmen. Ein enormer Vorteil gegenüber den bei Mammakarzinom klinisch (postmenopausal) eingesetzten Aromatasehemmern wäre der zusätzlich mögliche, prämenopausale Einsatz der Wirkstoffklasse. Diese Option beruht darauf, dass sie v.a. am Targetgewebe angreifen würde, da dort das Targetenzym verstärkt exprimiert wird. Außerdem würde im Unterschied zu den Aromatasehemmern auch nicht die komplette Estrogenbiosynthese gehemmt werden, sondern nur ihr letzter Schritt, wodurch weniger Nebenwirkungen zustande kämen.

3.2 In vitro- Modelle zur Evaluierung des Konzeptes nach peroraler Applikation

Um die Aktivität und Selektivität der neu entwickelten Inhibitoren zu untersuchen, wurden arbeitskreisinterne, zellfreie Enzymtests durchgeführt [Dissertation Erika Ziegler, 2006]. Um den kinetischen Faktor der Membrangängigkeit in die biologischen Aktivitätsstudien miteinzubeziehen, wurden zusätzlich arbeitskreisexterne Aktivitätstests an mit dem jeweiligen Enzym transfizierten MCF-7 Zellen durchgeführt. Außerdem wurden kinetische Studien mit MCF7-Zellen als Modell des Targetorgans, sowie Studien bzgl. der peroralen Verfügbarkeit in Caco-2

Zellen und in vivo-Studien durchgeführt. Außerdem wurde der Phase I-Metabolismus an Rattenlebermikrosomen getestet.

3.2.1 Caco-2 Modell

Da es auch bei dieser Wirkstoffklasse wünschenswert wäre, sie peroral applizieren zu können, wurden ausgewählte hochpotente, selektive 17 β -HSD1-Inhibitoren im Caco-2-Permeabilitätstest untersucht. Es wurden sowohl Verbindungen mit NaphthalinGrundgerüst und zwei phenolischen Substituenten, als auch Substanzen mit hydrophobem Core (meist fünfgliedrige Heterozyklen mit N, S, O) und zwei phenolischen Substituenten auf ihre Permeabilität getestet.

Dabei stellte sich heraus, dass die Membrangängigkeit aller Estradiolanaloge mittel bis hoch war, weshalb alle Verbindungen als voraussichtlich in vivo gut peroral verfügbar eingestuft wurden. Um dies näher zu überprüfen, wurden die beiden in ihrem Gesamtprofil am vielversprechendsten Kandidaten (EZ128B, EZ227) für eine in vivo-Untersuchung der peroralen Verfügbarkeit ausgewählt.

3.2.2 Perorale Kinetik in vivo

Durch die Aufnahme von Plasmaspiegel-Zeit-Kurven wurden die wichtigsten kinetischen Parameter der beiden Verbindungen bestimmt, und zwar die maximale Plasmakonzentration (c_{max}), der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (t_{max}), die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), die Clearance (Cl) und die „area under the curve“ (AUC: Fläche unter der Plasmaspiegel-Zeit-Kurve) (s. Ergebnisse „Perorale Kinetik von EZ128B und EZ227 in vivo“).

Hierbei zeigte sich, dass die Verbindungen in dem komplexeren in vivo-Modell eine geringere Bioverfügbarkeit zeigten, als in vitro vorhergesagt; sie waren laut AUC mittelgut verfügbar. Diese Diskrepanz zwischen den Modellen (und Spezies) ist auf Effekte zurückzuführen, die nicht durch das Caco-2 Modell abgedeckt werden können. Hierfür kommen multiple Transportwege (z.B. Efflux) und umfassendere Metabolisierung in vivo in Frage. Einen Hinweis auf einen raschen Metabolismus gibt die relativ hohe Clearance der Verbindungen, die viel höher liegt als z.B. bei den getesteten CYP11B2-Inhibitoren.

Die Anflutungszeit (t_{max}) und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) liegen in einem günstigen Bereich, wenn man die Interspezieskorrelation zwischen Mensch und Ratte

berücksichtigt. Die Verbindungen würden gut aufgenommen werden und müssten nur ein- bis zweimal täglich verabreicht werden.

Insgesamt ist das Profil der Verbindungen für eine perorale Applikation viel versprechend, es besteht aber noch Optimierungsbedarf.

3.2.3 Stabilität gegenüber Rattenlebermikrosomen

Um den Einfluss der Phase I-Metabolisierung auf die perorale Bioverfügbarkeit von EZ128B und EZ227 näher aufzuklären, wurden *in vitro* Stabilitätstests mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Dazu wurde die Halbwertszeit der Verbindungen in Referenz zu einem langsam (Diazepam) und einem schnell (Diphenhydramin) metabolisierten Arzneistoff bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass nur eine der beiden Verbindungen schnell durch den Phase I-Metabolismus abgebaut wird, die andere vergleichsweise langsam. Beide liegen jedoch innerhalb des Bereiches der bereits eingesetzten Arzneistoffe und besitzen somit ein günstiges Profil für einen potentiellen therapeutischen Einsatz.

Die Verbindung, die *in vitro* schneller metabolisiert wurde, war *in vivo* auch geringer verfügbar als die andere. Da sich das perorale kinetische Profil der beiden Verbindungen *in vivo* aber nicht in so hohem Masse unterschied wie ihr Profil im Mikrosomenstabilitätstest, muss die Bioverfügbarkeit *in vivo* durch weitere Faktoren als den Phase I-Metabolismus beeinflusst werden. Beispielsweise kämen dafür neben eines Effluxes auch ein schneller Phase II-Metabolismus (Sulfatierung, Glucuronidierung) der durchgängig phenolischen Verbindungen in Frage [Smith et al., 2006]. Die endgültige Ursache der nur mittelmäßigen peroralen Bioverfügbarkeit der Substanzen bleibt somit noch abzuklären.

3.2.4 MCF7 Modell

Die Aufnahme der 17 β -HSD1-Inhibitoren in MCF7-Zellen sollte aus zwei Gründen untersucht werden. Einerseits dienen sie als Modell fürs Targetorgan, andererseits sollte aufgeklärt werden, ob der starke Aktivitätsverlust der Inhibitoren (im Vergleich zu einen hauseigenen Enzymtest) in einem arbeitskreisextern durchgeführten zellulären Hemmtest (17 β -HSD1 bzw. 17 β -HSD2-transfizierte MCF7-Zellen) auf ihrer mangelnden Membrangängigkeit beruht.

Für diese Untersuchung wurden Verbindungen möglichst verschiedener Struktur ausgewählt (SOM19C, EZ128B, EJB100A, MX8, EZ247), um ein möglichst breites

Substanzspektrum abzudecken. Relativ unerwartet stellte sich heraus, dass die Membrangängigkeit der Verbindungen auch in diesem Modell relativ gut war.

Die Verbindungen konnten per Fluoreszenzmessung (Konfokale Laserscanningmikroskopie, CLSM) intrazellulär (zytoplasmatisch und nukleär) nachgewiesen werden; die stärkste Fluoreszenz besaß SOM19C.

Eine Quantifizierung der aufgenommenen Substanzen mit dieser Methode war allerdings nicht möglich, da sich die Fluoreszenz stark durch Proteininteraktionen änderte, und die Substanzen offenbar bei der hohen Lichtintensität des Lasers instabil waren. Die Quantifizierung der Substanzen wurde daher per LC/MS/MS aus dem Zellhomogenat durchgeführt, auch wenn hierbei der membrangebundene Anteil nicht erfasst wird. Trotz dieser Einschränkung konnten alle getesteten Verbindungen intrazellulär nachgewiesen werden: EZ247 wurde am wenigsten aufgenommen (0,6%), MX8 am besten (16,6%).

Ob diese Konzentrationen zur Erreichung der intrazellulären effektiven Dosen ausreichen, hängt natürlich von der Methode der Inkubation ab (z.B. Dauer, Startkonzentration, Zelllinie). Die externe, für die Aktivitätstests verwendete Methode wäre eventuell für die Substanzklasse noch optimierbar, da sie sehr kurze Inkubationszeiten verwendet (30min) und mit sehr niedrigen Inhibitorkonzentrationen arbeitet (100nM, 1µM).

Allerdings könnten auch Unterschiede in der Struktur der Zellmembranen zwischen den hauseigenen, untransfizierten und den externen, transfizierten MCF-7-Zellen bestehen, weshalb die Substanzen schlechter in die transfizierten Zellen aufgenommen werden könnten und somit nicht wirken würden. Um diese Problematik zu klären, soll ein hauseigener zellulärer Aktivitätstest etabliert werden. Prinzipiell besitzen die meisten untersuchten Verbindungen jedoch günstige kinetische Eigenschaften und könnten voraussichtlich ins Targetorgan aufgenommen werden.

3.3 Fazit des Projektes

Ausgewählte im Enzymtest hochpotente und selektive 17 β -HSD1-Inhibitoren zeigen ein sehr günstiges kinetisches Profil im Caco-2 Modell und ein mittelmäßiges perorales kinetisches Profil in vivo am Rattenmodell. Außerdem besitzen sie mit Arzneistoffen vergleichbare Stabilitäten gegenüber dem Phase I-Metabolismus durch Rattenlebermikrosomen. Sie werden auch in die hausintern verwendete MCF7-Zelllinie (DSMZ, untransfiziert) aufgenommen und wären somit im Targetgewebe verfügbar.

Die Verbindungen wären also ausgehend von diesen in vitro-Ergebnissen potentielle Kandidaten für eine Aktivitätsstudie in vivo an einem geeigneten Modell, da sie sowohl in der Lage sind, physiologische Membranen von Darm- und Targetzellen zu überwinden, als auch hohe Aktivität und Selektivität gegenüber 17 β -HSD1 besitzen. Eventuell könnten zur Verbesserung der peroralen Absorption und zur Verlangsamung des Phase II-Metabolismus der phenolischen Verbindungen Prodrugs eingesetzt werden (z.B. Veresterung oder Alkylierung der Phenolgruppen); die Notwendigkeit bzw. der Nutzen einer solchen Maßnahme bleibt allerdings noch abzuklären.

Außerdem soll zur umfassenderen Präselektion potentieller Kandidaten für in vivo-Tests ein hauseigener zellulärer Aktivitätstest mit 17 β -HSD1- bzw. 17 β -HSD2-transfizierten Eukaryonten (Brustkrebszelllinie) etabliert werden. Dadurch wären sowohl ein schnelleres Screening als auch eine bessere Interpretierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

Insgesamt liegen sehr viel versprechende in vitro-Ergebnisse vor, die nach weiteren Optimierungen sicherlich zur Entwicklung von Kandidaten für die klinische Prüfung führen werden.

4 CYP11B2-Projekt

4.1 Ziel und Ansatz des Projektes

Ziel des Projektes ist die Behandlung von Myokardfibrose und Herzinsuffizienz. Traditionell konnten diese mit einer hohen Mortalitätsrate assoziierten Erkrankungen durch den Einsatz von Mineralocorticoidrezeptor (MR)-Antagonisten nur symptomatisch behandelt werden. Ein enormer Nachteil dieser Therapieform besteht also darin, dass die Ursache der Erkrankung bzw. ein zu ihrer Progression führender physiologischer Effektor- Aldosteron- nicht beseitigt wird. Außerdem kam es durch die MR-Antagonisten zu teilweise tödlichen Hyperkaliämien.

Daher wurde im Arbeitskreis ein innovativer Ansatz entwickelt, der die Ursache der Krankheit therapiert, und zwar die selektive Hemmung der Biosynthese von Aldosteron durch nichtsteroidale CYP11B2-Inhibitoren. Die Cortisol-Synthese durch das hochhomologe Enzym CYP11B1 sollte nicht gehemmt werden, um gravierende Nebenwirkungen im Glucosehaushalt zu vermeiden.

Ein entscheidender Vorteil des neuen Konzeptes in vivo wäre also die Durchbrechung des pathophysiologischen „Circulus Vitiosus“ von Aldosteron (s. „Einleitung“), wodurch die Krankheitsstadien stabilisiert werden könnten, und somit die Überlebenszeit der Patienten erhöht werden würde. Zudem wären im Unterschied zu den traditionell eingesetzten (MR)-Antagonisten (Spironolacton, Eplerenon) hier auch keine steroidal-n Nebenwirkungen oder tödlichen Hyperkaliämien zu erwarten.

4.2 In vitro- Modelle zur Evaluierung des Konzeptes nach peroraler Applikation

Nachdem es gelungen war hochpotente und gegenüber CYP11B1 hochselektive CYP11B2-Inhibitoren zu entwickeln [Dissertation Voets, 2005 und Dissertation Ulmschneider, 2005] (in mit humanem CYP11B1 bzw. CYP11B2 transfizierten V79-Zellen), wurden ihre Eigenschaften weiter untersucht. Ihre perorale Verfügbarkeit im Caco-2 Modell und in Ratten, sowie ihre Stabilität gegenüber Rattenlebermikrosomen wurden getestet. Außerdem wurde ihre Aktivität an den entsprechenden Rattenenzymen in vitro und in vivo überprüft.

4.2.1 Caco-2 Modell

Da bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose eine Langzeittherapie benötigt wird, wäre auch hier die perorale Applikation der Arzneistoffe erwünscht. Um diese vorherzusagen, wurden zunächst Transportstudien im Caco-2 Modell durchgeführt. Die Ergebnisse waren sehr viel versprechend, da die meisten Verbindungen in hohem Masse permeabel waren, was generell eine günstige Prognose für perorale in vivo-Verfügbarkeit ist.

Um einen höheren Testdurchsatz zu erzielen und nur die besten Kandidaten eines Gemisches herauszufinden, wurden die Substanzen teilweise im „cassette dosing“ (s. „Ergebnisse“) verabreicht. Diese Konkurrenzsituation kommt außerdem der in vivo-Situation der vermutlich multimorbiden bzw. unter Multimedikation (Multitherapie) stehenden, älteren Patientenzielgruppe am nächsten.

Da sich bei der Applikation mehrerer Verbindungen im Gemisch jedoch die Permeabilität durch Interaktionen (im Vergleich zur Einzelapplikation) ändern kann, wurde die Methode für die Substanzklasse validiert. Es wurde zunächst ein Set von 5 Verbindungen einzelnen, dann ein 3er-Gemisch und schließlich ein 5er-Gemisch im Caco-2 Modell getestet. Durch den Vergleich der jeweiligen Permeabilitäten konnte man feststellen, dass die Interaktionen gering waren, da sich die Permeabilitätsklassen der Substanzen nicht änderten und die Reihenfolge ihrer Membrangängigkeit gleich blieb. Zur Sicherheit wurde jedoch in allen folgenden Testsets eine Referenzsubstanz (MV45) mitgetestet, um das Ausmaß möglicher Interaktionen innerhalb der Substanzklasse abschätzen zu können. Außerdem wurde die Permeabilität von im Gemisch niedrig membrangängigen Inhibitoren im „single dosing“ überprüft, wo sie allerdings genauso ausfiel. Bei im Gemisch mittel bis hoch permeablen Verbindungen war es nicht nötig, sie im „single dosing“ zu überprüfen, da sie dort auch mittel bis hoch permeabel sein sollten. Diese Annahme beruht darauf, dass die wahrscheinlichste Interaktion zwischen den Substanzen eine Konkurrenz um den gleichen Transportweg bzw. die Hemmung eines Transportenzymes ist, wodurch jeweils die Permeabilität abnehmen würde. Eine Steigerung der Permeabilität im Gemisch ist nicht zu erwarten, da diese höchstens durch eine Transportenzyminduktion ausgelöst werden könnte, die aber innerhalb des kurzen Inkubationszeitraumes relativ unwahrscheinlich ist. Auch eine Effluxhemmung wäre theoretisch möglich, kommt aber nicht in Frage, da alle Verbindungen sehr ähnliche Strukturen haben, und offensichtlich im Gemisch nicht

besser permeabel sind als einzeln. Außerdem besteht das Hauptziel dieser rationellen, gemischten Inkubationen in der Selektion der besten Kandidaten aus einem Gemisch, nicht in einer möglichst exakten Bestimmung der P_{app} -Werte. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, nur sehr gute Kandidaten innerhalb eines Testsets vorzufinden; somit ist es auch nicht zu erwarten, dass eine viel versprechende Verbindung mit dieser Methode aussortiert wird.

4.2.2 Perorale Kinetik in vivo

Die perorale Absorption der besten Kandidaten der Caco-2 Tests wurde im Anschluss im Rattenmodell ebenfalls per „cassette dosing“ überprüft.

Hier zeigten viele Verbindungen ein sehr günstiges kinetisches Profil. Die beste Verbindung der Substanzklasse der Naphthaline (MV18) war sogar vergleichbar gut wie der simultan als Referenz getestete, klinisch eingesetzte Aromatasehemmer Fadrozol. In der Substanzklasse der Indene zeigte SU20A eine sehr günstige perorale Kinetik. Sowohl Bioverfügbarkeit, Anflutungszeit, Halbwertszeit und Clearance vieler Verbindungen waren sehr gut. Einige Verbindungen waren entgegen der guten Voraussage des Caco-2 Modells schlecht, was zahlreiche Ursachen haben kann, v.a. komplexere Transportwege und Metabolismus in vivo.

Die per Caco-2 Modell als schlecht prognostizierte Verbindung MV39 war allerdings auch in vivo schlecht verfügbar.

Somit war für diese Verbindungen die Korrelation zwischen Caco-2 Modell und Rattenmodell hoch.

4.2.3 Stabilität gegenüber Rattenlebermikrosomen

Zusätzlich wurde die Stabilität jeweils zweier Verbindungen der beiden Substanzklassen (Naphthaline, Indene) gegenüber dem Abbau durch Rattenlebermikrosomen getestet. Da sie eine gute Halbwertszeit besaßen, zeichneten sie sich als potentielle Kandidaten für Aktivitätstests in vivo ab.

4.2.4 Aktivität der Inhibitoren an den Rattenenzymen

Da als in vivo-Modell das generell akzeptierte Rattenmodell verwendet werden sollte, sollten vor einem in vivo-Test durch ein weiteres Präscreening in vitro die aktivsten Verbindungen (des obigen Testsets) an den Rattenenzymen selektiert werden. Diese Testung wurde anhand eines modifizierten Rattennebennientestes [Dissertation

Grün, 1994] durchgeführt. Es konnten hier jedoch leider keine aktiven Verbindungen gefunden werden, allerdings war die Potenz der mit getesteten Referenz Fadrozol ebenfalls niedriger als beschrieben [Häusler et al., 1989]. Da somit die Forschungsverbindungen trotzdem in vivo aktiv am Rattenzym sein könnten, wurden für einen in vivo- Aktivitätstest die im sonstigen Gesamtprofil besten Verbindungen ausgewählt: MV18 als Stellvertreter der Naphthaline, SU20A als Modellsubstanz für die Indene.

Die Aktivität dieser beiden CYP11B2-Inhibitoren und der Referenz Fadrozol an den Rattenzymen wurde in vivo an katheterisierten Ratten getestet, deren Hormonlevel zuvor mit ACTH stimuliert worden war (s. „Ergebnisse“). Die effektive Dosis der Referenz zur Absenkung der Aldosteron- und Corticosteronspiegel war schon in früheren Studien ermittelt worden [Dissertation Müller-Vieira, 2005] und betrug 4mg/kg. Die Forschungsverbindungen wurden in einer Konzentration von 40mg/kg eingesetzt, da ihre IC_{50} -Werte gegenüber CYP11B2 im V79-Zelltest um Faktor 10 höher lagen als derjenige von Fadrozol. Dadurch müsste eine Aktivität beider Forschungssubstanzen nachweisbar sein, auch wenn diejenige von SU20A aus kinetischen Gründen etwas niedriger ausfallen könnte als diejenige von MV18.

Leider konnten weder MV18 noch SU20A innerhalb von 8h nach Inhibitorapplikation die Hormonspiegel signifikant absenken- weder denjenigen von Aldosteron noch denjenigen von Corticosteron. Da die Validität der Testergebnisse jedoch durch die deutliche Absenkung beider Hormonkonzentrationen durch Fadrozol kontrolliert worden war, musste eine Erklärung für die mangelnde Aktivität gefunden werden. Nahe liegend wäre eine mangelnde Interspezies-Homologie von CYP11B2 und CYP11B1 zwischen Mensch und Ratte, aufgrund der die an den humanen Enzymen hochpotenten und hochselektiven Substanzen nicht an den Rattenzymen wirken könnten. Andererseits wäre es auch möglich, dass die minimale effektive Dosis in vivo noch nicht erreicht wurde.

4.3 Fazit des Projektes

Die getesteten, am humanen CYP11B2 hochpotenten und hochselektiven Inhibitoren besitzen eine hohe Membrangängigkeit im Caco-2 Modell und ein günstiges kinetisches Profil nach peroraler Applikation in Ratten. Außerdem weisen einige der Verbindungen in vitro hohe Stabilität gegenüber dem hepatischen Phase I-Metabolismus auf.

Aktive Verbindungen an den Rattenenzymen konnten bisher allerdings weder in vitro noch in vivo identifiziert werden. Daher sind zurzeit Studien im Gange, um neue Verbindungsklassen zu entwickeln. Außerdem wird ein zelluläres in vitro-Aktivitätsscreening-Modell der Rattenenzyme etabliert.

Es sollen zwar keine Arzneistoffe für Ratten entwickelt werden, das einfache, generell genutzte Modell wäre aber für einen „proof of concept“ in vivo- als Voraussetzung für klinische Studien- wünschenswert.

5 Vorhersage der peroralen Absorption heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2

5.1 Ziel und Ansatz des Projektes

Da die Durchführung von Caco-2 Tests sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, sollte die Eignung der künstlichen Membransysteme für die Vorhersage der Permeabilität verschiedener Substanzklassen arbeitskreisinterner Projekte (CYP17, CYP19) untersucht werden. Dies geschah im Hinblick auf einen eventuell möglichen, höheren Durchsatz bei größeren Substanzbibliotheken.

5.2 Korrelation zwischen PAMPA, PAMPORE und Caco-2

Die Ergebnisse der künstlichen Membransysteme PAMPA und PAMPORE, sowie des zellulären Systems Caco-2 korrelierten untereinander sehr gut. Es gab nur geringe Unterschiede zwischen den Klassifizierungen der Permeabilitäten durch die Modelle; die Differenz betrug maximal eine Permeabilitätsklasse. Dies deutet darauf hin, dass die Verbindungen überwiegend passiv transzellulär absorbiert werden – sowohl durch die künstlichen Membransysteme als auch durch die physiologischen zellulären Membranen. Ein parazellulärer Transport tritt nicht auf, da für keine Verbindung die Transportrate in PAMPORE höher ist als in PAMPA. In den Fällen, in denen die Aufnahme im Caco-2 Modell besser war, kommen entweder zusätzlich aktive Transportaspekte zum Tragen, oder der Effekt wird durch die unterschiedliche Morphologie der Membranen verursacht.

5.3 Fazit des Projektes

Für die untersuchten Substanzklassen wäre prinzipiell ein Hochdurchsatzscreening größerer Bibliotheken zur Selektion der besten Kandidaten anhand des minimalistischen Modells PAMPA möglich. Um genauere Informationen über die potentielle perorale Verfügbarkeit dieser „hits“ zu bekommen, wäre es dann allerdings sicherer, vor einer in vivo-Testung die Transporteigenschaften dieser kleineren Substanzmenge im komplexeren Caco-2 Test nochmals zu überprüfen. Die beste Selektion erfolgt dann in vivo im generell verwendeten Rattenmodell, da dies die höchste Ähnlichkeit zum Menschen besitzt [Chiou et al., 2000].

Zusammenfassung

1 Etablierung und Optimierung des Caco-2 Modells und der LC/MS/MS-Analytik der Proben des Systems

Während dieser arbeitskreisintern projektübergreifenden Arbeit wurden präklinische Studien in vitro und in vivo durchgeführt, um Arzneistoffkandidaten für die klinische Prüfung zu entwickeln.

Die hauptsächliche Thematik war dabei die Vorhersage der peroralen Bioverfügbarkeit verschiedener Wirkstoffklassen, wozu vornehmlich das generell akzeptierte Caco-2 Modell verwendet wurde [Artursson et al., 2001]. Die Analyse der biologischen Proben erfolgte hauptsächlich per LC/MS, die als Technologie der Wahl für die meisten Studien während der Arzneistoffentwicklung eingesetzt wird [Korfmacher et al., 2005]. Das traditionelle Caco-2 Modell und das analytische Verfahren sowie die dazugehörige, adäquate Probenaufarbeitung mussten dazu zunächst im Arbeitskreis etabliert und validiert werden. Dies gelang hinsichtlich der Caco-2 Tests mit Hilfe von Referenzsubstanzen bekannter Transporteigenschaften bei den analytischen Messungen durch den Einsatz von Standards und Qualitätskontrollen.

Nachdem die anzuwendenden biologischen und analytischen Methoden prinzipiell etabliert waren, wurden sie noch optimiert. Ein Aspekt hierbei war die Erhöhung des Probendurchsatzes, sowohl im Bereich der Testung als auch in der Analytik. Der Caco-2 Durchsatz an Forschungsverbindungen konnte durch die Etablierung eines „multiple dosing approachs“ für die Referenzsubstanzen verdreifacht werden. Auch die Analyse der Caco-2- Proben konnte verbessert werden. Einerseits wurde eine Schaltventilmethode zur online-Entsalzung entwickelt; andererseits wurden mehrere Verbindungen per „multiple reaction monitoring“ parallel quantifiziert. Beides erspart ein hohes Maß an Messzeit. Außerdem war hierdurch die Probenaufarbeitung weniger aufwendig und es mussten weniger Kalibrierfunktionen gemessen werden. Weitere Optimierungen wie die Erhöhung der Inkubationsdauer im Caco-2 Test von 1h auf 3h zur besseren Nachahmung der gastrointestinalen Verweildauer lipophiler Verbindungen, sowie die Reduktion der Kulturdauer der Caco-2 Zellen von 21 Tagen auf 10 Tage zur Erhöhung der Testflexibilität konnten ebenfalls erreicht werden.

2 5 α -Reduktase-Projekt

Die 5 α -Reduktase (5 α R) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese des potentesten humanen Androgens- Dihydrotestosteron (DHT). Dessen irreversible Synthese aus Testosteron wird durch zwei Isoenzyme (Typ1 und Typ2) der 5 α R katalysiert, die gewebespezifisch verteilt auftreten. 5 α R1 wird primär in der Peripherie exprimiert, wohingegen 5 α R2 hauptsächlich in der Prostata vorkommt. Zur Therapie von Benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom sollten beide Isoenzyme gehemmt werden, da hierdurch die DHT-Spiegel am stärksten abgesenkt werden können, was sich in der Klinik durch den Einsatz dualer Inhibitoren als am effektivsten erwiesen hat [Bramson et al., 1997]. Der Nachteil dieser Arzneistoffe sind auf ihrer Struktur basierende, steroidale Nebenwirkungen. Daher wurden im Arbeitskreis neue, nichtsteroidale Inhibitoren der 5 α R1 und der 5 α R2 entwickelt [Dissertation Picard, 2002; Dissertation Razek, 2003]. Dabei wurde basierend auf experimentellen Ergebnissen ein völlig neuer therapeutischer Ansatz- das Hybridkonzept- etabliert [Dissertation Streiber, 2006]. Es beruht auf der selektiven Hemmung beider Isoenzyme durch Applikation eines Hybridinhibitors in Form eines Esters (selbes Molekül dient als Drug und Prodrug; Substanzklasse s. Ergebnisse: „Leitstruktur II“). Dazu soll der Ester in der Peripherie appliziert werden, wo er möglichst stabil bleiben und das verstärkt exprimierte Isoenzym Typ1 potent hemmen soll. Außerdem soll er in die Prostata gelangen können und intrazellulär seine korrespondierende Säure als hochpotenten Inhibitor des dort verstärkt exprimierten Isoenzym Typ 2 freisetzen. Voraussetzungen zur Realisierbarkeit des Konzeptes wären also gewebespezifische Stabilität und Permeabilität der Verbindungen. Der Vorteil des Konzeptes bestünde darin, dass wie bei den dualen Inhibitoren nur einmal die Kinetik optimiert werden müsste und nur einfach klinische Studien durchgeführt werden müssten. Zusätzlich wäre aufgrund der hohen Selektivität der nichtsteroidalen Verbindungen auch das Nebenwirkungspotential geringer.

Zur Evaluierung des Hybridkonzeptes wurden verschiedene in vitro-Modelle verwendet. Da zudem die perorale Applizierbarkeit der Ester erstrebenswert wäre, wurde ihr Transport im Caco-2 Modell untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Ester gering permeabel waren, wohingegen ihre korrespondierenden Carbonsäuren gut aufgenommen wurden, was vermutlich auf einen aktiven Transportmechanismus zurückgeht (z.B. Monocarbonsäuretransporter [Hidalgo et al., 1996]). Die

Permeabilität der Ester im Caco-2 Modell konnte jedoch mit Hilfe von Cyclodextrinen (Absorptionsverbesserer für lipophile Verbindungen) bzw. Strukturmodifikationen zur Absenkung der Lipophilie stark verbessert werden. Es wäre also durchaus möglich, die Ester peroral verfügbar zu machen. Die Art und Konzentration der Cyclodextrine wäre dazu zwar noch zu optimieren, es spräche allerdings nichts gegen ihren Einsatz, da sie schon umfassend in Kosmetika, Lebensmitteln und Arzneistoffen (z.B. Brexidol[®]) verwendet werden.

Da die perorale Bioverfügbarkeit der Ester im System aber außer von ihrer Membrangängigkeit auch von ihrer Stabilität während der gastrointestinalen Passage und in der Peripherie abhängt, wurde diese an Caco-2-Monolayern und -Homogenat sowie in humanem Plasma untersucht. Die meisten Verbindungen waren in diesen in vitro- Modellen sehr stabil, und könnten somit voraussichtlich einen gastrointestinalen first pass-Metabolismus überstehen und in der Peripherie die 5 α R1 hemmen. Außerdem setzen die Ester in den Modellen der Prostata (DU145-Zellen und humanes BPH-Homogenat) ihre korrespondierenden Säuren frei, die somit im Targetorgan verfügbar wären, um hochpotent die 5 α R2 zu hemmen.

Somit wären grundlegend alle Voraussetzungen für eine Realisierung des Hybridkonzeptes erfüllt, da die Ester sowohl über biologische Membranen absorbiert werden können, als auch gewebespezifisch stabil bzw. instabil sind.

3 17 β -HSD1-Projekt

Die 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase1 (17 β -HSD1) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese des potentesten humanen Estrogens Estradiol (E2) aus Estron (E1). Da in der Therapie estrogenabhängiger Erkrankungen (wie z.B. Mammakarzinom und Endometriose) die Absenkung der Estradiolspiegel erfolgreich ist, wurden im Arbeitskreis nichtsteroidale, hochselektive 17 β -HSD1-Inhibitoren entwickelt. Die Rückreaktion von E2 zu E1 durch das hochhomologe Isoenzym 17 β -HSD2 soll nicht gehemmt werden, um den Abbau von bereits im Targetgewebe vorhandenem E2 zu ermöglichen. Entscheidende Vorteile dieser Verbindungen gegenüber den traditionell eingesetzten Aromatasehemmern wären ihr geringeres Nebenwirkungspotential und ihre prämenopausale Einsetzbarkeit.

Da auch bei diesen Verbindungen die perorale Applizierbarkeit erwünscht wäre, wurde zunächst die Permeabilität von 21 hochpotenten, heterogenen Verbindungen im Caco-2 Modell untersucht und als gut prognostiziert. Diese Vorhersage erfüllte sich dann aber nur bedingt in dem komplexeren Rattenmodell, in dem die perorale Kinetik der beiden im Gesamtprofil besten Kandidaten näher untersucht wurde. Diese wiesen nach peroraler Applikation nur ein mittelgutes kinetisches Profil auf. Die Anflutung (t_{max}) und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) waren günstig, die AUC war jedoch nur mittelmäßig. Dies ist eventuell auf komplexere, multiple Transportwege in vivo oder eine relativ hohe Clearance der durchgehend phenolischen Verbindungen zurückzuführen. Um dies näher zu untersuchen, wurde die metabolische Stabilität der beiden Verbindungen an Rattenlebermikrosomen getestet (Phasen-Metabolismus). Hier wurde jedoch nur einer der beiden in vivo- Kandidaten relativ schnell abgebaut; beide besaßen mit Arzneistoffen vergleichbare Stabilität. D.h. die relativ niedrige Verfügbarkeit in vivo könnte auch durch einen für Phenole typischen, schnellen Phase II-Metabolismus (Glucuronidierung, Sulfatierung, Alkylierung, Acylierung) begünstigt werden.

Außerdem wurde die Aufnahme ausgewählter, im zellfreien System hochpotenter 17 β -HSD1-Inhibitoren in MCF7-Zellen getestet. Ein Grund hierfür war die Modellfunktion der Zelllinie als Targetorgan (Mammakarzinom), ein anderer Grund war der starke Aktivitätsverlust der Verbindungen in einem externen Aktivitätstest mit transfizierten MCF7-Zellen, als dessen mögliche Ursache mangelnde Permeabilität untersucht werden sollte. In der hauseigenen untransfizierten MCF7-Zelllinie waren die Substanzen allerdings gut membrangängig. Ihre intrazelluläre Lokalisation im

Zytoplasma und Zellkern konnte durch konfokale Laserscanningmikroskopie nachgewiesen werden, der intrazelluläre Gehalt wurde per LC/MS/MS bestimmt. Der Aktivitätsverlust beruht also entweder auf Unterschieden in der Morphologie der beiden Zelllinien, einem unterschiedlichen Metabolismus (Phase I und II) oder Unterschieden in den Inkubationsbedingungen.

Insgesamt besitzen die Leitverbindungen ein günstiges in vitro- Profil, das allerdings noch weiter optimiert werden muss. Dazu soll zunächst ein hauseigenes zelluläres Aktivitätsmodell etabliert werden, um eventuelle Probleme besser nachverfolgen zu können.

4 CYP11B2-Projekt

Aldosteronsynthese (CYP11B2) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese des potentesten humanen Mineralocorticoids (Aldosteron), das eine Progression der Krankheitsbilder bei Myokardfibrose und Herzinsuffizienz bewirkt. Das Ziel des Projektes war daher die Entwicklung hochselektiver und potenter CYP11B2-Inhibitoren zur Unterbindung der Aldosteronbiosynthese. Wichtig bei den Inhibitoren ist, dass sie nicht das hochhomologe Enzym CYP11B1 hemmen, um starke Nebenwirkungen im Glucocorticoidstoffwechsel zu vermeiden. Die Vorteile dieses komplett neuen Ansatzes gegenüber traditionell eingesetzten Inhibitoren des Mineralocorticoidrezeptors wären das geringere Nebenwirkungspotential und das Durchbrechen des pathophysiologischen Regelkreises von Aldosteron, was ein weiteres Fortschreiten der Krankheitsbilder verhindern würde.

Nachdem es gelungen war, am humanen CYP11B2 Enzym (transfizierte V79-Zellen) hochselektive und hochpotente, nichtsteroidale Inhibitoren zu entwickeln [Ulmschneider et al., 2005; Voets et al., 2005, 2006], sollten diese wiederum auf ihre perorale Verfügbarkeit untersucht werden.

Die Absorption der meisten Verbindungen im Caco-2 Modell war mittel bis hoch, sie waren also geeignete Kandidaten für einen in vivo- Test der peroralen Kinetik. Aus rationalen Gründen wurden sowohl im Caco-2 Test als auch im in vivo- Test am Rattenmodell für die Kinetikstudien „cassette dosings“ verwendet und durch Referenzen validiert, wodurch der Durchsatz stark gesteigert werden konnte. Zahlreiche der Substanzen zeigten auch im in vivo- Test ein sehr günstiges kinetisches Profil, weshalb ein Aktivitätstest in vivo zum „proof of concept“ angestrebt wurde. Da hierfür ebenfalls das Rattenmodell verwendet werden sollte, wurde zur Präselektion von aktiven Substanzen am Rattenenzym ein in vitro- Aktivitätstest an Rattennebenieren etabliert (modifiziert nach Gertrud Grün). Anhand der Ergebnisse dieses Screenings konnte jedoch keine Aussage über die Potenz der Forschungssubstanzen am Rattenenzym getroffen werden, da die parallel getestete Referenz Fadrozol einen viel schlechteren Hemmwert zeigte, als in der Literatur beschrieben. Daher wurde von jeder Verbindungsklasse (Naphthaline [Voets], Indene [Ulmschneider]) der im sonstigen Gesamtprofil beste Kandidat (MV18, SU20A) für eine in vivo- Aktivitätsstudie im Vergleich zu Fadrozol ausgesucht. Nach Applikation der Inhibitoren bei Ratten wurden die Plasmaspiegel von Aldosteron (CYP11B2-Hemmung) und Corticosteron (CYP11B1-Hemmung) über acht Stunden

bestimmt. Durch Fadrozol wurden die Hormonspiegel deutlich abgesenkt, die beiden Forschungsverbindungen zeigten jedoch keinen signifikanten Effekt, was vermutlich auf die Interspeziesunterschiede der Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 zurückgeht. Um dennoch einen Aktivitätsnachweis der ansonsten sehr viel versprechenden Inhibitoren in vivo erbringen zu können, wird zurzeit ein Screeningmodell mit V79-Zellen, die die Rattenenzyme exprimieren, etabliert. Außerdem werden weitere Verbindungsklassen entwickelt.

5 Vorhersage der peroralen Verfügbarkeit heterogener Verbindungen in vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2

Durch den Vergleich der Permeabilitäten in den verschiedenen Modellen sollte überprüft werden, welcher Transportweg für die betreffenden Substanzklassen vorherrschend ist, und ob andere Verbindungen der Substanzklassen somit in einem höheren Durchsatz als bei Caco-2 an einem der künstlichen Membransysteme getestet werden könnten. Da die Substanzen in allen drei Modellen ähnliche Permeabilität zeigten, nutzen sie vermutlich die passiv transzelluläre Route, und es wäre ausreichend, größere Substanzbibliotheken vergleichbarer Struktur in einem der minimalistischen Membranmodelle zu testen. Nach dieser High Throughput-Testung wäre es allerdings sicherer, vor einem in vivo- Test die Eigenschaften dieses präselektierten, kleineren Substanzsets anhand des komplexeren, zellulären Caco-2 Modells zu überprüfen.

1 Establishment and Optimisation of the Caco-2 Model and of the Analytical Procedure LC/MS/MS

In order to develop drug candidates for clinical studies, preclinical studies were performed in vitro and in vivo during this work.

The main objective was to investigate peroral bioavailability of different classes of research compounds. Therefore Caco-2 cells were used as a widely accepted in vitro model for the prediction of peroral absorption [Artursson et al., 2001]. Furthermore HPLC/MS/MS was applied for the examination of most of the biological samples since it is a highly sophisticated analytical technology [Korfmacher et al., 2005].

Before their applicability, the traditional cellular transport model Caco-2 and the adequate analytical procedure including sample preparation had to be established in the group. Additionally both methods were validated- the Caco-2 tests by the use of reference compounds, and the analytical procedure by the use of standards and quality control samples.

After their establishment the biological and analytical methods were optimised regarding sample throughput, incubation time and flexibility of permeability tests. The throughput of research compounds in the Caco-2 tests could be increased by the development of a “multiple dosing approach” for the reference compounds.

Besides, the analyses by HPLC/MS/MS were accelerated by the establishment of an online-sample preparation (desalting) of the Caco-2 samples using a switching valve (divert valve), and by the simultaneous identification and quantification of multiple compounds using “multiple reaction monitoring”. Both approaches lead to a strong saving of time required for analyses.

Further improvements concerned the traditional Caco-2 system. The incubation time in the biological system could be extended from one to three hours leading to a better mimesis of the physiological gastrointestinal passage of lipophilic compounds. Furthermore culturing time of Caco-2 monolayers could be reduced from 21 down to 10 days to improve flexibility of transport assays.

2 5 α -Reductase-Project

The key enzyme in the biosynthesis of the most potent androgen dihydrotestosterone (DHT) is 5 α -reductase (5 α R). It catalyses the irreversible conversion of testosterone to DHT by two isoenzymes (type 1 and type 2). 5 α R1 is mainly found in the periphery, whereas 5 α R2 is predominantly localised in the prostate gland. Consequently, for the most effective therapy of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate carcinoma (PC) both isoenzymes have to be inhibited, what was proven in clinical studies with dual inhibitors [Bramson et al., 1997]. The disadvantages of these inhibitors were strong side effects related to their steroidal structures. Regarding this, new, nonsteroidal inhibitors of 5 α R1 and 5 α R2 were developed in our group [PhD-thesis Picard, 2002; PhD-thesis Razek, 2003]. Based on later experimental results, a new therapeutic approach- the hybrid inhibition- was conceptualised. The idea of this concept is to inhibit both isoenzymes of 5 α R by the peroral (e.g. peroral) application of a nonsteroidal carboxylic acid ester (see results: lead structure II) acting as a hybrid inhibitor. In the periphery, it should be stable to strongly inhibit 5 α R1. Furthermore the ester should be able to reach and enter the prostate gland yielding its corresponding acid as a potent inhibitor of 5 α R2 inside the target cells. This means that the preconditions for the practicability of this concept are tissue-depending stability and permeability of the esters. The advantages of the hybrid inhibitors are comparable to those of dual inhibitors: preclinical pharmacokinetic and clinical studies would have to be performed just for one compound. Additionally the risk of side effects would be lower for the hybrid inhibitors due to their high selectivity. To evaluate the practicability of the novel strategy and the peroral availability of the hybrid inhibitors different *in vitro*-studies were performed. First the peroral applicability of the esters was tested in the Caco-2 model. Unfortunately, the esters were only absorbed to a small extent, whereas the corresponding carboxylic acids were absorbed to a high extent, which is probably due to an active transport mechanism, which is present in Caco-2 cells (monocarboxylic acid transporters [Hidalgo et al., 1996]). Resolving this problem, esters permeability in the Caco-2 model could be improved by cyclodextrins (as known absorption enhancers for lipophilic compounds) or structural modifications decreasing lipophilicity of the compounds. Consequently esters could be applied by the peroral pathway. Besides

cyclodextrins would be a feasible approach, since they are widely used in cosmetics, food stuff and marketed drugs (e.g. Brexin[®]).

Nevertheless peroral bioavailability of the esters is not only restricted by their permeability, but also by their stability during gastrointestinal transit time and in the periphery. Therefore stability tests in Caco-2 cells and cellular homogenate and in human plasma were performed. We found, that most of the esters were very stable in these in vitro-models, being available for absorption from the gastrointestinal tract and for the inhibition of 5 α R1 in the periphery.

In contrast esters yielded their corresponding acids to a high extent in the target tissue (BPH-homogenate, DU145 cells), which could consequently act as highly potent inhibitors of 5 α R2 in vivo.

Resuming the results all preconditions for the implementation of the hybrid inhibition theory are given, because esters can be absorbed through biological membranes and because they possess tissue-varying stability. Nevertheless peroral absorption remains to be improved.

3 17 β -HSD1-Project

The human 17 β -hydroxysteroiddehydrogenase type1 (17 β -HSD1) is the key enzyme in the biosynthesis of the most potent estrogen estradiol (E2) by estrone (E1). Since the reduction of estradiol concentrations is quite successful in the therapy of estrogen-dependent diseases (e.g. endometriosis, breast cancer) new nonsteroidal inhibitors of 17 β -HSD1 were developed in our group. The reaction of E2 to E1, which is catalysed by the highly homologous isoenzyme 17 β -HSD2, should not be inhibited to guarantee the unhindered degradation of E2 that is present in the target tissue. The main advantages of these inhibitors of 17 β -HSD1 in comparison to traditionally used aromatase-inhibitors (CYP19) are less side effects and premenopausal applicability.

Since 17 β -HSD1-inhibitors should also be applied by the peroral route, Caco-2 permeability of a heterogeneous set of 21 highly potent compounds was investigated and was found to be medium up to high. Therefore the peroral availability of the two best compounds was tested in rats, where it was lower than expected. Absorption (t_{max}) and half-life ($t_{1/2}$) were good, but the AUC-value was only medium. This medium peroral availability of the inhibitors might be due to multiple transport pathways in vivo or to the relatively high clearance rate described for phenolic compounds. In order to elucidate this, metabolic stabilities of the two compounds were tested in rat liver microsomes (phase I- metabolism). One of the compounds was highly stable, the other was rapidly degraded, but the both were as stable as reference drugs. Consequently the relatively low availability of the compounds should be due to a rapid phase II-metabolism of the phenols (glucuronidation, sulfatation, alkylation, acylation).

Besides, the uptake of different highly potent inhibitors of the 17 β -HSD1 was tested using non-transfected MCF7-cells. The cell line served as a model for the target tissue (mama carcinoma cells). Furthermore the uptake should be investigated looking for an explanation for the loss of activity of the inhibitors in an external assay using transfected MCF7-cells.

Surprisingly, cell permeation in the non-transfected MCF7-cells was quite good for the test set. The intracellular localisation (in cytoplasm and nucleus) of different compounds could be shown by confocal laser scanning microscopy; the extent of absorption was quantified by LC/MS/MS. This means, that the loss of activity in the

Summary

- 211 -

external cellular assay could be due to varying morphology of the two MCF7-cell lines, varying metabolism (phase I and II) or varying incubation procedures.

Consequently, the overall profile of the lead structures is very favourable, but there is need for further optimisations. Therefore an appropriate cellular activity assay is being established in the working group.

4 CYP11B2-Project

Aldosterone synthase (CYP11B2) is the key enzyme in the biosynthesis of the most potent human mineralocorticoid aldosterone, that triggers the progression of heart failure and myocardial fibrosis under pathophysiological conditions. Therefore, the aim of this project was to develop highly selective, potent CYP11B2-inhibitors to block the biosynthesis of aldosterone. Additionally the highly homologous enzyme CYP11B1 should not be inhibited to avoid strong side effects in the physiological balance of glucocorticoids. The advantages of this completely new approach in comparison to the traditionally used antagonists of the mineralocorticoid receptor are less side effects and the break of the pathophysiological “circulus vitiosus of aldosterone” preventing a further progression of the diseases.

After we succeeded in the development of highly potent and selective, nonsteroidal inhibitors of CYP11B2 in a transfected V79 cell-model [Ulmschneider et al., 2005; Voets et al., 2005, 2006], the compounds should be tested for peroral availability.

Most of the compounds were well absorbed in the Caco-2 model, making them suitable candidates for an in vivo-elucidation of their peroral pharmacokinetics in rats. In both models rational “cassette dosing” approaches were used, because they lead to a higher sample throughput. The results were verified by reference compounds. Since many inhibitors had good pharmacokinetic properties in vivo, a “proof of concept” was aspired in the rat model. Therefore an in vitro test using rat adrenal glands was established (modified according to Gertrud Grün) in order to preselect compounds with activity against the rodent enzymes. Unfortunately the results of this test could not help to find suitable compounds, because the results for the reference fadrozol differed strongly from literature.

Therefore the two best compounds in other respects were selected (naphthalenes [Voets]: MV18, indenenes [Ulmschneider]: SU20A) to perform activity tests in vivo in comparison to the reference fadrozol. In this context inhibitors were applied in rats and plasma levels of aldosterone (CYP11B2-inhibition) and of corticosterone (CYP11B1-inhibition) were monitored during 8 hours. Fadrozol led to a decrease of the levels of both hormones, the two research compounds had no significant effect, what can be explained by interspecies-differences in the homologies of the enzymes CYP11B1 and CYP11B2.

To reach anyway a “proof of concept” for the very favourable compounds in vivo, studies are in progress to establish activity-screening methods in V79-cells for the rat enzymes. Furthermore new compound classes are being developed.

5 Prediction of Peroral Availability of Heterogeneous Compounds in Vitro: PAMPA, PAMPORE, Caco-2

Comparing permeability results in the different models, the main transport pathway of the different compound classes should be elucidated. If the correlation between the models was high, it would be possible to increase the throughput for further compounds of the same compound classes by using the artificial membrane tests.

Since the permeability ranges were similar in all models, compounds are mainly using the passive transcellular transport pathway, which means that their peroral absorption can be predicted quite well by the very simple and fast PAMPA.

After a high throughput-preselection of compounds using PAMPA, the Caco-2 model should nevertheless be applied for a deeper selection of this smaller compound set before performing in vivo studies.

Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, HPLC-grade	Fisher Scientific (USA)
ACTH ₁₋₂₄ rat	Sigma-Aldrich (München)
BSA-Fraktion V	Sigma-Aldrich (München)
Aldosteron	Sigma-Aldrich (München)
Ameisensäure, p.a.	Sigma-Aldrich (München)
Androstendion	Sigma-Aldrich (München)
Argon	Sigma-Aldrich (München)
Atenolol	Sigma-Aldrich (München)
CaCl ₂	Roth (Karlsruhe)
Carbogen	Sigma-Aldrich (München)
Casy [®] tone	Schärfe System (Reutlingen)
Corticosteron	Sigma-Aldrich (München)
Cyclodextrine	Prof. Wenz, UDS
Diethylether	Sigma-Aldrich (München)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (München)
DMEM (Pulvermedium)	c.c.pro (Neustadt)
DMSO, research grade	Serva (Heidelberg)
EDTA	c.c.pro (Neustadt)
Eisessig	Sigma-Aldrich (München)
Erythromycin	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol	Fisher Scientific (USA)
Ethylacetat	Fisher Scientific (USA)
Diethylether	Fisher Scientific (USA)
Fadrozol	Ciba-Geigy (Basel, Schweiz)
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco-Invitrogen (Karlsruhe)
D(+)-Glucose	Sigma-Aldrich (München)
HBSS-Puffer ohne Phenolrot	c.c.pro (Neustadt)
HEPES	ICN Biochemicals (USA)
Insulin, kristallin, Zinksalz	c.c.pro (Neustadt)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (München)

KCl	Sigma-Aldrich (München)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (München)
Ketoprofen	Sigma-Aldrich (München)
Solutol-HS15	BASF(Ludwigshafen)
Lucifer Yellow (LY) (Di-Kaliumsalz)	Sigma-Aldrich (München)
MgCl ₂	(Roth, Karlsruhe)
MEM-NEAA (100-fach)	c.c.pro (Neustadt)
MES (Natriumsalz)	ICN Biochemicals (USA)
Methanol, HPLC-grade	Fisher Scientific (USA)
Naproxen	Sigma-Aldrich (München)
NaCl	Sigma-Aldrich (München)
NaH ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich (München)
Natriumpyruvat (100-fach)	c.c.pro (Neustadt)
Trypsin/ EDTA (10-fach)	c.c.pro (Neustadt)
Natronlauge	Sigma-Aldrich (München)
Paranitrophenylacetat (PNPA)	Lancaster (USA)
Penicillin 10.000U/ml (Pen)	c.c.pro (Neustadt)
1,3,6-Polytyrosin	Sigma-Aldrich (München)
RPMI 1640 modifiziert (Pulvermedium)	c.c.pro (Neustadt)
Salzsäure	Sigma-Aldrich (München)
Stickstoff	Sigma-Aldrich (München)
Streptomycin 10mg/ml (Strep)	c.c.pro (Neustadt)
Testosteron	Sigma-Aldrich (München)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (München)
Verapamil-HCl	Sigma-Aldrich (München)
Coomassie Brillant Blue G250	Sigma-Aldrich (München)
Ortho-Phosphorsäure (85%)	Sigma-Aldrich (München)

1.2 Zelllinien und Gewebe

1.2.1 Caco-2

Zelltyp	Humanes Adenokarzinom aus Kolongewebe
DSMZ-Nr.	ACC169
Herkunft	Primärer Tumor eines 72-jährigen Kaukasiers, 1974
Referenzen	Fogh et al., J Natl Cancer Inst 58: 209 (1977); Rousset, Biochimie 68: 1035 (1986); Bacher et al., Exp Cell Res 200: 97 (1992)
Vertrieb	Prof. A. Bacher, Technische Universität München

1.2.2 MCF-7

Zelltyp	Humanes Adenokarzinom aus Brustgewebe
DSMZ-Nr.	ACC115
Herkunft	Pleuraeffusion einer 69-jährigen Frau mit metastasierendem Mammakarzinom, 1970
Referenzen	Soule et al., J Natl Cancer Inst 51: 1409 (1973)
Vertrieb	ATCC (HTB 22), Rockville, Maryland, USA

1.2.3 Nebennierenrinden (NNR) von Ratten

Spendertiere	Männliche Wistar-Ratten, Gewicht 235-280g
Herkunft	Janvier, Frankreich
Gewebepräparation	Pharmacelsus CRO, Saarbrücken

1.3 Zellkulturmedien, Puffer und Standardlösungen

1.3.1 Zellkulturmedien

1.3.1.1 DMEM (für Caco-2)

DMEM-Pulvermedium	13,4g,
NaHCO ₃ ,	2,2g (bzw. 3,7g je Charge),
MEM-NEAA	10ml,
Pen/ Strep	10ml,
Aqua bidest	ad 900ml
(pH-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren)	
FKS	100ml steril zugeben

1.3.1.2 RPMI (für MCF-7)

RPMI-Pulvermedium	10,4g,
NaHCO ₃	2,0g,
MEM-NEAA	10ml,
Pen/ Strep	10ml,
Natriumpyruvat	10ml,
Insulin	0,01g
Aqua bidest	ad 900ml
(pH-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren)	
FKS	100ml steril zugeben

1.3.2 Puffer

1.3.2.1 Transportpuffer (für Caco-2)

➤ Apikaler Puffer

0,5M MgCl ₂ *6H ₂ O –Lösung	1ml,
1,25M CaCl ₂ *2H ₂ O–Lösung	1ml,
0,2M MES–Lösung	100ml,
2,5M Glucose–Lösung	10ml,
HBSS ohne Phenolrot	ad 1000ml

(benötigten pH-Wert mit HCl/ NaOH einstellen: Standard ist pH 6,3; danach sterilfiltrieren: pH-Wert erhöht sich auf 6,5)

➤ **Basolateraler Puffer**

0,5M MgCl ₂ *6H ₂ O –Lösung	1ml,
1,25M CaCl ₂ *2H ₂ O–Lösung	1ml,
0,2M HEPES–Lösung	100ml,
2,5M Glucose–Lösung	10ml,
HBSS	ad 1000ml

(benötigten pH-Wert mit HCl/ NaOH einstellen: Standard ist pH 7,2; danach sterilfiltrieren: pH-Wert erhöht sich auf 7,4)

1.3.2.2 PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

KH ₂ PO ₄	0,24g,
KCl	0,2g,
NaCl	8,0g
1,44g Na ₂ HPO ₄	
Aqua bidest.	ad 1000ml

(pH-Wert auf 7,4 einstellen, autoklavieren)

1.3.2.3 KRBG-Puffer (Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glucose für NNR)

[Krebs et al, 1932]

CaCl ₂ *2H ₂ O	0,367g,
KCl	0,208g,
KH ₂ PO ₄	0,163g,
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,295g,
NaCl	6,7g,
NaHCO ₃	2,1g,
D(+)-Glucose	2,0g
Aqua bidest.	ad 1000ml

(pH-Wert auf 7,2 einstellen, danach sterilfiltrieren: pH-Wert erhöht sich auf 7,4;

Aliquots vor Verwendung mit Carbogen begasen)

1.3.3 Standardlösungen

1.3.3.1 Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung

Coomassie Brillant Blue G250	0,1g
Ethanol (99%)	50ml
Ortho-Phosphorsäure (85%)	100ml
Aqua bidest.	ad 1000ml

(in angegebener Reihenfolge mischen, über Nacht rühren, danach filtrieren)

1.3.3.2 Lucifer Yellow- Lösungen (lichtinstabil!)

-Stammlösung: 1mM in Aqua bidest

-Transportlösungen für Caco-2-Tests: 100µM in apikalem Puffer

-Kalibrierlösungen für Caco-2-Tests: 100µM-3,1µM in basolateralem Puffer

(alle Lösungen in Braunglas bzw. in mit Alufolie umwickelten Eppendorff cups bei -18°C lagern)

1.3.3.3 Referenzen für Caco-2-Tests

(alle Substanzen werden standardmäßig im Transporttest in einer Konzentration von 50µM eingesetzt; der DMSO-Gehalt im Caco-2-Test beträgt immer 1%)

➤ Stammlösungen

Atenolol	5mM in apikalem Puffer,
Erythromycin	2,0mM in apikalem Puffer,
Ketoprofen	1,5mM in apikalem Puffer,
Testosteron	5mM in DMSO,
Verapamil-HCl	5mM in apikalem Puffer

1.3.3.4 Lösungen für NNR-Test

➤ Stammlösungen

ACTH	1mg in 1 ml Aqua bidest
CYP11B2-Inhibitoren	10mM in DMSO

1.4 Materialien

1.4.1 Materialien für Zellkultur

Casy [®] -Cups	Schärfe System (Reutlingen)
Deckgläschen, Ø 12mm	(Roth, Karlsruhe)
Eppendorf cups: 1,5-2ml	Eppendorf (Hamburg)
Falcons: 15, 50ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Kryoröhrchen (Cryoline [™])	Nunc International (Wiesbaden)
Membranfilter ME24	Schleicher und Schüll (Dassel)
Einwegküvetten	Eppendorf (Hamburg)
Immersionsöl	Carl Zeiss GmbH (Jena)
Objektträger: 76*26mm	Menzel-Gläser (Wiesbaden)
Sterilfiltereinheit (Express [™] plus: 0,22µm)	Millipore (Eschborn)
Zellkulturflaschen: 25 cm ² (Cellstar [®])	Greiner Bio One (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen: 80 cm ² (Nunclon [™] ΔSurface)	Nunc International (Wiesbaden)
Zellkulturschalen: 60, 90mm (Nunclon [™])	Nunc International (Wiesbaden)
Transwell [®] Platten (12mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, 12 wells, PC-Membran, PS-Platte)	Corning incorporated Costar [®] (USA)
6-well-Platten mit Deckel (Nunclon [™])	Nunc International (Wiesbaden)
12-well-Platten mit Deckel (Nunclon [™])	Nunc International (Wiesbaden)
24-well-Kulturplatten mit Deckel (Nunclon [™])	Nunc International (Wiesbaden)
Wasserwaage (Durchmesser 3cm- rund)	Nunc International (Wiesbaden)

1.4.2 Materialien für Analytik

96-well-Fluotrac-Platten	Nunc International (Wiesbaden)
HPLC-Vials: 1,5ml:	
Schnapp-und Schraubvials in Braunglas	VWR (Darmstadt)
Mikroeinsätze für HPLC-Vials. 150µl	VWR (Darmstadt)
Röhrchen für Gamma-Counter	VWR (Darmstadt)
RIA-Aldosteron	DRG (Marburg)
RIA-Corticosteron (Ratte/Maus)	DRG (Marburg)

HPLC-Säulen:

Nucleodur® EC50/3-100-3-C18ec

Nucleodur® EC50/3-125-2-C18ec

Nucleodur® C18ec, 100-3(2)*30mm

Macherey-Nagel (Düren)

Macherey-Nagel (Düren)

Vorsäulen für die HPLC:

Nucleodur® CC8/3-100-3-C18ec

Oasis HLB Kartuschen (SPE)

Macherey-Nagel (Düren)

Waters (Eschborn)

1.4.3 Geräte

Axiovert 24 Umkehrmikroskop

Casy® Modell TT (Zellcounter)

(150µm Kapillare)

Zeiss (Jena)

Schärfe System

(Reutlingen)

Feinwaage SBC21

Holten LaminAir Sterilbank

Scaltec (Heiligenstadt)

Heto-Holten (Allerød,

Dänemark)

LC-MS-MS:

Surveyor® Autosampler,

Surveyor® HPLC-System,

TSQ-Quantum® (ESI, APCI)

Thermo Electron Co.

(San Jose, USA)

LKB-Wallac-CliniGamma (γ-Counter)

Millipore Q plus Reinstwasseranlage

pH-Meter 766

Schüttelinkubator (Unitron 25)

Speed Vac Concentrator 5301

UV/VIS-Spektralphotometer Helios-beta

Wallac (Turku, Finnland)

Millipore (Eschborn)

Knick (Berlin)

Infors (Stuttgart)

Eppendorf (Hamburg)

Unicam, Thermo-Spectronic

(Neuss)

Wallac 1420 Victor²Multilabel Counter

Zellkulturinkubatoren Biosafe

Zentrifugen:

Micro24-28 R Tischzentrifugen

Universal 30 RF Zentrifugen

Perkin Elmer (Rodgau-

Jügesheim)

Revco (Ashville, USA)

Hettich GmbH (Tuttlingen)

(8-fach Ausschwingrotor 1617, 30-fach Winkelrotor 1653) Freezing Container (Cryoline™)	Hettich GmbH (Tuttlingen) Nunc International (Wiesbaden) Jügesheim)
Kryobehälter Air Liquide GT50	Kryotechnik GmbH (Düsseldorf)
EVOM™ Epithelial Voltohmmeter	WPI (Berlin)
Ultraschallbad Sonesorex RK106 Transistor	Bandelin Electronic (Berlin)
Ultraschallstab Bandelin Sonopuls HD60	Bandelin Electronic (Berlin)
Vialzangen (zum Schließen/ Öffnen)	VWR (Darmstadt)
Wasserbad	Nunc International (Wiesbaden)
Wasserbadschüttler (waagrecht, beheizt)	Nunc International (Wiesbaden)
Biorad CLSM, Typ MSC 1024	
Konfokales Laserscanningmikroskop	Zeiss (Jena)

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Herstellung der Kulturmedien

Die verwendeten Pulvermedien wurden nach Zusatz der vom Hersteller angegebenen Menge an NaHCO_3 in einem Teil des insgesamt benötigten Volumens an Aqua bidest gelöst (in Messzylindern auf Magnetrührern). Danach wurden sie mit weiteren Zusätzen, wie nicht essentiellen Aminosäuren (MEM-NEAA), Penicillin/Streptomycin, Natriumpyruvat, oder Insulin (schon vorgelöst!) versetzt. Das Volumen wurde bei der Herstellung mit Aqua bidest auf 90% des Endvolumens aufgefüllt und der pH-Wert wurde mit HCl/NaOH auf 7,2-7,3 eingestellt. Die klare Lösung wurde dann unter sterilen Bedingungen (Sterilbank, sterile Gefäße, Absaugvorrichtung mit Vakuumpumpe) zur Entfernung von Keimen filtriert. Danach wurden 10% des Gesamtvolumens in Form von FKS steril zugegeben, das bei früherer Zugabe die Poren des Filters verschließen würde. Durch die letzten Arbeitsschritte stieg der pH-Wert auf 7,4 an (Kontrolle anhand eines Aliquots des Mediums per pH-Meter). Das Medium war im Kühlschrank (4°C) für ca. 8 Wochen haltbar (Sichtkontrolle: Bewuchs, Farbe des Mediums (Indikator: Phenolrot)).

2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 5% CO_2 , 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen angezogen. Der konstante CO_2 -Gehalt der Gasphase begünstigt durch ein chemisches Gleichgewicht mit den NaHCO_3 -gepufferten Medien eine weitgehende Konstanthaltung des pH-Wertes während der Zeiträume zwischen den Medienwechseln. Dies ist essentiell für konstante Wachstumsbedingungen und somit für eine relativ gleichmäßige, reproduzierbare Differenzierung der Zellen.

2.1.2.1 Caco-2

Die Caco-2 Zellen wurden in DMEM- Medium kultiviert, das 10% [v/v] FKS und 1% [v/v] Pen/Strep als Schutz vor bakterieller Kontamination enthielt.

Das Wachstum der epithelial adhärenenten Zelllinie verläuft relativ langsam (Verdopplungszeit ca. 80h) und beginnt in Kolonien, die schließlich Monolayer

ausbilden. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert und die Zellen wurden bei 90% Konfluenz alle 5-7 Tage im Verhältnis 1 zu 10 passagiert (nach dem Auftauen maximal 30 Passagen). Da es sich um eine polyklonale Zelllinie handelt, muss man, um identische Zelleigenschaften vorzufinden, Zellen derselben Charge und möglichst ähnlicher Passagen verwenden. Ansonsten muss man zum Vergleich Standards einsetzen.

2.1.2.2 MCF-7

Die MCF-7 Zellen wurden in modifiziertem RPMI- Medium kultiviert, das 10% [v/v] FKS und 1% [v/v] Pen/Strep als Schutz vor möglicher bakterieller Kontamination enthielt.

Das Wachstum der epithelial adhärennten Zelllinie verläuft relativ schnell (Verdopplungszeit ca. 30-70h) und beginnt in Kolonien, die schließlich Monolayer ausbilden. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert und die Zellen wurden bei 90% Konfluenz alle 2-6 Tage im Verhältnis 1 zu 4 passagiert (nach dem Auftauen maximal 30 Passagen).

2.1.3 Passagieren der Zellen

Alle Abläufe erfolgten unter steriler Arbeitsweise mit auf 37°C vortemperierten Lösungen.

2.1.3.1 Caco-2

Um die Caco-2 Zellen (nachdem sie ca. 90% Konfluenz erreicht hatten) zu passagieren, wurde das vorhandene Inkubationsmedium steril abgesaugt. Dann wurden die Zellen zweimal mit einfachem PBS-Puffer gewaschen– das jeweilige Waschvolumen entsprach dem Volumen des Kulturmediums (je nach Größe der Inkubationsgefäße: 2*6ml für 25cm², 2*15ml für 80cm²). Im Anschluss wurden die Zellen, um sie von ihrem Untergrund abzulösen, mit Trypsin/EDTA- Lösung versetzt (0,05% Trypsin; 0,53mM EDTA-Na in PBS: 3ml pro 80cm²) und für ca. 10 min in den Brutschrank (5% CO₂, 37°C) gestellt. Das Ausmaß der Ablösung konnte mikroskopisch kontrolliert werden, da es sich durch eine abgerundete Morphologie der Zellen bzw. das Schwimmen der Zellen in der Lösung zeigt. Um die abgelösten Zellen aus dem ursprünglichen Kulturgefäß zu gewinnen, wurden sie mit Medium

abgespült und darin aufgenommen (25ml pro 80cm²). Dieses trypsinhaltige Medium wurde nun schnellstmöglich von den Zellen entfernt, da sie sonst geschädigt werden bzw. absterben. Dies geschah durch Abzentrifugieren der Zellen bei 420g (1650rpm) für 5min bei 37°C. Der Zellüberstand wurde steril abgesaugt und die Zellen wurden in frischem Medium durch mehrfaches, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resolubilisiert (ohne Schaumbildung!). Nach Verdünnen mit Medium wurden die Zellen maximal im Verhältnis 1 zu 10 gesplittet und auf die benötigte Anzahl an Kulturgefäßen aufgeteilt.

2.1.3.2 MCF-7

Die MCF-7 Zellen wurden nach demselben Verfahren wie die Caco-2 Zellen gesplittet. Es bestanden jedoch einige wichtige Unterschiede. Die Monolayer wurden nicht mit PBS gewaschen. Außerdem wurden die Zellen maximal für 5min abtrypsiniert. Die Zellen wurden außerdem maximal im Verhältnis 1 zu 6 passagiert.

2.1.4 Kryokonservierung der beiden eukaryotischen Zelllinien

Je nach Bedarf wurde die entsprechende Menge an Zellen angezogen und aus ihren Kulturgefäßen abtrypsiniert (siehe „Passagieren der Zellen“). Die Zellen wurden aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert (5min, 420g) und der Überstand wurde abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wurde dann in frischem Medium resolubilisiert und die Zellzahl wurde elektronisch per Zellcounter bestimmt.

Danach wurde das Medium erneut abzentrifugiert und die Zellen wurden in der benötigten Menge an eisgekühltem Einfriermedium gelöst. Dieses Medium bestand aus 70% Kulturmedium, 10% DMSO als Gefrierschutz und 20% FKS. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1-1,5 Millionen Zellen pro Milliliter eingefroren, wobei jedes Kryoröhrchen mit ca. 1,5ml Zellsuspension befüllt wurde. Die sterilen Kryoröhrchen wurden zuvor mit Bleistift beschriftet (Zelltyp, Quelle, Passage, Einfrierdatum, Operator-ID) und auf Eis gekühlt. Nach dem Befüllen wurden sie möglichst zügig in einem auf 4°C vortemperierten, mit 100%-igem Isopropanol gefüllten Nalgene- Freezing Container (Nunc) über Nacht bei -70°C eingefroren (Röhrchen noch nicht fest zugekehrt). Diese Methode soll das allmähliche, kontrollierte Einfrieren der Zellen und damit das langsame Eindringen des DMSO in die Zellen gewährleisten. Am nächsten Morgen (nach 12h) wurden die Kryoröhrchen

sofort in den Kryotank überführt (Röhrchen fest zuge dreht), wo sie jahrelang bei -196°C in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff gelagert werden können. Diese Konservierung in der Kältestarre verhindert das Ablaufen jeglicher biologischer Prozesse und die Zellen können bei Bedarf wieder in ihrem ursprünglichen Zustand aufgetaut und kultiviert werden.

2.1.5 Auftauen der beiden eukaryotischen Zelllinien

Die Zellen wurden in normalem Kulturmedium aufgetaut, die Verwendung eines speziellen, teureren Auftaumediums (40% FKS, 60% Kulturmedium) war nicht nötig. Zum Auftauen der Zellen wurde Kulturmedium im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Unmittelbar vor Entnahme von Kryoröhrchen aus dem Kryotank wurde das benötigte Volumen an temperiertem Kulturmedium steril vorgelegt (10-faches Volumen des Einfriervolumens), um die kritische Auftauphase möglichst kurz zu halten. Die Kryoröhrchen wurde dann aus dem Tank entnommen und sofort möglichst kurz im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Dazu wurden sie von Hand im Wasserbad geschwenkt bis nur noch ein kleiner Eisklumpen übrig war (ca. 30sec bis 1min: Medium wechselt Farbe von Gelb (gefroren) zu Rosa (aufgetaut)). Es wurde nicht mit „Schwimmern“ ins Wasserbad eingetaucht, da sich die Dichtung der Kryoröhrchen während des Auftauens verschieben kann, und so eventuell Wasser in die Röhrchen eindringen könnte, was zu Kontaminationen führen würde.

Sofort nach dem Auftauen wurde der Inhalt der Kryoröhrchen mittels einer Pipette steril in das entsprechende vorgelegte Auftaувolumen überführt und die Zellen wurden zügig 5min bei 420g, 37°C abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in frischem Medium resolubilisiert und auf Kulturgefäße verteilt (1 Kryoröhrchen auf 80 cm² in 15ml Medium: ca. 1,5-2,25 Millionen Zellen).

Unmittelbar nach dem Auftauen ist die Zellteilungsrate der Zellen geringer als nach mehrfachem Passagieren, da sie je nach Zelllinie eine gewisse Regenerationsphase nach der Kältestarre benötigen (3-7 Tage). Sind die Zellen jedoch morphologisch verändert oder sterben zu viele ab, sind beim Einfrieren oder Auftauen Probleme aufgetreten. Die Passage/ Charge ist dann zu verwerfen.

2.1.6 Zellzahlbestimmung

2.1.6.1 Elektronische Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des Casy®TT-Zellcounters, der auch zur Bestimmung von Aggregationsgrad und Vitalität der Zellen dient. Das Verfahren der Partikelbestimmung beruht auf der Widerstandsmessung gekoppelt mit der Signalauswertung per Pulsflächenanalyse, wonach Zelltrümmer (Debrisanteil) von ganzen Zellen (tot oder lebendig) unterschieden werden können. Dazu wird an einer Messkapillare mit definiertem Durchmesser (für Eukaryonten: 150µm), die mit konstantem Fluss von einer isotonen Elektrolytlösung (Casy®ton) durchspült wird, ein Niederspannungsfeld angelegt. Dieses System besitzt einen definierten Widerstand, der sich ändert, wenn durch eintretende Partikel (ganze Zellen, Trümmer), ein bestimmtes Volumen der isotonen Elektrolytlösung verdrängt wird. Diese Widerstandsänderung wird dann per Pulsflächenanalyse in ein Messsignal übersetzt und kann nach entsprechender Eichung für einen Zelltyp lebende und tote Zellen (hier stellt die Zellmembran keine intakte elektrische Barriere mehr da, d.h. nur die Größe des Zellkerns wird erfasst), sowie Zellaggregate und Trümmer differenzieren. Bei dieser Eichung werden die Größenbereiche für zwei Evaluierungs- (Auswerte-) und zwei Normierungscursor festgelegt (s. Abbildung 1 „Darstellung im Zellcounter“).

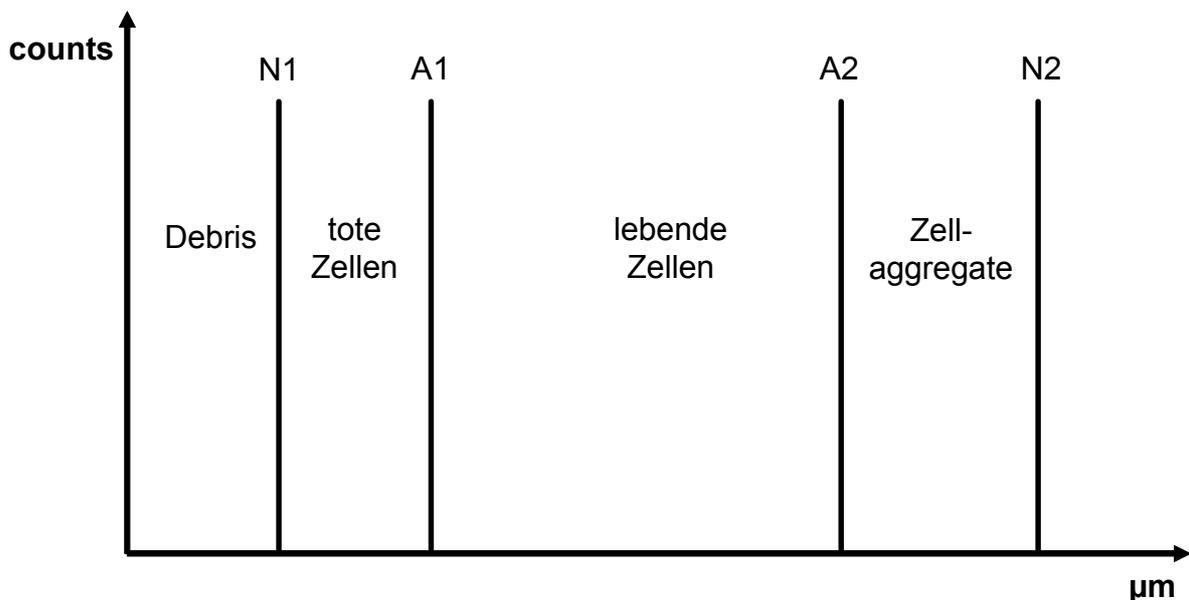


Abbildung 1: Darstellung im Zellcounter

A: Auswertecursor (Evaluierungscursor), N: Normierungscursor

Rechter und linker Evaluierungscursor bestimmen, welcher Bereich der Größenverteilung zur Berechnung der Messergebnisse verwendet wird. Bei allen Prozentberechnungen (% Vitalität, % Counts, % Volumen) definieren die Auswertecursor den Größenbereich, für den der prozentuale Anteil bezogen auf den Normierungsbereich (siehe Normierungscursor) berechnet wird. Rechter und linker Normierungscursor bestimmen den Bereich der Größenverteilung, der bei allen Prozentberechnungen (% Vitalität, % Counts, % Volumen) die 100% definiert. Außerdem wird der Größenbereich zur Ermittlung des Debris-Anteils verwendet. Links des linken Normierungscursors liegt der Debris-Anteil, zwischen linkem Normierungscursor und linkem Auswertecursor befindet sich der Anteil der toten Zellen. Zwischen linkem und rechtem Auswertecursor liegen die vitalen Zellen, gefolgt von den Zellaggregaten zwischen rechtem Auswertecursor und rechtem Normierungscursor.

Die Zellzahl von Caco-2 und MCF-7 Zellen wurde durch Zugabe von 100µl Zellsuspension in Medium oder Puffer zu 10ml Casy[®]tone- Lösung und anschließender Messung bestimmt. Die Position der Cursor wurde dazu wie in Tabelle 1 beschrieben gesetzt.

Organismus	Kapillare	Evaluierungscursor	Normierungscursor
Caco-2	150µm	13,38-40µm	8,38-50µm
MCF-7	150µm	11,75-40µm	6,75-50µm

Tabelle 1: Eichung des Zellcounters

2.2 Handling der Rattenebennieren (NNR)

Die verwendeten Nebennieren stammten von männlichen Wistar-Ratten. Diese wurden unmittelbar vor der Organentnahme getötet. Die Organe wurden sofort in eisgekühlten KRBG-Puffer überführt (ca. 10ml Puffer für 12 Nebennieren) und möglichst schnell weiter verarbeitet und zur Testung eingesetzt. Sie wurden nicht mit flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder zur Testung bei Raumtemperatur aufgetaut, sondern stets frisch verwendet, da durch den Auftauvorgang Enzymaktivität verloren geht.

Zur in vitro-Testung der Hemmung der Aldosteron- und Corticosteronbildung wurden die Nebennieren mittels eines Skalpells auf mit eiskaltem KRBG-Puffer getränktem Filterpapier auf einer Glasplatte geachtelt. Anschließend wurden die Organteile gepoolt, so dass immer acht Achtel verschiedener Organe pro Inkubationsansatz kombiniert wurden.

Das Schneiden erfordert einige Übung, da die Organe sehr klein sind und je nach Zustand relativ weich werden. Man sollte deshalb möglichst zügig vorgehen und immer unter Eiskühlung arbeiten. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Organe ohne das äußere Bindegewebe und anhängendes Fett verwendet werden, da es sonst später bei der Korrelation von Gewicht und Aktivität zu erheblichen Schwankungen kommt.

2.3 Analytische Messverfahren

2.3.1 LC/MS/MS

2.3.1.1 Optimierung der Massenspektrometrie

Allgemeiner Hinweis:

Für alle massenspektrometrischen Optimierungen wurden generell Lösungen in einem Konzentrationsbereich von etwa 100 micromolar hergestellt; die Injektion ins System erfolgte per Spritzenpumpe mit einem Fluss von ca. 20µl pro Minute

➤ **Massenkalibrierung mit 1,3,6-Polytyrosin im Bereich von 30-1400 Da**

Um die optimale Leistung des TSQ-Quantum[®] zu erzielen, wird das Gerät monatlich mit 1,3,6-Polytyrosin kalibriert. Dabei wird automatisch die Selektivität und Sensitivität der Messung verbessert, da die Geräteparameter (wie z.B. Linseneinstellungen, Spannungen, Gasdrücke) anhand der Kalibrierlösung bestmöglich eingestellt werden. Dieser „Tune“ erfolgt sukzessive im unteren (L-Tyrosin (C₉H₁₁NO₃): 181,19 Da), mittleren (L-Tyrosin-Trimer (C₂₇H₂₉N₃O₇): 507,55 Da) und oberen Massenbereich (L-Tyrosin-Hexamer (C₅₄H₅₆N₆O₁₃): 997,08 Da). Dadurch wird sichergestellt, dass z.B. bei Identitätsbestimmungen nicht durch Abweichung der Massenskala falsche Molekulargewichte gemessen werden.

➤ **Substanzspezifische Optimierung der MS-Geräteparameter**

Um die ideale Detektion eines speziellen Moleküls zu erreichen, wird das TSQ-Quantum[®] nach erfolgreicher Massenkalibration mit Polytyrosin auf die Messung der nachzuweisenden Substanz optimiert, indem verschiedene Geräteparameter automatisch spezifisch für diese Substanz eingestellt werden.

Die wesentlichen Parameter, die verändert werden sind bei der Elektrosprayionisation (ESI) spray voltage, sheat gas pressure, auxiliary valve flow, capillary temperature, tube lens offset, collision pressure und collision energy. Bei der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) variiert man discharge current, vaporiser temperature, sheat gas pressure, auxiliary gas pressure, capillary temperature, tube lens offset, collision pressure und collision energy.

Um konstante, reproduzierbare Messungen durchführen zu können, sollten alle Parameter innerhalb gewisser Richtlinien liegen (s. Tabelle 2 „Richtlinien für Messparameter per LC/MS“). Ob die Ionisation besser per ESI oder per APCI abläuft, hängt von den Moleküleigenschaften ab (Polarität), es gibt allerdings eine große Schnittmenge zwischen beiden Methoden. Häufig sind eher polare Verbindungen wie Amine, Peptide und Proteine besser per ESI ionisierbar-unpolarere Verbindungen wie Steroide per APCI.

ESI (Spray-Spannung: 3- 4,5kV; HPLC-Säulendurchmesser: 1- 4,6mm)			
HPLC- Fluss [µl/min]	Temperatur der Ionen- transfer- kapillare [°C]	Druck des „Sheat Gas“ [psi]	Druck des “Auxiliary Gas” [arbitrary units]
50- 100	250- 350	10- 30	5- 10
200- 400	300- 350	20- 40	10- 20
>400	350	30- 60	15- 40
APCI (Corona Entladung: 5µA; Vaporisationstemperatur: 400- 550°C)			
HPLC- Fluss [µl/min]	Temperatur der Ionen- transfer- kapillare [°C]	Druck des „Sheat Gas“ [psi]	Druck des “Auxiliary Gas” [arbitrary units]
200- 2000	200- 250	30	0- 5

Tabelle 2: Richtlinien für Messparameter per LC/MS

➤ **Wahl der zu detektierenden Masse**

Generell versucht man bei ESI oder APCI die Messparameter auf den Molpeak der jeweiligen Verbindung zu optimieren, da dieser aufgrund der Sanfttheit der beiden Ionisationsmethoden meist charakteristisch und intensiv im Massenspektrum auftritt. Die detektierte Masse entspricht dabei dem Molekulargewicht ± 1 Dalton, also je nach Substanzeigenschaften und Polarität des Messmodus dem Molekulargewicht $\pm H^+$ (Kation $(M+H^+)^+$ oder Anion $(M-H^+)^-$). Falls jedoch eine andere Masse (z.B. Fragmente instabiler Moleküle, oder Addukte mit Matrixkomponenten, mehrfach geladene Moleküle) eine deutlich bessere Ionisationsausbeute besitzt als der Molpeak, werden die Geräteparameter auf diese optimiert. Die endgültige Entscheidung über die Wahl der molekülspezifischen Masse zur Analyse einer unbekannt Probe, hängt letztendlich von dem jeweiligen analytischen Ziel ab – höchste Selektivität oder bestmögliche Sensitivität. Außerdem wird die Wahl der Masse natürlich auch von der Polarisierung des Massenspektrometers beeinflusst. Je nach Art der funktionellen Gruppen eines Moleküls kann es sowohl im positiven als auch im negativen Modus vermessen werden, allerdings ist die Ionisierungsausbeute normalerweise unterschiedlich. Folglich wird im jeweils geeigneteren Modus vermessen, also werden entweder Anionen oder Kationen des Moleküls detektiert (qualitativ und quantitativ).

Bei Molekülen, die schlechte Fragmentierungseigenschaften besitzen, ist das Detektionslimit im SIM-Modus (nur parent ion) zumeist besser als im SRM-Modus, in dem wiederum die Selektivität höher ist (parent and product ion).

➤ **Ionisationseffizienz: Matrixeffekte und Ionisierungsadditive**

Da die Ionisationsausbeute und das Massenspektrum stark von Matrixeinflüssen abhängen, wird generell die erste Substanzoptimierung in Methanol oder Acetonitril (unterschiedliche Effizienz der Ionisierung je Molekülstruktur: polar protisch, polar aprotisch) vorgenommen. Man verwendet zunächst keine wässrige Lösung, da hier das Ergebnis des Elektrosprays im Allgemeinen schlechter ausfällt. Die nächste Optimierung erfolgt dann in der meist biologischen Matrix der Substanz (in derselben Konzentration). Die Unterschiede in der Detektion zwischen beiden Matrices werden dann beim Nachweis der Substanz aus den biologischen Proben berücksichtigt, und es wird im Bedarfsfall eine geeignete Methode der Probenaufarbeitung vor ihrer Analyse per LC/MS/MS angewandt. Hierbei handelt es sich z.B. um

Festphasenextraktionen, Flüssig-Flüssig-Extraktionen oder Schaltventilmethoden. Bei allen Aufarbeitungen soll sowohl der Gehalt an oberflächenaktiven Stoffen (Tenside), Salzen und Proteinen reduziert werden; außerdem soll die Wiederfindungsrate der Analyten möglichst hoch sein.

Diese störenden Einflüsse des Hintergrundes sind bei ESI höher als bei APCI, da im ersteren Fall die Ionenbildung bereits teilweise in der flüssigen Phase erfolgt, wohingegen sie bei der chemischen Ionisation allein in der Gasphase abläuft. Dieser Unterschied eröffnet bei ESI allerdings auch die Möglichkeit, durch Wahl von Lösungsmittelzusätzen die Ionisierungsausbeute drastisch zu erhöhen. Solche Additive (modifier) sind je nach Polarisierung des Spektrometers z.B. Ammoniumacetat, Ammoniumformiat, Eisessig, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Ammoniumhydroxid, Ammoniak, oder Triethylamin. Wichtig hierbei ist, dass alle Zusätze flüchtig sind und in Konzentrationen unter 100 millimolar (Puffer) bzw. zwischen 0,1 und 1% [v/v] verwendet werden, da sonst das Massenspektrometer beschädigt wird (durch irreversible Niederschläge nichtflüchtiger Pufferkomponenten an den Quadrupolen) bzw. die Ionisation supprimiert werden kann.

2.3.1.2 Optimierung der HPLC- Methode

➤ Anforderungen an die HPLC- Methode

Nachdem eine den Anforderungen entsprechende massenspektrometrische Methode gefunden worden ist, entwickelt man eine geeignete HPLC- Methode. Diese besitzt verschiedene Funktionen.

Ein Gesichtspunkt ist die chromatographische Auftrennung der gelösten Bestandteile einer Probe durch Wechselwirkung mit der festen Phase der HPLC- Säule. Dabei sollen sowohl verschiedene Analyten voneinander getrennt werden, als auch ist es wünschenswert, das Hintergrundrauschen durch zeitversetzte Elution von Matrix und Analyten möglichst niedrig zu halten. Die Trennung der Analyten ist bei UV (PDA)- Detektion essentiell zur Identifizierung von Komponenten, die bei gleicher Wellenlänge absorbieren; bei MS-Detektion ist sie wichtig zur Unterscheidung zwischen Molekülen gleicher Masse (qualitativer Nachweis).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Flüssigchromatographie ist ihr Beitrag zur Gehaltsbestimmung der Analyten, da die reproduzierbare Quantifizierbarkeit von der Peakform im Chromatogramm abhängt (Ziel: Gaußform, schmal, hoch). Innerhalb einer stabilen chromatographischen Methode muss zudem die Elution der Analyten mit konstanter Retentionszeit erfolgen. Außerdem soll die Dauer der chromatographischen Methode natürlich aus analytischen (Verteilung) und rationellen Gründen möglichst kurz sein.

➤ Parameter einer HPLC- Methode

Die Grundlage jeder chromatographischen Methode ist das Verteilungsgleichgewicht der Komponenten einer Probe zwischen der flüssigen und der festen Phase des Systems. Dabei hängt die Lage des Gleichgewichts von den chemisch-physikalischen Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, π -stacking) des Analyten mit der mobilen und der stationären Phase ab, d.h. sie kann durch die Wahl der beiden Phasen reguliert werden. Für polare Verbindungen wählt man generell Normalphasensäulen, für unpolare Verbindungen „Reversed Phase“- Säulen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase aus wässrigen (verschiedene pH- Werte) und organischen Lösemitteln kann während eines chromatographischen Laufs in Form eines Gradienten variiert werden, sie kann aber auch isokratisch gehalten werden. Neben der Polarität beeinflussen auch noch Säulendruck, -kapazität und -temperatur maßgeblich das chromatographische Profil.

2.3.1.3 HPLC-MS- Methoden

➤ Probenaufarbeitungsmethoden

Bei vielen biologischen Proben ist es aufgrund ihrer hohen Komplexität nicht möglich, sie ohne vorherige Probenaufarbeitung per Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie zu vermessen. Die häufigsten Verfahren sind SPE (Festphasenextraktion), LLE (Flüssig-Flüssig-Extraktion) und Proteinausfällung mit anschließender Entsalzung per Schaltventil zu Beginn eines chromatographischen Laufs. Bei allen Methoden sind natürlich die hohe Wiederfindungsrate des Analyten, seine selektive Anreicherung in der Extraktionsmatrix zur guten Detektierbarkeit und preisliche Aspekte von Belang.

Die SPE und die LLE beruhen wie die HPLC auf Verteilungsgleichgewichten zwischen festen und flüssigen bzw. zwischen verschiedenen flüssigen Phasen. Die Proteinausfällung eignet sich nicht zum Nachweis von Proteinen, sondern dient der Denaturierung der die Analyse störenden Proteine der biologischen Matrices. Sie erfolgt meist durch Zusatz organischer Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol) oder organischer Säuren (Trichloressigsäure). Die Entsalzung per Schaltventil erfolgt am einfachsten dadurch, wenn man zu Beginn eines chromatographischen Laufs die Möglichkeit hat, einen hohen wässrigen Anteil an Fließmittel einzusetzen, ohne dadurch die Analyten zu eluieren. Das Salz wird dabei ohne Eintritt in die Ionenquelle in den Abfall geleitet.

➤ Validierung

Wenn ein zum qualitativen und quantitativen Nachweis der gewünschten Verbindungen geeignetes Verfahren entwickelt wurde, muss sichergestellt werden, dass bei seiner Anwendung keine systematischen Fehler unterlaufen. Die häufigsten Methoden hierzu sind der Einsatz interner Standards (IS), externer Standards (ES) und derjenige von Qualitätskontrollproben (QS).

Eine als IS verwendete Verbindung muss möglichst ähnliche Eigenschaften wie der eigentliche Analyt aufweisen; bei heterogenen Substanzgemischen muss man einen Kompromiss zur Wahl des IS finden. Je nachdem, ob der IS bereits vor der Probenaufarbeitung oder erst hinterher zur LC/MS/MS-Analyse zugesetzt wird, nivelliert er sowohl experimentelle als auch messtechnische Ungenauigkeiten. Dazu muss sein Verhalten zuvor allerdings genau untersucht werden; es muss z.B. seine

Wiederfindungsrate im unteren, mittleren und oberen erwarteten Konzentrationsbereich der Proben bestimmt werden.

Externe Standards (ES) können als Verdünnungsreihen in Form von Kalibrierfunktionen vermessen werden und dienen sowohl der Quantifizierung der Proben, als auch dem Nachweis der reproduzierbaren Ionisierung der Analyten bei verschiedenen Konzentrationen. Vermisst man dieselben ES (Voraussetzung: Stabilität!) zu Beginn und am Ende einer Probencharge, kann man die Stabilität der Detektion kontrollieren.

Die QCs sind Proben bekannter Konzentration und werden in einem gesonderten Prozess entsprechend der zu analysierenden unbekanntem Proben hergestellt. Ihre Funktion ist die Überprüfung der Genauigkeit aller experimentellen Vorgänge- ihre Abweichung von den ES sollte innerhalb 15 Prozent liegen.

➤ **Vorteile der Methode gegenüber regulärer Mikroskopie**

Ein Nachteil der traditionellen mikroskopischen Untersuchungen zur photographischen Detektion ist ihre Einschränkung auf sehr dünne Sektionen, in denen zur Vermeidung von Messfehlern außerdem keine Interferenzen mit Fluoreszenzen außerhalb des mikroskopischen Fokus auftreten dürfen.

Im Gegensatz dazu gibt es bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie keine solchen Einschränkungen. Man kann das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene sammeln. Dadurch kann ein Bild aus einer Menge von Daten zusammengesetzt werden, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird. Indem man die Fokusebene schrittweise verschiebt, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und anschließend digital verarbeiten. Außerdem können bei diesem dreidimensional bildgebenden Verfahren Fluoreszenzen außerhalb der Fokusebene abgeschirmt werden (durch quasi-theoretische Auflösung).

➤ **Anwendung**

Voraussetzung für die Anwendbarkeit aller Typen von Fluoreszenzmikroskopie sind eine gewisse Autofluoreszenz oder eine induzierbare Fluoreszenz der nachzuweisenden Strukturen bzw. Moleküle (Vorkommen von Fluorochromen). Die Meßmethode wird traditionell für morphologische Studien und klinische Diagnostik verwendet.

Man kann außer Gewebestandteilen auch andere fluoreszierende bzw. per Laser zur Fluoreszenz anregbare Moleküle optisch nachweisen und lokalisieren, d.h. man kann z.B. zelluläre Schichten aufnehmen und Elemente wie z.B. Zellkern oder Mitochondrien intrazellulär lokalisieren.

Diese Methode ist zwar sehr sensitiv, allerdings eher qualitativ. Eine Quantifizierung ist problematisch, da die Fluoreszenz von zahlreichen Faktoren wie z.B. Interaktion mit Proteinen oder Lichtinstabilität der Moleküle (sehr hohe Intensität des Lasers) beeinflusst wird.

2.3.2.2 CLSM- Messung

➤ Reinigung der Deckgläschen für die Zellkultur

Die Deckgläser wurden in einer Petrischale aus Glas für 12 Stunden in absolutem, unvergälltem Ethanol überkreuz eingelegt, um ein Zusammenkleben zu vermeiden. Danach wurden sie steril mit einer flachen Deckglaspinzette entnommen und auf fusselfreiem Tuch im Brutschrank bei 37°C getrocknet; anschließend wurden sie bei 180°C für zwei Stunden im Trockenschrank sterilisiert.

➤ Zelltest und CLSM- Messung

Die MCF-7-Zellen wurden in 12-Well-Platten auf Deckgläschen angezogen und mit der Testsubstanz in Puffer inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und drei Mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen, um außen an der Zellmembran haftende Substanz zu entfernen. Nun wurden die Zellen für 15 min mit Paraformaldehyd bei RT fixiert (3,6% in PBS) [Anderle et al., 1998]. Danach wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den Platten entnommen und mit der Zellschicht auf die Objektträger gelegt. Die Fluoreszenz verschiedener Zellschichten (einschließlich der Zellmembran) wurde in 1µm-Abständen bei 485nm/ 525nm (Excitation/ Emission) gemessen. Die Fokussierung der einzelnen Ebenen und die Kontrasteinstellungen für die grüne Fluoreszenz erfolgten automatisch. Die verwendete Laserintensität war maximal [Arbeitskreis Prof. Lehr, Zeiss-Mikroskop].

2.3.3 Gamma- Counter

➤ Prinzip und Anwendung

Ein gamma- Counter wird zur Vermessung des Gammaskpektrums radioaktiver Proben eingesetzt, die γ -Strahlung oder Röntgenstrahlung aussenden. Es registriert die Intensität der energiereichen, elektromagnetischen Strahlung (in Form von Wellen oder Teilchen). Abhängig von ihrer Energie setzt die Strahlung unterschiedliche Mengen an Ladungsträgern (bei Halbleiterdetektoren) oder Lichtquanten (bei Szintillationszählern) frei. Diese Energie ist spezifisch für die meisten Radionuklide und dient der Identifizierung und Quantifizierung. Sie wird zum Nachweis in ein elektrisches Signal übersetzt und wird häufig in biologischen Assays angewendet, in denen Antikörper radioaktiv markiert werden.

➤ J¹²⁵-Messung

Der Gehalt an Aldosteron und Corticosteron in Plasmaproben von Ratten wurde nach Radioimmunoassay mit J¹²⁵-markiertem Substrat [RIA-kits, DRG-Marburg] in RIA-Röhrchen, die die Komplexe aus Antikörper und radioaktivem Antigen enthielten, nach Eichung auf das Radionuklid Jod¹²⁵ per Gammaskpektrometrie bestimmt.

2.4 Durchführung der biologischen Tests

2.4.1 Caco-2-Transporttest als *in vitro*-Modell der humanen peroralen Absorption/ Bioverfügbarkeit

➤ Einsäen der Transwellplatten für die Transporttests

Die benötigte Anzahl Zellen wird aus ihren Kulturgefäßen abtrypsiniert, mit Kulturmedium abgelöst, abzentrifugiert und wieder in Kulturmedium gelöst (s. Passagieren der Zellen). Nach Bestimmung der Zellzahl im benötigten Gesamtvolumen an Zellsuspension (0,5ml pro Transwell), wird die gewünschte Menge an Transwellplatten unter sterilen Bedingungen eingesät (s. Abbildung 3 „Aufbau eines Transwells mit Caco-2 Monolayer“).

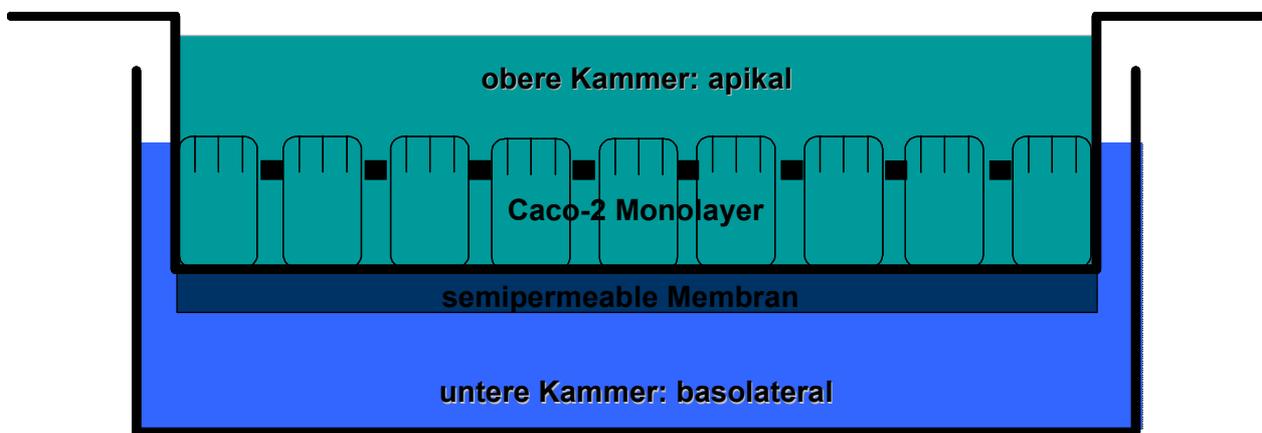


Abbildung 3: Aufbau eines Transwells mit Caco-2 Monolayer

Zum Einsäen legt man in den unteren Kammern (basolateral) jeweils 1,5ml auf 37°C temperiertes Kulturmedium vor und gibt danach in die oberen Kammern jeweils exakt 0,5ml einer homogenen Zellsuspension. Dazu werden die oberen Kammern (Einsätze) zu keinem Zeitpunkt aus den Platten entnommen, da dies die Sterilität und Integrität des Systems gefährden würde. Die Befüllung der unteren Kammern erfolgt stattdessen durch seitliche Einsparungen der oberen Kammern. Es ist ebenfalls sehr wichtig, bei keinem der Arbeitsgänge die semipermeable Membran (aus Polycarbonat, \varnothing der Poren: 0,4 μ m) der Transwellplatten (aus Polystyrol) zu berühren, da ihre Funktionalität sonst nicht mehr gewährleistet ist. Nachdem man den Deckel der Platte aufgesetzt hat, bewegt man sie auf der Arbeitsfläche der Sterilbank waagrecht jeweils diagonal, nach Norden/Süden und nach Westen/Osten, aber nicht kreisförmig. Dies dient der Verteilung der Zellen auf den Membranen, was Voraussetzung für ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen und die Ausbildung

möglichst ähnlicher, dichter Monolayer in den verschiedenen Wells ist. Um dies zu gewährleisten, ist es außerdem essentiell, die eingesäten Platten waagrecht in den Brutschrank (37°C, 5%CO₂, Wasserdampfsättigung) zu stellen, was man mit Hilfe einer Wasserwaage kontrolliert. Der Mediumwechsel erfolgte durch sukzessive Abnahme und Erneuerung des Mediums in den oberen (per Eppendorf-Pipette) und dann in den unteren Kammern (per Sauger) alle 2 Tage und am Tag vor dem Transporttest.

Die Zellzahl, die man einsät, ist abhängig von der geplanten Kultivierungsdauer. Traditionell wurden die Zellen 21 Tage kultiviert, wozu man 6,4*10⁴ Zellen pro cm² Transwellmembran einsät. Um den Durchsatz des Systems zu steigern, wurden jedoch zahlreiche verkürzte Kultivierungsmethoden etabliert. In dieser Arbeit wurde die Kulturdauer auf 10 Tage reduziert, indem die Einsädhichte auf 1,6*10⁵ Zellen pro cm² erhöht wurde. Da die polyklonalen Zellen jedoch als biologisches System nicht immer konstant wachsen, wurde die hinreichende Dichte der Monolayer zusätzlich per TEER-Messung kontrolliert. Ein Transporttest wurde stets nur dann durchgeführt, wenn der TEER am Tag vor dem Test zwischen 500 und 600 Ohm lag (große Unterschiede zwischen verschiedenen Laboratorien).

➤ **Wachstumskontrolle per TEER-Messung (Transepithelial Electrical Resistance)**

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands zwischen oberer und unterer Kammer der Transwells dient als Informationsquelle über das Wachstumsstadium bzw. die Dichte der Caco-2-Monolayer. Mit fortschreitender Kulturdauer steigt der TEER an, wenn das System intakt ist. Haben die Zellen ihren maximalen Differenzierungsgrad erreicht, bleibt ihr Zustand für ca. 1 Woche stabil, danach beginnen sie abzusterben und der Widerstand sinkt wieder.

Die Messung erfolgt mit Hilfe zweier „Chopstick“-Elektroden ca. 1mal pro Woche (und am Tag vor einem Transporttest) stets im Anschluss an einen Mediumwechsel. Die Elektroden werden dazu zuerst für 10min in 70%-igem Isopropanol sterilisiert, unter der Sterilbank getrocknet und vor der Messung für 10min in warmem Kulturmedium äquilibriert (Eichung des Gerätes mit Medium als Nullwert). Dann taucht man die längere der Elektroden in die untere Kammer (über die seitlichen Aussparungen in der oberen Kammer) und die kürzere in die obere Kammer ein, ohne die Membran zu berühren. Durch Zusammendrücken der Elektroden wird der

Stromkreis geschlossen (trotz dazwischen liegender Wand der oberen Kammer) und der Widerstand wird angezeigt. Je dichter die Zellmonolayer geworden sind, desto geringer wird der Ionenaustausch (Stromfluss) zwischen oberer und unterer Kammer, d.h. der Widerstand steigt an (bei konstanter angelegter Spannung).

➤ **Durchführung der Caco-2-Permeationstests**

Während der Testvorbereitung werden alle verwendeten Lösungen wie apikaler Puffer (pH 6,5 oder 7,4), basolateraler Puffer (pH 7,4), HBSS ohne Phenolrot, apikale bzw. basolaterale Substanzlösungen (50µM mit 1% [v/v] DMSO) und Lucifer Yellow-Lösung (1mM in Aqua bidestilliert- erst gegen Testende erwärmen) im Wasserbad steril auf 37°C vorgewärmt. Außerdem wird der geschlossene, horizontale Wasserbadschüttler, in dem die Testinkubationen bei 37°C, 30rpm stattfinden sollen, auf Betriebstemperatur gebracht. In ihm sollte außerdem eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre herrschen, da diese zur Konstanthaltung der Caco-2-Transportbarriere (adhärente Wasser-Schicht) wichtig ist. Die waagerechte Bewegung des Transportsystems dient der gleichmäßigen Verteilung der Substanzlösungen über die gesamte Zelloberfläche der Monolayer.

Zur Durchführung der Permeationstests wird aus beiden Kammern der Transwells das Kulturmedium entfernt und vorsichtig zweimal mit HBSS gewaschen, um alle Mediumreste von den Zellen zu entfernen, da die Bestandteile des Mediums (z.B. FKS) den Transport beeinflussen könnten. Dann werden zur 20-minütigen Präinkubation im Brutschrank die Transportpuffer zugegeben (obere Kammer: 0,5 ml apikaler Puffer pro well; untere Kammer: 1,5 ml basolateraler Puffer pro well). Zur Inkubation im Wasserbadschüttler werden anschließend die Puffer beider Kammern entfernt und in den Donorkammern durch Lösungen der Testsubstanzen in Puffer (jeweils Triplica pro Substanz) bzw. in den Akzeptorkammern durch reinen Puffer ersetzt. Die Festlegung des apikalen oder basolateralen Kompartiments als Donor oder Akzeptor hängt davon ab, ob man die Absorption oder die Sekretion der Verbindungen durch die Mucosa untersuchen will. Meist dient jedoch die apikale Kammer als Donor, da generell zunächst die Absorption interessanter ist.

Nachdem die Inkubation begonnen hat, erfolgt die Probenziehung in 150µl-Volumina nach 0min (für Artefakte und P_{app} -Berechnung) und am Ende des Transporttests (für Wiederfindungsrate) aus beiden Kompartimenten. Abhängig vom Testprotokoll werden außerdem entweder nach 15min, 30min, 60min (für schnell permeierende

Substanzen) oder nach 1h, 2h, 3h (für langsam permeierende Substanzen) Proben aus dem Akzeptorkompartiment genommen (für P_{app} -Berechnung). Alle aus dem System entnommenen Probenvolumina werden durch reinen Puffer ersetzt (Verdünnungsfaktor später einberechnen) außer bei der apikalen Startlösung, bei der der Ersatz durch Startlösung erfolgt. Bis zu ihrer Analyse per LC/MS werden die Proben bei -18°C in Eppendorf-Cups eingefroren.

2.4.1.1 Lucifer Yellow (LY)- Permeationstest zur Integritätskontrolle am Testende

Um die Permeabilitätsergebnisse der Forschungssubstanzen abzusichern, wird die Integrität der Caco-2 Monolayer im unmittelbaren Anschluss an die letzte Probenziehung der Transporttests mit den Forschungssubstanzen überprüft. Dies geschieht mit Hilfe des parazellulären Markers LY (s. Abbildung 4 „Struktur von Lucifer Yellow“).

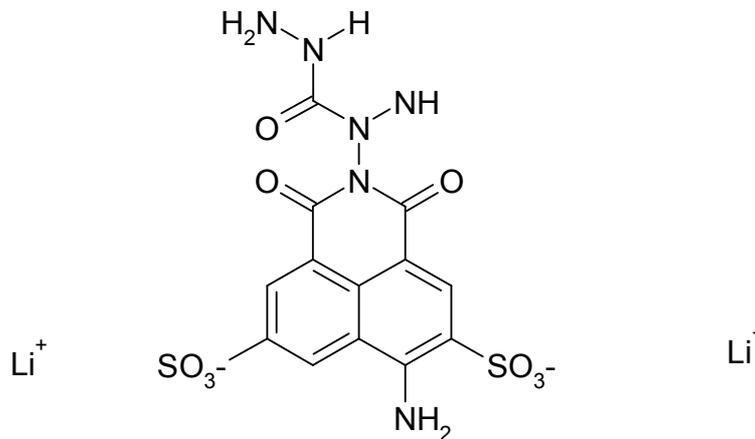


Abbildung 4: Struktur von Lucifer Yellow

Der Fluoreszenzfarbstoff wird als Di-Lithium-, oder Di-Kaliumsalz eingesetzt und kann aufgrund der Ladung seiner beiden Sulfonsäuregruppen keine intakten Caco-2-Monolayer passieren. Er kann ausschließlich durch größere, wässrig gefüllte Poren von einem Kompartiment ins andere gelangen, die nur entstehen wenn das zelluläre System nicht mehr intakt ist. Ursachen hierfür sind z.B. zu lange Inkubationszeiten, Zytotoxizität der Testsubstanzen, oder mechanische Verletzung der Transportschicht während des Experimentierens.

Die Durchführung des Transporttests mit LY erfolgt analog zu demjenigen mit Forschungssubstanzen, allerdings ist zusätzlich ein weitgehender Lichtausschluss

nötig, da der Farbstoff sehr photoinstabil ist. Daher schaltet man unter der Sterilbank das Licht aus, umwickelt möglichst alle Gefäße mit Aluminiumfolie und stellt die 100µM Testlösung in apikalem Puffer erst unmittelbar vor ihrem Einsatz aus einer tiefgefroren gelagerten 1mM Stammlösung in Aqua bidest her.

Zum Integritätstest entfernt man die apikalen und basolateralen Lösungen mit den Testsubstanzen aus den Transwells (12-well-Format) und befüllt sie dann apikal mit je 0,5ml einer 100 micromolaren LY-Testlösung; basolateral legt man 1,5ml frischen Puffer vor. Die Inkubation wird wiederum im Wasserbadschüttler durchgeführt, aber die Probenziehung (je 150µl) erfolgt apikal nach 0min und 30 min, sowie basolateral nach 10min, 20min und 30 min. Die Fluoreszenz der Proben wird in schwarzen Mikrotiterplatten durch einen Multilabel-Platereader (Wallac-Victor) bei 405nm Extinktion und 535nm Emission vermessen. Ebenso werden die Fluoreszenz einer LY-Kalibriergeraden in basolateralem Puffer (äquidistante Kalibrierpunkte von 3,125µM- 100µM) und diejenige von basolateralem Puffer als Hintergrund aufgenommen (s. Abbildung 5 „LY- Kalibrierfunktion“). Die mittlere Hintergrundfluoreszenz wird von der totalen Fluoreszenz abgezogen.

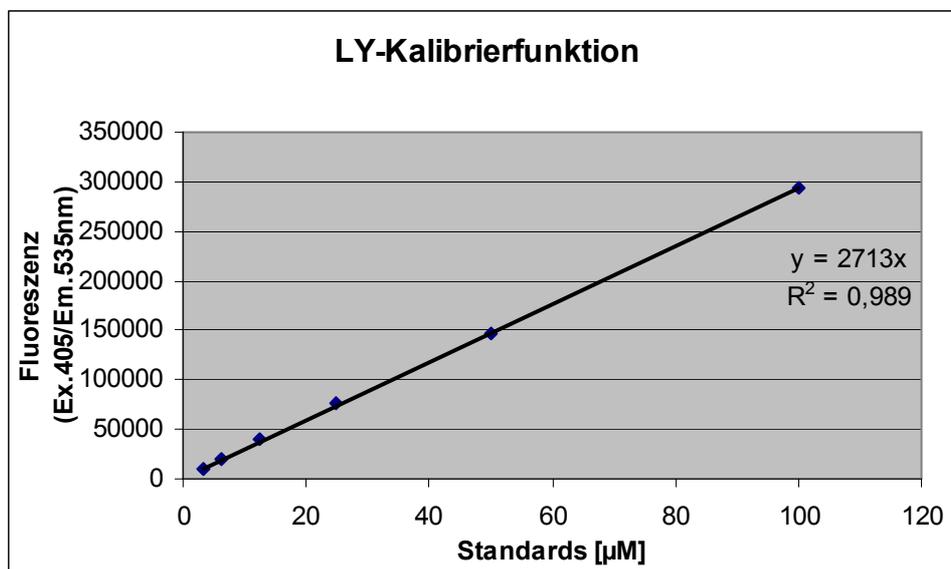


Abbildung 5: LY- Kalibrierfunktion

(Excitation bei 405 nm, Emission bei 535nm)

Die Ergebnisse eines Transporttests für Forschungssubstanzen werden dann als verlässlich angesehen, wenn die LY-Permeabilität laborintern in einem Bereich von $P_{app} < 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm/sec}$ liegt (optimalerweise: counts zwischen Eigenfluoreszenz des Puffers und 100).

2.4.1.2 Berechnung und Bedeutung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app})

Der Papp-Wert einer Substanz im Caco-2 Modell gilt als Maß für ihre potentielle perorale Verfügbarkeit im Menschen. Er gibt die Geschwindigkeit an, mit der eine Substanz vom Donorkompartiment ins Akzeptorkompartiment gelangt (s. Abbildung 6 „Formel zur P_{app} - Berechnung“) und ist stark abhängig vom Testsystem.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt \cdot A \cdot c_0} \quad [\text{cm/sec}]$$

dQ (=dC*V): Stoffmenge im Akzeptorkompartiment [$(\mu\text{g}/\text{cm}^3) \cdot \text{cm}^3$],

dt : Zeitpunkt der Probenziehung [sec],

A : Oberfläche der Transwellmembran [cm^2]

c_0 : Startkonzentration im Donorkompartiment [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]

Abbildung 6: Formel zur P_{app} - Berechnung

Wichtige Faktoren, die den P_{app} -Wert beeinflussen, sind z.B. die Startkonzentration im Donorkompartiment, die Oberfläche der Zellmonolayer (ist unbekannt, folglich wird als Näherung die Transwellmembranoberfläche angenommen) und andere Zelleigenschaften, der pH-Gradient und der Konzentrationsgradient (sink-Bedingungen). Generell werden zur P_{app} -Berechnung nur Konzentrationen im Akzeptorkompartiment herangezogen, die im linearen Anstiegsbereich der Konzentrations-Zeit-Kurve liegen. Bei zusätzlicher Einbeziehung von Konzentrationen im Sättigungsbereich im Akzeptor käme es zu Verfälschungen, da dort die Steigung nicht mehr konstant ist. Die beste Korrelation zwischen P_{app} im Caco-2 Modell und Permeabilität in vivo besteht hierbei für passiv transzellulär membrangängige Verbindungen, die auch keinem pharmakokinetischen Shift (keine Anreicherung in Membran vor Übertritt) unterliegen. Bei Beteiligung von aktivem bzw. parazellulärem Transport oder Transzytose am Überwinden der zellulären Membranen ist die Korrelation geringer.

Je kleiner der Papp-Wert ist, desto geringer ist die erwartete perorale Bioverfügbarkeit in vivo. Um eine solche Einteilung unbekannter Substanzen vorzunehmen, existieren in der Literatur verschiedene Richtwerte. Da es sich jedoch bei Caco-2 um eine polyklonale Zelllinie handelt, d.h. die Schwankungen zwischen verschiedenen Laboratorien sehr groß sein können, ist es exakter, die Einteilung mit Hilfe bekannter Referenzsubstanzen vorzunehmen, die man in jedem Transporttest mit untersucht.

2.4.1.3 Probenaufarbeitung der Caco-2-Transporttests zur Analyse per LC/MS/MS

Die generell angewendete, optimierte Methode zur Probenaufarbeitung bestand darin, alle Proben zunächst auf den gleichen Salzgehalt einzustellen und dann weitestgehend zu entsalzen, um die Analytik nicht zu stören. Der Proteingehalt in den Proben war so gering, dass er die Messungen nicht beeinträchtigte.

Vor der LC/MS-Analyse wurde von den Caco-2-Proben- nach Auftauen im Wasserbad und 5min Ultraschall- ein Aliquot (80µl) entnommen und in 200µl-Mikroinsätze in HPLC-Vials pipettiert. Diese Aliquots wurden dann mit 80µl Puffer des entgegen gesetzten Caco-2-Kompartiments, dem 2% Ionisierungsadditiv (z.B. Eisessig) und ein interner Standard (ca. 5-10µM) zugesetzt worden waren, gemischt. Die zur Quantifizierung benötigten Lösungen der Kalibriergeraden wurden in der gleichen Matrix hergestellt (apikaler Puffer/ basolateraler Puffer wie 1/1 [v/v]) mit 1% Ionisierungsadditiv und gleicher Endkonzentration an internem Standard).

Nachdem so alle Lösungen auf den gleichen Salzgehalt gebracht worden waren, erfolgte unmittelbar vor ihrer Analyse (online) durch Einsatz eines Schaltventils ihre weitestgehende Entsalzung, indem die hydrophilen Salze jeder injizierten Probe zu Beginn der Reversed Phase-HPLC-Methode in den Abfall geleitet wurden. Nach Ableitung der Salze wurde das Ventil umgeschaltet, um die lipophileren Analyten nach der säulenchromatographischen Trennung in die Ionenquelle zu eluieren und massenspektrometrisch zu detektieren.

2.4.2 Caco-2-Homogenat als Modell für Stabilitätstests bzgl. des intestinalen bzw. hepatischen first pass-Metabolismus nach peroraler Applikation eines Wirkstoffs

2.4.2.1 Kultivierung und Homogenisierung der Zellen

Um einen hinreichenden Differenzierungsgrad der Caco-2 Zellen v.a. hinsichtlich der Enzymexpression zu erreichen (Esterasen, Peptidasen,...) wurden sie 10-21 Tage vor einem Stabilitätstest in großen Zellkulturflaschen eingesät und kultiviert (s. „Zellkultur“; Einsäedichte abhängig von Kultivierungsdauer: vgl. Transporttests). Nach ihrer Ernte wurden sie in physiologischem PBS-Puffer (pH 7,4) resolubilisiert und ihre Zellzahl wurde elektronisch bestimmt (Soll: ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml). Danach wurden sie in großen Falcons auf Eis mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen. Die Homogenisierung erfolgte in 5er-Intervallen von je 10sec pro 5ml Zellsuspension. Danach wurde die Zellzahl erneut per Zellcounter überprüft, um den Aufschluss aller Zellen zu gewährleisten. Alle homogenisierten Aliquots wurden vereinigt und mögliche Zellreste wurden 5min bei 4°C, 3850g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann nach Erwärmen auf 37°C für alle weiteren Tests verwendet.

Um vergleichbare Stabilitätswerte von Substanzen zu erhalten, sollte man das Homogenat derselben Zellcharge verwenden, da sich die spezifische Enzymaktivität der polyklonalen Zelllinie stark ändern kann, auch wenn man dieselbe totale Esteraseaktivität verschiedener Homogenate einstellt. Man kann dazu Homogenat mit flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -70°C lagern, um es bei Bedarf auf Eis aufzutauen. Die eventuell nach dem späteren Auftauen zurückgegangene Enzymaktivität lässt sich dann durch Wahl einer höheren Proteinkonzentration oder durch simultane Untersuchung einer Referenzsubstanz weitgehend kompensieren.

2.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Methode beruht auf einer zeitabhängigen Komplexbildung von Coomassie-Brilliant Blau mit Proteinen proportional zu ihrer Konzentration. Diese Komplexe zeigen eine charakteristische Absorption bei 585nm und werden photometrisch detektiert.

Zunächst wird eine Kalibriergerade des lichtinstabilen Reagenzes (ca. 4 Wochen unter Lichtausschluss bei RT verwendbar) mit bovinem Serumalbumin (BSA)

aufgenommen. Man stellt dazu eine Stammlösung von 40mg BSA in 10ml Aqua bidest. her und verdünnt diese für die verschiedenen Kalibrierpunkte mit Aqua bidest. in Eppendorf Cups. (s. Tabelle 3 „Eichgerade mit BSA-Lösungen“)

BSA-Stammlösung [µl]	Aqua bidest. [µl]	Kalibrierpunktlösungen [mg/ml]
0	1000	0
100	900	0,4
200	800	0,8
300	700	1,2
400	600	1,6
500	500	2,0
600	400	2,4
700	300	2,8
800	200	3,2
900	100	3,6
1000	0	4,0

Tabelle 3: Eichgerade mit BSA-Lösungen

Zur Messung der Extinktion bei 585nm wurden je 20µl der Kalibrierpunktlösungen in Einwegküvetten vorgelegt und nach Zugabe von 2ml Bradford-Reagenz per Dispenser (und vorsichtigem Vortexen) exakt 5min vor der Absorptionsaufnahme per Photometer inkubiert (d.h. zeitversetztes Starten der Reaktion: hier alle 30sec).

Der Proteingehalt des Caco-2-homogenates wurde entsprechend bestimmt, wobei darauf geachtet wurde, dass die vermessene Konzentration innerhalb des linearen Bereichs der Kalibriergerade lag. Lag die Konzentration darüber, wurde das Homogenat mit einfachem PBS-Puffer verdünnt, um in diesen Bereich zu gelangen.

2.4.2.3 Bestimmung der totalen Esteraseaktivität mit PNPA (Para-Nitrophenylacetat)

➤ Testprinzip

Als totale Esteraseaktivität bezeichnet man die Aktivität (z.B. physiologischer Präparate) gegenüber Paranitrophenylacetat (Literaturstandard). Der farblose Carbonsäureester wird durch Esterasen äquimolar in gelbes para-Nitrophenol (PNP) gespalten, das eine Absorption bei 405nm zeigt. Man kann den Umsatz von PNPA also quantifizieren, indem man eine Eichgerade von Paranitrophenol aufnimmt (Absorption gegen Konzentration) und so die Konzentrationsänderung von PNP pro Zeit und Proteinmenge bestimmt.

Um Homogenat einer geeigneten Aktivität zu finden, wird der Umsatz von 500µM PNPA durch verschiedene Verdünnungen des Homogenates getestet. Es wird diejenige Proteinkonzentration ausgewählt, die dem Literaturumsatz entspricht oder, falls dieser unbekannt ist, eine Konzentration bei der die Umsatzfunktion innerhalb des benötigten Inkubationszeitraumes linear ansteigt (d.h. keine Enzymsättigung, keine Produkthemmung, keine Instabilität der Enzyme). Hat man dann die gewünschte totale Aktivität als Richtwert für andere Tests festgelegt, kann man die spezifischen Aktivitäten des Homogenates gegenüber Forschungssubstanzen analog untersuchen.

Die Esteraseaktivität wird in $[\text{nmol}_{\text{Umsatz}}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}})]$ angegeben.

➤ Testdurchführung

Da PNPA lichtinstabil ist, wird der Test möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt (Aluminiumfolie um Plastikgefäße, Braunglas). Es wird eine 10mM Stammlösung von PNPA in DMSO hergestellt, die dann mit PBS (pH7,4) auf 1mM verdünnt wird. Alle benötigten Lösungen und das Homogenat werden auf 37°C erwärmt. Dann werden in einer 24-well-Platte (Greiner) in Triplica je 0,5ml verschiedener Verdünnungen des Homogenates vorgelegt. Durch Zugabe von je 500µl einer 1mM Lösung von PNPA in PBS und gutem Mischen wird der Umsatz durch Esterasen (und Peptidasen,...) gestartet. Er wird unter waagerechtem Schütteln (10rpm) im Wallac Victor-Platereader zeitabhängig bei 405nm verfolgt. Außerdem werden als Blindwert reines Homogenat und als Kontrolle reines PNPA (500µM in PBS) vermessen.

2.4.2.4 Bestimmung der spezifischen Esteraseaktivität gegenüber Forschungssubstanzen

Es wurden 2,5 mM Stammlösungen der Testverbindungen (Carbonsäureester und -amide des 5 α R-Projektes) in DMSO hergestellt und dann mit auf 37°C erwärmtem Homogenat (definierten Proteingehaltes) in einer Konzentration von 25 μ M (1%DMSO) in Falcons bei 37°C, 100rpm für 24 Stunden geschüttelt (in Triplica). Eine Übersättigung der Enzyme durch diese Substanzkonzentration kann ausgeschlossen werden, da PNPA in einer 20-fach höheren Konzentration eingesetzt wird.

Die Probenziehung aus den homogenen Lösungen erfolgte nach 0min (100%-Wert), 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, obwohl die Aufenthaltsdauer im Magen-Darm-Trakt selten mehr als 3 h beträgt. Dabei wurden jeweils 0,5ml aus den Inkubationsgefäßen entnommen und in neuen Eppendorff-Cups zum Abstoppen der Reaktion (Denaturierung der Proteine) mit 1,0ml Acetonitril versetzt, das 0,1N-HCl enthielt. Nach 30sec Vortexen wurden die Proteine 5min bei 4°C, 21000g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorff-Cups transferiert und im Vakuum bei 30°C zur Trockne einrotiert. Dann wurden die Gefäßwände mit je 0,5ml Ether gewaschen und unter Stickstoffstrom nochmals zur Trockne abgedampft. Diese Rückstände wurden in je 150 μ l Methanol, das 1% Eisessig enthielt für 5min im Ultraschallbad resolubilisiert. Anschließend ließ man die Proben zur Absetzung der Salze über Nacht unbewegt stehen und überführte danach je 80 μ l der Überstände in Mikroeinsätze in HPLC-Vials. Die Proben wurden online per Schaltventilmethode weiter entsalzen und die Abnahme der Ester bzw. Amide und die Zunahme ihrer korrespondierenden Säuren wurde per LC/MS detektiert.

2.4.3 Bestimmung des intrazellulären Gehalts verschiedener Verbindungen in MCF-7-, Caco-2- und DU145-Zellen

➤ Testprinzip

Die Zellen wurden mit den Testverbindungen inkubiert, und danach wurde ihre Konzentration sowohl im Zellüberstand als auch im Zellhomogenat bestimmt. Die Zellen wurden vor ihrem Aufschluss gewaschen, um an der äußeren Membran angelagerte Verbindung zu entfernen, die sonst fälschlicherweise bei der Gehaltsbestimmung des Homogenates als intrazellulär interpretiert werden würde. Die Konzentration im Homogenat wurde näherungsweise als intrazellulärer Anteil angenommen.

Der Nachweis der Verbindungen erfolgte per LC/MS oder per CLSM (konfokaler Laserscanningmikroskopie). Fluoreszierende Verbindungen wie z.B. SOM19C konnten per CLSM intrazellulär zwar nachgewiesen, allerdings nicht quantifiziert werden. Die Quantifizierungen erfolgten per LC/MS.

➤ Testdurchführung

Alle Zelllinien wurden 24h vor Testbeginn in 6 well-Zellkulturplatten in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 3ml Medium ausgesät, um bis zum nächsten Tag konfluent zu werden. Zur Inkubation wurde das Kulturmedium abgesaugt und mit den Testsubstanzen (50µM; 1% DMSO) in 3ml FKS-freiem Medium für 3h im Brutschrank inkubiert (Kontrollen: 1% DMSO ohne Testsubstanz).

Am Testende wurden die Überstände komplett in Falcons überführt. Dann wurden die Zellen zweimal mit je 3ml FKS-freiem Medium gewaschen und die Waschlösungen wurden mit den entsprechenden Überständen vereinigt. Nun wurden die Zellen mit je 0,5 ml Trypsin/EDTA pro well abtrypsiniert und in 3 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in je 2ml frischem Medium resolubilisiert. Danach wurde zur Kontrolle die Zellzahl aller wells elektronisch bestimmt (je 100µl Zellsuspension mit 9,9ml Casytone[®]). Das restliche Zellvolumen (je 1,9ml) wurde auf Eis mit dem Ultraschallstab für 5mal 10sec homogenisiert. Als 100%-Werte wurden die Überstände (vereinigt mit den Waschlösungen) und die Homogenate der Kontrollwells nun mit 50µM der entsprechenden Testsubstanz versetzt. Dann wurden alle „Ansätze“ mit jeweils dem doppelten Volumen an Diethylether dreimal für 30sec auf dem Vortex extrahiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 4°C, 3850g, um die Phasen zu trennen, woraufhin die Wasserphase für 10min im

Ethanol/Trockeneisbad ausgefroren wurde, um die oben liegende Etherphase leicht in frische Gefäße dekantieren zu können. Der dekantierte Ether wurde in großen Falcons über Nacht bei Raumtemperatur restlos abgedampft. Danach wurden die Gefäßwände mit je 5ml Ether nachgespült (dreimal 20 sec Vortex), der ebenfalls komplett abgedampft wurde. Diese Rückstände wurden dann für 5min im Ultraschallbad in 2ml Methanol resolubilisiert und in Eppendorff-Cups überführt, wo die Lösungen unter Stickstoffstrom zur Trockne abgedampft wurden. Diese Rückstände wurden in je 150µl Methanol mit 1% Eisessig für 5min im Ultraschallbad gelöst und je 100µl davon wurden in Mikroinsätze in HPLC-Vials pipettiert. Die Analyse der Proben erfolgte per LC/MS (Schaltventilmethode).

2.4.4 Pharmakokinetikstudien in vivo nach peroraler Applikation verschiedener Forschungssubstanzen in der Ratte

➤ Testprinzip

Ausgewählte Forschungssubstanzen wurden in einer Mischung (=Cassette) von bis zu fünf Verbindungen nach peroraler Applikation an Ratten getestet. Jede Cassette wurde aus statistischen Gründen an fünf Tieren untersucht.

Dieses Verfahren liefert für die Arzneimittelentwicklung entscheidende Informationen über die Pharmakokinetik in vivo, wie z.B. perorale Absorption und Elimination.

➤ Testdurchführung

In der Studie wurden männliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Germany) mit einem Gewicht zwischen 260-300g eingesetzt. Sie wurden bei 20-22°C in einem 12-stündig alternierenden Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Eine Woche vor der kinetischen Studie wurde den Tieren unter Narkose (Ketamin, Xylazin) ein Halsvenenkatheter zur späteren schonenden Blutentnahme implantiert. Die Ratten wurden 12 Stunden vor der Applikation der Testverbindungen nicht mehr gefüttert, hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser. Schließlich wurden die Testsubstanzen in Lösungen mit DMSO und physiologischer Kochsalzlösung den Tieren peroral mit einer Fütterungsnadel injiziert. (Zuvor wurden separate Stammlösungen jeder Verbindung hergestellt und diese wurden dann gemischt.) Appliziert wurden 5ml Lösung pro kg Körpergewicht eines Tieres. Die Blutproben von je 200µl wurden eine Stunde vor der Substanzapplikation (als Nullwert) und jeweils 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h und 24 h nach der Applikation in heparinhaltige Gefäße entnommen. Zur Plasmagewinnung wurden die Proben dann bei 3000g, 4°C für 10min zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Gefäße überführt, worin sie bis zur Analyse per LC/MS bei -20°C eingefroren wurden (Pharmacelsus CRO).

2.4.4.1 Aufarbeitung der Plasmaproben für die LC/MS-Analyse

Zu 50µl Plasma wurden zur Proteinfällung je 100µl Acetonitril, das einen internen Standard enthielt, zugesetzt. Die Proben wurden nun für 30sec rigoros gevortext und anschließend für 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Proteine für 5min bei 21.000g/ 20°C abzentrifugiert und der partikelfreie Überstand

wurde in neue Gefäße überführt. Ein Aliquot (100µl) dieses Überstandes wurde jeweils in Mikroensätze in HPLC-Vials überführt und per LC/MS analysiert.

Die Standards zur Anfertigung der Kalibrierkurven der Verbindungen wurden entsprechend unter Verwendung von blank-Plasma angefertigt.

2.4.5 Hemmung von CYP11B2/CYP11B1 an Nebennierenfragmenten der Ratte *in vitro* (Biosynthese von Aldosteron/ Corticosteron)

➤ Testprinzip

Ausgewählte nichtsteroidale, humane CYP11B2-Inhibitoren wurden *in vitro* an Nebennierenstücken (Achtel) von Ratten auf Hemmung der Biosynthese von Aldosteron und Corticosteron getestet [Test modifiziert nach Gertrud Luise Grün, Dissertation 1994]. Als Referenz diente Fadrozol, dessen Aktivität in diesem Testsystem der Ratte bereits in früheren Studien bewiesen wurde [modifiziert nach Häusler et al., 1989].

➤ Testdurchführung und Analyse der Proben

Für einen Inkubationsansatz benötigte man eine ganze Nebenniere. Daher wurden zur Verminderung interindividueller Schwankungen zwischen den Tieren Achtel verschiedener Organe im selben Ansatz gepoolt (pro Falcon: 2ml KRBG mit einer gepoolten Nebenniere). Die Verarbeitung erfolgte bis zur Präinkubation unter Eiskühlung (s. „Handling der Rattennebenieren“). Diese Ansätze wurden dann möglichst parallel für 5min auf Eis mit Carbogen ($O_2/CO_2 = 95/5$) begast (über Glaskapillaren, die in die Lösungen eingetaucht wurden), um die Enzymaktivität zu verbessern. Die Falcons wurden anschließend zügig verschlossen und es erfolgte eine Präinkubation im Wasserbadschüttler für 1h bei 37°C, 45rpm. Danach wurde der Präinkubationspuffer durch frischen KRBG-Puffer, der 0,1 µg/ml ACTH (Blindwerte ohne ACTH) und die gewünschte Konzentration des Hemmstoffes (Stammlösungen in DMSO) bzw. nur DMSO als Kontrolle (in allen Proben 1% Endgehalt an DMSO) enthielt, ersetzt. Anschließend erfolgte für 2h die Inkubation im Wasserbadschüttler bei 37°C, 45rpm, wonach das Gewebe für 1min bei 420g auf den Boden der Falcons abzentrifugiert wurde.

Zum Abstoppen wurden die Organstücke in Eppis überführt und je 1,6ml der Überstände wurden zweimal mit je 6ml Ether extrahiert, wozu jeweils 30sec rigoros gevortext und abzentrifugiert wurde (je 2min, 400g, 4°C). Die Überstände der ersten Extraktion wurde weitestgehend abpipettiert. Nach der zweiten Extraktion wurden die wässrigen Phasen ausgefroren (im Ethanol/Trockeneisbad) und die Überstände wurden dekantiert. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockne abgedampft;

danach wurden die Gefäßwände mit je 5ml Ether nachgespült (Vortex), der ebenfalls komplett abgedampft wurde. Diese Rückstände wurden dann für 5min im Ultraschallbad in 2ml Methanol resolubilisiert. Dann wurden diese Lösungen in neue Eppendorff-Cups überführt und zur Trockne eingedampft. Diese Rückstände wurden dann in 150µl Methanol für 5min im Ultraschallbad resolubilisiert; 100µl dieser Überstände wurden in Mikroinsätze von HPLC-Vials überführt und zum Nachweis von Aldosteron und Corticosteron per HPLC/MS analysiert (Schaltventilmethode, ESI, SIM, Lösungsmittel (MeOH, H₂O) ohne Modifier).

Der Gehalt der Proben wurde dann auf das Gewicht der trocken getupften (per Filterpapier) Nebennierenfragmente pro Ansatz bezogen.

Der Nebennierenbedarf für die Bestimmung der prozentualen Hemmung einer Verbindung ist folgender: 3 Blindwerte (mit DMSO, ohne ACTH), 3 Kontrollen (mit DMSO, mit ACTH), 3 Hemmwerte (mit Hemmstoff in DMSO, mit ACTH).

2.4.6 Hemmung von CYP11B2/CYP11B1 in vivo am Rattenmodell (Biosynthese von Aldosteron/ Corticosteron)

➤ Testprinzip

Ausgewählte nichtsteroidale, humane CYP11B2-Inhibitoren wurden Ratten auf dem intraperitonealen Applikationsweg verabreicht. Dadurch sollte ein „proof of concept“ versucht werden, indem die Biosynthese von Aldosteron und Corticosteron an dem generell verwendeten in vivo-Modell gehemmt würde. Als Referenz diente Fadrozol, dessen aktive Konzentration in der Ratte bereits in früheren Studien bestimmt worden war und in dem verwendeten Modell bei 4mg/kg lag [Dissertation Müller-Vieira, 2005].

➤ Testdurchführung

In der Studie wurden männliche Wistar-Ratten (Janvier, France) mit einem Gewicht zwischen 235-280g eingesetzt. Sie wurden bei 20-22°C in einem 12-stündig alternierenden Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Zwei Wochen vor der pharmakodynamischen Studie wurden die Tiere täglich an das experimentelle Handling der ausstehenden Studie gewöhnt, um während der Studie Stressreaktionen zu vermeiden, die die Testergebnisse verfälschen würden. Außerdem wurden den Tieren bereits unter Narkose (Ketamin, Xylazin) permanente Silikonkatheter in die Halsvenen implantiert, um später eine schonende Blutabnahme zu ermöglichen.

Zur Bestimmung der individuellen basalen Plasmaspiegel der Tiere an Aldosteron und Corticosteron, wurden die ersten Blutproben (300µl) 18h vor der Inhibitorapplikation entnommen. Der Volumenverlust nach jeder Blutentnahme wurde durch physiologische Kochsalzlösung ausgeglichen. Eine halbe Stunde nach dieser ersten Probenentnahme wurde den Tieren subkutan ACTH₁₋₂₄ (1 mg/kg; 1 ml/kg als Synacthene Depot 1 mg, Novartis) verabreicht, um die adrenale Steroidproduktion zu stimulieren. Exakt 17h nach der Stimulation wurde die zweite Blutprobe entnommen, um die stimulierten Level von Aldosteron und Corticosteron festzustellen. Wiederum 30min nach dieser Blutprobe wurden den Tieren die Inhibitoren intraperitoneal appliziert (5ml pro kg Körpergewicht). Die Zusammensetzung der Inhibitorlösungen war folgende: Fadrozol: 4mg in 5 ml 0,9%-iger NaCl; MV 18: 40 mg in 5 ml 0,9% NaCl; SU 20A: 40 mg in 5 ml 0,9% NaCl mit 25% DMSO und 25% Solutol.

Die Probenziehung im Anschluss an die Inhibitorapplikation erfolgte nach 1h, 2h, 4h und 8h. Zwei Tiere bekamen keinen Inhibitor appliziert und dienten als Kontrolle für den zeitabhängigen Verlauf der Aldosteron- und Corticosteronlevel. Ihnen wurde nur die Matrix der Testverbindungen appliziert [Pharmacelsus CRO].

➤ **Aufarbeitung der Blutproben für die Analyse per Radioimmunoassay (RIA-Test)**

Die Serumproben jedes Entnahmezeitpunktes wurden für 1h bei Raumtemperatur gerinnen gelassen. Danach wurden die zellulären Bestandteile bei 21000g für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände (Plasma) wurden zur Analyse per Radioimmunoassay bei -20°C gelagert.

Aldosteron wurde mit einem RIA-¹²⁵Jod-kit (DRG, Marburg) und Corticosteron mit einem Ratte-Maus-RIA-¹²⁵Jod-kit (DRG, Marburg) biologisch getestet und per Gammacounter analysiert.

➤ **Durchführung der RIA-Tests**

Aldosteron:

❖ **Testprinzip**

Das Verfahren beruht auf dem Grundprinzip von Radioimmunotests, wobei radioaktive und nicht radioaktive Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Die Menge des mit ¹²⁵I markierten, an Antikörper gebundenen Analyten ist umgekehrt proportional zur Konzentration des nicht markierten Analyten. Im Inkubationsgemisch befindet sich in allen Proben eine definierte Konzentration an ¹²⁵I-markierten Aldosteron, mit dem das unmarkierte Mineralocorticoid kompetitiv um die Antikörperbindungsstellen konkurriert. Die Trennung von freiem und gebundenem Antigen wird leicht und schnell durch Dekantieren oder Absaugen der mit Antikörper beschichteten Röhren erreicht. Die gebundene Radioaktivität wird im Gammacounter vermessen.

❖ **Versuchsdurchführung**

Der Test wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Doppelbestimmungen reichen aufgrund der geringen Abweichungen aus.

In Polystyrolröhrchen, deren Innenwand mit polyklonalem Anti-Aldosteron-Kaninchen-Immunglobulin beschichtet ist, werden Proben mit unbekanntem Aldosterongehalt (aufgearbeitetes Plasma) und bekannte Proben für 3h bei 25°C, 180rpm inkubiert (Standards: 0pg/ml, 25-1600pg/ml; Kontrollen: eine niedrige und eine hohe Konzentration). Der Nullstandard dient zur Bestimmung der basalen counts (Bo). Zur Bestimmung der Totalaktivität (T) benötigt man unbeschichtete Röhrchen.

Nach der Inkubation werden alle Röhrchen- außer denen der Totalaktivitätsbestimmung- dekantiert, gründlich ausgeklopft und oberhalb der Antikörperbeschichtung mit Wattestäbchen getrocknet. Die Strahlung der Komplexe des Antikörpers mit ¹²⁵I-markierten Aldosteron am Boden der Röhrchen wird dann eine Minute lang im Gammacounter vermessen.

❖ Auswertung

Die Ergebnisse wurden wie unten beschrieben mit log-linearer Kurvenanpassung berechnet.

1. Aus den mittleren Counts/Minute (CPM) wurden die %-Bindung (B/T) oder % B/Bo für alle Standards, Kontrollen und unbekanntenen Proben wie folgt berechnet:

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Mittlere CPM}}{\text{Mittlere Totalaktivität (T)}} \times 100$$

$$\text{B/Bo \%} = \frac{\text{Mittlere CPM}}{\text{Mittlere CPM des Nullstandards (B}_0\text{)}} \times 100$$

2. Die in Counts pro Minute (CPM) gemessene Radioaktivität, % B/T oder % B/Bo der Aldosteron-Standards wurden auf der y-Achse gegen die Aldosteron-Konzentrationen (x-Achse) auftragen und durch eine log-lineare Funktion verbunden.
3. Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Aldosteronkonzentration aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen (Counts) für jede Probe ermittelt.

4. Die für die Plasmaproben in pg/ml erhaltenen Ergebnisse wurden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Aldosteronkonzentrationen im ursprünglichen, unverdünnten Plasma in pg/ml zu erhalten.
5. Das Quantifizierungslimit lag bei 25 pg/ml.

❖ **Qualitätskontrolle**

Die maximale Bindung (% B/T) oder der Anteil gebundener Counts bei Abwesenheit von nicht markiertem Antigen ist bei Verwendung von frisch mit ¹²⁵I markiertem Tracer ungefähr 30% und kann bis kurz vor dem Verfalldatum auf 20% sinken. Eine maximale Bindung unter 15% kann auf Reagenzienzersetzung, Kontamination oder unsachgemäße Durchführung des Assays hindeuten.

In jedem Assay sollten Kontrollen sowohl mit hoher als auch mit niedriger Konzentration mit gemessen werden. Die Ergebnisse der Kontrollen sollten innerhalb des entsprechenden Vertrauensbereichs liegen. Die Vertrauensgrenzen für die DRG-Kontrollen sind auf den Etiketten der Kontrollfläschchen vermerkt.

Corticosteron:

❖ Testprinzip

Das Verfahren beruht analog zur Aldosteronbestimmung auf dem Grundprinzip von Radioimmuntests, wobei radioaktive und nicht radioaktive Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Die Menge des mit ^{125}I markierten, an Antikörper gebundenen Analyten, ist umgekehrt proportional zur Konzentration des nicht markierten Analyten.

Im Unterschied zu Aldosteron wird hier zur Abtrennung von Antikörper-gebundenem und freiem ^{125}I -Corticosteron die Doppelantikörpermethode eingesetzt, wobei ein zweiter Antikörper im Überschuss zugegeben wird. Durch Zentrifugation wird der gebildete (doppelte) Antikörper-Antikörper-Corticosteron-Komplex abgetrennt, ungebundenes Antigen wird dekantiert und die Radioaktivität im Niederschlag des Teströhrchens wird mittels eines Gammacounters gemessen.

❖ Versuchsdurchführung

Der Test wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Doppelbestimmungen reichen aufgrund der geringen Abweichungen aus.

In unbeschichteten Polystyrolröhrchen werden Proben mit unbekanntem Corticosterongehalt (aufgearbeitetes Plasma: verdünnt „1:200“ mit Phosphosaline Puffer / Gelatine, pH 7,0 mit Kaninchen IgG) und bekannte Proben (Standards: 0ng/ml, 25-1000ng/ml; Kontrollen: eine niedrige und eine hohe Konzentration) mit Anti-Corticosteron inkubiert (Antikörper 1: Gewinnung durch Applikation von Corticosteron-3-carboxymethyloxim-BSA als Antigen in Kaninchen). Die Inkubation erfolgte für 2h bei 180rpm, 25°C in Konkurrenz mit ^{125}I -markierten Corticosteron. Die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden dann mit einem Überschuss an einem zweiten Antikörper (Mischung aus PEG und Ziege-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin in TRIS-Puffer) präzipitiert und abzentrifugiert (1000g, 15min, 4°C). Nun wurden alle Röhrchen- außer denen der Totalaktivitätsbestimmung- dekantiert, gründlich ausgeklopft und oberhalb des Niederschlages (Doppelantikörper-Antigen-Komplex) mit Wattestäbchen getrocknet. Die Radioaktivität in den geschlossenen Röhrchen wurde dann eine Minute lang im Gammacounter vermessen.

❖ **Auswertung und Qualitätskontrolle (vgl. Aldosteron)**

Die Auswertung erfolgte analog zu derjenigen von Aldosteron.

Zunächst wurden Mittelwerte der counts aller Doppelbestimmungen berechnet und die counts der blanks wurden von den Proben und Standards subtrahiert. Die so korrigierten „Nettounts“ der Standards bzw. Proben wurden bezogen auf den korrigierten Nullstandard in Prozent Bindung angegeben. Die ermittelten B/Bo-Werte in Prozent wurden in einem halblogarithmischen Diagramm gegen die Corticosteronkonzentrationen aufgetragen. Nach Einberechnung des Verdünnungsfaktors wurden die realen Plasmakonzentrationen angegeben.

Abkürzungen

11 β -HSD 1, 2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ I, II (Isoenzyme)
17 β -HSD1, 2	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ I, II (Isoenzyme)
18-OHB	18-Hydroxycorticosteron
5 α R 1, 2	5 Alfa-Reduktase Typ I, II (Isoenzyme)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ACE	angiotensin converting enzyme
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination (L)ADME-Tox: Liberation, ADME, Toxizität
ALDO	Aldosteron
AlogP98	berechneter Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
APCI	atmospherical pressure chemical ionisation
API	atmospherical pressure ionisation
Aqua (bi)dest	bidestilliertes Wasser (Millipore-Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
ATII	Angiotensin II
B	Corticosteron
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Caco-2	Colon Carcinoma Zellen
CD	Cyclodextrine
CHI	Chromatographischer Hydrophober Index
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CRM	charged residue model
CYP11B1	Steroid-11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP450	Cytochrom-P450-Enzyme
DC	direct current
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco`s modified eagles medium
DMPK	drug metabolism and pharmacokinetics

Abkürzungen
- 265 -

DOC	Desoxycorticosteron
DV	divert valve: Schaltventilmethode
E	Cortison
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPHESUS	epirenone's heart failure efficacy and survival study
Eppi(s)	Eppendorff-Cup(s)
ESI	electrospray ionisation
F	Cortisol
GC	Gaschromatographie
GI(T)	Gastrointestinaltrakt
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
H ⁺	Protonen
HBA	hydrogen bonding acceptor
HBD	hydrogen bonding donor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEK	hamster embryonal kidney cells
HPLC (LC)	high performance liquid chromatography
HTS	high throughput
IEM	ion emission model
i.p.	intraperitoneal
IS	interner Standard
K ⁺	Kalium
KSR	Ketosteroidisomerase
LC/MS	Flüssigchromatographie/ Massenspektrometrie
LC/MS/MS	Flüssigchromatographie/ Tandemmassenspektrometrie
LLE	liquid liquid extraction
LogP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MCF7	Mamma Carcinoma Zellen
MD	molecular dynamics
MDR	multidrug resistance proteins (Efflux)
MEM-NEAA	minimal essential medium modifier- non essential amino acids
Mg ²⁺	Magnesium

Abkürzungen

- 266 -

μM	micromolar
mM	millimolar
MM	molecular modeling
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MRM-Modus	multiple reaction monitoring-Modus
MRP	multidrug resistance-associated proteins (Efflux)
MS	Massenspektrometrie
mucus/ABL	mucus/ aqueous boundary layer
MW	Mittelwert, Molekulargewicht
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH/ NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid/ phosphorylierte Form
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
nM	nanomolar
NaOH	Natronlauge
NCE	new chemical entity
OAT	Organischer Anionen-Transporter
OCT	Organischer Kationen-Transporter
pM	picomolar
p.o.	peroral
PAMPA	parallel artificial membrane permeation assay
P_{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient
PBS	phosphate buffered saline
PC	Prostatakarzinom
PDA	photo diode array (UV-Detektor)
PEPT1	Peptidtransporter
P-gp	Glycoprotein P (Efflux)
PK	Pharmakokinetik
PNPA	para-Nitrophenylacetat
PSA	polar surface area, prostate specific antigen
QSAR	quantitative structure activity-relationship
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (systemisch oder lokal)
RALES	randomised aldactone elevation study

Abkürzungen
- 267 -

rel. SD	relative Standardabweichung
RF	radio frequency
RIA	Radioimmunoassay
RKI	Robert-Koch-Institut
RSS	Desoxycortisol
s.c.	subkutan
SDR	Short Chain Dehydrogenase/ Reduktase
SIM-Modus	selected ion monitoring-Modus
SPE	solid phase extraction: Festphasenextraktion
SRM-Modus	selected reaction monitoring-Modus
TEER	transepithelial electrical resistance
TOF	time of flight
V79	chinese hamster lung fibroblasts

Literaturverzeichnis

Zitierte Publikationen

- [1] A. D. Abell, M. J. Prince, A. M. McNulty, B. L. Neubauer, *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *17*, 1909-1911
- [2] A. D. Abell, M. Brandt, M.A. Levy, D.A. Holt, *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 481-484
- [3] A. Abid, I. Bouchon, G. Siest, N. Sabolovic, *Biochem Pharmacol* **1995**, *4*, 557-561
- [4] B. L. Ackermann, M. J. Berna, A. T. Murphy, *Curr Top Med Chem* **2002**, *1*, 53-66
- [5] E. Albers, B. W. Muller, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1995**, *4*, 311-337
- [6] G. Aldini, P. Granata, M. Orioli, E. Santaniello, M. Carini, *J Mass Spectrom* **2003**, *11*, 1160-1168
- [7] J. Alsenz, E. Haenel, *Pharm Res* **2003**, *12*, 1961-1969
- [8] J. Alsenz, H. Steffen, R. Alex, *Pharm Res* **1998**, *3*, 423-428
- [9] P. Anderle, E. Niederer, W. Rubas, C. Hilgendorf, H. Spahn-Langguth, H. Wunderli-Allenspach, H. P. Merkle, P. Langguth, *J Pharm Sci* **1998**, *6*, 757-762
- [10] S. Andersson, D. M. Berman, E. P. Jenkins, D. W. Russell, *Nature* **1991**, 159-161
- [11] S. Andersson, D. W. Russell, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *10*, 3640-3644
- [12] G. Andriole, D. Bostwick, O. Brawley, L. Gomella, M. Marberger, D. Tindall, S. Breed, M. Somerville, R. Rittmaster, *J Urol* **2004**, *4 Pt 1*, 1314-1317
- [13] G. L. Andriole, C. Roehrborn, C. Schulman, K. M. Slawin, M. Somerville, R. S. Rittmaster, *Urology* **2004**, *3*, 537-541; discussion 542-533
- [14] P. Artursson, *J Pharm Sci* **1990**, *6*, 476-482
- [15] P. Artursson, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1991**, *4*, 305-330
- [16] P. Artursson, J. Karlsson, *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *3*, 880-885
- [17] P. Artursson, C. Magnusson, *J Pharm Sci* **1990**, *7*, 595-600
- [18] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *1-3*, 27-43
- [19] Y. Asada, T. Sonoda, M. Ojio, S. Kurata, T. Sato, T. Ezaki, S. Takayasu, *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, *6*, 2875-2880
- [20] G. Aumuller, W. Eicheler, H. Renneberg, K. Adermann, P. Vilja, W. G. Forssmann, *Acta Anat (Basel)* **1996**, *4*, 241-252
- [21] R. K. Bakshi, G. F. Patel, G. H. Rasmusson, W. F. Baginsky, G. Cimis, K. Ellsworth, B. Chang, H. Bull, R. L. Tolman, G. S. Harris, *J Med Chem* **1994**, *23*, 3871-3874
- [22] R. K. Bakshi, G. H. Rasmusson, G. F. Patel, R. T. Mosley, B. Chang, K. Ellsworth, G. S. Harris, R. L. Tolman, *J Med Chem* **1995**, *17*, 3189-3192
- [23] A. Baranczyk-Kuzma, J. A. Garren, I. J. Hidalgo, R. T. Borchardt, *Life Sci* **1991**, *16*, 1197-1206
- [24] A. Barqawi, I. M. Thompson, E. D. Crawford, *J Urol* **2004**, *2 Pt 2*, S5-8; discussion S9
- [25] G. Bartsch, R. S. Rittmaster, H. Klocker, *World J Urol* **2002**, *6*, 413-425

Literaturverzeichnis

- 269 -

- [26] C. Bayne, F. Donnelly, K. Chapman, P. Bollina, C. Buck, F. Habib, *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, *1*, 206-213
- [27] E. K. Bayne, J. Flanagan, M. Einstein, J. Ayala, B. Chang, B. Azzolina, D. A. Whiting, R. A. Mumford, D. Thiboutot, Singer, I.G. Harris, *Br J Dermatol* **1999**, *3*, 481-491
- [28] M. Beato, J. Klug, *Hum. Reprod. Update* **2000**, 225-236
- [29] F. Becher, A. Pruvost, J. Gale, P. Couerbe, C. Goujard, V. Boutet, E. Ezan, J. Grassi, H. Benech, *J Mass Spectrom* **2003**, *8*, 879-890
- [30] A. S. Bhatnagar, A. Hausler, K. Schieweck, M. Lang, R. Bowman, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990**, *6*, 1021-1027
- [31] S. Bjorge, K. L. Hamelhele, R. Homan, S. E. Rose, D. A. Turluck, D. S. Wright, *Pharm Res* **1991**, *11*, 1441-1443
- [32] A. Blais, P. Bissonnette, A. Berteloot, *J Membr Biol* **1987**, *2*, 113-125
- [33] H. Bohets, P. Annaert, G. Mannens, L. van Beijsterveldt, K. Anciaux, P. Verboven, W. Meuldermans, K. Lavrijssen, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2001**, 367-383
- [34] D. G. Bostwick, J. Qian, F. Civantos, C. G. Roehrborn, R. Montironi, *Clin Prostate Cancer* **2004**, *4*, 228-235
- [35] X. Boulenc, M. Bourrie, I. Fabre, C. Roque, H. Joyeux, Y. Berger, G. Fabre, *J Pharmacol Exp Ther* **1992**, *3*, 1471-1478
- [36] H. N. Bramson, D. Hermann, K. W. Batchelor, F. W. Lee, M. K. James, S. V. Frye, *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, *3*, 1496-1502
- [37] A. Braun, S. Hammerle, K. Suda, B. Rothen-Rutishauser, M. Gunthert, S. D. Kramer, H. Wunderli-Allenspach, *Eur J Pharm Sci* **2000**, S51-60
- [38] O. W. Brawley, H. Parnes, *Eur J Cancer* **2000**, *10*, 1312-1315
- [39] C. G. Brilla, *Cardiovasc Res* **2000a**, 1-3
- [40] C. G. Brilla, *Herz* **2000b**, 299-306
- [41] C. G. Brilla, M. Schencking, C. Scheer, H. Rupp, *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* **1997**, 566-574
- [42] S. E. Bulun, S. Yang, Z. Fang, B. Gurates, M. Tamura, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2001**, 19-25
- [43] G. W. Caldwell, *Current Opinion in Drug Discovery* **2000**, 30-41
- [44] G. W. Caldwell, S. M. Easlick, J. Gunnet, J. A. Masucci, K. Demarest, *J Mass Spectrom* **1998**, *7*, 607-614
- [45] G. P. Camenisch, W. Wang, B. Wang, R. T. Borchardt, *Pharm Res* **1998**, *8*, 1174-1181
- [46] C. Carson, 3rd R. Rittmaster, *Urology* **2003**, *4 Suppl 1*, 2-7
- [47] N. B. Cech, C. G. Enke, *Mass Spectrom Rev* **2001**, *6*, 362-387
- [48] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J Chromatogr A* **1999**, *1*, 191-202
- [49] L. M. Chan, S. Lowes, B. H. Hirst, *Eur J Pharm Sci* **2004**, *1*, 25-51
- [50] J. Chen, Y. Jiang, H. Fu, Y. Chen, C. Cheng, Y. Zhao, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2001**, *16*, 1489-1493
- [51] W. Chiou, M. C. C. SM, W. TCJ. HY, *Int J Clin Pharmacol Ther* **2000**, *11*, 532-539

- [52] B. E. Chong, D. M. Lubman, F. R. Miller, A. J. Rosenspire, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *18*, 1808-1812
- [53] J. N. Cogburn, M. G. Donovan, C. S. Schasteen, *Pharm Res* **1991**, *2*, 210-216
- [54] A. Collet, N. B. Higgs, E. Sims, M. Rowland, G. Warhurst, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1999**, *1*, 171-178
- [55] P. P. Constantinides, A. Tustian, D. R. Kessler, *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *9*, 1243-1255
- [56] T. L. G. S. J. Constantopoulos, Christie G. Enke, *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 625-634
- [57] C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, J. Boccia, D. Casals, J. R. Bertino, M. R. Melamed, *J Histochem Cytochem* **1990**, *9*, 1277-1287
- [58] K. Cox, *American Pharmaceutical Reviews* **2001**, 45-52
- [59] K. Cox, *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies (edt. Korfmacher): Special Requirements for Metabolite Characterization*, 229-252
- [60] C. L. Crespi, L. Fox, P. Stocker, M. Hu, D. T. Steimel, *Eur J Pharm Sci* **2000**, *1*, 63-68
- [61] K. M. Crommentuyn, H. Rosing, L. G. Nan-Offeringa, M. J. Hillebrand, A. D. Huitema, J. H. Beijnen, *J Mass Spectrom* **2003**, *2*, 157-166
- [62] S. Croubels, S. de Baere, P. de Backer, *Analytica Chimica Acta* **2003**, *1-2*, 419-427
- [63] T.Z. Czaky, *Pharmacology of Intestinal Permeation II: Intestinal Absorption of Xenobiotics*, **1984**, 1-30
- [64] E. e. a. Daeseleire, *Analytica Chimica Acta* **2003**, 25-34
- [65] A. H. Dantzig, L. Bergin, *Biochim Biophys Acta* **1990**, *3*, 211-217
- [66] R. L. de Vruh, P. L. Smith, C. P. Lee, *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, *3*, 1166-1170
- [67] C. Delcayre, J. S. Silvestre, A. Garnier, A. Oubenaissa, S. Cailmail, E. Tatara, B. Swynghedauw, V. Robert, *Kidney Int.* **2000**, 1346-1351
- [68] K. Denner, J. Doehmer, R. Bernhardt, *Endocr Res* **1995a**, 443-448
- [69] E. di Salle, D. Giudici, A. Radice, T. Zaccheo, G. Ornati, M. Nesi, A. Panzeri, S. Delos, P. M. Martin, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1998**, *3-4*, 179-186
- [70] M. S. Diaz-Cruz, M. J. Lopez de Alda, R. Lopez, D. Barcelo, *J Mass Spectrom* **2003**, *9*, 917-923
- [71] B. Disdier, H. Bun, J. Catalin, A. Durand, *J Chromatogr B Biomed Appl* **1996**, *2*, 143-154
- [72] M. Dole, L. L. Mach, R. L. Hunes, R. C. Mobley, L. P. Ferguson, M. B. Alice, *J Chem Phys* **1968**, *5*, 2240-2249
- [73] M. E. Dowty, C. R. Dietsch, *Pharm Res* **1997**, *12*, 1792-1797
- [74] E. Duizer, C. van der Wulp, C. H. Versantvoort, J. P. Groten, *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, *1*, 395-402
- [75] P. J. Eddershaw, A. P. Beresford, M. K. Bayliss, *Drug Discov Today* **2000**, *9*, 409-414
- [76] T. H. Eichhold, R. E. Bailey, *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 504-511
- [77] T. H. Eichhold, R. E. Bailey, S. L. Tanguay, S. H. Hoke, 2nd, *J Mass Spectrom* **2000**, *4*, 504-511
- [78] M. A. Eisenberger, M. Laufer, N. J. Vogelzang, O. Sartor, D. Thornton, B. L. Neubauer, V. Sinibaldi, G. Lieskovsky, M. A. Carducci, M. Zahurak, D. Raghavan, *Urology* **2004**, *1*, 114-119
- [79] I. Elimrani, K. Lahjouji, E. Seidman, M. J. Roy, G. A. Mitchell, I. Qureshi, *Am J Physiol Gastrointest*

Liver Physiol **2003**, *5*, G863-871

- [80] K. Ellsworth, B. Azzolina, W. Baginsky, H. Bull, B. Chang, G. Cimis, S. Mitra, J. Toney, R. K. Bakshi, G. R. Rasmusson, R. L. Tolman, G. S. Harris, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, *4*, 377-384
- [81] F. Faassen, J. Kelder, J. Lenders, R. Onderwater, H. Vromans, *Pharm Res* **2003**, *2*, 177-186
- [82] F. Faassen, G. Vogel, H. Spanings, H. Vromans, *Int J Pharm* **2003**, *1-2*, 113-122
- [83] J. B. Fenn, *J Am Soc Mass Spectrom* **1993**, 524-535
- [84] A. Ferrali, G. Menchi, E. G. Occhiato, G. Danza, R. Mancina, M. Serio, A. Guarna, *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *1*, 145-148
- [85] A. Fiebeler, J. Nussberger, E. Shagdarsuren, S. Rong, G. Hilfenhaus, N. Al-Saadi, R. Dechend, M. Wellner, S. Meiners, C. Maser-Gluth, A. Y. Jeng, R. L. Webb, F. C. Luft, D. N. Muller, *Circulation* **2005**, *23*, 3087-3094
- [86] A. Fisher, E. Friel, R. Bernhardt, C. E. Gomez-Sanchez, J. M. Connell, R. Fraser, E. Davies, *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, 4326-4329
- [87] C. L. Foley, R. S. Kirby, *Curr Opin Urol* **2003**, *1*, 31-37
- [88] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, **7**, 1996 (pub. Urban&Fischer)
- [89] M.H. Friedman, *Nonequilibrium thermodynamics: Principles and models of biological transport*, **5**, 1986 (pub. Springer)
- [90] S. V. Frye, C. D. Haffner, P. R. Maloney, R. A. Mook, Jr., G. F. Dorsey, Jr., R. N. Hiner, K. W. Batchelor, H. N. Bramson, J. D. Stuart, S. L. Schweiker, *J Med Chem* **1993**, *26*, 4313-4315
- [91] S. V. Frye, C. D. Haffner, P. R. Maloney, R. A. Mook, Jr., G. F. Dorsey, Jr., R. N. Hiner, C. M. Cribbs, T. N. Wheeler, J. A. Ray, R. C. Andrews, *J Med Chem* **1994**, *15*, 2352-2360
- [92] T. Fujita, Y. Matsumoto, T. Kimura, S. Yokota, M. Sawada, M. Majima, Y. Ohtani, Y. Kumagai, *Br J Clin Pharmacol* **2002**, *3*, 283-294
- [93] J. W. Funder, *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, 139-142
- [94] J. W. Funder, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**, *2*, R356-357
- [95] J. W. Funder, *Curr Diab Rep* **2005**, *1*, 36-40
- [96] J. W. Funder, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2005**, *2-5*, 121-125
- [97] J. W. Funder, *Heart Fail Rev* **2005**, *1*, 15-22
- [98] J. W. Funder, *DDT* **2005**, *3*, 231-235
- [99] J. W. Funder, P. T. Pearce, R. Smith, A. I. Smith, *Science* **1988**, 583-585
- [100] E. N. Fung, I. Chu, C. Li, T. Liu, A. Soares, R. Morrison, A. A. Nomeir, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *18*, 2147-2152
- [101] L.-S. Gan, P.-H. Hsyu, J. F. Pritchard, D. Thakker, *Pharm Res* **1993**, *12*, 1722-1725
- [102] L.-S. L. Gan, D. Thakker, *Adv Drug Deliv Rev* **1997**, 77-98
- [103] A. Gangloff, A. Garneau, Y. W. Huang, F. V. Yang, S. X. Lin, *Biochem J* **2001**, 269-276
- [104] J. Geller, A. Kirchenbaum, H. Lepor, A. C. Levine, *J Clin Endocrinol Metab* **1995**, *3*, 745-747
- [105] C. Gerst, M. Dalko, P. Pichaud, J. B. Galey, B. Buan, B. A. Bernard, *Exp Dermatol* **2002**, *1*, 52-58

- [106] D. Giudici, G. Briatico, C. Cominato, T. Zaccheo, C. Lehle, M. Nesi, A. Panzeri, E. di Salle, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, 3, 299-305
- [107] M. J. Gnoth, S. Rudloff, C. Kunz, R. K. Kinne, *J Biol Chem* **2001**, 37, 34363-34370
- [108] C. E. Gomez-Sanchez, M. Zhou, E. N. Cozza, H. Morita, M. F. Foecking, E. P. Gomez-Sanchez, *Endocrinology* **1997b**, 3369-3373
- [109] S. Graham-Lorence, J. Peterson, *FASEB J* **1996**, 2, 206-214
- [110] M. Gröger, E.K. Kretzer, A. Woyke, Cyclodextrine, 2001, Science Forum, Universität Siegen, Didaktik der Chemie
- [111] P. Grosse, F. Bressolle, F. Pinguet, *Eur J Cancer* **1998**, 1, 168-174
- [112] A. Guarna, C. Belle, F. Machetti, E. G. Occhiato, A. H. Payne, C. Cassiani, A. Commerci, G. Danza, A. De Bellis, S. Dini, A. Marruca, M. Serio, *J Med Chem* **1997**, 7, 1112-1129
- [113] A. Guarna, F. Machetti, E. G. Occhiato, D. Scarpi, A. Commerci, G. Danza, R. Mancina, M. Serio, K. Hardy, *J Med Chem* **2000**, 20, 3718-3735
- [114] A. Guarna, E. G. Occhiato, G. Danza, A. Conti, M. Serio, *Steroids* **1998**, 5-6, 355-361
- [115] A. Guarna, E. G. Occhiato, F. Machetti, A. Marrucci, G. Danza, M. Serio, P. Paoli, *J Med Chem* **1997**, 21, 3466-3477
- [116] A. Guarna, E. G. Occhiato, F. Machetti, A. Trabocchi, D. Scarpi, G. Danza, R. Mancina, A. Commerci, M. Serio, *Bioorg Med Chem* **2001**, 6, 1385-1393
- [117] A. Guarna, E. G. Occhiato, D. Scarpi, R. Tsai, G. Danza, A. Commerci, R. Mancina, M. Serio, *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, 20, 2871-2876
- [118] A. Guarna, E. G. Occhiato, D. Scarpi, C. Zorn, G. Danza, A. Commerci, R. Mancina, M. Serio, *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, 4, 353-356
- [119] C. Gunnarsson, B. M. Olsson, O. Stal, *Cancer Res* **2001**, 8448-8451
- [120] P. Guo, S. Li, J. M. Gallo, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**, 1, 43-52
- [121] F. K. Habib, M. Ross, C. W. Bayne, K. Grigor, A. C. Buck, P. Bollina, K. Chapman, *J Endocrinol* **1998**, 3, 509-517
- [122] K. S. Hakala, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen, R. Kostianen, T. Kotiaho, *Anal Chem* **2003**, 21, 5969-5977
- [123] E. Harada, M. Yoshimura, H. Yasue, O. Nakagawa, M. Nakagawa, M. Harada, Y. Mizuno, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Ito, S. Nakamura, K. Kuwahara, Y. Saito, K. Nakao, H. Ogawa, *Circulation* **2001**, 2, 137-139
- [124] H. Hatakeyama, I. Miyamori, T. Fujita, Y. Takeda, R. Takeda, H. Yamamoto, *J Biol Chem* **1994**, 24316-24320
- [125] A. Häusler, P. R. Allegrini, M. Biollaz, C. Batzl, E. Scheidegger, A. S. Bhatnagar, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, 3-4, 187-195
- [126] A. Häusler, G. Monnet, C. Borer, A. S. Bhatnagar, *J Steroid Biochem* **1989**, 1-6, 567-570
- [127] A. Häusler, L. Schenkel, C. Krahenbuhl, G. Monnet, A. S. Bhatnagar, *J Steroid Biochem* **1989**, 1, 125-131

- [128] S. Hayward, R. Dahiya, G. Cunha, J. Bartek, N. Deshpande, P. Narayan, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1995**, *1*, 14-21
- [129] I. J. Hidalgo, *Curr Top Med Chem* **2001**, *5*, 385-401
- [130] I. J. Hidalgo, K. M. Hillgren, K. M. Grass, R. T. Borchardt, *Pharm Res* **1991**, *222*,
- [131] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, R. T. Borchardt, *Gastroenterology* **1989**, *3*, 736-749
- [132] I. J. Hidalgo, L. Jibin, *Adv Drug Deliv Rev* **1996**, 53-66
- [133] S. Hidetaka, *Pharm Res* **2000**, *6*, 761-765
- [134] B. Higgins, I. M. Thompson, *J Urol* **2004**, *2 Pt 2*, S15-17; discussion S18
- [135] C. Hilgendorf, H. Spahn-Langguth, C. G. Regardh, E. Lipka, G. L. Amidon, P. Langguth, *J Pharm Sci* **2000**, *1*, 63-75
- [136] A. R. Hilgers, R. A. Conradi, P. S. Burton, *Pharm Res* **1990**, *9*, 902-910
- [137] K. M. Hillgren, A. Kato, R. T. Borchardt, *Med Res Rev* **1995**, *2*, 83-109
- [138] J. Hirosumi, O. Nakayama, N. Chida, M. Inami, T. Fagan, K. Sawada, S. Shigematsu, H. Kojo, Y. Notsu, M. Okuhara, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, *4*, 365-373
- [139] J. Hirosumi, O. Nakayama, T. Fagan, K. Sawada, N. Chida, M. Inami, S. Takahashi, H. Kojo, Y. Notsu, M. Okuhara, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, *4*, 357-363
- [140] K. S. Hirsch, C. D. Jones, J. E. Audia, S. Andersson, L. McQuaid, N. B. Stamm, B. L. Neubauer, P. Pennington, R. E. Toomey, D. W. Russell, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *11*, 5277-5281
- [141] J. H. Hochman, M. Chiba, M. Yamazaki, C. Tang, J. H. Lin, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *1*, 323-330
- [142] R. Hoffmann, *Clin Exp Dermatol* **2002**, *5*, 373-382
- [143] D.A. Holt, M. A. Levy, B.W. Metcalf, Inhibition of Steroid 5-alpha-Reductase by Unsaturated 3-Carboxysteroids, *J Med Chem* **1990**, *33*, 943-950
- [144] G. J. Hooiveld, J. E. van Montfoort, D. K. Meijer, M. Muller, *Eur J Pharm Sci* **2000**, *1*, 13-30
- [145] L. Hovgaard, H. Brondsted, *Pharm Res* **1995**, *9*, 1328-1332
- [146] Y. Hsieh, *American Pharmaceutical Reviews* **2003**, 14-20
- [147] M. Hu, R. T. Borchardt, *Pharm Res* **1990**, *12*, 1313-1319
- [148] C. G. Huber, *J Chromatogr A* **1998**, *1*, 3-30
- [149] C. G. Huber, M. R. Buchmeiser, *Anal Chem* **1998**, *24*, 5288-5295
- [150] C. Huggins, C. V. Hodges, *J Urol* **2002**, *1*, 9-12
- [151] J. Hunter, B. H. Hirst, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 129-157
- [152] J. H. Hunter, B. H. Hirst, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 129-157
- [153] N. Ichihashi, Y. Kitajima, *Br J Dermatol* **2001**, *4*, 745-750
- [154] K. A. Iczkowski, J. Qiu, J. Qian, M. C. Somerville, R. S. Rittmaster, G. L. Andriole, D. G. Bostwick, *Urology* **2005**, *1*, 76-82
- [155] T. Imai, M. Imoto, H. Sakamoto, M. Hashimoto, *Drug Metab Dispos* **2005**, *8*, 1185-1190
- [156] F. M. Ingels, P. F. Augustijns, *J Pharm Sci* **2003**, *8*, 1545-1558
- [157] J. V. Iribarne, P. J. Dziedzic, *Int J Mass Spectrom Ion Phys* **1983**, 331-347
- [158] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J.Chem. Phys.* **1976**, 2287-2294

- [159] J. D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J. W. Tolan, H. E. Selick, J. R. Grove, *J Pharm Sci* **1999**, *1*, 28-33
- [160] M.J. Jackson, *Physiology of the Gastrointestinal Tract: Drug Transport across Gastrointestinal Epithelia* **1987** (pub. Raven Press)
- [161] M. Jemal, *Biomedical Chromatography* **2000**, 422-429
- [162] M. Jemal, D. J. Hawthorne, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, 61-66
- [163] M. Jemal, M. Huang, X. Jiang, Y. Mao, M. L. Powell, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *21*, 2125-2132
- [164] E. P. Jenkins, S. Andersson, J. Imperato-McGinley, J. D. Wilson, D. W. Russell, *J Clin Invest* **1992**, 293-300
- [165] C. D. Jones, J. E. Audia, D. E. Lawhorn, L. A. McQuaid, B. L. Neubauer, A. J. Pike, P. A. Pennington, N. B. Stamm, R. E. Toomey, K. S. Hirsch, *J Med Chem* **1993**, *3*, 421-423
- [166] H. Jornvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, *Biochemistry* **1995**, 6003-6013
- [167] D. N. Juurlink, M. M. Mamdani, D. S. Lee, A. Kopp, P. C. Austin, A. Laupacis, D. A. Redelmeier, *N Engl J Med* **2004**, 543-551
- [168] M. J. Kang, S. Mathur, R. W. Hartmann, *J Mass Spectrom* **2004**, *7*, 762-769
- [169] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J Med Chem* **1998**, *7*, 1007-1010
- [170] J. Karlsson, P. Artursson, *Int J Pharm* **1991**, *55*,
- [171] M. Katashima, K. Yamamoto, K. Haraguchi, Y. Tokuma, T. Hata, Y. Sawada, T. Iga, *Drug Metab Dispos* **1997**, *9*, 1051-1058
- [172] M. Katashima, K. Yamamoto, Y. Tokuma, T. Hata, Y. Sawada, T. Iga, *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, *3*, 914-920
- [173] T. Kawamoto, Y. Mitsuuchi, K. Toda, Y. Yokoyama, K. Mijiyahara, S. Miura, T. Ohnishi, Y. Ichikawa, K. Nakao, H. Imura, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 1458-1462
- [174] P. Kearney, C. Marriott, *Int J Pharm* **1987**, *211*,
- [175] D. W. Keetch, G. L. Andriole, *AJR Am J Roentgenol* **1995**, *1*, 11-17
- [176] W. A. Korfmacher, *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies*, **2005**, CRC press
- [177] W. A. Korfmacher, *Drug Discov Today* **2005**, *20*, 1357-1367
- [178] W. A. Korfmacher, *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies: Bioanalytical Assays in a Drug Discovery Environment*, **2005**, CRC press
- [179] T. Korjamo, P. Honkakoski, M. R. Toppinen, S. Niva, M. Reinisalo, J. J. Palmgren, J. Monkkonen, *Eur J Pharm Sci* **2005**, *3-4*, 266-279
- [180] H. Krebs, K. Henseleit, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* **1932**, 33-66
- [181] D. Kwok, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, Bioscienceworld 2006
- [182] F. Labrie, Y. Sugimoto, V. Luu-The, J. Simard, Y. Lachance, D. Bachvarov, G. Leblanc, F. Durocher, N. Paquet, *Endocrinology* **1992**, *3*, 1571-1573
- [183] L. Laitinen, H. Kangas, A. M. Kaukonen, K. Hakala, T. Kotiaho, R. Kostainen, J. Hirvonen, *Pharm Res* **2003**, *2*, 187-197

- [184] J. Lambeth, D. Seybert, J. Lancaster, J. Salerno, H. Kamin, *Mol Cell Biochem* **1982**, 13-31
- [185] L. J. Langer, L. L. Engel, *J Biol Chem* **1956**, 583-588
- [186] P. Larger, M. Altamura, R. M. Catalioto, S. Giuliani, C. A. Maggi, C. Valenti, A. Triolo, *Anal Chem* **2002**, *20*, 5273-5281
- [187] E. Le Ferrec, C. Chesne, P. Artusson, D. Brayden, G. Fabre, P. Gires, F. Guillou, M. Rousset, W. Rubas, M. L. Scarino, *Altern Lab Anim* **2001**, *6*, 649-668
- [188] K. Lee, D. R. Thakker, *J Pharm Sci* **1999**, *7*, 680-687
- [189] C. Lehle, F. Radvanyi, S. Gil Diez de Medina, L. H. Ouafik, H. Gerard, D. Chopin, J. P. Raynaud, P. M. Martin, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1999**, *5-6*, 189-195
- [190] W.D. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Konrad Triltsch GmbH, **1996**
- [191] H. Lennernas, *J Pharm Sci* **1998**, *4*, 403-410
- [192] D. Lesuisse, E. Albert, F. Bouchoux, E. Cerede, J. M. Lefrancois, M. O. Levif, S. Tessier, B. Tric, G. Teutsch, *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *13*, 1709-1712
- [193] D. Lesuisse, J. F. Gourvest, E. Albert, B. Doucet, C. Hartmann, J. M. Lefrancois, S. Tessier, B. Tric, G. Teutsch, *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *13*, 1713-1716
- [194] M. A. Levy, M. Brandt, K. M. Sheedy, J. T. Dinh, D. A. Holt, L. M. Garrison, D. J. Bergsma, B. W. Metcalf, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1994**, *2-3*, 197-206
- [195] A. P. Li, *DDT* **2001**, *7*, 357-365
- [196] X. Li, C. Chen, S. M. Singh, F. Labrie, *Steroids* **1995**, *6*, 430-441
- [197] X. Li, S. M. Singh, F. Labrie, *J Med Chem* **1995**, *7*, 1158-1173
- [198] T. Liang, M. A. Cascieri, A. H. Cheung, G. F. Reynolds, G. H. Rasmusson, *Endocrinology* **1985**, *2*, 571-579
- [199] T. Liang, C. E. Heiss, S. Ostrove, G. H. Rasmusson, A. Cheung, *Endocrinology* **1983**, *4*, 1460-1468
- [200] P. Lijnen, V. Petrov, *J Mol Cell Cardiol* **2000**, 865-879
- [201] S.-X. Lin, F. Yang, J.-Z. Jin, R. Breton, D.-W. Zhu, V. Luu-The, F. Labrie, *J Biol Chem* **1992**, 16182-16187
- [202] C. M. Lock, L. Chen, D. A. Volmer, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *17*, 1744-1754
- [203] T. Loftsson, *Pharmazie* **1998**, *11*, 733-740
- [204] T. Loftsson, *Nordic Industrial Fund* **1998**
- [205] R. Lösel, A. Schultz, M. Wehling, *Mol Cell Endocrinol* **2004**, 137-141
- [206] M. Lourdasamy, J. Cote, S. Laplante, F. Labrie, S. M. Singh, *Bioorg Med Chem* **1997**, *2*, 305-310
- [207] F. Luciani, A. Molinari, F. Lozupone, A. Calcabrini, L. Lugini, A. Stringaro, P. Puddu, G. Arancia, M. Cianfruglia, S. Fais, *Blood* **2002**, *2*, 641-648
- [208] V. Luu-The, Y. Sugimoto, L. Puy, Y. Labrie, I. Lopez Solache, M. Singh, F. Labrie, *J Invest Dermatol* **1994**, *2*, 221-226
- [209] R. J. MacFadyen, C. S. Barr, A. D. Struthers, *Cardiovasc. Res.* **1997**, 30-34
- [210] F. Machetti, A. Guarna, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2002**, 201-215

- [211] J.L. Madara, J.S. Trier, *Physiology of the Gastrointestinal Tract: Functional Morphology of the Mucosa of the Small Intestine*, Raven Press
- [212] V. D. Makhey, A. Guo, D. A. Norris, P. Hu, J. Yan, P. J. Sinko, *Pharm Res* **1998**, *8*, 1160-1167
- [213] F. Mantero, G. Lucarelli, *Ann. Endocrinol. (Paris)* **2000**, 52-60
- [214] Y. C. Martin, *J Med Chem* **1981**, 229,
- [215] S. Mathur, J. D. Park, D. H. Kim, R.W. Hartmann, *J Enz Inhib Med Chem* **2004**,
- [216] G. Mazzocchi, G. Nussdorfer, *Exp Clin Endocrinol* **1986**, 157-161
- [217] J. D. McConnell, *Urol Clin North Am* **1990**, *3*, 661-670
- [218] J. D. McConnell, R. Bruskewitz, P. Walsh, G. Anderiole, M. M. Lieber, H. Holtgrewe, *N Engl J Med* **1998**, 557-563
- [219] J. D. McConnell, J. D. Wilson, F. W. George, J. Geller, F. Pappas, E. Stoner, *J Clin Endocrinol Metab* **1992**, *3*, 505-508
- [220] A. M. McNulty, J. E. Audia, K. G. Bemis, R. L. Goode, V. P. Rocco, B. L. Neubauer, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2000**, *1-2*, 13-21
- [221] R. M. B. Menon, William H., *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **2002**, 317-326
- [222] P. Mineo, D. Vitalini, D. La Mendola, E. Rizzarelli, E. Scamporrino, G. Vecchio, *J Inorg Biochem* **2004**, *2*, 254-265
- [223] Y. Miyoshi, A. Ando, E. Shiba, T. Taguchi, Y. Tamaki, S. Noguchi, *Int J Cancer* **2001**, *5*, 685-689
- [224] N. Mizuno, T. Niwa, Y. Yotsumoto, Y. Sugiyama, *Pharmacol Rev* **2003**, *3*, 425-461
- [225] Y. Mizuno, M. Yoshimura, H. Yasue, T. Sakamoto, H. Ogawa, K. Kugiyama, E. Harada, M. Nakayama, S. Nakamura, T. Ito, Y. Shimasaki, Y. Saito, K. Nakao, *Circulation* **2001**, *1*, 72-77
- [226] H. Monkkonen, S. Tormalehto, K. Asunmaa, R. Niemi, S. Auriola, J. Vepsalainen, J. Monkkonen, *Eur J Pharm Sci* **2003**, *1*, 23-29
- [227] E. Mornet, J. Dupont, A. Vitek, P. C. White, *J Biol Chem* **1989**, 20961-20967
- [228] M. R. Moura, G. de Nucci, S. Rath, F. G. Reyes, *Anal Bioanal Chem* **2004**, *2*, 499-503
- [229] A. T. Murphy, M. J. Berna, J. L. Holsapple, B. L. Ackermann, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2002**, *6*, 537-543
- [230] S. Nakamura, M. Yoshimura, M. Nakayama, T. Ito, Y. Mizuno, E. Harada, T. Sakamoto, Y. Saito, K. Nakao, H. Yasue, H. Ogawa, *Circulation* **2004**, *13*, 1787-1793
- [231] T. Nakamura, *Pharm Res* **2003**, 324-327
- [232] R. K. Nam, A. Toi, D. Vesprini, M. Ho, W. Chu, S. Harvie, J. Sweet, J. Trachtenberg, M. A. Jewett, S. A. Narod, *Urology* **2001**, *1*, 199-204
- [233] A. B. Neithardt, R. B. Barnes, *Semin Reprod Med* **2003**, *3*, 285-293
- [234] B. L. Neubauer, H. M. Gray, C. W. Hanke, K. S. Hirsch, K. C. Hsiao, C. D. Jones, M. V. Kumar, D. E. Lawhorn, J. Lindzey, L. McQuaid, D. J. Tindall, R. E. Toomey, R. C. Yao, J. E. Audia, *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *6*, 2055-2060
- [235] W. M. Niessen, *Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry*, chapter 4, Marcel Dekker, 1999
- [236] W. M. Niessen, *J Chromatogr A* **1998**, *1-2*, 407-435

- [237] W. M. Niessen, *J Chromatogr A* **2003**, 1-2, 413-436
- [238] K. Nithipatikom, B. Holmes, M. A. Isbell, C. J. Hanke, C. E. Gomez-Sanchez, W. B. Campbell, *Anal Biochem* **2005**, 2, 203-210
- [239] Y. Niv, J. C. Byrd, S. B. Ho, Y. S. Kim, *Gastroenterology* **1989**, A366,
- [240] C. Ntais, A. Polycarpou, J. P. Ioannidis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**, 7, 618-624
- [241] A. K. Nussler, A. Wang, P. Neuhaus, J. Fischer, J. Yuan, L. Liu, K. Zeilinger, J. Gerlach, P. J. Arnold, W. Albrecht, *Altex* **2001**, 2, 91-101
- [242] H. Oberacher, W. Walcher, C. G. Huber, *J Mass Spectrom* **2003**, 1, 108-116
- [243] E. G. Occhiato, A. Ferrali, G. Menchi, A. Guarna, G. Danza, A. Comerci, R. Mancina, M. Serio, G. Garotta, A. Cavalli, M. De Vivo, M. Recanatini, *J Med Chem* **2004**, 14, 3546-3560
- [244] E. G. Occhiato, A. Guarna, G. Danza, M. Serio, *J Steroid Biochem Mol Biol* **2004**, 1, 1-16
- [245] T. Ogihara, I. Tamai, H. Takanaga, Y. Sai, A. Tsujii, *Pharm Res* **1996**, 12, 1828-1832
- [246] T. Ohkawa, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 1089-1099
- [247] N. Okudaira, I. Komiya, Y. Sugiyama, *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, 2, 717-723
- [248] N. Okudaira, T. Tatebayashi, G. C. Speirs, I. Komiya, Y. Sugiyama, *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, 2, 580-587
- [249] T. V. Olah, D. A. Mc Loughlin, J. D. Gilbert, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1997**, 1, 17-23
- [250] T. Omura, R. Sato, *J Biol Chem* **1964a**, 2379-2385
- [251] T. Omura, R. Sato, *J Biol Chem* **1964b**, 2379-2385
- [252] J. R. Pappenheimer, K. Z. Reiss, *J Membr Biol* **1987**, 123,
- [253] H. L. Parnes, I. M. Thompson, L. G. Ford, *J Clin Oncol* **2005**, 2, 368-377
- [254] O. Pelkonen, A. R. Boobis; U. Gundert-Remy, *Eur J Clin Pharmacol* **2001**, 621-629
- [255] H. Peltoketo, V. Luu-The, J. Simard, J. Adamski, *J Mol Endocrinol* **1999**, 1-11
- [256] T. M. Penning, *Endocrinology Reviews* **1997**, 281-305
- [257] W. H. Peters, H. M. Roelofs, *Biochem J* **1989**, 2, 613-616
- [258] N. Petri, C. Tannergren, D. Rungstad, H. Lennernas, *Pharm Res* **2004**, 8, 1398-1404
- [259] K. Petritis, *Journal of Chromatography A* **1999**, 147-155
- [260] F. Picard, S. Barassin, A. Mokhtarian, R. W. Hartmann, *J Med Chem* **2002**, 16, 3406-3417
- [261] F. Picard, E. Baston, W. Reichert, R. W. Hartmann, *Bioorg Med Chem* **2000**, 6, 1479-1487
- [262] F. Picard, T. SchulzR. W. Hartmann, *Bioorg Med Chem* **2002**, 2, 437-448
- [263] M. Pinto, *Biologie Cellulaire* **1983**, 323-330
- [264] B. Pitt, *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1995**, 145-149
- [265] B. Pitt, F. Zannad, W. J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky, J. Wittes, *N Engl J Med* **1999**, 709-717
- [266] L. R. Plageman, G. M. Pauletti, K. A. Skau, *Exp Biol Med (Maywood)* **2002**, 7, 480-486
- [267] D. Poirier, *Curr Med Chem* **2003**, 10, 453-477
- [268] J. W. Polli, M. Gimski, *Pharm Res* **1998**, 1, 47-52
- [269] J. W. Polli, S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster, C. S. Serabjit-

- Singh, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 2, 620-628
- [270] Powell, D.W., Physiology of the Gastrointestinal Tract: Intestinal water and electrolyte transport, chapter 46, Raven Press, 1987
- [271] T. Prueksaritanont, L. M. Gorham, J. H. Hochman, L. O. Tran, K. P. Vyas, *Drug Metab Dispos* **1996**, 6, 634-642
- [272] A. Purohit, H. Tutill, J. Day, S. Chander, H. Lawrence, G. Allan, D. Fischer, N. Vicker, S. Newman, B. Potter, M. Reed, *Mol Cell Endocrinol* **2006**, 1-2, 199-203
- [273] J. K. Reichardt, *Front Biosci* **1999**, D596-600
- [274] W. Reichert, J. Jose, R. W. Hartmann, *Arch Pharm (Weinheim)* **2000**, 7, 201-204
- [275] S. Ren, E. J. Lien, *Prog Drug Res* **2000**, 1-23
- [276] S. A. Roberts, *Xenobiotica* **2001**, 8-9, 557-589
- [277] E. M. Rocha, L. A. Wickham, L. A. da Silveira, K. L. Krenzer, F. S. Yu, I. Toda, B. D. Sullivan, D. A. Sullivan, *Br J Ophthalmol* **2000**, 1, 76-84
- [278] C. M. Roehrborn, LS; Fenter, T; Freedman, S; Tuttle, J; Gittlema, Morrill B; Wolford, ET, *Urology* **2004**, 4, 709-715
- [279] Rosenberg, *Arch Biochem Biophys* **1993**, 186-192
- [280] D.T.Rossi, Mass Spectrometry in Drug Discovery: The Impact of Ionic Pressure Ionization, Marcel Dekker AG, 2002
- [281] D. W. Russell, D. M. Berman, J. T. Bryant, K. M. Cala, D. L. Davis, C. P. Landrum, J. S. Prihoda, R. I. Silver, A. E. Thigpen, W. C. Wigley, *Recent Prog Horm Res* **1994**, 275-284
- [282] D. W. Russell, J. D. Wilson, *Annu Rev Biochem* **1994**, 25-61
- [283] S. Sabarinath, M. Rajanikanth, K. P. Madhusudanan, R. C. Gupta, *J Mass Spectrom* **2003**, 7, 732-742
- [284] H. Saito, Y. Fukasawa, Y. Otsubo, K. Yamada, H. Sezaki, S. Yamashita, *Pharm Res* **2000**, 6, 761-765
- [285] O. Salem, M. Frotscher, C. Scherer, A. Neugebauer, C. Biemel, M. Streiber, R. Maas, R. W. Hartmann, *Pharm Res* **2006**,
- [286] P. L. Sappington, X. Han, R. Yang, R. L. Delude, M. P. Fink, *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, 1, 464-476
- [287] M. Satoh, M. Nakamura, H. Saitoh, H. Satoh, T. Akatsu, J. Iwasaka, T. Masuda, K. Hiramori, *Clin Sci (Lond)* **2002**, 4, 381-386
- [288] K. Sawada, S. Okada, P. Golden, N. Kayakiri, Y. Sawada, M. Hashimoto, H. Tanaka, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1999**, 4, 481-491
- [289] Schardinger, *Unters Nahf Genusssm* **1903**, 865-880
- [290] P. Schmiedlin-Ren, K. E. Thummel, J. M. Fisher, M. F. Paine, P. B. Watkins, *Drug Metab Dispos* **2001**, 11, 1446-1453
- [291] J. I. Schwartz, W. K. Tanaka, D. Z. Wang, D. L. Ebel, L. A. Geissler, A. Dallob, B. Hafkin, B. J. Gertz, *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, 5, 1373-1377

- [292] J. I. Schwartz, A. Van Hecken, P. J. De Schepper, I. De Lepeleire, K. C. Lasseter, E. C. Shamblen, G. A. Winchell, M. L. Constanzer, C. M. Chavez, D. Z. Wang, D. L. Ebel, S. J. Justice, B. J. Gertz, *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *8*, 2942-2947
- [293] National Institute of General Medical Sciences, workshop on oral drug delivery, Interface between discovery and development- report and recommendations, Bethesda, 1993
- [294] A. Seelig, E. Landwojtowicz, *Eur J Pharm Sci* **2000**, *1*, 31-40
- [295] T. Sergent-Engelen, V. Delistrie, Y. J. Schneider, *Biochem Pharmacol* **1993**, *8*, 1393-1401
- [296] P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra, *Biotechnol Prog* **2006**, 186-198
- [297] R. B. Shah, A. Palamakula, M. A. Khan, *J Pharm Sci* **2004**, *4*, 1070-1082
- [298] A. Shibata, M. I. Garcia, I. Cheng, T. A. Stamey, J. E. McNeal, J. D. Brooks, S. Henderson, C. E. Remoto, D. M. Peehl, *Prostate* **2002**, *4*, 269-278
- [299] T. Shirakawa, H. Okada, B. Acharya, Z. Zhang, N. Hinata, Y. Wada, T. Uji, S. Kamidono, A. Gotoh, *Prostate* **2004**, *1*, 33-40
- [300] D. Siccardi, M. Gumbleton, Y. Omid, C. McGuigan, *Eur J Pharm Sci* **2004**, *1*, 25-31
- [301] C.P. Siegers, Biliary excretion of drugs and other chemicals: In vivo biliary excretion and the isolated perfused liver preparation, 1991, Gustav Fischer
- [302] R. I. Silver, E. L. Wiley, D. L. Davis, A. E. Thigpen, D. W. Russell, J. D. McConnell, *J Urol* **1994**, *2 Pt 1*, 433-437
- [303] R. I. Silver, E. L. Wiley, A. E. Thigpen, J. M. Guileyardo, J. D. McConnell, D. W. Russell, *J Urol* **1994**, *2 Pt 1*, 438-442
- [304] M. W. Sinz, Mass Spectrometry in Drug Discovery: The demand for drug discovery, 2002, Marcel Dekker
- [305] H. M. Siragy, C. Xue, P. Abadir, R. M. Carey, *Hypertension* **2005**, *1*, 133-137
- [306] D.A. Smith, H. van de Waterbeemd, D.K. Walker, Methods and Principles in Medicinal Chemistry: Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design, 2006, Wiley-VCH
- [307] E. C. Smith, L. A. McQuaid, R. L. Goode, A. M. McNulty, B. L. Neubauer, V. P. Rocco, J. E. Audia, *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *4*, 395-398
- [308] T. K. Smith, C. L. Gibson, B. J. Howlin, J. M. Pratt, *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *3*, 1028-1035
- [309] J. E. Soberman, K. T. Weber, *Curr Hypertens. Rep.* **2000**, 451-456
- [310] C. Souppart, N. Gauducheau, N. Sandrenan, F. Richard, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, *2*, 195-203
- [311] P. Span, C. Sweep, T. Benraad, A. Smals, *Eur J Endocrinol* **1996**, *3*, 386-392
- [312] B. Steffansen, C. U. Nielsen, B. Brodin, A. H. Eriksson, R. Andersen, S. Frokjaer, *Eur J Pharm Sci* **2004**, *1*, 3-16
- [313] J. F. Steiner, *Clin Pharmacokinet* **1996**, *1*, 16-27
- [314] R. H. Stephens, C. A. O'Neill, A. Warhurst, G. L. Carlson, M. Rowland, G. Warhurst, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *2*, 584-591

- [315] E. Stoner, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990**, *3*, 375-378
- [316] M. Streiber, F. Picard, C. Scherer, S. B. Seidel, R. W. Hartmann, *J Pharm Sci* **2005**, *3*, 473-480
- [317] K. Sugano, H. Hamada, M. Machida, H. Ushio, K. Saitoh, K. Terada, *Int J Pharm* **2001**, *1-2*, 181-188
- [318] J. Taipalensuu, *Eur J Pharm Sci* **2004**, 69-75
- [319] Y. Takahashi, H. Kondo, T. Yasuda, T. Watanabe, S. Kobayashi, S. Yokohama, *Int J Pharm* **2002**, *1-2*, 85-94
- [320] C. Tannergren, P. Langguth, K. J. Hoffmann, *Pharmazie* **2001**, *4*, 337-342
- [321] S. E. Taymans, S. Pack, E. Pak, D. J. Torpy, Z. Zhuang, C. A. Stratakis, *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 1033-1036
- [322] H. Thai, H. Van, M. Gaballa, S. Goldman, T. Raya, *Am J Physiol* **1999**, 873-880
- [323] M. Thevis, G. Opfermann, W. Schanzer, *J Mass Spectrom* **2003**, *11*, 1197-1206
- [324] D. Thiboutot, G. Harris, V. Iles, G. Cimis, K. Gilliland, S. Hagari, *J Invest Dermatol* **1995**, *2*, 209-214
- [325] A. E. Thigpen, D. L. Davis, T. Gautier, J. Imperato-McGinley, D. W. Russell, *N Engl J Med* **1992**, *17*, 1216-1219
- [326] A. E. Thigpen, R. I. Silver, J. M. Guileyardo, M. L. Casey, J. D. McConnell, D. W. Russell, *J Clin Invest* **1993**, *2*, 903-910
- [327] I. M. Thompson, P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, G. J. Miller, L. G. Ford, M. M. Lieber, R. D. Cespedes, J. N. Atkins, S. M. Lippman, S. M. Carlin, A. Ryan, C. M. Szczepanek, J. J. Crowley, C. A. Coltman, Jr., *N Engl J Med* **2003**, *3*, 215-224
- [328] I. M. Thompson, Jr., M. Kouril, E. A. Klein, C. A. Coltman, A. Ryan, P. Goodman, *Urology* **2001**, *4 Suppl 1*, 230-234
- [329] I. M. Thompson, C. Tangen, P. Goodman, *World J Urol* **2003**, *1*, 28-30
- [330] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J Chem Phys* **1979**, 4451-4463
- [331] P. R. Tiller, L. A. Romanyshyn, U. D. Neue, *Anal Bioanal Chem* **2003**, *5*, 788-802
- [332] S. Tolle-Sander, J. Rautio, S. Wring, J. W. Polli, J. E. Polli, *Pharm Res* **2003**, *5*, 757-764
- [333] R. L. Tolman, S. P. Sahoo, R. K. Bakshi, D. Gratale, G. Patel, S. Patel, J. Toney, B. Chang, G. S. Harris, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1997**, *5-6*, 303-309
- [334] M. D. Troutman, D. R. Thakker, *Pharm Res* **2003**, *8*, 1200-1209
- [335] P. F. Trunet, P. H. Mueller, F. Girard, B. Aupetit, A. S. Bhatnagar, F. Zognbi, F. Ezzet, J. Menard, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2005**, *3*, 571-576
- [336] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem Rev* **1998**, *5*, 2045-2076
- [337] S. Ulmschneider, U. Müller-Vieira, C. Klein, I. Antes, T. Lengauer, R.W. Hartmann, *J Med Chem* **2005a**, 1563-1575
- [338] S. Ulmschneider, U. Müller-Vieira, M. Mitrenga, R. W. Hartmann, S. Oberwinkler-Marchais, C. Klein, M. Bureik, R. Bernhardt, I. Antes, T. Lengauer, *J Med Chem* **2005b**, 1796-1805
- [339] H. van de Waterbeemd, *Eur J Pharm Sci* **2000**, *1*, 1
- [340] H. van de Waterbeemd, *J Med Chem* **2001**, 1313-1333,
- [341] J. van Gelder, S. Defirme, L. Naesens, E. De Clercq, G. van den Mooter, R. Kinget, P. Augustijns,

Drug Metab Dispos **2002**, *8*, 924-930

- [342] J. Van Gelder, M. Shafiee, E. De Clercq, F. Penninckx, G. Van den Mooter, R. Kinget, P. Augustijns, *Int J Pharm* **2000**, *1-2*, 93-100
- [343] M. V. Varma, Y. Ashokraj, C. S. Dey, R. Panchagnula, *Pharmacol Res* **2003**, *4*, 347-359
- [344] N. Varo, J. Etayo, G. Zalba, J. Beaumont, M. Iraburu, C. Montiel, M. Gil, I. Monreal, J. Diez, *J Hypertens* **1999**, 107-114
- [345] R. Venn, P. Macrae, P. Wright, A. Wright, Principles and Practice of Bioanalysis: LC/MS in Drug Discovery, Pfizer Global Research, 2000, European Pharmaceutical Review
- [346] A. Villiers, *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci.* **1891**, 435-438
- [347] G. P. Vinson, *Mol Cell Endocrinol* **2004**, *1-2*, 59-65
- [348] M. Voets, I. Antes, C. Scherer, U. Müller-Vieira, K. Biemel, C. Barassin, S. Oberwinkler-Marchais, R. W. Hartmann, *J Med Chem* **2005**, *21*, 6632-6642
- [349] M. Voets, I. Antes, C. Scherer, U. Müller-Vieira, K. Biemel, S. Oberwinkler-Marchais, R.W. Hartmann, *J Med Chem* **2006**, *7*, 2222-2231
- [350] M. Voets, U. Müller-Vieira, S. Oberwinkler-Marchais, R.W. Hartmann, *Arch Pharm Pharm Med Chem* **2004**, 411-416,
- [351] W. Voigt, S. L. Hsia, *J Biol Chem* **1973**, *12*, 4280-4285
- [352] U. K. Walle, T. Walle, *Carcinogenesis* **1999**, *11*, 2153-2157
- [353] L. Wang, R. Kulmacz, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, 409-422
- [354] Z. Wang, C. E. Hop, K. H. Leung, J. Pang, *J Mass Spectrom* **2000**, *1*, 71-76
- [355] G. Wenz, *Clinical Drug Investigation* **2000**, 21-25
- [356] P. C. White, *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, *6*, 2376-2383
- [357] C. Wilson, C. Washington, N. Washington, Physiological Pharmaceutics: Biological Barriers to Drug Absorption, chapter 11, 1989
- [358] J. D. Wilson, *J Control Release* 1990, 25-40
- [359] C. P. Wu, F. L. Gu, *Prog Clin Biol Res* **1991**, 249-255
- [360] Y. Xu, J. L. Grem, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**, *1*, 273-285
- [361] C. Xue, H. M. Siragy, *Hypertension* **2005**, *3*, 584-590
- [362] F. Yamashita, S. Wanchana, M. Hashida, *J Pharm Sci* **2002**, *10*, 2230-2239
- [363] S. Yamashita, T. Furubayashi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, H. Tokuda, *Eur J Pharm Sci* **2000**, *3*, 195-204
- [364] S. Yamashita, *J Pharm Sci* **2002**, *3*, 669-679
- [365] M. Yamazaki, W. E. Neway, T. Ohe, I. Chen, J. F. Rowe, J. H. Hochman, M. Chiba, J. H. Lin, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *3*, 723-735
- [366] P. Ye, C. J. Kenyon, S. M. Mc Kenzie, A. S. Jong, C. Miller, G. A. Gray, A. Wallace, A. S. Ryding, J. J. Mullins, M. W. McBride, D. Graham, R. Fraser, J. M. Connell, E. Davies, *Endocrinology* **2005**, *12*, 5287-5293
- [367] S. Yee, *Pharm Res* **1997**, *6*, 763-766

Literaturverzeichnis
- 282 -

- [368] M. Yoshioka, *Int J Cancer* **1991**, 916-921
- [369] E. Young, J. Lopez, V. Murphy-Weinberg, S. Watson, H. Akil, *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 3339-3345
- [370] K. Yunomae, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, *FEBS Lett* **2003**, 1-3, 225-231
- [371] F. Zannad, F. Alla, B. Dousset, A. Perez, B. Pitt, *Circulation* **2000**, 2700-2706
- [372] J. Zhao, A. Y. Yang, J. D. Rogers, *J Mass Spectrom* **2002**, 4, 421-433
- [373] M. Zhou, D. Xue, M. F. Foecking, C. E. Gomez-Sanchez, *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, 6, 523-528
- [374] C. Zhu, L. Jiang, T. M. Chen, K. Hwang, *Eur J Med Chem* **2002**, 5, 399-407

Zitierte Dissertationen

arbeitskreisintern:

Gertrud L. Grün:

Mammatumor-hemmende Aromatase-Inhibitoren vom Benzozykloalken-Typ: Untersuchungen zur Selektivität und in vivo-Wirkung.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1994

Franck Picard:

In vivo-active non steroidal 5 α -reductase inhibitors of the benzylidenepiperidene and biphenyl type: synthesis and biological evaluation.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2002

Ola Ibrahim Abdel Razek (Salem):

Design und Struktur-Wirkungsbeziehung von neuen Substanzen zur Behandlung von BPH (Benigner Prostatahyperplasie) – einer degenerativen Erkrankung der männlichen Bevölkerung im höheren Alter.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2003

Bärbel Panter:

Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der humanen 5 α -Reduktase Typ II.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2004

Ursula Müller-Vieira:

Selektive Inhibition der Aldosteronsynthese CYP11B2 als neues Therapiekonzept bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose. Entwicklung und Evaluierung einer Teststrategie unter besonderer Berücksichtigung der adrenocorticalen Tumorzelllinie NCI-H295R

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2005

Sarah Ulmschneider:

Synthese, biologische Testung und Entwicklung eines Pharmakophormodells von nichtsteroidalen Hemmstoffen der Aldosteronsynthese (CYP11B2) vom Typ heterozyklische Methylen-Tetrahydronaphthaline und -indane.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2005

Marieke Voets:

Synthesis and evaluation of selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) of the naphthalene and dihydronaphthalene type for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2005

Ulrich Dossou:

Vorhersage der Absorption auf der Basis von physikalisch-chemischen Parametern und Verbesserung der Absorptionseigenschaften potentieller Arzneistoffe.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2006

arbeitskreisextern:

Matthias Becker:

LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosidantibiotika

Bergische Universität, Wuppertal, 2005

Zitierte Diplomarbeiten

arbeitskreisintern:

Erika Ziegler:

Synthese nichtsteroidaler Inhibitoren der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1.

Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2004

Anhang

1. HPLC/MS/MS-Methoden

1.1. Massenspektrometrie

Bei der Optimierung der massenspektrometrischen Methoden (tunes) wurden bei der Elektrosprayionisation unter Verwendung des MS/MS-Messmodus (SRM, MRM) v.a. die „collision energy“ und auch der „tube lens offset“ substanzspezifisch angepasst, beim MS-Messmodus (SIM) nur der „tube lens offset“. Weniger wichtig für die Detektion war die Veränderung anderer Parameter wie „spray voltage“ (3800-4000V), „sheat gas pressure“ (Stickstoff: 25psi), „auxiliary gas pressure“ (Stickstoff: 8psi), „capillary temperature“ (350°C) und „collision pressure“ (1,5mTorr) (s. Tabellen 1-6 „ESI-Messungen“). Bei der Verwendung der APCI wurden alle Parameter optimiert. Sowohl im positiven als auch im negativen Messmodus wurden meist die Pseudomolekularionen als „parent ions“ detektiert ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) (SIM: selected ion monitoring), sowie bei Bedarf ein intensives, charakteristisches Fragment (SRM: selected reaction monitoring). Die wichtigsten Methoden sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

➤ Referenzen für Caco-2 Tests

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
Atenolol	MRM, (+)	267,1	30	145,0
Erythromycin	MRM, (+)	734,3	32	158,0
Ketoprofen	MRM, (+)	254,9	16	209,1
Testosteron	MRM, (+)	289,0	30	108,6
Verapamil ¹	SRM, (+)	455,1	32	165,1
Ranitidin-HCl ²	SRM, (+)	315,1	22	175,0

¹ P-gp-Inhibitor, ² in späteren Caco-2 Tests durch Atenolol und Erythromycin ersetzt

Tabelle1: ESI-Messungen

➤ **Interne Standards für LLE**

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
FP42	SRM, (+)	426,2	32	320,2
OR19	SRM, (+)	333,1	26	163,0
Metoclopramid-HCl	SRM, (+)	300,1	22	227,0
Androstendion	SRM, (+)	287,3	24	109,1
Naproxen	SRM, (+)	231,1	20	185,1

Tabelle 2: ESI-Messungen

➤ **5 α -Reduktase-Projekt**

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
OR65	SRM, (+)	413,0	30	277,0
FP7	SRM, (+)	423,3	34	97,4
1a	SRM, (+)	438,2	38	232,1
2a	SRM, (+)	456,2	30	248,2
3a	SRM, (+)	468,2	32	262,1
MS2	SRM, (+)	454,2	32	262,2
MS3	SRM, (+)	482,2	30	276,3
MS4	SRM, (+)	496,3	28	454,3
MS5	SRM, (+)	424,3	34	135,2
MS6	SRM, (+)	410,3	34	135,2
UD1	SIM (+)	436,6		
UD2	SIM (+)	453,6		
UD3	SIM (+)	451,6		
MS1d	SRM, (+)	498,3	30	290,1
MS1e	SRM, (+)	510,3	28	304,2
IBE	SRM, (+)	510,3	28	304,2
MS4a	SRM, (+)	388,3	22	262,2
MS7a	SRM, (+)	516,2	40	97,3

Tabelle 3: ESI-Messungen

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
MS9a	SRM, (+)	472,4	40	372,3
FP13a	SRM, (+)	444,2	32	338,2
FP14a	SRM, (+)	456,3	24	262,2
Z1	SRM, (+)	437,3	36	183,1
Z3	SRM, (+)	467,3	28	261,2

Tabelle 3-Fortsetzung: ESI-Messungen

➤ **17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase1- Projekt**

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
AO 3D	SRM, (-)	260,9	34	232,2
AO 5	SRM, (-)	261,0	34	233,3
EJB100A	SRM, (+)	270,2	36	107,3
EJB102C	SRM, (+)	271,1	10	193,1
EJB110A	SRM, (+)	271,0	18	193,0
EJB114A	SRM, (+)	283,3	26	250,4
EJB114B	SRM, (+)	283,2	24	250,3
EJB139A	SRM, (+)	280,9	16	203,1
EJB159C	SRM, (+)	254,8	14	177,0
EJB161A	SRM, (+)	270,9	16	193,1
EJB69p	SRM, (+)	254,9	10	177,0
EZ128B	SRM, (-)	312,0	16	310,3
EZ13E	SRM, (-)	234,9	14	234,2
EZ140A4	SRM, (+)	344,1	30	329,2
EZ141B	SRM, (+)	405,1	16	373,3
EZ227	SRM, (-)	326,0	34	235,2
EZ247	SRM, (+)	490,3	30	311,3
MX 8	SRM, (-)	259,9	34	232,2
OAS 59	SRM, (-)	266,9	28	225,2
SOM19C	SRM, (-)	238,0	30	210,1
TD10C	SRM, (+)	356,0	24	263,2

Tabelle 4: ESI-Messungen

➤ **CYP11B2- Projekt**

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
Fadrozol	SRM, (+)	224,0	38	81,0
MV18	SRM, (+)	208,1	30	206,1
MV20	SRM, (+)	195,1	34	167,0
MV22	SRM, (+)	206,1	42	178,0
MV23	SRM, (+)	236,1	26	221,1
MV26	SRM, (+)	194,0	32	192,1
MV28	SRM, (+)	222,0	30	194,2
MV31	SRM, (+)	283,9	42	204,1
MV38	SRM, (+)	269,9	34	227,0
MV40	SRM, (+)	270,0	34	227,0
MV41	SRM, (+)	303,9	36	261,0
MV42	SRM, (+)	316,0	34	220,0
MV43	SRM, (+)	238,0	28	223,1
MV45	SRM, (+)	237,9	28	223,1
MV46	SRM, (+)	222,0	30	206,1
MV51	SRM, (+)	222,0	34	206,1
MV55	SRM, (+)	231,0	38	203,1
MV57	SRM, (+)	264,1	44	204,1
MV64	SRM, (+)	236,1	34	192,1
SU11A	SRM, (+)	226,3	30	211,1
SU20A	SRM, (+)	227,1	20	200,1
TS3	SRM, (+)	208,4	30	193,1

Tabelle 5: ESI-Messungen

➤ **PAMPA/ PAMPORE/ Caco-2-Vergleich**

Verbindung	Messmodus, (Polarität)	Parent Ion	Collision Energy [V]	Product Ion
BW70	SRM, (+)	254,8	24	81,0
EB4	SRM, (+)	287,1	20	177,0
EB8	SRM, (+)	353,1	34	134,1
GW104	SRM, (+)	241,4	24	81,2
GW114	SRM, (+)	256,8	34	81,2
GW22	SRM, (+)	241,9	24	221,0
GW91	SRM, (+)	224,9	30	81,1
MM16	SRM, (+)	255,9	20	254,1

Tabelle 6: ESI-Messungen

1.2. HPLC-Methoden

-Säulen: EC 50/3 Nucleodur 100-3 C18 ec Macherey-Nagel (Düren, Germany)

-Vorsäulen: CC 8/3 Nucleodur 100-3 C18 ec Macherey-Nagel (Düren, Germany)

-Lösungsmittelgemische über 4-Kanal-Pumpe mit Entgaser

➤ Caco-2-Referenzen

Fließmittel	A: Methanol mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure C: Aqua bidest mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure
Verhältnis von A zu C	0-1min: 5 zu 95, 1-7min: 95 zu 5, 7-8min: 5 zu 95
Fluss, Druck (max.)	350µl/min, 120 bar
Injektionsvolumen Autosampler	15µl, partial loop
Schaltventil	0-1,5min: Abfall, 1,5-8min: Ionenquelle

➤ 5 α -Reduktase-Inhibitoren

Fließmittel	C: Aqua bidest mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure D: Acetonitril/ Methanol (8/2) und 0,1% Ameisensäure
Verhältnis von C zu D	0-1,5min: 90 zu 10, 2-9min: 90 zu 10 9-10min: 90 zu 10
Fluss, Druck (max.)	350µl/min, 90 bar
Injektionsvolumen Autosampler	15µl, partial loop
Schaltventil	0-2min: Abfall, 2-10min: Ionenquelle

➤ **CYP11B2-Inhibitoren**

Fließmittel	A: Methanol mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure C: Aqua bidest mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure
Verhältnis von A zu C	0-2min: 10 zu 90, 2,5min: 75 zu 25, 4,0min: 95 zu 5, 7,5min: 95 zu 5 8min: 10 zu 90 9min: 10 zu 90
Fluss, Druck (max.)	350µl/min, 110 bar
Injektionsvolumen Autosampler	20µl, partial loop
Schaltventil	0-2min: Abfall, 2-9min: Ionenquelle

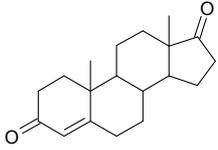
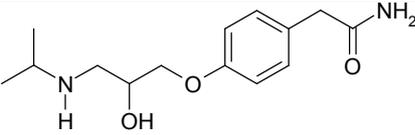
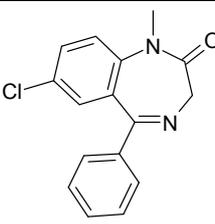
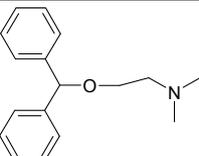
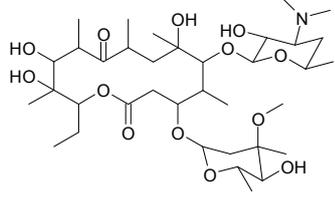
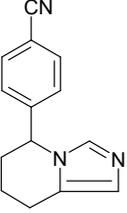
➤ **17 β -HSD1-Inhibitoren**

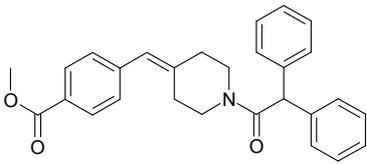
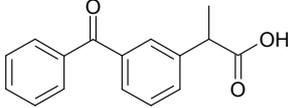
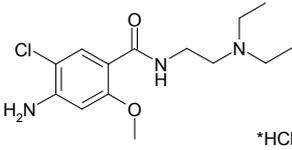
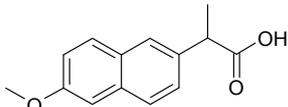
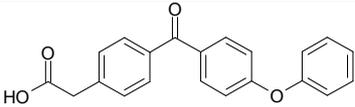
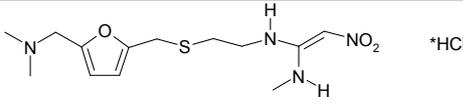
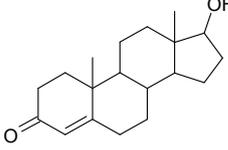
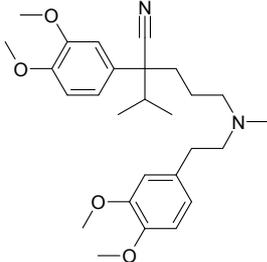
Fließmittel	A: Methanol mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure C: Aqua bidest mit 0,1% Ameisensäure (0,1 % Ammoniumhydroxid für negativen Modus)
Verhältnis von A zu C	0-1min: 10 zu 90, 1-1,2min: 95 zu 5, 9min: 95 zu 5, 10min: 10 zu 90
Fluss, Druck (max.)	350 μ l/min, 120 bar
Injektionsvolumen Autosampler	20 μ l, partial loop
Schaltventil	0-1min: Abfall, 1-10min: Ionenquelle

➤ **PAMPA/ PAMPORE/ Caco-2-Vergleich**

Fließmittel	A: Methanol mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure C: Aqua bidest mit 10mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure
Verhältnis von A zu C	0-1min: 10 zu 90, 1,5min- 9 min: 95zu 5 10min: 10 zu 90
Fluss, Druck (max.)	350 μ l/min, 120 bar
Injektionsvolumen Autosampler	20 μ l, partial loop
Schaltventil	0-1min: Abfall, 1-10min: Ionenquelle

2. Zusätzliche Strukturformeln

Verbindung	Strukturformel
Androstendion	
Atenolol	
Diazepam	
Diphenhydramin	
Erythromycin	
Fadrozol	

FP42	
Ketoprofen	
Metoclopramid-HCl	
Naproxen	
OR19	
Ranitidin-HCl	
Testosteron	
Verapamil	

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Rolf W. Hartmann für seine umfassende Unterstützung bei allen Fragestellungen, für die vielfältige projektübergreifende Thematik und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem danke ich folgenden Personen und Institutionen:

-Herrn Prof. Michael Veith sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft/ Deutsch-Französischen Hochschule für die Vergabe eines Doktorandenstipendiums im Rahmen des Europäischen Graduiertenkollegs 532, aufgrund dessen ich erste interessante Erfahrungen in einer internationalen und interdisziplinären Forschergruppe sammeln konnte.

In diesem Kontext danke ich ebenfalls Herrn Dr. Markus Ehes für die stete Hilfsbereitschaft.

- Herrn Juniorprofessor Claus Jacob für die Übernahme des Koreferates.

-Herrn Prof. Heinzle für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

-Herrn Dr. Stefan Boettcher für die Übernahme des Beisitzes der Prüfungskommission.

-Herrn Dr. Martin Frotscher für die sehr gute Betreuung während der Promotionszeit.

-Frau Dr. Stefanie Seidel für die Unterstützung bei allen berufsbezogenen Fragestellungen.

-Den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern von Pharmacelsus für ihre Kooperation und Hilfe bei Problemen, im Besonderen Dr. Christine Batzl-Hartmann, Dr. Ruth Maas (Jose), Yvonne Koch-Kirsch, Lorenz Mahs und Dr. Klaus Biemel.

-Allen Kollegen für die problemlose Zusammenarbeit.

Ich danke besonders denjenigen Kollegen, die für ein optimales Arbeitsklima- und teilweise mehr- gesorgt haben. (Falls ich hier vergessen haben sollte, jemanden zu erwähnen, der es erwartet hätte, möge er dies entschuldigen 😊.)

