

Hybridinhibitoren der humanen 5 α -Reduktase

Ein neues Konzept zur Hemmung der 5 α -Reduktase Isoenzyme Typ I und Typ II

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

von
Martina Streiber
Saarbrücken
2006

Tag des Kolloquiums: 15.03.2007

Dekan: Prof. Dr. K. Hegetschweiler

Berichterstatter: Prof. Dr. R.W. Hartmann

Diese Arbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. R. W. Hartmann in der Fachrichtung 8.2 Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes von November 2002 bis August 2006.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. Die 5α-Reduktase	1
1.1 Reaktion und Isoenzyme	1
1.2 Enzymatischer Mechanismus	3
1.3 Gewebeverteilung	4
2. Physiologie von Testosteron und Dihydrotestosteron	5
3. Androgenabhängige Erkrankungen	6
3.1 Benigne Prostatahyperplasie	6
3.2 Prostatakrebs	9
3.3 Hirsutismus, Akne und androgenetische Alopezie	13
4. Inhibitoren der 5αR	14
4.1 Steroidale Inhibitoren	14
4.2 Nicht-steroidale Inhibitoren	16
II. ZIELSETZUNG	21
III. ERGEBNISSE	23
1. Untersuchung der Ester-Prodrug-Strategie potenter Inhibitoren der 5αR	23
1.1 Subzelluläre Fraktionierung mit DU145 Zellen zur Lokalisierung der Esterase-Aktivität	25
1.2 Entwicklung eines DU145 zellfreien Assays	27
1.2.1 Wahl der Zellzahl	27
1.2.2 Zellaufschluss und Zentrifugation	27
1.2.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen	29
1.2.4 Inkubationszeit	31
1.2.5 K_M -Wert-Bestimmung	32
1.2.6 Einführung von Referenzverbindungen	34
1.3 Testung von Inhibitoren an den zellfreien Assays für 5 α R1 und 5 α R2	34

2. Entwicklung des Hybridinhibitor-Konzepts	37
2.1 Voraussetzungen für einen erfolgreichen Hybridinhibitor	37
2.2 Stabilitätsuntersuchungen der Hybridhemmstoffe	37
2.2.1 Stabilität in Puffer	37
2.2.2 Stabilität in humanem Plasma	38
2.2.3 Labilität in BPH-Gewebehomogenat	38
2.2.4 Stabilität in Caco-2 Zellhomogenat	39
2.2.5 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen	40
2.2.6 Vergleich der eingesetzten biologischen Medien	40
2.3 Fazit und Bewertung des Hybridinhibitor-Konzepts	41
3. Screening der hauseigenen Substanzbibliothek nach weiteren Hybridhemmstoffen	43
4. Optimierung der Teststrategie	48
4.1 Entwicklung des HEK-I Homogenattests	49
4.1.1 Wahl der Zellzahl	49
4.1.2 Zellaufschluss	49
4.1.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen	50
4.1.4 Inkubationszeit	52
4.1.5 K_M -Wert-Bestimmung	53
4.2 Entwicklung des HEK-II Homogenattest	55
4.2.1 Wahl der Zellzahl	55
4.2.2 Zellaufschluss	55
4.2.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen	55
4.2.4 Inkubationszeit	57
4.2.5 K_M -Wert-Bestimmung	58
4.3 Verifizierung und Bewertung der neu entwickelten Testsysteme für 5 α R1 und 5 α R2	60
4.4 Entwicklung eines DU145 Zellpermeationsassays	62
4.4.1 Testvorbereitung und Inkubation	62
4.4.2 Teststopp und Probenaufarbeitung	63
4.4.3 Auswertung und Wiederfindungsrate	64
4.4.4 Methodenentwicklung mittels HPLC-MS/MS	65

4.4.5	Ergebnisse	66
4.4.6	Bewertung der Ergebnisse	67
4.4.7	Esteraseaktivität außerhalb der DU145 Zellen	68
5.	Synthese und Testung neuer Hybridinhibitoren	69
5.1	Verschiedene Substanzklassen	69
5.1.1	Carbonsäuren und korrespondierende Methylester mit Biphenylstruktur	69
5.1.1.1.	Synthese von 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure und -methylester	70
5.1.1.2.	Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2	71
5.1.2	N-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure und -methylester	71
5.1.2.1.	Synthese	72
5.1.2.2.	Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2	73
5.2	Optimierung der Ausgangsverbindungen	74
5.2.1	Einfluss des Ester-Restes R auf die Hemmaktivität der 5 α R1	75
5.2.1.1.	Synthesestrategie	75
5.2.1.2.	Hemmung der humanen 5 α R	79
5.2.2	Einfluss des Restes X auf die Hemmung der 5 α R Isoenzyme	81
5.2.2.1.	Synthese	81
5.2.2.2.	Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2	82
5.2.3	Einfluss des Substituenten Y auf die Hemmung der 5 α R Isoenzyme	84
5.2.3.1.	Synthese	85
5.2.3.2.	Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2	86
5.2.4	Ersatz der Ester-Gruppe durch eine Methylamid-Gruppe	87
5.2.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Hybridhemmsstoffe	89
5.3	Stabilitätsuntersuchungen und Permeation von aktiven Hybridhemmstoffen	94
5.3.1	Vergleich der eingesetzten biologischen Medien	94
5.3.2	Stabilitätsuntersuchungen an Methylestern mit Variationsstelle X	95
5.3.3	Stabilitätsuntersuchungen an homologen Estern	96
5.3.4	Stabilitätsuntersuchungen an Methylamiden und Methylestern mit Variationsstelle Y	98
5.3.5	Permeation in DU145 Zellen als Modell für das Target	99
5.3.6	Bewertung der Untersuchungen auf Stabilität und Permeation	101

6. In vivo Untersuchungen an Ratten	105
6.1 In vitro Hemmung der 5 α R Isoenzyme der Ratte	105
6.2 In vitro Experimente zur Stabilität von Methylester 1a	107
6.3 In vivo Hemmaktivität in der Ratte	109
6.4 Bewertung der in vitro / in vivo Ergebnisse	111
IV. DISKUSSION	113
1. Das Hybridinhibitor-Konzept – Eine neue Strategie zur Hemmung der 5αR1 und 5αR2	113
2. Hemmung der 5αR Isoenzyme durch Hybridinhibitoren	116
3. Bewertung der Teststrategie	119
V. ZUSAMMENFASSUNG	124
VI. SUMMARY	127
VII. MATERIAL	130
1. Chemikalien	130
2. Materialien für die Zellkultur	131
3. Zelllinien	131
4. Medien und Standardlösungen	132
4.1 RPMI-Medium (für DU145 Zellen)	132
4.2 DMEM-Medium (für HEK-Zellen)	132
4.3 PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	133
4.4 Homogenat-Puffer	133
4.5 Tris-Test-Puffer	133
4.6 Citrat-Puffer	133
4.7 Phosphat-Puffer	134
4.8 NADPH regenerierendes System (Stammlösung)	134
4.9 Proteinbestimmungsreagenz nach Bradford (1976)	134

5. Geräte	135
VIII. BIOCHEMISCHE METHODEN	137
1. Arbeitstechniken mit Zellkulturen	137
1.1 Kultivierung der Zelllinien	137
1.2 Zubereitung der Zellkulturmedien	137
1.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	138
1.4 Passagieren eukaryontischer Zellen	139
1.4.1 Passagieren von DU145 Zellen	139
1.4.2 Passagieren von HEK-I und HEK-II Zellen	140
1.5 Zellzahlbestimmung	140
1.6 DU145 Mikrosomenpräparation	142
1.7 Fraktionierte Zentrifugation mit DU145 Zellhomogenat	143
1.8 HEK Zellhomogenat	144
1.9 Bestimmung des Gesamtproteingehalts	145
2. Gewebeaufarbeitungen	146
2.1 Rattenprostata-Mikrosomenpräparation für 5 α R-Assays	146
2.2 BPH-Mikrosomenpräparation für 5 α R-Assay	146
2.3 Gewinnung von humanem Plasma für Stabilitätstest	147
2.4 BPH-Homogenat für Stabilitätstest	147
2.5 Rattenprostata-Homogenat für Stabilitätstest	148
2.6 Bestimmung der Gesamtesterase-Aktivität	148
3. Testverfahren zur 5αR-Aktivitätsbestimmung	149
3.1 BPH-Mikrosomenassay	149
3.2 Rattenprostata-Mikrosomenassay (RVP1 und RVP2)	150
3.3 DU145 Zellassay	151
3.4 DU145 Mikrosomenassay	152
3.5 HEK-I und HEK-II Homogenatassay	154
3.6 5 α R-Aktivitätsmessung mittels Radio-HPLC	155
3.7 Bestimmung von prozentualen Hemmwerten und IC ₅₀ -Werten	156
3.8 K _M -Wert-Bestimmung	157

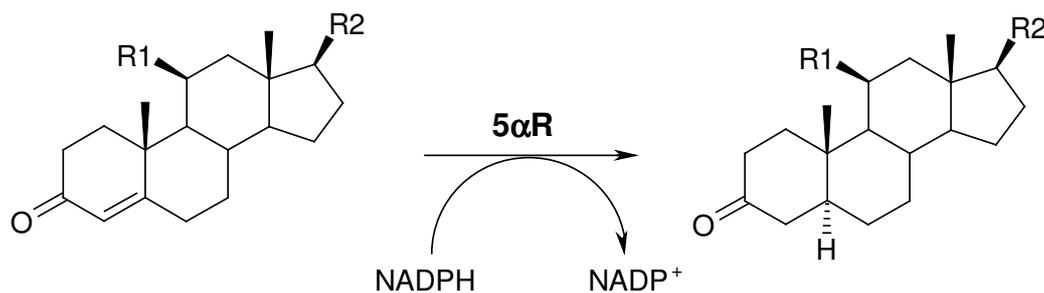
4. Testung auf Stabilität / Labilität	158
4.1 Puffer-Stabilität	158
4.2 Stabilität in humanem Plasma	158
4.3 Labilität in BPH-Homogenat	159
4.4 Stabilität in Rattenprostata-Homogenat	159
4.5 Auswertung mittels HPLC	159
4.6 Auswertung mittels HPLC-MS/MS	160
5. DU145 Permeationsassay	163
IX. SYNTHESE	164
1. Allgemeines	164
2. Methoden	165
3. Elementaranalysen	193
4. Reinheitsbestimmungen mittels HPLC-MS/MS	194
X. ABKÜRZUNGEN	195
XI. LITERATURVERZEICHNIS	197
1. Zitierte Dissertationen	197
2. Zitierte Publikationen	198

I. Einleitung

1. Die 5 α -Reduktase

1.1 Reaktion und Isoenzyme

Das Enzym 5 α -Reduktase (3-Oxo-5 α -Steroid- Δ^4 -Dehydrogenase; 5 α R) ist ein NADPH-abhängiges Membranprotein und katalysiert irreversibel die Reduktion von 4-en-3-Oxosteroiden zu den entsprechenden 5 α -3-Oxoverbindungen. Die wichtigste katalysierte Reaktion ist die Umwandlung von Testosteron (T) zum potentesten Androgen Dihydrotestosteron (DHT). DHT hat die höchste Affinität zum Androgenrezeptor und ist in die Pathogenese und Progression von androgenabhängigen Erkrankungen involviert.



4-en-3-Oxosteroide	R1	R2	5 α -3-Oxosteroide
Testosteron	H	OH	5 α -Dihydrotestosteron
4-Androsten-3,17-dion	H	=O	5 α -Androstan-3,17-dion
Progesteron	H	COCH ₃	5 α -Dihydroprogesteron
Corticosteron	OH	COCH ₃	5 α -Dihydrocorticosteron

Abbildung I.1: Reaktionen der 5 α -Reduktase¹

Im Menschen existieren zwei Gene, die je für verschiedene 5 α R Isoenzyme kodieren. Entsprechend der chronologischen Reihenfolge, in welcher Anfang der 90er die cDNAs der beiden Isoenzyme kloniert wurden, werden die Enzyme als 5 α -Reduktase Typ 1 und 5 α -Reduktase Typ 2 bezeichnet.^{2,3}

Es handelt sich um sehr lipophile Enzyme mit mehreren Transmembranhelices, die sich in ihren kinetischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Während die humane $5\alpha R2$ ein relativ scharfes Optimum bei pH 5,5 hat, zeigt sich für das Isoenzym 1 ein breites Optimum von pH 6,0 bis pH 8,5.^{2,4} Außerdem besitzt die $5\alpha R2$ eine größere Affinität zum Substrat Testosteron ($K_M \approx 4 - 50 \text{ nM}$) im Vergleich zur $5\alpha R1$ ($K_M \approx 1 - 5 \mu\text{M}$). Wird AD als Substrat verwendet, so zeigt das Isoenzym 2 einen ähnlichen K_M -Wert wie für Testosteron. Bei der Isoform 1 hingegen ist die Affinität von AD viel größer als die von T.⁵

Auch in der Ratte existieren 2 Isoenzyme der $5\alpha R$, die im Vergleich zu den menschlichen Enzymen andere Eigenschaften besitzen.^{3,6} Diese Unterschiede sind schon in der Identität der Aminosäuresequenzen begründet, wie die unten dargestellte Abbildung I.2 verdeutlicht.

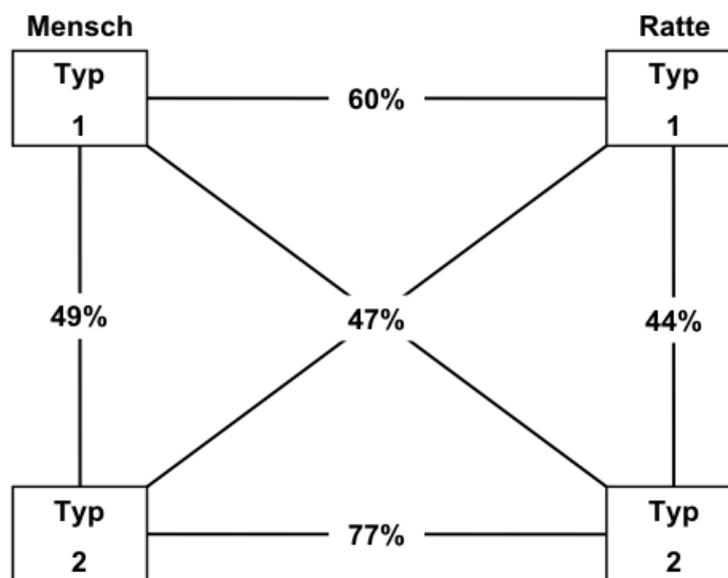


Abbildung I.2: Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen den 5α -Reduktase Isoenzymen⁶

Die Identität der Aminosäuren ist für dieselben Isoenzyme beider Spezies größer verglichen mit der Identität der $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ einer Spezies. Allerdings stimmen das Isoenzym 1 der Ratte und des Menschen auch nur zu 60 % überein.

Zusätzlich ist das Expressionsmuster der beiden Isoformen in Ratte und Mensch unterschiedlich. Im Gegensatz zur humanen Prostata beispielsweise, besitzen die $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ in der Prostata der Ratte ähnliche Aktivitäten.

1.2 Enzymatischer Mechanismus

In einem Experiment mit Rattenleber wurde durch Verwendung von $\text{NADP}[^3\text{H}]$ anstelle von NADPH die Aufnahme von ^3H in DHT nachgewiesen, das nicht wieder ausgetauscht werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde nach Reduktion von T in tritiiertem Wasser das ^3H in DHT unter basischen Bedingungen leicht ausgetauscht.^{7,8} Diese Experimente ließen keinen Zweifel daran, dass der Hydridtransfer von NADPH an der 5α -Position des Testosterons mit anschließender Protonierung durch das Solvent in Position 4 erfolgte.¹ So wurde der enzymatische Mechanismus für die $5\alpha\text{R}$ postuliert, wie er in Abbildung I.3 dargestellt ist.

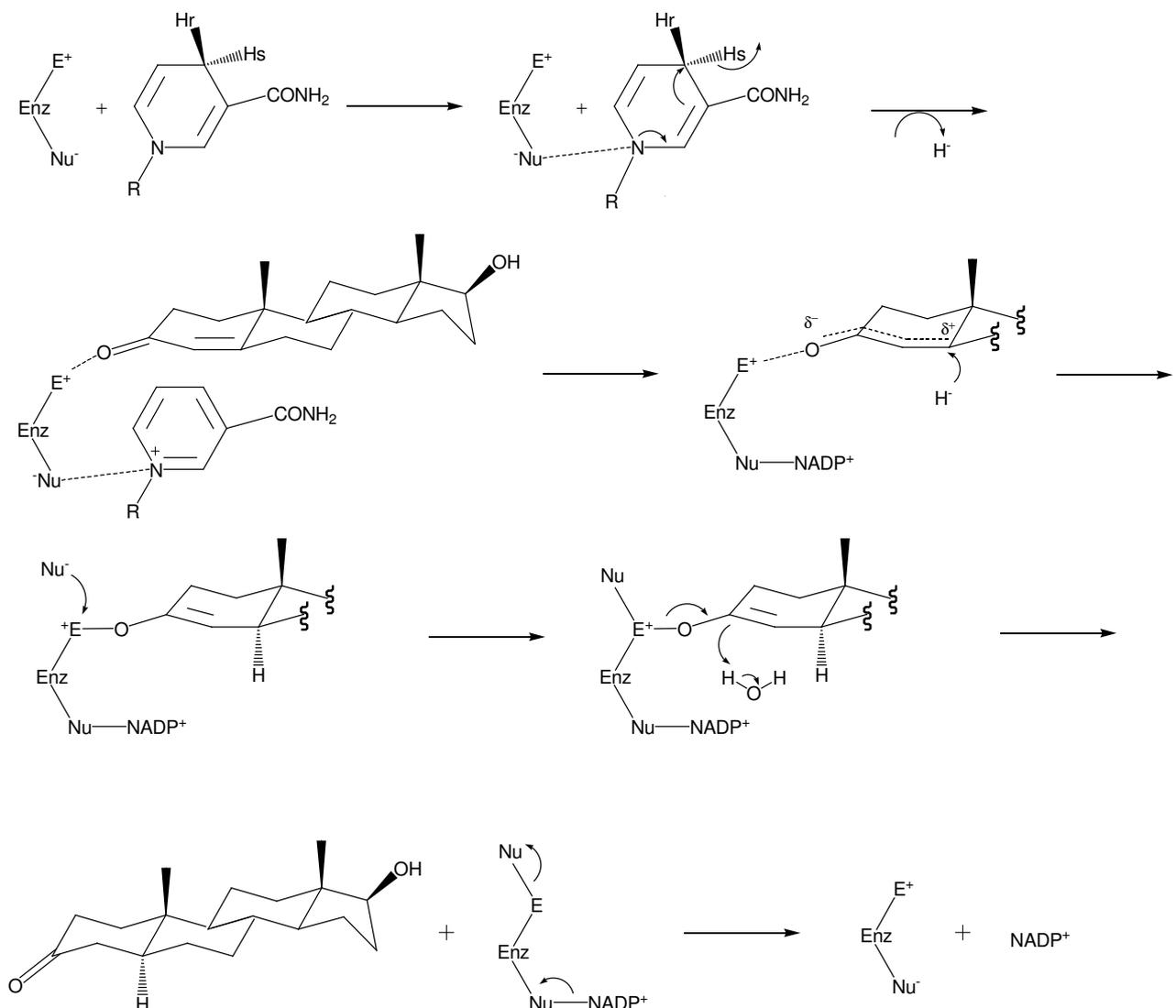


Abbildung I.3: Katalytischer Mechanismus der $5\alpha\text{R}$; Enz = Enzym; E^+ = Elektrophiles Zentrum; Nu^- = Nukleophiles Zentrum; R = Adenin Dinukleotid Phosphate

Diesen Prozess kann man als Aktivierung eines Enons durch einen elektrophilen Rest (E^+ , positiv geladene Gruppe) im aktiven Zentrum des Enzyms verstehen. Dabei entsteht zunächst ein delokalisiertes Carbokation, das vom NADPH ein Hydrid-Ion selektiv an C-5 aufnimmt. Dieser ternäre Komplex aus E-NADP⁺-DHT setzt dann durch Enzym-vermittelte Tautomerie das Produkt DHT frei und es entsteht ein binärer Enzym-NADP⁺-Komplex. Dieser zerfällt schließlich in NADP⁺ und das freie Enzym, das so für einen neuen Katalyse-Zyklus bereitsteht.¹

1.3 Gewebeverteilung

Zur Gewebeverteilung der 5 α R Isoenzyme im Menschen gibt es viele verschiedene Auffassungen. Anfang der 90er Jahre ging man davon aus, dass in der Prostata, den Nebenhoden und der Genitalhaut ausschließlich 5 α R2 vorkommt, während in anderen Geweben (Kopfhaut und Nichtgenitalhaut) vor allem die 5 α R1 exprimiert wird.⁹ Somit könnte der Haut als größtem Organ des menschlichen Körpers bei der Produktion der Androgene eine wichtige Rolle zukommen, die aber noch geklärt werden muss.¹⁰

Nach und nach konnte gezeigt werden, dass 5 α R1 ebenfalls in geringerem Maße als das Isoenzym 2 in der Prostata lokalisiert ist.¹¹⁻¹⁴ In den Stroma- und Basalzellen der Prostata findet sich 5 α R2 Aktivität, während in den Epithelzellen vor allem die 5 α R1 exprimiert wird.^{11,13} Warum in der Prostata beide Isoformen der 5 α R zu finden sind und auch Aktivität aufweisen, bleibt noch zu klären.

Beide Isoenzyme wurden außerdem in Geweben wie Niere, Leber, Muskelzellen, Haarfollikel, cerebraler Kortex, dem Auge und der Plazenta nachgewiesen.^{10,14-17}

2. Physiologie von Testosteron und Dihydrotestosteron

Der Precursor des Steroidhormons Dihydrotestosteron (DHT) ist Testosteron (T). Der Hauptteil an T wird durch den Einfluss der Hypophysen- und Hypothalamushormone in den Leydig Zellen der Hoden gebildet. In der Nebennierenrinde findet ebenfalls zu einem geringeren Teil die Bildung von T statt. Freies Testosteron diffundiert passiv in die Zellen, um dort entweder von der $5\alpha R$ in DHT oder von der Aromatase in Estradiol umgewandelt zu werden (siehe Abbildung I.7).

Nach dem Transport von DHT zum Target-Gewebe (z.B. Prostata), bindet es an den zuvor inaktiven, cytosolischen Androgenrezeptor und löst so eine Kaskade von Reaktionen aus, die notwendig für die Bildung von Signalfaktoren sind, die das Zellwachstum regulieren. Im Nukleus binden dann 2 DHT-Rezeptor-Komplexe an Androgen Response Elemente, die ihrerseits die Transkription von Genen modulieren. In der Prostata zum Beispiel führt die Bindung des DHT-Rezeptor-Komplexes an die DNA zur Expression von Prostata spezifischem Antigen (PSA) und weiteren regulatorischen Proteinen, die Wachstum und Funktionen der Zelle modulieren.¹⁸ DHT ist das potenteste endogene Androgen und besitzt wesentlich höhere Affinität zum Androgen-Rezeptor als Testosteron.

T ist beim Fötus für die Anlage der internen Sexualorgane (Nebenhoden, Samenblasen, Duktus deferens) verantwortlich und während der Pubertät für die sexuelle Differenzierung und Virilisierung. Beim erwachsenen Mann ist T wichtig zur Aufrechterhaltung des männlichen Phänotypus und der Sexualfunktion und wirkt so anabol auf die Muskulatur. Es ist in verschiedene metabolische Prozesse involviert, ebenso wie in den Knochenstoffwechsel oder die Hämatopoese. Mit dem Alter sinken die Serumkonzentrationen an T, was mehrere Folgen haben kann: Reduktion der Muskelmasse, zunehmende Demineralisation der Knochen (klinisches Bild der Osteoporose), Abnahme der Erythrozytenzahl, Verminderung des Hämoglobins, sowie Abnahme der Libido und der Potenz.

DHT ist verantwortlich für die Differenzierung der fötalen Prostata und während der Pubertät für die Entwicklung der externen Genitalen sowie für Wachstum und Differenzierung der Prostata. Beim Adulten moduliert DHT die Funktion der Prostata und stimuliert die Produktion des Samenbläschensekrets. Die zahlreichen pathophysiologischen Effekte des DHT werden im nächsten Kapitel behandelt.

3. Androgenabhängige Erkrankungen

Die Zellproliferation und das Absterben der Zellen werden durch Wachstumsfaktoren moduliert und stehen beim normalen Zellwachstum in einem Gleichgewicht. Die Expression einiger Wachstumsfaktoren (IGFs, KGF, EGF, TGF- β) wird auch durch DHT beeinflusst. Liegt DHT in einer physiologisch zu hohen Konzentration vor, so gerät dieses Gleichgewicht aus dem Lot (siehe Abbildung I.4). Die Zellproliferation wird gesteigert, während gleichzeitig die Apoptoserate abnimmt. Die Folge davon ist eine starke Vermehrung der Zellen, wie es pathologisch bei BPH (Benigner Prostatahyperplasie) oder Prostatakrebs auftritt.¹⁸

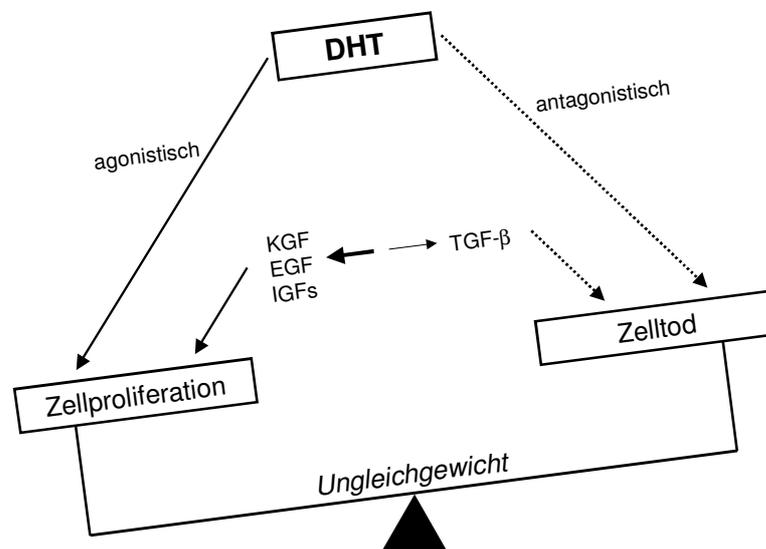


Abbildung I.4: Pathologisches Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod in der Prostata bei androgenabhängigen Erkrankungen¹⁸

3.1 Benigne Prostatahyperplasie

Die BPH ist die häufigste gutartige Tumorerkrankung der Prostata. Über 90% der 80-jährigen Männer sind davon betroffen.¹⁸ Es handelt sich um eine echte hyperplastische Erkrankung: die Zellzahl nimmt zu und die DNA-Synthese ist gesteigert.¹⁹ Wie Abbildung I.5 zeigt, ist die Prostata anatomisch so lokalisiert, dass sie direkt unter der Harnblase die Urethra umgibt. Als Konsequenz der Wucherung dieses periurethralen Prostatagewebes kommt es zu einer Einengung der Harnröhre,

was mit typischen Symptomen wie starkem nächtlichem Harndrang (Nykturie), schmerzhaftem Harndrang (Dysurie), Drang zu häufigem Wasserlassen ohne vermehrte Ausscheidung (Pollakisurie) bis hin zu Harnverhalten mit Restharnbildung einhergeht.

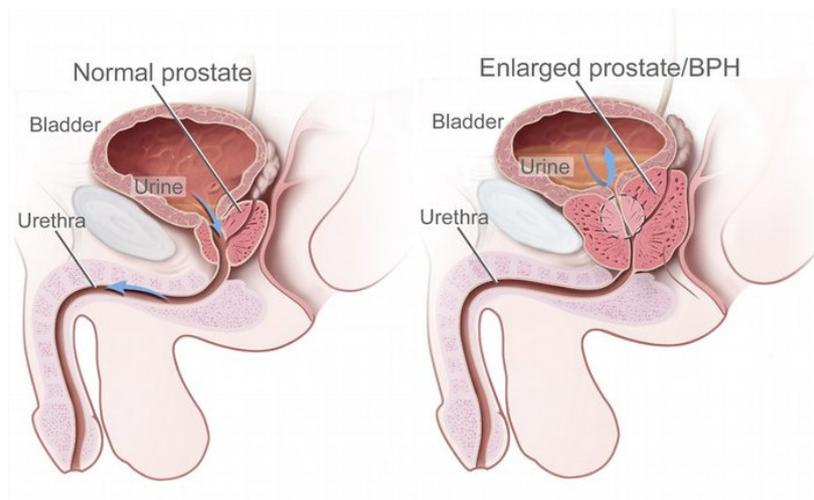


Abbildung I.5: Prostata in Normalzustand und nach Gewebewucherung bei BPH; Quelle: NCI Homepage

Bei der Entstehung der BPH spielen Androgene eine unterstützende Rolle in Kombination mit dem Alterungsprozess. Die T-Konzentration nimmt mit dem Alter ab, während die DHT-Konzentration im Fall einer Erkrankung gleich hoch bleibt.¹⁹

Wegen der Androgenabhängigkeit der Erkrankung werden zur Therapie 5 α R-Inhibitoren eingesetzt. Neben α_1 -Rezeptorantagonisten, die aber nur die Symptomatik verbessern können, und der operativen Entfernung des Gewebes durch transurethrale Resektion (TURP), sind die Enzyminhibitoren das Mittel der Wahl. Die Zellproliferation wird durch die Hemmung der Synthese von Wachstumsfaktoren vermindert, ebenso wie die antagonistische Wirkung von TGF- β auf die Apoptose verringert wird. So kann eine Reduktion des Prostatavolumens um 20 – 30% erzielt werden, wodurch auch die Symptomatik deutlich gebessert wird.¹⁸

Auf dem Arzneimittelmarkt sind zwei 5 α R Inhibitoren mit 4-Azasteroid-Struktur zur Behandlung der BPH zugelassen, nämlich Finasterid (Proscar[®]) und Dutasterid (Avodart[®]). Finasterid ist ein selektiver und vermeintlich kompetitiver Hemmstoff der humanen 5 α R2, mit der dieser langsam einen stabilen Enzymkomplex bildet.^{20,21} Es

handelt sich deshalb um einen sogenannten "slow time-dependent inhibitor". Der Abbau dieses Komplexes dauert mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Tagen sehr lange. Proscar[®] wird seit 1999 in einer täglichen Dosis von 5 mg zur Behandlung der BPH eingesetzt. Wie eine klinische Studie zeigen konnte, wurde bei Patienten mit BPH, die Finasterid täglich über 4 Jahre einnahmen, die DHT-Konzentration im Serum um ca. 70 % gesenkt, was mit einer mittleren Reduktion des Prostatavolumens um ca. 20 % einherging.²² Das restliche Serum-DHT resultierte wohl aus der Aktivität der 5 α R1, die bei der eingesetzten klinischen Dosis nicht gehemmt wird.²³ Dutasterid ist hingegen ein dualer Hemmstoff der 5 α R1 und 5 α R2 und ebenfalls ein "slow time-dependent inhibitor".^{21,24} Dieser steroidale Hemmstoff ist seit 2003 zur Behandlung der BPH auf dem Markt und ist in der Lage, bei einer täglichen Dosis von nur 0,5 mg die Serum-DHT-Konzentration um etwa 94 % zu senken.²⁵ Diese Daten belegen, dass Dutasterid aufgrund seiner dualen Hemmung der 5 α R Isoenzyme der potentere Inhibitor ist. Ein direkter *in vitro* Vergleich zwischen Finasterid und Dutasterid zeigte ebenfalls die generelle Überlegenheit des dualen Hemmstoffs.²⁶ Bei beiden steroidalen Hemmstoffen, Finasterid und Dutasterid, sind häufig vorkommende Nebenwirkungen Impotenz und veränderte Libido, neben gelegentlich auftretenden Ejakulationsstörungen und Gynäkomastie. Immerhin zeigten 19 % aller Patienten in einer Placebo-kontrollierten Phase III Studie unter Dutasterid Behandlung Nebenwirkungen.

Früher wurde angenommen, dass DHT nur lokal in normalen und hyperplastischen Prostata-Epithelzellen von der 5 α R2 produziert wird. Weitere Studien legen nahe, dass intraprostatiches DHT vor allem in Stroma- und Basalzellen der Prostata entsteht.^{27,28} Neueste Studien zeigen nun, dass sowohl in Epithelzellen (5 α R1) als auch in Stroma- und Basalzellen (5 α R2) der Prostata 5 α R-Aktivität nachzuweisen ist.¹¹ Also ist der Effekt von DHT auf die Epithelzellen auch parakriner und nicht nur, wie früher angenommen, autokriner Natur. Weiterhin kann man die Hypothese aufstellen, dass DHT – produziert von der 5 α R1 in peripherem Gewebe wie Haut und Leber – einen echten endokrinen Effekt auf die Prostata ausüben kann.¹⁹ So wird ebenfalls die äußerst wichtige Rolle des Einsatzes von dualen 5 α R-Inhibitoren zur möglichst kompletten Unterdrückung der DHT-Produktion in der Behandlung der BPH deutlich.

3.2 Prostatakrebs

Mit 19% aller Neuerkrankungen stellt das Prostata Karzinom (PCa) die häufigste Krebserkrankung bei Männern dar. Derzeit werden jährlich etwa 40.600 Prostatakarzinome in Deutschland diagnostiziert (Robert-Koch-Institut, 2004). Die Verbreitung von Prostatakrebs ist in den letzten 10 Jahren stetig gestiegen, einerseits wegen der immer älter werdenden Bevölkerung, andererseits auch wegen des Anstiegs an verbesserten Screening Tests.²⁹

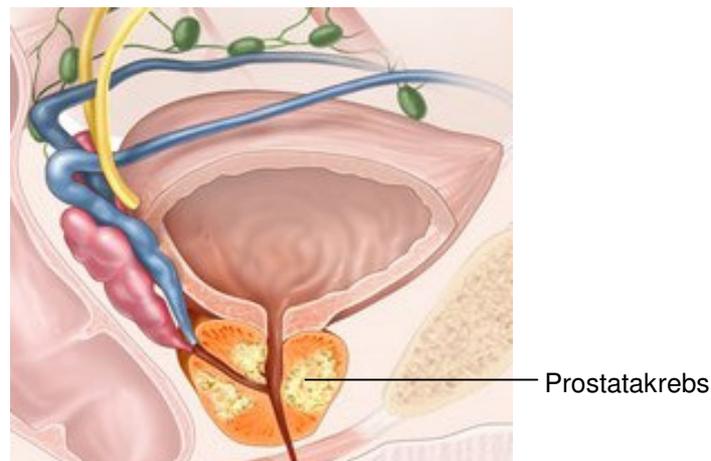


Abbildung I.6: Prostatakrebs; Quelle: NCI Homepage

Die genauen Ursachen für die Entstehung des PCa sind zum großen Teil unbekannt. Die einzigen etablierten Risikofaktoren sind Alter, familiäres Risiko und eine genetische Prädisposition, da verschiedene ethnische Gruppen unterschiedlich häufig an PCa erkranken.³⁰ Es wird außerdem der Zusammenhang zwischen verschiedenen Polymorphismen der 5 α R Typ 2 und der Entstehung von Prostatakrebs vermutet.³¹⁻³³ Die Androgen-Abhängigkeit von Prostatakrebs ist allerdings offensichtlich seit der klassischen Studie von Huggins und Hodges (1941), die den Rückgang der fortgeschrittenen Krankheit nach Kastration zeigte.³⁴ Der Einfluss der Androgene auf die Prostata-Karzinogenese wird auch dadurch verdeutlicht, dass weder Eunuchen noch Männer mit angeborenem 5 α R Defizit Prostatakrebs entwickeln.^{35,36}

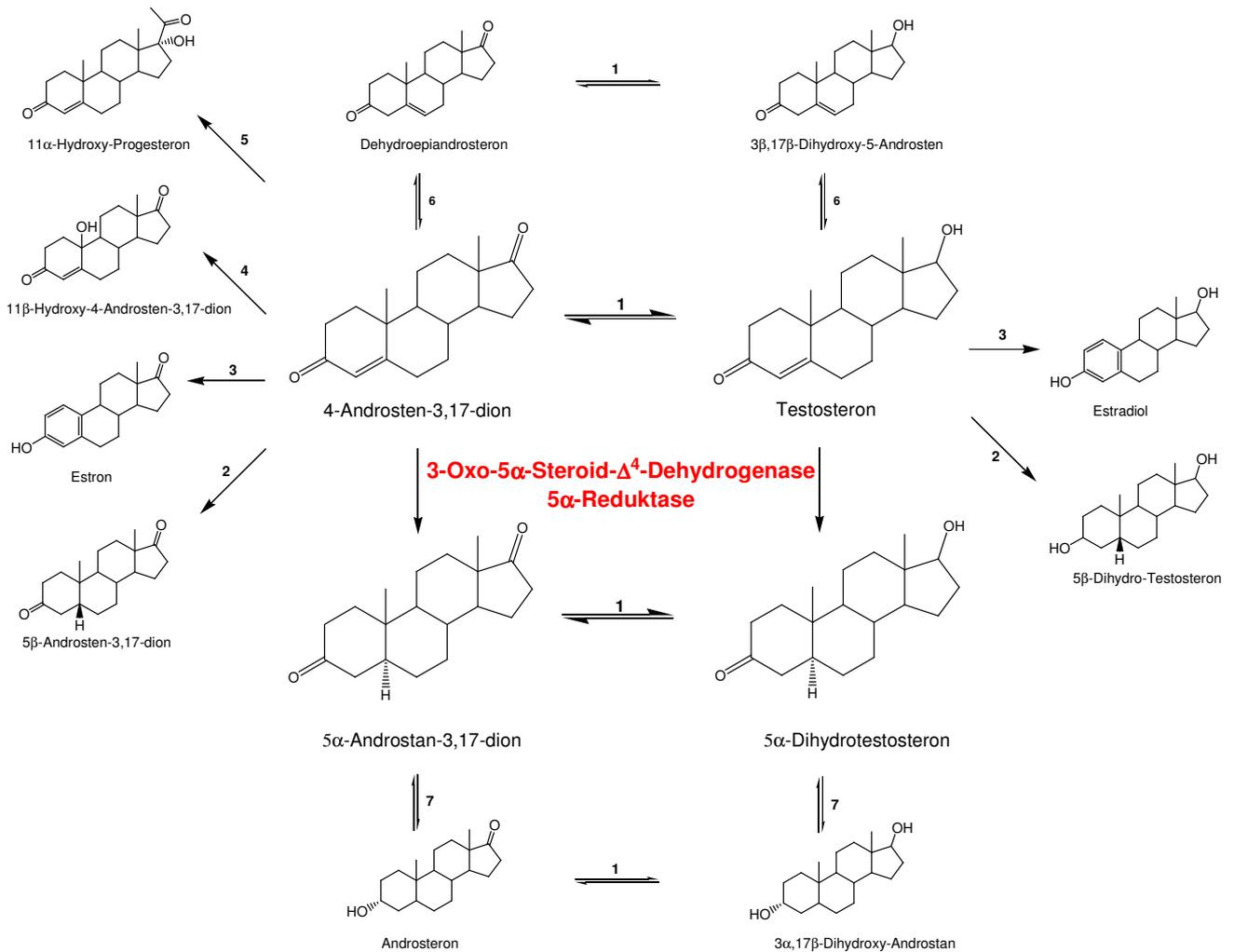


Abbildung I.7: Metabolismus und Biosynthese von Testosteron und Androstendion

- 1 17 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
- 2 3-Oxo-5 β - Δ^4 -Dehydrogenase
- 3 Aromatase
- 4 Steroid-19-Hydroxylase
- 5 17 α -Hydroxylase
- 6 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Steroid-Dehydrogenase und Δ^5 -Steroid Isomerase
- 7 3 α -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase

Den proliferativen Effekt der Androgene auf die Prostata zu verhindern, stellt noch 60 Jahre später den Eckpfeiler der Therapieansätze des PCa dar. Die Reduktion von T oder 4-Androsten-3,17-dion (AD) zu DHT beziehungsweise 5 α -Androstan-3,17-dion (DHAD) ist der letzte Schritt in der Androgenbiosynthese (siehe Abbildung I.7). Obwohl DHT die größte Affinität zum Androgenrezeptor hat, sollte aber der Einfluss

aller männlichen Sexualhormone minimiert werden, um den größtmöglichen Effekt zu erzielen. 5 α R-Inhibitoren sind bis jetzt deshalb nicht Mittel der Wahl.

Allerdings wurde ein dualer 5 α R-Inhibitor (LY320236) in einer klinischen Phase I-Studie als Therapieansatz zur Behandlung des PCa geprüft.³⁷ Der Wirkstoff zeigte einen positiven Effekt auf den Verlauf der Erkrankung, auch die PSA-Level sanken. Überraschenderweise waren weder die DHT noch die T-Konzentrationen vermindert, sondern es war ein Anstieg der Estradiol-Konzentration zu verzeichnen. Durch die Blockade der 5 α R liegt ein Substratüberschuss vor, was zu einer erhöhten Aromatisierung der Δ 4-Androgene führen kann (siehe Abbildung I.7). Estrogene wirken zum einen zentral antigonadotrop und können so über eine LH-Suppression zum Abfall des Testosteron-Levels führen. Andererseits wirken sie direkt auf die Prostata und führen dort zu einer Suppression der Testosteronaufnahme in die Zelle und zu einer Hemmung der DHT-Bindung an den Rezeptorkomplex. Wie diese Studie bisher zeigen konnte, stellen also auch 5 α R-Inhibitoren eine vielversprechende Therapiemöglichkeit des PCa dar.

Der Fokus bei Prostatakrebs liegt bisher auf einer möglichst frühen Diagnose und anschließender Behandlung beispielsweise mit Antiandrogenen. Da die Prostata-Karzinogenese ein Langzeitprozess ist, in den viele verschiedene Mechanismen verwickelt sind, kann die Chemoprävention hier eine bessere Möglichkeit bieten.³⁸ Der 5 α R-Inhibitor Finasterid wurde deshalb in einer prospektiven Studie in den USA, der Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT), getestet.³⁹⁻⁴³ Im Rahmen dieser groß angelegten klinischen Phase III-Studie wurde untersucht, ob die Prophylaxe mit Finasterid die Entstehung des PCa auch beim Menschen verhindern kann. Eine Prostata-Biopsy sollte nach Ablauf der 7 Jahre langen Studie den wahren Effekt von Finasterid auf die Entwicklung von Prostatakrebs zeigen. Das Hauptergebnis war die Beobachtung, dass die Prävalenz einer PCa-Erkrankung in der mit Finasterid behandelten Gruppe um 24,8% gesunken war (relativ zur Placebo-Gruppe).^{40,43} Allerdings wurde in der mit Finasterid behandelten Gruppe auch ein Anstieg an high-grade Prostatakrebs verzeichnet. Diese aggressivere Art des Krebses wurde nur anhand des Gleason-Scores festgelegt. Bostwick et. al.⁴⁴ verfassten 2004 ein umfassendes Review über die Morphologie von normalem und malignem Prostatagewebe nach Finasterid-Behandlung. Finasterid (ebenso wie Antiandrogene)

kann histologische Veränderungen hervorrufen, die in einem scheinbar höheren Gleason-Score (Bewertungssystem der Aggressivität von Prostatakrebs anhand mikroskopischer Untersuchungen der Differenzierung von PCa-Zellen) resultieren und damit das Bild eines aggressiveren Prostatakrebses vermitteln. Deshalb sollte der Gleason-Score als Endpunktuntersuchung bei solchen Studien nicht verwendet werden, um die Ergebnisse nicht ins Negative zu verzerren.⁴⁴ Das positive Ergebnis, dass Finasterid PCa verhindern kann sowie die reduzierten Probleme beim Harndrang müssen nun abgewogen werden gegen sexuelle Nebenwirkungen und das vermeintlich erhöhte Risiko an high-grade Prostatakrebs zu erkranken.^{40,42}

Dutasterid, ein steroidaler 5α R-Inhibitor, wird schon länger in der Behandlung von BPH erfolgreich eingesetzt. Dutasterid senkt das Serum-DHT um etwa 94%, indem die 5α R Typ 1 und Typ 2 gehemmt wird, und ist damit potenter als Finasterid.⁴⁵ Eine Studie, die den Effekt dieses dualen Hemmstoffs auf die Entwicklung von PCa untersuchte, hat gezeigt, dass in der mit Dutasterid behandelten Gruppe signifikant weniger PCa auftrat als in der Placebo-Gruppe.⁴⁵ In einer weiteren Untersuchung wurde festgestellt, dass eine Behandlung mit Dutasterid zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate und zu einer Verringerung der Dichte der Mikrogefäße in Prostatakrebsgewebe führen kann.⁴⁶ Diese Ergebnisse resultierten schließlich in der Initiierung der „Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events“ (REDUCE) Studie: 0,5 mg Dutasterid pro Tag werden über 4 Jahre den Probanden verabreicht.^{47,48} Es soll der positive Effekt von Dutasterid zur Chemoprävention von PCa bewiesen werden.⁴⁹ Weitere Untersuchungen sollen auch das mögliche Potential von Dutasterid in der Behandlung von Prostatakrebs zeigen.⁵⁰

Neuere Forschungen haben außerdem gezeigt, wie wichtig es gerade bei der besonders aggressiven Form des Prostatakrebses ist, dass nicht nur die 5α R2 gehemmt wird sondern auch die 5α R1. Es wurde nämlich festgestellt, dass sich bei rezidivierendem Krebs die Expressionslevel und die Isoenzym-Aktivitäten von der 5α R2 in Richtung 5α R1 verschieben.⁵¹ Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür liefern, warum in klinischen Studien zur Behandlung des metastasierenden Prostatakrebses der Einsatz des selektiven 5α R2 Inhibitors Finasterid in Monotherapie oder in Kombination mit Antiandrogenen nur sehr begrenzten Erfolg zeigen konnte.^{52,53} Im Vergleich zu einem solchen selektiven 5α R2 Inhibitor war der duale 5α R Hemmstoff Dutasterid in der Lage, eine erhöhte *in vivo* Wirksamkeit

gegen Prostatakrebs der Ratte und des Menschen zu zeigen.⁵⁴ Bedenkt man nun, dass eine übliche Androgen-Ablation die testikuläre Testosteron-Produktion, aber nicht komplett den Testosteron-Spiegel in Prostatakrebs-Gewebe absenken kann⁵⁵, dann müsste verglichen mit jeglicher Monotherapie die Kombination aus einem dualen 5 α R Inhibitors und einer üblichen Androgen-Ablation eine stärkere Hemmung auf das Tumorwachstum ausüben.⁵⁴

3.3 Hirsutismus, Akne und androgenetische Alopezie

Hirsutismus bezeichnet die verstärkte Behaarung der Frau, dem männlichen Phänotypus entsprechend. Verantwortlich dafür sind entweder eine verstärkte Wirkung der Androgene im Gewebe oder seltener eine zu hohe Produktion dieser Hormone in der Nebenniere (Androgenitales Syndrom) oder den Eierstöcken (Polyzystisches Ovarial-Syndrom).⁵⁶

Akne ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der eine Überproduktion an Talg eine zentrale Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass die Funktion der Talgdrüsen durch Androgene, vor allem durch DHT, moduliert wird. Die Serum-DHT-Konzentration bei Männern und Frauen mit Akne ist erhöht, die Sebumproduktion ist dadurch gesteigert.⁵⁷

Die **Androgenetische Alopezie** (AGA) ist der am weitesten verbreitete Typ des Haarausfalls bei Männern. Zirkulierende und lokal produzierte Androgene (insbesondere DHT) sowie eine genetische Prädisposition spielen eine Rolle bei der Ursache der Erkrankung. DHT verkürzt die Wachstumsphase der Haarfollikel und verkleinert diese, so dass nur noch dünne Härchen entstehen und die Haarbildung schließlich ganz aufhört. Es kommt zu einer Reduktion der Haaranzahl und schließlich zur Glatzenbildung.⁵⁸

Zur Behandlung aller drei Erkrankungen soll der Einfluss der Androgene, speziell der von DHT unterdrückt werden. 5 α R-Inhibitoren, die die Produktion von DHT hemmen, sind also zur Therapie bestens geeignet. Der 5 α R-Inhibitor Finasterid (Propecia[®]) wird seit 1998 erfolgreich zur Therapie der AGA eingesetzt.

Eine weitere therapeutische Option zur Behandlung von Akne und Hirsutismus ist der Einsatz von Antiandrogenen, wie Cyproteronacetat (Diane-35[®], Androcur[®]).

4. Inhibitoren der 5 α R

Trotz vieler Bemühungen ist es bisher noch nicht gelungen, die Isoenzyme der 5 α R zu kristallisieren und die Proteinstruktur mittels Röntgen-Kristallstruktur näher zu untersuchen. Die einzig verfügbare Information ist die von der cDNA abgeleitete Primärsequenz der Proteine. Die ersten Inhibitoren, die entwickelt wurden, leiten sich deshalb von der Struktur der natürlichen Substrate ab.

Es wurden im Laufe der Zeit sowohl selektive als auch duale Inhibitoren mit entweder steroidal oder auch nicht-steroidal Struktur entwickelt.

4.1 Steroidale Inhibitoren

Voigt und Hsia veröffentlichten 1973 den ersten potenten 5 α R Inhibitor (4-Androsten-3-on-17 β -Carbonsäure).⁵⁹ Die Modifikation des Substituenten in Position 17 solcher Substratanaloga spielt eine große Rolle, was die Potenz der 5 α R Inhibitoren anbelangt. Eine weitere Androsten-Carbonsäure stellt Epristerid dar (SmithKlineBeecham), das in einer klinischen Studie zur Behandlung der BPH untersucht wurde (siehe Abbildung I.8).⁶⁰ Im Vergleich zu dem unten erwähnten Finasterid (4-Azasteroid) konnte das Serum-DHT allerdings weit weniger gesenkt werden und damit kein größerer klinischer Nutzen aus der Verwendung von Epristerid zur Behandlung der BPH gezogen werden. Einige der Derivate des natürlichen Substrates sind potente 5 α R Inhibitoren, aber der schnelle Metabolismus und die mangelnde orale Aktivität ließ diese Substanzen als therapeutische Wirkstoffe scheitern.⁶¹

In den 80er Jahren machte Merck die Entdeckung von 4-Aza-3-ketosteroiden, wie beispielsweise 4-MA (4-Methyl-aza) mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (in vitro) und MK-906 (Finasterid), das bald darauf in klinischen Studien getestet wurde (Strukturformeln siehe Abbildung I.8).⁶²⁻⁶⁴ Allerdings wurde unter anderem eine hepatotoxische Wirkung bei der Anwendung von 4-MA festgestellt.

Finasterid (Proscar[®], Propecia[®]) befindet sich nun seit 1999 auf dem Markt und stellt als steroidal, kompetitiver Hemmstoff des humanen Isoenzym 2 einen sogenannten "slow time-dependent inhibitor" dar, der erfolgreich zur Therapie der BPH (5 mg / Tag) und der AGA (1 mg / Tag) eingesetzt wird.²⁰ Die Serum-DHT-Konzentration wird bei der höheren Dosierung um 70% gehemmt und das Volumen der Prostata reduziert sich um 20%.²² Das restliche Serum-DHT resultiert wohl aus

der Reaktion der $5\alpha R1$, die bei der eingesetzten klinischen Dosis nicht gehemmt wird.²³

Merk entwickelte noch einen weiteren potenten und selektiven Hemmstoff der $5\alpha R1$, das Azasteroid MK-386, das es ebenfalls in die klinische Studie schaffte.^{65,66} Dort scheiterte dieser Hemmstoff allerdings ebenso wie 4-MA aufgrund der nachgewiesenen Hepatotoxizität.^{67,68}

Um die DHT-Konzentration in Serum und Prostata gänzlich zu senken, wurde nach dualen Hemmstoffen der $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ gesucht. Glaxo entwickelte einen dualen Inhibitor (GG745, Dutasterid), ebenfalls basierend auf dem 4-Azasteroid-Grundgerüst (siehe Abbildung I.8). *In vivo* zeigte Dutasterid im Gegensatz zum $5\alpha R$ Typ 2 selektiven Finasterid eine fast vollständige Reduktion des Serum-DHT-Spiegels.^{25,69} Seit 2003 ist Dutasterid (Avodart[®]) auf dem Markt und ebenfalls zur Behandlung von BPH zugelassen.

Neben den oben beschriebenen, wichtigsten Azasteroiden wurden noch viele weitere $5\alpha R$ -Hemmstoffe synthetisiert getestet.^{1,61,70,71} Darunter befinden sich sowohl weitere 4-Azasteroide⁷²⁻⁷⁹ als auch 4-Oxa- und 4-Thiasteroide, 10-Azasteroide^{80,81} und 6-Azasteroide^{82,83}, die als erste Substanzklasse auch potente duale Inhibitoren stellten.

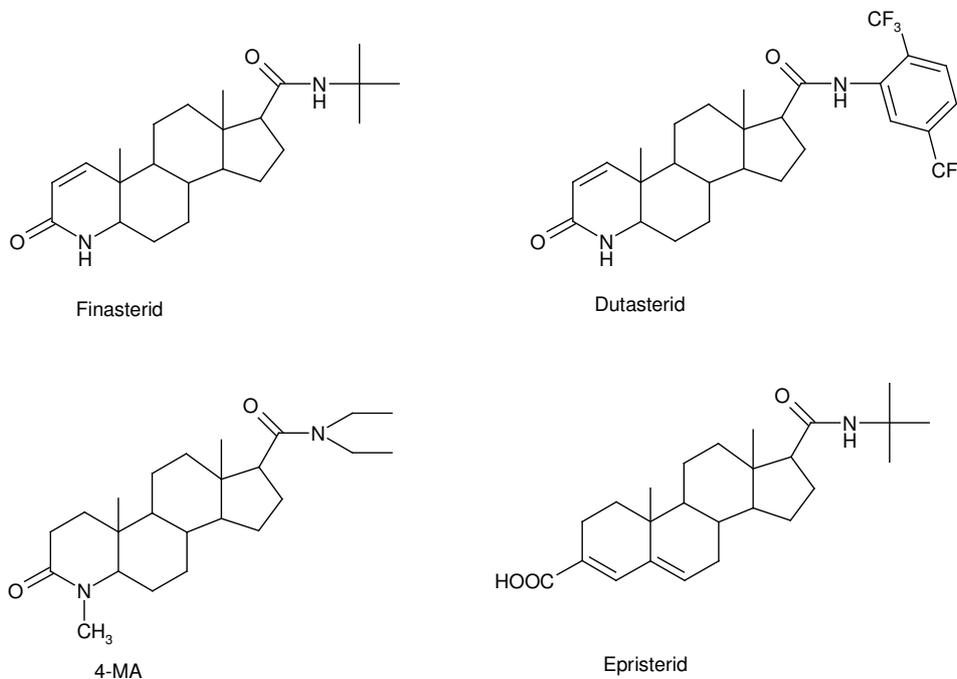


Abbildung I.8: Steroidale Inhibitoren der $5\alpha R$

4.2 Nicht-steroidale Inhibitoren

Außer Finasterid und Dutasterid, bei denen es sich um steroidale Hemmstoffe handelt, sind bis jetzt noch keine $5\alpha R$ Inhibitoren auf dem Markt. Wegen der unerwünschten Wirkungen solcher Steroidinhibitoren, wie zum Beispiel der Beeinträchtigung der Sexualfunktion, die bekanntermaßen mit der steroidal Struktur einhergehen können,⁸⁴ wurden nicht-steroidale Inhibitoren, speziell auch von unserem Arbeitskreis entwickelt.

Die ersten nicht-steroidalen Inhibitoren wurden formal von den steroidal Hemmstoffen abgeleitet. Durch direkte Abwandlung und durch das Fehlen des D-Rings von Epristerid kam man zu einer Tetrahydrophenanthren-Carbonsäure mit $5\alpha R2$ Aktivität.⁸⁵ Weitere potente, trizyklische Inhibitoren beschrieb Abell et. al. Die aufgeführten 9,10-Dihydrophenanthren-2-Carbonsäuren zeigten Selektivität für $5\alpha R1$.⁸⁶ Direkte Abwandlung der Azasteroide führte zur Klasse der Benzochinolinone. LY191704 (Eli Lilly and Company) stellte einen der ersten, selektiven $5\alpha R1$ Inhibitoren dar.⁸⁷⁻⁸⁹ 1998 gelang es Eli Lilly and Company 8-substituierte Benzochinolinone zu synthetisieren, die sowohl $5\alpha R1$ als auch $5\alpha R2$ Aktivität im nanomolaren Bereich zeigten.⁹⁰ Nach verschiedenen Optimierungsstudien entwickelten Eli Lilly and Company schließlich LY320236, einen potenten dualen Hemmstoff, der in einer klinischen Phase I Studie zur Behandlung des PCa getestet wurde.^{37,91}

Guarna et. al. veröffentlichten 1998 die Klasse der Benzo[c]chinolizin-3-one, die ebenfalls von den entsprechenden Azasteroiden abgeleitet war, und potente $5\alpha R1$ Hemmstoffe darstellen.⁹²⁻⁹⁵ 2005 wurden Benzo[c]chinolizin-3-one auch als potente duale Inhibitoren beschrieben.⁹⁶

In der Klasse der Arylbutanoate, die sich nicht von den steroidal Hemmstoffen ableitete, wurde ONO-3805 als potenter und dualer Inhibitor der $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ identifiziert.⁹⁷ Bei diesem nicht-kompetitiven Hemmstoff wird eine Wechselwirkung der Butansäure-Struktur mit den beiden Phosphat-Gruppen des NADPH vermutet. Der restliche Molekülteil kann sich dann gleichzeitig in die lipophile Tasche des Enzyms orientieren.

Eine weitere wichtige Klasse an $5\alpha R$ -Inhibitoren stellen die Indole dar. Solche Hemmstoffe tragen entweder direkt am Indolring oder an einem benachbarten Benzolring eine Säure-Gruppe.⁹⁸⁻¹⁰² FK143 ist ein Indol-1-yl-buttersäure-Derivat und erwies sich als potenter dualer $5\alpha R$ Hemmstoff. Er zeigte in Ratten eine signifikante

Reduktion des Plasma DHT Spiegels und eine Reduktion des Prostatagewichts.¹⁰³⁻

¹⁰⁶ Bei TF-505 handelt es sich um ein Indolizin-Derivat, das nicht-kompetitiv die 5 α R1 und 5 α R2 hemmt. In Studien an gesunden Männern zeigte TF-505 eine gute Verträglichkeit.¹⁰⁷

Auch Biphenyle wurden als Steroidomimetika entwickelt und als Hemmstoffe der 5 α R beschrieben. Bei diesen Inhibitoren wird allerdings eine zusätzliche Affinität zum Estrogen-Rezeptor beschrieben.^{108,109}

Als weitere bityklische 5 α R Inhibitoren, sind Lactame und Thiolactame beschrieben, die teilweise eine duale Hemmung der 5 α R zeigen.¹¹⁰

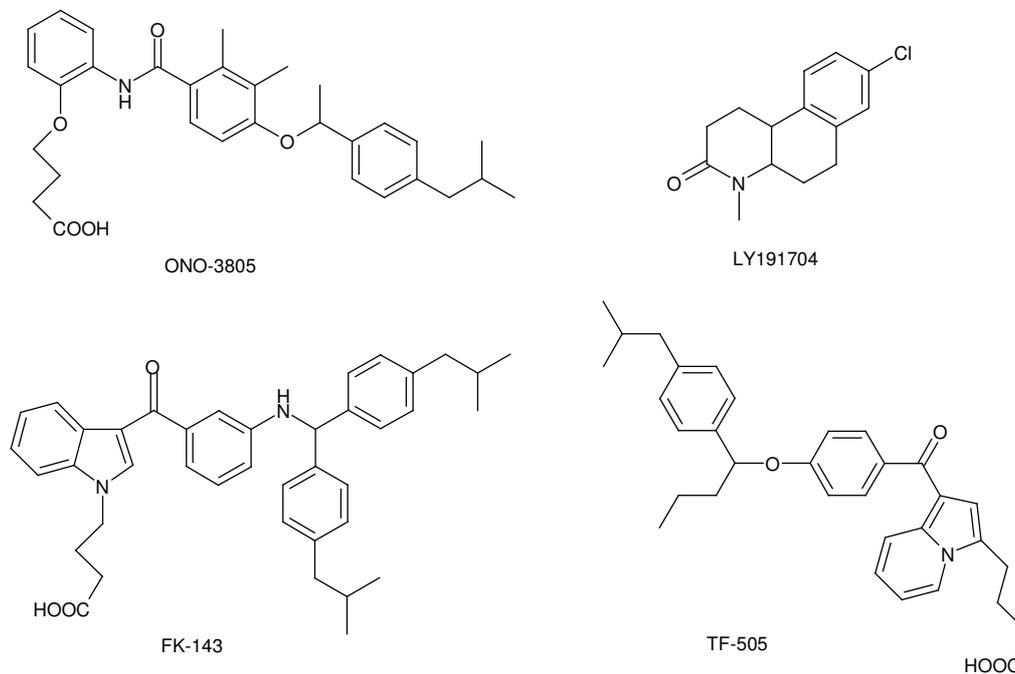


Abbildung I.9: Nicht-steroidale Inhibitoren der 5 α R

Auch in unserem Arbeitskreis wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die sich als potente 5 α R Hemmstoffe herausstellten.

Eine der ersten Substanzklassen waren *N*-Alkyl und *N*-Arylalkyl-substituierte Indol – Derivate (siehe Struktur A, Abbildung I.10).¹⁰¹ Hier sollte die Carbonsäure-Gruppe mit dem elektropositiven Rest im aktiven Zentrum der 5 α R interagieren. Die Verbindungen zeigten mittelmäßige Hemmung an beiden Isoenzymen. Für die 5 α R1 war ein Anstieg der Hemmaktivität zu verzeichnen, je größer und lipophiler die eingeführten Reste R waren.

Bei Verbindung A befindet sich der lipophile Substituent R in der Ebene des Moleküls im Gegensatz zu den steroidal Hemmstoffen, bei denen der Substituent in 17 β -Position aus der Ebene herausgedreht ist. Deshalb wurden *N*-substituierte Piperidin-4-(benzyliden-4-carbonsäure)-Derivate synthetisiert, die den Steroid-Hemmstoffen strukturell ähnlicher sind und bei denen der Rest R ebenfalls aus der Molekülebene gedreht ist (siehe Verbindung B, Abbildung I.10). Hier konnten sehr potente 5 α R2 Hemmstoffe erhalten werden, die auch *in vivo* in Ratten aktiv waren.^{111,112}

Abgeleitet von dem mittelmäßigen 5 α R2 Hemmstoff C mit 1-Methyl-2-Piperidon – Struktur¹¹³ (siehe Abbildung I.10, IC₅₀ 13 μ M) wurden konformativ eingeschränkte Analoga wie 1*H*-Chinolin-2-one und 2-Methoxy-Chinoline entwickelt. Letztere zeigten an den humanen Isoenzymen keinerlei Wirkung, wohingegen die beste Verbindung D aus der Klasse der 1*H*-Chinolin-2-one an Position X einen Methyl-Rest trug und gegenüber der 5 α R1 einen IC₅₀-Wert von 510 nM zeigte. Die entsprechend unsubstituierte Verbindung (X = H) war dagegen ein guter 5 α R2 Hemmstoff (IC₅₀ 1,7 μ M).¹¹⁴

Als A-C-Ring Steroidomimetika wurden ebenfalls Biphenylstrukturen synthetisiert, die als Substituenten R lipophile Reste trugen (siehe Verbindung E, Abbildung I.10). Die beste Verbindung besaß einen CH(Cyclohexyl)₂-Rest und erreichte einen IC₅₀-Wert von 220 nM am Isoenzym 2.¹¹⁵

Um Hemmstoffe mit größerer konformativer Flexibilität zu erhalten, wurde die Struktur E so abgewandelt, dass ein Ether-Linker zwischen das steroidal A-C-Ring Mimetikum eingeführt wurde (siehe Verbindung F, Abbildung I.10). Dieser Versuch führte wiederum zu einer Reihe potenter 5 α R2 Inhibitoren, wobei die beste Verbindung einen NH(Adamantyl)-Rest trug und einen IC₅₀-Wert von 380 nM im BPH Mikrosomenassay zeigte.¹¹⁶

Es wurden ebenfalls von den Hemmstoffen mit Struktur F abgeleitete Verbindungen hergestellt, indem ein flexibles Benzophenon-Grundgerüst eingeführt wurde. Dabei konnte ein hoch potenter Inhibitor G für das Isoenzym 2 gefunden werden mit einem IC₅₀-Wert von 53 nM (siehe Verbindung G, Abbildung I.10).¹¹⁷ Aufgrund der hohen Hemmaktivität wurde diese Leitstruktur weiter optimiert und führte zu hoch potenten 5 α R2 Hemmstoffen mit IC₅₀-Werten bis zu 5 nM für Verbindung K.¹¹⁸

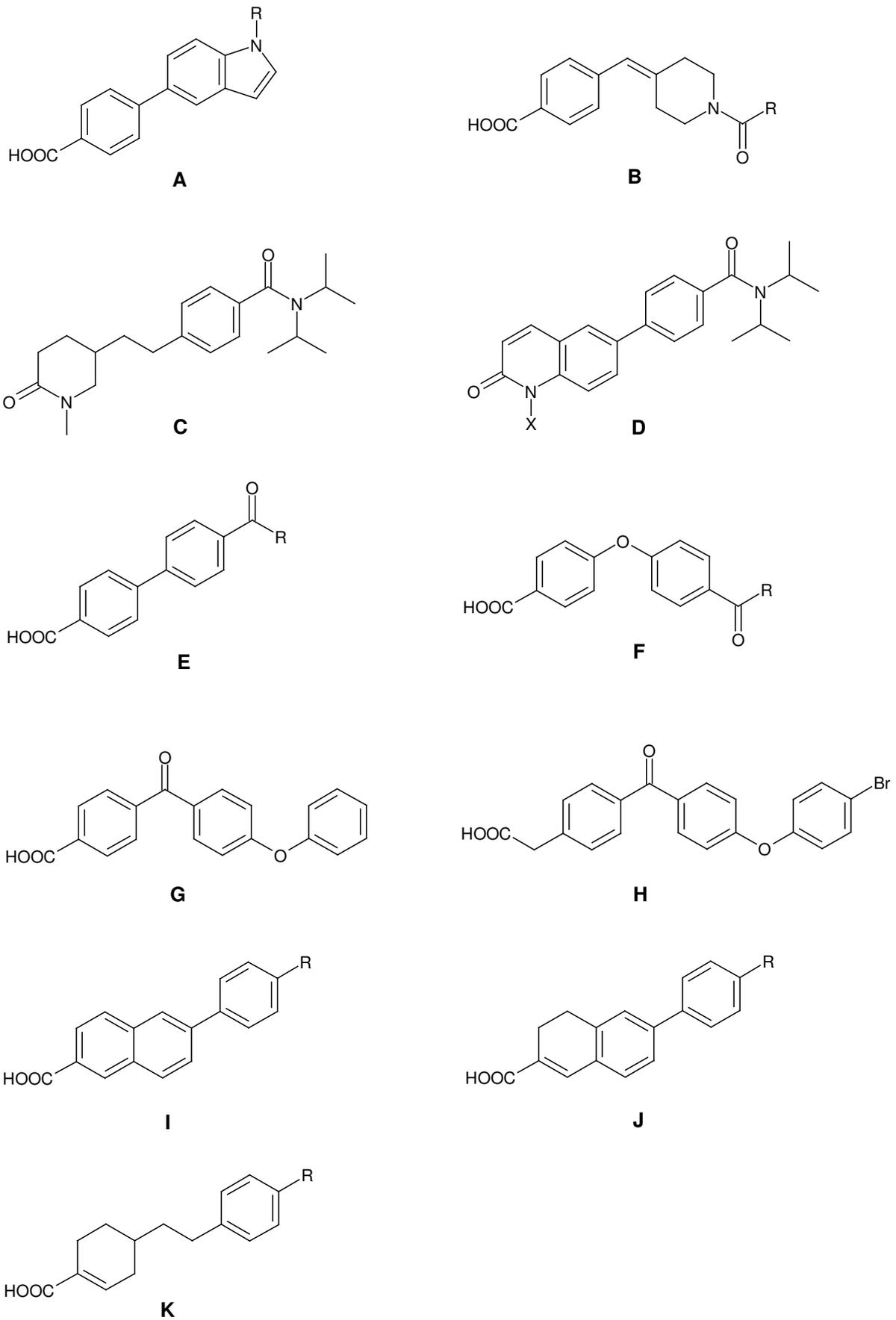


Abbildung I.10: Nicht steroidale 5 α R Inhibitoren des Arbeitskreises Hartmann

Strukturell vom steroidalen 5α R Hemmstoff Epristerid (siehe Abbildung I.8) abgeleitet wurden nicht-steroidale Verbindungen wie 3,4-Dihydro-naphthalen-2-carbonsäuren und Naphthalen-2-carbonsäuren (Strukturen I und J, siehe Abbildung I.10) hergestellt, die teilweise sehr potente Hemmstoffe der 5α R in Mensch oder Ratte darstellten.¹¹⁹

Da diese rigiden Mimetika I und J von Epristerid gute Hemmwerte gezeigt hatten, sollte auch die Hemmaktivität von flexibleren Epristerid-Mimetika untersucht werden. Dazu wurden Cyclohex-1-en-carbonsäuren synthetisiert (siehe Verbindung K, Abbildung I.10), die gute Hemmwerte für die 5α R2 zeigten.¹²⁰

II. Zielsetzung

Die beiden Isoenzyme der 5 α R katalysieren den letzten Schritt in der Androgenbiosynthese. Die wichtigste Reaktion ist hierbei die irreversible Reduktion von T zu DHT, weil DHT als potentestes Androgen die größte Affinität zum Androgenrezeptor besitzt und in die Pathogenese und Progression einiger androgenabhängiger Krankheiten, wie beispielsweise BPH und Prostatakrebs, involviert ist. 5 α R Inhibitoren werden deshalb bereits erfolgreich als Mittel der Wahl zur Behandlung der BPH eingesetzt.^{18,121} In mehreren Studien, die derzeit noch den Einsatz von 5 α R Hemmstoffen zur Prävention von Prostatakrebs oder gar zur Behandlung in Kombination mit Antiandrogenen überprüfen, konnten bereits positive Effekte durch Behandlung mit solchen Hemmstoffen festgestellt werden.^{38,48,54,122,123}

Auf dem Arzneimittelmarkt gibt es bisher nur 2 zugelassene steroidale Hemmstoffe, Finasterid und Dutasterid. Im Vergleich zum selektiven 5 α R2 Inhibitor Finasterid, hat sich zur Behandlung von BPH oder Prostatakrebs generell Dutasterid aufgrund seiner dualen Hemmung der 5 α R1 und 5 α R2 als potenterer Hemmstoff erwiesen.^{26,51} Wegen unerwünschter Wirkungen dieser beiden Arzneistoffe, wie Impotenz und verringerte Libido, die mit der steroidalen Struktur einhergehen könnten, wurden in unserem Arbeitskreis nicht steroidale 5 α R Inhibitoren entwickelt, die möglichst eine duale Hemmung an beiden Isoenzymen zeigen sollten.

Selektive nicht-steroidale 5 α R2 Hemmstoffe (4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenemethyl]-benzoesäuren, Verbindungen 1-3; siehe Tabelle III.1) zeigten in einem Zellassay mit DU145 Zellen keine Hemmung gegenüber der 5 α R1.^{111,112} Nach Permeationsstudien mit Verbindung 1 wurde festgestellt, dass die Säure wahrscheinlich aufgrund der negativen Ladung bei physiologischem pH-Wert nicht in der Lage war, die Zellmembran zu überwinden.^{124,125}

Deshalb soll zunächst ein Prodrug-Konzept entwickelt werden, mit dem diese nachteilige Eigenschaft umgangen werden kann. Zusätzlich soll ein zellfreier Assay mit DU145 Zellen entwickelt werden, um solche Permeationseinflüsse bei der zukünftigen Hemmstofftestung am Isoenzym 1 zu vermeiden und die reinen Hemmwerte am freien Enzym bestimmen zu können.

Als Prodrugs für die Carbonsäure 1-3 werden die korrespondierenden Methylester ausgewählt. Überraschender Weise kann im neu entwickelten DU145-Mikrosomenassay eine eigene Hemmwirkung für die Ester selbst festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen soll nun ein neues Konzept zur Hemmung der 5 α R Isoenzyme entwickelt werden. Die Ester sind jetzt nicht nur Prodrugs für die entsprechenden 5 α R2 aktiven Säuren, sondern auch gleichzeitig Inhibitoren für die 5 α R1. Im folgenden soll von den Ester-Säure-Paaren als Hybridhemmstoffen gesprochen werden. Damit ein Ester *in vivo* auf diese besondere Art beide Isoenzyme der 5 α R hemmen kann, muss er bestimmte hydrolytische Eigenschaften in verschiedenen biologischen Medien aufweisen. Stabilität während der Adsorption im Magen-Darm-Trakt und während der Verteilung über den Blutkreislauf ist wichtig, damit der Ester die ubiquitär vorkommende 5 α R1 hemmen kann. Im Target-Organ angekommen, soll der Ester dann von Enzymen der Prostata hydrolysiert werden, um seine korrespondierende Säure intrazellulär freizusetzen, die dann lokal die 5 α R2 hemmen kann.

Zur Überprüfung, ob sich Substanzen als potentielle Hybridhemmstoffe eignen, soll eine *in vitro* Teststrategie aufgestellt werden, die exakte Aussagen über die Hemmung der Substanzen an beiden Isoenzymen ebenso wie über die Stabilität der Ester in verschiedenen biologischen Medien und deren Zellpermeabilität erlaubt.

Mit Hilfe dieses Testsystems sollen dann verschiedene Substanzklassen auf mögliche Hybridinhibitoren untersucht werden. Außerdem sollen weitere bereits synthetisierte Substanzen aus der Klasse der Ausgangsverbindungen (1/1a-3/3a) getestet werden, um diese Hybridhemmung weiter zu charakterisieren und zu optimieren. Durch Neusynthese und strukturelle Modifizierung der Ausgangssubstanzen soll das Testset zusätzlich erweitert werden.

Im Sinne eines "Proof of Concept" soll schließlich an dem bewährten Ratten-Modell, das zur Evaluierung von 5 α R Hemmstoffen eingesetzt wird⁷⁹, gezeigt werden, dass die Applikation von Hybridhemmstoffen im Vergleich zur Gabe eines selektiven 5 α R2 Inhibitors zu einem positiveren *in vivo* Effekt führt. Aufgrund der vorhandenen Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch soll in Vortests abgeklärt werden, ob sich die Ratte als Modell für die angestrebten Untersuchungen eignet.

III. Ergebnisse

1. Untersuchung der Ester-Prodrug-Strategie potenter Inhibitoren der 5 α R

Ausgangspunkt der Experimente waren die von Dr. Franck Picard im Rahmen seiner Dissertation synthetisierten Verbindungen, substituierte 4-[1-(2,2-Dicyclohexylacetyl)-piperidin-4-ylidenemethyl]-benzoesäuren (Verbindungen 1-3, siehe Tabelle III.1). Es handelt sich hierbei um potente, nicht steroidale 5 α R2 Inhibitoren. Die Hemmwerte wurden an dem in Kapitel VIII.3.1 beschriebenen BPH-Mikrosomen-Assay für die 5 α R2 ermittelt. Diese Hemmstoffe sollten nun auch auf ihre Selektivität gegenüber der 5 α R1 untersucht werden. Hierfür wurde ein in unserem Arbeitskreis etablierter Zellassay herangezogen, bei dem humane Prostatakrebszellen (DU145 Zelllinie), die selektiv Isoenzym 1 exprimieren, als Monolayer kultiviert wurden. Die potenten 5 α R2 Inhibitoren zeigten allerdings kaum Hemmung.

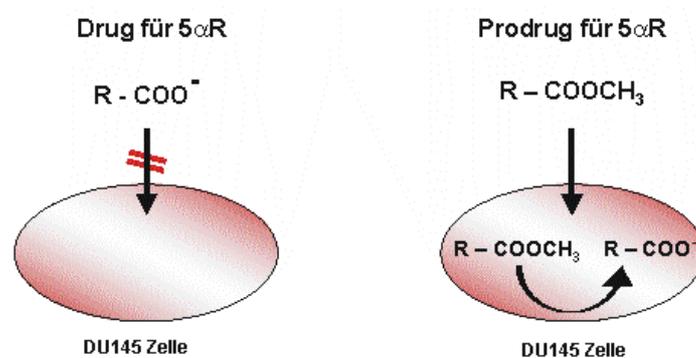


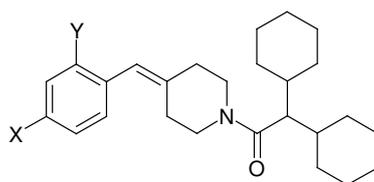
Abbildung III.1: Permeation von Carbonsäure und korrespondierendem Ester in DU145 Zellen

Das konnte nun einerseits daran liegen, dass die Substanzen wirklich selektive 5 α R2 Hemmstoffe waren, oder andererseits an der schlechten Zellpermeation der Verbindungen. Die Überlegung war, dass die Carbonsäuren bei physiologischem pH Wert (unter Assaybedingungen pH 7,4, siehe Abbildung III.1) deprotoniert vorlagen

und deshalb die Zellmembran schlecht überwinden konnten. Diese Behauptung wurde durch Inkubation von Verbindung 1 mit DU145 Zellen und der anschließenden Detektion mit MALDI-TOF¹²⁴ oder HPLC-MS/MS¹²⁵ bewiesen. Von Carbonsäure 1 konnten lediglich 0,1 % innerhalb der DU145 Zellen nachgewiesen werden.¹²⁵

Um diese negative Ladung bei physiologischem pH-Wert zu umgehen, wurde ein Prodrug-Konzept entwickelt. Aufgrund der Tatsache, dass in den meisten Geweben^{126,127} ebenso wie in DU145 Zellen¹²⁸ Esterase-Aktivität zu finden ist, stellte die Veresterung der vorliegenden Carbonsäuren eine naheliegende und bewährte Prodrug-Strategie dar, zumal die entsprechenden Methylester 1a-3a als Synthesestufe der Carbonsäuren 1-3 anfallen.

Tabelle III.1: Hemmung der humanen 5 α R Isoenzyme durch 4-[1-(2,2-Dicyclohexylacetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuren und -methylester



Verbindung	X	Y	[IC ₅₀ [(μ M)] % Hemmung (10 μ M)]	
			BPH 5 α R2 (Mikrosomen)	DU145 5 α R1 (Ganze Zellen)
1	COOH	H	[0,060]	35
1a	COOCH ₃	H	20	[2,0]
2	COOH	F	[0,011]	12
2a	COOCH ₃	F	56	[2,55]
3	COOH	OCH ₃	[0,130]	5
3a	COOCH ₃	OCH ₃	28	[0,434]
Finasterid			[0,005]	[0,041]

Mit HPLC-MS/MS konnte nach Inkubation des Methylesters 1a eine wesentlich bessere Zellpermeation nachgewiesen werden (0,1 % Säure und 3,5 % Ester intrazellulär nachweisbar, siehe Abbildung III.1).¹²⁵ Außerdem konnte nun auch - wie Tabelle III.1 zeigt - im DU145 Zellaassay eine gute Hemmung für alle Methylester gezeigt werden. Das ließ darauf schließen, dass die Ester die Zellmembran nicht nur gut überwinden konnten, sondern auch innerhalb der Zellen in die entsprechenden Carbonsäuren gespalten wurden, die dann die 5 α R1 hemmen konnten.

1.1 Subzelluläre Fraktionierung mit DU145 Zellen zur Lokalisierung der Esterase-Aktivität

Im Rahmen der oben entwickelten Prodrug-Strategie sollte zur Charakterisierung der DU145 Zellen und ihrer Esterase-Aktivität die Spaltung des Methylesters 1a zur Carbonsäure 1 in verschiedenen Zellfraktionen überprüft werden.

Dazu wurde (wie in Kapitel VIII.1.7 beschrieben) der konfluente Monolayer aus DU145 Zellen abgelöst, zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in Homogenat-Puffer resuspendiert. Auf normalerweise bei Zellaufarbeitungen verwendete, Enzymschützende Zusätze wie EDTA, PMSF oder DTT wurde verzichtet, um die Esterase-Aktivitäten nicht zu beeinträchtigen. Die Zellen wurden dann mittels Ultraschallstab aufgeschlossen und durch mehrere Zentrifugationsschritte in 3 Fraktionen unterteilt. Die entstanden Pellets der Kernfraktion und der mikrosomalen Fraktion wurden in Puffer resuspendiert. Mit definierten Aliquots jeder Fraktion wurde der Gesamtproteingehalt mit der Methode nach Bradford bestimmt.¹²⁹ Außerdem wurde ein Test auf Esterase-Aktivität durchgeführt, indem der Methylester 1a mit den verschiedenen Fraktionen inkubiert wurde. Durch Ansäuern und Ausschütteln der Proben mit Diethylether wurden Ester und eventuell entstandene Säure extrahiert. Durch Quantifizierung mit HPLC-MS/MS und die Verwendung von Kalibrierkurven wurde der genaue Gehalt an Ester 1a und Säure 1 in den verschiedenen Fraktionen festgestellt. In Abbildung III.2 ist die Spaltung des Esters 1a bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Fraktionen angegeben.

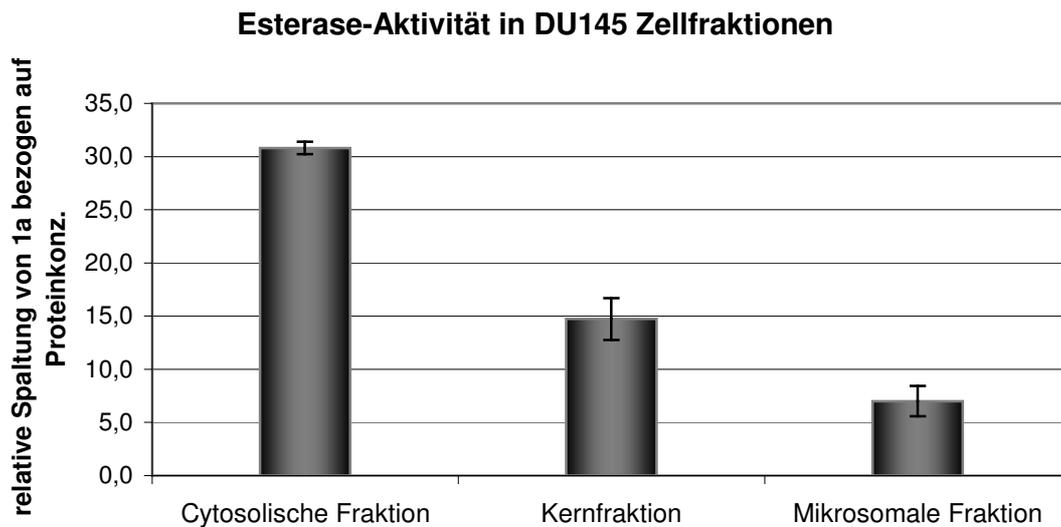


Abbildung III.2: Esterase-Aktivität in DU145 Zellfraktionen

Die höchste Esterase-Aktivität für den Methylester 1a befand sich mit über 30 % Spaltung eindeutig in der cytosolischen Fraktion. In der Kernfraktion war noch eine Hydrolyse von ca. 14 % zu finden und in der mikrosomalen Fraktion mit 7 % nur noch halb so viel.

Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Fraktionen schwankte von 3,6 mg Protein / ml für die Fraktion S1 (Überstand nach der 1. Zentrifugation, siehe Kapitel VIII.1.7) bis 0,6 mg Protein / ml für die Fraktion S1* (Überstand nach der 2. Zentrifugation, siehe Kapitel VIII.1.7).

Intrazelluläre Carboxylesterasen sind hauptsächlich mikrosomal lokalisiert, vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER).¹³⁰ Früher wurde sogar behauptet, dass cytosolische Carboxylesterasen bloß eine Kontamination der mikrosomalen Enzyme wären. Mittlerweile gibt es aber Beweise, dass lösliche Esterasen nicht unbedingt im ER entstehen müssen.¹³¹ Dass cytosolische und mikrosomale Esterasen wirklich unterschiedliche Enzyme sein müssen, belegt auch die subzelluläre Fraktionierung mit DU145 Zellen. Der Methylester 1a war offensichtlich für lösliche, cytosolische Enzyme ein besseres Substrat als für mikrosomale Hydrolasen.

1.2 Entwicklung eines DU145 zellfreien Assays

Bisher wurde zur Hemmstofftestung am Isoenzym 2 eine Enzympräparation aus BPH-Operationsgewebe verwendet und für Isoenzym 1 ein Zelltest mit DU145 Zellen, eine humane Prostatakarzinom-Zelllinie, die aktive 5 α R1 exprimiert. Um bei der zukünftigen Hemmstofftestung am Isoenzym 1 Permeationseinflüsse von Substanzen, wie sie in Kapitel I.1. beschrieben sind, zu vermeiden und die reinen Hemmwerte am freien 5 α R1 Enzym zu erhalten, sollte analog zum BPH-Mikrosomenassay für die 5 α R2 ein zellfreier Assay mit DU145 Zellen entwickelt werden.

1.2.1 Wahl der Zellzahl

Erste Anhaltspunkte bei der Wahl der Zellzahl lieferte der DU145 Zellassay, bei dem 0,25 Millionen Zellen pro well 5 h inkubiert wurden, um 25 % Substratumsatz von Androstendion zu erhalten. Die Inkubationszeit sollte nicht allzu lange gewählt werden, damit die Stabilität des Targetenzyms (5 α R) über den gesamten Inkubationszeitraum gewährleistet werden konnte. Nach mehreren Versuchen fiel die Entscheidung auf eine Zellzahl von 2 Millionen Zellen in einem möglichst kleinen Gesamtansatz von 500 μ l. Ausgehend von dieser Zellzahl wurden nun weitere Assayparameter optimiert.

1.2.2 Zellaufschluss und Zentrifugation

Für den Zellaufschluss wurden jeweils zu etwa 80 % konfluente Zellen verwendet, die von ihrer Substratoberfläche abgelöst und nach Zentrifugation gründlich mit PBS-Puffer gewaschen wurden. Letzteres diente dazu, Reste des FKS-haltigen Mediums, die beim Homogenisieren und bei der späteren Inkubation erheblich stören könnten, zu entfernen. Die Zellzahl wurde mittels Casy[®] Cell Counter bestimmt.

Um die Aktivität von abbauenden Enzymen, wie z. B. Lipasen und Proteasen, einzuschränken, wurden alle Homogenisierungsschritte bei 0-4 °C durchgeführt. Zum weiteren Schutz der 5 α R vor Serinproteasen wurde dem Homogenatpuffer PMSF in einer Endkonzentration von 10 μ M zugesetzt. PMSF (Stammlösung in Isopropanol)

wurde erst kurz vor der Verwendung zugegeben, da es sich in wässriger Lösung zersetzt. Der Homogenat-Puffer war annähernd isoosmotisch, enthielt 300 mM Saccharose und als organischen Pufferbestandteil 5 mM Tris-HCl. Zweifach geladene Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} führen leicht zu Membranaggregationen und Ca^{2+} aktiviert zudem noch bestimmte Proteasen und Phospholipasen. Deshalb sollen diese Kationen durch den Einsatz von 0,1 mM EDTA abgefangen werden.

Mittels Ultraschallstab wurde die Zellsuspension aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 10 s mit 50 s Kühlpause auf höchster Stufe homogenisiert wurde. Dabei darf die Sondenspitze zu keiner starken Erhitzung der Suspension führen. Der Grad des Zellaufschlusses wurde sowohl optisch verfolgt, als auch durch Bestimmung der eventuell noch lebenden Zellen mit dem Casy[®] Cell Counter. Vor der weiteren Verarbeitung musste ein Aufschluss von mindestens 97 % erreicht sein.

Zur Aufkonzentrierung der membranständigen $5\alpha\text{R}$ wurde das Homogenat 60 min lang bei 150.000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt Kerne, Mitochondrien und Mikrosomen und wurde in Tris-HCl Puffer suspendiert, so dass mit Hilfe der vorher bestimmten Zellzahl eine Konzentration von 8 Millionen aufgeschlossener Zellen pro ml Puffer erreicht wurde. Die Proteinkonzentration wurde zusätzlich nach der Methode von Bradford¹²⁹ bestimmt und sollte bei 1,4 mg Protein pro ml liegen. Die so erhaltene Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Da es sich bei dem Zellaufschluss mittels Ultraschall um eine sehr aggressive Aufschlussmethode von eukaryontischen Zellen handelt, wurde untersucht, ob mit einer schonenderen Homogenisierung ein besseres Ergebnis erzielt werden konnte. Die konfluenten Zellen wurden genauso abgelöst und mit PBS-Puffer gewaschen wie vorher beschrieben. Nach Suspendieren des Pellets in Homogenat-Puffer wurden die Zellen durch mehrmaliges Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und wieder Auftauen aufgebrochen (5-malige Wiederholung). Diese Methode führte ebenfalls zu einer Aufschlussrate von mindestens 97% (ermittelt mit Casy[®] Cell Counter). Die weitere Verarbeitung des Homogenats erfolgte wie oben beschrieben. Nach direktem Vergleich der beiden Methoden durch $5\alpha\text{R}$ -Aktivitätstest konnten allerdings keine Unterschiede im Androstendion-Umsatz festgestellt werden. Die aggressivere Aufschlussmethode durch Ultraschall wirkte sich also nicht negativ auf die Ausbeute

an intaktem 5 α R1-Enzym aus, so dass aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit diese Methode als Standard für weitere Tests gewählt wurde.

1.2.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen

Es ist bekannt, dass die humane Prostatakrebszelllinie DU145 eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität aufweist.¹³² Da dieses Enzym das 5 α R-Substrat Testosteron zu Androstendion umsetzt (siehe Abbildung I.7), wurde für den 5 α R1 zellfreien Assay als Substrat nicht Testosteron sondern Androstendion gewählt, das dann direkt zu Androstendion umgesetzt wird. Im Assay wurde eine Mischung aus Androstendion und radioaktiv markiertem [1 β -³H(N)]-Androsten-4-en-3,17-dion eingesetzt. Dabei wurde lediglich das radioaktiv markierte Substrat mittels Radiodetektor erfasst. Als optimale Radioaktivitätsmenge erwiesen sich dabei 63,25 nCi (entspricht 5 nM AD). Damit wurde weit genug über der Detektionsgrenze gearbeitet und dennoch eine lineare und quantitative Messung am Detektor gewährleistet.

Da es sich bei der 5 α R um ein NADPH-abhängiges Enzym handelt und nun nicht mehr mit intakten Zellen gearbeitet wird, die die Produktion des Cofaktor selbst übernehmen können, wurde dem Ansatz ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt. Um die ausreichende Versorgung der 5 α R mit NADPH während des gesamten Inkubationszeitraums zu gewährleisten, wurde dem Reaktionsansatz 0,55 mM NADP, 5 mM Glucose-6-phosphat, 0,625 U / ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase zugesetzt.

Der Assay sollte nicht in Kulturmedium durchgeführt werden, da in FKS immer auch eine unbekannte Mischung aus Enzymen, die die gewünschte Reaktion eventuell stören könnten, enthalten ist. Deshalb wurde der Test in einem definierten Puffer (Tris-HCl-Puffer) durchgeführt. Der pH-Werte sollte ebenso wie im entsprechenden Zellassay bei pH 7,4 gehalten werden, zumal diesbezüglich keine Anpassung des erforderlich war, da die 5 α R1 ein sehr breites pH Spektrum von 6,0 – 8,5 besitzt. Es wurde während der Inkubation auf eine konstante Temperatur von 37 °C geachtet, ebenso wie auf eine gute Durchmischung der Proben. Diese Bedingungen konnten in einem beheizbaren Schüttelinkubator (bei 150 rpm) garantiert werden.

Um die für einen Assay benötigte Menge an Substrat zu ermitteln, wurde ein Test mit 5 verschiedenen AD-Konzentrationen, 2 Millionen aufgeschlossener Zellen und einer Inkubationszeit von 1 h durchgeführt. Dem "kalten" Androstendion wurden immer 5 nM radioaktiv markiertes AD zugesetzt.

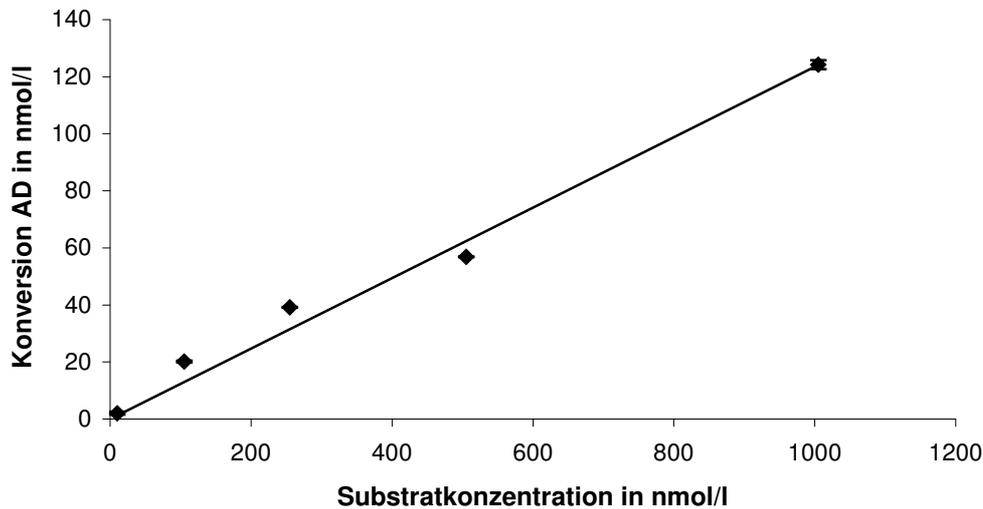


Abbildung III.3: Konversion von Androstendion in Anhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration (Standardabweichungen < 1%)

Anhand der Abbildung III.3 lässt sich erkennen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen den gewählten Substratkonzentrationen (10 nM, 105 nM, 255 nM, 505 nM, 1005 nM) und der Konversion von AD zu Androstandion bestand. Um nach der gewählten Inkubationszeit einen Umsatz von ungefähr 20 % zu erhalten, wurde für folgende Assays eine Substratkonzentration von 105 nM AD gewählt.

Unter den bisher gewählten Bedingungen wurde ebenfalls die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Proteinkonzentration (bzw. der Zahl der aufgeschlossenen Zellen) überprüft. Die Enzymkonzentration wurden im Vergleich zur vorher gewählten Zellzahl verdoppelt und anschließend eine Verdünnungsreihe mit der jeweils halbierten Konzentration hergestellt (700 µg, 350 µg, 175 µg, 87,5 µg Gesamtprotein pro Ansatz). Wie Abbildung III.4 zeigt, ergibt sich nach einer Inkubationszeit von 1 h

ebenfalls eine lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der absoluten Proteinkonzentration.

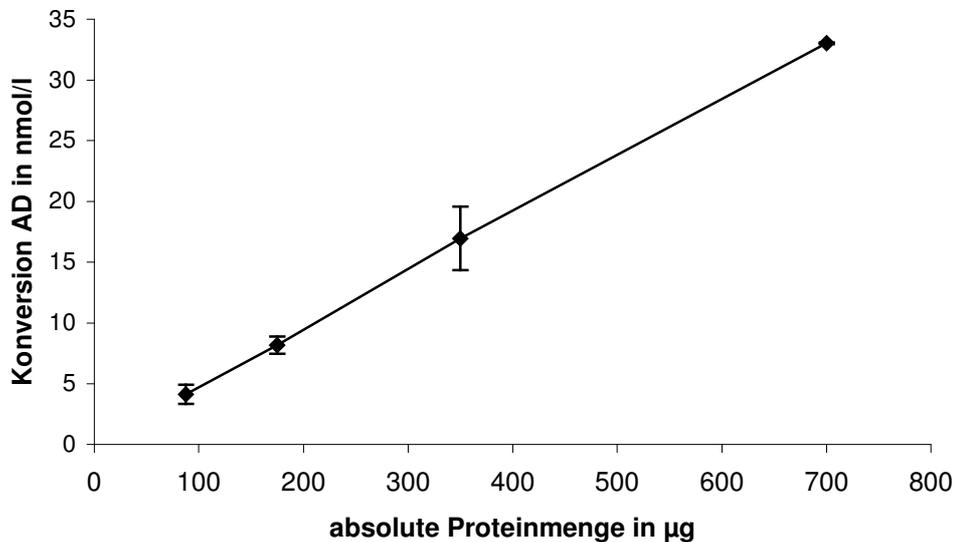


Abbildung III.4: Konversion von Androstendion in Anhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge

1.2.4 Inkubationszeit

Ausgehend von der verwendeten Zellzahl (2 Millionen aufgeschlossene Zellen pro Ansatz) und der gewählten Substratkonzentration von 105 nM AD wurde auch die notwendige Inkubationsdauer mit den vorher beschriebenen Parametern bestimmt. Für die spätere Hemmstofftestung war es wichtig, dass die Inkubationszeit so gewählt wurde, dass sie im linearen Bereich der Enzymaktivität-Zeit-Kurve lag. Dort liegt nach der Michaelis-Menten-Kinetik die initiale Enzymgeschwindigkeit vor, bei der angenommen werden kann, dass sich die Substratkonzentration nicht signifikant geändert hat. Um bei den durchgeführten Messungen keine allzu großen Schwankungen zu erhalten, sollte also eine AD-Konversion von etwa 20-25 % im linearen Bereich erhalten werden.

Ein Umsatz von etwa 20 % wurde nach einer Inkubationszeit von 60 min ermittelt (siehe Abbildung III.5). Erfreulicherweise befindet sich auch eine Konversionsrate von etwa 30 % bei 120 min immer noch im linearen Bereich dieser Kurve, wobei sich

eine Bestgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,989$ ergab. Erst nach einer Inkubation von 2 Stunden flacht die Kurve langsam ab.

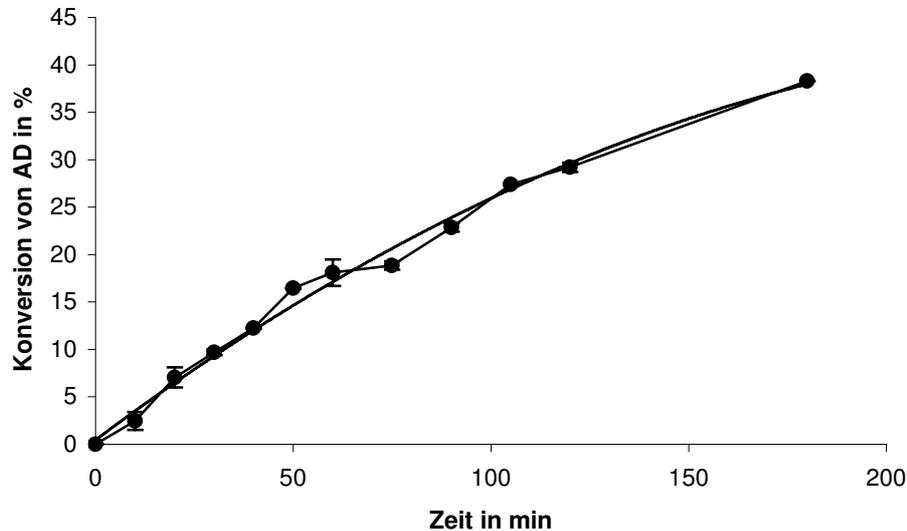


Abbildung III.5: Konversion des Substrates AD in Abhängigkeit von der Zeit

1.2.5 K_M -Wert-Bestimmung

Der K_M -Wert der $5\alpha R1$ im DU145 zellfreien Assay wurde durch den Einsatz von 5 verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Dabei wurde die Konversion des Substrates AD zum Produkt DHAD nach einer Inkubationszeit von 60 min quantifiziert und in eine nach Lee und Wilson modifizierte Lineweaver-Burk-Gleichung eingesetzt.¹³³ Der K_M -Wert kann dann als Kehrwert des negativen X-Achsenabschnitts der Auftragung $1/v^*$ gegen $1/s^*$ abgelesen werden.

$$\frac{1}{v^*} = \frac{K_M}{v_{\max}} * \frac{1}{S^*} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Gleichung nach Lee-Wilson

S_0 Anfangssubstratkonzentration (Androstendion)

S_t Androstendion nach Inkubationszeit $t = 1$ h

$$v^* = (S_0 - S_t) / t$$

$$S^* = (S_0 + S_t) / 2$$

Tabelle III.2: Substrat- und Produktkonzentrationen und daraus berechnete Parameter zur Bestimmung des K_M -Wertes nach Lee-Wilson

S_0 [nM]	S_t [nM]	$S_0 - S_t$ [nM]	S^* [nM]	$1/S^*$ [1/nM]	v^* [nM/h]	$1/v^*$ [h/nM]
10	7,9	2,1	8,9	0,1115	0,07	14,4928
110	89,1	20,9	99,5	0,0100	0,70	1,4329
260	220,9	39,1	240,4	0,0042	1,30	0,7667
510	453,1	56,9	481,6	0,0021	1,90	0,5276
1010	885,8	124,2	947,9	0,0011	4,14	0,2415

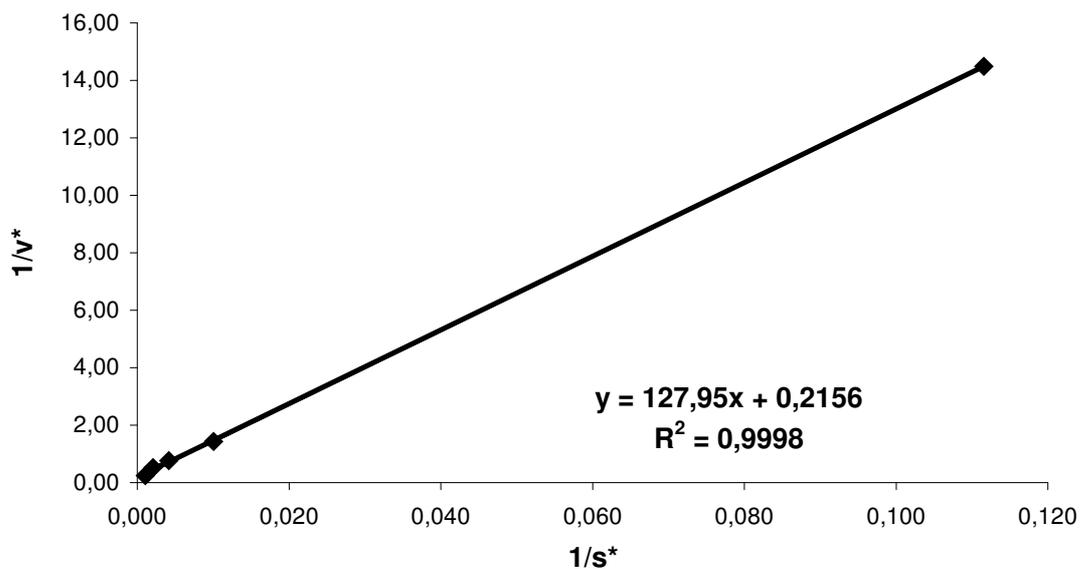


Abbildung III.6: Graphische Darstellung von $1/S^*$ gegen $1/v^*$ nach Lee-Wilson

Der K_M -Wert (als negativer X-Achsenabschnitt) kann nun anhand der ermittelten Geradengleichung errechnet werden, indem $y = 0$ gesetzt wird. Es ergibt sich für die 5 α R1 aus DU145 Zellen ein K_M -Wert von 593,5 nM. Dieser Wert ist gut vergleichbar

mit dem von Wolfgang Reichert im Rahmen seiner Dissertation bestimmten K_M -Wert für den DU145-Zellassay von 860 nM.

Die vorgeschlagene Substratkonzentration von 105 nM wurde nach diesen Ergebnissen dennoch beibehalten und nicht erhöht, weil sich hiermit in allen Tests lineare Umsatzraten erzielen ließen und das verwendete Gemisch aus [1β - ^3H (N)]-Androsten-4-en-3,17-dion und Androstendion eine sehr gute Detektierbarkeit aufwies.

1.2.6 Einführung von Referenzverbindungen

Zur Verifizierung des entwickelten Tests sollten nun Referenzverbindungen getestet werden, von denen bekannt war, dass sie potente $5\alpha\text{R}$ Inhibitoren waren. Eine steroidale Verbindung war Finasterid, das vor allem die $5\alpha\text{R}2$ hemmt und zur Behandlung der BPH zugelassen ist. Als zweiter Hemmstoff wurde 4-MA herangezogen, das sehr potent beide Isoenzyme hemmt. Wie Tabelle III.3 zeigt, wies 4-MA mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM eine sehr gute Hemmung der $5\alpha\text{R}1$ im DU145 zellfreien Assay auf. Auch der IC_{50} -Wert von Finasterid lag mit 202 nM im erwarteten Bereich, da Finasterid ein potenterer Hemmstoff für die $5\alpha\text{R}2$ ist. Die Hemmdaten waren gut vergleichbar mit den vorher in anderen Testsystemen ermittelten Werten (z.B. DU145 Zellassay) und den in der Literatur angegebenen, die für 4-MA immer im tiefen nanomolaren Bereich liegen.^{62-64,77}

1.3 Testung von Inhibitoren an den zellfreien Assays für $5\alpha\text{R}1$ und $5\alpha\text{R}2$

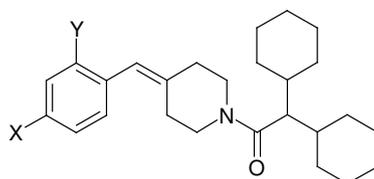
Im Rahmen der neu entwickelten Prodrug-Strategie sollten die in Kapitel III.1 beschriebenen Ester-Säure-Paare unter Ausschluss von Permeationseinflüssen in dem neu entwickelten DU145-Mikrosomenassay getestet und den vorher bestimmten Werten im BPH-Mikrosomenassay für $5\alpha\text{R}2$ gegenübergestellt werden.

Wie vorher erwähnt, wurden die Ester als Prodrugs für die $5\alpha\text{R}$ entwickelt, um damit die negative Ladung der entsprechenden Carbonsäuren und die damit verbundene

schlechte Zellpermeation zu überwinden. Nach einer guten Absorption der Ester in die DU145 Zellen konnte zusätzlich auch eine Wirkung für die 5 α R1 nachgewiesen werden. Die Theorie dazu war, dass die Ester in den DU145 Zellen gespalten wurden und die intrazellulär freigesetzte Säure auch die 5 α R1 hemmen konnte.

Wie Tabelle III.3 zeigt, sind alle Säuren 1, 2 und 3 sehr potente Inhibitoren der 5 α R2. Die beste Carbonsäure trägt im meta-Position einen Fluor-Substituenten und wies im BPH-Mikrosomenassay einen IC₅₀-Wert von 11 nM auf. Im DU145 Zellassay hingegen zeigten die Carbonsäuren keine Hemmung, wie schon vorher (Kapitel III.1) beschrieben.

Tabelle III.3: Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2 durch 3 Ester-Säure-Paare



Verbindung	X	Y	[IC ₅₀ (μM)] oder % Hemmung (10μM)		
			BPH	DU145	DU145
			5 α R2 Mikrosomen	5 α R1 Ganze Zellen	5 α R1 Mikrosomen
1	COOH	H	[0,060]	35	25
1a	COOCH ₃	H	20	[2]	[6,86]
2	COOH	F	[0,011]	12	28
2a	COOCH ₃	F	56	[2,55]	[1,494]
3	COOH	OCH ₃	[0,130]	5	46
3a	COOCH ₃	OCH ₃	28	[0,43]	[0,206]
4-MA			[0,003]	[0,006]	[0,003]
Finasterid			[0,005]	[0,041]	[0,202]

Allerdings konnte auch in dem neu entwickelten DU145 zellfreien Assay keine wesentliche Verbesserung der Hemmwirkung am freien Typ 1 Enzym festgestellt werden. Die beste Hemmwirkung konnte mit Verbindung 3 erreicht werden, die bei einer Konzentration von 10 μM eine Hemmung der 5 α R1 von 46 % zeigte. Die schlechte Inhibition der Carbonsäuren im DU145 Zellassay lag also nicht nur an der schlechten Zellpermeation, sondern zusätzlich an der geringen Hemmwirkung am freien Isoenzym 1.

Im Gegensatz zu den Säuren, zeigten alle Ester 1a, 2a und 3a im BPH-Assay kaum Hemmwirkung für die 5 α R2. Dieses Resultat war wie erwartet, denn die Methylester waren ja als Prodrugs für die 5 α R entwickelt worden und die Definition eines Prodrugs besagt, dass es sich hierbei um eine pharmakologisch nicht oder wenig wirksame Substanz handelt, die erst durch Verstoffwechslung im Körper in einen aktiven Wirkstoff überführt wird.

Interessanterweise konnte für die Methylester nicht nur eine Wirkung im DU145 Zellassay festgestellt werden, sondern auch im DU145 zellfreien Assay. Die Hemmwirkung der Ester beruhte also nicht, wie ursprünglich vermutet, auf der Spaltung zu den korrespondierenden Carbonsäuren, sondern sie waren selbst Inhibitoren der 5 α R1. Der potenteste Hemmstoff war der Methylester 3a mit einem IC_{50} -Wert von 206 nM, getestet am freien 5 α R1 Enzym.

Die Methylester 1a-3a, die ursprünglich als Prodrugs entwickelt wurden, um die Zellmembran besser überwinden zu können, stellten sich nun selbst als potente Hemmstoffe der 5 α R1 heraus, und waren damit keine echten Prodrugs mehr. Im folgenden soll deshalb ein solcher Ester als Precursor bezeichnet werden.

2. Entwicklung des Hybridinhibitor-Konzepts

Aus den im vorhergehenden Kapitel gezeigten Hemmdaten ließ sich nun ein völlig neues Konzept zur dualen Hemmung der 5 α R entwickeln. Da die Methylester eine gute Hemmwirkung am Isoenzym 1 zeigten und gleichzeitig aber auch als Precursor für die 5 α R2 aktiven Carbonsäuren dienten, kann mit der Applikation einer Verbindung eine duale Hemmung der 5 α R1 und 5 α R2 erreicht werden.

2.1 Voraussetzungen für einen erfolgreichen Hybridinhibitor

Wenn man den Methylester als Hemmstoff für die 5 α R1 betrachtet, dann darf er nicht zu schnell hydrolysiert werden während seiner Absorption und Verteilung im menschlichen Körper. Er muss als Inhibitor also hinreichend stabil sein, um die 5 α R1 in der Peripherie hemmen zu können. Andererseits muss der Ester als Precursor für die 5 α R2 das Target-Organ, die Prostata, erreichen und dort in die korrespondierende Carbonsäure gespalten werden.

Deshalb wurde die Esterstabilität bzw. -labilität überprüft. Die Ester mussten zuerst eine gute Stabilität in wässriger Lösung (PBS-Puffer) bei 37°C aufweisen. Caco-2 Zellen (Carcinoma Colon Zellen) sind ein oft verwendetes Modell für den Gastrointestinaltrakt. Daher wurde die Stabilität gegenüber intestinalen Esterasen durch Inkubation mit Caco-2 Zellhomogenat untersucht. Anschließend wurde überprüft, ob die Ester hinreichend hydrolyse-stabil gegen Enzyme in humanem Plasma waren, das das größte Verteilungskompartiment des menschlichen Körpers darstellt. Schließlich wurde die Labilität der Hybridhemmstoffe in BPH-Gewebe-Homogenat, das als Modell für die Prostata herangezogen wurde, getestet.

2.2 Stabilitätsuntersuchungen der Hybridhemmstoffe

2.2.1 Stabilität in Puffer

Für den Test wurden 20 μ M des jeweiligen Esters in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 37 °C inkubiert. Nach 72 h wurden die Proben mit 0,1 N HCl in Acetonitril versetzt, ein Aliquot entnommen und zur Trockne eingedampft. Nach Resuspendieren in

Methanol wurden die Proben schließlich per HPLC vermessen. Die Abnahme des Ester wurde mittels DAD (275 nm) quantifiziert und relativ zu gespikten, direkt extrahierten 100 % - Proben angegeben. Dabei wurde auch gleichzeitig auf die Zunahme der entsprechenden Säure geachtet. Nach 72 Stunden konnten von allen Estern 1a, 2a und 3a keinerlei Hydrolyse festgestellt werden (siehe Abbildung III.7),

2.2.2 Stabilität in humanem Plasma

Das humane Plasma wurde selbst aus Citratblut von freiwilligen, gesunden Probanden unseres Arbeitskreises gewonnen. Durch Zentrifugation bei 2000 g setzten sich die korpuskulären Elemente des Vollblutes am Boden ab, während das Blutplasma als schwach gelbe Flüssigkeit nach oben stieg und so leicht abgetrennt werden konnte.

Die Gesamtesterase-Aktivität des mit PBS-Puffer auf 80 % verdünnten Plasmas wurde jeweils vor einem Stabilitätstest mittels PNPA bestimmt. Die zu testenden Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 20 μ M eingesetzt und über einen Zeitraum von 72 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 0,1 N HCl in Acetonitril versetzt, wodurch die Enzyme im Plasma sofort ausgefällt und die enzymatischen Reaktionen gestoppt wurden. Aliquots wurden entnommen, zur Trockne eingedampft und vor der HPLC-Analyse wieder in Methanol resuspendiert. Als 100 % - Proben dienten hier ebenfalls gespikte, direkt extrahierte Proben.

Über den gesamten Inkubationszeitraum von 72 h konnte keine Esterhydrolyse beobachtet werden (siehe Abbildung III.7). Die Methylester erwiesen sich also als sehr stabil gegenüber humanen Plasma-Esterasen.

2.2.3 Labilität in BPH-Gewebehomogenat

Die operative Entfernung der Gewebewucherung bei BPH wird als Standardverfahren im Universitätsklinikum Homburg eingesetzt. Das dabei anfallende Gewebe wurde in PBS-Puffer gegeben und zuerst mittels Ultraturrax und schließlich mit Hilfe eines Glashomogenisators zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Bei der Inkubation des Gewebehomogenats mit den Methylestern und

der Probenaufarbeitung wurde ebenso verfahren wie bei der Testung auf Plasma-Stabilität.

Wie Abbildung III.7 zeigt, konnte erfreulicherweise nach einer Inkubationszeit von nur 20 h (im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 72 h in Plasma) eine signifikante Spaltung aller Ester detektiert werden. Methylester 1a wurde zu 23,7 % und Methylester 3a zu 29,8 % hydrolysiert, wobei die Entstehung der korrespondierenden Säuren beobachtet werden konnte. Das beste Substrat für Esterasen in der Prostata mit einer Hydrolyse von 42,4 % stellte die fluorierte Verbindung 2a dar.

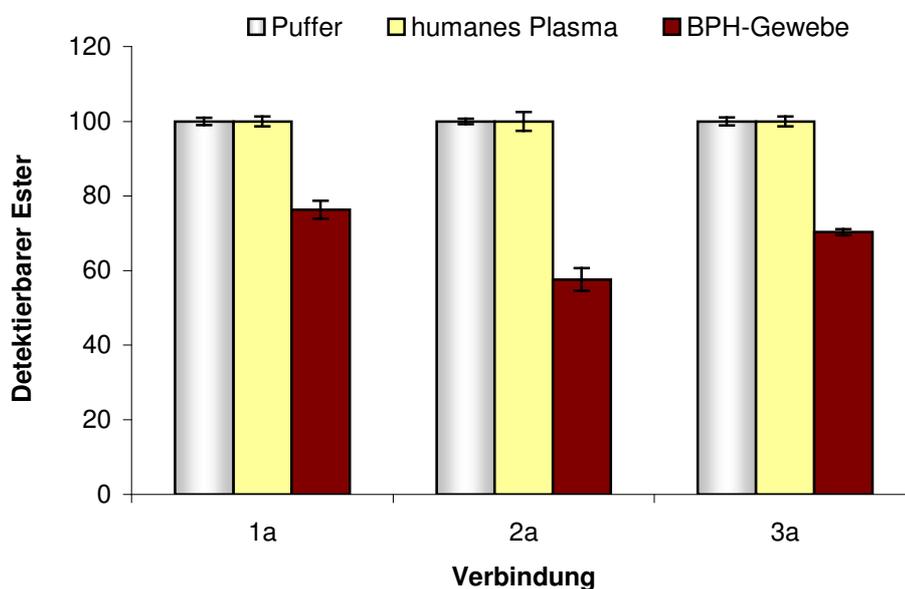


Abbildung III.7: Stabilitätsuntersuchungen der Hybridhemmstoffe

2.2.4 Stabilität in Caco-2 Zellhomogenat

Diese Untersuchungen wurden von Christiane Scherer im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. $2 \cdot 10^6$ Caco-2 Zellen pro ml PBS-Puffer wurden mittels Ultraschallstab aufgeschlossen und das entstandene Homogenat anschließend mit den Testsubstanzen bei 37 °C über 3 h im Schüttler inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse wurde durch Zugabe von 0,1 N HCl in Acetonitril gestoppt und die Proben mittels HPLC-MS/MS quantifiziert. Nach 3 Stunden waren von allen Estern noch ca.

50 % vorhanden, was auf eine hinreichende Hydrolyse-Stabilität während der Magen-Darm-Passage schließen ließ.

2.2.5 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen

Bei der Messung mittels HPLC wurde als stationäre Phase eine RP-Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec) mit entsprechender Vorsäule benutzt. Die mobile Phase A bestand aus Wasser mit 0,5 % Essigsäure und die mobile Phase B aus Acetonitril mit 0,5 % Essigsäure. Um Ester und Säure unter Baseline-Trennung zu eluieren, wurde bei einem Fluss von 0,5 ml/min folgendes Gradientenprogramm verwendet: Von 0 – 8 min wurde B von 70 % auf 100 % erhöht. Danach wurde bis zur vollständigen Elution der Substanzen auf 100 % B eingespült. Das Injektionsvolumen betrug 25 µl und die Säulentemperatur 30 °C.

Die Abnahme der Ester-Peaks wurde mittels DAD (Dioden Array Detektor) quantifiziert und die Zunahme der entsprechenden Säure-Peaks dabei beobachtet. Durch Spektrenaufnahme der Ester wurden die Absorptionsmaxima ermittelt. Alle Ester konnten bei 275 nm detektiert werden. Es wurden ebenfalls die Detektionsgrenze und der Arbeitsbereich bestimmt, innerhalb dessen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Analyten und des DAD-Signals bestand. Letzteres wurden durch Aufnahme von Kalibrierkurven jeder Substanz überprüft. Die getesteten Verbindungen wurden mit Hilfe der Reinsubstanzen anhand ihrer Retentionszeiten und der Peakreinheitsprüfung (Spektrenvergleich mittels DAD) verifiziert.

2.2.6 Vergleich der eingesetzten biologischen Medien

Humanes Plasma und BPH-Gewebehomogenat wurden sowohl aufgrund des Proteingehaltes nach der Methode von Bradford¹²⁹ als auch durch die Aktivität der enthaltenen Esterasen (Spaltung von p-Nitrophenylacetat) charakterisiert. Bei der Proteinbestimmung bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer

Lösung unspezifisch sowohl mit den kationischen als auch den hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der kationischen Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner anionischen Sulfatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 595 nm. Zur Ermittlung des Proteingehaltes einer Probe wurde zuvor eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin aufgenommen.

Die Gesamtesterase-Aktivität wurde mit leichten Abwandlungen nach der Methode von Pauletti et al. bestimmt. Als unspezifisches Substrat für Esterasen wurde das farblose p-Nitrophenylacetat (PNPA) eingesetzt, das zu seinem gelben Produkt (4-Nitrophenol) hydrolysiert werden kann. Die Reaktion konnte spektrometrisch im Multilabel Counter bei 405 nm und 37°C bis zur fast vollständigen Konversion verfolgt werden. Eine Kalibrierkurve von p-Nitrophenol wurde erstellt, um die Esterase-Aktivität nach 1 min bestimmen zu können.

Die spezifische Aktivität wurde schließlich unter Einbeziehung der Proteinkonzentration in nmol / min / mg Protein angegeben. Die spezifischen Aktivitäten von Plasma und BPH-Gewebe sind nachfolgend angegeben:

Humanes Plasma:	5,2 nmol / min / mg Protein
BPH-Gewebehomogenat	3,4 nmol / min / mg Protein
Caco-2 Zellhomogenat	10,7 nmol / min / mg Protein

2.3 Fazit und Bewertung des Hybridinhibitor-konzepts

Nach Applikation des Methylesters als Hybridinhibitor kann dieser die Zellmembran gut überwinden (getestet für Verbindung 1a an DU145 Zellen als Modell für das Target-Organ). Da der Ester hinreichend stabil in Caco-2 Zellhomogenat (als Modell für den Gastrointestinalen Trakt) und humanem Plasma ist, kann angenommen werden, dass er selektiv die 5 α R1 in der Peripherie hemmt. Nachdem der Hybridhemmstoff jedoch das Target-Organ erreicht hat, kann dieser durch Enzyme der Prostata (getestet in BPH-Gewebehomogenat) hydrolysiert werden und seinen aktiven Metaboliten freisetzen. Die korrespondierende Säure wäre dann in der Lage,

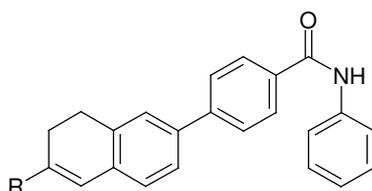
als potenter Hemmstoff selektiv die $5\alpha R2$ zu hemmen. Durch dieses neuartige, duale Hemmkonzept ist es möglich, beide Isoenzyme der $5\alpha R$ durch Gabe einer Substanz zu hemmen.

Vergleicht man die Gesamtesterase-Aktivitäten der biologischen Medien, so stellt man fest, dass in humanem Plasma trotz 1,5-fach höherer Esteraseaktivität im Vergleich zu BPH-Gewebehomogenat keine Hydrolyse der Ester durch Plasma-Esterasen erfolgte. Durch Prostata-Esterasen jedoch ließen sich die Methylester relativ gut zur korrespondierenden Säure spalten. Außerdem kann angenommen werden, dass die Stabilität der Ester in Caco-2 Zellhomogenat ausreichend ist, um eine Magen-Darm-Passage zu überstehen, da die Inkubationszeit von 3 h recht lange gewählt wurde und die Gesamtesterase-Aktivität mit $10,7 \text{ nmol} / \text{min} / \text{mg}$ Protein im Vergleich zu den anderen biologischen Medien doppelt bzw. 3-fach so hoch war.

3. Screening der hauseigenen Substanzbibliothek nach weiteren Hybridhemmstoffen

Hybridester, die selektiv die 5 α R1 hemmen und nach Spaltung eine Säure freisetzen, die selektiv die 5 α R2 hemmt, konnten bisher nur in der Klasse der *N*-substituierten Piperidin-4-ylidenmethyl-benzoesäure-ester nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob dieses Konzept auch in anderen Substanzklassen zu finden ist, wurde die Substanzbibliothek des Arbeitskreises nach weiteren Hybridinhibitoren gescreent. Dazu wurden Carbonsäuren ausgewählt, die sich bereits als gute 5 α R2 Hemmstoffe erwiesen hatten und von denen eine veresterte Verbindung existierte. Die Hemmdaten für die 5 α R2 wurden im BPH Mikrosomenassay ermittelt und die Ester im DU145 Mikrosomenassay auf ihre 5 α R1 Aktivität getestet.

Tabelle III.4: Hemmung der humanen 5 α R durch eine 6-substituierte 3,4-Dihydro-naphthalen-2-carbonsäure und korrespondierenden Ester

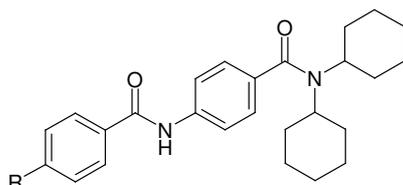


Verbindung	R	[IC ₅₀ [(μ M)]]	
		% Hemmung (10 μ M)	
		BPH 5 α R2 Mikrosomen	DU145 5 α R1 Mikrosomen
OR4	COOH	[0,460]	25,5
OR3	COOCH ₃	24,0	13,0

Aus der ersten getesteten Substanzklasse wurde eine 6-substituierte 3,4-Dihydro-naphthalen-2-carbonsäure und ihr entsprechender Methylester ausgewählt.¹¹⁹ Die Säure (6-[4-(*N*-Phenylaminocarbonyl)phenyl]-3,4-dihydro-naphthalen-2-carbonsäure) OR4 zeigte im BPH Mikrosomenassay einen IC₅₀-Wert von 460 nM und wie erwartet

im DU145 Mikrosomenassay kaum Hemmwirkung mit 25,5 % bei 10 μM (siehe Tabelle III.4). Der korrespondierende Methylester OR3 wies gegenüber der 5 α R2 keine Wirkung auf. Auch die erhoffte 5 α R1 Hemmaktivität blieb aus.

Tabelle III.5: Hemmung der humanen 5 α R durch *N*-(4-Dicyclohexylcarbamoyl-phenyl)-terephthalamidsäure und korrespondieren Ethylester



Verbindung	R	[IC ₅₀ [(μM)]	
		% Hemmung (10 μM)	
		BPH 5 α R2 Mikrosomen	DU145 5 α R1 Mikrosomen
MK50	COOH	[4,1]	22,3
MK49	COOCH ₂ CH ₃	0	22,0

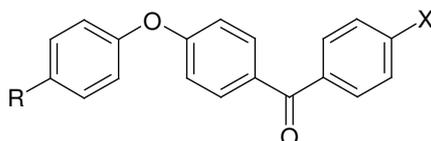
Die nächste getestete Substanzklasse ist in Tabelle III.5 aufgeführt. Marc Klein synthetisierte diese Terephthaloylanilide im Rahmen seiner Dissertation. Die Säure MK50 besaß einen IC₅₀-Wert von 4,1 μM im BPH Mikrosomenassay. Ihre Synthesestufe ist der entsprechende Ethylester MK49, der leider gegenüber der 5 α R1 keine gute Hemmwirkung zeigte.

Bei den in Tabelle III.6 aufgeführten Verbindungen handelt es sich um Benzoylphenoxy-benzoesäuren bzw. um Benzoylphenoxy-phenylessigsäuren, die von Ola I. A. Salem während ihrer Dissertation synthetisiert wurden. Die Verbindung OR55 (4-[4-(4-Methyl-benzoyl)-phenoxy]-benzoesäure), OR38 (4-[4-(4-Bromo-benzoyl)-phenoxy]-benzoesäure) und OR67 ((4-[4-(4-Bromo-benzoyl)-phenoxy]-phenyl)-essigsäure) sind sehr potente Hemmstoffe der 5 α R2 mit entsprechenden IC₅₀-

Werten von 13 nM, 12 nM und 44 nM. Gegenüber der 5 α R1 zeigten die Carbonsäuren eine schlechte Hemmwirkung. OR67 zeigte im DU145 Mikrosomenassay noch eine Hemmung von 52 % bei 10 μ M und besaß somit eine minimale duale Hemmung.

Für die korrespondierenden Methylester OR54, OR37 und OR66 konnte gegenüber der 5 α R1 ebenfalls keine Hemmung nachgewiesen werden. OR54 zeigte einen relativ hohen prozentualen Hemmwert von 77 % für das Isoenzym 2. Dieser Wert ist sicherlich auf eine geringe Hydrolyse des Methylesters zur entsprechenden Säure zurückzuführen, die einen hoch potenten 5 α R2 Inhibitor darstellt.

Tabelle III.6: Hemmung der humanen 5 α R durch Benzoyl-phenoxy-benzoessäuren bzw. Benzoyl-phenoxy-phenylessäuren und korrespondierende Ester



Verbindung	R	X	[IC ₅₀ [(μ M)]	
			% Hemmung (10 μ M)	
			BPH 5 α R2 Mikrosomen	DU145 5 α R1 Mikrosomen
OR55	COOH	CH ₃	[0,013]	29,5
OR54	COOCH ₃	CH ₃	77	16
OR38	COOH	Br	[0,012]	16,5
OR37	COOCH ₃	Br	38	16
OR67	CH ₂ COOH	Br	[0,044]	52
OR66	CH ₂ COOCH ₃	Br	40	15

In Tabelle III.7 sind Verbindung von Marc Klein aufgelistet. MK71 (4-[2-(4-tert-Butylcarbamoyl-phenyl)-vinyl]-benzoessäure) und MK73 (4-[2-(4-Diisopropyl-carbamoyl-phenyl)-vinyl]-benzoessäure) zeigten gute Hemmwerte im BPH

Mikrosomenassay mit IC_{50} -Werten von 2,1 μM und 410 nM. Für die $5\alpha\text{R}1$ allerdings konnte weder für die Säuren noch für ihre korrespondierenden Ethylester MK70 und MK72 eine gute Hemmung festgestellt werden.

Tabelle III.7: Hemmung der humanen $5\alpha\text{R}$ durch Vinyl-benzoesäuren und entsprechende Ethylester

Verbindung	R	X	[IC_{50}] [(μM)]	
			% Hemmung (10 μM)	
			BPH 5 $\alpha\text{R}2$ Mikrosomen	DU145 5 $\alpha\text{R}1$ Mikrosomen
MK71	COOH		[2,1]	35,8
MK70	COOCH ₂ CH ₃		0	9,3
MK73	COOH		[0,41]	17,3
MK72	COOCH ₂ CH ₃		72,0	28,0

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der getesteten Substanzklassen zur Klasse der *N*-substituierten Piperidin-4-ylidenmethyl-benzoesäuren und ihrer korrespondierenden Ester, war es nicht möglich, nach Screening der hauseigenen Substanzbibliothek

weitere Hydridhemmstoffe zu identifizieren. Obwohl es sich bei allen ausgewählten Carbonsäuren um aktive $5\alpha R2$ Inhibitoren handelt, konnte für die korrespondierenden Ester keine Hemmaktivität am Isoenzym 1 nachgewiesen werden.

4. Optimierung der Teststrategie

Um das Screening nach neuen Hybridhemmstoffen zu erleichtern, sollte die Teststrategie verbessert und erweitert werden. Deshalb wurden zur weiteren Hemmstofftestung an den 5 α R Isoenzymen zwei neue zellfreie Assays entwickelt. Als Enzymquelle dienten hierbei die HEK-I und HEK-II Zelllinien, die exklusiv in unserem Arbeitskreis etabliert wurden. Es handelt sich um primäre embryonale Nierenzellen, die durch Transformation mit dem Adenovirus Typ 5 auf Dauer kultivierbar gemacht wurden und entsprechend ihrer Bezeichnung humane aktive 5 α R1 und 5 α R2 exprimieren. Durch Entwicklung zweier zellfreier Assays wurden der BPH-Mikrosomentest und der DU145 Mikrosomenassay ersetzt.

Ausgehend von der gleichen Zelllinie für die 5 α R1 und 5 α R2 Testung sollten durch Verwendung der gleichen Enzymquelle und nach derselben Aufarbeitungsmethode besser vergleichbare Hemmwerte für beide Isoenzyme erhalten werden. Da für den BPH-Mikrosomentest Testosteron und für den DU145 Mikrosomenassay Androstendion verwendet wurde, die Affinitäten der beiden Substrate zu den Isoenzymen aber nicht gleich sind, sollte bei der Neuentwicklung auch besonderen Wert auf den Einsatz desselben Substrates gelegt werden.

BPH-Homogenat wurde aus der operativen Entfernung der Gewebewucherung bei BPH-Patienten gewonnen. Da dieses Gewebe immer sehr rar zu beschaffen war und die daraus gewonnenen Aufarbeitungen auch immer individuellen Schwankungen der verschiedenen Patienten unterlagen, sollte dieser Test durch einen HEK-II Homogenatassay ersetzt werden. Ein weiterer Grund für diesen Ersatz war, dass in der Prostata beide Isoenzyme der 5 α R exprimiert und auch aktiv sind. Folglich enthielt die BPH-Gewebeaufarbeitung nicht nur 5 α R2, sondern auch in geringerer Menge Isoenzym 1, wodurch die Hemmwerte der selektiven Inhibitoren leicht verfälscht werden könnten. In HEK-II Zellen dagegen befindet sich nur aktive 5 α R2, die in Form einer Enzympräparation aus diesen definierten Zellen in hoher Menge gewonnen werden kann.

DU145 Zellen exprimieren neben der 5 α R1 auch das Isoenzym 2 und 17 β -Hydroxy-Steroiddehydrogenase, die ebenfalls in der Lage sind, T und AD umzusetzen. Außerdem ist die 5 α R1 Aktivität in DU145 Zellen viel geringer als in HEK-I Zellen, so dass für einen HEK-I Homogenatassay viel weniger Zellen für dieselbe Enzymausbeute benötigt werden, was schließlich Zeit und Kosten einsparen kann.

Um einen AD Umsatz von 25 % zu erzielen, müssen bei gleicher Zellzahl DU145 Zellen 5 h inkubiert werden und HEK-I Zellen gerade mal 30 min. An dieser Stelle ist allerdings anzumerken, dass der HEK293 Wildtyp eine sehr geringe endogene 5 α R2 Aktivität besitzt und unter denselben Bedingungen nach 24 h eine Konversion an AD von 25 % zeigte. Diese 5 α R2 Aktivität der HEK-II-Zellen ist allerdings im Vergleich zur höheren Aktivität der 17 β -Hydroxy-Steroiddehydrogenase (und der 5 α R2) in DU145 Zellen zu vernachlässigen.

4.1 Entwicklung des HEK-I Homogenattests

4.1.1 Wahl der Zellzahl

Erste Anhaltspunkte bei der Wahl der Zellzahl lieferte der HEK-I Zellassay, bei dem durch Verwendung von Androstendion als Substrat in einer 80 % konfluenten 24-well Gewebekulturschale bereits nach 35 min eine 25 %ige Konversion erreicht werden konnte (siehe Dissertationsschrift von Wolfgang Reichert). Auf die 5 α R1 Aktivität bezogen, waren diese Zellen also aktiver als DU145 Zellen. Die Entscheidung fiel nach verschiedenen Tests auf eine Zellzahl von 1 Million Zellen in einem Gesamtansatz von 500 μ l. Davon ausgehend wurden nun weitere Assayparameter optimiert.

4.1.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss (siehe auch Kapitel VIII.1.8) wurden jeweils zu etwa 80 % konfluente Zellen verwendet, die vorher unter Selektionsdruck mit G418-Sulfat in DMEM-Kulturmedium angezogen wurden. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen, um Reste des FKS-haltigen Mediums, die beim Homogenisieren und bei der späteren Inkubation erheblich stören könnten, zu entfernen. Danach wurden die Zellen durch mehrmaliges Abspülen mit PBS-Puffer von ihrer Substratoberfläche abgelöst und die Zellzahl mittels Casy[®] Cell Counter bestimmt.

Alle Homogenisierungsschritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Da die Enzymausstattung der HEK-Zellen sehr spärlich ist und mit PNPA kaum Esterase-Aktivität zu finden war, wurde auf Proteaseinhibitoren wie PMSF verzichtet.

Aufschlussversuche mit 10 μ M PMSF-Zusatz erbrachten zudem keine höhere 5 α R-Aktivität. Der Homogenat-Puffer war -wie schon im DU145 Mikrosomenassay verwendet- annähernd isoosmotisch und enthielt 300 mM Saccharose, als organischen Pufferbestandteil 5 mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA.

Mittels Ultraschallstab wurde die Zellsuspension aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 10 s mit 50 s Kühlpause auf höchster Stufe homogenisiert wurde. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst wenig Schaum zu produzieren. Durch die Sondenspitze durfte es zu keiner lokalen Erhitzung der Zellsuspension kommen. Der Grad des Zellaufschlusses wurde sowohl optisch verfolgt, als auch durch Bestimmung der eventuell noch lebenden Zellen mit dem Casy[®] Cell Counter. Vor der weiteren Verarbeitung musste ein Aufschluss von mindestens 97 % erreicht sein. Aufgrund der höheren 5 α R1 Aktivität und der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte hier auf eine Zentrifugation des Homogenats (wie beim DU145 Mikrosomenassay) verzichtet werden. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und belief sich bei der eingesetzten Zellzahl auf etwa 0,5 mg Protein pro ml. Die erhaltene Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

4.1.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen

Bärbel Panter hat im Rahmen ihrer Dissertation Untersuchungen an HEK-I und HEK-II Zellen mit Testosteron als Substrat durchgeführt. Die Konversions-Zeit-Kurven zeigten eine starke 5 α R2 Aktivität (80 % Konversion an T in 120 min), während die 5 α R1 Aktivität viel geringer war (20 % Konversion nach 180 min). Bei der Konversion von AD wurden unter den gleichen Testbedingungen in HEK-II bereits nach 60 min über 80 % des Substrates umgesetzt (siehe Disserationsschrift W. Reichert). Außerdem war der AD-Umsatz der 5 α R2 gerade mal doppelt so hoch wie der der 5 α R1. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Bestimmung der K_M -Werte der beiden in CHO-Zellen exprimierten Isoenzyme von Thigpen et. al. bestätigt.¹³⁴ Dabei stellte sich heraus, dass die K_M -Werte des Isoenzym 2 für T und AD als Substrat identisch sind. Bei Isoenzym 1 ist jedoch die Affinität von AD viel größer als die von T (K_M -Wert von AD um 8,5 höher).

Um also die Ergebnisse des HEK-I Zellassays besser mit den Daten des HEK-I Homogenatassays vergleichen zu können und aufgrund der höheren Affinität von AD zum Enzym, fiel die Wahl des Substrats hier ebenfalls auf Androstendion. Eine Mischung aus Androstendion und radioaktiv markiertem [1β - $^3\text{H}(\text{N})$]-Androsten-4-en-3,17-dion wurde eingesetzt, um den Substratumsatz mittels Radiodetektor erfassen zu können. Als optimale Radioaktivitätsmenge hatten sich 63,25 nCi (entspricht 5 nM AD) erwiesen. (siehe Kapitel 1.2.3.)

Da nicht in intakten Zellen gearbeitet wurde, musste dem Reaktionsansatz ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt werden, um eine Versorgung der $5\alpha\text{R}$ mit Cofaktor zu garantieren. Das System bestand aus NADP, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, das 1 h vor dem Teststart angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt wurde, damit bereits genügend NADPH gebildet werden konnte. Der Test wurde in Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4 und 37 °C durchgeführt, um identische Bedingungen zum Zellassay zu schaffen. Der physiologische pH-Wert wurde belassen, da die $5\alpha\text{R}1$ ein breites pH-Optimum von 6,9 – 8,5 besitzt. Ein Absetzen der Proteine in den Proben wurde durch Inkubation in einem Schüttler verhindert.

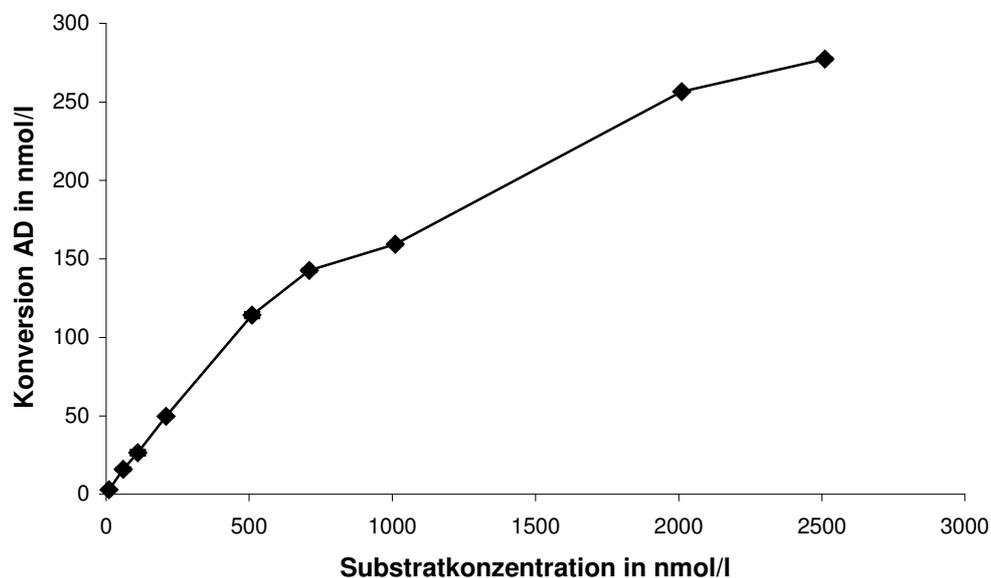


Abbildung III.8: Konversion von AD in Anhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration

Die Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentrationen und der Konversion von Androstendion zu Androstandion zeigt Abbildung III.8. Für weitere Tests wurde eine Substratkonzentration von 505 nM AD ausgewählt, um nach einer bestimmten Inkubationszeit (siehe Kapitel 4.1.4) einen Umsatz von ungefähr 25 % zu erhalten und somit im linearen Bereich dieser Kurve zu arbeiten.

Unter diesen Bedingungen wurde ebenfalls die lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Proteinkonzentration (bzw. der Zahl der aufgeschlossenen Zellen) nachgewiesen.

4.1.4 Inkubationszeit

Ausgehend von einer Substratkonzentration von 505 nM AD und der eingesetzten Zellzahl (1 Million aufgeschlossene Zellen pro Ansatz) wurde die notwendige Inkubationsdauer mit den vorher beschriebenen Parametern bestimmt. Die Inkubationszeit musste so gewählt werden, dass sie im linearen Bereich der Enzymaktivität-Zeit-Kurve lag. Dort liegt nach der Michaelis-Menten-Kinetik die initiale Enzymgeschwindigkeit vor, bei der angenommen werden kann, dass sich die Substratkonzentration nicht signifikant ändert. Um bei den durchgeführten Messungen gut reproduzierbare Daten zu erhalten, sollte also eine AD-Konversion von etwa 25 % im linearen Bereich erhalten werden.

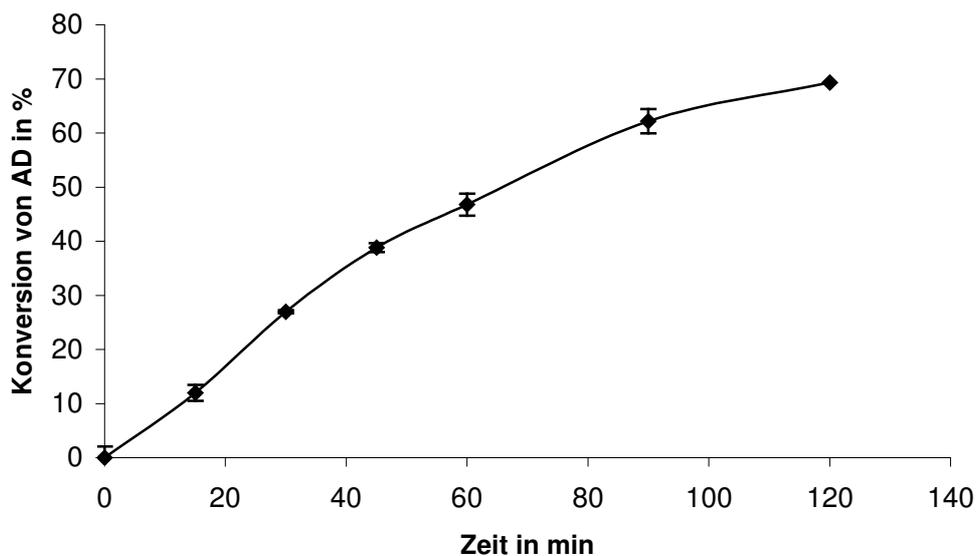


Abbildung III.9: Konversion des Substrates AD in Abhängigkeit von der Zeit

Wie Abbildung III.9 veranschaulicht, war die Enzymaktivität-Zeit-Kurve bis zu etwa 60 min linear und ein Umsatz von etwa 26 % nach einer Inkubationszeit von 30 min erreicht.

4.1.5 K_M -Wert-Bestimmung

Für die 5 α R1 wurde der K_M -Wert durch Inkubation mit 7 verschiedenen Substratkonzentrationen im HEK-I Homogenatassay bestimmt. Mit Hilfe der erzielten Konversionsraten an Androstendion nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die in Tabelle III.8 aufgeführten Parameter berechnet und in die nach Lee und Wilson modifizierte Lineweaver-Burk-Gleichung eingesetzt.

$$\frac{1}{v^*} = \frac{K_M}{v_{\max}} * \frac{1}{S^*} + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{Gleichung nach Lee-Wilson}$$

S_0 Anfangssubstratkonzentration (Androstendion)

S_t Androstendion nach Inkubationszeit $t = 30$ min

$$v^* = (S_0 - S_t) / t$$

$$S^* = (S_0 + S_t) / 2$$

Der K_M -Wert wurde als Kehrwert des negativen X-Achsenabschnitts der Auftragung $1/v^*$ gegen $1/S^*$ anhand der in Abbildung III.10 angegebenen Geradengleichung berechnet und betrug 851,6 nM. Dieser Wert liegt im selben Bereich wie der im DU145 Mikrosomenassay ermittelte K_M -Wert für die 5 α R1 (593,5 nM).

Da die gewählte Substratkonzentration von 505 nM AD relativ nahe am ermittelten K_M -Werte lag und neben einer guten Detektierbarkeit auch lineare Umsatzraten erzielt werden konnten, wurde die Konzentration an AD für künftige Tests so beibehalten.

Tabelle III.8: Substrat- und Produktkonzentrationen und daraus berechnete Parameter zur Bestimmung des K_M -Wertes der 5 α R1 nach Lee-Wilson

S_0 [nM]	S_t [nM]	$S_0 - S_t$ [nM]	S^* [nM]	$1/S^*$ [1/nM]	v^* [nM/30min]	$1/v^*$ [30min/nM]
10	2,88	7,12	8,56	0,1168	0,10	10,4275
110	26,49	83,51	96,76	0,0103	0,88	1,1326
210	49,67	160,34	185,17	0,0054	1,66	0,6040
510	114,29	395,71	452,85	0,0022	3,81	0,2626
710	142,64	567,36	638,68	0,0016	4,75	0,2103
1010	159,24	850,76	930,38	0,0011	5,31	0,1884
2510	277,27	2232,73	2371,36	0,0004	9,24	0,1082

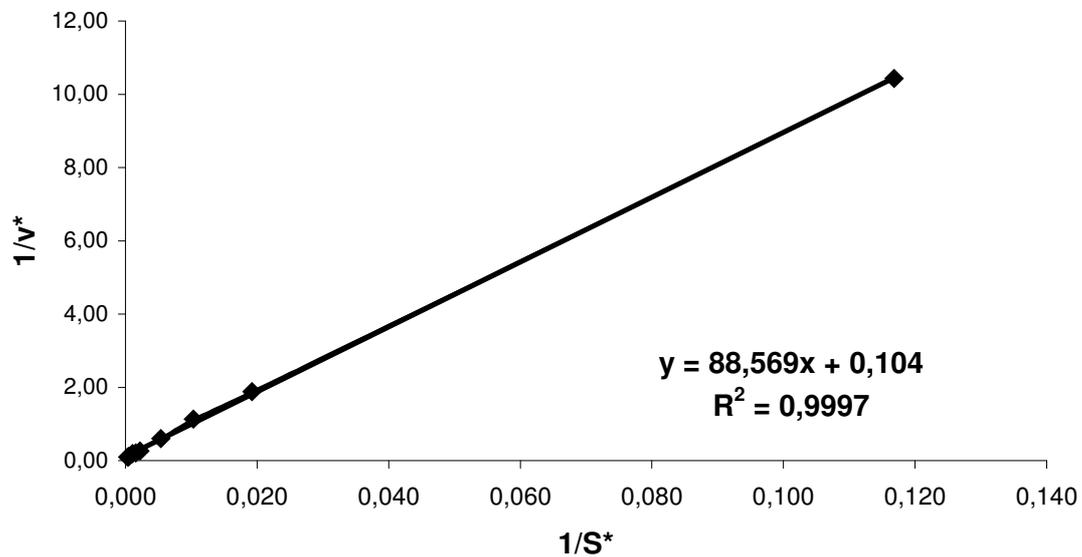


Abbildung III.10: Graphische Darstellung von $1/S^*$ gegen $1/v^*$ nach Lee-Wilson

4.2 Entwicklung des HEK-II Homogenatassay

4.2.1 Wahl der Zellzahl

Anhaltspunkte bei der Wahl der Zellzahl lieferte auch hier wieder der HEK-II Zellassay. Unter den gleichen Bedingungen wie im HEK-I Zellassay, wurde bei Verwendung von Androstendion als Substrat nach 13 min eine 25 %ige Konversion erreicht (siehe Dissertationsschrift von Wolfgang Reichert). Diese Zellen waren also aktiver als die unter gleichen Bedingungen transfizierte HEK-I Zelllinie. Nach mehreren Versuchen wurde eine Zellzahl von 0,4 Millionen in einem Gesamtansatz von 500 µl festgelegt. Diese Zellzahl war der Ausgangspunkt für die Optimierung weiterer Parameter.

4.2.2 Zellaufschluss

Beim Zellaufschluss wurde analog der vorher in Kapitel VIII.1.8 beschriebenen Methode für die HEK-I Zellen vorgegangen. Der Homogenat-Puffer enthielt 300 mM Saccharose, als organischen Pufferbestandteil 5 mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA ohne weitere Zusätze von Proteasehemmern. Homogenisiert wurde mittels Ultraschallstab, bis mindestens 97 % der Zellen aufgebrochen waren. Das Zellhomogenat wurde ebenfalls ohne weitere Zentrifugation aliquotiert, schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und lag bei etwa 0,8 mg Protein pro ml.

4.2.3 Substratwahl, benötigte Additive und weitere Bedingungen

Aus den bereits in Kapitel 4.1.3 diskutierten Gründen wurde für diesen Assay ebenfalls Androstendion verwendet. Die Hemmdaten aus HEK-I und HEK-II Homogenatassay (und den entsprechenden Zellassays) sollten direkt miteinander vergleichbar sein, was den Einsatz desselben Substrates voraussetzte. Die bewährte Mischung aus Androstendion und radioaktiv markiertem [1β - $^3\text{H}(\text{N})$]-Androsten-4-en-3,17-dion wurde für diesen Test beibehalten.

Dem Reaktionsansatz musste auch ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt werden, um die Versorgung der 5 α R2 mit Cofaktor zu gewährleisten (siehe Kapitel

4.1.3). Der Test wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator durchgeführt, um die Proben über den gesamten Inkubationszeitraum gleichmäßig zu durchmischen.

Es sind viele Literaturstellen zu finden, die für die 5 α R2 ein eher saures pH-Optimum bei pH 5,5 beschreiben. In einer Veröffentlichung von Thigpen et. al. werden jedoch beide Isoenzyme in CHO-Zellen exprimiert und anschließend charakterisiert. Nach bestimmten Zellperforationsmethoden konnte für die 5 α R2 auch ein neutrales pH-Optimum bei 7,0 gefunden werden.¹³⁴ Unter bisher verwendeten Bedingungen im HEK-II Homogenatassay konnte kein Unterschied in der Konversion von Androstendion festgestellt werden, wenn der pH-Wert von 7,4 auf 5,5 gesenkt wurde. Deshalb wurde weiterhin Tris-HCl-Puffer mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 verwendet (ebenso wie im HEK-I Homogenatassay).

Die lineare Abhängigkeit zwischen den eingesetzten Substratkonzentrationen und der Konversion von Androstendion wurde ebenfalls überprüft. Nach der gewählten Inkubationszeit von 30 min und einer AD Konzentration von 505 nM zeigte sich ein Umsatz von ungefähr 25 %.

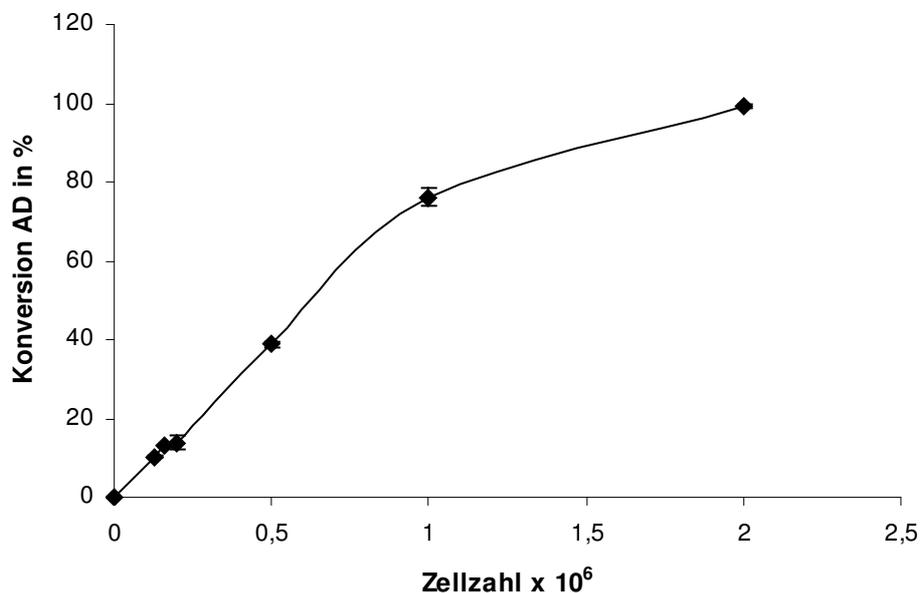


Abbildung III.11: Konversion des Substrates AD in Abhängigkeit von der Anzahl der aufgeschlossenen Zellen

Es wurde ebenfalls getestet, ob sich unter den bisher gewählten Bedingungen eine lineare Abhängigkeit der Substratkonversion von der Zahl der aufgeschlossenen Zellen (bzw. Proteinkonzentration) ergeben würde. Die dazu ermittelte Kurve ist in Abbildung III.11 dargestellt. Mit einer Zellzahl von 0,4 Millionen pro Reaktionsansatz und einer Substratkonzentration von 505 nM nach 30 min Inkubation wurde ein Enzymumsatz von etwa 27 % im linearen Bereich der Kurve erhalten.

4.2.4 Inkubationszeit

Ausgehend von 0,4 Millionen aufgeschlossener Zellen pro Ansatz und der gewählten Substratkonzentration von 505 nM AD wurde die notwendige Inkubationsdauer mit den vorher beschriebenen Parametern bestimmt. Die Inkubationszeit musste so gewählt werden, dass sie im linearen Bereich der Enzymaktivität-Zeit-Kurve lag. Um bei den späteren Experimenten gut reproduzierbare Daten zu erhalten, sollte eine AD-Konversion von etwa 25 % erhalten werden.

Abbildung III.12 zeigt, dass unter den gewählten Assaybedingungen die Konversion von AD zu DHAD über einen Inkubationszeitraum von mindestens 100 min linear ist. Ein Umsatz von etwa 25 % war nach 30 min erreicht, so dass diese Inkubationszeit für alle weiteren Experimente beibehalten wurde.

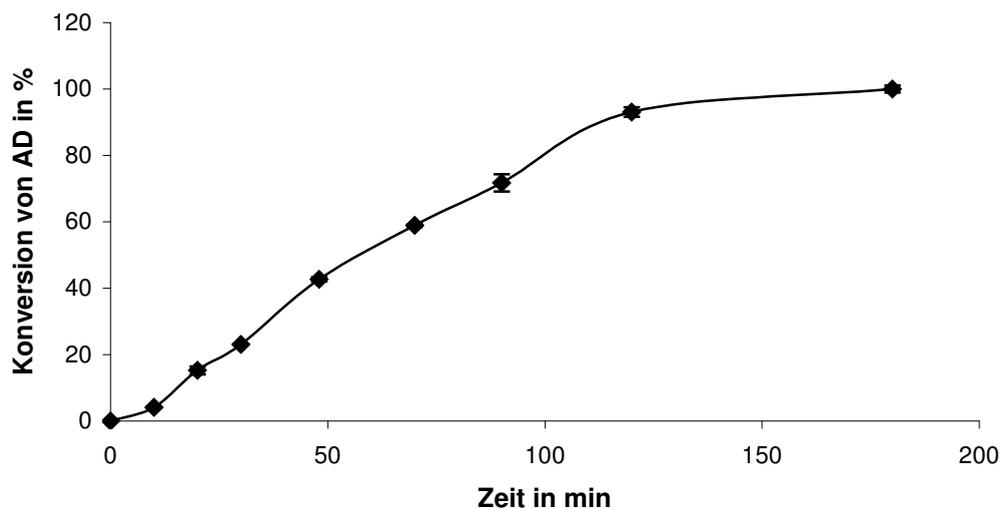


Abbildung III.12: Konversion des Substrates AD in Abhängigkeit von der Zeit

4.2.5 K_M -Wert-Bestimmung

Der K_M -Wert der $5\alpha R2$ wurde durch Inkubation mit 7 verschiedenen Substratkonzentrationen im HEK-II Homogenatassay bestimmt. Die erzielten Umsatzraten an AD wurden nach einer Inkubationszeit von 30 min erhalten und dienten zur Berechnung der in Tabelle III.9 aufgeführten Parameter, die in die nach Lee und Wilson modifizierte Lineweaver-Burk-Gleichung eingesetzt wurden.

Anhand der in Abbildung III.13 dargestellten Geradengleichung konnte der K_M -Wert als Kehrwert des negativen X-Achsenabschnitts der Auftragung $1/v^*$ gegen $1/S^*$ berechnet werden. Der K_M -Wert betrug 56,7 nM. Im Vergleich zu dem im HEK-I Homogenatassays ermittelten Wert für die $5\alpha R1$ (593,5 nM) besitzt das Isoenzym 2 einen etwa 10-fach niedrigeren K_M -Wert und somit eine viel höhere Affinität zum Substrat AD. Diese Ergebnisse weichen etwas von den Werten für die HEK-II Zellassay ab (Dissertationsschrift W. Reichert). Hier wurde für die $5\alpha R1$ ein K_M -Wert von 1,59 μM und für das Typ 2 Isoenzym ein gerade mal 3-fach niedrigerer Wert (0,56 μM) gefunden.

Trotz des etwa 9-fach niedrigeren K_M -Wertes (in Bezug auf die ausgewählte AD Konzentration) wurde die Substratkonzentration von 505 nM AD (wie im HEK-I Homogenatassay) zunächst beibehalten, obwohl soviel höhere AD-Konzentrationen die Identifizierung von kompetitiven Hemmstoffen erschweren können. Bei der im nächsten Kapitel beschriebenen Hemmstofftestung sollten solche eventuell auftretenden Probleme überprüft werden. Mit den bisher gewählten Parametern konnten jedoch überall lineare Umsatzraten und eine gute Detektierbarkeit von Substrat und Produkt erreicht werden.

$$\frac{1}{v^*} = \frac{K_M}{v_{\max}} * \frac{1}{S^*} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Gleichung nach Lee-Wilson

S_0 Anfangssubstratkonzentration (Androstendion)

S_t Androstendion nach Inkubationszeit $t = 30$ min

$$v^* = (S_0 - S_t) / t$$

$$S^* = (S_0 + S_t) / 2$$

Tabelle III.9: Substrat- und Produktkonzentrationen und daraus berechnete Parameter zur Bestimmung des K_M -Wertes der 5 α R2 nach Lee-Wilson

S_0 [nM]	S_t [nM]	$S_0 - S_t$ [nM]	S^* [nM]	$1/S^*$ [1/nM]	v^* [nM/30min]	$1/v^*$ [30min/nM]
110	77,89	32,11	71,06	0,0141	2,60	0,3852
260	107,91	152,09	206,04	0,0049	3,60	0,2780
310	118,06	191,94	250,97	0,0040	3,94	0,2541
410	120,29	289,71	349,85	0,0029	4,01	0,2494
510	128,62	381,38	445,69	0,0022	4,29	0,2332
610	129,38	480,62	545,31	0,0018	4,31	0,2319
2010	128,74	1881,26	1945,63	0,0005	4,29	0,2330

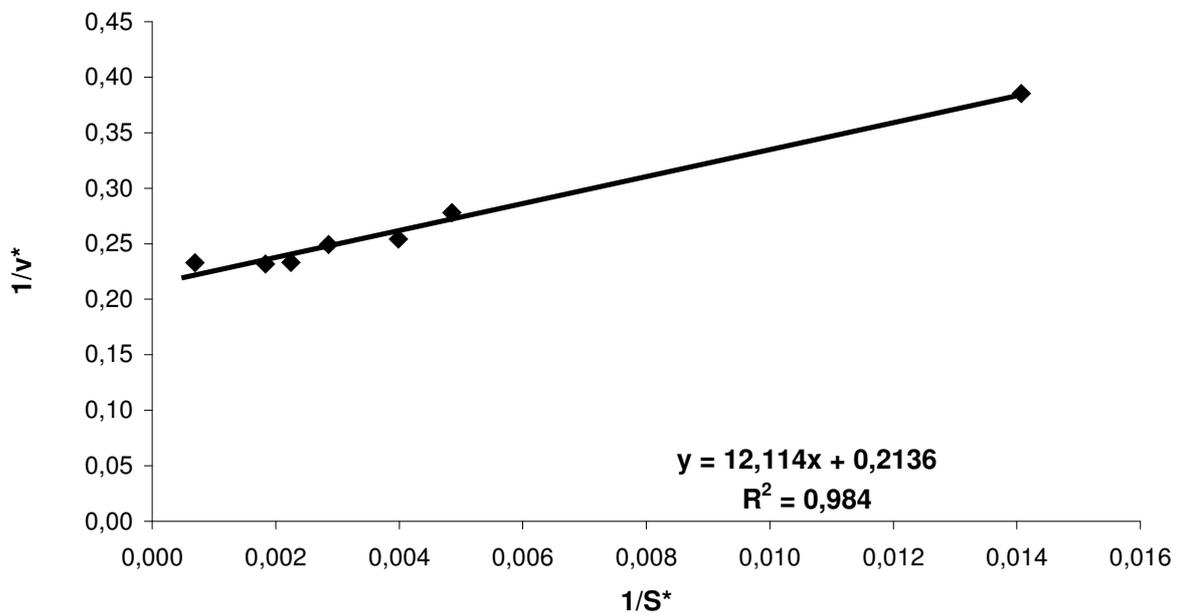


Abbildung III.13: Graphische Darstellung von $1/S^*$ gegen $1/v^*$ nach Lee-Wilson

4.3 Verifizierung und Bewertung der neu entwickelten Testsysteme für 5 α R1 und 5 α R2

Zur Verifizierung der entwickelten Homogenatassays sollten nun die bekannten Referenzverbindungen Finasterid und 4-MA herangezogen werden. Außerdem wurden die Ausgangsverbindungen 1 / 1a – 3 / 3a getestet, um die bisherigen Testverfahren mit den neu entwickelten Methoden vergleichen zu können.

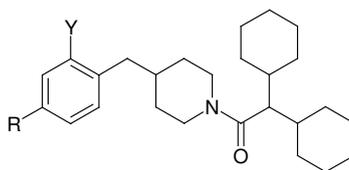
Wie Tabelle III.10 zeigt, betragen die IC₅₀-Werte für 4-MA aus den HEK Homogenatassays 4 nM für 5 α R1 und 14 nM für 5 α R2. Diese Werte sind sehr gut vergleichbar mit den bestimmten Hemmwerten aus dem DU145 Mikrosomenassay (6 nM) und dem BPH Assay für die 5 α R2 (3 nM). Auch die Literaturwerte für 4-MA liegen im unteren nanomolaren Bereich.⁷⁷

Finasterid gilt als selektiver 5 α R2 Inhibitor und zeigte deshalb im HEK-I Homogenatassay nur einen IC₅₀-Wert von 453 nM. Die besseren Hemmwerte im DU145 Mikrosomenassay (202 nM) und im DU145 Zellassay (41 nM) können durch die geringeren Substratkonzentrationen an Androstendion erklärt werden, die im Vergleich zum HEK-I Homogenatassay (505 nM) entsprechend bei 105 nM und 20 nM AD lagen. Weniger ausgeprägt waren diese Unterschiede beim BPH-Mikrosomentest im Vergleich zum HEK-II Homogenatassay. Hier ergaben sich IC₅₀-Werte von 5 nM (BPH) und 25 nM (HEK-II), wobei für den BPH-Mikrosomenassay 210 nM Testosteron und für den HEK-II zellfreien Test 505 nM Androstendion verwendet wurde. Diese Hemmdaten waren nicht so gut vergleichbar, weil nicht nur die Konzentration unterschiedlich war, sondern auch das eingesetzte Substrat selbst.

Betrachtet man nun zuerst die in Tabelle III.10 aufgeführten Carbonsäuren 1, 2 und 3, so wiesen diese im HEK-II Homogenatassay IC₅₀-Werte von 5 nM, 4 nM und 25 nM auf. Im Vergleich zum BPH Mikrosomenassay (siehe Tabelle III.3; 60 nM, 11 nM und 130 nM) waren diese Hemmdaten durchweg besser. Durch Variation der eingesetzten Substrate (T für BPH Mikrosomentest und AD für HEK-II Homogenatassay) sollten diese Unterschiede in den IC₅₀-Werten nicht zustande gekommen sein, da die K_M-Werte der 5 α R2 für AD und T in etwa gleich sind.¹³⁴ Verglichen mit dem BPH Mikrosomentest war die Substratkonzentration im HEK-II zellfreien Assay mehr als doppelt so hoch, und doch sind hier die Hemmwirkungen der Carbonsäuren besser. Ein Grund dafür könnte die Zusammensetzung des zur

Testung verwendeten BPH-Gewebehomogenats sein. Wie neuere Studien zeigten, befindet sich in der Prostata nicht nur $5\alpha R2$, sondern auch aktives Isoenzym 1.¹¹ In den Stroma- und Basalzellen lässt sich $5\alpha R2$ Aktivität nachweisen, in den Epithelzellen wird vor allem die $5\alpha R1$ exprimiert. Also bestand die Aufarbeitung des operativ entfernten BPH-Gewebes nicht nur aus $5\alpha R2$, sondern es wird auch ein geringerer $5\alpha R1$ Substratumsatz miterfasst. Deshalb zeigten die $5\alpha R2$ selektiven Carbonsäuren schlechtere Hemmwerte in diesem BPH Mikrosomenassay im Vergleich zum HEK-II Homogenatassay, in dem ausschließlich die Hemmung der $5\alpha R2$ betrachtet wird.

Tabelle III.10: Hemmung der humanen $5\alpha R$ getestet in den HEK-I und HEK-II Homogenatassays



Verbindung	Y	R	HEK Zellfreier Assay	
			$5\alpha R1$	$5\alpha R2$
			[IC ₅₀ (μM)]	% Hemmung (2μM)
1	H	COOH	8,4	[0,005]
1a	H	COOCH ₃	[2,336]	18,6
2	F	COOH	5,7	[0,004]
2a	F	COOCH ₃	[0,758]	21,4
3	OCH ₃	COOH	12,5	[0,025]
3a	OCH ₃	COOCH ₃	[0,234]	2,4
Finasterid			[0,453]	[0,025]
4-MA			[0,004]	[0,014]

Andererseits können die etwas niedrigeren IC_{50} -Werte (ca. Faktor 2) für die entsprechenden Methylester 1a und 2a aus dem HEK-I Homogenatstest im Vergleich zum DU145 Mikrosomenassay vielleicht damit erklärt werden, dass in DU145 Zellen in geringerem Maße auch $5\alpha R2$ und 17β -Hydroxy-Steroiddehydrogenase nachgewiesen werden konnten.¹³⁵

4.4 Entwicklung eines DU145 Zellpermeationsassays

Nach Untersuchung der Hybridinhibitoren auf Hemmaktivität gegenüber den $5\alpha R$ Isoenzymen und anschließender Stabilitätstests der Methylester in ausgewählten biologischen Medien sollte nun überprüft werden, ob der applizierte Ester nach Erreichen der Prostata auch in der Lage ist, die Membran der Targetzellen zu überwinden, um intrazellulär die korrespondierende Säure als potenten $5\alpha R2$ Inhibitor freisetzen zu können. Als Modell für die Targetzelle wurde die DU145 Zelllinie herangezogen.

Wie in Kapitel 1 beschrieben wurden die Ester ursprünglich als Prodrugs der Säuren für die $5\alpha R2$ entwickelt. In früheren Versuchen wurde bereits festgestellt, dass der Methylester 1a eine wesentlich bessere Aufnahme in DU145 Zellen zeigte als seine korrespondierende Säure 1.^{124,125} Es sollte nun der Beweis erbracht werden, dass dieses Ergebnis auch auf die restlichen Ester-Säure-Paare übertragbar ist. Dazu wurde ein DU145 Permeationsassay entwickelt und hinsichtlich verschiedener Parameter, wie z. B. Inkubationszeit, Testmedium, Waschschriffe usw. optimiert.

4.4.1 Testvorbereitung und Inkubation

24 Stunden vor der Durchführung eines Experiments wurden $1 \cdot 10^6$ DU145 Zellen in frischem RPMI Medium auf einer 6-well-Kulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium über den Zellen abgezogen und der Monolayer mit PBS-Puffer gewaschen, um Reste des serumhaltigen RPMI Mediums vollständig zu entfernen. Zum Starten des Permeationstests wurden 3 ml frisches, serumfreies RPMI Medium inklusive $20 \mu M$ der zu testenden Verbindung zugegeben und die

Kulturplatten 3 h bei 37 °C inkubiert. Auf den Zusatz von Serum sollte verzichtet werden, da die Zusammensetzung von FKS undefiniert ist und nach Inkubation der zu testenden Ester mit serumhaltigem Medium eine Spaltung (aufgrund des FKS-Zusatzes) festgestellt werden konnte. Daher musste die Viabilität der Zellen in serumfreiem Medium für den Inkubationszeitraum überprüft werden. Um die Permeationsergebnisse nicht zu verfälschen, musste unbedingt mit intakten Zellen gearbeitet werden. Mit Hilfe des Casy[®] Cell Counters wurde die Lebendzellzahl im Vergleich zur Gesamtzellzahl automatisch bestimmt. Die Auswertung zeigte keinen Unterschied zwischen einer Inkubationszeit von 1 h und 3 h (Viabilität > 95%). Nach 6 Stunden Inkubation konnte jedoch ein geringes Absterben der Zellen beobachtet werden (Viabilität ≈ 85 %). Deshalb wurde ein Inkubationszeitraum von 3 h gewählt.

4.4.2 Teststopp und Probenaufarbeitung

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium über den Zellen mit einer Pipette entnommen und in frische Falcons überführt. Die Zellen wurden zweimal mit FKS-freiem Kulturmedium gewaschen, ohne dabei den Monolayer zu beschädigen, und die Waschflüssigkeiten mit den entsprechenden Überständen vereinigt. Anschließend wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und die erhaltene Zellsuspension mit Hilfe eines Ultraschallstabes homogenisiert.

Die Anzahl der benötigten Waschschriffe wurde experimentell ermittelt. Dazu wurde ein Versuch mit Verbindung 1 und 1a durchgeführt, in dem die Zellen nach der Inkubation 6 mal mit FKS-freiem Kulturmedium gewaschen wurden. Die Waschungen wurden nun aber nicht vereinigt, sondern einzeln die darin enthaltenen Substanzmengen quantifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Waschschriff 3 nur noch 1 % der jeweiligen Substanzen zu finden sind. Da sich immer ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Überstand und Zellinnerem bildet, sollten nicht zu viele Waschschriffe erfolgen, da sonst die Substanzen wieder aus den Zellen herausgewaschen werden können. Da außerdem viele Waschschriffe auch Stress für die Zellen bedeuten und diese sich so leicht von der Substratoberfläche ablösen oder sogar sterben können, wurde der Zellmonolayer lediglich 2 mal mit Medium gewaschen.

Die gewonnenen Proben (Überstände und Zellhomogenate) wurden dann mit 1 M HCl auf $\text{pH} \approx 2$ eingestellt und mit dem doppelten Volumen an Diethylether extrahiert. Die Wasserphase wurde schließlich im Ethanol-Trockeneis-Bad eingefroren, die Etherphase in frische Falcons überführt und zur Trockne eingedampft. Der gesamte Probeninhalt eines Falcons wurde wieder mit 1,9 ml Methanol quantitativ gelöst, in 2ml-Eppendorf-Gefäße überführt und erneut eingedampft. Zur Detektion mittels HPLC-MS/MS wurden die Proben in 100 μl Methanol resuspendiert.

Der zusätzliche Überführungsschritt von 50ml-Flacons in 2ml-Eppendorf-Gefäße war notwendig, weil mit 100 μl Methanol der Inhalt eines Falcons nicht vollständig aus den Gefäßen gelöst werden konnte. Dazu bedurfte es einer größeren Menge an Lösungsmittel, die dann über Stickstoff abgedampft wurde.

4.4.3 Auswertung und Wiederfindungsrate

Die Vermessung der Proben erfolgte mittels HPLC-MS/MS. Dabei wurden nicht nur die Ester detektiert, sondern auch gleichzeitig nach eventuell entstandener Säure gescannt. Die Substanzen wurden sowohl über ihre Masse quantifiziert, als auch anhand der Retentionszeiten und PDA-Signale identifiziert.

Die Permeation einer Substanz in die DU145 Zellen wurde in Bezug zu 100%-Werten, die zu jedem Test neu ermittelt wurden, angegeben. Als 100%-Werte dienten dabei mit der jeweiligen Testsubstanz gespikete, direkt extrahierte Proben aus den jeweiligen Medien (Zellkulturüberstand oder Zellhomogenat). Alle Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt. Die Zellzahl wurde nach dem Experiment bestimmt und in der Ergebnisauswertung berücksichtigt.

Zusätzlich wurde die Effizienz der Extraktion bestimmt. 20 μmolare Proben von 1 und 1a aus verschiedenen Medien wurden mit dem gleichen, dem doppelten und 2 mal dem gleichen Volumen an Ether extrahiert. Die Werte für Säure und Ester waren nach Ansäuern mit HCl etwa gleich. Nach Extraktion mit der einfachen Ethermenge konnte am wenigsten Substanz nachgewiesen werden. Da aber die Extraktion mit doppelter Ethermenge (Wiederfindung 85 % für 1a) etwa gleich effizient war wie die 2malige Extraktion (Wiederfindung 82 % für 1), wurde wegen der einfacheren Handhabung die Methode mit dem doppelten Ethervolumen gewählt.

Für jedes Well wurde die Wiederfindungsrate der Testsubstanz bestimmt. Dabei wurde die Summe aus Ester und entstandener Säure in Bezug zur entsprechenden 100%-Probe gesetzt. Die Wiederfindungsraten mussten mindestens $100 \% \pm 10 \%$ betragen, sonst wurden die Daten nicht in die Endauswertung miteinbezogen.

4.4.4 Methodenentwicklung mittels HPLC-MS/MS

Zur Quantifizierung der Proben aus dem DU145 Permeationsassay wurde ein Triple Quadrupol Massenspektrometer mit einem Elektrospray Interface (ESI) verwendet. Als stationäre Phase wurde eine RP-Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec) bei 21 °C Raumtemperatur verwendet. Zur Elution der Substanzen wurde folgender Gradient ermittelt: Die mobile Phase A bestand aus Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure und die mobile Phase B aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure. Innerhalb der ersten Minute wurden die in den Proben enthaltenen Salze unter Verwendung des Schaltventils mit 60 % A und 40 % B in den Abfall geleitet. Der relativ hohe Wasseranteil von 40 % diente zur besseren Löslichkeit der Salze, die bei der Detektion im Massenspektrometer stören würden. Nach Umschalten des Ventils wurden die Substanzen zur Quantifizierung in die Ionenquelle eluiert. Dabei wurde innerhalb einer Minute der Anteil an Fließmittel A von 60% auf 100% erhöht. Die Länge eines Analysenlaufs wurde aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der Substanzen entsprechend angepasst. 2 Minuten vor Beginn des nächsten Runs wurde die Säule wieder auf 60 % A und 40 % B eingespült.

Das Injektionsvolumen betrug 15 µl und der Fluss 350 µl/min. Als interner Standard wurde den Proben Testosteron (10 µM) zugesetzt. Alle Detektionsparameter für $[M+H]^+$ Ionen wurden automatisch mittels Software optimiert. Die Polarität für die Ionisierung war positiv, da im selben Lauf sowohl Ester als auch Säure detektiert werden sollten, und als Scan Mode wurde Selected Reaction Monitoring (SRM) gewählt. Zusätzlich wurden noch mit Hilfe des angeschlossenen PDA UV-Signale bei 230 nm und 275 nm aufgezeichnet, um eventuelle Umsatzprodukte des Esters (außer der Hydrolyse zur Säure) ausschließen zu können.

4.4.5 Ergebnisse

Abbildung III.14 zeigt die im neu entwickelten DU145 Zellpermeationstests ermittelten Absorptionswerte der Verbindungen 1 / 1a – 3 / 3a. Diese Ergebnisse bestätigen die früher durchgeführten Untersuchungen an DU145 Zellen mit den Verbindungen 1 und 1a.¹²⁵ Die Säure konnte die Zellmembran schlecht überwinden, wohingegen der ursprünglich als Prodrug entwickelte Methylester eine bessere Aufnahme in die DU145 Zellen zeigte.

Diese Tatsache konnte anhand des neu entwickelten Testsystems bestätigt werden. Allerdings waren die ermittelten prozentualen Permeationswerte insgesamt etwas höher aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl und eingesetzten Substanzkonzentrationen. Von Methylester 1a wurden 16 % in den Zellen nachgewiesen und von der korrespondierenden Säure nur 5 %. Zusätzlich konnte nach Inkubation von 1a eine Esterspaltung von 3 % nachgewiesen werden.

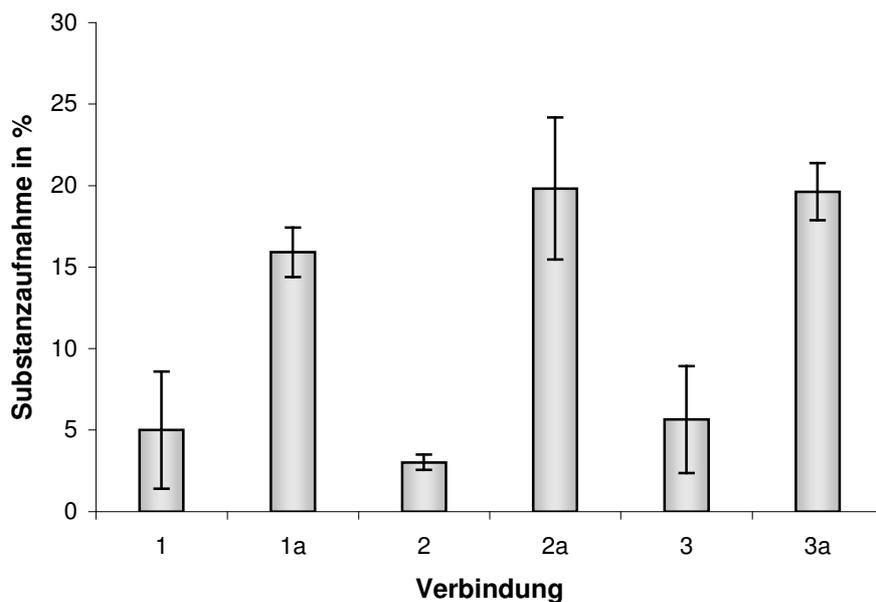


Abbildung III.14: Permeation von Ester und Säure in DU145 Zellen als Modell für die Targetzellen

Ein ähnliches Ergebnis ergab die Inkubation der Ester 2a und 3a im Vergleich zu den entsprechenden Säuren. Von 2a und 3a konnten jeweils ca. 20 % in den Zellen detektiert werden. Die Säuren 2 und 3 wurden nur zu 3 % und 6% adsorbiert. Die

Hydrolyse der Ester während der Inkubationszeit wurde ebenfalls überprüft. Eine Spaltung von 3 % konnte für 2a nachgewiesen werden, während der Ester 3a über den gewählten Inkubationszeitraum stabil war.

Da die Esterspaltung durch Prostata-Esterasen schon in BPH-Gewebehomogenat untersucht wurde, war die Hydrolyse im DU145 Permeationsassay nebensächlich. Deshalb wurde die Inkubationszeit mit 3 Stunden auch recht kurz gewählt, um eine stärkere Hydrolyse der Verbindungen zu vermeiden und das Hauptaugenmerk auf die Absorption der Substanzen in die Zellen richten zu können.

4.4.6 Bewertung der Ergebnisse

Als zusammenfassendes Ergebnis konnte festgehalten werden, dass alle Ester die Zellmembran der DU145 Zellen besser überwinden konnten als die entsprechenden Säuren (Faktor 3 – 6,7 besser). Die Ester als $5\alpha R1$ Inhibitoren sind also zusätzlich auch zellpermeable Precursoren für die korrespondierenden Säuren. Man kann also annehmen, dass nach Applikation eines Hybridesters und dessen ausreichender Stabilität in der Peripherie der Ester gut in die Targetzelle aufgenommen wird und so die intrazellulär lokalisierte $5\alpha R$ hemmen kann.

Dass die ermittelten Werte für die Ester-Permeation kein Phänomen der Adsorption der Substanzen an der Zelloberfläche ist, beweisen die Hemmdaten aus dem DU145 Zellassay. Wie in Tabelle III.1 zu sehen ist, wiesen alle Ester 1a, 2a und 3a eine gute Hemmwirkung gegenüber der $5\alpha R1$ in den DU145 Zellen auf (von 2,5 μM bis 460 nM). Da sich die $5\alpha R1$ membrangebunden innerhalb der Zellen befindet, müssen die Substanzen also in der Lage sein, die Zellmembran zu überwinden.

In dieser Versuchsanordnung wurde ebenfalls die Hydrolyse der Ester bestimmt. Dabei konnte für Verbindung 1a und 2a eine geringe Spaltung festgestellt werden. Auffällig dabei war die Tatsache, dass über 90 % der durch Hydrolyse entstandenen Säure im Zellüberstand zu finden war. Daraufhin sollte untersucht werden, ob die Spaltung der Ester wirklich außerhalb der Zelle stattfand oder ob die innerhalb der Zellen entstandene Säure wieder heraustransportiert wurde.

4.4.7 Esteraseaktivität außerhalb der DU145 Zellen

Der Nachweis, ob von DU145 Zellen hydrolysierende Enzyme ins Kulturmedium abgegeben werden, sollte mittels eines einfachen Tests erbracht werden. Auf 80 % konfluente Zellen (3 Millionen) wurde frisches serumhaltiges und serumfreies Medium (3 ml) gegeben. Nach 24 h bei 37 °C wurden die Kulturmedien über den Zellen entnommen und mit dem Methylester 1a in einer Konzentration von 20 µM bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Proben wurden mit HCl versetzt und anschließend mit Diethylether extrahiert und abgedampft. Nach Resuspendierung der Proben wurden die Ergebnisse mittels HPLC-MS/MS quantifiziert. Die Hydrolyse des Esters in serumfreiem Medium wurde im Vergleich zur Spaltung in serumhaltigem Medium angegeben.

Anhand dieses Versuches konnte eine Esterspaltung außerhalb der Zellen von ca. 17 % festgestellt werden. Diese Hydrolyse musste tatsächlich von einem ins Kulturmedium sekretierten Enzym stammen. In einer Studie von McGowen et. al. von 2000, wird die Sekretion von tPa (tissue-type plasminogen activator) und uPa (urokinase-type plasminogen activator) ins Kulturmedium beschrieben.¹³⁶ Dabei handelt es sich um Proteasen, die normalerweise Plasminogen zu Plasmin aktivieren, und die aufgrund ihrer hydrolytischen Aktivität durchaus auch in der Lage wären, die untersuchten Methylester zu spalten.

5. Synthese und Testung neuer Hybridinhibitoren

5.1 Verschiedene Substanzklassen

5.1.1 Carbonsäuren und korrespondierende Methylester mit Biphenylstruktur

Zu den nicht-steroidalen 5α R Inhibitoren gehört auch die Klasse der Biphenyle, die den steroidalen A-C Ring des natürlichen Substrates T nachahmen. Diese Biphenyl-4-carbonsäuren erwiesen sich als potente 5α R2 Hemmstoffe und wurden zum Beispiel von Igarashi et. al. 1999¹³⁷, Picard et. al. 2002¹¹⁵ oder Lesuisse et. al. 2001^{108,109} veröffentlicht.

Es sollte nun untersucht werden, ob Hybridhemmstoffe auch in der Klasse der Biphenyle zu finden sind. Dazu wurden die in Abbildung III.15 dargestellten Verbindungen exemplarisch ausgewählt. Zur 4'-Cyclohexancarboxyl-biphenyl-4-carbonsäure FP27 existierte bereits als Synthesevorstufe der entsprechende Methylester FP38¹¹⁵, so dass diese Verbindungen direkt der Testung an den Isoenzymen 5α R1 und 5α R2 unterzogen werden konnten.

Das zweite A-C-Ring Steroidmimetikum (Verbindung 9) besaß einen Ether-Linker als Verknüpfung zwischen Ring A und C.¹³⁷ Die so erhöhte konformative Flexibilität ermöglichte es dem Inhibitor, sich besser in das aktive Zentrum des Enzyms einzupassen. So konnten für die Carbonsäure 9 Hemmwerte der 5α R2 im unteren nanomolaren Bereich erzielt werden.

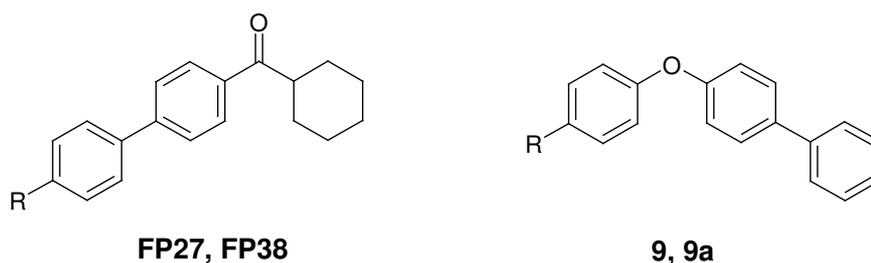


Abbildung III.15: Ausgewählte Biphenyle

5.1.1.1. Synthese von 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure und -methylester

Da zu Verbindung 9 kein entsprechender Ester existierte, wurde die Synthese der Säure mit anschließender Veresterung angestrebt. Die Herstellung der Säure erfolgte analog der Methode von Igarashi et. al., der den Inhibitor 1999 erstmals beschrieb.¹³⁷

Als Ausgangsverbindungen wurden 4-Fluorobenzaldehyd und 4-Hydroxybiphenyl wie in Methode G beschrieben zu 4-(Biphenyl-4-yloxy)-benzaldehyd (9z) umgesetzt. (Abbildung III.16) Das entstandene Aldehyd wurde in einer Lindgren Oxidation (Methode H) zur gewünschten 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure (9) umgesetzt.

Zur Darstellung des Methylesters (9a) wurde die Carbonsäure mit einer äquimolaren Menge von Methylchloroformat und Triethylamin in Dichlormethan versetzt (Methode F). Durch Zugabe von katalytischen Mengen DMAP (0,5 Äquivalente) konnte nach 60 min bei 0 °C der Methylester in hoher Ausbeute erhalten werden. DMAP wurde durch Ausschütteln der organischen Phase mit wässriger NH₄Cl-Lösung entfernt.

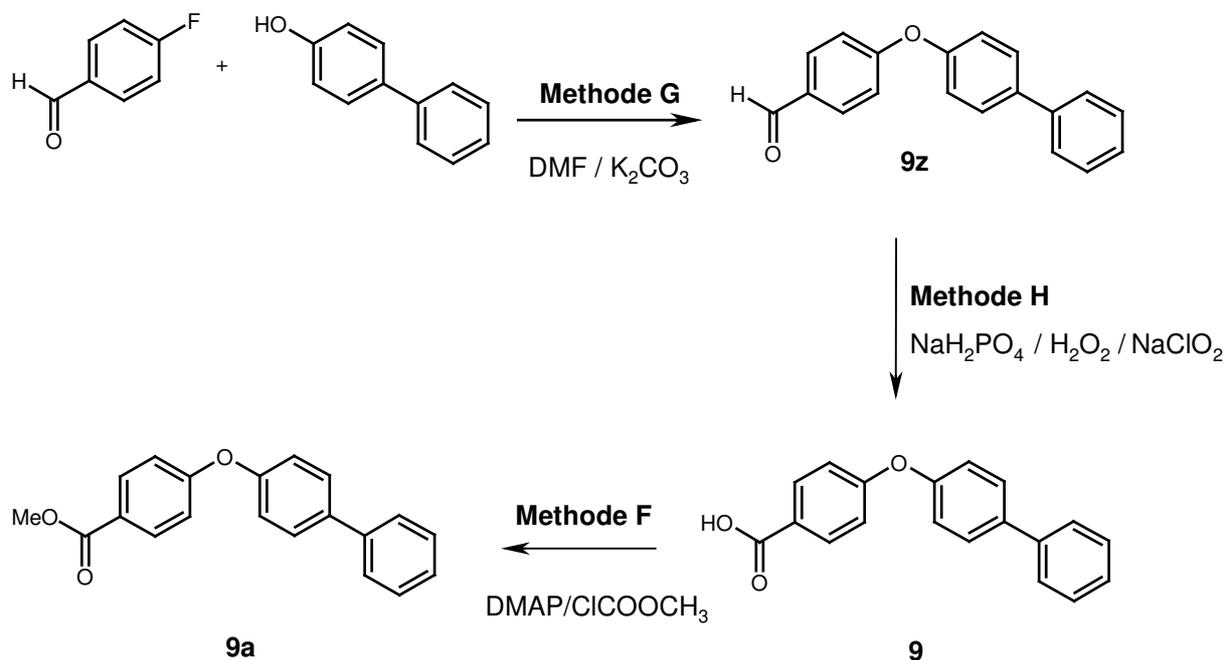


Abbildung III.16: Synthese von 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure und -methylester

5.1.1.2. Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2

Tabelle III.11 zeigt die Hemmwerte für die oben beschriebenen Biphenyle FP27, FP38, 9 und 9a. Die prozentualen Hemmwerte wurden bei Hemmstoffkonzentrationen von 2 μ M in den HEK-1 und HEK-2 Homogenatassays ermittelt. Bei hohen prozentualen Hemmungen wurden zusätzlich IC₅₀-Werte bestimmt.

Tabelle III.11: Hemmung der humanen 5 α R durch Substanzen mit Biphenylstruktur

Verbindung	R	HEK Zellfreier Assay	
		5 α R1	5 α R2
		[IC ₅₀ (μ M)]	% Hemmung (2 μ M)
FP27	COOH	20,8	[0,176]
FP38	COOCH ₃	8,6	5,2
9	COOH	6,0	[0,012]
9a	COOCH ₃	1,0	23,1

Die Carbonsäuren FP27 und 9 zeigten mit IC₅₀-Werten von 176 nM und 12 nM wie erwartet eine sehr gute Hemmung am Isoenzym 2. Für einen erfolgreichen Hybridinhibitor wird nicht nur eine Säure benötigt, die ein potenter 5 α R2 Hemmstoff ist, sondern auch ein entsprechender Ester, der eine gute Hemmwirkung an der 5 α R1 aufweist. Allerdings zeigten die Methylester FP38 und 9a keine Hemmwirkung (8,6 % und 1 % Hemmung bei 2 μ M) an der 5 α R1 und erfüllten somit nicht die Voraussetzungen für erfolgreiche Hybridhemmstoffe.

5.1.2 N-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure und -methylester

Von dieser Substanzklasse war weder bekannt, ob die Carbonsäuren gute 5 α R2 Hemmstoffe waren, noch ob die entsprechenden Methylester eine Hemmung gegenüber der 5 α R1 zeigen würden. Die Substanzen wurden aufgrund der

strukturellen Ähnlichkeit zu den Ausgangsverbindungen (substituierte 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenemethyl]-benzoesäuren) ausgewählt. Diese wurden als Mimetika des steroidal Substrates der 5 α R entwickelt. Der steroidale A-Ring wurde durch eine Benzoesäure-Gruppe dargestellt, die sich schon bei vielen 5 α R2 Hemmstoffen als vorteilhaft erwiesen hatten und aus der durch Veresterung leicht der potentielle 5 α R1 Inhibitor erhalten werden konnte. Außerdem sollten die Verbindungen ähnlich der steroidal Hemmstoffe, die einen lipophilen Substituenten in 17 β -Position tragen, aufgebaut sein. Hier wurde ein Adamantyl-Rest, durch dessen Einbau in Verbindungen der Ausgangssubstanzklasse niedrige IC₅₀-Werte erreicht werden konnten, als lipophiler Substituent verwendet.

5.1.2.1. Synthese

Abbildung III.17 zeigt die Synthese des *N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure-methylesters 8a und der entsprechenden Carbonsäure 8. Die Synthese des Esters erfolgte analog der Methode von Stepanov et al.¹³⁸

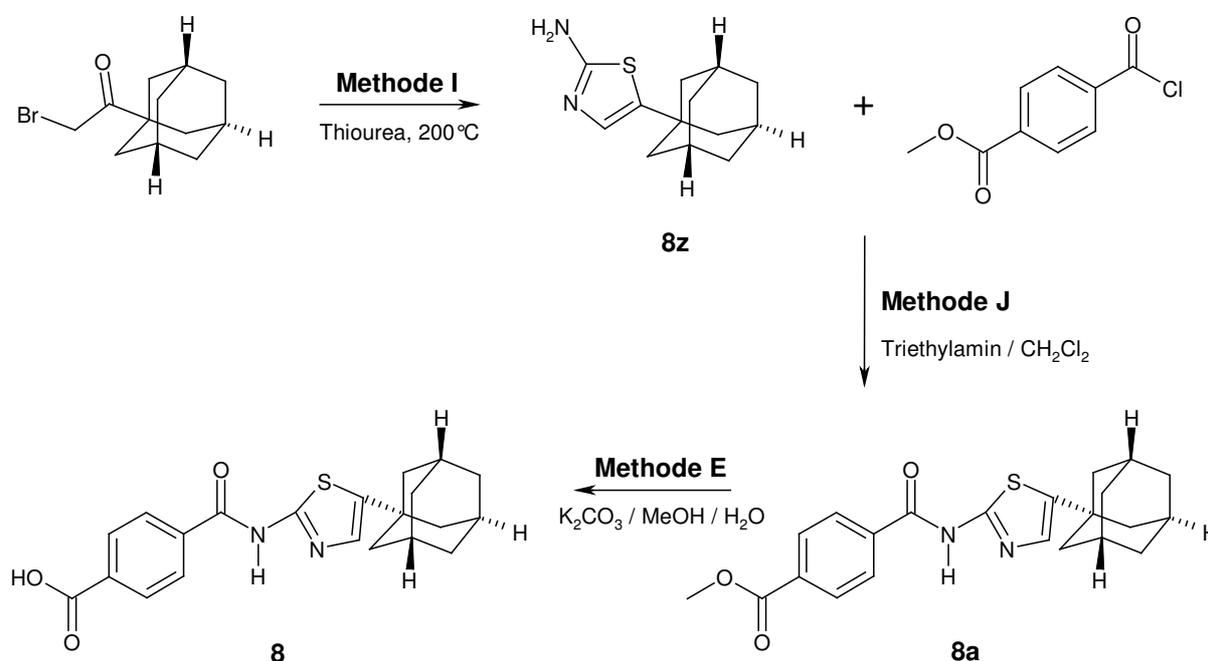


Abbildung III.17: Synthese von *N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamid-säure und -methylester

Als Ausgangssubstanzen dienten dabei α -(Adamant-1-yl)- α -bromoacetaldehyd und Thioharnstoff, die wie in Methode I (Thiazol-Synthese nach Hantzsch) beschrieben zu 5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-ylamin (8z) umgesetzt wurden. Das entstandene Amin konnte als Präzipitat aus alkalischer Lösung abgetrennt werden.

Die Knüpfung der Amid-Bindung erfolgte nach Methode J durch Umsetzung von 8z mit 4-Chlorocarbonyl-benzoesäuremethylester und Triethylamin. Der resultierende Methylester 8a wurde schließlich zu *N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure (8) verseift (Methode E).

5.1.2.2. Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2

Wie Tabelle III.12 zeigt, wurde für die Carbonsäure 8 in einer Konzentration von 2 μ M am Isoenzym 1 keine Hemmung festgestellt. Auch für die 5 α R2 konnte nur eine schlechte Hemmwirkung (29,6 % Hemmung bei 2 μ M) erzielt werden. Der entsprechende Methylester 8a wies keine nennenswerte Inhibition der 5 α R1 oder 5 α R2 auf. Durch weitere Optimierung der vorliegenden Säure könnte vielleicht die 5 α R2 Hemmaktivität noch erhöht werden, aber ob die entsprechenden Methylester gute 5 α R1 Inhibitoren wären, bleibt aufgrund der vorliegenden Daten zu bezweifeln. So eignet sich diese Substanzklasse nicht zur Etablierung von neuen Hybridhemmstoffen der 5 α R1 und 5 α R2.

Tabelle III.12: Hemmung der humanen 5 α R durch *N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure und -methylester

		HEK Zellfreier Assay	
		[IC ₅₀ (μ M)]	
		% Hemmung (2 μ M)	
Verbindung	R	5 α R1	5 α R2
8	COOH	1,6	29,6
8a	COOCH ₃	7,4	7,5

5.2 Optimierung der Ausgangsverbindungen

Da potente Hybridhemmstoffe trotz Screening der hauseigenen Substanzbibliothek und Neusynthese von Verbindungen bislang nur in der Klasse der substituierten 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenemethyl]-benzoesäuren und ihrer entsprechenden Ester nachgewiesen werden konnten, war die logische Konsequenz daraus, diese Substanzklasse näher zu betrachten. Dazu wurden bereits existierende Ester und Säuren auf ihre $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ Hemmung getestet. Zusätzlich sollten die Ausgangsverbindungen durch Synthese modifiziert werden, um das Phänomen der Hybridhemmung weiter zu charakterisieren und zu optimieren. Abbildung III.18 zeigt die Positionen (R, Y, X) an der Grundstruktur der Ausgangsverbindungen, die systematisch modifiziert und untersucht wurden. Dabei waren sowohl die Auswirkungen des Ester-Restes R auf die $5\alpha R1$ Hemmung als auch der Einfluss der Substituenten Y auf die Hemmwirkung von Ester und Säure von Interesse. An Position X wurde der lipophile Rest (Dicyclohexyl-Rest) ausgetauscht.

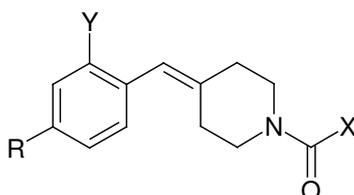


Abbildung III.18: Modifikationsstellen der Ausgangsverbindungen

Ziel war es also, die $5\alpha R1$ Hemmaktivität der Methylester 1a - 3a zu verbessern und gleichzeitig die potente $5\alpha R2$ Wirkung der entsprechenden Carbonsäuren 1 - 3 beizubehalten. Damit eine Substanz einen guten Hybridhemmstoff *in vivo* abgeben kann, müssen Ester und Säure aber nicht nur potente Inhibitoren an den entsprechenden Isoenzymen der $5\alpha R$ sein, sondern der Ester muss zusätzlich noch ein günstiges Stabilitäts-/Labilitätsverhältnis aufweisen. Nach Verabreichung muss der Ester die Magen-Darm-Passage unbeschadet überstehen. Während der Verteilung im menschlichen Körper soll er hydrolyse-stabil gegenüber Enzymen des Blutplasmas sein, um die $5\alpha R1$ in der Peripherie (Haut, Leber, ...) hemmen zu können und schließlich das Targetorgan (Prostata) zu erreichen. Der Ester muss gut in die Targetzellen aufgenommen werden, um dort von Esterasen der Prostata in die

entsprechende Carbonsäure gespalten zu werden, die ihrerseits selektiv das Isoenzym 2 hemmen soll.

5.2.1 Einfluss des Ester-Restes R auf die Hemmaktivität der 5 α R1

Zuerst sollten die Auswirkungen auf die 5 α R1 Hemmung, die sich durch Vergrößerung des Ester-Restes ergeben würden, untersucht werden. Der potenteste Methylester 3a (234 nM für 5 α R1) wurde als Grundstruktur ausgewählt und die aliphatische Esterkette immer mehr verlängert (siehe Tabelle III.13, Verbindungen 3b – 3i). Dabei wurden auch verzweigte Reste ebenso wie ein Benzyl-Rest zur Veresterung herangezogen. Eine Vergrößerung des Restes R wurde ebenfalls durch Einführen eines CH₂-Spacers zwischen Benzol-Ring und Methylester-Gruppe erreicht (siehe Tabelle III.13, Verbindung 4a).

5.2.1.1. Synthesestrategie

Bei der Darstellung der homologen Ester erfolgte die Veresterung als letzter Syntheseschritt. Ausgangsverbindung für diese letzte Stufe war die Carbonsäure 3, deren Vorstufen nach den Methoden von Griera et. al. und Picard et. al. hergestellt wurden.^{111,139} Das allgemeine Syntheschema ist in Abbildung III.19 dargestellt. *N*-Acylpiperidon 1z wurde nach Methode A aus der entsprechenden Säure hergestellt, die nach Reaktion mit Thionylchlorid zum Säurechlorid mit Piperidon-HCl umgesetzt wurde. Zum Abfangen der bei der Reaktion entstehenden Säure wurde in Triethylamin gearbeitet. Das zur Wittig-Reaktion mit 1z benötigte Phosphoniumbromid 3x wurde durch Wohl-Ziegler-Bromierung von 3-Methoxy-4-methylbenzoesäuremethylester mit NBS und AIBN als Radikalstarter synthetisiert (Methode B). Die entstandene bromierte Verbindung 3y wurde dann mit Triphenylphosphin in trockenem Benzol unter Rückfluss erhitzt, so dass das gewünschte Phosphoniumbromid 3x als Salz ausfiel und nach Abkühlung filtriert werden konnte (Methode C). Die Wittig-Reaktion wurde wie in Methode D beschrieben durch Deprotonierung des Phosphoniumbromids 3x in trockenem THF mittels Butyllithium eingeleitet. Anschließende Umsetzung mit *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon 1z führte dann zum Methylester 3a. Vor der weiteren

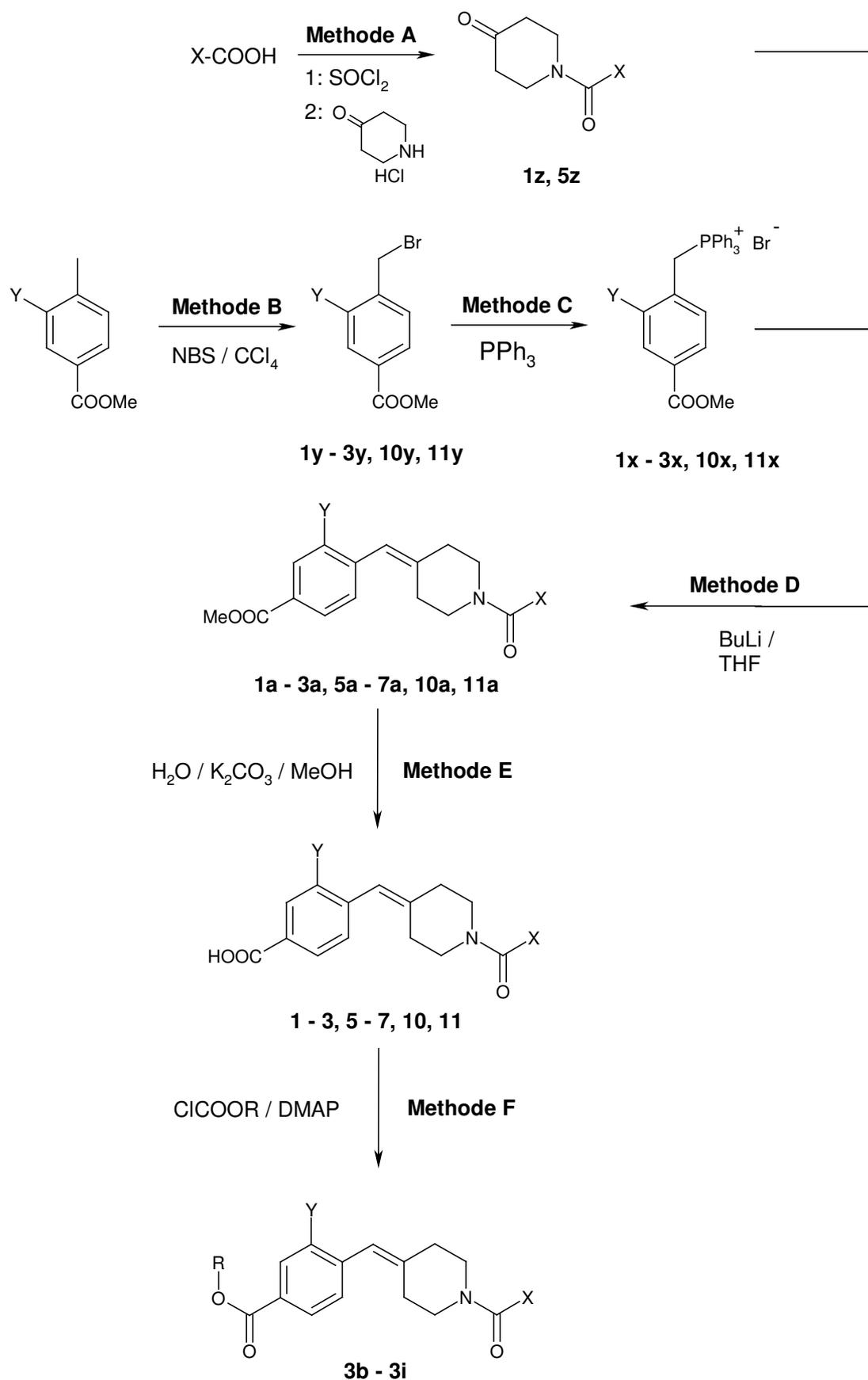


Abbildung III.19: Allgemeine Synthesestrategie

Veresterung wurde eine Verseifung von 3a zur korrespondierenden Carbonsäure 3 in Kaliumcarbonat-Lösung durchgeführt (Methode E).

Die Verbindungen 3b – 3i wurden nach der Methode von Kim et al.¹⁴⁰ synthetisiert und konnten schließlich durch Reaktion der Säure 3 mit den entsprechenden Alkylchloroformaten, 4-Dimethylaminopyridin in katalytischen Mengen und Triethylamin gewonnen werden.

Eine weitere Möglichkeit den Ester-Rest R zu vergrößern bestand darin, einen CH₂-Spacers zwischen Benzol-Ring und Methylester-Gruppe einzuführen. Wie in Abbildung III.20 dargestellt, wurden die entsprechenden Verbindungen 4a und 4 nach den Methoden von Chauffe et. al.¹⁴¹ und Picard et. al.^{111,112} hergestellt.

Das zur Wittig-Reaktion benötigte *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon 1z wurde wie oben beschrieben aus der entsprechenden Carbonsäure synthetisiert.

Ausgangsverbindungen für die Wittig-Reaktion (Methode D) zum Methylester 4a waren *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon 1z (4-Methoxycarbonylmethyl-benzyl)-triphenyl-phosphoniumbromid 4x. Letzteres wurde aus *p*-Tolylsäuremethylester durch Wohl-Ziegler-Reaktion zur allyl-bromierten Verbindung 4y umgesetzt, die wiederum mit Triphenylphosphin zum entsprechenden Phosphoniumbromid 4x reagierte. Nach Verseifung des Wittig-Produktes 4a konnte die korrespondierende Carbonsäure 4 erhalten werden.

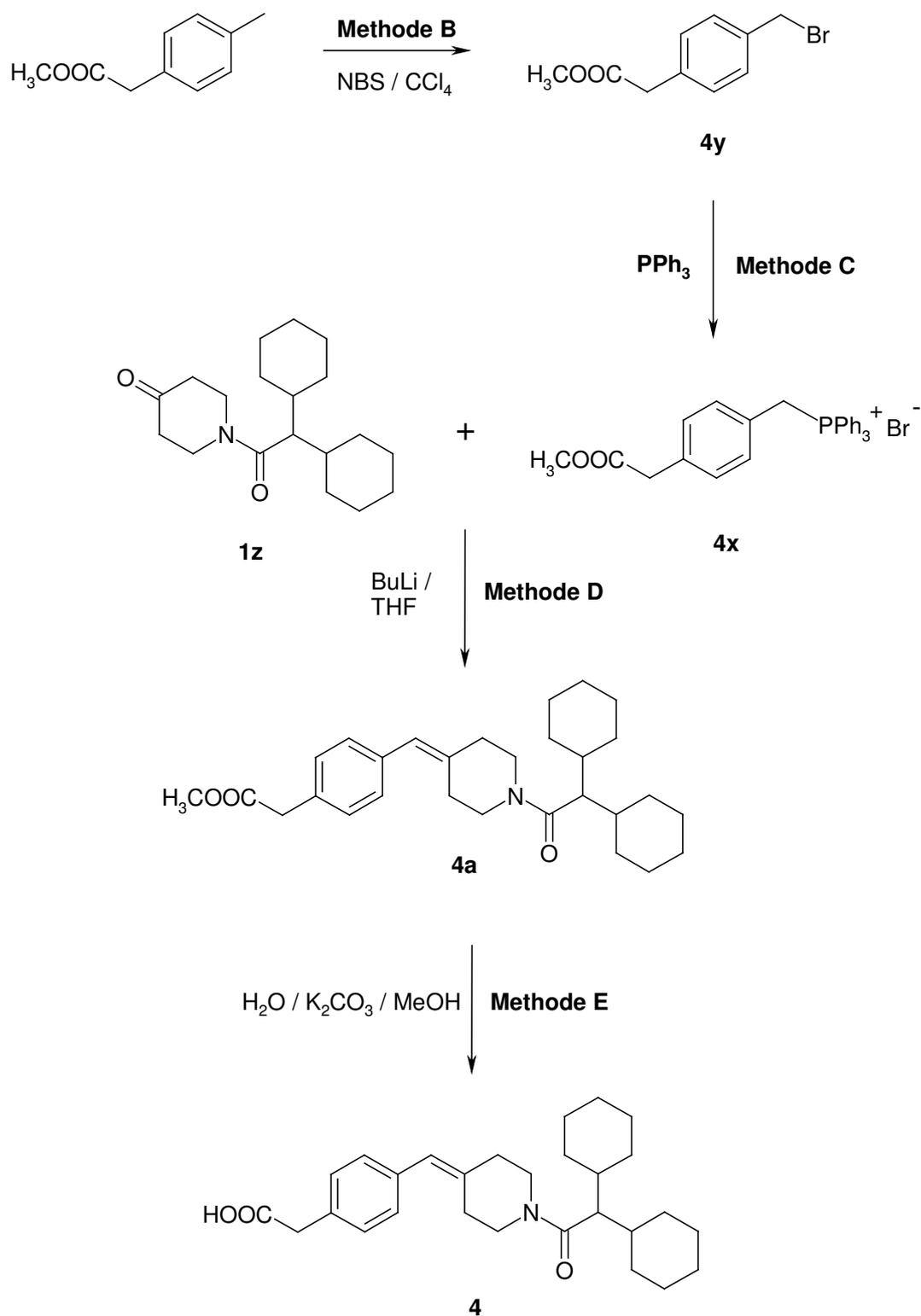


Abbildung III.20: Synthese von {4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-phenyl}-essigsäuremethylester **4a** und der korrespondierenden Carbonsäure **4**

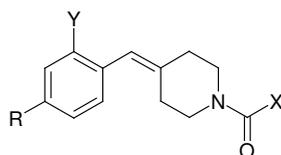
5.2.1.2. Hemmung der humanen 5 α R

Die Hemmwerte aus Tabelle III.13 wurden im HEK-I und HEK-II zellfreien Assay bei Inhibitorkonzentrationen von 2 μ M ermittelt. Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle III.13 zusätzlich nochmal die Ausgangsverbindungen 1/1a – 3/3a und die Referenzverbindungen Finasterid und 4-MA aufgeführt.

Zur Verlängerung der Esterkette wurde der Methylester ausgesucht, der zu diesem Zeitpunkt die beste Hemmung am Isoenzym 1 aufwies. Es handelte sich um die Verbindung 3a, die in meta-Position zur Estergruppe einen Methoxy-Substituenten trug und im HEK-I Assay einen IC₅₀-Wert von 234 nM zeigte. Die entsprechende Carbonsäure 3 stellte mit einem IC₅₀-Wert von 25 nM einen selektiven 5 α R2 Hemmstoff dar. Die neu synthetisierten Ester 3b – 3i würden -als theoretische Hybridhemstoffe- natürlich in dieselbe korrespondierende Säure 3 gespalten.

Es sollte nun die Hemmung der Ester 3a – 3i gegenüber der 5 α R1 betrachtet werden. Durch Verlängerung der aliphatischen Esterkette von 3a um eine CH₂-Gruppe erhielt man den Ethylester 3b, der eine gute Hemmaktivität gegenüber der 5 α R1 aufwies, die allerdings mit einem IC₅₀-Wert von 378 nM etwa um den Faktor 2 geringer ausfiel als die des entsprechenden Methylesters. Ebenso verhielt es sich mit dem Propylester 3c, der mit 793 nM wiederum einen um den Faktor 2 höheren IC₅₀-Wert als der vorhergehende Ethylester 3b zeigte. Die Verbindung 3d mit Isopropylrest erreichte nur noch einen IC₅₀-Wert von \approx 5 μ M. Danach hatte eine weitere Verlängerung der Esterkette einen nahezu vollständigen Verlust der 5 α R1 Hemmaktivität zur Folge, was anhand der prozentualen Hemmwerte des Neopentylesters 3h (3,5 %) und auch des Benzylesters 3i (6,7 %) zu erkennen ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Vergrößerung des Restes R war die Einführung eines CH₂-Spacers zwischen Benzol-Ring und Methylester-Gruppe. Diese Modifikation wurde bereits bei steroidalen Hemmstoffen durchgeführt. Holt et. al. konnten zeigen, dass 3-Carboxymethyl-Steroide ebenso potent waren wie die entsprechenden 3-Carboxy-Steroide.¹⁴² Von der Phenyllessigsäure 4 war bereits bekannt, dass sie einen selektiven und hoch potenten 5 α R2 Inhibitor darstellt.¹¹² Im HEK-II Homogenatstest konnte ein IC₅₀-Wert von 3 nM erreicht werden. Im Gegensatz zur hoch aktiven Säure konnte für den korrespondierenden Methylester am Isoenzym 1 keine Hemmung festgestellt werden, so dass hier die Voraussetzungen für einen Hybridhemstoff nicht gegeben sind. Der prozentuale Hemmwert des Esters 4a von

Tabelle III.13: Einfluss des Restes R auf die Hemmung der humanen 5 α R

Verbindung	X	Y	R	HEK Zellfreier Assay	
				5 α R1	5 α R2
				[IC ₅₀ (μM)]	% Hemmung (2μM)
1	CH(Cyclohexyl) ₂	H	COOH	8,4	[0,005]
1a	CH(Cyclohexyl) ₂	H	COOCH₃	[2,336]	18,55
2	CH(Cyclohexyl) ₂	F	COOH	5,7	[0,004]
2a	CH(Cyclohexyl) ₂	F	COOCH₃	[0,758]	21,4
3	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOH	12,5	[0,025]
3a	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH₃	[0,234]	2,4
3b	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH₂CH₃	[0,378]	30,8
3c	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COO(CH₂)₂CH₃	[0,793]	8,0
3d	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH(CH₃)₂	[4,923]	6,8
3e	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COO(CH₂)₃CH₃	16,7	2,2
3f	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH₂CH(CH₃)₂	34,9	7,0
3g	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COO(CH₂)₅CH₃	17,0	5,6
3h	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH₂C(CH₃)₃	3,5	4,9
3i	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOCH₂C₆H₅	6,7	5,2
4	CH(Cyclohexyl) ₂	H	CH₂COOH	8,6	[0,003]
4a	CH(Cyclohexyl) ₂	H	CH₂COOCH₃	6,7	17,4
Finasterid				[0,453]	[0,025]
4-MA				[0,004]	[0,014]

17,4 % am Isoenzym 2 ergab sich wahrscheinlich während des Assays durch eine geringe Hydrolyse zur potenten, 5 α R2 aktiven Säure .

5.2.2 Einfluss des Restes X auf die Hemmung der 5 α R Isoenzyme

In diesem Kapitel sollten die Auswirkungen verschiedener Substituenten X auf die Hemmwirkung der 5 α R Isoenzyme untersucht werden. Da die 5 α R ein membrangebundenes und sehr lipophiles Enzym ist, wurden schon früh steroidale Inhibitoren als Mimetika des Substrates T entwickelt, die lange Alkyl-Substituenten in 17 β -Position trugen und eine gute Hemmwirkung aufwiesen.⁷² Unsere Ausgangsverbindungen aus der Klasse der *N*-substituierten 4-(Piperidin-4-ylidenmethyl)-benzoesäuren wurden als Steroidmimetika entwickelt, bei denen die Position des Restes X mit der 17 β -Position der steroidalen Inhibitoren gut korrespondiert. Beide Reste sind aus der Ebene herausgedreht (Dissertationsschrift von E. Baston, 1997). Zur Modifikation der Ausgangsverbindungen wurden also verschiedene, lipophile Reste X in die Grundstruktur der *N*-substituierten 4-(Piperidin-4-ylidenmethyl)-benzoesäuren und -methylester eingeführt. Dabei konnte auf bereits existierende Verbindungen zurückgegriffen werden (FP6 / 6a, FP13 / 13a, FP14 / 14a, FP9 / 9a, FP18 / 18a)^{111,112}, teilweise wurde auch zur Erweiterung des Testsets Neusynthese (5 / 5a – 7 / 7a) durchgeführt.

5.2.2.1. Synthese

Die Verbindungen 5 / 5a – 7 / 7a wurden nach den Methoden von Chauffe et. al.¹⁴¹ und Picard et. al.^{111,112} analog des allgemeinen Syntheschemas (siehe Abbildung III.19) hergestellt. *N*-(2-Propyl)pentanoyl-4-piperidon 5z wurde aus Propylpentansäurechlorid durch Umsetzung mit 4-Piperidon Monohydrat-Hydrochlorid und Triethylamin gewonnen (Methode A). Die zur Wittig-Reaktion benötigten Phosphoniumbromide 1x – 3 x wurde durch Allylbromierung (Methode B) der entsprechenden Benzoesäuren und anschließender Reaktion mit Triphenylphosphin in trockenem Benzol (Methode C) synthetisiert. In einer Wittig-Olefinierung konnten schließlich die gewünschten Methylester 5a – 7a nach Methode

D erhalten werden, die wiederum zu den korrespondierenden Carbonsäuren 5 – 7 verseift wurden.

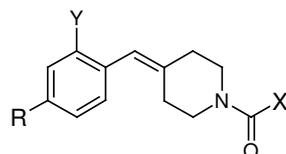
5.2.2.2. Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2

Die Hemmaktivitäten der in Tabelle III.14 aufgeführten Ester-Säure-Paare wurden in den HEK-I und HEK-II Homogenatassays bestimmt. Die prozentualen Hemmwerte wurden bei einer Hemmstoffkonzentration von 2 μ M ermittelt. Im Fall von potenteren Hemmstoffen wurden die IC₅₀-Werte in μ M angegeben. Zum Vergleich sollen die Werte der potenten Hybridhemmstoffe 1 / 1a – 3 / 3a (mit CH(Cyclohexyl)₂-Rest) in Tabelle III.13 herangezogen werden.

Bei den Carbonsäuren FP6, FP13 und FP14 ist der CH(Cyclohexyl)₂-Rest (wie bei den Carbonsäuren 1 – 3) gegen einen CH(Phenyl)₂-Rest ausgetauscht. Sie zeigten wie erwartet gegenüber der 5 α R1 kaum Hemmung. Für das Isoenzym 2 jedoch konnten IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich erzielt werden. Die beste Verbindung FP13 dieser Gruppe trug einen Fluor-Substituenten in meta-Position zur Carbonsäure-Gruppe und zeigte für die 5 α R2 einen IC₅₀-Wert von 94 nM. Allerdings sind diese Hemmwerte am Isoenzym 2 im Vergleich zu den entsprechend substituierten Säuren mit CH(Cyclohexyl)₂-Rest (1 – 3) um mindestens Faktor 23 schlechter.

Betrachtet man nun die korrespondierenden Methylester FP6a, FP13a und FP14a, so kann für alle Verbindungen eine 5 α R1 Hemmung festgestellt werden. Der beste Ester FP14a trug einen Methoxy-Substituenten und zeigte im HEK-I zellfreien Assay einen IC₅₀-Wert von 920 nM, was verglichen mit Methylester 3a (mit CH(Cyclohexyl)₂-Rest) eine 4-fach schlechtere 5 α R1 Hemmung bedeutete.

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Ermittlung der Hemmwerte für die Verbindungen mit 4-Heptyl-Rest (5 / 5a – 7 / 7a). Alle Carbonsäuren 5 – 7 waren potente Inhibitoren für die 5 α R2 mit IC₅₀-Werten von 764 nM für Verbindung 7 bis hin zu 74 nM für Verbindung 5. Diese Werte lagen aber um mindestens Faktor 15 höher als die IC₅₀-Werte der entsprechend substituierten Säuren 1 – 3.

Tabelle III.14: Einfluss des Restes X auf die Hemmung der humanen 5 α R

				HEK Zellfreier Assay	
				[IC ₅₀ (μM)]	
				% Hemmung (2μM)	
Verbindung	X	Y	R	5 α R1	5 α R2
FP6	CH(Phenyl) ₂	H	COOH	6,7	[0,167]
FP6a	CH(Phenyl) ₂	H	COOCH ₃	30,5	2,5
FP13	CH(Phenyl) ₂	F	COOH	25,2	[0,094]
FP13a	CH(Phenyl) ₂	F	COOCH ₃	[2,659]	41,6
FP14	CH(Phenyl) ₂	OCH ₃	COOH	24,2	[0,850]
FP14a	CH(Phenyl) ₂	OCH ₃	COOCH ₃	[0,920]	10,5
FP9	N(Phenyl) ₂	H	COOH	9,8	[0,281]
FP9a	N(Phenyl) ₂	H	COOCH ₃	22,2	15,6
FP18	1-Adamantyl	OCH ₃	COOH	29,7	[0,440]
FP18a	1-Adamantyl	OCH ₃	COOCH ₃	[0,452]	26,3
5	4-Heptyl	H	COOH	5,4	[0,074]
5a	4-Heptyl	H	COOCH ₃	[3,18]	15,7
6	4-Heptyl	F	COOH	6,8	[0,154]
6a	4-Heptyl	F	COOCH ₃	[1,832]	10,0
7	4-Heptyl	OCH ₃	COOH	10,4	[0,764]
7a	4-Heptyl	OCH ₃	COOCH ₃	[0,396]	9,3

Die korrespondierenden Methylester 5a – 7a hemmten alle selektiv die 5 α R1. Der beste Inhibitor war Verbindung 7a, der in meta-Position zur Ester-Gruppe einen Methoxy-Substituenten trug, und zeigte im HEK-I Homogenatstest einen IC₅₀-Wert von 396 nM. Der Hemmwert für den entsprechenden Methoxy-substituierten Ester 3a mit CH(Cyclohexyl)₂-Rest war gerade mal 1,7-fach besser.

Bei Austausch des CH(Cyclohexyl)₂-Rest gegen einen N(Phenyl)₂-Rest konnte mit der Carbonsäure FP9 ein selektiver und recht potenter 5 α R2 Hemmstoff erhalten werden (IC₅₀-Wert 281 nM). Bei dem korrespondierenden Methylester hingegen führte diese Modifikation zu einem sehr starken Wirkungsverlust am Isoenzym 1. Hier konnte nur noch eine prozentuale Hemmung von 22 % nachgewiesen werden im Vergleich zum unsubstituierten Methylester 1a, der am Isoenzym 1 einen IC₅₀-Wert von 2,3 μ M zeigte.

Der Methylester FP18a, der einen lipophilen 1-Adamantyl-Rest und einen Methoxy-Substituent trug, erreichte einen IC₅₀-Wert von 452 nM für Isoenzym 1 und damit eine gerade mal 2-fach schwächere 5 α R1 Hemmung als der beste Hybridester 3a mit CH(Cyclohexyl)₂-Rest. Die korrespondierende Säure FP18 zeigte für die 5 α R2 einen IC₅₀-Wert von 440 nM, der leider um ca. Faktor 18 schlechter war als der Hemmwert der entsprechenden Carbonsäure 3.

5.2.3 Einfluss des Substituenten Y auf die Hemmung der 5 α R Isoenzyme

Wenn man die vorher beschriebenen Verbindungen betrachtet (siehe Kapitel 5.2.1 und Kapitel 5.2.2), schien der Substituent Y in meta-Position zur Carbonsäure- oder Ester-Gruppe, einen großen Einfluss sowohl auf die Hemmwirkung der Ester am Isoenzym 1 als auch auf die 5 α R2 Hemmung der Säuren zu haben. Bisher wurden Substanzen mit H-, F- oder OCH₃-Substituent in Position Y untersucht.

Nach Betrachtung der Hemmaktivitäten der Carbonsäuren am Isoenzym 2 wurde festgestellt, dass der Fluor-Substituent (siehe Verbindungen 2 und FP13) mit seinem elektronenziehenden Effekt zu einer Erniedrigung des IC₅₀-Wertes führen konnte, besonders im Vergleich zu den entsprechenden Carbonsäuren mit einem Methoxy-Substituenten. Die OCH₃-Gruppe stellt den größten verwendeten Substituenten mit einem schwachen elektronischen Effekt dar. Die so substituierten Säuren

(Verbindungen 3, 7, FP14) waren in ihrer Gruppe von Verbindungen jeweils die schlechtesten 5α R2 Hemmstoffe. Nach Gegenüberstellung der 5α R1 Hemmwerte der Methylester, wurde jedoch schnell erkannt, dass die potentesten Inhibitoren diejenigen mit OCH_3 -Substituent waren (siehe Verbindungen 3a, FP14a, FP18a und 7).

Da nun für die Carbonsäuren ein Fluor-Substituent eine Erhöhung der 5α R2 Hemmung erzielen konnte, für die 5α R1 Hemmung der entsprechenden Methylester aber ein Methoxy-Substituent eine wesentliche Verbesserung bedeutete, sollte versucht werden, die gegensätzlichen Eigenschaften beider Substituenten zu vereinen. Es sollten also Verbindungen mit voluminöseren Substituenten (verglichen mit F) aber stärkeren elektronenziehenden Effekten (verglichen mit OCH_3) synthetisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen wurden Ester-Säure-Paare mit Chlor- und Brom-Resten (10 / 10a und 11 / 11a) an Position Y hergestellt.

5.2.3.1. Synthese

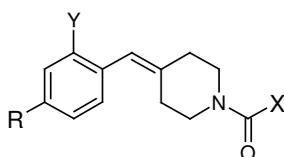
Die Synthese der Cl- und Br-substituierten Verbindungen erfolgte analog des allgemeinen Syntheschemas in Abbildung III.19. Das *N*-Acylpiperidon 1z wurde nach Methode A aus der entsprechenden Säure hergestellt, die nach Reaktion mit Thionylchlorid zum Säurechlorid mit Piperidon-HCl und Triethylamin umgesetzt wurde. Die zur Wittig-Reaktion mit 1z benötigten Phosphoniumbromide 10x und 11x wurden durch Allylbromierung nach Methode B und anschließender Umsetzung mit Triphenylphosphin in trockenem Benzol (Methode C) gewonnen. Zur Wittig-Olefinierung wurde wie in Methode D beschrieben die Deprotonierung der Phosphoniumbromide 10x und 11x mittels einer Base eingeleitet. Für die Br-substituierte Verbindung wurde als Base Lithiumdiisopropylamid anstelle von Butyllithium verwendet. Anschließende Zugabe von *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon 1z führte dann zu den gewünschten Methylestern 10a und 11a. Nach Verseifung dieser Ester wurden die entsprechenden Carbonsäuren 10 und 11 erhalten.

5.2.3.2. Hemmung der humanen 5 α R1 und 5 α R2

Die Hemmaktivitäten der beiden in Tabelle III.15 aufgeführten Ester-Säure-Paare wurden in den HEK-I und HEK-II Homogenatassays bestimmt. Die prozentualen Hemmwerte wurden bei einer Konzentration von 2 μ M ermittelt, die IC₅₀-Werte sind in μ M angegeben. Zum Vergleich sollen wieder die Werte der potenten Hybridhemmstoffe 1 / 1a – 3 / 3a in Tabelle III.13 herangezogen werden.

Zunächst sollen die 5 α R2 Hemmwerte der Carbonsäuren 10 und 11 betrachtet werden. Mit Zunahme des elektronenziehenden Effektes der Substituenten in Position Y wird die Hemmwirkung der Säuren 10 und 11 stärker. Durch die Verwendung von Cl- und Br-Substituenten konnte also die 5 α R2 Hemmung von einem IC₅₀-Wert von 25 nM (für die Methoxy-substituierte Säure 3) auf Werte von 8 nM (Verb. 10) und 3 nM (Verb. 11) gesteigert werden.

Tabelle III.15: Einfluss des Substituenten Y auf die Hemmung der humanen 5 α R



Verbindung	X	Y	R	HEK Zellfreier Assay	
				5 α R1	5 α R2
				[IC ₅₀ (μ M)]	% Hemmung (2 μ M)
10	CH(Cyclohexyl) ₂	Cl	COOH	10,1	[0,008]
10a	CH(Cyclohexyl) ₂	Cl	COOCH ₃	[0,431]	4,5
11	CH(Cyclohexyl) ₂	Br	COOH	24,0	[0,003]
11a	CH(Cyclohexyl) ₂	Br	COOCH ₃	[0,536]	11,1

Die korrespondierenden Methylester 10a und 11a zeigten gute Hemmwerte am Isoenzym 1. Mit IC₅₀-Werten von 536 nM für Verbindung 11a und 431 nM für Verbindung 10a gehörten sie zu den besten 5 α R1 Hemmstoffen, waren aber

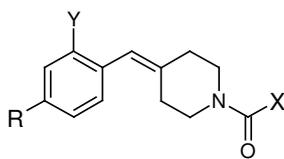
verglichen mit dem Methylester 3a (IC_{50} -Wert = 234 nM) etwa um Faktor 1,8 und 2,3 schwächer wirksam.

Aufgrund der Kombination aus der hoch potenten Hemmaktivität der Carbonsäuren an der $5\alpha R2$ und der guten $5\alpha R1$ Hemmung der Methylester erfüllten diese Ester-Säure-Paare die ersten Voraussetzungen für vielversprechende Hybridhemmstoffe.

5.2.4 Ersatz der Ester-Gruppe durch eine Methylamid-Gruppe

Zur weiteren Modifizierung der Ester-Gruppe, sollte versucht werden, in Position R der Ausgangsverbindungen (1a – 3a) einen bioisosteren Austausch vorzunehmen. Dabei sollte natürlich das Hybridinhibitor-Konzept beibehalten werden. Das bedeutete, dass der Ester gegen eine funktionelle Gruppe mit genügend großer struktureller Ähnlichkeit ersetzt werden musste, so dass die entstehenden Verbindungen die $5\alpha R1$ noch hemmen würden. Andererseits musste diese Precursor-Substanz ebenfalls in der Lage sein, enzymatisch in die korrespondierende, $5\alpha R2$ aktive Carbonsäure gespalten zu werden. Diese Bedingungen konnten von einer Methylamid-Gruppe erfüllt werden. Da eine Amid-Bindung aufgrund ihrer elektronischen Eigenschaften stabiler ist als eine Ester-Gruppe, könnte sich außerdem ein günstigeres Stabilitäts-/Labilitätsverhältnis ergeben. Die Endverbindungen mit Methylamid-Gruppe sollten den für die $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ Hemmung günstigsten Rest an Position X ($CH(\text{Cyclohexyl})_2$ -Rest) tragen. Für Position Y wurde unter anderem der Substituent (OCH_3 -Gruppe) gewählt, mit dem die beste Hemmwirkung der Ester an Isoenzym 1 erzielt werden konnte.

In Tabelle III.16 sind die entsprechend synthetisierten Verbindungen aufgeführt. Die Hemmwerte wurden wieder in den HEK-I und HEK-II zellfreien Assays ermittelt. Zu den entsprechenden Methylamiden (ZS1a und ZS3a) sind zusätzlich die Hemmwerte der bereits bekannten Hydrolyseprodukte (Carbonsäuren 1 und 3) angegeben.

Tabelle III.16: Hemmung der humanen 5 α R durch Amide und Methyl-Amide

Verbindung	X	Y	R	HEK Zellfreier Assay	
				5 α R1	5 α R2
ZS1	CH(Cyclohexyl) ₂	H	CONH₂	3,7	6,8
1	CH(Cyclohexyl) ₂	H	COOH	8,4	[0,005]
ZS1a	CH(Cyclohexyl) ₂	H	CONHCH₃	[2,051]	3,7
3	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	COOH	12,5	[0,025]
ZS3a	CH(Cyclohexyl) ₂	OCH ₃	CONHCH₃	[0,199]	7,2

Erfreulicherweise waren die Methylamide ZS1a und ZS3a mit IC₅₀-Werten von ungefähr 2 μ M und sogar 199 nM sehr gute Inhibitoren für die 5 α R1. Verglichen mit den Hemmwerten der entsprechenden Methylester 1a und 3a (IC₅₀-Werte von 2,336 μ M und 234 nM) waren die Methylamide nicht nur wirksam, sondern konnten auch die Hemmaktivität für das Isoenzym 1 noch steigern. Die Carbonsäuren 1 und 3 stellten die korrespondierenden Hydrolyseprodukte dar und waren, wie bereits bekannt, mit IC₅₀-Werten von 5 nM und 25 nM sehr potente Hemmstoffe der 5 α R2. Da das Methylamid ZS3a mit Methoxy-Substituent einen sehr potenten Hemmstoff für die 5 α R1 darstellte, aber auch die entsprechende Carbonsäure 3 eine hervorragende Hemmwirkung am Isoenzym 2 zeigte, ergaben sich auch hier wiederum beste Voraussetzungen für erfolgreiche Hybridhemmstoffe.

Das „unsubstituierte“ Amid ZS1 wurde als Negativbeispiel ebenfalls getestet, um zu zeigen, dass die CH₃-Gruppe (wie in den Methylamiden und Methylestern) essentiell für die Wirkung an der 5 α R1 ist. Wie erwartet konnte für ZS1 weder am Isoenzym 1 noch am Isoenzym 2 eine Hemmung festgestellt werden.

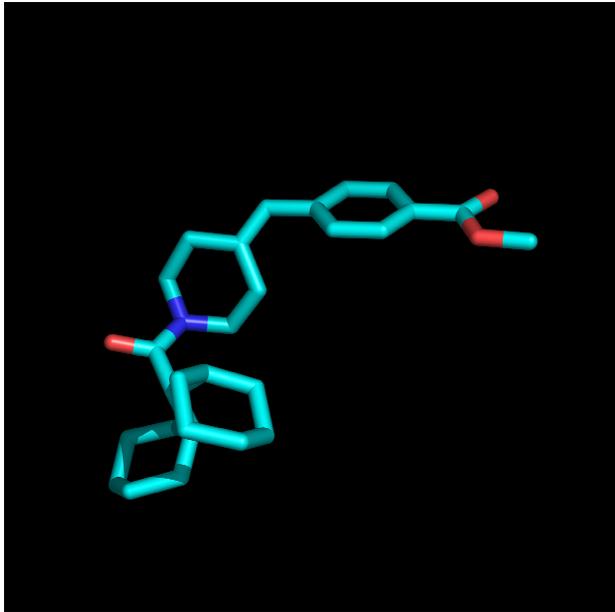
5.2.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen der Hybridhemmstoffe

Zur Charakterisierung der Hybridhemmung an den 5α R Isoenzymen wurde zuerst untersucht, welchen Einfluss die Vergrößerung des Restes R auf die 5α R1 Hemmung hat. Dazu wurde einerseits die Esterkette verlängert und andererseits ein CH_2 -Spacer zwischen Benzol-Ring und Methylester-Gruppe eingeführt.

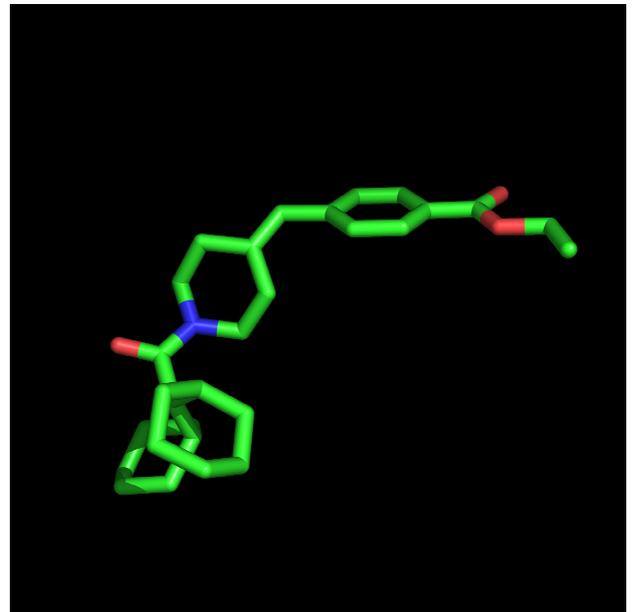
Damit die Änderungen in der Hemmaktivität möglichst deutlich festzustellen sein würden, wurde zur Verlängerung der Esterkette der Methylester mit der besten 5α R1 Hemmung (3a) ausgewählt. Im HEK-I Homogenatassay konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Länge der Esterkette auch die IC_{50} -Werte zunahm. Zunächst wurde die Hemmung der 5α R1 von Methyl- über Ethyl- zu Propyl-Ester nur um den Faktor 2 schlechter. Bei weiterer Vergrößerung nahm die Wirkung drastischer ab und endete schließlich in völligem Wirkungsverlust für die Verbindungen 3h (Neopentylester) und 3i (Benzylester). Daraus ließ sich schließen, dass das aktive Zentrum des Isoenzym 1 an der Position, in die sich die Ester-Gruppe orientiert, sehr begrenzt sein muss und keinen größeren Rest als eine Methylester-Gruppe zulässt. Mit dem Methylester 3a war also die maximale Wirkung bereits erreicht.

Die Einführung eines CH_2 -Spacers zwischen Benzol-Ring und Methylester-Gruppe lieferte Verbindung 4a. Diese Modifikation, die bereits bei Steroiden erfolgreich durchgeführt wurde,¹⁴² resultierte bei Methylester 4a in einer fast vollständigen Reduktion der 5α R1 Hemmaktivität. Auch an diesem Beispiel wurde die strikte Begrenzung der Bindetasche des Isoenzym 1 deutlich. Im Gegensatz aber zu langsam ansteigenden IC_{50} -Werten bei Verlängerung der Esterkette um eine CH_2 -Gruppe (3a \rightarrow 3b) ist der Verlust der 5α R1 Hemmaktivität bei Einführung eines CH_2 -Spacers (wie bei Verbindung 4a) ausgeprägter. Um eine Erklärung dafür zu finden, wurde die Verbindung 4a ebenso wie der korrespondierende Methylester 1a und sein entsprechender Ethylester 1b (ohne CH_2 -Spacer) mittels HyperChem dargestellt und optimiert (HyperChem Release 6.03.; Semi-empirical Optimization, Polak-Ribiere Conjugate Gradient). Wie Abbildung III.21 zeigt, liegen die Ester-Gruppen von Verbindung 1a und 1b in einer Ebene mit dem Benzol-Ring. Bei 4a hingegen ragt die Methylester-Gruppe durch den eingeführten CH_2 -Spacer aus der Ebene heraus. Aufgrund dieser Begebenheit könnte die schlechte 5α R1 Hemmung von 4a also zusätzlich damit erklärt werden, dass der Ester-Rest eine andere Orientierung im

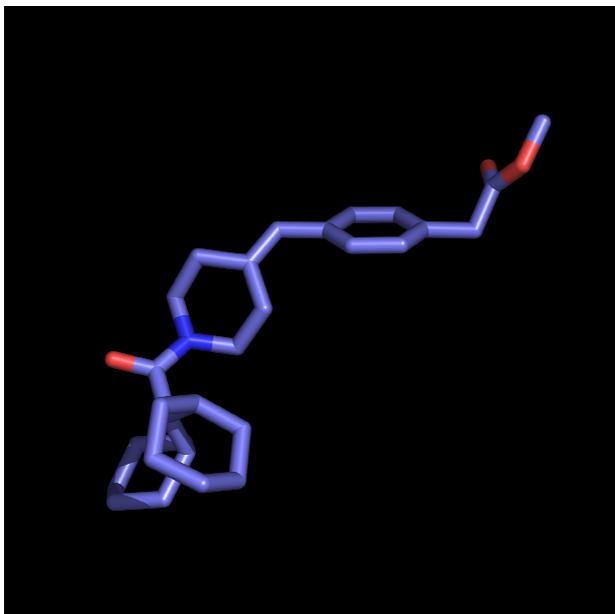
Enzym einnehmen muss, so dass die notwendigen Wechselwirkungen nicht mehr zustande kommen können.



Methylester 1a



Ethylester 1b



Verbindung 4a mit CH₂-Spacer

Abbildung III.21: Mit HyperChem Energie-minimierte Strukturen 1a, 1b und 4a

Als nächstes sollte die Position X der Ausgangsstruktur modifiziert werden. Dazu musste beachtet werden, dass die vorliegenden Substanzen Mimetika des steroidalen Grundgerüsts darstellen. Das A-Ring Imitat (aromatische Carbonsäure bzw. Ester) ist über eine starre Verbrückung mit einem zweiten Molekülteil (Piperidin-Element) in einer solchen Weise verknüpft, dass einem lipophilen Substituenten X eine zu Steroiden vergleichbare Orientierung in der 17 β -Position ermöglicht wird. Dieser Substituent X ist wie bei den steroidalen Inhibitoren aus der Ebene herausgedreht. (Dissertationsschrift E. Baston, 1997) Lipophile Gruppen hatten sich bereits als günstig für die Hemmung der 5 α R erwiesen, da sie gut mit der hydrophoben Bindungstasche, die für die 5 α R Isoenzyme schon lange postuliert und in einem Pharmakophor-Modell gefordert wurde, in Wechselwirkung treten können.^{111,112,143} Zur weiteren Optimierung und Charakterisierung der Hybridhemmstoffe wurden also verschiedene lipophile Substituenten an dieser Stelle eingeführt.

Die CH(Cyclohexyl)₂-Gruppe der Ausgangsverbindungen 1 / 1a – 3 / 3a wurde durch einen CH(Phenyl)₂-Substituenten, eine 4-Heptyl-Gruppe und einen Adamantyl-Rest ausgetauscht. Alle Substitutionen führten für die Carbonsäuren zu einer relativ starken Verringerung der 5 α R2 Hemmaktivität. Verglichen mit den entsprechenden Ausgangsverbindungen wurden teilweise IC₅₀-Werte erhalten, die um Faktor 38 höher lagen. Bei den korrespondierenden Methylestern war der Wirkungsverlust für die 5 α R1 weniger stark ausgeprägt als bei den Säuren der Wirkungsverlust für die 5 α R2. Die ermittelten IC₅₀-Werte waren nur um Faktor 2 – 4 höher als die der Ausgangsverbindungen.

Diese Verluste an Hemmaktivität könnten mit der Verringerung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor erklärt werden. Dabei war offensichtlich nicht nur die Lipophilie, sondern auch die Größe der Substituenten von besonderer Bedeutung. Bei der 5 α R2 schienen diese hydrophoben Wechselwirkungen außerdem eine wesentlich größere Rolle zu spielen als bei der 5 α R1.

Verglichen mit CH(Phenyl)₂-Substituenten oder einer 4-Heptyl-Gruppe zeigte die Carbonsäure FP18 mit einem Adamantyl-Rest trotz relativer Steigerung der Lipophilie einen starken Wirkungsverlust für die 5 α R2. Ebenso erreichte der korrespondierende Methylester FP18a trotz erhöhter Lipophilie keine bessere

Hemmung der 5 α R1 im Vergleich zum entsprechend substituierten Ester 7a mit 4-Heptyl-Rest. Diese Ergebnisse belegten, dass einerseits die Lipophilie, andererseits aber auch die Flexibilität der verwendeten Reste in Position X wichtig für die Wirkung an beiden Isoenzymen war. Die hydrophobe Tasche im aktiven Zentrum der 5 α R Isoenzyme schien also am besten von großen lipophilen und flexiblen Resten ausgefüllt zu werden, so dass sich die Verbindungen 1 / 1a – 3 / 3a mit CH(Cyclohexyl)₂-Gruppe in Position X als beste Inhibitoren erwiesen.

Auch die Variation des Substituenten Y hatte großen Einfluss auf die 5 α R1 Hemmung der Ester und auf die 5 α R2 Hemmung der Säuren. Dabei konnte nach Betrachtung der IC₅₀-Werte für die Carbonsäuren an Isoenzym 2 festgehalten werden, dass der Fluor-Substituent mit seinem elektronenziehenden Effekt zu einer Erniedrigung des IC₅₀-Wertes führen konnte, besonders im Vergleich zu den schwächer wirksamen Carbonsäuren mit OCH₃-Gruppe. Für die 5 α R1 Hemmung der Ester war jedoch der größere Methoxy-Substituent mit schwachem elektronischem Effekt von Vorteil, verglichen mit den weniger wirksamen fluorierten Estern. Um nun die Hemmung der Ester und der entsprechenden Carbonsäuren gleichzeitig zu verbessern bzw. beizubehalten, sollten die gegensätzlichen Eigenschaften beider Substituenten vereint werden. Deshalb wurden Substanzen mit voluminöseren (im Vergleich zu Fluor) und zusätzlich aber stärkeren elektronenziehenden Effekten (im Vergleich mit OCH₃) synthetisiert. Die OCH₃-Gruppe besitzt ein ungefähres Volumen von 133 Å³. Als Substituenten mit elektronegativen Effekten boten sich daher vor allem Chlor mit einem Volumen von 135 Å³ an, aber auch der Effekt von Brom (158 Å³) sollte untersucht werden.

Eine Erklärung für die Überlegenheit der Fluor-Substitution der Carbonsäuren könnte der hypothetische Reaktionsmechanismus, der für die 5 α R beschrieben ist, liefern. Die enzymatische Reaktion der 5 α R kann als Aktivierung eines Enons (wie bei Testosteron) durch einen elektrophilen Rest (E⁺) im aktiven Zentrum verstanden werden. Die vorliegenden nicht-steroidalen Hemmstoffe sind als Mimetika dieses Enolat-Intermediates synthetisiert. Die Interaktion zwischen E⁺ im aktiven Zentrum und der Carbonsäure sollte also umso stärker sein, je kleiner ihr pKa-Wert ist, d.h. je leichter die Säure deprotoniert werden kann. Die 5 α R2 Hemmung der Carbonsäure

3a mit Methoxy-Rest konnte durch Substitution mit den stärker elektronenziehenden Substituenten Chlor und Brom verbessert werden, was die oben angeführte Theorie bestätigte. Mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM stellte die Verbindung 11 mit Brom-Substituent in meta-Position zur Carbonsäure-Funktion den besten Inhibitor des Isoenzym 2 dar.

Der IC_{50} -Wert des Methylesters 3a (mit Methoxy-Substituent) wurde allerdings durch Cl- und Br-Substitution etwas erhöht (Faktor 1,8 und 2,3), was darauf schließen ließ, dass nicht allein das Volumen des Substituenten eine Rolle spielte, sondern eventuell auch die Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften.

Interessanterweise war auch der bioisostere Austausch der Methylester-Gruppe gegen eine Methylamid-Gruppe erfolgreich. Trotz der weniger starken Polarisierung der Amid-Bindung im Vergleich zur Ester-Bindung, konnten für die Methylamide ZS1a und ZS3a $5\alpha R1$ Hemmwerte ermittelt werden, die die der entsprechenden Methylester 1a und 3a noch etwas übertrafen. Als Hydrolyse-Produkte fungierten die bereits als potente $5\alpha R2$ Inhibitoren bekannten Carbonsäuren 1 und 3.

Die Selektivität der $5\alpha R1$ und $5\alpha R2$ Hemmstoffe kommt lediglich durch die Veresterung der Carbonsäure zustande. Ohne "Einführung" einer CH_3 -Gruppe wären die Substanzen an der $5\alpha R1$ also nicht wirksam. Um zu überprüfen, ob das Weglassen dieser Methyl-Gruppe auch bei den Methylamiden zu einem Wirkungsverlust am Isoenzym 1 führen würde, wurde das dem Methylamid ZS1a entsprechende Amid ZS1 synthetisiert. Wie erwartet zeigte sich auch hier ein völliger Verlust der Hemmaktivität gegenüber der $5\alpha R1$. Für die $5\alpha R2$ Hemmung schien ja eine negativ ionisierbare Gruppe (Carbonsäure) essentiell für die Hemmung. Daher sollte das Amid ZS1 auch hier keine Wirkung zeigen, was durch die experimentellen Daten bestätigt werden konnte.

5.3 Stabilitätsuntersuchungen und Permeation von aktiven Hybridhemmstoffen

Ester bzw. Methylamide, die als Hemmstoffe der $5\alpha R1$ identifiziert wurden und deren korrespondierende Säuren potente $5\alpha R2$ Inhibitoren darstellten, sollten auf ihre Eignung, als Hybridhemmstoffe zu fungieren, untersucht werden. Diese Ester dürfen also während der Absorption und Distribution im menschlichen Körper nicht zu schnell hydrolysiert werden, damit sie die $5\alpha R1$, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt, auch hemmen können. Nach Erreichen der Prostata müssen die Ester in der Lage sein, die Membran der Targetzellen zu überwinden, um intrazellulär in die korrespondierende Säure gespalten zu werden, die dann ihrerseits als potenter $5\alpha R2$ Hemmstoff wirken kann.

Deshalb wurde die Esterstabilität in wässriger Lösung (PBS-Puffer), in Caco-2 Zellhomogenat (als Modell für den Gastrointestinaltrakt) und gegenüber Enzymen in humanem Plasma überprüft. Die Aufnahme der Ester in die Prostatazellen wurde in einem Permeationstest untersucht, zu dessen Durchführung DU145 Zellen als Modell für die Targetzellen verwendet wurden. Zur Stabilitätsuntersuchung der Methyl ester in der Prostata wurde BPH-Gewebe-Homogenat eingesetzt. Alle Substanzen wurden jeweils 24 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die eingesetzten biologischen Medien sollten auf dieselbe spezifische Aktivität eingestellt werden.

5.3.1 Vergleich der eingesetzten biologischen Medien

Caco-Zellhomogenat, humanes Plasma und BPH-Gewebehomogenat wurden sowohl durch Bestimmung des Proteingehaltes als auch durch die Aktivitätsbestimmung der enthaltenen Esterasen charakterisiert. Wie vorher in Kapitel 2.2.6 beschrieben, wurde Gesamtprotein nach der Methode von Bradford ermittelt.¹²⁹ Die Gesamtesterase-Aktivität wurde mit leichten Abwandlungen nach der Methode von Pauletti et al. bestimmt (siehe Kapitel 2.2.6).¹⁴⁴ Als unspezifisches Substrat für Esterasen wurde das farblose p-Nitrophenylacetat (PNPA) eingesetzt, das zu seinem gelben Produkt (4-Nitrophenol) hydrolysiert wurde. Die Reaktion wurde spektrometrisch im Multilabel Counter bei 405 nm und 37 °C bis zur fast vollständigen Konversion verfolgt.

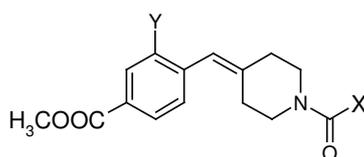
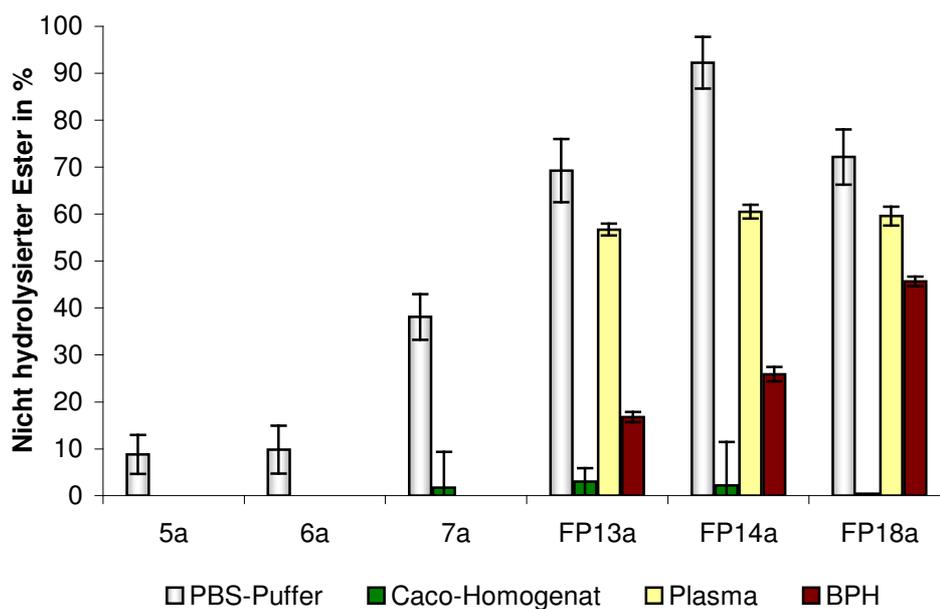
Die spezifischen Aktivitäten der biologischen Medien wurden dann unter Einbeziehung der Proteinkonzentration in nmol / min / mg Protein angegeben. Für humanes Plasma, wurde eine spezifische Aktivität von 11 nmol / min / mg Protein gefunden. Zum direkten Vergleich wurden für die nachfolgenden Tests auch Caco-Zellhomogenat und BPH-Gewebehomogenat auf dieselbe Aktivität eingestellt.

5.3.2 Stabilitätsuntersuchungen an Methylestern mit Variationsstelle X

Die Ergebnisse der Stabilitätstests sind in Abbildung III.22 graphisch dargestellt. Nach 24 h Inkubation in PBS-Puffer (pH 7,4) wurden die Methylester 5a und 6a, die einen 4-Heptyl-Rest in Position X trugen, fast vollständig zu den korrespondierenden Carbonsäuren hydrolysiert. Auch von Verbindung 7a konnten nach 24 h nur noch knapp 40 % in Puffer nachgewiesen werden. Da auch nach Inkubation von 7a mit Caco-Homogenat und Plasma weniger als 2 % bzw. kein Ester mehr detektiert werden konnte, wurde auf den Stabilitätstest in BPH-Gewebehomogenat verzichtet.

Methylester FP13a wurde in Puffer leicht hydrolysiert (zu etwa 30 %), wogegen die Methoxy-substituierte Verbindung FP14a in Puffer stabil war. Beide Substanzen waren moderat beständig gegen Plasma-Enzyme (Hydrolyse von ca. 40 %) und wurden von Target-Enzymen der Prostata sehr gut gespalten. Nach 24 h konnten von FP13a nur noch 17 % und von FP14a noch 26 % detektiert werden. Leider verlief auch die Hydrolyse in Caco-Zellhomogenat sehr leicht, so dass beide Methylester nach 24 h zu über 97 % gespalten waren.

Ähnlich verhielt es sich mit PF18a. Nach leichter Hydrolyse von etwa 30 % in Puffer und moderater Stabilität in Plasma und BPH-Gewebehomogenat wurde in Caco-Zellhomogenat ein fast vollständiger Abbau zur Säure beobachtet.



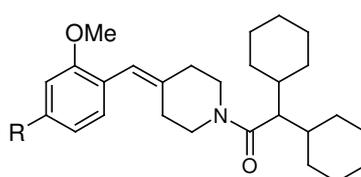
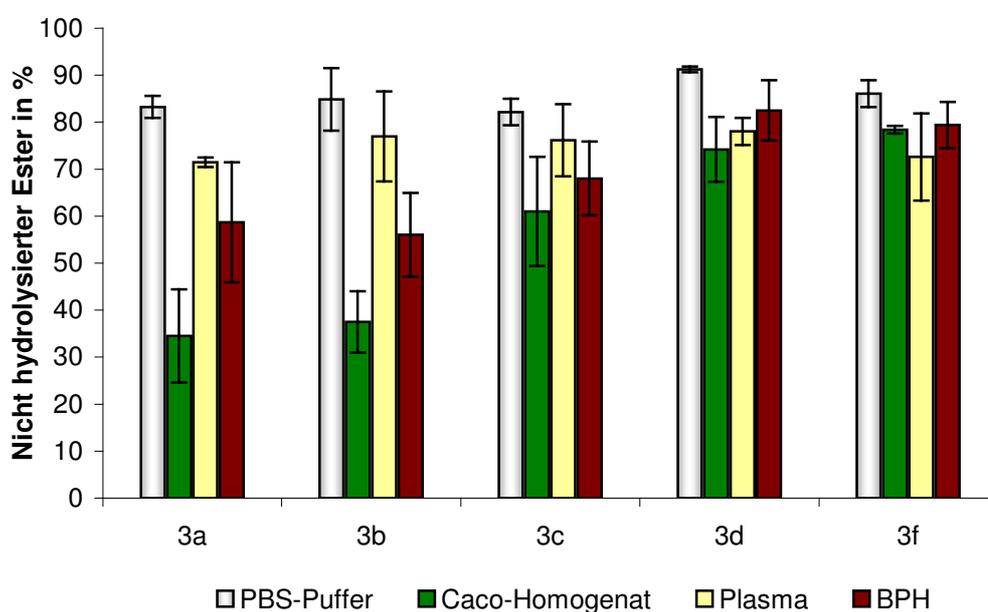
Verbindung	X	Y
FP13a	CH(Phenyl) ₂	F
FP14a	CH(Phenyl) ₂	OCH ₃
FP18a	1-Adamantyl	OCH ₃
5a	4-Heptyl	H
6a	4-Heptyl	F
7a	4-Heptyl	OCH ₃

Abbildung III.22: Stabilität von Methylestern mit Variation an Position X

5.3.3 Stabilitätsuntersuchungen an homologen Estern

Die untersuchten Ester 3a – 3f waren sehr hydrolysestabil in Puffer, so dass nach 24 h Inkubation noch mindestens 82 % detektierbar waren. Die Spaltung durch Enzyme in humanem Plasma war mit Hydrolyseraten von 28 % für 3a bis hin zu 22 % für 3d ebenfalls sehr langsam. In Anbetracht der Tatsache, dass die Aufnahme einer

Substanz durch den Magen-Darm-Trakt mit durchschnittlich 3 Stunden veranschlagt werden kann, wiesen alle Ester eine hinreichende Stabilität in Caco-Zellhomogenat auf. Am stabilsten waren dabei der Isopropylester 3d (74,2 % detektierbar) und der Isobutylester 3f (78,4 % detektierbar). Die Hydrolyse zur entsprechenden Carbonsäure wurde mit zunehmender Länge der Esterkette geringer. In BPH-Gewebehomogenat wurden die Verbindungen 3a – 3c besser gespalten als in humanem Plasma und zeigten ausreichende Hydrolyseraten um 40 %. Für die Ester 3d und 3f hingegen konnte hier nur eine Spaltung von 17,5 % und 20 % nachgewiesen werden.

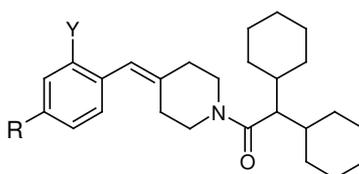
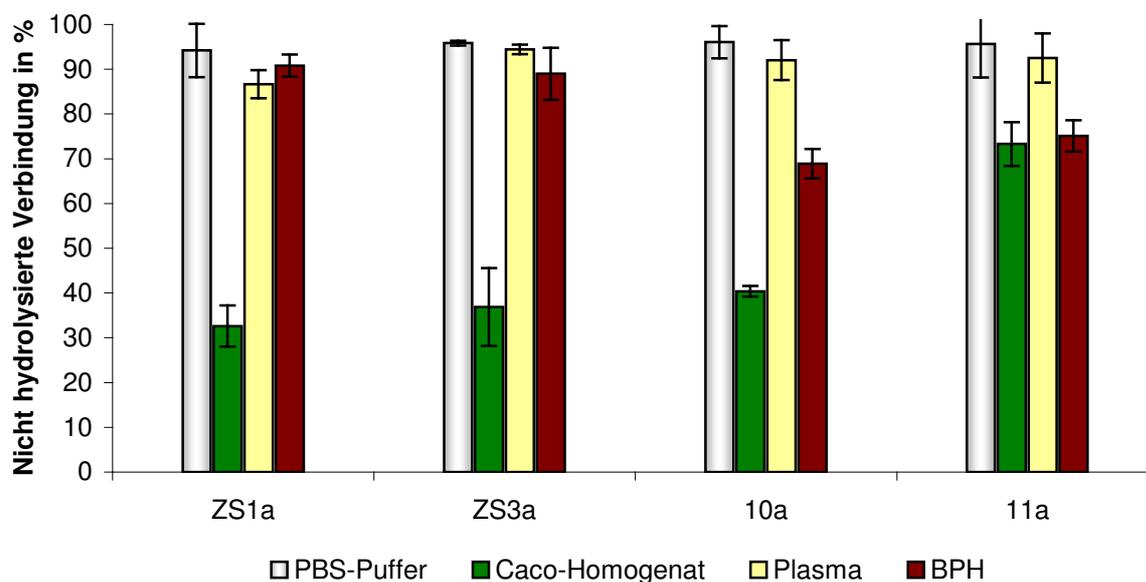


Verbindung	R
3a	COOCH ₃
3b	COOCH ₂ CH ₃
3c	COO(CH ₂) ₂ CH ₃
3d	COOCH(CH ₃) ₂
3f	COOCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Abbildung III.23: Stabilität der homologen Ester 3a – 3f

5.3.4 Stabilitätsuntersuchungen an Methylamiden und Methylestern mit Variationsstelle Y

Die beiden Methylamide ZS1a und ZS3a waren, wie in Abbildung III.24 dargestellt, in Puffer und Plasma äußerst stabil. Leider fand aber auch im Target-Gewebe kaum Hydrolyse (ca. 10 %) durch Prostata-Enzyme statt. Trotz der enormen Stabilität konnte in Caco-Homogenat ein Hydrolyse von 67,4 % für ZS1a und 63,1 % für ZS3a beobachtet werden.



Verbindung	Y	R
ZS1a	H	CONHCH₃
ZS3a	OCH ₃	CONHCH₃
10a	Cl	COOCH ₃
11a	Br	COOCH ₃

Abbildung III.24: Stabilität von Methylamiden und Methylestern mit Variation an Position Y

Die Methylester 10a und 11a wiesen im Vergleich zu den Methylamiden ein günstigeres Stabilitäts-/Labilitätsverhältnis auf. In Puffer und Plasma wurden beide Verbindungen zu kaum 10 % hydrolysiert. Auch gegenüber intestinalen Esterasen zeigten die Methylester eine gute Stabilität. Nach 24 h konnten von Verbindung 10a noch über 40 % detektiert werden, bei Verbindung 11a waren es sogar über 70 %. In BPH-Gewebehomogenat hingegen wurden die Ester besser gespalten als in humanem Plasma und wiesen Hydrolyseraten von 31 % für Verbindung 10a sowie 25 % für Verbindung 11a auf.

5.3.5 Permeation in DU145 Zellen als Modell für das Target

Nach Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen sollte exemplarisch an einigen ausgewählten Estern bzw. Methylamiden gezeigt werden, dass die Substanzen in der Lage sind, die Membran der Targetzellen zu überwinden, um intrazellulär die korrespondierende Säure als potenten 5 α R2 Hemmstoff freisetzen zu können. Der Test wurde durchgeführt wie bereits in Kapitel 4.4 beschrieben.

Abbildung III.25 zeigt, dass die prozentualen Werte für die Aufnahme der Säuren 3 und 10 in die Zellen (5,7 % und 9,9 %) sehr viel schlechter waren als die erhaltenen Werte für die korrespondierenden Ester bzw. Methylamide. Der Methylester 3a, der Ethylester 3b und der Chlor-substituierte Methylester 10a wurden jeweils zu etwa 20 % in die DU145 Zellen aufgenommen. Etwas besser noch schien das Methoxy-substituierte Methylamid mit einer Absorption von 23,3 % zu sein.

Die eventuell im Laufe eines Tests auftretende Hydrolyse der Ester 3a, 3b und 10a ebenso wie die des Methylamids ZS3a wurde ebenfalls untersucht. Dabei lagen alle Hydrolyseraten unter 1 %.

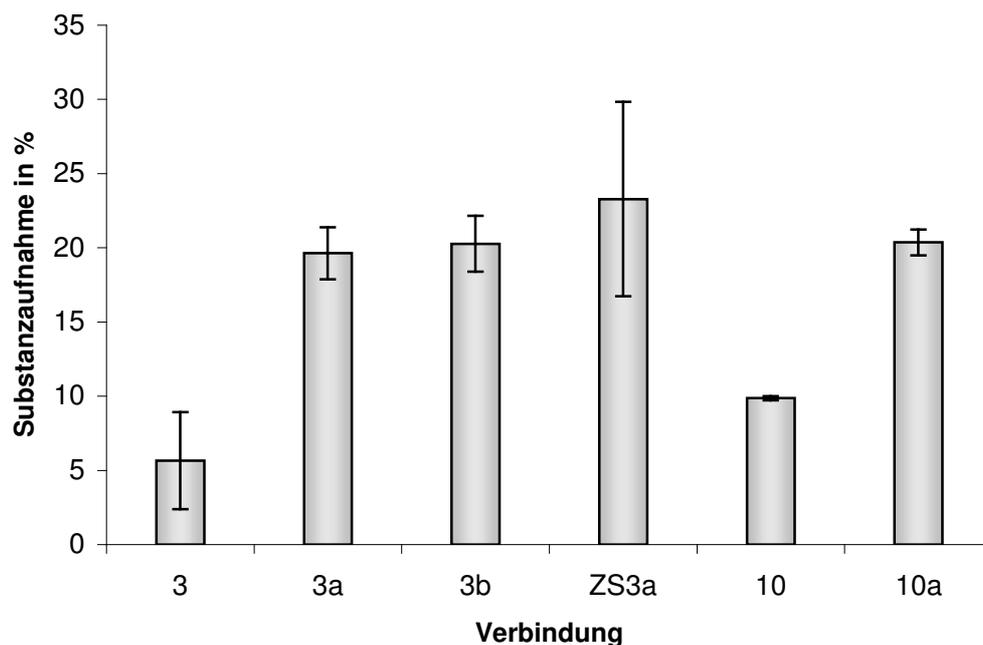
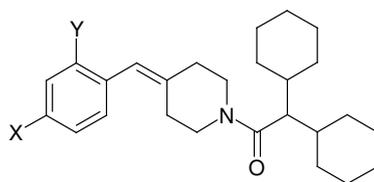


Abbildung III.25: Permeation in DU145 Zellen als Modell für die Targetzellen

Tabelle III.17: Hemmung der humanen 5 α R1 im DU145 Zellassay



Verbindung	X	Y	[IC ₅₀ [(μ M)] % Hemmung (10 μ M)]
3	COOH	OCH ₃	5,0
3a	COOCH ₃	OCH ₃	[0,434]
3b	COOCH ₂ CH ₃	OCH ₃	[0,656]
ZS3a	CONHCH ₃	OCH ₃	[0,395]
10	COOH	Cl	8,1
10a	COOCH ₃	Cl	[0,649]

Dass die ermittelten Permeationswerte kein Phänomen der Adsorption der Substanzen an der Zelloberfläche sind, sollte durch die Hemmung der Ester bzw. Methyamide an der 5 α R1 innerhalb der DU145 Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden die IC₅₀-Werte der Verbindungen 3a, 3b, ZS3a und 10a im DU145 Zellassay bestimmt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle III.17 angegeben.

Die Carbonsäuren 3 und 10 stellten an intakten DU145 Zellen wie erwartet schlechte Inhibitoren dar. Das kann mit der geringen Hemmung der Säuren am freien Isoenzym 1 und zusätzlich noch mit der schlechten Permeation in die Targetzellen begründet werden.

Alle Ester zeigten eine gute Hemmung der 5 α R1 mit IC₅₀-Werten von 434 nM für den Methylester 3a bis hin zu 656 nM für den entsprechenden Ethylester 3b. Den potentesten Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 395 nM stellt das Methylamid ZS3a dar. Die im DU145 Zelltest ermittelten IC₅₀-Werte zeigten dieselbe Tendenz wie die am freien Isoenzym 1 (HEK-I Homogenatassay) bestimmten Werte, nur dass letztere um etwa den Faktor 1,6 niedriger waren. Das könnte an der in Kapitel 4.3 bereits diskutierten unterschiedlichen Enzymausstattung der beiden Zelllinien liegen.

5.3.6 Bewertung der Untersuchungen auf Stabilität und Permeation

Drei katalytische Funktionalitäten sind praktisch allen hydrolysierenden Enzymen gemeinsam. Sie besitzen eine elektrophile Komponente, die die Carbonyl-Gruppe des Substrates polarisiert und außerdem ein Nucleophil, das das Carbonyl-C-Atom angreift. Zusätzlich wird noch ein Protonen-Donator benötigt, der die Alkoholat-Funktion in eine bessere Abgangsgruppe verwandelt. Trotz dieser Ähnlichkeiten sind Hydrolasen sehr unterschiedlich in der Umsetzung ihrer Substrate.

Die getesteten Ester bzw. Methyamide besaßen trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit sehr unterschiedliche Hydrolyseeigenschaften. Aufgrund der starken Hydrolyseraten in Puffer, Plasma und auch Caco-Homogenat wären die Verbindungen 5a – 7a und FP13a - FP18a als Hybridhemmstoffe *in vivo* wohl nicht einsetzbar. Im Vergleich zu den Substanzen mit CH₂(Cyclohexyl)₂-Rest schienen generell die Methylester mit CH₂(Phenyl)₂-Rest (FP13a, FP14a) und 1-Adamantyl-Rest (FP18a) von Esterasen des Plasmas, der Prostata und des GIT leichter gespalten zu werden. Das könnte an

der höheren Lipophilie des $\text{CH}_2(\text{Cyclohexyl})_2$ -Restes liegen. Zwar gilt allgemein für Plasma-Esterasen und Carboxylesterasen, dass die Affinität eines Substrates mit der Lipophilie zunimmt, aber diese Aussage stimmt nur bis zu einem gewissen Punkt. Ist ein bestimmtes Lipophilie-Maximum überschritten, dann sinkt die Substrataffinität wieder. Das könnte also auch die Erklärung für die bessere Stabilität der Substanzen mit $\text{CH}_2(\text{Cyclohexyl})_2$ -Rest sein.

Bei Studien mit Nicotinsäure-Estern stellte sich heraus, dass sowohl für die Affinität zu Carboxylesterasen als auch zu Plasma-Esterasen allgemein die Lipophilie des Ester-Restes und ebenso die Größe dieses Restes eine wichtige Rolle spielt.¹⁴⁵ Dabei konnte allgemein festgestellt werden, dass mit steigender Lipophilie des Ester-Restes die Affinität des Substrates und damit auch die Hydrolyse zunimmt (bis zu einem gewissen Grad). Betrachtet man nun die Reihe der homologen Ester 3a – 3f, so konnte allerdings fast kein Unterschied bei der Hydrolyse durch Plasma-Enzyme beobachtet werden. Die Ester wurden kaum hydrolysiert. In Caco-Zellhomogenat nahm sogar die Stabilität mit zunehmender Länge der Esterkette (und damit steigender Lipophilie) noch zu. Das könnte ebenfalls wieder daran liegen, dass das Lipophilie-Maximum für diese Substanzen überschritten ist. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei Hydrolasen der Prostata. Die stabilsten Ester waren diejenigen mit der längsten Esterkette (3d und 3f). Da der Isopropylester 3d ebenso wie der Isobutylester 3f in BPH-Gewebe weniger hydrolysiert wurden als in Plasma, eigneten sich diese Ester ebenfalls nicht zum Einsatz als Hybridinhibitoren.

Methylamide und Methylester sind sich strukturell sehr ähnlich. Beide Substanzklassen werden oft von denselben Enzymen hydrolysiert. Dabei kann allgemein festgestellt werden, dass Amide langsamer gespalten werden als die entsprechenden Ester. Die höhere Stabilität der Amid-Bindung lässt sich damit erklären, dass sie aufgrund der geringeren Elektronegativität des Stickstoffes weniger stark polarisiert ist im Vergleich zu einer Ester-Bindung. Diese höhere Stabilität zeigten auch die Methylamide ZS1a und ZS3a, die weder in Puffer oder Plasma noch im Target-Gewebe gegenüber Prostata-Esterasen einer Hydrolyse unterlagen. Nach 24 h in Caco-Zellhomogenat war für die Methylamide jedoch eine Spaltung von ca. 65 % zu beobachten, was zeigte, dass die Ausstattung mit hydrolytischen Enzymen in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich sein kann. Trotz des ähnlichen Hydrolysemechanismus solcher Enzyme besitzen diese große Unterschiede, was die Substratspezifität anbelangt. Aufgrund der fehlenden Labilität

gegenüber Prostata-Esterasen erfüllten die Methylamide ZS1a und ZS3a nicht alle notwendigen Voraussetzungen für gute Hybridhemmstoffe.

Elektronenziehende Substituenten in Nähe der Ester-Gruppe sollten die Hydrolyse wesentlich beschleunigen, weil durch diesen Effekt eine Erniedrigung der Elektronendichte am Carbonyl-Kohlenstoff erfolgt und dieser somit anfälliger für einen nucleophilen Angriff wird. Also sollten die Verbindungen 10a und 11a mit Cl- und Br-Substituent in meta-Position zur Ester-Gruppe stärker hydrolyse-empfindlich sein verglichen mit dem entsprechenden Methoxy-substituierten Methylester 3a. Die experimentellen Ergebnisse konnten diese Theorie aber nicht belegen, da die Verbindungen 10a und 11a generell stabiler waren als der Methylester 3a. Zur Erklärung könnte wieder die Erhöhung der Gesamtlipophilie der Substanzen herangezogen werden, die durch Substitution des Methoxy-Restes mit einem Cl- oder Br-Rest noch erhöht wird. Da für die hydrolysierenden Enzyme das Lipophilie-Maximum der Substrate schon überschritten wäre, würde die Affinität und damit die Hydrolyse mit weiterer Steigerung der Lipophilie immer mehr abnehmen.

Ester und Methylamide, die als Hemmstoffe der $5\alpha R1$ identifiziert wurden und deren korrespondierende Säuren potente $5\alpha R2$ Inhibitoren darstellten, wurden in diesem Kapitel auf ihre weitere Eignung, als Hybridhemmstoffe zu agieren, untersucht. Dabei sollten die Verbindungen ein gutes Stabilitäts-/Labilitätsverhältnis aufweisen: einerseits stabil in menschlichem Plasma und gegen intestinale Esterasen aus Caco-Homogenat, andererseits labil gegen Esterasen der Prostata aus BPH-Gewebehomogenat. Von den untersuchten Verbindungen wiesen die Ester 3a und 3b, ebenso wie 10a und 11a die beste Balance zwischen Stabilität und Hydrolyse auf. Sie waren sehr stabil in humanem Plasma und gegenüber intestinalen Hydrolasen. Man kann also annehmen, dass sie während der Absorption und Distribution im menschlichen Körper ebenfalls stabil sind und damit in der Lage, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommende $5\alpha R1$ zu hemmen. Der Permeationsassay in DU145 Zellen zeigte, dass die Substanzen nach Erreichen der Prostata gut in die Targetzellen eindringen können. In diesem Zielgewebe konnte für alle Ester (3a, 3b, 10a, 11a) eine gute Hydrolyserate zur korrespondierenden Säure beobachtet werden (getestet an BPH-Gewebehomogenat, verglichen mit Plasma).

So kann weiter angenommen werden, dass die entstandene Carbonsäure intrazellulär als potenter 5 α R2 Hemmstoff wirken kann.

6. In vivo Untersuchungen an Ratten

Zum Beweis, dass ein Hemmkonzept funktioniert, müssen die *in vitro* potenten Inhibitoren eine ebensolche Wirkung *in vivo* zeigen. Neben der Pharmakodynamik eines potentiellen Arzneistoffs, die *in vitro* sehr gut bestimmt werden kann, spielen im lebenden Organismus auch eine große Zahl von pharmakokinetischen Effekten eine Rolle. Trotz der Existenz einer Vielzahl von *in vitro* Methoden zur Vorhersage der pharmakokinetischen Eigenschaften einer Substanz, ist die Testung am Tiermodell im Sinne eines "Proof of Concept" unumgänglich.

Das neuartige Hybridkonzept zur Hemmung der 5 α R Isoenzyme sollte deshalb auf seine Tauglichkeit *in vivo* überprüft werden. Dabei sollte die Überlegenheit der Applikation eines Esters im Vergleich zur Gabe eines 5 α R2 selektiven Hemmstoffes bewiesen werden.

Nach Verabreichung eines Esters als Hybridhemmstoff müsste dieser eine gute orale Bioverfügbarkeit zeigen. Während der Distribution im Organismus muss der Ester stabil sein gegen enzymatische Hydrolyse und eine günstige Halbwertszeit aufweisen. Bei ausreichender metabolischer Stabilität wäre er dann in der Lage, die 5 α R1 in der Peripherie zu hemmen. Nachdem er schließlich das Target-Organ, die Prostata, erreicht hat, sollte er auch hier gut die Zellmembran überwinden können, um dann intrazellulär in die korrespondierende Säure gespalten zu werden, die wiederum die 5 α R2 selektiv hemmen könnte.

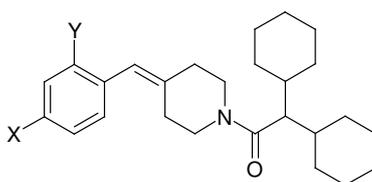
6.1 In vitro Hemmung der 5 α R Isoenzyme der Ratte

Da bei den Isoenzymen von Ratte und Mensch Speziesunterschiede bestehen, sollte vor der Durchführung eines *in vivo* Tests in der Ratte die Hemmwirkung der Ausgangssubstanzen 1 / 1a – 3 / 3a *in vitro* überprüft werden. Die Versuche wurden nach der Methode von Liang et. al. mit leichten Modifizierungen durchgeführt.⁶³ Zur Testung der Hemmwerte an den Isoenzymen 1 und 2 wurde eine Mikrosomenaufarbeitung aus ventraler Rattenprostata verwendet. Dieses Gewebe enthielt beide Isoenzyme, so dass die Selektivität nur durch Einstellung der pH-Optima des jeweiligen Isoenzym erreicht werden konnte. Für den RVP1 Test wurde Phosphat-Puffer (pH 6,6) und für den RVP2 Assay Citrat-Puffer (pH 5,5) verwendet.

Neben der Enzymsuspension wurde dem Reaktionsansatz auch NADPH als Cofaktor und das Substrat Testosteron zugesetzt. Die Hemmwerte wurden in Bezug zu ungehemmten Kontrollen bestimmt.

Die in Tabelle III.18 dargestellten prozentualen Hemmwerte sind in den RVP1 und RVP2 Assays bei Inhibitorkonzentrationen von 10 μM ermittelt worden. Für potentere Hemmstoffe sind zusätzlich die IC_{50} -Werte angegeben.

Tabelle III.18: *In vitro* Hemmung der $5\alpha\text{R}$ Isoenzyme der Ratte



Verbindung	X	Y	$[\text{IC}_{50} [(\mu\text{M})]$ % Hemmung (10 μM)	
			RVP1 5 αR1	RVP2 5 αR2
1	COOH	H	65	[0,08]
1a	COOCH ₃	H	34	10
2	COOH	F	68	[3,0]
2a	COOCH ₃	F	30	9
3	COOH	OCH ₃	50	43
3a	COOCH ₃	OCH ₃	11	4

Die Carbonsäuren 1 – 3 zeigten wie erhofft am Isoenzym 2 gute Hemmwerte. Die Verbindung 1 war mit einem IC_{50} -Wert von 80 nM der potenteste $5\alpha\text{R2}$ Inhibitor, wobei dieser Wert im Vergleich zum humanen Enzym (siehe Tabelle III.10) um Faktor 16 schlechter war. Ein zusätzlicher Unterschied zum humanen Enzym bestand darin, dass sich die Verbindung 1 als wesentlich potenter herausstellte als die Fluor-substituierte Säure 2 mit einem IC_{50} -Wert von 3 μM . Auch an Isoenzym 2 konnten für die Carbonsäuren Hemmwerte von 50 % bis 68 % gefunden werden, so

dass für die Verbindungen 1 und 2 eine schwache duale Hemmung angenommen werden konnte. Die Säure 3 war im Vergleich zu den Verbindungen 1 und 2 der schwächste Hemmstoff und zeigte eine geringe duale Inhibition an beiden Isoenzymen, wobei die Werte für die 5 α R1 (50 % Hemmung bei 10 μ M) sogar noch etwas besser waren als an der 5 α R2 (43 % Hemmung bei 10 μ M).

Im Gegensatz zu den wirksamen Säuren waren alle Methylester 1a – 3a sowohl für Isoenzym 2 als auch für Isoenzym 1 schlechte Inhibitoren. Der beste Hemmwert mit 34 % für die 5 α R1 konnte für Verbindung 1a gefunden werden.

Da *in vitro* am 5 α R1 Enzym der Ratte kaum eine Hemmwirkung der Ester festgestellt werden konnte, konnte hier das Prinzip der Hybridhemmung nicht zum Tragen kommen. Deshalb war die Ratte kein geeignetes Tiermodell, um die überlegene Hemmwirkung der humanen Hybridinhibitoren im Vergleich zu Typ 2 Inhibitoren zu zeigen.

6.2 In vitro Experimente zur Stabilität von Methylester 1a

Obwohl die Ratte aufgrund der fehlenden Hemmung der Ester am Isoenzym 1 kein geeignetes Modell darstellte, um die überlegene Hemmwirkung der humanen Hybridinhibitoren im Vergleich zu Typ 2 Inhibitoren zu zeigen, könnte sie aber durchaus als Modell für pharmakokinetische Studien genutzt werden. Bei ausreichender Stabilität in Rattenplasma (*in vitro*) wäre die Bestimmung der Plasmahalbwertszeiten von Ester und Säure *in vivo* gut geeignet, um die Überlegenheit des Hybridinhibitor-Konzepts zu beweisen. Bei ausreichender Plasma-Stabilität der Ester und einer guten Hydrolyserate zur Säure in der Prostata müsste bei übertragbaren Werten auf den Menschen die Applikation des Esters als Hybridinhibitor der Applikation der Säure als selektiver Typ 2 Inhibitor in der Wirkung überlegen sein. Denn der Ester hat am humanen Typ 1 Enzym eine zusätzliche Wirkung.

Deshalb wurden Vorversuche in Plasma und Prostatagewebe-Homogenat der Ratte durchgeführt. Zur Stabilitätsprüfung wurde hierbei exemplarisch der Methylester 1a ausgewählt.

Das Ratten-Plasma wurde aus Citratblut von unbehandelten Kontrollratten durch anschließende Zentrifugation gewonnen (durchgeführt von der Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken). Das schockgefrorene Plasma wurde vor der Durchführung eines Stabilitätstests mit PBS-Puffer auf 80 % verdünnt. Der Methylester 1a wurde einer Endkonzentration von 20 μM eingesetzt und mit dem Plasma bei 37 °C inkubiert. Die Hydrolyse-Reaktion wurde nach ausgewählten Zeitpunkten durch Zugabe von 0,1 N HCl in Acetonitril gestoppt. Die eingedampften Proben wurden nach Resuspendierung in Methanol mittels HPLC-MS/MS vermessen.

Die Gesamtesterase-Aktivität wurde ebenso wie die Proteinkonzentration jeweils vor einem Stabilitätstest bestimmt.

Die Aufarbeitung der Ratten-Prostata erfolgte wie in Kapitel VIII.2.5 beschrieben und der Stabilitätstest analog zu dem in Ratten-Plasma. Es wurden ebenfalls die Gesamtesterase-Aktivität mittels PNPA und die Proteinkonzentration nach Bradford zur Angabe der spezifischen Aktivität bestimmt.

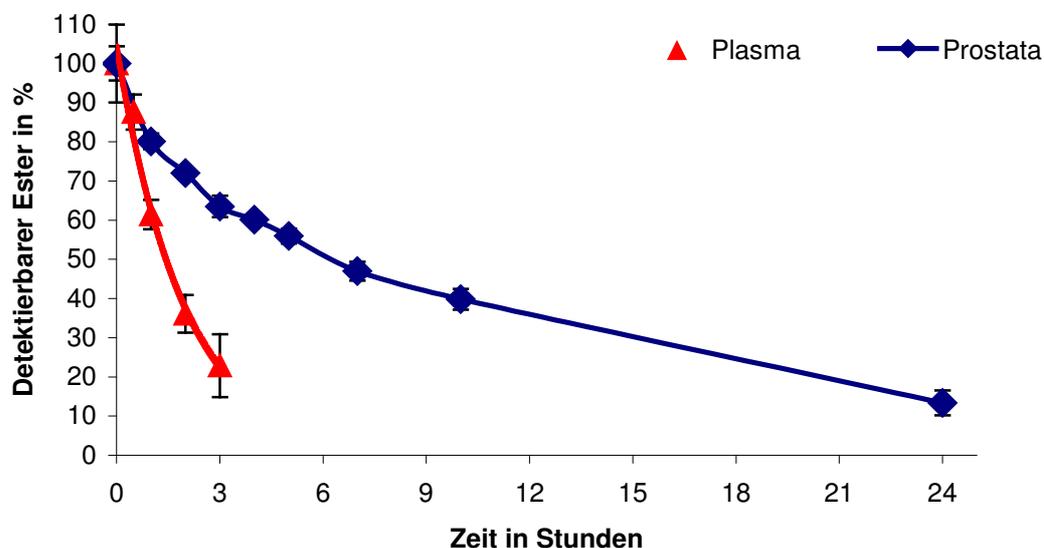


Abbildung III.26: Stabilität von Methylester 1a in Plasma und Prostata-Homogenat der Ratte

Die spezifische Aktivität von Plasma betrug 9 nmol / min / mg Protein und war damit etwa genauso groß wie die in Prostata-Homogenat bestimmte spezifische Aktivität von 10 nmol / min / mg Protein. Die ermittelten Stabilitätsdaten von Methylester 1a konnten also direkt miteinander verglichen werden.

Die in Abbildung III.26 dargestellten Kurven geben die enzymatische Spaltung des Esters 1a über die Zeit in Plasma und Prostata-Homogenat an. Anhand der erhaltenen Hydrolysekurven konnten die *in vitro* Halbwertszeiten für Verbindung 1a in beiden Medien abgeschätzt werden. Für Ratten-Plasma ergab sich eine Halbwertszeit von ungefähr 1,5 h und in Prostata-Homogenat eine von 6,9 h. Die Hydrolyse durch Plasma-Enzyme erfolgte also sehr viel schneller als durch Esterasen der Prostata, so dass die Ratte auch als Modell für pharmakokinetische Studien nicht unbedingt vorteilhaft schien.

6.3 In vivo Hemmaktivität in der Ratte

Anhand der experimentell bestimmten *in vitro* Stabilitätsdaten und der bereits vorhandenen *in vivo* Hemmdaten von Methylester 1a und der korrespondierenden Säure 1 an der Ratte sollte dennoch versucht werden, einen indirekten Beweis für die Überlegenheit der Hybridinhibitoren zu finden. Dabei konnte auf bereits vorhandene *in vivo* Daten in der Ratte zurückgegriffen werden.¹¹¹

Der *in vivo* Assay erfolgte nach der Methode von Häusler et. al.⁷⁹ Für den Versuch wurden 21 Tage alte männliche Ratten orchietomiert. Jede Versuchsgruppe bestand aus 7 Ratten. Testosteronpropionat (1 mg / kg) wurde als Substrat der 5 α R in einer öligen Suspension einmal täglich über 4 Tage subcutan appliziert. Als Messparameter diente hierbei die durch Dihydrotestosteron vermittelte Zunahme des Prostatagewichts im Vergleich zur Vehikel-behandelten (nur Olivenöl), kastrierten Kontrollgruppe. Durch Behandlung mit einem 5 α R Inhibitor kann dieser Effekt dosisabhängig unterdrückt werden. Die zu testenden Hemmstoffe und Finasterid als Referenzsubstanz wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit Testosteronpropionat (1 mg / kg) separat verabreicht. Dabei wurde entweder eine perorale (po) oder eine subcutane (sc) Applikationsroute gewählt.

24 h nach der letzten Behandlung wurden die Ratten getötet und die ventrale Prostata entnommen. Von Fettgewebe befreit und trockengetupft wurde das

Prostatafeuchtgewicht bestimmt und auf 100 g Körpergewicht normiert. Nach Subtraktion der Prostatagewichte der unstimulierten Kontrollen wurden die Prostatagewichte auf die Testosteronpropionat-behandelten Kontrollen bezogen. Die Signifikanz der Reduktion der Prostatagewichte der Behandlungsgruppen wurde verglichen mit den Androgen-stimulierten Kontrollen anhand des Dunnett's Test bestimmt.

Tabelle III.19: In vivo Aktivitäten des Methylesters 1a und seiner korrespondierenden Säure 1 an Ratten

Behandlung	In vivo		
	Dosis	Prostatagewicht MW ± SD	% Hemmung
Vehicle (nicht kastriert)		57,4 ± 7,9	
Vehicle (kastriert)		13,7 ± 1,9	
Testosteron-Propionat (Tp), sc	1	41,6 ± 1,9 [#]	
1, po	11,3	31,6 ± 1,7 *	36
1, sc	11,3	27,9 ± 1,2 **	49
1a, sc	11,7	32,1 ± 2,9 *	34
Finasterid, sc	1	20,5 ± 1,5 **	76

Signifikanzberechnungen nach Dunnett's Test :

P < 0,001: Vehikel – behandelte, kastrierte Kontrollgruppe als Referenz verwendet

* P < 0,05: Testosteronpropionat – behandelte Ratten als Referenz verwendet

** P < 0,01: Testosteronpropionat – behandelte Ratten als Referenz verwendet

Wie Tabelle III.19 zeigt, waren die getesteten Verbindungen 1 und 1a in der Lage, die Testosteron induzierte Stimulation auf das Prostatagewicht zu reduzieren. Die Carbonsäure 1 war sowohl bei subcutaner Injektion als auch bei peroraler Applikation wirksam, wenn auch bei letzterer die Wirkung mit 36 % Hemmung etwas geringer ausfiel. Auch die Gabe des Ester 1a führte mit 34 % zu einer signifikanten Hemmung, die nur auf seine Hydrolyse zur 5 α R2 aktiven Säure zurückzuführen sein

konnte, da der Ester selbst *in vitro* an den Isoenzymen der Ratte kaum Hemmung gezeigt hatte.

Die Substanzen konnten leider nicht die Potenz von Finasterid erreichen, das nur in einer 1/10 so hohen äquimolaren Konzentration wie die nicht-steroidalen Hemmstoffe verabreicht wurde.

6.4 Bewertung der *in vitro* / *in vivo* Ergebnisse

Die unterschiedlichen Hemmdaten an den 5α R Isoenzymen des Menschen und der Ratte konnten deutliche Speziesunterschiede zeigen, wie sie bereits aus Studien mit anderen Inhibitoren bekannt waren.¹¹⁸ Diese Unterschiede sind schon in der Identität der Aminosäuresequenz begründet, die für die 5α R1 von Mensch und Ratte gerade mal 60 % beträgt und für das Isoenzym 2 77 %. Diese Tatsache kann erklären, warum die Methylester am humanen 5α R1 Enzym potente Inhibitoren waren, wogegen sie am Rattenenzym 1 keine Wirkung zeigten.

Weitere Speziesunterschiede waren in der Ausstattung der Plasma-Enzyme zu finden. Es ist allgemein bekannt, dass humanes Plasma verglichen mit Ratten-Plasma viel weniger Esterasen enthält.^{130,146-148} Diese Tatsache wird auch durch die Ergebnisse der Stabilitätstests bestätigt. Obwohl die Methylester in menschlichem Plasma über 24 h lang hydrolyse-stabil waren, konnten in Ratten-Plasma nach etwa 90 min nur noch 50 % des Methylesters 1a nachgewiesen werden.

Mit den vorhandenen Daten konnte jedoch gezeigt werden, dass der Methylester 1a trotz relativ kurzer Halbwertszeit in Plasma verglichen mit der in Prostata-Homogenat nach Applikation einen ähnlich guten Effekt aufwies wie die Gabe der entsprechenden Carbonsäure 1. Dabei ist zu beachten, dass der Ester selbst keine zusätzliche Wirkung auf die 5α R1 der Ratte gezeigt hatte, sondern dass nur sein Hydrolyseprodukt wirken konnte (siehe Tabelle III.18). Das beweist, dass bei Applikation des Esters genug Säure im Target-Organ (Prostata) ankommen muss, um dort die 5α R2 zu hemmen. In menschlichem Plasma hingegen war die Halbwertszeit des Esters bedeutend höher als in humanem Prostata-Homogenat. Zusätzlich zeigte der Ester noch eine gute 5α R1 Wirkung am menschlichen Enzym. Deshalb ist theoretisch bei Applikation des Ester und einer damit verbundenen

zusätzlichen Hemmung der 5 α R1 in der Peripherie, beim Menschen eine bessere Wirkung zu erwarten als bei der Gabe der entsprechenden Säuren, die nur die 5 α R2 hemmen. Somit konnte indirekt doch noch ein Beweis für die bessere Hemmung der 5 α R Isoenzyme durch Hybridinhibitoren verglichen mit dem Einsatz von selektiven 5 α R2 Hemmstoffen erbracht werden.

IV. Diskussion

1. Das Hydridinhibitor-Konzept – Eine neue Strategie zur Hemmung der 5 α R1 und 5 α R2

Methylester-Prodrugs von potenten 5 α R2 Hemmstoffen mit Benzoessäure-Struktur (Verbindungen 1 – 3, siehe Tabelle III.1) wurden zur besseren Zellpermeation hergestellt. Diese Ester (Verbindungen 1a – 3a, siehe Tabelle III.1) konnten auch tatsächlich die Zellmembran von DU145 Zellen besser überwinden als die entsprechenden Säuren¹²⁵ und zeigten im Zellassay eine gute Hemmung gegenüber der 5 α R1. Um Permeationseinflüsse bei der Bestimmung der Hemmaktivität gegenüber des Isoenzym 1 zu vermeiden, wurde analog zum BPH-Mikrosomentest für die 5 α R2 ein zellfreier Assay mit DU145 Zellen entwickelt. Hier konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Ester selbst eine 5 α R1 Hemmung am freien Enzym aufwiesen. Ausgehend von diesen Hemmdaten konnte nun ein völlig neues Konzept zur Hemmung der 5 α R1 und 5 α R2 entwickelt werden. Da es sich bei Ester und Säure um keine echten dualen Hemmstoffe handelt und hier eine besondere Art der dualen Inhibition beider Isoenzyme vorliegt, wurde dieses Phänomen Hybridhemmung genannt.

Für gute Hybridhemmstoffe sind neben hervorragenden Hemmwerten für 5 α R1 (Ester) und 5 α R2 (Säure) auch ein günstiges Stabilitäts - / Labilitätsverhältnis des Esters Voraussetzung. Abbildung IV.1 zeigt schematisch den Weg des Esters durch den menschlichen Körper nach seiner Applikation. Der Ester muss als Inhibitor und auch als Precursor für die entsprechende Säure eine gute Zellpermeation aufweisen, um überhaupt absorbiert zu werden. Dabei muss er ausreichend hydrolysestabil gegen intestinale Enzyme sein, um eine Magen-Darm-Passage zu überstehen. Während der anschließenden Verteilung über die Blutbahn muss der Ester stabil gegen Hydrolasen sein, damit er die 5 α R1, die ubiquitär im Menschen vorkommt, auch hemmen kann. Letztlich soll der Ester dann das Target-Organ erreichen und dort gut von den Zellen aufgenommen werden, um dann von Enzymen der Prostata hydrolysiert zu werden und intrazellulär seinen aktiven Metaboliten freizusetzen. Die korrespondierende Säure muss dann als potenter Hemmstoff selektiv die 5 α R2

hemmen. So ist es möglich, beide 5 α R Isoenzyme durch die Gabe einer Substanz zu hemmen.

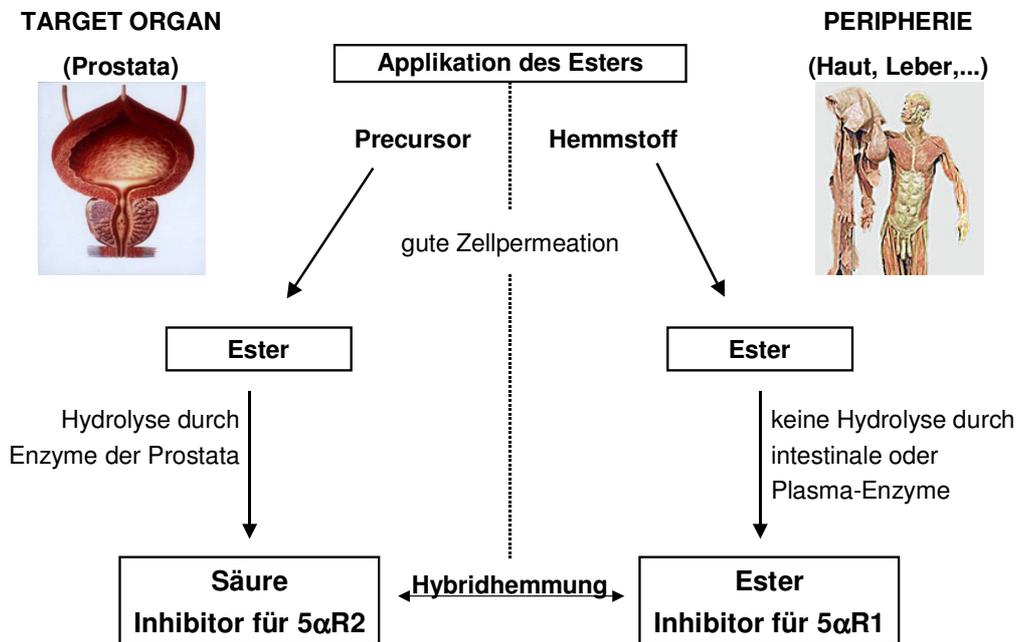


Abbildung IV.1: Konzept zur Hybridhemmung der 5 α R Isoenzyme

Mittel der Wahl zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie sind 5 α R-Hemmstoffe. Auf dem Arzneimittelmarkt sind bislang nur 2 Medikamente mit steroidaler Struktur zugelassen. Finasterid (Proscar[®]) ist ein selektiver 5 α R2 Hemmstoff und wird seit 1999 zur Behandlung der BPH in einer Dosis von 5 mg pro Tag eingesetzt. In dieser Konzentration ist der Hemmstoff in der Lage, die DHT-Konzentration im Serum um ca. 70 % zu senken.²² Dutasterid (Avodart[®]) wird in einer etwa 11-fach niedrigeren Dosis eingesetzt und kann bei einer Gabe von 0,5 mg pro Tag die Serum-DHT-Konzentration um etwa 94 % senken.^{25,69} Im Vergleich zu Finasterid handelt es sich also um einen potenteren Arzneistoff, weil Dutasterid als dualer Inhibitor beide Isoenzyme der 5 α R hemmen kann. Eine neuere Studie, bei der ein direkter *in vitro* Vergleich zwischen Finasterid und Dutasterid stattfand, zeigte ebenfalls die generelle Überlegenheit des dualen Hemmstoffs.²⁶ Bei beiden steroidalern Hemmstoffen, Finasterid und Dutasterid, sind häufig vorkommende

Nebenwirkungen Impotenz und veränderte Libido, neben gelegentlich auftretenden Ejakulationsstörungen und Gynäkomastie. Diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen könnten mitunter auf die steroidale Struktur zurückzuführen sein. Obwohl für Finasterid keinerlei Affinität zum Androgen-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass es an einen anderen Rezeptor der Steroid-Familie bindet. Bisher ist es allerdings nicht gelungen duale, nicht-steroidale Hemmstoffe der 5 α R Isoenzyme bis zur Marktreife zu entwickeln.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass durchaus noch Bedarf an der Entwicklung von neuen dualen 5 α R Inhibitoren besteht, die beide Isoenzyme hemmen können und keine Steroid-Struktur aufweisen. Die neu entdeckten Hybridhemmstoffe sind auf besondere Art und Weise in der Lage, beide Isoenzyme nach Applikation einer Substanz zu hemmen. Aufgrund ihrer nicht-steroidalen Struktur sind in dieser Hinsicht auch weniger unerwünschte Wirkungen zu erwarten.

Gängige Strategien zur Hemmung beider 5 α R Isoenzyme sind der Einsatz von dualen Hemmstoffen oder die Kombination von selektivem 5 α R1 mit selektivem 5 α R2 Inhibitor. Der Einsatz von Hybridhemmstoffen stellt eine spezielle Art der dualen Hemmung dar und könnte so gegenüber diesen Methoden den Vorteil eines einfachen Dosierungsschemas und einer prinzipiell geringeren Nebenwirkungsrate besitzen. Bei Verabreichung zweier Substanzen in Kombination muss im Gegensatz zu Hybridhemmstoffen für jede Substanz ein eigenes Dosierungsschema gefunden werden, was eindeutig die Compliance erschwert. Da die erste Wirkform der Hybridhemmstoffe in die zweite umwandelt wird und so der Metabolit ebenfalls aktiv ist, kommt man mit niedrigeren Dosen aus, was sich auf das potentielle Nebenwirkungsprofil günstig auswirken kann.

2. Hemmung der 5 α R Isoenzyme durch Hybridinhibitoren

Die sogenannte Hybridhemmung der 5 α R Isoenzyme stellt eine besondere Art der dualen Hemmung dar, wobei der Ester (oder auch das Methylamid) ein potenter und selektiver 5 α R1 Hemmstoff ist und zusätzlich nach Hydrolyse die korrespondierende Carbonsäure als hoch potenter und selektiver 5 α R2 Inhibitor wirken kann.

Betrachtet man nun den hypothetischen Mechanismus, der für die 5 α R Isoenzyme beschrieben ist, so kann damit nur die Hemmwirkung der Carbonsäuren und nicht die der Ester erklärt werden. Wie in Kapitel 1.1.2 ausführlicher erklärt, beschrieb Li. et. al. den katalytischen Prozess des Enzyms als Aktivierung eines Enons (wie bei Testosteron) durch einen elektrophilen Rest (E^+ , positiv geladene Gruppe) im aktiven Zentrum. Die vorliegenden Carbonsäuren sind als Mimetika dieses Enolat-Intermediates entwickelt. So kann es zu einer starken Interaktion zwischen E^+ im aktiven Zentrum und der bei physiologischem pH-Wert deprotonierten Säure-Gruppe kommen. Bei den entsprechenden Estern ist die Entstehung eines solchen Carboxylat-Anions jedoch nicht möglich, so dass deren Hemmaktivität anhand dieses Mechanismus nicht erklärt werden kann.

Eine Arbeit von Hartmann et al. unterstreicht anhand der durchgeführten QSAR-Untersuchungen mit steroidalen und nicht steroidalen Hemmstoffen die Ähnlichkeit zwischen den Bindungstaschen der beiden humanen Isoenzyme.¹⁴⁹ Es wurden lediglich kleinere Unterschiede in der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen der Seitenketten beschrieben, so dass auch hier keine Erklärung für die Hemmung und Selektivität der Ester zu finden ist.

Faragalla et. al. beschrieb in einem Pharmakophor-Modell die Eigenschaften für nicht-steroidale Inhibitoren der humanen 5 α R Isoenzyme. Dazu wurden 15 Hemmstoffe für Isoenzym 1 untersucht und 46 Inhibitoren der 5 α R2. In den meisten Fällen wurde für 5 α R2 Hemmstoffe neben anderen Eigenschaften eine negativ ionisierbare Gruppe gefordert, wie sie bei den Hemmstoffen mit Carbonsäure-Gruppe vorliegt. Für 5 α R1 Inhibitoren wurde diese Eigenschaft jedoch nicht gefordert. Das Pharmakophor-Modell für das Isoenzym 1 beschrieb lediglich einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor, eine hydrophobe und eine hydrophobe-aromatische Funktion für entsprechende Hemmstoffe. Die Autoren beschrieben dieses letzte Modell allerdings nur als ein qualitatives Pharmakophor und nicht als quantitativ, weil

die resultierenden Kosten der "sixth scoring hypothesis" bei -14 lagen und sich nur eine Korrelation von 0,72 ergab.

Bei den Hybridinhibitoren wird die Selektivität zwischen den beiden Isoenzymen der 5 α R nur durch die Veresterung der Carbonsäure, also durch Einführung einer zusätzlichen CH₃-Gruppe, erreicht. Durch diese Veresterung werden natürlich die elektronischen Eigenschaften des Moleküls stark verändert. Die Carbonsäure kann bei physiologischem pH-Wert leicht deprotoniert werden und es kann eine negative Ladung entstehen, was bei dem entsprechenden Ester so nicht mehr funktioniert. Dass Selektivität durch Zufügen oder Weglassen einer kleinen Gruppe zustande kommen kann, kann durch weitere Beispiele belegt werden. Am interessantesten war jedoch eine ähnliche Beobachtung bei den von Baston et. al. publizierten 1*H*-Chinolin-2-onen (siehe Abbildung IV.2).¹¹⁴

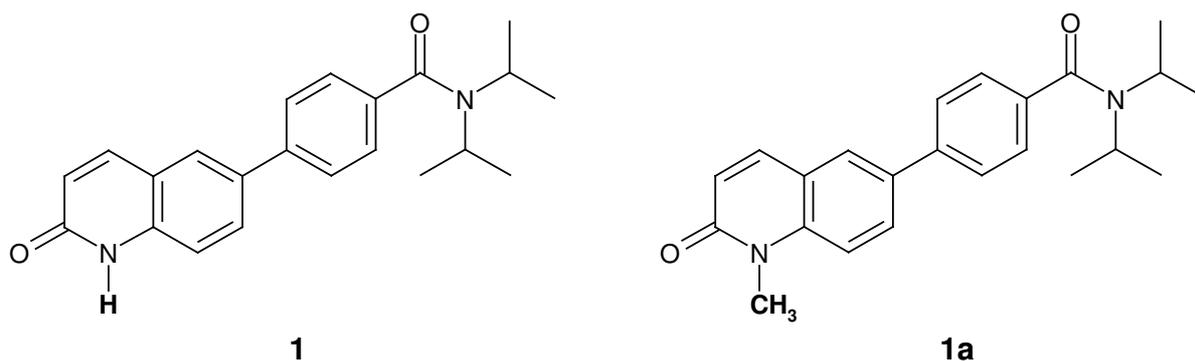


Abbildung IV.2: Substituierte 1*H*-Chinolin-2-one als 5 α R Hemmstoffe

Verbindung 1 zeigte im BPH-Mikrosomenassay einen IC₅₀-Wert von 1,7 μ M und fast keine Hemmung (27 %) im DU145 Assay bei einer Konzentration von 10 μ M. Es handelte sich also um einen selektiven 5 α R2 Inhibitor. Das methylierte 1*H*-Chinolin-2-on 1a dagegen wies im DU145 Zellassay einen IC₅₀-Wert von 510 nM auf und keine Hemmung gegenüber der 5 α R2. Damit ergab sich also ein ähnliches Hemmprofil wie bei den neu entdeckten Hybridhemmstoffen, bei denen der Carbonsäureester selektiv die 5 α R1 und die entsprechenden Säure selektiv die 5 α R2 hemmen. Allerdings kann das 1*H*-Chinolin-2-one 1a nicht so leicht durch einfache Hydrolyse in die korrespondierende Verbindung 1 umgewandelt werden, so

dass hier keine Hybridhemmstoffe vorliegen. Dieses Beispiel zeigt aber deutlich, wie sich durch Veränderung der elektronischen Eigenschaften eines Hemmstoffs Selektivität für die 5 α R Isoenzyme erreichen lässt. Verbindung 1, die bei physiologischem pH-Wert deprotoniert werden kann und so eine höhere Elektronendichte am Carbonyl-Sauerstoff besitzt, ist ein selektiver Inhibitor für die 5 α R2, weil hier stärkere Wechselwirkungen zwischen dem elektrophilen Rest im aktiven Zentrum des Enzyms und der negativen Ladung des Moleküls stattfinden können (ebenso wie bei den Carbonsäuren der Hybridinhibitoren). Durch Methylierung des Stickstoffs kommt es zu einer Änderung dieser elektronischen Eigenschaften und einer gleichzeitigen Erhöhung der Lipophilie, was insgesamt zu einem Wirkungsverlust am Isoenzym 2 und im Gegensatz dazu zu einer Hemmung der 5 α R1 führt. Die Methyl-Gruppe ist somit essentiell für die 5 α R1 Hemmaktivität der vorliegenden Hemmstoffe.

Um eine Erklärung zu finden, warum die Ester am Isoenzym 1 aktiv sind, wäre die Entwicklung eines Pharmakophor-Modells unter Einbeziehung dieser Hybridhemmstoffe interessant. Vielleicht könnte so auch das Zustandekommen der Selektivität zwischen den beiden Isoenzymen durch eine CH₃-Gruppe besser gedeutet werden.

3. Bewertung der Teststrategie

Zur *in vitro* Identifizierung von Hybridhemmstoffen wurde ein umfangreiches Testsystem entwickelt, das neben der Untersuchung auf Hemmaktivität an den 5 α R Isoenzymen auch Stabilitäts- und Permeationsassays beinhaltet. Das in Abbildung IV.3 dargestellte Testschema bezieht sich lediglich auf die *in vitro* Testung an menschlichen Enzymen, Geweben und Zellen.

Der erste Schritt zur Auffindung neuer Hybridinhibitoren bestand in der Testung von Ester und Säure auf ihre Hemmaktivität an den 5 α R Isoenzymen. Um dabei jegliche Permeationseinflüsse auszuschließen und um die Hemmung an den freien Enzymen testen zu können, wurden 2 zellfreie Assays mittels der stabil transfizierten HEK-I und HEK-II Zelllinien entwickelt. Dabei wurde auf dieselbe Aufarbeitungsmethode, auf die Verwendung desselben Substrates und auf weitere identische Assaybedingungen Wert gelegt. Zur Testung standen immer genau definierte Zellhomogenate für die 5 α R1 und 5 α R2 zur Verfügung. Wenn sich dann eine Säure als potenter 5 α R2 Inhibitor und ihr korrespondierender Ester als 5 α R1 Hemmstoff herausstellten, musste der Ester auf seine Eignung als Inhibitor und gleichzeitiger Precursor untersucht werden. Vor der Durchführung von Stabilitätsuntersuchungen in verschiedenen biologischen Medien musste der Ester natürlich eine gute Stabilität in wässriger Lösung aufweisen, was anhand der Inkubation in PBS-Puffer bei 37 °C (pH 7,4) getestet wurde. Zur Überprüfung, ob der Ester eine Magen-Darm-Passage unbeschadet überstehen würde, wurde die Hydrolyserate in Caco-2-Zellhomogenat bestimmt. Die Carzinoma-Colon-Zelllinie Caco-2 wurde als Modell für den GIT herangezogen, wobei angenommen werden kann, dass eine Hydrolyserate von etwa 50 % nach 24 h Inkubation mit Zellhomogenat ausreichend ist, um eine Magen-Darm-Passage von etwa durchschnittlich 4 Stunden zu überstehen. Schließlich musste der Ester auch stabil während der Verteilung im menschlichen Körper sein, um die 5 α R1 in der Peripherie zu hemmen und das Target-Organ (Prostata) zu erreichen. Deshalb wurde Plasma von gesunden Probanden gewonnen und der Ester auf Hydrolysestabilität getestet. Wenn der Ester bis dahin genügend hohe Stabilität gezeigt hatte, war anzunehmen, dass er auch in der Prostata ankommen würde. Dort sollte er enzymatisch gespalten werden, um dann seinen 5 α R2 aktiven Metaboliten, also die Säure intrazellulär freizusetzen. Zur Labilitätsprüfung wurde Operationsgewebe von BPH-Patienten verwendet. Schließlich wurde anhand des

DU145 Permeationsassays noch überprüft, ob der Ester auch gut zellpermeabel ist und von den Prostatazellen aufgenommen werden kann. Dabei wurde die humane Prostatakrebs-Zelllinie DU145 als Modell herangezogen. Zur Verifizierung des DU145 Permeationstests wurden zusätzlich auch die 5 α R1 Hemmwerte der getesteten Ester an ganzen DU145 Zellen bestimmt, um zu zeigen, dass die erhaltenen Werte kein Phänomen der Oberflächenadsorption sind. Diese Teststrategie eignet sich bestens, potente Hybridinhibitoren zu identifizieren und erste Einschätzungen über ihre Kinetik *in vivo* zu treffen.

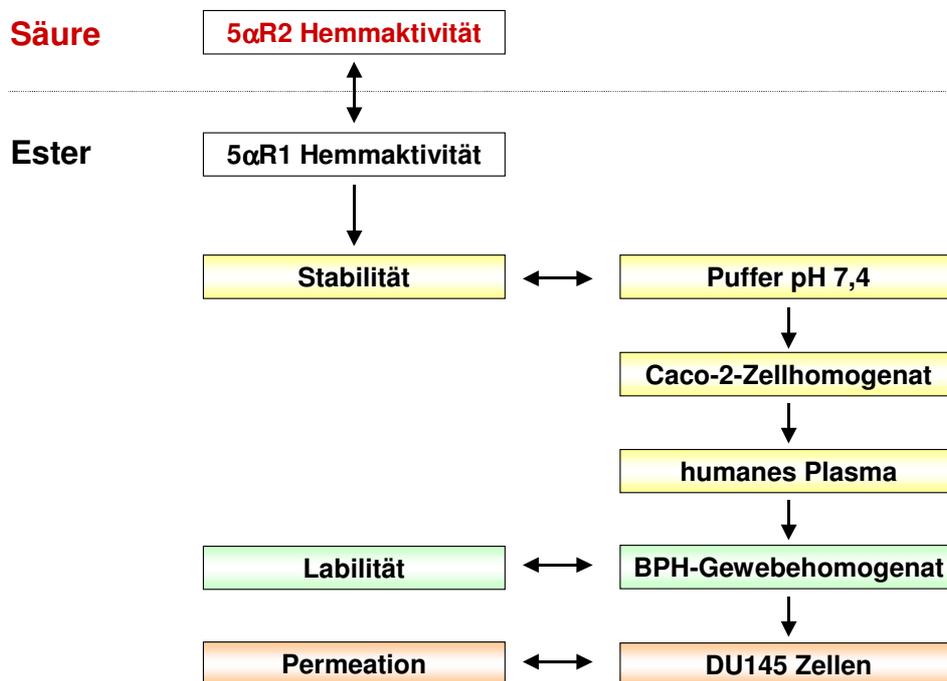


Abbildung IV.3: Testsystem zur Identifizierung potenter Hybridhemmstoffe

Durch Entwicklung der HEK-I und HEK-II zellfreien Tests ist es gelungen, 2 sehr gut vergleichbare und hoch durchsatzfähige Assays für 5 α R1 und 5 α R2 zu erhalten. Zur Testung wurde die gleiche, nach derselben Aufarbeitungsmethode gewonnene Enzymquelle verwendet und zusätzlich auch dasselbe Substrat AD eingesetzt. Bei den vorher verwendeten BPH-Mikrosomentests und den DU145 Mikrosomenassays wurden entsprechend Testosteron und Androstendion verwendet, was zum direkten Vergleich von Hemmwerten ungünstig ist, da die Affinitäten der beiden Substrate zu

den Isoenzymen nicht gleich sind. Außerdem können bei den HEK zellfreien Tests auf genau definierte und immer gleiche Zellen zurückgegriffen werden, was beim BPH-Mikrosomentest unmöglich ist, da immer individuelle Schwankungen der verschiedenen Patienten einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben können, genauso wie deren eventuelle Vorbehandlung mit 5 α R Inhibitoren. Außerdem werden im Gegensatz zu HEK-II Zellen in der humanen Prostata nicht nur das Isoenzym 2 exprimiert sondern auch in geringerem Maße 5 α R2, so dass folglich die BPH-Mikrosomenpräparation auch beide Isoformen enthielt. Diese Tatsache belegt auch die besseren Hemmwerte der 5 α R2 selektiven Carbonsäuren im HEK-II zellfreien Assay im Vergleich zu den im BPH-Mikrosomentest bestimmten IC₅₀-Werten. Der Ersatz des DU145 Mikrosomenassays durch den HEK-I zellfreien Test erfolgte vor allem wegen der höheren Enzymausbeute bei HEK-I Zellen. Dadurch konnten kostengünstiger und in kürzerer Zeit mehr Verbindungen getestet werden.

In dem beschriebenen *in vitro* Testsystem können die wichtigsten Voraussetzungen für potente Hybridhemmstoffe überprüft werden. Da diese *in vitro* Tests allerdings keine Garantie geben, dass die entdeckten Hybridinhibitoren auch *in vivo* wirksam sind und sich eine bessere 5 α R Hemmung durch Gabe eines Hybridhemmstoffs im Vergleich zu einem selektiven 5 α R2 Inhibitor erzielen lässt, ist ein "Proof of Concept" *in vivo* meistens unumgänglich. Dazu sollte auf ein bewährtes Rattenmodell zurückgegriffen werden, das die Hemmwirkung von 5 α R-Inhibitoren durch Gewichtsreduktion der vorher mit Testosteronpropionat stimulierten Prostata bestimmt.⁷⁹ Bevor Substanzen jedoch an Ratten getestet wurden, wurde die Hemmung der 5 α R Isoenzyme der Ratte *in vitro* überprüft. Leider konnte hier für keinen der getesteten Ester eine Hemmung der 5 α R1 festgestellt werden, so dass in der Ratte das Konzept der Hybridhemmung von Isoenzym 1 und 2 nicht funktionierte. Die Ratte erwies sich also nicht als geeignetes Modell, um die überlegene Hemmwirkung der Hybridinhibitoren *in vivo* zu beweisen. Ob in Ratten Kinetikstudien mit Hybridhemmstoffen durchgeführt werden konnten, sollte ein *in vitro* Vortest auf Stabilität der Ester in Rattenplasma und Prostatahomogenat der Ratte zeigen. Allerdings erfolgte die Hydrolyse durch Plasma-Enzyme viel schneller als durch Esterasen der Prostata, so dass die Ratte auch als Modell für pharmakokinetische

Studien nicht unbedingt vorteilhaft schien. Allerdings konnte anhand der bereits vorliegenden *in vivo* Daten für den Methylester 1a und die entsprechende Säure 1 angenommen werden, dass die Hybridhemmstoffe im Menschen eine bessere Wirkung erzielen könnten als ein selektiver 5 α R2 Inhibitor. Der Methylester 1a wies trotz relativ kurzer Halbwertszeit in Plasma verglichen mit der in Prostata-Homogenat nach subkutaner Applikation einen ähnlich guten Effekt auf wie die Gabe der entsprechenden Carbonsäure 1. Da der Ester selbst keine zusätzliche Wirkung auf die 5 α R1 der Ratte gezeigt hatte, sondern nur sein Hydrolyseprodukt wirken konnte, kann man postulieren, dass bei Applikation des Esters genug Säure im Target-Organ (Prostata) ankommen muss, um dort die 5 α R2 zu hemmen. Im Gegensatz zur Ratte, war die Halbwertszeit des Esters in menschlichem Plasma bedeutend höher als in humanem Prostata-Homogenat. Zusätzlich zeigte der Ester noch eine gute 5 α R1 Wirkung am menschlichen Enzym. Deshalb ist theoretisch bei Applikation des Ester und einer damit verbundenen zusätzlichen Hemmung der 5 α R1 in der Peripherie, beim Menschen eine bessere Wirkung zu erwarten als bei der Gabe der entsprechenden Säuren, die nur die 5 α R2 hemmen.

Da anhand der *in vitro* Teststrategie keine Aussagen über die metabolische Stabilität von Ester und Säure gemacht werden können, sollte das Testsystem noch zusätzlich erweitert werden durch die Überprüfung der metabolischen Stabilität an beispielsweise humanen Lebermikrosomen.

Außerdem wäre es wichtig, ein echtes "Proof of Concept" anzutreten. Dazu kann einerseits versucht werden, Hybridhemmstoffe der Rattenenzyme zu entwickeln. Es kann dabei auf die hauseigene Substanzbibliothek zurückgegriffen werden und es können zusätzlich auch durch Synthese potente 5 α R2 Hemmstoffe (Carbonsäuren) verestert werden. Im so gewonnenen Testset kann dann nach 5 α R1 aktiven Estern gescreent werden.

Eine weitere Möglichkeit, ein "Proof of Concept" anzutreten, würde in der *in vivo* Testung an einem anderen Tiermodell bestehen. Solche Versuche sind beispielsweise an Hunden oder auch Affen beschrieben worden und waren gut vergleichbar mit Resultaten an menschlichen Enzymen.^{79,103,104,150,151} Wie bei dem Ratten-Test wären auch hier entsprechende *in vitro* Vorversuche zu entwickeln und

durchzuführen. Es müssen die Hemmaktivitäten von Ester und Säure *in vitro* bestimmt werden und außerdem sollten auch erste Aussagen über die *in vitro* Stabilität der Ester gemacht werden können, bevor eine Testung am Tier in Frage käme.

V. Zusammenfassung

Erhöhte DHT-Spiegel korrelieren mit der Pathogenese und Progression androgenabhängiger Erkrankungen wie Prostatakrebs und benigner Prostatahyperplasie (BPH). Die irreversible Reduktion von T zu DHT stellt den letzten Schritt in der Androgenbiosynthese dar und wird von den beiden Isoenzymen 5 α R1 und 5 α R2 katalysiert. Zur Therapie der BPH werden deshalb 5 α R Inhibitoren erfolgreich eingesetzt. Der Nutzen von 5 α R Hemmstoffen zur Prävention von Prostatakrebs oder dessen Behandlung in Kombination mit Antiandrogenen wird zur Zeit in verschiedenen klinischen Studien untersucht.^{29,38,40,41,48,54} Dabei hat sich generell die Hemmung beider 5 α R Isoenzyme als vorteilhafter erwiesen. Auf dem Arzneimittelmarkt sind nur 2 steroidale 5 α R Hemmstoffe zugelassen, Finasterid und Dutasterid, wobei es sich nur bei letzterem um einen dualen Hemmstoff handelt. Wegen der unerwünschten Nebenwirkungen dieser 5 α R Hemmstoffe, die mit der steroidal Struktur einhergehen könnten, wurden in unserem Arbeitskreis nicht steroidale Inhibitoren entwickelt, die möglichst auch eine dualen Hemmung aufweisen sollten.

Potente, nicht steroidale 5 α R2 Inhibitoren (4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuren, Verbindungen 1-3) wurden auf Selektivität gegenüber der 5 α R1 getestet werden. Dazu wurde ein Assay mit DU145 Zellen (humane Prostatakarzinom-Zellen, die 5 α R1 exprimieren) verwendet, in dem die Substanzen keine Hemmung zeigten. Allerdings konnte für die Verbindungen eine schlechte Permeation in DU145 Zellen nachgewiesen werden, die wahrscheinlich mit der bei physiologischem pH-Wert deprotonierten Carbonsäure-Struktur in Zusammenhang steht.^{124,125} Um diese negative Ladung zu umgehen, wurde ein Konzept entwickelt, bei dem die korrespondierenden Methylester (1a-3a) als zellpermeable Prodrugs eingesetzt wurden.

Um künftig solche Permeationseinflüsse im verwendeten Testsystem für die 5 α R1 zu umgehen, wurde ein zellfreier DU145 Assay entwickelt. Interessanterweise zeigten nun die Methylester eine eigene Hemmwirkung am freien Isoenzym 1, was sie nicht nur zu Prodrugs der 5 α R2 aktiven Säuren macht, sondern auch gleichzeitig zu Inhibitoren der 5 α R1.

Aus dieser besonderen Art der dualen Hemmung beider 5 α R Isoenzyme wurde nun ein völlig neues Hybridinhibitor-Konzept entwickelt.¹⁵² Der Ester sollte als Precursor für die korrespondierende Säure und gleichzeitig als selektiver Inhibitor der 5 α R1 dienen und daher während seiner Absorption und Verteilung im menschlichen Körper hydrolyse-stabil sein. Dann wäre er in der Lage die ubiquitär vorkommende 5 α R1 zu hemmen. Nach Erreichen des Target-Organs, der Prostata, musste der Ester gut in die Zellen aufgenommen werden, um dann von Enzymen der Prostata hydrolysiert zu werden und intrazellulär die korrespondierende Carbonsäure als aktiven Metaboliten freizusetzen. Diese wiederum sollte als potenter und selektiver 5 α R2 Inhibitor wirken. Neben guten Hemmwerten der Säuren für die 5 α R2 und der Ester für die 5 α R1 mussten letztere also noch zusätzlich ein gutes Verhältnis zwischen hydrolytischer Stabilität und Labilität aufweisen.

Zahlreiche Voraussetzungen müssen also erfüllt sein, damit Substanzen als sogenannte Hybridhemmstoffe wirken können. Im Rahmen der Entwicklung neuer Hemmstoffe wurde deshalb eine komplexe *in vitro* Teststrategie aufgestellt. Um gut vergleichbare Hemmwerte für die 5 α R Isoenzyme zu erhalten und gleichzeitig einen hohen Durchsatz an Substanzen erzielen zu können, wurden ausgehend von den in unserem Arbeitskreis etablierten Zelllinien HEK-I und HEK-II, die entsprechend ihrer Bezeichnung 5 α R1 oder 5 α R2 in hoher Menge exprimieren, zwei zellfreie Assays zum Screening nach neuen Hybridhemmstoffen entwickelt. Die HEK-I und HEK-II Homogenatassays wurden hinsichtlich der Substratkonzentration, der Inkubationszeit und der Proteinkonzentration optimiert. Wenn nun die Carbonsäure gute Hemmwerte im HEK-II zellfreien Assay zeigte und der korrespondierende Ester ein potenter 5 α R1 Inhibitor war, wurden anschließend Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dabei musste der Ester zunächst eine ausreichende Hydrolyse-Stabilität in Puffer (pH 7,4) aufweisen. In Caco-2 Zellhomogenat, das als Modell für den GIT diente, sollte der Ester ebenfalls stabil sein. Die Distribution eines Stoffes erfolgt vor allem über den Blutkreislauf, weshalb auch die Stabilität des Esters in humanem Plasma beobachtet wurde. In BPH-Gewebehomogenat hingegen sollte der Ester von Hydrolasen der Prostata in die 5 α R2 aktive Säure gespalten werden. Um schließlich noch die Zellgängigkeit der Ester, die ursprünglich als Prodrugs entwickelt wurden, zu untersuchen, wurde ein Permeationsassay mit den humanen Prostatakarzinom-Zellen DU145 als Modell für die Target-Zellen entwickelt.

Mit Hilfe der beschriebenen Teststrategie wurde die hauseigene Substanzbibliothek nach weiteren Hybridhemmstoffen durchmustert und zusätzlich noch weitere potentielle Inhibitoren synthetisiert. Zur Testung wurden solche Verbindungen ausgewählt, von denen bereits bekannt war, dass die Carbonsäuren potente 5 α R2 Hemmstoffe darstellten. Allerdings konnte das Hybridinhibitor-Konzept nur in der Klasse der 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuren und -methylester (Verbindungen 1/1a-3/3a) nachgewiesen werden, da Ester aus anderen Substanzklassen keine Hemmaktivität gegenüber der 5 α R1 aufwiesen.

Als logische Konsequenz wurden also die vorliegenden Ausgangssubstanzen näher betrachtet. Dazu wurden einerseits bereits existierende Ester und Säuren auf ihre 5 α R1 und 5 α R2 Hemmung getestet und andererseits die Ausgangsverbindungen durch Synthese modifiziert. Dadurch konnte das Phänomen der Hybridhemmung weiter charakterisiert und optimiert werden. Neben verschiedenen Alkylestern (3a, 3b, 10a, 11a) wurden auch Methylamide (ZS1a und ZS3a) als selektive und potente Inhibitoren der 5 α R1 identifiziert. Die korrespondierenden Säuren (1, 3, 10, 11) zeigten am Isoenzym 2 Hemmwerte im unteren nanomolaren Bereich. Bei weiteren Stabilitätsuntersuchungen wurde allerdings festgestellt, dass die Methylamide im Gegensatz zu den Estern 3a, 3b, 10a und 11a kein günstiges Stabilitäts-/Labilitätsverhältnis aufwiesen, da kaum Hydrolyse durch Prostata-Esterasen stattfand. Die Ausgangsverbindungen 3 und 3a ebenso wie der entsprechende Ethylester 3b (und die Säure 3) und die Cl- und Br-substituierten Verbindungen 10/10a und 11/11a gehören zu den potentesten Hybridhemmstoffen mit günstigen hydrolytischen Eigenschaften der Ester.

Mit der Entdeckung dieser potenten und nicht-steroidalen Hybridhemmstoffe der 5 α R1 und 5 α R2 konnte ein völlig neuartiges Konzept zur dualen Hemmung beider 5 α R Isoenzyme entwickelt werden. Nach Verabreichung eines zellpermeablen Esters, der hydrolytisch stabil gegenüber intestinalen und Plasma-Esterasen ist, kann dieser selektiv die ubiquitär vorkommende 5 α R1 hemmen. Im Target-Organ angekommen, wird er von Hydrolasen der Prostata gespalten und kann so intrazellulär die korrespondierende Carbonsäure als potenten 5 α R2 Inhibitor freisetzen.

VI. Summary

Elevated DHT levels correlate with the pathogenesis and progression of androgen-dependent diseases such as prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH). The irreversible reduction of T to DHT represents the final step in androgen biosynthesis and is catalysed by two isoenzymes, 5 α R1 and 5 α R2. Therefore 5 α R inhibitors were successfully used to treat BPH. Currently, the therapeutic efficacy of 5 α R inhibitors for the prevention of prostate cancer or for treating PCa in combination with antiandrogens should be proved in several clinical studies.^{29,38,40,41,48,54} In general, the inhibition of both isoenzymes showed to be more advantageous. On the pharmaceutical market, only 2 steroidal 5 α R inhibitors are available, Finasteride and Dutasteride, whereas mere the latter is capable to act as dual inhibitor. Due to undesirable side effects of these inhibitors that are believed to be caused by its steroidal structure, non steroidal compounds were synthesised within our working group exhibiting potential dual inhibition.

Potent, non steroidal 5 α R2 inhibitors ((4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidine-4-ylidenemethyl]-benzoic acids, compounds 1-3) were tested for selectivity against 5 α R1. As a test system, we used DU145 cells (human prostatic carcinoma cells expressing 5 α R1). Here the human type 2 inhibitors showed poor inhibitory activities. However, these compounds exhibited little permeation in DU145 cells probably because of the deprotonated carboxylic acid moiety at physiological pH.^{124,125} To overcome this limitation a concept was developed to use the corresponding methyl esters (1a-3a) as cell permeable prodrugs.

In order to avoid such permeation influences in our 5 α R1 test system, a cell free assay method using DU145 was developed. Interestingly enough, methyl esters themselves displayed inhibitory activities against 5 α R1. Esters were not only prodrugs for the corresponding carboxylic acids, but in addition inhibitors toward 5 α R1.

Starting with this special kind of dual inhibition of both 5 α R isoenzymes, a new hybrid inhibitor concept was developed.¹⁵² The methyl ester serving as precursor for the corresponding acid and at the same time being a selective 5 α R1 inhibitor should be stable against hydrolytic enzymes during absorption and distribution in human body. Thus, the compound should be able to inhibit the ubiquitous isoenzyme 1. After

reaching the target organ, the prostate, the methyl ester should easily permeate the cells to be hydrolysed by prostatic enzymes and to release the corresponding carboxylic acid as active metabolite intracellular. The acid again could act as potent and selective 5 α R2 inhibitor. Besides good inhibitory activities of carboxylic acids toward 5 α R2 and of esters toward 5 α R1, the latter had to show additionally a good ratio of hydrolytic stability and instability.

Several conditions must be fulfilled that compounds could act as hybrid inhibitors. Within the scope of the development of new inhibitors a complex *in vitro* test strategy was established. To obtain well comparable inhibition data for both isoenzymes and in addition a high throughput of compounds, two cell-free assays were developed using HEK-I and HEK-II cells transfected with either human 5 α R1 or 5 α R2. Assays were optimised with respect to substrate concentration, incubation time and protein content. If the carboxylic acid showed good inhibitory activities in the HEK-II cell-free assay and the corresponding ester was a potent 5 α R1 inhibitor, stability tests were performed in several biological media. First, esters had to be stable in buffer pH 7.4. In Caco-2 cell homogenate serving as model for the gastro-intestinal tract, the ester should also show adequate hydrolytic stability. Distribution of drugs is particularly due to blood circulation. Therefore ester stability was monitored in human plasma. However in BPH tissue homogenate, prostatic enzymes should cleave the ester into the corresponding acid being able to selectively inhibit 5 α R2. Finally, a cell permeation assay was developed to determine the absorption in target cells. Human prostatic carcinoma cell line DU145 was used as a model for the target cells.

By means of this evolved test strategy, the *in house library* was screened for further hybrid inhibitors. For inhibitor testing ester compounds were selected knowing the corresponding carboxylic acids to be potent 5 α R2 inhibitors. The hybrid inhibitor concept could be proven only in the class of 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidine-4-ylidenemethyl]-benzoic acids and -methyl esters (compounds 1/1a – 3/3a), as esters of other compound classes displayed no inhibitory activities toward 5 α R1.

Consequently, the parent compounds (1/1a – 3/3a) were modified by synthesis and on the other hand existing esters and acids were tested for their inhibitory activities toward 5 α R1 and 5 α R2. Thus, hybrid inhibition of both 5 α R isoenzymes could be further characterised and optimised. Several alkyl esters (3a, 3b, 10a, 11a) and methyl amides (ZS1a, ZS3a) were identified as selective and potent 5 α R1

inhibitors. The corresponding acids (1, 3, 10, 11) showed inhibitory activities toward $5\alpha R2$ in the lower nanomolar range. During the following stability tests, methyl amides displayed no convenient ratio of hydrolytic stability / instability compared to the esters 3a, 3b, 10a and 11a due to the lack of hydrolysis by prostatic enzymes. To summarise, the carboxylic acid 3, the methyl ester 3a and the corresponding ethyl ester 3b as well as the chloro- and bromo-substituted compounds 10/10a and 11/11a belong to the most potent hybrid inhibitors exhibiting favourable hydrolytic properties of esters.

By discovering these potent non steroidal hybrid inhibitors of $5\alpha R1$ and $5\alpha R2$, a completely new concept for dual inhibition of $5\alpha R$ isoenzymes could be developed. Application of a cell permeable ester that is hydrolytic stable against intestinal and plasma esterases will lead to a selective inhibition of $5\alpha R1$. After reaching the target organ, the ester will be hydrolysed by prostatic enzymes and will yield intracellular the corresponding carboxylic acid that will act as selective and potent $5\alpha R2$ inhibitor.

VII. Material

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien und Grundstoffe (p.a. Qualität) wurden von folgenden Firmen bezogen: Acros (Neuss), Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Lancaster (Mülheim am Main), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der Regel ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die wichtigsten Chemikalien und Reagenzien sind nachfolgend aufgeführt und wurden von den angegebenen Herstellern bezogen.

1. Chemikalien

[1,2,6,7- ³ H(N)]-Testosteron	Perkin Elmer, Boston, USA
[1 β - ³ H(N)]-Androsten-4-en-3,17-dion	Perkin Elmer, Boston, USA
Testosteron	Riedel-de Haën, Seelze
Dihydrotestosteron	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Androsten-4-en-3,17-dion	Riedel-de Haën, Seelze
5 α -Andosta-3,17-dion	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Quickszint Flow 302	Zinsser Analytic, Frankfurt
α -D-Glucose-6-phosphat*Na ₂ -salz	Serva, Heidelberg
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Serva, Heidelberg
NADP (β -Nicotinamid-adenin- dinucleotid-phosphat Dinatriumsalz)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg

2. Materialien für die Zellkultur

G418-Sulfat	Calbiochem, Darmstadt
DMEM Pulvermedium	CCpro, Neustadt an der Weinstrasse
RPMI 1640 Pulvermedium	CCpro, Neustadt an der Weinstrasse
Penicillin 10.000 U/ml	CCpro, Neustadt an der Weinstrasse
Streptomycin 10 mg/ml	CCpro, Neustadt an der Weinstrasse
Trypsin/EDTA	CCpro, Neustadt an der Weinstrasse
Fötale Kälberserum	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Casy [®] ton (isotone Salzlösung)	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy [®] clean (Reinigungslösung)	Schärfe System GmbH, Reutlingen

3. Zelllinien

DU145 Zelllinie (DSM ACC 261)

Es handelt sich um eine humane Prostatakarzinom-Zelllinie, die bereits 1975 aus einer Metastase im zentralen Nervensystem eines 69-jährigen Kaukasiers etabliert worden ist. DU145 Zellen wachsen als Monolayer und stellen morphologisch eine adhärente Zelllinie des Prostataepithels dar.¹⁵³

Humane Zelllinie 293 (Human embryonic kidney cells; HEK-293; Wildtyp)

Die Zelllinie wurde aus einer primären embryonalen Nierenzellkultur durch Transformation mit dem Adenovirus Typ 5 etabliert. Es handelt sich morphologisch um fibroblastenartige Zellen, die als adhärente Monolayer wachsen.¹⁵⁴

Humane Zelllinie 293 stabil transfiziert mit humaner 5 α -Reduktase Typ I (HEK-I)

HEK-I ist eine von Reichert (2001)¹⁵⁵ etablierte Zelllinie, die zur permanenten Expression aktiver humaner 5 α R1 fähig ist.

Humane Zelllinie 293 stabil transfiziert mit humaner 5 α -Reduktase Typ II (HEK-II)
HEK-II ist eine von Reichert (2001)¹⁵⁵ etablierte Zelllinie, die zur permanenten Expression aktiver humaner 5 α R2 in der Lage ist.

4. Medien und Standardlösungen

4.1 RPMI-Medium (für DU145 Zellen)

Die Formulierung wurde Mitte der 1960er Jahre von G. E. Moore und Kollegen am Roswell Park Memorial Institute, daher RPMI, entwickelt.

RPMI 1640 (mod.) Pulvermedium	10,4 g
NaHCO ₃	2,0 g
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (0,1 mg/ml)	10,0 ml
Fötale Kälberserum (FKS)	100 ml
H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,3 eingestellt. Die Zugabe des FKS erfolgte nach Sterilfiltration des restlichen Mediums.

4.2 DMEM-Medium (für HEK-Zellen)

DMEM Pulvermedium	13,4 g
NaHCO ₃	3,7 g
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (0,1 mg/ml)	10,0 ml
Fötale Kälberserum (FKS)	100 ml
H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,3 eingestellt. Die Zugabe des FKS erfolgte nach Sterilfiltration des restlichen Mediums.

4.3 PBS-Puffer (phosphate buffered saline)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O bidest.	ad 1,0 l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend durch Autoklavieren sterilisiert.

4.4 Homogenat-Puffer

Tris-HCl	5 mM
Saccharose	300 mM
EDTA	0,1 mM

Die Substanzen wurden in entionisiertem Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

4.5 Tris-Test-Puffer

Tris-HCl	5 mM
EDTA	0,1 mM

Die Substanzen wurden in entionisiertem Reinstwasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

4.6 Citrat-Puffer

Trinatriumcitrat * 5,5 H ₂ O	40 mM
-----------------------------------------	-------

Das Salz wurde in entionisiertem Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 5,5 eingestellt.

4.7 Phosphat-Puffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	40mM
NaH_2PO_4	40mM

Die Salze wurden in entionisiertem Reinstwasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 6,6 eingestellt.

4.8 NADPH regenerierendes System (Stammlösung)

NADP (22 mM)	1 Teil
Glucose-6-phosphat (100 mM)	2 Teile
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (25 U/ml)	1Teil

Die Substanzen wurden jeweils frisch vor einem Assay in Tris-Test-Puffer (pH 7,4) gelöst, etwa eine halbe Stunde vor Benutzung im Verhältnis 1:2:1 gemischt und im Kühlschrank aufbewahrt.

4.9 Proteinbestimmungsreagenz nach Bradford (1976)

Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
Ethanol 99%	50 ml
o-Phosphorsäure 85%	100 ml
H_2O bidest.	ad 1,0 l

Die einzelnen Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt und die Lösung vor Gebrauch durch einen Whatman No. 1 Filter filtriert.

5. Geräte

Casy Cell Counter und Analyser System

Modell TT-2-BA-1008

Schärfe System, Reutlingen

Feinwaage SBC 21

Scaltec, Heiligenstadt

Kryobehälter Air liquide, Modell GT 50

Kryotechnik GmbH, Düsseldorf

Holten LaminAir Sterilbank

Heto-Holten, Allerød, Dänemark

CO₂-Inkubator Biosafe eco

Integra Biosciences, Fernwald

Magnetrührer RCT-Basic

IKA-Labortechnik, Staufen

Mikroskop Axiovert 25

Zeiss, Wetzlar

pH-Meter 766

Knick, Berlin

Photometer Heλios β

Unicam, Cambridge, Großbritannien

Reinstwasseranlage MilliQ Plus PF

Millipore, Eschborn

Schüttelinkubator Unitron 25

Infors, Einsbach

Ultraschallbad Sonesorex RK 106 Transistor

Bandelin, Berlin

Ultraturrax T25

Janke & Kunkel IKA-Labortechnik,
Staufen

Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls HD60

Bandelin electronic, Berlin

Wasserbad WBU45

Memmert, Schwabach

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Universal 32 R

Hettich, Tuttlingen

Tischzentrifuge Micro 24-48 R

Hettich, Tuttlingen

Laborzentrifuge RC 5B Plus

Sorvall, Newtown, USA

Rotoren SS-34, SLA-1500

Sorvall, Newtown, USA

Ultrazentrifuge LKB 2330 Ultrospin 55

LKB, Pharmacia Bromma,
Schweden

Rotor SRP50AT-115	Hitachi, Tokyo, Japan	
Rotor RP45T-312	Hitachi, Tokyo, Japan	
Wallac 1420 Victor ² ™ multilabel counter	PerkinElmer, Jügesheim	Rodgau-
HPLC-System mit Radiodetektion:		
Modular 3D LC System Series 1100	Agilent, Waldbronn	
Agilent Interface 35900E, AD-Wandler	Agilent, Waldbronn	
HPLC Radioflow Detektor LB 509	Berthold, Bad Wildbad	
Szintillatorpumpe LB 5035	Berthold, Bad Wildbad	
ChemStation [®] Rev. A.09.01	Agilent, Waldbronn	
CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec		
CC 8/3 Nucleodur 100-3 C18 ec	Macherey-Nagel, Düren	
HPLC-MS/MS:		
Surveyor Autosampler		
Surveyor LC-Pumpe		
Surveyor PDA		
TSQ Quantum MS		
Xcalibur [™] 1.3 Core Data System Software	Thermo Finnagan, San Jose, USA	

VIII. Biochemische Methoden

1. Arbeitstechniken mit Zellkulturen

1.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle eingesetzten Zellen wurden in einem CO₂-Zellkultur-Inkubator bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Durch Einstellung eines konstanten CO₂-Gehalts auf 5 % wurde gewährleistet, dass der pH-Wert des Kulturmediums konstant gehalten wurde, so dass das Wachstum der Zellen durch Abfallprodukte nicht beeinflusst wurde. Zur Neutralisierung solcher Stoffwechselprodukte wird in der Regel ein Kohlensäure / Hydrogencarbonat-System zur Pufferung eingesetzt: Natriumhydrogencarbonat wird dem Medium zugesetzt, während Kohlendioxid von außen zugeführt wird.

Zum Schutz vor mikrobieller Kontamination wurden den Medien außerdem 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Um die Expression der 5 α -Reduktase Typ I bzw. Typ II in den Zelllinien HEK-I bzw. HEK-II aufrechtzuerhalten, wurde G418-Sulfat zum ständigen Selektionsdruck in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt.

1.2 Zubereitung der Zellkulturmedien

Zur Herstellung des Zellkulturmediums für HEK-Zellen wurde DMEM Pulvermedium (Dulbecco's modified eagle medium) und Natriumhydrogencarbonat nach Herstellerangaben abgewogen und in entionisiertem Reinstwasser (Millipore Q plus) gelöst. Nach Zusatz von Penicillin (100 U / ml) und Streptomycin (100 µg / ml) und Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 - 7,3 wurde auf 90 % des Endvolumens aufgefüllt. Das Medium wurde mit Hilfe eines sterilen Filtersystems (Nalgene, Rochester, USA) und eines Vakuumpumpensystems durch eine Membran (Membranfilter aus Cellulosemischester, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) in sterile Glasgefäße (Schott, Mainz, Deutschland) filtriert. Nach der

Filtration wurde fötales Kälberserum (Endkonzentration 10 %) steril zugegeben. Das Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt und war für die Dauer von ca. 8 Wochen haltbar. Die Herstellung des RPMI 1640 (mod.) Pulvermediums für die DU145 Zelllinie erfolgte analog zur Zubereitung des DMEM Pulvermediums.

1.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Säugetierzellen können bei einer Temperatur von -196 °C in flüssigem Stickstoff in der Kältestarre gelagert werden, da bei diesen Temperaturen keine biologischen Prozesse mehr ablaufen. Die Lagerung bewahrt neue Zelllinien oder auch bereits etablierte Zellvarianten vor Kontamination, Variabilität durch Subkultivierung, Verlust ursprünglicher Funktion oder Überalterung durch zu häufiges Passagieren. Bei Bedarf können die so konservierten Zellen aus dem eingefrorenen Vorrat wieder angezogen werden.

Um die Zellen vor Zerstörung durch Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu schützen, wird DMSO als Gefrierschutz verwendet. DMSO verhindert die Ausbildung größerer Kristalle, die die Zellwand durchbohren könnten.

Einfrieren von Zellen

Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche (Nunc Brand, Dänemark) wurden mit 12 ml Medium abgelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml Einfriermedium (DMEM-Medium bzw. RPMI-Medium inklusive 10% fötales Kälberserum) mit einem Zusatz von 20% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,2 ml Aliquots in vorgekühlte Kryovials (Nalgene, Rochester, USA) pipettiert. Die Gefäße wurden in eine spezielle mit Isopropanol gefüllte Einfriervorrichtung (Cryo 1 °C Freezing Container, Nalgene, Rochester USA) überführt, die ein definiertes Abkühlen von 1 °C / min ermöglicht. Nach 12 h Lagerung bei -70 °C wurden die Gefäße in Gefrierhalterungen des Kryobehälters überführt und in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

Auftauen von Zellen

Die eingefrorene Zellsuspension wurde schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in 10 ml auf 37 °C temperiertes Medium pipettiert. Durch diesen Verdünnungsschritt wurde die DMSO-Konzentration erniedrigt, so dass das Gefrierschutzmittel nicht mehr toxisch wirkte. Die Suspension wurde anschließend für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um so das zum Frostschutz zugesetzte DMSO vollständig zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 12 ml auf 37 °C vorgewärmtem Medium resuspendiert und die Zellen auf einer Zellkulturschale (90 mm Durchmesser; Nunc Brand, Dänemark) im CO₂-Inkubator kultiviert.

1.4 Passagieren eukaryontischer Zellen

1.4.1 Passagieren von DU145 Zellen

Zum Passagieren der Zelllinie DU145 wurde das vorhandene Medium abgesaugt und der Zellmonolayer vorsichtig mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, ohne dabei gesunde Zellen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,25 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für ca. 5 min im CO₂-Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Die Zellablösung konnte mikroskopisch kontrolliert werden, da sich die Zellen durch die enzymatische Behandlung von ihrer Substratfläche ablösen und als abgerundete Zellen sichtbar werden. Durch Abspülen mit 2 x 5 ml FKS-haltigem Medium wurde die Trypsinbehandlung abgestoppt, die Zellsuspension anschließend in ein Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert.

Der trypsinhaltige Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem auf 37 °C vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert. Durch Splitten dieser neuen Zellsuspension im Verhältnis 1:4 bis 1:8 auf neue Gewebekulturgefäße mit frischem Medium wurden die Zellen passagiert und weiter im CO₂-Inkubator kultiviert.

1.4.2 Passagieren von HEK-I und HEK-II Zellen

Zum Passagieren der Zelllinien HEK-I und HEK-II wurde das vorhandene Medium abgezogen. Eine Trypsinbehandlung war hier nicht erforderlich, da sich die Zellen bereits durch Abspülen mit frischem Medium (10 ml) mechanisch von ihrer Substratoberfläche ablösen ließen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem auf 37 °C temperiertem Kulturmedium gründlich resuspendiert, da HEK Zellen stark zur Aggregation neigen. Dem Zellkulturmedium wurde zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks G418-Sulfat in einer Konzentration von 0,5 mg / ml zugesetzt. Durch Splitten der neuen Zellsuspension im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Gewebekulturgefäße wurden die Zellen passagiert und weiter im CO₂-Inkubator kultiviert.

1.5 Zellzahlbestimmung

Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer

Ein Hämocytometer nach Bürker bzw. Neubauer (siehe Abbildung VIII.1) besteht aus einem Glasobjektträger mit einem definierten Flüssigkeitsreservoir zwischen zwei Glasstegen. Die Zählkammer besteht aus neun Großquadraten zu je 0,1 µl, das wiederum in Kleinquadrate unterteilt ist. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1 mm², die Höhe der Kammer beträgt 0,1 mm.

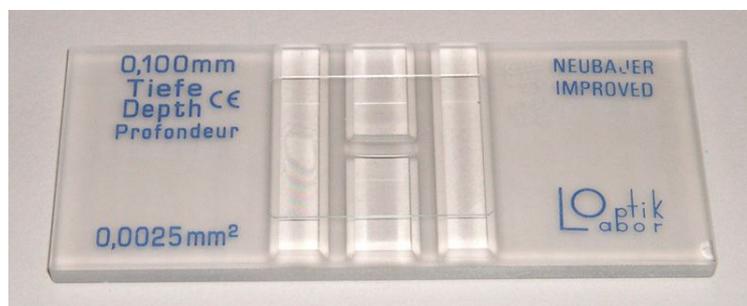


Abbildung VIII.1: Hämocytometer nach Neubauer

Zur Ermittlung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde ein Deckglas mit leichtem Druck auf die Glasstege der Zählkammer aufgelegt, so dass die Newtonschen Ringe zu beobachten waren. Die Zellsuspension wurde dann unter das Deckglas pipettiert. Die Anzahl der Zellen in mindestens fünf der neun Großquadrate wurde bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert der Zellen pro Quadrat errechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10^4 konnte die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension errechnet werden.

Bestimmung der Zellzahl mittels Casy[®] Cell Counter und Analyser System

Das Zellzählgerät Casy Modell TT-2-BA-1008 arbeitet mit der elektronischen Pulsflächenanalyse von Schärfe System und ermöglicht neben der Bestimmung der Zellzahl und Größenverteilung einer Probe, auch eine Aussage über die Vitalität der Zellen. Ebenso wird der Aggregationsgrad der Zellen ermittelt und bei der Berechnung der Zellkonzentration automatisch berücksichtigt. So stellen auch Zellaggregate, wie sie häufig bei HEK Zellen vorkommen, kein Problem bei der Zellzahlbestimmung dar.

Die Zellen werden in Casy[®]ton, einer isotonen Elektrolytlösung, suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesskapillare (150 µm Durchmesser) gesaugt. Über zwei Platinelektroden wird ein Niederspannungsfeld an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Messpore stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Intakte Zellen können als Isolator betrachtet werden, es kommt somit zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke. Ein Impuls wird ausgelöst, die Anzahl der Impulse entspricht der Zellzahl der Probe. Die Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Tote Zellen, deren Zellmembran keine elektrische Barriere darstellt, werden hingegen mit der Größe ihres Zellkerns erfasst und in der Größenverteilung somit kleiner dargestellt. (nach Casy[®] Cell Counter und Analyser System Model TT Bedienungsanleitung, Schärfe System GmbH, Reutlingen)

Zur automatischen Abgrenzung von lebenden und toten Zellen sowie von Zelltrümmern wurden die entsprechenden Cursor (Evaluierungscursor und Normierungscursor) für jede Zellart individuell ermittelt und gespeichert.

Zur Durchführung der Messung wurden 10 µl Zellsuspension in einen Casy[®]Cup mit 10 ml Casy[®]ton gegeben und der Probenbecher 5 mal geschwenkt. Das Casy[®]Cup wurde anschließend unter die Messkapillare gestellt und das Gerät führte entsprechend der Einstellung eine Dreifach-Messung durch. Das Ergebnis als Mittelwert und die Größenverteilung wurden auf dem Display dargestellt. Links vom Normierungscursor befindet sich der Debris-Peak (Zelltrümmer), zwischen Normierungscursor und Auswertecursor liegt der Peak der toten Zellen, rechts vom Auswertecursor beginnt der Peak der vitalen Zellen gefolgt von den Zellaggregaten. In Tabelle VIII.1 sind die ermittelten Einstellungen von Evaluierungs- und Normierungscursor für die verschiedenen Zelllinien angegeben.

Zelllinie	Evaluierungscursor	Normierungscursor
DU145	14,25 – 50,0 µm	6,75 – 50,0 µm
HEK-I	11,38 – 50,0 µm	6,00 – 50,0 µm
HEK-II	11,75 – 50,0 µm	8,25 – 50,0 µm

Tabelle VIII.1: Einstellungen von Evaluierungs- und Normierungscursor des CASY[®] Cell Counters

1.6 DU145 Mikrosomenpräparation

Für die DU145 Mikrosomenpräparation wurden Zellen verwendet, die zu 80 % konfluent die Substratoberfläche bedeckten. Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA versetzt, für 5 min im CO₂-Inkubator belassen und anschließend mit FKS-haltigem Medium abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 400 g für 5 min zentrifugiert und das Zellkulturmedium abgezogen. Nach Resuspendierung des Pellets in PBS-Puffer wurde die Zellzahl bestimmt. Die Suspension wurde bei 400 g zentrifugiert, das Pellet ein weiteres Mal mit PBS-Puffer gewaschen und wiederum zentrifugiert. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten bei 0-4°C auf Eis, um Proteine vor Abbaureaktionen zu schützen. Das resultierende Zellpellet wurde im 5-fachen Volumen eines Homogenatpuffers (Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,1 mM Saccharose 300 mM, pH 7,4) aufgenommen. Als Proteaseinhibitor wurde PMSF

(Phenylmethylsulfonylfluorid) in einer Endkonzentration von 10 μM zugesetzt. Mittels Ultraschallstab wurde die Zellsuspension nun aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 10 s mit 50 s Kühlpause auf höchster Stufe homogenisiert wurde. Beim Homogenisieren mit dem Ultraschallstab war darauf zu achten, dass möglichst wenig Schaum produziert wurde. Der Zellaufschluss wurde durch Vermessung des Homogenats mit dem Casy[®] Cell Counter überprüft (mindestens 97% zerstörte Zellen). Das Homogenat wurde dann in Zentrifugenröhrchen überführt und für 60 min bei 150.000 g zentrifugiert. Die resultierenden Pellets, die Kerne, Mitochondrien und Mikrosomen enthielten, wurden in Tris-HCl Puffer suspendiert, so dass mit Hilfe der vorher bestimmten Zellzahl eine "Konzentration" von 8 Millionen Zellen pro ml Puffer erreicht wurde. Die so erhaltene Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Aktivität der Enzympräparation war unter diesen Bedingungen über mindestens 5 Monate stabil.

1.7 Fraktionierte Zentrifugation mit DU145 Zellhomogenat

Für das DU145 Homogenat wurden Zellen verwendet, die zu 80% konfluent waren. Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA versetzt und nach 5 min im CO_2 -Inkubator mit FKS-haltigem Medium abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 400 g für 5 min zentrifugiert und das Zellkulturmedium abgezogen. Nach Resuspendierung des Pellets in PBS-Puffer wurde die Zellzahl bestimmt und anschließend wieder bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Für die fraktionierte Zentrifugation wurden ca. 290 Millionen Zellen verwendet. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten bei $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Eis. Das resultierende Zellpellet wurde im 10-fachen Volumen Homogenatpuffer (Tris-HCl 5 mM, Saccharose 300 mM, pH 7,4) aufgenommen. Hier wurde auf weitere Zusätze wie EDTA, PMSF oder DTT verzichtet, um die zu testende Esterase-Aktivität nicht zu beeinträchtigen.

Mittels Ultraschallstab wurden die Zellen aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 10 s mit 50 s Kühlpause auf höchster Stufe homogenisiert wurde. Der Zellaufschluss wurde einerseits optisch verfolgt und andererseits durch Messung des Homogenats im Casy[®] Cell Counter genau bestimmt (mindestens 97% zerstörte Zellen). Das Zellhomogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 50 min bei 20.000 g zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand (S1) wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt, das Pellet (P1) erneut in der 5-fachen Menge eiskaltem Homogenat-Puffer resuspendiert und 50 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand aus der zweiten Zentrifugation (S1^{*}) wurde mit dem Überstand S1 und das neue Pellet (P1^{*}) mit P1 vereinigt. Die vereinigten Pellets (P1 + P1^{*}) enthielten Zelltrümmer und schwere Zellbestandteile wie Kerne und Mitochondrien.

Die vereinigten Überstände (S1 und S1^{*}) wurden nun 60 min bei 150.000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet (P2) stellte die Mikrosomen-Fraktion dar, der Überstand (S2) das Cytosol.

Das Pellet P2 wurde zur Testung in Puffer resuspendiert. Von jeder Fraktion wurde dann ein definiertes Volumen entnommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel VIII.1.9) durchgeführt. 990 µl wurden jeweils sofort zum Esterase-Test verwendet und mit 10 µl einer 1 mM Stammlösung von FP7a (in MeOH) versetzt. Es wurde 18 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert und anschließend Ester und eventuell entstandene Säure 2 mal mit 1 ml Diethylether (nach ansäuern mit HCl auf pH 2) extrahiert. Die Proben wurden zur Trockne eingedampft und zur Vermessung mittels HPLC-MS/MS (Methode siehe Kapitel 4.6) in 50 µl Methanol resuspendiert.

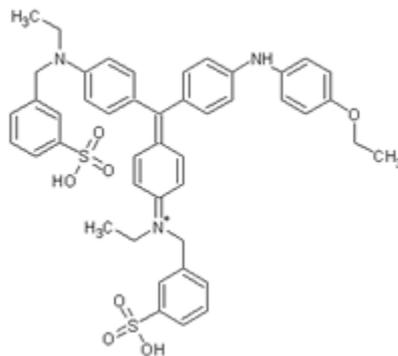
1.8 HEK Zellhomogenat

Das Kulturmedium über den konfluenten Zellen wurde abgesaugt und der Zellmonolayer vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen, ohne dabei gesunde Zellen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen mechanisch durch Abspülen mit PBS-Puffer von der Kulturoberfläche abgelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, die Zellen in wenig Homogenatpuffer suspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Suspension wurde mit soviel Homogenatpuffer aufgefüllt, dass sich eine Konzentration von 4 Millionen Zellen pro 0,25 ml ergab. Mit Hilfe des Ultraschallstabes wurden die Zellen aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 10 s auf höchster Stufe homogenisiert wurde (möglichst wenig Schaum produzieren). Dazwischen lagen jeweils Kühlpausen auf Eis von 50 s. Durch Vermessung des Homogenats mit dem Casy[®] Cell Counter wurde der Aufschluss überprüft (mindestens 97% zerstörte Zellen).

Das so entstandene Zellhomogenat wurde schließlich aliquotiert, schockgefroren und bis zur Testung bei -70°C gelagert. Die Aktivität der Aliquots war unter diesen Bedingungen über mindestens 4 Monate stabil.

1.9 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Der Gesamtproteingehalt der verschiedenen Lösungen wurde nach der Bradford-Methode von 1976 bestimmt.¹²⁹ Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung unspezifisch sowohl mit den kationischen als auch den hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen (kationischen) Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner anionischen Sulfatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm zu 595 nm. Der Test ist sehr empfindlich (Nachweisgrenze 5 μg Protein/ml) und es stören weder Salze noch Saccharose.



Coomassie Brilliant Blue G-250

Zur Proteinbestimmung wurden in 20 μl der entsprechenden Lösung mit 2 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption nach exakt 5 min bei 595 nm vermessen. Eine Kalibriergerade (Regression größer als 0,98) wurde vor jedem Gebrauch aus Lösungen mit definiertem Gehalt an Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

2. Gewebeaufarbeitungen

2.1 Rattenprostata-Mikrosomenpräparation für 5 α R-Assays

Die Aufarbeitung der Rattenprostata erfolgte analog der Methode von Liang et al.⁶³ mit leichten Modifizierungen. Die ventrale Prostata von Ratten wurde entnommen, von Fett und Bindegewebe befreit und nach der OP in Kochsalzlösung (0,9%) auf Eis aufbewahrt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Pro Gramm Gewebe wurden 3 ml Homogenat-Puffer zugegeben. Als Proteaseinhibitoren wurden PMSF in einer Endkonzentration von 10 μ M und Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt.

Das Gewebe wurde 10 mal für 10 s im Ultraturrax bei 20.500 rpm homogenisiert, wobei jeweils eine Kühlpause von 50 s eingehalten wurde. Anschließend wurde die Suspension durch 3-lagigen Zellstoff filtriert und das Gewebehomogenat für 60 min bei 105.000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in wenig Puffer resuspendiert, so dass der Proteingehalt etwa zwischen 15 und 25 mg / ml lag. Für die Präparation von 5 α R1 aus Rattenprostata wurde Phosphat-Puffer (pH 6,6) zum Resuspendieren des erhaltenen Pellets verwendet und für die Präparation von 5 α R2 Citrat-Puffer (pH 5,5). Die so erhaltenen Suspensionen wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2 BPH-Mikrosomenpräparation für 5 α R-Assay

Die operative Entfernung der Gewebewucherung bei Benigner Prostata Hyperplasie (BPH) ist eine Therapiemöglichkeit und ein Standardverfahren im Universitätsklinikum Homburg. Das dabei anfallende Gewebe enthält vorwiegend Typ II Isoenzym und wurde schon oft zur Herstellung von Enzympräparationen eingesetzt (Dissertationsschrift von S. Göhring, 1996). Die Aufarbeitung verläuft ähnlich der Rattenprostata-Mikrosomenpräparation.

Das Gewebe wurde nach der OP in Kochsalzlösung (0,9%) auf Eis transportiert. Die Gewebestücke wurden trockengetupft und mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten, gewogen und in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt. Pro Gramm Gewebe wurden 7,5 ml Homogenat-Puffer zugegeben. Als irreversibler Proteaseinhibitor wurde PMSF in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben,

wobei hier auf den Zusatz von DTT verzichtet wurde, da PMSF wenig effektiv in Gegenwart von Thiolen ist.

Das Gewebe wurde 10 mal für 10 s im Ultraturrax bei 20.500 rpm homogenisiert. Dabei wurde eine Kühlpause von 50 s zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten eingehalten. Anschließend wurde die Suspension durch 3-lagigen Zellstoff filtriert, um nicht aufgeschlossene Gewebereste zu beseitigen.

Das Gewebehomogenat wurde anschließend für 60 min bei 105.000 g zentrifugiert und das resultierende Pellet in möglichst wenig Citrat-Puffer (pH 5,5) resuspendiert, so dass der Proteingehalt je nach Aufarbeitung zwischen 15 und 25 mg / ml lag. Die so erhaltene Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3 Gewinnung von humanem Plasma für Stabilitätstest

Die Blutentnahme bei freiwilligen, gesunden Probanden unseres Arbeitskreises erfolgte aus der Vene (Ellenbeuge). Das Blut wurde direkt steril in Röhrchen (S-Monovette[®] 10 ml 9NC, Sarstedt, Nümbrecht) entnommen, die als Antikoagulanzen 1 ml Tri-Natriumcitrat-Lösung (0,106 mol / l) enthielten. Das ungerinnbar gemachte Blut wurde auf Eis gelegt, um möglichst schnell in größere Falcons überführt zu werden und dann in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 15 min bei 2000 g zentrifugiert zu werden.

Auf Grund des unterschiedlichen spezifischen Gewichtes setzen sich die korpuskulären Elemente am Boden ab, während das Blutplasma als schwach gelbe Flüssigkeit nach oben steigt und so leicht abpipettiert werden kann. Die Plasma-Proben der einzelnen Probanden wurden anschließend gepoolt, aliquotiert und schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C .

2.4 BPH-Homogenat für Stabilitätstest

Prostatagewebe wurde nach der OP in Kochsalzlösung (0,9 %) auf Eis transportiert. Die Gewebestücke wurden trockengetupft und gewogen. Pro Gramm Gewebe wurden 6 ml PBS-Puffer zugegeben. Auf weitere Zusätze (wie z.B.

Proteaseinhibitoren) wurde verzichtet, um die Esterase-Aktivität im späteren Gewebehomogenat nicht zu beeinträchtigen.

Das Gewebe wurde 10 mal für 10 s im Ultraturrax bei 20.500 rpm homogenisiert. Dabei wurde eine Kühlpause von 50 s zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten eingehalten. Um gröbere Stücke weiter zu zerkleinern, wurde das Homogenat zusätzlich noch mit einem Glashomogenisator (Weathon, Millville, USA) bearbeitet. Anschließend wurde die Suspension durch 3-lagigen Zellstoff filtriert, um letzte, nicht aufgeschlossene, Gewebereste zu beseitigen. Schließlich wurde das BPH-Homogenat aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.5 Rattenprostata-Homogenat für Stabilitätstest

Die Aufarbeitung erfolgte analog der Herstellung von BPH-Gewebehomogenat. Die frisch entfernten Prostatadrüsen wurden nach der OP in Kochsalzlösung (0,9%) auf Eis transportiert. Die Gewebestücke wurden trockengetupft und gewogen. Pro Gramm Gewebe wurden 6 ml PBS-Puffer (ohne weitere Zusätze) zugegeben.

Das Gewebe wurde 10 mal für 10 s (mit je 50 s Kühlpause) im Ultraturrax bei 20.500 rpm homogenisiert. Um die Flüssigkeit noch homogener zu machen, wurde zusätzlich noch ein Glashomogenisator (Weathon, Millville, USA) verwendet. Anschließend wurde die Suspension durch 3-lagigen Zellstoff filtriert. Schließlich wurde das Gewebehomogenat aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.6 Bestimmung der Gesamtesterase-Aktivität

Zur Charakterisierung der verschiedenen biologischen Medien wurde die Gesamtesterase-Aktivität mit leichten Abwandlungen nach der Methode von Pauletti et al. bestimmt.^{144,156} Als unspezifisches Substrat für Esterasen wurde p-Nitrophenylacetat (PNPA) in einer Konzentration von 500 μM eingesetzt.

In einer 24-well-plate wurden 250 μl des biologischen Mediums vorgelegt und der Test durch Zugabe von 250 μl PNPA-Lösung (1 mM in PBS-Puffer mit 1% DMSO) gestartet. Die Umsetzung von PNPA zu seinem gelben Produkt (4-Nitrophenol)

wurde spektrometrisch im Multilabel Counter (Wallac 1420 Victor²) bei 405 nm und 37 °C bis zur fast vollständigen Konversion verfolgt. Entsprechende Kontrollen mit 500 µM PNPA in PBS-Puffer wurden über den gleichen Zeitraum inkubiert, um die nicht-enzymatische Entstehung von 4-Nitrophenol zu bestimmen. Um die Esterase-Aktivität nach 1 min zu berechnen, wurde eine Kalibrierkurve von p-Nitrophenol erstellt.

Die spezifische Aktivität wurde schließlich nach Proteinbestimmung (nach der Methode von Bradford) in nmol / min / mg Protein angegeben.

3. Testverfahren zur 5 α R-Aktivitätsbestimmung

3.1 BPH-Mikrosomenassay

Der Assay wurde durchgeführt nach der Methode von Liang et al.⁶³ mit Modifizierungen nach Hartmann et al.¹¹³

Als Enzymquelle wurde die in Kapitel VIII.2.2 beschriebene BPH-Mikrosomenpräparation verwendet.

Testvorbereitung

Die zu testenden Hemmstoffe wurden in DMSO gelöst und bis zur gewünschten Konzentration verdünnt, wobei jeweils der letzte Verdünnungsschritt in Citrat-Puffer erfolgte.

Die für einen Test benötigte Menge radioaktiv markiertes Testosteron (10 nM [1,2,6,7-³H(N)]-Testosteron pro Eppi, entspricht einer Radioaktivitätsmenge von 20 nCi) wurde vorgelegt, abgedampft und anschließend in 200 nM kalter Testosteron-Lösung aufgenommen.

Teststart

Der Inkubationsansatz enthielt 100 µM NADPH, 210 nM Testosteron (inklusive [1,2,6,7-³H(N)]-Testosteron) und 2 % DMSO mit oder ohne Hemmstoff. Durch

Zugabe von BPH-Mikrosomenpräparation (in Citrat-Puffer pH 5,5) mit Hilfe eines Multistepers wurde die Reaktion in getakteten Intervallen gestartet und kurz geschüttelt. Der Ansatz besaß ein Endvolumen von 250 µl.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Wasserbad betrug der Umsatz an Testosteron zu Dihydrotestosteron in den ungehemmten Proben ungefähr 20 %.

Teststopp

Die Reaktion wurde zum Abstoppen auf Eis gestellt und in genau getimeten Intervallen mit 50 µl NaOH (10 M) versetzt, um das Enzym zu inaktivieren. Danach wurden die Steroide sofort mit 500 µl kaltem Diethylether extrahiert. Die Mischung wurde 10 min geschüttelt, bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und die Wasserphase im Ethanol-Trockeneisbad ausgefroren. Die Etherphase wurde vorsichtig abdekantiert und in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

Nach Abdampfen des Ethers wurden die Proben in 50 µl Methanol resuspendiert und mittels Radio-HPLC analysiert.

3.2 Rattenprostata-Mikrosomenassay (RVP1 und RVP2)

Der Assay wurde durchgeführt nach der Methode von Liang et al.⁶³ mit Modifizierungen nach Hartmann et al.¹¹³ und verlief ähnlich dem BPH-Mikrosomentest.

Als Enzymquelle wurde die in Kapitel VIII.2.1 beschriebene Rattenprostata-Mikrosomenaufarbeitung benutzt.

Testvorbereitung

Die Hemmstoffe wurden in DMSO gelöst und bis zur gewünschten Konzentration verdünnt, wobei jeweils der letzte Verdünnungsschritt in Puffer erfolgte. Für den RVP1 Test wurde Phosphat-Puffer (pH 6,6) und für den RVP2 Assay Citrat-Puffer (pH 5,5) verwendet.

Die für einen Test benötigte Menge radioaktiv markiertes Testosteron (10 nM [1,2,6,7-³H(N)]-Testosteron pro Eppi, entspricht einer Radioaktivitätsmenge von 20

nCi) wurde vorgelegt, abgedampft und anschließend in 200 nM kalter Testosteron-Lösung aufgenommen.

Teststart

Der Inkubationsansatz enthielt 200 µM NADPH, 50 µl Testosteron-Lösung (210 nM, inklusive [1,2,6,7-³H(N)]-Testosteron) und 2 % DMSO mit oder ohne Hemmstoff (50 µl). Durch Zugabe von Rattenprostata-Mikrosomenpräparation mittels Multistepper in gleichmäßigen Intervallen wurde die Reaktion (Endvolumen 250 µl) gestartet und kurz durch Vortexen gemischt.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Wasserbad betrug der Umsatz an Testosteron zu Dihydrotestosteron in den ungehemmten Proben ungefähr 25 %.

Teststopp

Zum Abstoppen wurde der Ansatz auf Eis gestellt und in gleichmäßigen Abständen 50 µl NaOH (10 M) zugesetzt. Dann wurde sofort mit 500 µl kaltem Diethylether extrahiert, die Mischung 10 min geschüttelt und bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Einfrieren der Wasserphase im Ethanol-Trockeneisbad konnte die Etherphase vorsichtig abdekantiert werden und in neue Eppendorf-Gefäße überführt werden. Nach Abdampfen des Ethers wurden die Proben in 50 µl Methanol resuspendiert und mittels Radio-HPLC analysiert.

3.3 DU145 Zellassay

Die humane Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 diente als Quelle für 5αR Typ 1.¹⁵⁷

Testvorbereitung

24 Stunden vor einem Zellassay wurden 0,25 Millionen Zellen in je 1 ml RPMI-Kulturmedium auf einer 24-well-plate ausgesät. Die Hemmstoffe wurden in Methanol gelöst und bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Teststart

Die über Nacht konfluent gewordenen Zellen, wurden unmittelbar vor dem Start 2 mal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und mit 5 µl der zu testenden Hemmstofflösungen oder 5 µl DMSO im Fall der ungehemmten Kontrollen versetzt. Gestartet wurde durch Zugabe von frischem Kulturmedium (genau 495 µl je well), das je well 2,5 µl [1β - $^3\text{H}(\text{N})$]-Androsten-4-en-3,17-dion (entspricht einer Radioaktivitätsmenge von 253 nCi) in einer Endkonzentration von 20 nM enthält. Die 24-well-plate wurde für 5 h im CO_2 -Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Nach dieser Zeit betrug die Konversion von Androstendion zu Androstandion ungefähr 25 %.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte kurz geschwenkt, der Zellüberstand möglichst quantitativ mit einer Pipette entnommen und in frische, mit kaltem Diethylether (750 µl) gefüllte Eppis gegeben. Zur Extraktion der Steroide wurden die Proben 10 min geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung bei 10.000 g zentrifugiert. Die Wasserphase wurde im Ethanol-Trockeneisbad ausgefroren und die Etherphase zum Abdampfen in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Vor der Radio-HPLC Analyse wurden die Steroide in 200 µl Methanol resuspendiert.

3.4 DU145 Mikrosomenassay

Als Enzymquelle diente die DU145 Mikrosomenpräparation wie in Kapitel VIII.1.6 beschrieben. Das aliquotierte Enzym (8 Millionen aufgeschlossene Zellen / ml) wurde schonend auf Eis aufgetaut.

Testvorbereitung

Die zu testenden Hemmstoffe wurden in Methanol gelöst und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Für den jeweils letzten Verdünnungsschritt wurde Tris-Test-Puffer verwendet.

Um zu verhindern, dass die Enzymreaktion aus Cosubstratmangel zum Erliegen kommt, wurde dem Reaktionsansatz ein NADPH regenerierendes System zugesetzt. Dieses wurde immer frisch ca. eine halbe Stunde vor dem Start des Assays in Tris-Test-Puffer (pH 7,4) angesetzt (siehe Kapitel VII.4.8) und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

Teststart

Der Inkubationsansatz besaß ein Endvolumen von 500 µl und enthielt je Reaktionsgefäß 0,55 mM NADP, 5 mM Glucose-6-phosphat, 0,625 U/ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 105 nM Androstendion Lösung inklusive 5 nM [1β - ^3H (N)]-Androsten-4-en-3,17-dion (entspricht einer Radioaktivitätsmenge von 63,25 nCi) und 2% Methanol mit oder ohne Hemmstoff (25 µl). Durch Zugabe von DU145 Mikrosomenpräparation (im Assay 2 Millionen zerstörte Zellen) mittels Multistepper wurde die Reaktion in getakteten Intervallen gestartet und kurz durch Vortexen gemischt.

Zur optimalen Durchmischung der Proben während der Inkubation, wurde für 60 min ein Schüttelinkubator bei 150 rpm und 37 °C verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit betrug die Konversion von Androstendion zu Androstandion ungefähr 25 %.

Teststopp

Zum Abstoppen wurde der Ansatz auf Eis gestellt und in gleichmäßigen Abständen mit 1000 µl kaltem Diethylether versetzt. Zur Extraktion der Steroide wurde die Mischung 10 min geschüttelt und bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Einfrieren der Wasserphase im Ethanol-Trockeneisbad konnte die Etherphase vorsichtig abdekantiert und in neue Eppendorf-Gefäße überführt werden.

Nach Abdampfen des Ethers wurden die Proben in 50 µl Methanol resuspendiert und mit Radio-HPLC analysiert.

3.5 HEK-I und HEK-II Homogenatassay

Die in Kapitel VIII.1.8 beschriebenen HEK-Zellhomogenate dienen als Enzymquelle für die folgenden Assays. Die eingefrorenen Aliquots wurden schonend auf Eis aufgetaut und nach Bedarf mit Tris-HCl Puffer verdünnt. Für den HEK-I zellfreien Assay wurden 1 Million und für den HEK-II Homogenatassay 0,4 Millionen aufgeschlossene Zellen eingesetzt.

Testvorbereitung

Die zu testenden Hemmstoffe wurden in Methanol gelöst und auf die gewünschte Konzentration verdünnt, wobei für den jeweils letzten Verdünnungsschritt Tris-Test-Puffer verwendet wurde.

Ungefähr eine halbe Stunde vor dem Start des Assays wurde das NADPH-regenerierende System in Tris-Test-Puffer (pH 7,4) angesetzt (siehe Kapitel VII.4.8) und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

Teststart

Der Inkubationsansatz enthielt je Reaktionsgefäß 0,55 mM NADP, 5 mM Glucose-6-phosphat, 0,625 U/ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 505 nM Androstendion Lösung inklusive 5 nM [1β - $^3\text{H}(\text{N})$]-Androsten-4-en-3,17-dion (entspricht einer Radioaktivitätsmenge von 63,25 nCi) und 2 % Methanol mit oder ohne Hemmstoff (25 μl). Durch Zugabe von HEK-Zellhomogenat mittels Multistepper wurde die Reaktion in gleichen Zeitintervallen gestartet und kurz durch Vortexen gemischt. Das Gesamtvolumen betrug 500 μl .

Der Ansatz wurde für 30 min im Schüttelinkubator bei 150 rpm und 37 °C belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit betrug die Konversion von Androstendion zu Androstandion ungefähr 25 % für den HEK-I und den HEK-II Zellhomogenatassay.

Teststopp

Der Ansatz wurde zum Abstoppen auf Eis gestellt. Substrat und entstandenes Produkt wurden sofort extrahiert durch Zugabe von 1000 μl kaltem Diethylether in

gleichmäßigen Abständen. Die Mischung wurde 10 min geschüttelt und zur Phasentrennung bei 10.000 g zentrifugiert. Nach Einfrieren der Wasserphase im Ethanol-Trockeneisbad konnte die Etherphase vorsichtig abgetrennt werden und in neue Eppendorf-Gefäße überführt werden.

Nach Abdampfen des Ethers wurden die Proben in 50 µl Methanol resuspendiert und mit Radio-HPLC analysiert.

3.6 5 α R-Aktivitätsmessung mittels Radio-HPLC

Die Analyse wurde mit Hilfe eines HPLC-Systems von Agilent (Series 1100) und eines HPLC Radioflow Detektors (LB 509) von Berthold durchgeführt. Zur Trennung der Steroide wurde als stationäre Phase eine C18 Reversed Phase Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec, Macherey-Nagel) mit der entsprechenden Vorsäule verwendet.

Sowohl zur Trennung von Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) als auch zur Trennung von Andostendion (AD) und Andostandion (DHAD) konnte dieselbe HPLC Methode verwendet werden.

Die Identität der Steroide wurde sowohl durch Vergleich der Retentionszeiten der markierten Reinsubstanzen als auch durch Verwendung von internen, unmarkierten Standards bestätigt. Zur Herstellung der unmarkierten Standards wurden T, DHT, AD und DHAD zu 1 mg/ml (m/V) in Methanol gelöst und die UV-Absorption bei 205 nm aufgenommen.

Der Autosampler injizierte von jeder Probe 12 µl. Die Steroide wurden unter isokratischen Bedingungen mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (65 / 35, v/v) und einem Fluss von 0,325 ml / min (entspricht je nach Qualität der Säule einem Druck von etwa 275 mbar) eluiert. Im Säulenofen wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt, um die Gleichmäßigkeit der Analyse zu gewährleisten.

Die Detektion der radioaktiven Strahlung erfolgte nach dem Prinzip des Szintillationszählers (erweitert um Koinzidenzschaltung). Das Eluat wird durch die Messzelle geleitet, die sich zwischen den Kathoden zweier Photovervielfacher befindet. Die radioaktive Strahlung im Eluat ruft durch Anregung lumineszierender Substanzen (Flüssigszintillator Quickszint Flow 302, Zinsser Analytic) Lichtblitze hervor, deren Häufigkeit proportional zur auftretenden Strahlungsintensität ist (nach

Berthold Radioflow Detektors LB 509 Manual). Die Zumischung des Szintillators erfolgte mit einem Fluss von 1 ml / min.

Einstellungen des Radioflow Detektors LB 509:

Nuclid: ^3H

Cell Model: Z (für Zumischzelle)

Ratem.-Units: cpm (Ratemeter-Einheit, Dimension für die Pulsrate)

L-Range: 10K (Grobstufung für den Niedrigenergiekanalbereich)

L-Range: 10K (Feinstufung für den Niedrigenergiekanalbereich)

Peak-FwhM (sec): 15 (Peak-Halbwertsbreite)

L-Time-C (FWHM): 0.5 (Niedrigenergiekanal-Zeitkonstante, Zeitkonstante der Glättung)

Ein Analysenlauf dauerte 12 min bis zur vollständigen Elution der Steroide. Durch Integration der Peak-Flächen der resultierenden Chromatogramme mit Hilfe der Auswertesoftware ChemStation[®] konnte die Konversion der Enzymreaktionen bestimmt werden.

3.7 Bestimmung von prozentualen Hemmwerten und IC_{50} -Werten

Zur Berechnung des prozentualen Hemmwertes einer Verbindung wurde der Prozentsatz an gebildetem DHT (wenn T als Substrat verwendet wurde) oder DHAD (wenn AD als Substrat verwendet wurde) durch HPLC-Analyse bestimmt. Die ungehemmten Proben dienten dabei als 100%-Kontrollwerte. Als Standardkonzentrationen in den Proben mit Hemmstoff wurden 10 μM oder 2 μM Lösungen verwendet. Mehrfachwerte einer Inkubation wurden gemittelt (mindestens Doppelwerte), wobei die Abweichungen zwischen den Einzelwerten nicht mehr als 10 % betragen sollte. Alle Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt.

Von den Substanzen, die prozentuale Hemmwerte von mindestens 75 % (Standardkonzentration 10 μM) oder 50 % (Standardkonzentration 2 μM) aufwiesen, wurden IC_{50} -Werte ermittelt.

Der IC₅₀-Wert ist definiert als die Konzentration an Hemmstoff, die eine enzymatische Reaktion zu 50 % hemmt. Erhalten wurde er durch die Bestimmung der prozentualen Hemmdaten bei mindestens drei unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen, die im linearen Bereich der sigmoiden IC₅₀-Wert-Kurve liegen müssen. Die Kalkulation der IC₅₀-Werte erfolgte schließlich durch lineare Regression (log der Hemmstoffkonzentrationen gegen prozentuale Hemmwerte), wobei die erhaltene Gerade mindestens einen Regressionskoeffizienten von $r = 0,98$ aufweisen musste. Alle IC₅₀-Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt.

3.8 K_M-Wert-Bestimmung

Der K_M-Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms halb maximal ist. Die apparenten K_M-Werte für die verschiedenen Enzymassays wurden durch Inkubation bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Dabei wurde die Konversion des Substrates AD zum Produkt DHAD nach den jeweiligen Inkubationszeiten quantifiziert und in eine nach Lee und Wilson modifizierte Lineweaver-Burk-Gleichung eingesetzt.¹³³ Der K_M-Wert kann dann als Kehrwert des negativen X-Achsenabschnitts der Auftragung $1/v^*$ gegen $1/s^*$ abgelesen werden.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{Lineweaver-Burk}$$

$$\frac{1}{v^*} = \frac{K_M}{v_{\max}} * \frac{1}{S^*} + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{Lee-Wilson}$$

Bei der Modifikation des Lineweaver-Burk - Plots nach Lee und Wilson wird v gegen $v^* = (S_0 - S_t) / t$ und S gegen $S^* = (S_0 + S_t) / 2$ ersetzt. Bei S_0 und S_t handelt es sich um die Substratkonzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ bzw. t . Der Vorteil der Lee-Wilson-Näherung liegt darin, dass die mittlere Substratkonzentration S^* sich der tatsächlichen Konzentration während des Experiments stärker annähert. Dies führt zu einer geringeren Fehleranfälligkeit bei kleineren Substratkonzentrationen.

4. Testung auf Stabilität / Labilität

4.1 Puffer-Stabilität

Von den zu testenden Substanzen wurden 1 mM Stammlösungen in Methanol hergestellt. Zum Stabilitätstest wurden die Ester (Konzentration im Assay: 20 μM) mit PBS-Puffer (pH 7,4) in einem Gesamtvolumen von 250 μl bei 37 °C inkubiert. Um eine gute Durchmischung der Proben zu gewährleisten, wurde der Versuch in einem Schüttelinkubator bei 150 rpm durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μl 0,1 N HCl in Acetonitril gestoppt und die Proben anschließend mit 2000 g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden je Aliquots von 500 μl entnommen und unter Stickstoff-Zufuhr zur Trockne eingedampft. Bevor die Proben per HPLC-MS/MS (oder HPLC) analysiert werden konnten, wurden sie in 50 μl Methanol resuspendiert und in Glasvials überführt.

100% - Werte wurden von jeder Substanz durch direkte Extraktion von gespiktem Puffer hergestellt und die Versuchsergebnisse relativ dazu berechnet. Entsprechend extrahierte Puffer-Proben ohne Testsubstanz dienten als Nullwerte. Alle Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt.

4.2 Stabilität in humanem Plasma

Das in Kapitel VIII.2.3 beschriebene menschliche Plasma wurde nach dem Auftauen zu 80 % mit PBS-Puffer verdünnt. Durch diesen Verdünnungsschritt konnte das Plasma leichter pipettiert werden, und der pH-Wert während des Assays wurde konstant gehalten. Die Gesamtesterase-Aktivität wurde jeweils vor einem Stabilitätstest mittels PNPA bestimmt.

Zum Stabilitätstest wurde nun ebenso verfahren wie bei den Stabilitätsuntersuchungen in PBS-Puffer. Die zu testenden Substanzen wurden in einer Endkonzentration von 20 μM mit humanem Plasma in einem Gesamtvolumen von 500 μl inkubiert. Der Assay wurde in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 500 μl 0,1 N HCl in Acetonitril versetzt. Dadurch wurden die löslichen Plasma-Proteine sofort ausgefällt und die

enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C wurden vom Überstand 500 µl – Aliquots entnommen und unter Stickstoff-Zufuhr zur Trockne eingedampft. Zur HPLC-MS/MS (oder HPLC) Analyse wurden die Proben in 50 µl Methanol gelöst und in Glasvials überführt.

Die 100% - Werte ergaben sich aus direkt extrahierten, gespikten Plasma-Proben. Als Nullwerte wurden Plasma-Proben ohne Testsubstanz verwendet. Alle Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt.

4.3 Labilität in BPH-Homogenat

Bei diesem Assay wurde ebenso verfahren wie bei den Stabilitätstests in PBS-Puffer und humanem Plasma. Aliquots des in Kapitel VIII.2.4 beschriebenen BPH-Homogenats wurden schonend auf Eis aufgetaut. Vor der Verwendung zum Labilitätstest wurde die Gesamtesterase-Aktivität bestimmt. Kontrollen und 100% - Werte wurden ebenfalls wie vorher beschrieben durchgeführt.

4.4 Stabilität in Rattenprostata-Homogenat

Die Vorgehensweise war analog zum Stabilitätstest in humanem Plasma. Es wurde das in Kapitel VIII.2.5 aufgeführte Rattenprostata-Homogenat verwendet, dessen Gesamtesterase-Aktivität vor der Testung bestimmt wurde. Analoge Kontrollen und 100% - Werte wurden durchgeführt.

4.5 Auswertung mittels HPLC

Aufgrund der geringeren Detektionsgrenze (im Vergleich zur Detektion mit HPLC-MS/MS) wurden die Stabilitätstest in Puffer, Plasma und BPH-Homogenat für die Auswertungen mittels HPLC im 4-fachen Assay-Volumen (1000 µl Gesamtvolumen) durchgeführt.

Die Substrat- (Ester) und Produkt- (Säure) Peaks wurden mittels DAD detektiert. Die Abnahme der Ester wurde in einem Absorptionsmaximum bei 275 nm quantifiziert.

Die Entstehung der korrespondierenden Säure wurde dabei entsprechend beobachtet. Die Identifikation der Verbindungen aus den Proben wurde mit Hilfe der Reinsubstanzen anhand ihrer Retentionszeiten und der Peakreinheitsprüfung (Spektrenvergleich mittels DAD) durchgeführt. Vor der Testung wurde die Detektionsgrenze für jede Substanz ermittelt. Außerdem wurde überprüft, ob zwischen der Konzentration der Analyten und des DAD-Signals eine lineare Proportionalität innerhalb des Arbeitsbereiches besteht, indem Kalibrierkurven aufgenommen wurden.

Als stationäre Phase wurde eine RP-Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec) mit entsprechender Vorsäule (CC 8/3 Nucleodur 100-3 C18 ec) benutzt. Die mobile Phase A bestand aus Wasser mit 0,5 % Essigsäure und die mobile Phase B aus Acetonitril mit 0,5 % Essigsäure. Um Ester und Säure unter Baseline-Trennung zu eluieren wurde bei einem Fluss von 0,5 ml/min folgendes Gradientenprogramm verwendet:

0 – 8 min B wurde von 70 % auf 100 % erhöht

8 – 10 min 100 % B bis zur vollständigen Elution der Substanzen

Das Injektionsvolumen betrug 25 µl und die Säulentemperatur 30 °C.

4.6 Auswertung mittels HPLC-MS/MS

Zur Quantifizierung wurde ein Triple Quadrupol Massenspektrometer mit einem Elektrospray Interface (ESI) verwendet. Zuvor wurden die zu analysierenden Substanzen über eine RP-Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec) bei 21 °C Raumtemperatur unter Verwendung des nachfolgend beschriebenen Gradienten getrennt.

Die mobile Phase A bestand aus Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure und die mobile Phase B aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure. Innerhalb der ersten Minute wurden die in den Proben enthaltenen Salze unter Verwendung des Schaltventils mit 60 % A und 40 % B in den Abfall geleitet. Nach Umschalten des Ventils wurden die Substanzen zur Quantifizierung in die Ionenquelle eluiert. Innerhalb einer Minute wurde der Anteil an Fließmittel A von 60% auf 100% erhöht. Die Länge eines Analysenlaufs wurde aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der

Substanzen entsprechend angepasst. 2 Minuten vor Beginn des nächsten Runs wurde die Säule wieder auf 60 % A und 40 % B eingespült.

Das Injektionsvolumen betrug 15 µl und der Fluss 350 µl/min. Als interner Standard wurde den Proben Testosteron (10 µM) zugesetzt. Alle Detektionsparameter für $[M+H]^+$ Ionen wurden automatisch mittels Software optimiert. Die Polarität für die Ionisierung war positiv, und als Scan Mode wurde Selected Reaction Monitoring (SRM) gewählt. Zusätzlich wurden noch mit Hilfe des angeschlossenen PDA UV-Signale bei 230 nm und 275 nm aufgezeichnet. Die Detektionsgrenze und die Linearität zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal wurde für jede Substanz überprüft.

In Tabelle VIII.2 sind jeweils die Massen der Ausgangsverbindungen und die Massen der ausgewählten Produkte inklusive der verwendeten Kollisionsenergie (CE) angegeben.

Tabelle VIII.2: Gemessene Massen von Ausgangssubstanz und Produkt

Verbindung	Ausgangsmasse	Produkt Masse	CE
Testosteron	289,0	109,1	30
1	424,3	324,2	40
1a	438,6	232,2	34
ZS1a	437,3	183,1	36
2	442,4	342,3	38
2a	456,5	356,3	38
3	454,2	248,2	28
3a	468,2	262,1	32
3b	482,2	276,3	30
3c	496,3	290,1	30
3d	496,3	290,3	28
3f	510,3	304,2	28
ZS3a	467,5	261,2	28
5	344,3	218,1	26
5a	358,2	232,2	26
6	362,3	236,1	28
6a	376,3	250,1	28
7	374,2	248,2	24
7a	388,3	262,2	22
10	458,3	358,1	38
10a	472,4	372,3	40
11	502,2	420,1	36
11a	516,2	310,2	38
FP13	430,3	324,2	30
FP13a	444,2	338,2	32
FP14	442,3	248,1	24
FP14a	456,3	262,2	24
FP18	410,3	230,4	22
FP18a	424,3	135,2	34

5. DU145 Permeationsassay

Genau 24 Stunden vor der Durchführung des Experiments, wurden die zu etwa 80 % konfluenten DU145 Zellen abgeerntet und auf einer 6-well-Kulturplatte neu ausgesät. Dazu wurden in ein well $1 \cdot 10^6$ Zellen gegeben, die in 3 ml frischem Medium (RPMI 1640, 10 % FKS) resuspendiert waren. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium über den adhären Zellen abgezogen und der Monolayer mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden 3 ml frisches Medium (RPMI 1640, serumfrei) inklusive 20 μ M der zu testenden Verbindung (Stammlösung 1 mM in Methanol) zugegeben und die Kulturplatten 3 h bei 37 °C im Zellinkubator belassen.

Nach der Inkubation wurde jeweils der Überstand mit einer Pipette entnommen und in frische Falcons überführt. Die Zellen wurden zweimal mit 3 ml FKS-freiem Kulturmedium gewaschen, ohne dabei den Monolayer zu beschädigen, und die Waschflüssigkeiten mit den entsprechenden Überständen vereinigt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin versetzt und von der Oberfläche mit 2 x 3 ml Kulturmedium abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Ultraschallstabes aufgeschlossen, indem 5 mal für jeweils 15 s mit 50 s Kühlpause auf höchster Stufe homogenisiert wurde.

Die gewonnenen Proben (Überstände und Zellhomogenate) wurden mit 1 M HCl auf pH \approx 2 gebracht und mit dem doppelten Volumen an Diethylether extrahiert. Die Wasserphase wurde schließlich im Ethanol-Trockeneis-Bad eingefroren, die Etherphase in frische Falcons (50 ml) überführt und zur Trockne eingedampft. Der gesamte Probeninhalt eines Falcons wurde mit 1900 μ l Methanol quantitativ gelöst, in 2ml-Eppendorf-Gefäße überführt und erneut über Stickstoff eingedampft.

Zur Detektion mittels HPLC-MS/MS wurden die Proben in 100 μ l Methanol resuspendiert. Die Methoden zur Messung und die Auswertungen erfolgten wie in Kapitel 4.6 beschrieben.

Die Effizienz der Extraktion wurde für jede Testsubstanz bestimmt. Als 100%-Werte dienten gespikete, direkt extrahierte Proben aus den jeweiligen Medien (Zellkulturüberstand oder Zellhomogenat). Alle Werte wurden in unabhängigen Tests mindestens 3 mal bestimmt. Die Zellzahl wurde immer auch nach dem Experiment bestimmt und in der Ergebnisauswertung berücksichtigt.

IX. Synthese

1. Allgemeines

¹H-NMR-Spektroskopie

¹H-NMR Spektren wurden auf einem Bruker (Karlsruhe, Germany) DRX-500 Spektrometer (500 MHz) gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind als δ -Werte (ppm) relativ zum einem internen Standard (Tetramethylsilan oder Lösungsmittelpeak) angegeben.

Abkürzungen der Signale: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Doublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett).

Die Kopplungskonstanten (J) sind in Herz (Hz) angegeben.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Stuart Schmelzpunkt Apparatur SMP3, Bibby Sterlin (Essex, United Kingdom) gemessen. Die Aufheizrate betrug hierbei 6 °C / min.

Chromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Merck Kieselgel 60 (40 – 63 μ M) verwendet. Alle Reaktionsabläufe wurden mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Dabei wurden Alugram[®] Silica G / UV₂₅₄ Platten von Macherey-Nagel verwendet.

Massenspektrometrie

Die Masse der Endverbindungen wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt, indem ohne vorherige chromatographische Trennung die jeweilige Substanz direkt in die Ionenquelle (ESI) geleitet und ein Massenscan durchgeführt wurde. Die Reinheitsbestimmungen mittels HPLC-MS/MS wurden, wie in Kapitel IX.4 beschrieben, durchgeführt.

2. Methoden

Methode A

***N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon (1z)**

Eine Mischung aus Dicyclohexylelessigsäure (0,1 mol), einem Tropfen *N,N*-dimethylformamid (DMF) und Thionylchlorid (50 ml) wurde für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde Thionylchlorid abdestilliert und als Rückstand erhielt man Dicyclohexylacetylchlorid, das ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde.

Dicyclohexylacetylchlorid (0,1 mol) wurde in 20 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst. Dazu wurde 4-Piperidon Monohydrat-Hydrochlorid (0,1 mol) und Triethylamin (40 ml, 0,3 mol) in trockenem CH_2Cl_2 (170 ml) getropft. Die Lösung wurde für 2 h gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 mal 20 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert.

Aufreinigung durch Umkristallisation (Hexan / Ethylacetat)

Ausbeute 68 %

Weißer Kristalle

Schmelzpunkt 48 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.94 - 1.16 (m, 11H, Cyclohexan H), 1.56 (s, 1H, -COCH-), 1.69 (bs, 11H, Cyclohexan H), 2.46 (t, 4H, J = 6 Hz, pip. H), 3.86 und 3.93 (2t, 4H, J = 6 Hz, pip. H)

$\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ (305,45)

***N*-(2-Propyl)pentanoyl-4-piperidon (5z)**

Synthetisiert aus 2-Propylpentansäurechlorid.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 73 %

gelbliches Öl

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.88-1.43 (m, 14H, Propylpentan H), 2.76 (s, 1H, -COCH-), 2.47 (s, 4H, pip. H), 3.85 und 3.93 (2t, 4H, breit, J = 6 Hz, pip. H)

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ (225,33)

Methode B

4-Bromomethyl-benzoesäuremethylester (1y)

Eine Mischung aus 4-Methyl-benzoesäuremethylester (67 mmol), NBS (N-Bromsuccinimid, 70 mmol) und AIBN (2,2'-Azobisisobutyronitril, 400 mg) in CCl_4 (150 ml) wurde unter Stickstoff für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Die Mischung wurde gekühlt und das unlösliche Material abfiltriert. Das zur Trockene eingedampfte Filtrat enthielt das Produkt.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 75 %

weißer Feststoff

Schmelzpunkt 54 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 3.89 (s, 3H, -COOCH₃), 4.49 (s, 2H, Ar-CH₂-Br), 7.44 und 8.02 (d, AA'BB', 4H, J = 8.4 Hz, aromat. H)

$\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_2$ (229,07)

4-Bromomethyl-3-fluoro-benzoesäuremethylester (2y)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Thomas et al.¹⁵⁸

Synthetisiert aus 3-Fluoro-4-methylbenzoesäuremethylester.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 62 %

Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.98 (s, 3H, COOCH₃), 4.50 (s, 2H, Ar-CH₂-Br), 7.22 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, aromat. H), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, aromat. H), 7.69 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, aromat. H)

C₉H₈O₂BrF (247,08)

4-Bromomethyl-3-methoxy-benzoesäuremethylester (3y)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Griera et al.¹³⁹

Synthetisiert aus 3-Methoxy-4-methylbenzoesäuremethylester .

Aufreinigung durch Umkristallisation (Hexan / Ethylacetat)

Ausbeute: 83 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 73 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, COOCH₃), 4.55 (s, 2H, Ar-CH₂-Br), 7.39 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromat. H), 7.54 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, aromat. H), 7.61 (dd, 1H, *J* = 7.8 Hz und *J* = 1.6 Hz, aromat. H)

C₁₀H₁₁O₃Br (259,09)

(4-Bromomethyl-phenyl)-essigsäuremethylester (4y)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Chauffe et. al.¹⁴¹

Synthetisiert aus p-Tolylsäuremethylester.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 61 %

Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.60 (s, 2H, -CH₂COOCH₃), 3.68 (s, 3H, -CH₂COOCH₃), 4.48 (s, 2H, Ar-CH₂-Br), 7.26 und 7.35 (d, AA'BB', 4H, J = 8 Hz, arom. H)

C₁₀H₁₁BrO₂ (243,10)

4-Bromomethyl-3-chloro-benzoesäuremethylester (10y)

Synthetisiert aus 3-Chloro-4-methylbenzoesäuremethylester.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 56 %

Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.88 (s, 3H, COOCH₃), 4.50 (s, 2H, Ar-CH₂-Br), 7.41 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.79 (d, 1H, J = 9.7 Hz, arom. H), 7.95 (m, 1H, arom. H)

C₉H₈BrClO₂ (263,52)

3-Bromo-4-bromomethyl-benzoessäuremethylester (11y)

Synthetisiert aus 3-Bromo-4-methylbenzoessäuremethylester.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 46 %

Öl

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ = 3.91 (s, 3H, COOCH_3), 4.57 (s, 2H, Ar- CH_2 -Br), 7.52 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.93 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 8.09 (s, 1H, arom. H)

$\text{C}_9\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}_2$ (307,97)

Methode C**(4-Methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid (1x)**

Eine Mischung aus 4-Bromomethyl-benzoessäuremethylester **1y** (22 mmol) und Triphenylphosfin (22 mmol) in trockenem Toluol wurden unter Rückfluss für 5 h erhitzt. Die klare Lösung wurde aufgrund des ausfallenden Salzes schnell trüb. Um das Produkt zu erhalten, wurde das Präzipitat nach Kühlung abfiltriert.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 70 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 238 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ = 3.87 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 5.65 (d, 2H, J (H,P) = 15 Hz, $-\text{CH}_2\text{-PPh}_3^+\text{Br}^-$), 7.55 und 7.76 (d, AA'BB', 4H, J = 8.4 Hz, arom. H), 7.62 – 7.77 (m, 15H, $\text{PPh}_3^+\text{Br}^-$)

$\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{P Br}$ (491,36)

(2-Fluoro-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid (2x)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Thomas et al.¹⁵⁸

Synthetisiert aus 4-Bromomethyl-3-fluoro-benzoesäuremethylester **2y**.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 70 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 226 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.88 (s, 3H, -COOCH₃), 5.71 (d, 2H, *J* (H,P) = 15 Hz, -CH₂-PPh₃⁺Br⁻), 7.47 (d, 1H, *J* = 8 Hz, arom. H), 7.62 – 7.84 (m, 15H, PPh₃⁺Br⁻ überlappend mit 2H, arom. H).

C₂₇H₂₃O₂BrPF (509,35)

(2-Methoxy-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid (3x)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Grier et al.¹³⁹

Synthetisiert aus 4-Bromomethyl-3-methoxy-benzoesäuremethylester **3y**.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 83 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 220 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.27 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (s, 3H, -COOCH₃), 5.49 (d, 2H, *J* (H,P) = 15 Hz, -CH₂-PPh₃⁺Br⁻), 7.25 (d, 1H, *J* = 8 Hz, arom. H), 7.49 (d, 1H, *J* = 8 Hz, arom. H), 7.56 – 7.77 (m, 15H, PPh₃⁺Br⁻ überlappend mit 1H, arom. H)

C₂₈H₂₆O₃PBr (521,39)

(4-Methoxycarbonylmethyl-benzyl)-triphenyl-phosphoniumbromid (4x)

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Chauffe et. al.¹⁴¹

Synthetisiert aus (4-Bromomethyl-phenyl)-essigsäuremethylester **4y**.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 65 %

Weißes Pulver

Schmelzpunkt: 222 – 223 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.53 (s, 2H, -CH₂COOCH₃), 3.67 (s, 3H, -CH₂COOCH₃), 5.40 (d, 2H, *J* (H, P) = 14,3 Hz -CH₂-PPh₃⁺ Br⁻), 7.00-7.08 (m, 4H, aromat. H), 7.59-7.81 (m, 15H, PPh₃⁺ Br⁻)

C₂₈H₂₆O₂PBr (505,39)

(2-Chloro-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid (10x)

Synthetisiert aus 4-Bromomethyl-3-chloro-benzoessäuremethylester **10y**.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 67 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 226 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 3.83 (s, 3H, -COOCH₃), 5.73 (d, 2H, *J* (H,P) = 14.8 Hz, -CH₂-PPh₃⁺Br⁻), 7.17 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, aromat. H), 7.56 – 7.77 (m, 15H, PPh₃⁺Br⁻ überlappend mit 1H, aromat. H)

C₂₇H₂₃O₂BrPCl (525,82)

(2-Bromo-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid (11x)

Synthetisiert aus 4-Bromomethyl-3-bromo-benzoesäuremethylester **11y**.

Verwendet ohne weitere Aufreinigung

Ausbeute: 74 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 234 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 3.90 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 5.87 (d, 2H, $J(\text{H,P}) = 14.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-PPh}_3^+\text{Br}^-$), 7.63 – 7.83 (m, 15H, $\text{PPh}_3^+\text{Br}^-$ überlappend mit 1H, aromat. H), 8.03 (s, 1H, aromat. H)

$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{Br}_2\text{P}$ (570,27)

Methode D**4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester (1a).**

Die Synthese erfolgte analog der Methode von Picard et al.¹¹¹

Eine Suspension von (4-Methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **1x** (9,6 mmol) in trockenem THF (40 ml) wurde unter Stickstoff auf -78°C abgekühlt. Danach wurde eine Lösung von Butyllithium (1,6 M in Hexan, 9,6 mmol) langsam zugetropft. Nach etwa 5 min begann sich die Lösung orange zu färben.

N-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon **1z** in trockenem THF (30 ml) wurde schließlich bei Raumtemperatur zugetropft und die resultierende Lösung über Nacht weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abrotiert, der Rückstand in CH_2Cl_2 (75 ml) gelöst und 2 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die Lösung wurde dann über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel abdestilliert.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2)

Ausbeute: 53 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 74 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.89-1.73 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.43 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.50-3.78 (m, breit, 4H, pip. H), 3.91 (s, 3H, -COOCH₃), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.17-7.96 (m, 4H, aromat. H)

$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_3$ (437,63)

MS: 438,6 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäuremethylester (3a)

Synthetisiert aus (2-Methoxy-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphonium-bromid **3x** und *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon **1z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2)

Ausbeute: 59 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 123 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.83-1.69 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.54-3.78 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 3.91 (s, 3H, -COOCH₃), 6.38 (s, 1H, vinyl-H), 7.17 (d, 1H, J = 7.9 Hz, aromat. H), 7.54 (s, 1H, aromat. H), 7.61 (d, 1H, J = 7.9 Hz, aromat. H).

$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_4$ (467,64)

MS: 468,2 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

**{4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-phenyl}-
essigsäuremethylester (4a)**

Synthetisiert aus (4-Methoxycarbonylmethyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **4x** und *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon **1z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2)

Ausbeute: 23%

Öl

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.83-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.24-2.41 (m, 4H, pip. H), 2.60 (m, 1H, -COCH-), 3.48-3.65 (m, breit, 4H, pip. H), 3.54 (s, 2H, -CH₂COOR), 3.73 (s, 3H, -COOCH₃), 6.35 (d, 1H, vinyl-H), 7.15 und 7.22 (d, AA`BB`, 4H, J = 8.19 Hz, aromat. H)

C₂₉H₄₁NO₃ (451,66)

MS: 452,4 m/z (M+H)⁺

**4-[1-(2-Propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester
(5a)**

Synthetisiert aus (4-Methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **1x** und *N*-(2-Propyl)pentanoyl-4-piperidon **5z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (7,5 / 2,5)

Ausbeute: 27 %

Öl

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ = 0.78-1.36 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl H), 1.97 (m, 1H, -COCH-), 2.29-2.45 (m, 4H, pip. H), 3.45-3.67 (3t, J = 6, 4H pip. H), 3.84 (s, 3H, -COOCH₃), 6.34 (d, 1H, vinyl-H), 7.17 and 7.93 (AA`BB`, 4H, J = 8,1 Hz, aromat. H)

$C_{22}H_{31}NO_3$ (357,50)

MS: 358 m/z (M+H)⁺

**Fluoro-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-
benzoesäuremethylester (6a)**

Synthetisiert aus (2-Fluoro-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **2x** und *N*-(2-Propyl)pentanoyl-4-piperidon **5z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (7,5 / 2,5)

Ausbeute: 25 %

Öl

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 0.82-1.50 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl H), 2.24-2.40 (m, 4H, pip. H), 2.80 (m, 1H, -COCH-), 3.50-3.64 (m, 4H, pip. H), 3.86 (s, 1H, -COOCH₃), 6.35 (s, 1H, vinyl-H), 7.45 (m, 1H, aromat. H), 7.66 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz, aromat. H), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz, aromat. H)

$C_{22}H_{30}FNO_3$ (375,49)

MS: 376,3 m/z (M+H)⁺

**3-Methoxy-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-
benzoesäuremethylester (7a)**

Synthetisiert aus (2-Methoxy-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **3x** und *N*-(2-Propyl)pentanoyl-4-piperidon **5z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2)

Ausbeute: 23 %

Öl

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) : δ = 0.76-1.33 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl-H), 2.26-2.37 (m, 4H, pip. H), 2.78 (m, 1H, -COCH-), 3.48-3.62 (m, 4H, pip. H), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 3.85 (s, 1H, -COOCH₃), 6.35 (s, 1H, vinyl-H), 7.28 (m, 1H, arom. H), 7.47 (s, 1H, arom. H), 7.53 (d, 1H, J = 7.88 Hz, arom. H)

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ (387,52)

MS: 388,3 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

3-Chloro-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester (10a)

Synthetisiert aus (2-Chloro-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **10x** und *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon **1z**.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (9 / 1)

Ausbeute: 12 %

Öl

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.85-1.79 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.32-2.52 (m, 4H, pip. H überlappend mit 1H, -COCH-), 3.54-3.79 (m, breit, 4H, pip. H), 3.92 (s, 3H, -COOCH₃), 6.40 (s, 1H, vinyl-H), 7.25 (m, 1H, arom. H), 7.87 (m, 1H, arom. H), 8.06 (s, 1H, arom. H).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClNO}_3$ (472,07)

MS: 472,5 m/z

3-Bromo-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester (11a)

Synthetisiert aus (2-Bromo-4-methoxycarbonyl-benzyl)-triphenylphosphoniumbromid **11x** und *N*-(Dicyclohexyl)acetyl-4-piperidon **1z**. Anstelle von 1,6 M Butyllithium in Hexan wurde Lithiumdiisopropylamid (2 M in n-Hexan) zur Wittig-Reaktion verwendet.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (9 / 1)

Ausbeute: 10 %

Öl

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.93-1.74 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.28-2.47 (m, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.54-3.79 (m, breit, 4H, pip. H), 3.92 (s, 3H, -COOCH₃), 6.35 (s, 1H, vinyl-H), 7.24 (m, 1H, aromat. H), 7.92 (m, 1H, aromat. H), 8.25 (s, 1H, aromat. H).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{BrNO}_3$ (516,52)

MS: 516 m/z, 518 m/z (M+H)⁺

Methode E**4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (1)**

Eine Mischung von 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **1a** (1,2 mmol) und Kaliumcarbonat (0,70 g) in Methanol / Wasser (9 / 1) wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt.

Danach wurde die Lösung mit 1 N HCl angesäuert und mit CH_2Cl_2 (3 mal 30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt erhalten.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 77 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 168 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 0.90-1.65 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.27 and 2.32 (2s, 4H, pip. H), 2.60 (s, 1H, -COCH-), 3.50-3.64 (4s, breit, 4H, pip. H), 6.42 (s, 1H, vinyl-H), 7.21 und 7.91 (d, AA'BB', 4H, J = 7.9 Hz, arom. H), 12.86 (s, 1H, -COOH)

$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NO}_3$ (423,59)

MS: 424,3 m/z (M+H)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure (3)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäuremethylester **3a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 81 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 198 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90-1.65 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.42 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.55-3.80 (m, breit, 4H, pip. H), 3.90 (s, 3H, -OCH₃), 6.40 (s, 1H, vinyl-H), 7.21 (m, 1H, arom. H), 7.59 (s, 1H, arom. H), 7.69 (m, 1H, arom. H), 12.96 (s, 1H, -COOH)

$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_4$ (453,62)

ms: 454,2 m/z (M+H)⁺

{4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-phenyl}-essigsäure (4)

Synthetisiert aus {4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-phenyl}-essigsäuremethylester **4a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 69 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 120 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.83-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.24-2.41 (m, 4H, pip. H), 2.50 (m, 1H, -COCH-), 3.48-3.65 (m, breit, 4H, pip. H), 3.54 (s, 2H, -CH₂COOH), 6.35 (d, 1H, vinyl-H), 7.15 und 7.22 (d, AA`BB`, 4H, *J* = 8.2 Hz, arom. H), 12.33 (s, 1H, -COOH)

C₂₈H₃₉NO₃ (437,63)

MS: 438,3 m/z (M+H)⁺

4-[1-(2-Propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (5)

Synthetisiert aus 4-[1-(2-Propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **5a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 70 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 125 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 0.85-1.44 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl H), 2.10 (m, 1H, -COCH-), 2.39-2.54 (m, 4H, pip. H), 3.52-3.77 (3t, *J* = 6, 4H pip. H), 6.44 (d, 1H, vinyl-H), 7.3 and 8.0 (AA`BB`, 4H, *J* = 8.1 Hz, arom. H), 12.9 (s, 1H, -COOH)

C₂₁H₂₉NO₃ (343,47)

MS: 344,3 m/z (M+H)⁺

Fluoro-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (6)

Synthetisiert aus Fluoro-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **6a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 56 %

Öl

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ = 0.82-1.52 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl-H), 2.25-2.40 (m, 4H, pip. H), 2.80 (s, breit, 1H, -COCH-), 3.50-3.65 (m, 4H, pip. H), 6.35 (s, 1H, vinyl-H), 7.43 (m, 1H, arom. H), 7.64 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz, arom. H), 7.73 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H), 13.2 (s, 1H, -COOH)

C₂₁H₂₈FNO₃ (361,46)

MS: 362,3 m/z (M+H)⁺

3-Methoxy-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (7)

Synthetisiert aus 3-Methoxy-4-[1-(2-propyl-pentanoyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **7a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 73 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 155 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ = 0.76-1.33 (m, 14H, 2-propyl-pentanoyl-H), 2.25-2.38 (m, 4H, pip. H), 2.79 (s, 1H, -COCH-), 3.48-3.62 (m, 4H, pip. H), 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 6.35 (s, 1H, vinyl-H), 7.26 (m, 1H, arom. H), 7.45 (s, 1H, arom. H), 7.51 (m, 1H, arom. H), 12.9 (s, 1H, -COOH)

C₂₂H₃₁NO₄ (373,50)

MS: 374,2 m/z (M+H)⁺

3-Chloro-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (10)

Synthetisiert aus 3-Chloro-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **10a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 71 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 202 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.85-1.79 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.32-2.52 (m, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.54-3.79 (m, breit, 4H, pip. H), 6.40 (s, 1H, vinyl-H), 7.23 (m, 1H, arom. H), 7.86 (m, 1H, arom. H), 8.04 (s, 1H, arom. H), 13.2 (s, 1H, -COOH).

C₂₇H₃₆ClNO₃ (458,05)

MS: 456 m/z, 459 m/z (M+H)⁺

3-Bromo-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäure (11)

Synthetisiert aus 3-Bromo-4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-benzoesäuremethylester **11a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 69 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 209 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.92-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.31-2.51 (m, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.54-3.79 (m, 4H, pip. H), 6.36 (s, 1H, vinyl-H), 7.27 (m, 1H, aromat. H), 7.97 (m, 1H, aromat. H), 8.30 (s, 1H, aromat. H), 13.2 (s, 1H, -COOH)

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{BrNO}_3$ (502,50)

MS: 502,2 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 504,2 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

N-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure (8)

Synthetisiert aus *N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure-methylester **8a**.

Aufreinigung durch Umkristallisation in Cyclohexan

Ausbeute: 92 %

beiger Feststoff

Schmelzpunkt > 330 °C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1.72 (s, 6H, Adamantyl), 1.90 (m, 6H, Adamantyl), 2.04 (bs, 3H, Adamantyl), 6.77 (s, 1H, aromat. H), 8.04 und 8.16 (d, 4H, AA`BB`, J = 8.5 Hz, aromat. H), 12.76 (s, 1H, -CONH-), 12.94 (s, 1H, -COOH).

C₂₁H₂₂N₂O₃S (382,49)

MS: 380,9 m/z (M-H)⁻

Methode F

Die Synthesen zur Veresterung der Carbonsäuren wurden nach der Methode von Kim et al.¹⁴⁰ durchgeführt.

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoessäure-ethylester (3b)

Zu einer Lösung von 4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoessäure **3** (1,5 mmol), Ethylchloroformat (1,5 mmol) und Triethylamin (1,7 mmol) in Dichlormethan (10 ml) bei 0 °C wurde DMAP (0,75 mmol) zugefügt.

Die erhaltene Lösung wurde für mindestens 60 min bei 0 °C gerührt und die Entstehung des Produktes per Dünnschichtchromatographie alle 10 min verfolgt. Nach nahezu vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde die Lösung mit Dichlormethan (30 ml) verdünnt und mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde wiederum mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten Extrakte über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abgezogen.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 91 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 123 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 0.91-1.77 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit 3H -COOCH₂CH₃), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 4.37 (q, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 6.7 Hz, -COOCH₂CH₃), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H)

$C_{30}H_{43}NO_4$ (481,68)

MS: 482,2 m/z (M+H)⁺

**4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-
benzoesäure-propylester (3c)**

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-
benzoesäure **3** und Propylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2)
und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 95 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 135 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 0.91-1.77 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit
5H -COOCH₂CH₂CH₃), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, -COCH-),
3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 4.28 (dt, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 6.7
Hz, -COOCH₂CH₂CH₃), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H),
7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, arom. H)

$C_{31}H_{45}NO_4$ (495,71)

MS: 496,3 m/z (M+H)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure-isopropylester (3d)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure **3** und Isopropylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 84 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 130 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.77 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit (δ = 1.37) 6H - $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, - COCH -), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, - OCH_3), 5.25 (m, 1H, - $\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, J = 7.9 Hz, aromat. H), 7.54 (s, 1H, aromat. H), 7.60 (d, 1H, J = 7.9 Hz, aromat. H)

$\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ (495,71)

MS: 496,3 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure-butylester (3e)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure **3** und Butylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 85 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 139 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit 7H $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, $-\text{COCH}-$), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.33 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H)

$\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{NO}_4$ (509,74)

MS: 510,3 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure-isobutylester (3f)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure **3** und Isobutylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 82 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 137 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit 7H $-\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, $-\text{COCH}-$), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.11 (2d, 2H, $J = 2.5$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $-\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H)

$\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{NO}_4$ (509,74)

MS: 510,3 m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure-hexylester (3g)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure **3** und Hexylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 74 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 146 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit 11H $-\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, $-\text{COCH}-$), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.31 (dt, 2H, $J = 2.7$ Hz, $J = 6.7$ Hz, $-\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, arom. H)

$\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_4$ (537,79)

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure-2,2-dimethyl-propylester (3h)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxy-benzoesäure **3** und 2,2-Dimethyl-propylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 72 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 131 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.78 (m, 22H, cyclohexyl-H, überlappend mit (δ = 1.06) 9H $-\text{COOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, $-\text{COCH}-$), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.03 (s, 2H, $-\text{COOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H)

$\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{NO}_4$ (523,76)

4-[1-(2,2-Dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure-benzylester (3i)

Synthetisiert aus 4-[1-(2,2-dicyclohexyl-acetyl)-piperidin-4-ylidenmethyl]-3-methoxybenzoesäure **3** und Benzylchloroformat.

Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Hexan / Ethylacetat (8 / 2) und anschließender Umkristallisation in Methanol

Ausbeute: 55 %

Weißer Feststoff

Schmelzpunkt 138 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91-1.77 (m, 22H, cyclohexyl-H), 2.40 (m, breit, 4H, pip. H, überlappend mit 1H, $-\text{COCH}-$), 3.55-3.75 (m, breit, 4H, pip. H), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.37 (s, 2H, $-\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6.39 (s, 1H, vinyl-H), 7.16 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H), 7.33-7.46 (m, 5H, arom. H, $-\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.54 (s, 1H, arom. H), 7.60 (d, 1H, J = 7.9 Hz, arom. H).

$\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ (543,75)

4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäuremethylester (9a)

Synthetisiert aus 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure und Methylchloroformat.

Ausbeute: 79 %

Weißes Pulver

Schmelzpunkt 152 – 153 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ = 3.83 (s, 3H, -COOCH₃), 7.12 und 7.75 (d, 4H, AA'BB', J = 8.8 Hz, arom. H), 7.22 und 7.99 (d, 4H, AA'BB', J = 8.8 Hz, arom. H), 7.37 (t, 1H, J = 7.5 Hz, arom. H), 7.47 (t, 2H, J = 7.7 Hz, arom. H), 7.67 (d, 2H, J = d, 2H, J = 7.5 Hz, arom. H)

C₂₀H₁₆O₃ (304,35)

MS: 289,0 m/z (M-CH₃)⁻

Methode G

Die Synthese erfolgte analog der Methode von Igarashi et al.¹³⁷

4-(Biphenyl-4-yloxy)-benzaldehyd (9z)

4-Fluorobenzaldehyd (209 mmol) und 4-Hydroxybiphenyl (209 mmol) wurden in 180 ml trockenem DMF suspendiert. Dann wurde K₂CO₃ (26,5 g) zugegeben und die Suspension bei 160 °C für 6 h unter Stickstoff zum Rückfluss erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde 2M NaOH (450 ml) zugefügt und 30 min gerührt. Die resultierende Suspension wurde anschließend auf 800 ml Eiswasser gegeben und weitere 30 min gerührt. Danach wurden die ausgefallenen Kristalle über einen Büchnertrichter filtriert und mit Wasser nachgewaschen.

Ausbeute: 85 %

Weißes Pulver

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.11$ und 7.62 (d, AA'BB', 4H, $J = 8.4$ Hz, arom. H), 7.15 und 7.86 (d, AA'BB', 4H, $J = 8.8$ Hz, arom. H), 7.35 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, arom. H), 7.45 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, arom. H), 7.58 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, arom. H), 9.98 (s, 1H, -CHO)

$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$ (274,32)

Methode H

Die Synthese erfolgte analog der Methode von Igarashi et al.¹³⁷

4-(Biphenyl-4-yloxy)benzoesäure (9)

Zu einer Lösung von 4-(Biphenyl-4-yloxy)benzaldehyd **9z** (18,6 mmol) in 100 ml THF wurden NaH_2PO_4 (592 mg = 4,8 mmol) in 7,4 ml Wasser und 1,9 ml H_2O_2 (35 %) gegeben. Nachdem 5 min gerührt wurde, wurde NaClO_2 (80 %, 32,6 mmol) in 30 ml H_2O innerhalb einer halben Stunde zugetropft. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel THF wurde im Vakuum evaporiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Nachdem die organische Phase über MgSO_4 getrocknet worden war, wurde das Lösungsmittel abdestilliert und man erhielt das Rohprodukt.

Aufreinigung durch Umkristallisation (Hexan / Ethylacetat)

Ausbeute: 70 %

Weißes Pulver

Schmelzpunkt: 239 °C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : $\delta = 7.09$ und 7.74 (d, 4H, AA'BB', $J = 8.8$ Hz, arom. H), 7.20 und 7.97 (d, 4H, AA'BB', $J = 8.8$ Hz, arom. H), 7.36 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, arom. H), 7.47 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, arom. H), 7.67 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, arom. H), 12.79 (s, 1H, -COOH)

$C_{19}H_{14}O_3$ (290,32)

MS: 289,0 m/z (M-H)⁻

Methode I

Die Synthese erfolgte analog der Methode von Stepanov et al.¹³⁸

5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-ylamin (8z)

Eine Mischung aus 2,6 g α -(Adamant-1-yl)- α -bromoacetaldehyd und 1 g Thiourea wurden unter Rühren 10 min lang auf 200 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 30 ml Ethanol zugegeben und die Mischung für weitere 10 min unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde mit wässriger NH_3 alkalisch gemacht, das Präzipitat abgetrennt und anschließend wieder in einer Mischung aus HCl / Methanol (1 / 5) gelöst. Die Lösung wurde wieder mit wässriger Na_2CO_3 – Lösung alkalisiert und das Amin fiel wieder aus. Das entstandene Produkt wurde abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 67 %

gelbliches Pulver

Schmelzpunkt 161 °C

1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) : δ = 1.69 (s, 6H, Adamantyl), 1.80 (m, 6H, Adamantyl), 1.98 (bs, 3H, Adamantyl), 5.99 (s, 1H, arom. H), 6.73 (s, 2H, -NH₂).

$C_{13}H_{18}N_2S$ (234,37)

Methode J

Die Synthese erfolgte analog der Methode von Stepanov et al.¹³⁸

***N*-(5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-yl)-terephthalamidsäure-methylester (8a)**

4-Chlorocarbonyl-benzoesäuremethylester (5 mmol, 1 g) wurde in 20 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst. Nachdem 5-Adamantan-1-yl-thiazol-2-ylamin **8z** (5 mmol, 1,18 g) und Triethylamin (25 ml) in trockenem CH₂Cl₂ (20 ml) langsam zugetropft wurden, wurde die Lösung für 2 h gerührt. Danach wurde die organische Phase mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Aufreinigung durch Umkristallisation (Hexan / Ethylacetat)

Ausbeute: 63 %

beiges Pulver

Schmelzpunkt > 330 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 1.72 (s, 6H, Adamantyl), 1.88 (m, 6H, Adamantyl), 2.01 (bs, 3H, Adamantyl), 3.16 (s, 3H, -COOCH₃), 6.08 (s, 1H, aromat. H), 7.80 und 7.98 (d, 4H, AA`BB`, *J* = 8.5 Hz, aromat. H), 12.76 (s, 1H, -CONH-).

C₂₂H₂₄N₂O₃S (396,51)

MS: 397,2 m/z (M+H)⁺

3. Elementaranalysen

Verbindung	berechnet			gefunden		
	C	H	N	C	H	N
3b (C ₃₀ H ₄₅ NO ₄)	74.81	9.00	2.91	74.76	8.67	2.95
3c (C ₃₁ H ₄₅ NO ₄)	75.11	9.15	2.83	74.72	8.93	2.91
3d(C ₃₁ H ₄₅ NO ₄)	75.11	9.15	2.83	74.83	8.74	2.87
3e (C ₃₂ H ₄₇ NO ₄)	75.40	9.29	2.75	75.06	9.40	2.72
3f (C ₃₂ H ₄₇ NO ₄)	75.40	9.29	2.75	75.54	9.25	2.73
3g (C ₃₄ H ₅₁ NO ₄)	75.94	9.56	2.60	75.62	9.17	2.58
3h (C ₃₃ H ₄₉ NO ₄)	75.68	9.43	2.67	75.25	9.42	2.66
3i (C ₃₅ H ₄₅ NO ₄)	77.31	8.34	2.58	77.31	8.31	2.58
8 (C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃ S)	65.95	5.80	7.32	64.47	5.94	6.90
8a (C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃ S)	66.64	6.10	7.06	66.44	6.07	6.78
5 (C ₂₁ H ₂₉ NO ₃)	73.44	8.51	4.08	73.23	8.17	3.96
5a (C ₂₂ H ₃₁ NO ₃)	73.92	8.74	3.92	73.55	8.50	3.62
6 (C ₂₁ H ₂₈ FNO ₃)	69.78	7.81	3.88	70.08	8.53	3.74
6a (C ₂₂ H ₃₀ FNO ₃)	70.37	8.05	3.73	70.42	8.43	3.71
7 (C ₂₂ H ₃₁ NO ₄)	70.75	8.37	3.75	70.64	8.11	3.67
7a (C ₂₃ H ₃₃ NO ₄)	71.29	8.58	3.61	70.88	8.60	3.60
11 (C ₂₇ H ₃₆ BrNO ₃)	64.54	7.22	2.79	64.74	6.96	2.63
11a (C ₂₈ H ₃₈ BrNO ₃)	65.11	7.42	2.71	65.01	7.03	2.78

4. Reinheitsbestimmungen mittels HPLC-MS/MS

Ungefähr 0,2 mg Substanz wurden in 1 ml Methanol gelöst und zur Vermessung mittels HPLC-MS/MS in ein Glasvial überführt. Per Autosampler wurden 10 µl der Probenlösung injiziert. Zur chromatographischen Trennung wurde eine RP-Phase-Säule (CC 125/2 Nucleodur 100-3 C18 ec) verwendet und einerseits ein isokratisches Trennprogramm und andererseits ein Gradienten-Programm eingesetzt. Zur Reinheitsprüfung per UV Detektor und per Quadrupole MS Detektor wurde sowohl im "positive ionisation mode" (TIC 50 – 1000 Da) als auch im "negative ionisation mode" (TIC 50 – 1000 Da) gemessen.

Für die isokratische HPLC-Trennung wurde bei einem Fluss von 350 µl/min eine Mischung aus Methanol und Wasser (9/1, v/v) eingesetzt. Beim Gradienten wurde bei demselben Fluss mit einer Mischung aus Methanol und Wasser (7/3, v/v) begonnen und nach 1 Minute der Methanol-Anteil auf 90 % erhöht. Zum Zeitpunkt 6 min wurden die Substanzen dann mit 100 % Methanol eluiert.

Verbindung 10 (C₂₇H₃₆ClNO₃): MS: 456 m/z (negative Scan)
UV-Reinheit 92,0 %

Verbindung 10a (C₂₈H₃₈ClNO₃): MS: 472,5 m/z (positive Scan)
UV-Reinheit 98,4 %

Verbindung ZS1 (C₂₇H₃₈N₂O₂): MS: 423 (M+H⁺) m/z
UV-Reinheit 87,7 %

Verbindung ZS1a (C₂₈H₄₀N₂O₂): MS: 437 (M+H⁺) m/z
UV-Reinheit 99,0 %

Verbindung ZS3a (C₂₉H₄₂N₂O₃): MS: 467 (M+H⁺) m/z
UV-Reinheit 92,2 %

X. Abkürzungen

3HA	Tritiummarkiertes Androstendion
3HT	Tritiummarkiertes Testosteron
5 α R1	3-Oxo-5 α -Steroid- Δ 4-Dehydrogenase Typ I
5 α R2	3-Oxo-5 α -Steroid- Δ 4-Dehydrogenase Typ II
AD	Androsten-4-en-3,17-dion
AGA	Androgenetische Alopezie
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril
aromat.	aromatisch
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCo	Carcinoma Colon (Zellen)
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 * 10 ⁶ Becequerel
DAD	Dioden-Array-Detektor
DHAD	5 α -Andosta-3,17-dion
DHT	Dihydrotestosteron
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ESI	Elektrospray Ionisation
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G418-Sulfat	Geneticindisulfat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney (cells)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IC ₅₀	InhibitorKonzentration für eine 50%-ige Enzymhemmung
IR	Infrarot
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse / Ladung
NADP	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid-phoshat
NADPH	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid-phoshat (reduziert)
n.b.	nicht bestimmt
NBS	N-Bromsuccinimid
NCI	National Cancer Institute (Bethesda, USA)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffer Saline, Phosphat-Kochsalz-Puffer
PCa	Prostata-Karzinom
PDA	Photon Detector Assembly
pip.	Piperidin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPA	p-Nitrophenylacetat
RP	reversed phase
RVP	Rattenventralprostata
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Kulturmedium
s	Sekunde
T	Testosteron
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
UV	Ultraviolettes Licht

XI. Literaturverzeichnis

1. Zitierte Dissertationen

Dissertationsschrift von Marc Klein

Die Terephthalsäure als Baustein für die Entwicklung von Hemmstoffen der Steroid-5 α -Reduktase; Saarbrücken, 1996.

Dissertationsschrift von Eckhard Baston

In vivo aktive Hemmstoffe von Aromatase und 5 α -Reduktase: Synthese, Struktur-Wirkungs-Studien und enzymkinetische Untersuchungen; Saarbrücken, 1997.

Dissertationsschrift von Wolfgang Reichert

Etablierung eukaryontischer Zelllinien zur Expression der 5 α -Reduktase-Isozyme I und II: Evaluierung von Hemmstoffen und molekulargenetische Untersuchungen; Saarbrücken, 2000.

Dissertationsschrift von Franck Picard

In vivo active non steroidal 5 α -reductase inhibitors of the benzylidenepiperidine and biphenyl type: synthesis and biological evaluation; Saarbrücken, 2002.

Dissertationsschrift von Bärbel Ursula Panter

Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der humanen 5 α -Reduktase Typ II; Saarbrücken, 2004.

2. Zitierte Publikationen

- (1) Li, X.; Chen, C.; Singh, S. M.; Labrie, F. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 alpha-oxidoreductase. *Steroids* **1995**, *60*, 430-441.
- (2) Andersson, S.; Russell, D. W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 3640-3644.
- (3) Russell, D. W.; Wilson, J. D. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* **1994**, *63*, 25-61.
- (4) Andersson, S.; Berman, D. M.; Jenkins, E. P.; Russell, D. W. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* **1991**, *354*, 159-161.
- (5) Occhiato, E. G.; Guarna, A.; Danza, G.; Serio, M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 alpha-reductase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2004**, *88*, 1-16.
- (6) Russell, D. W.; Berman, D. M.; Bryant, J. T.; Cala, K. M.; Davis, D. L. et al. The molecular genetics of steroid 5 alpha-reductases. *Recent Prog Horm Res* **1994**, *49*, 275-284.
- (7) Abul-Hajj, Y. J. Stereospecificity of hydrogen transfer from NADPH by steroid 4 -5 - and 4 -5 -reductase. *Steroids* **1972**, *20*, 215-222.
- (8) Suzuki, K.; Tamaoki, B. In vitro metabolism of testosterone in seminal vesicles of rats. *J Steroid Biochem* **1974**, *5*, 249-256.
- (9) Thigpen, A. E.; Silver, R. I.; Guileyardo, J. M.; Casey, M. L.; McConnell, J. D. et al. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* **1993**, *92*, 903-910.
- (10) Luu-The, V.; Sugimoto, Y.; Puy, L.; Labrie, Y.; Lopez Solache, I. et al. Characterization, expression, and immunohistochemical localization of 5 alpha-reductase in human skin. *J Invest Dermatol* **1994**, *102*, 221-226.
- (11) Shirakawa, T.; Okada, H.; Acharya, B.; Zhang, Z.; Hinata, N. et al. Messenger RNA levels and enzyme activities of 5 alpha-reductase types 1 and 2 in human benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue. *Prostate* **2004**, *58*, 33-40.
- (12) lehle, C.; Radvanyi, F.; Gil Diez de Medina, S.; Ouafik, L. H.; Gerard, H. et al. Differences in steroid 5alpha-reductase iso-enzymes expression between

- normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1999**, *68*, 189-195.
- (13) Habib, F. K.; Ross, M.; Bayne, C. W.; Grigor, K.; Buck, A. C. et al. The localisation and expression of 5 alpha-reductase types I and II mRNAs in human hyperplastic prostate and in prostate primary cultures. *J Endocrinol* **1998**, *156*, 509-517.
- (14) Aumuller, G.; Eicheler, W.; Renneberg, H.; Adermann, K.; Vilja, P. et al. Immunocytochemical evidence for differential subcellular localization of 5 alpha-reductase isoenzymes in human tissues. *Acta Anat (Basel)* **1996**, *156*, 241-252.
- (15) Bayne, E. K.; Flanagan, J.; Einstein, M.; Ayala, J.; Chang, B. et al. Immunohistochemical localization of types 1 and 2 5alpha-reductase in human scalp. *Br J Dermatol* **1999**, *141*, 481-491.
- (16) Asada, Y.; Sonoda, T.; Ojiro, M.; Kurata, S.; Sato, T. et al. 5 alpha-reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, *86*, 2875-2880.
- (17) Rocha, E. M.; Wickham, L. A.; da Silveira, L. A.; Krenzer, K. L.; Yu, F. S. et al. Identification of androgen receptor protein and 5alpha-reductase mRNA in human ocular tissues. *Br J Ophthalmol* **2000**, *84*, 76-84.
- (18) Carson, C., 3rd; Rittmaster, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* **2003**, *61*, 2-7.
- (19) Bartsch, G.; Rittmaster, R. S.; Klocker, H. Dihydrotestosterone and the concept of 5alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World J Urol* **2002**, *19*, 413-425.
- (20) Faller, B.; Farley, D.; Nick, H. Finasteride: a slow-binding 5 alpha-reductase inhibitor. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5705-5710.
- (21) Frye, S. V. Discovery and clinical development of dutasteride, a potent dual 5alpha-reductase inhibitor. *Curr Top Med Chem* **2006**, *6*, 405-421.
- (22) McConnell, J. D.; Wilson, J. D.; George, F. W.; Geller, J.; Pappas, F. et al. Finasteride, an inhibitor of 5 alpha-reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **1992**, *74*, 505-508.

- (23) Steiner, J. F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of finasteride. *Clin Pharmacokinet* **1996**, *30*, 16-27.
- (24) Dolder, C. R. Dutasteride: a dual 5-alpha reductase inhibitor for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Ann Pharmacother* **2006**, *40*, 658-665.
- (25) Bramson, H. N.; Hermann, D.; Batchelor, K. W.; Lee, F. W.; James, M. K. et al. Unique preclinical characteristics of GG745, a potent dual inhibitor of 5AR. *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, *282*, 1496-1502.
- (26) Makridakis, N.; Reichardt, J. K. Pharmacogenetic analysis of human steroid 5 alpha reductase type II: comparison of finasteride and dutasteride. *J Mol Endocrinol* **2005**, *34*, 617-623.
- (27) Silver, R. I.; Wiley, E. L.; Davis, D. L.; Thigpen, A. E.; Russell, D. W. et al. Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase 2 in prostate disease. *J Urol* **1994**, *152*, 433-437.
- (28) Silver, R. I.; Wiley, E. L.; Thigpen, A. E.; Guileyardo, J. M.; McConnell, J. D. et al. Cell type specific expression of steroid 5 alpha-reductase 2. *J Urol* **1994**, *152*, 438-442.
- (29) Barqawi, A.; Thompson, I. M.; Crawford, E. D. Prostate cancer chemoprevention: an overview of United States trials. *J Urol* **2004**, *171*, S5-8; discussion S9.
- (30) Reichardt, J. K. GEN GEN: the genomic genetic analysis of androgen-metabolic genes and prostate cancer as a paradigm for the dissection of complex phenotypes. *Front Biosci* **1999**, *4*, D596-600.
- (31) Nam, R. K.; Toi, A.; Vesprini, D.; Ho, M.; Chu, W. et al. V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* **2001**, *57*, 199-204.
- (32) Ntais, C.; Polycarpou, A.; Ioannidis, J. P. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**, *12*, 618-624.
- (33) Shibata, A.; Garcia, M. I.; Cheng, I.; Stamey, T. A.; McNeal, J. E. et al. Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes and prostate cancer prognosis. *Prostate* **2002**, *52*, 269-278.

- (34) Huggins, C.; Hodges, C. V. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* **2002**, *168*, 9-12.
- (35) Thigpen, A. E.; Davis, D. L.; Gautier, T.; Imperato-McGinley, J.; Russell, D. W. Brief report: the molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N Engl J Med* **1992**, *327*, 1216-1219.
- (36) Wu, C. P.; Gu, F. L. The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res* **1991**, *370*, 249-255.
- (37) Eisenberger, M. A.; Laufer, M.; Vogelzang, N. J.; Sartor, O.; Thornton, D. et al. Phase I and clinical pharmacology of a type I and II, 5-alpha-reductase inhibitor (LY320236) in prostate cancer: elevation of estradiol as possible mechanism of action. *Urology* **2004**, *63*, 114-119.
- (38) Parnes, H. L.; Thompson, I. M.; Ford, L. G. Prevention of hormone-related cancers: prostate cancer. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 368-377.
- (39) Brawley, O. W.; Parnes, H. Prostate cancer prevention trials in the USA. *Eur J Cancer* **2000**, *36*, 1312-1315.
- (40) Higgins, B.; Thompson, I. M. The Prostate Cancer Prevention Trial: current status. *J Urol* **2004**, *171*, S15-17; discussion S18.
- (41) Thompson, I. M., Jr.; Kouril, M.; Klein, E. A.; Coltman, C. A.; Ryan, A. et al. The Prostate Cancer Prevention Trial: Current status and lessons learned. *Urology* **2001**, *57*, 230-234.
- (42) Thompson, I. M.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Lucia, M. S.; Miller, G. J. et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* **2003**, *349*, 215-224.
- (43) Thompson, I. M.; Tangen, C.; Goodman, P. The Prostate Cancer Prevention Trial: design, status, and promise. *World J Urol* **2003**, *21*, 28-30.
- (44) Bostwick, D. G.; Qian, J.; Civantos, F.; Roehrborn, C. G.; Montironi, R. Does finasteride alter the pathology of the prostate and cancer grading? *Clin Prostate Cancer* **2004**, *2*, 228-235.
- (45) Andriole, G. L.; Roehrborn, C.; Schulman, C.; Slawin, K. M.; Somerville, M. et al. Effect of dutasteride on the detection of prostate cancer in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* **2004**, *64*, 537-541; discussion 542-533.

- (46) Andriole, G. L.; Humphrey, P.; Ray, P.; Gleave, M. E.; Trachtenberg, J. et al. Effect of the dual 5alpha-reductase inhibitor dutasteride on markers of tumor regression in prostate cancer. *J Urol* **2004**, *172*, 915-919.
- (47) Andriole, G.; Bostwick, D.; Brawley, O.; Gomella, L.; Marberger, M. et al. Chemoprevention of prostate cancer in men at high risk: rationale and design of the reduction by dutasteride of prostate cancer events (REDUCE) trial. *J Urol* **2004**, *172*, 1314-1317.
- (48) Gomella, L. G. Chemoprevention using dutasteride: the REDUCE trial. *Curr Opin Urol* **2005**, *15*, 29-32.
- (49) Lowe, J. F.; Frazee, L. A. Update on prostate cancer chemoprevention. *Pharmacotherapy* **2006**, *26*, 353-359.
- (50) Iczkowski, K. A.; Qiu, J.; Qian, J.; Somerville, M. C.; Rittmaster, R. S. et al. The dual 5-alpha-reductase inhibitor dutasteride induces atrophic changes and decreases relative cancer volume in human prostate. *Urology* **2005**, *65*, 76-82.
- (51) Titus, M. A.; Gregory, C. W.; Ford, O. H., 3rd; Schell, M. J.; Maygarden, S. J. et al. Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 4365-4371.
- (52) Andriole, G.; Lieber, M.; Smith, J.; Soloway, M.; Schroeder, F. et al. Treatment with finasteride following radical prostatectomy for prostate cancer. *Urology* **1995**, *45*, 491-497.
- (53) Ornstein, D. K.; Smith, D. S.; Andriole, G. L. Biochemical response to testicular androgen ablation among patients with prostate cancer for whom flutamide and/or finasteride therapy failed. *Urology* **1998**, *52*, 1094-1097.
- (54) Xu, Y.; Dalrymple, S. L.; Becker, R. E.; Denmeade, S. R.; Isaacs, J. T. Pharmacologic basis for the enhanced efficacy of dutasteride against prostatic cancers. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4072-4079.
- (55) Titus, M. A.; Schell, M. J.; Lih, F. B.; Tomer, K. B.; Mohler, J. L. Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 4653-4657.
- (56) Neithardt, A. B.; Barnes, R. B. The diagnosis and management of hirsutism. *Semin Reprod Med* **2003**, *21*, 285-293.

- (57) Thiboutot, D.; Harris, G.; Iles, V.; Cimis, G.; Gilliland, K. et al. Activity of the type 1 5 alpha-reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol* **1995**, *105*, 209-214.
- (58) Hoffmann, R. Male androgenetic alopecia. *Clin Exp Dermatol* **2002**, *27*, 373-382.
- (59) Voigt, W.; Hsia, S. L. Further studies on testosterone 5 -reductase of human skin. Structural features of steroid inhibitors. *J Biol Chem* **1973**, *248*, 4280-4285.
- (60) Levy, M. A.; Brandt, M.; Sheedy, K. M.; Dinh, J. T.; Holt, D. A. et al. Epristeride is a selective and specific uncompetitive inhibitor of human steroid 5 alpha-reductase isoform 2. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1994**, *48*, 197-206.
- (61) Machetti, F.; Guarna, A. Novel inhibitors of 5-alpha-reductase. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2002**, *12*, 201-215.
- (62) Liang, T.; Heiss, C. E.; Ostrove, S.; Rasmusson, G. H.; Cheung, A. Binding of a 4-methyl-4-aza-steroid to 5 alpha-reductase of rat liver and prostate microsomes. *Endocrinology* **1983**, *112*, 1460-1468.
- (63) Liang, T.; Cascieri, M. A.; Cheung, A. H.; Reynolds, G. F.; Rasmusson, G. H. Species differences in prostatic steroid 5 alpha-reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology* **1985**, *117*, 571-579.
- (64) Stoner, E. The clinical development of a 5 alpha-reductase inhibitor, finasteride. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990**, *37*, 375-378.
- (65) Ellsworth, K.; Azzolina, B.; Baginsky, W.; Bull, H.; Chang, B. et al. MK386: a potent, selective inhibitor of the human type 1 5alpha-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, *58*, 377-384.
- (66) Schwartz, J. I.; Van Hecken, A.; De Schepper, P. J.; De Lepeleire, I.; Lasseter, K. C. et al. Effect of MK-386, a novel inhibitor of type 1 5 alpha-reductase, alone and in combination with finasteride, on serum dihydrotestosterone concentrations in men. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *81*, 2942-2947.
- (67) McConnell, J. D. Androgen ablation and blockade in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* **1990**, *17*, 661-670.
- (68) Schwartz, J. I.; Tanaka, W. K.; Wang, D. Z.; Ebel, D. L.; Geissler, L. A. et al. MK-386, an inhibitor of 5alpha-reductase type 1, reduces dihydrotestosterone concentrations in serum and sebum without affecting dihydrotestosterone concentrations in semen. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, *82*, 1373-1377.

- (69) Foley, C. L.; Kirby, R. S. 5 alpha-reductase inhibitors: what's new? *Curr Opin Urol* **2003**, *13*, 31-37.
- (70) Holt, D. A.; Levy, M. A.; Metcalf, B. W. *Inhibition of steroid 5-alpha-reductase*, 1993; 1-29.
- (71) Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Danza, G.; Conti, A.; Serio, M. 5 alpha-reductase inhibitors, chemical and clinical models. *Steroids* **1998**, *63*, 355-361.
- (72) Bakshi, R. K.; Patel, G. F.; Rasmusson, G. H.; Baginsky, W. F.; Cimisi, G. et al. 4,7 beta-Dimethyl-4-azacholestan-3-one (MK-386) and related 4-azasteroids as selective inhibitors of human type 1 5 alpha-reductase. *J Med Chem* **1994**, *37*, 3871-3874.
- (73) Bakshi, R. K.; Rasmusson, G. H.; Patel, G. F.; Mosley, R. T.; Chang, B. et al. 4-Aza-3-oxo-5 alpha-androst-1-ene-17 beta-N-aryl-carboxamides as dual inhibitors of human type 1 and type 2 steroid 5 alpha-reductases. Dramatic effect of N-aryl substituents on type 1 and type 2 5 alpha-reductase inhibitory potency. *J Med Chem* **1995**, *38*, 3189-3192.
- (74) Giudici, D.; Briatico, G.; Cominato, C.; Zaccheo, T.; Lehle, C. et al. FCE 28260, a new 5 alpha-reductase inhibitor: in vitro and in vivo effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, *58*, 299-305.
- (75) di Salle, E.; Giudici, D.; Radice, A.; Zaccheo, T.; Ornati, G. et al. PNU 157706, a novel dual type I and II 5alpha-reductase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1998**, *64*, 179-186.
- (76) Tolman, R. L.; Sahoo, S. P.; Bakshi, R. K.; Gratale, D.; Patel, G. et al. 4-Methyl-3-oxo-4-aza-5alpha-androst-1-ene-17beta-N-aryl-carboxamides: an approach to combined androgen blockade [5alpha-reductase inhibition with androgen receptor binding in vitro]. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1997**, *60*, 303-309.
- (77) Li, X.; Singh, S. M.; Labrie, F. Synthesis and in vitro activity of 17 beta-(N-alkyl/arylformamido)- and 17 beta-[(N-alkyl/aryl)alkyl/arylamido]-4-methyl-4-aza-3-oxo-5 alpha-androstan-3-ones as inhibitors of human 5 alpha-reductases and antagonists of the androgen receptor. *J Med Chem* **1995**, *38*, 1158-1173.
- (78) Lourdasamy, M.; Cote, J.; Laplante, S.; Labrie, F.; Singh, S. M. Synthesis and in vitro study of 17 beta-[N-ureylene-N,N'-disubstituted]-4-methyl-4-aza-5

- alpha-androstan-3-ones as selective inhibitors of type I 5 alpha-reductase. *Bioorg Med Chem* **1997**, *5*, 305-310.
- (79) Häusler, A.; Allegrini, P. R.; Biollaz, M.; Batzl, C.; Scheidegger, E. et al. CGP 53153: a new potent inhibitor of 5alpha-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1996**, *57*, 187-195.
- (80) Guarna, A.; Belle, C.; Machetti, F.; Occhiato, E. G.; Payne, A. H. et al. 19-nor-10-azasteroids: a novel class of inhibitors for human steroid 5alpha-reductases 1 and 2. *J Med Chem* **1997**, *40*, 1112-1129.
- (81) Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Machetti, F.; Marrucci, A.; Danza, G. et al. 19-nor-10-azasteroids, a new class of steroid 5 alpha-reductase inhibitors. 2. X-ray structure, molecular modeling, conformational analysis of 19-nor-10-azasteroids and comparison with 4-azasteroids and 6-azasteroids. *J Med Chem* **1997**, *40*, 3466-3477.
- (82) Frye, S. V.; Haffner, C. D.; Maloney, P. R.; Mook, R. A., Jr.; Dorsey, G. F., Jr. et al. 6-Azasteroids: potent dual inhibitors of human type 1 and 2 steroid 5 alpha-reductase. *J Med Chem* **1993**, *36*, 4313-4315.
- (83) Frye, S. V.; Haffner, C. D.; Maloney, P. R.; Mook, R. A., Jr.; Dorsey, G. F., Jr. et al. 6-Azasteroids: structure-activity relationships for inhibition of type 1 and 2 human 5 alpha-reductase and human adrenal 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase/3-keto-delta 5-steroid isomerase. *J Med Chem* **1994**, *37*, 2352-2360.
- (84) Sawada, K.; Okada, S.; Golden, P.; Kayakiri, N.; Sawada, Y. et al. 4-(1-benzoylindol-3-yl)butyric acids and FK143: novel nonsteroidal inhibitors of steroid 5 alpha-reductase (II). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1999**, *47*, 481-491.
- (85) Abell, A. D.; Brandt, M.; Levy, M. A.; Holt, D. A. A nonsteroidal diene acid inhibitor of human type-2 steroid 5-alpha-reductase. *Bioorg Med Chem Lett* **1994**, *4*, 2327-2330.
- (86) Abell, A. D.; Brandt, M.; Levy, M. A.; Holt, D. A. A comparison of steroidal and non-steroidal inhibitors of human steroid 5-alpha-reductase: new tricyclic aryl acid inhibitors of the type-1 isoenzyme. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, *6*, 481-484.
- (87) Hirsch, K. S.; Jones, C. D.; Audia, J. E.; Andersson, S.; McQuaid, L. et al. LY191704: a selective, nonsteroidal inhibitor of human steroid 5 alpha-reductase type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 5277-5281.

- (88) Jones, C. D.; Audia, J. E.; Lawhorn, D. E.; McQuaid, L. A.; Neubauer, B. L. et al. Nonsteroidal inhibitors of human type I steroid 5-alpha-reductase. *J Med Chem* **1993**, *36*, 421-423.
- (89) Neubauer, B. L.; Gray, H. M.; Hanke, C. W.; Hirsch, K. S.; Hsiao, K. C. et al. LY191704 inhibits type I steroid 5 alpha-reductase in human scalp. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *81*, 2055-2060.
- (90) Smith, E. C.; McQuaid, L. A.; Goode, R. L.; McNulty, A. M.; Neubauer, B. L. et al. Synthesis and 5 alpha-reductase inhibitory activity of 8-substituted benzo[f]quinolinones derived from palladium mediated coupling reactions. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 395-398.
- (91) McNulty, A. M.; Audia, J. E.; Bemis, K. G.; Goode, R. L.; Rocco, V. P. et al. Kinetic analysis of LY320236: competitive inhibitor of type I and non-competitive inhibitor of type II human steroid 5alpha-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2000**, *72*, 13-21.
- (92) Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Scarpi, D.; Tsai, R.; Danza, G. et al. Synthesis of benzo[c]quinolizin-3-ones: selective non-steroidal inhibitors of steroid 5 alpha-reductase 1. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 2871-2876.
- (93) Guarna, A.; Machetti, F.; Occhiato, E. G.; Scarpi, D.; Comerci, A. et al. Benzo[c]quinolizin-3-ones: a novel class of potent and selective nonsteroidal inhibitors of human steroid 5alpha-reductase 1. *J Med Chem* **2000**, *43*, 3718-3735.
- (94) Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Scarpi, D.; Zorn, C.; Danza, G. et al. Synthesis of 8-chloro-benzo[c]quinolizin-3-ones as potent and selective inhibitors of human steroid 5alpha-reductase 1. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 353-356.
- (95) Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Machetti, F.; Trabocchi, A.; Scarpi, D. et al. Effect of C-ring modifications in benzo[c]quinolizin-3-ones, new selective inhibitors of human 5 alpha-reductase 1. *Bioorg Med Chem* **2001**, *9*, 1385-1393.
- (96) Ferrali, A.; Menchi, G.; Occhiato, E. G.; Danza, G.; Mancina, R. et al. Synthesis and activity of 8-substituted benzo[c]quinolizin-3-ones as dual inhibitors of human 5-alpha-reductase 1 and 2. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 145-148.
- (97) Harris, G. S.; Ellsworth, K.; Witzel, B. E.; Tolman, R. L. Steroid 5-alpha-reductase: comparative study of mechanism of inhibition by nonsteroids ONO-3805 and LY191704. *Bioorg Chem* **1996**, *24*, 386-400.

- (98) Kumazawa, T.; Takami, H.; Kishibayashi, N.; Ishii, A.; Nagahara, Y. et al. (E)-4-(2-[[3-(indol-5-yl)-1-oxo-2-butenyl]amino]phenoxy)butyric acid derivatives: a new class of steroid 5 alpha-reductase inhibitors in the rat prostate. 1. *J Med Chem* **1995**, *38*, 2887-2892.
- (99) Takami, H.; Koshimura, H.; Kishibayashi, N.; Ishii, A.; Nonaka, H. et al. Indole derivatives as a new class of steroid 5 alpha-reductase inhibitors. *J Med Chem* **1996**, *39*, 5047-5052.
- (100) Takami, H.; Kishibayashi, N.; Ishii, A.; Kumazawa, T. Indole and benzimidazole derivatives as steroid 5alpha-reductase inhibitors in the rat prostate. *Bioorg Med Chem* **1998**, *6*, 2441-2448.
- (101) Baston, E.; Hartmann, R. W. N-substituted 4-(5-indolyl)benzoic acids. Synthesis and evaluation of steroid 5alpha-reductase type I and II inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9*, 1601-1606.
- (102) Gerst, C.; Dalko, M.; Pichaud, P.; Galey, J. B.; Buan, B. et al. Type-1 steroid 5 alpha-reductase is functionally active in the hair follicle as evidenced by new selective inhibitors of either type-1 or type-2 human steroid 5 alpha-reductase. *Exp Dermatol* **2002**, *11*, 52-58.
- (103) Hirosumi, J.; Nakayama, O.; Chida, N.; Inami, M.; Fagan, T. et al. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 alpha-reductase: (2) In vivo effects on rat and dog prostates. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, *52*, 365-373.
- (104) Hirosumi, J.; Nakayama, O.; Fagan, T.; Sawada, K.; Chida, N. et al. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 alpha-reductase: (1) In vitro effects on human and animal prostatic enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, *52*, 357-363.
- (105) Katashima, M.; Yamamoto, K.; Haraguchi, K.; Tokuma, Y.; Hata, T. et al. Tissue distribution kinetics of a new nonsteroidal 5 alpha-reductase [correction of 5 A-reductase] inhibitor, 4-[3-[3-[bis(4-isobutylphenyl)methylamino]benzoyl]-1H-indol-1-yl]-butyric acid, in rats. *Drug Metab Dispos* **1997**, *25*, 1051-1058.
- (106) Katashima, M.; Yamamoto, K.; Tokuma, Y.; Hata, T.; Sawada, Y. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new nonsteroidal 5 alpha-reductase inhibitor, 4-[3-[3-[Bis(4-isobutylphenyl)methylamino]benzoyl]-1H-indol-1-yl]-butyric acid, in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, *284*, 914-920.
- (107) Fujita, T.; Matsumoto, Y.; Kimura, T.; Yokota, S.; Sawada, M. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TF-505, a novel nonsteroidal

- 5alpha-reductase inhibitor, in normal subjects treated with single or multiple doses. *Br J Clin Pharmacol* **2002**, *54*, 283-294.
- (108) Lesuisse, D.; Albert, E.; Bouchoux, F.; Cerede, E.; Lefrancois, J. M. et al. Biphenyls as surrogates of the steroidal backbone. Part 1: synthesis and estrogen receptor affinity of an original series of polysubstituted biphenyls. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11*, 1709-1712.
- (109) Lesuisse, D.; Gourvest, J. F.; Albert, E.; Doucet, B.; Hartmann, C. et al. Biphenyls as surrogates of the steroidal backbone. Part 2: discovery of a novel family of non-steroidal 5-alpha-reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11*, 1713-1716.
- (110) Abell, A. D.; Prince, M. J.; McNulty, A. M.; Neubauer, B. L. Simple bi- and tricyclic inhibitors of human steroid 5alpha-reductase. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 1909-1911.
- (111) Picard, F.; Baston, E.; Reichert, W.; Hartmann, R. W. Synthesis of N-substituted piperidine-4-(benzylidene-4-carboxylic acids) and evaluation as inhibitors of steroid-5alpha-reductase type 1 and 2. *Bioorg Med Chem* **2000**, *8*, 1479-1487.
- (112) Picard, F.; Barassin, S.; Mokhtarian, A.; Hartmann, R. W. Synthesis and evaluation of 2'-substituted 4-(4'-carboxy- or 4'-carboxymethylbenzylidene)-N-acylpiperidines: highly potent and in vivo active steroid 5alpha-reductase type 2 inhibitors. *J Med Chem* **2002**, *45*, 3406-3417.
- (113) Hartmann, R. W.; Reichert, M.; Goehring, S. Novel 5-alpha-reductase inhibitors. Synthesis and structure-activity studies of 5-substituted 1-methyl-2-pyridones and 1-methyl-2-piperidones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *29*, 807-817.
- (114) Baston, E.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W. 6-Substituted 1H-quinolin-2-ones and 2-methoxy-quinolines: synthesis and evaluation as inhibitors of steroid 5alpha reductases types 1 and 2. *Eur J Med Chem* **2000**, *35*, 931-940.
- (115) Picard, F.; Schulz, T.; Hartmann, R. W. 5-Phenyl substituted 1-methyl-2-pyridones and 4'-substituted biphenyl-4-carboxylic acids. synthesis and evaluation as inhibitors of steroid-5alpha-reductase type 1 and 2. *Bioorg Med Chem* **2002**, *10*, 437-448.

- (116) Picard, F.; Hartmann, R. W. N-substituted 4-(4-carboxyphenoxy)benzamides. Synthesis and evaluation as inhibitors of steroid-5 α -reductase type 1 and 2. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2002**, *17*, 187-196.
- (117) Salem, O. I.; Schulz, T.; Hartmann, R. W. Synthesis and biological evaluation of 4-(4-(alkyl- and phenylaminocarbonyl)benzoyl)benzoic acid derivatives as non-steroidal inhibitors of steroid 5 α -reductase isozymes 1 and 2. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **2002**, *335*, 83-88.
- (118) Salem, O. I.; Frotscher, M.; Scherer, C.; Neugebauer, A.; Biemel, K. et al. Novel 5 α -reductase inhibitors: synthesis, structure-activity studies, and pharmacokinetic profile of phenoxybenzoylphenyl acetic acids. *J Med Chem* **2006**, *49*, 748-759.
- (119) Baston, E.; Salem, O. I.; Hartmann, R. W. 6-Substituted 3,4-dihydro-naphthalene-2-carboxylic acids: synthesis and structure-activity studies in a novel class of human 5 α reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2002**, *17*, 303-320.
- (120) Baston, E.; Salem, O. I.; Hartmann, R. W. Cyclohex-1-ene carboxylic acids: synthesis and biological evaluation of novel inhibitors of human 5 α reductase. *Arch Pharm (Weinheim)* **2003**, *336*, 31-38.
- (121) Barry, M. J.; Roehrborn, C. G. Benign prostatic hyperplasia. *Bmj* **2001**, *323*, 1042-1046.
- (122) Hsing, A. W.; Reichardt, J. K.; Stanczyk, F. Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* **2002**, *52*, 213-235.
- (123) Kelloff, G. J.; Lippman, S. M.; Dannenberg, A. J.; Sigman, C. C.; Pearce, H. L. et al. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 3661-3697.
- (124) Mathur, S.; Picard, F.; Dossou, U.; Barassin, C.; Seidel, S. B. et al. Evaluation of cell permeation of a potent 5 α -reductase inhibitor using MALDI-TOF MS. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2004**.
- (125) Kang, M. J.; Mathur, S.; Hartmann, R. W. Quantitative analysis of 5 α -reductase inhibitors in DU145 cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 762-769.

- (126) Stinchcomb, A. L.; Swaan, P. W.; Ekabo, O.; Harris, K. K.; Browe, J. et al. Straight-chain naltrexone ester prodrugs: diffusion and concurrent esterase biotransformation in human skin. *J Pharm Sci* **2002**, *91*, 2571-2578.
- (127) Wheelock, C. E.; Wheelock, A. M.; Zhang, R.; Stok, J. E.; Morisseau, C. et al. Evaluation of alpha-cyanoesters as fluorescent substrates for examining interindividual variation in general and pyrethroid-selective esterases in human liver microsomes. *Anal Biochem* **2003**, *315*, 208-222.
- (128) Reichert, W.; Jose, J.; Hartmann, R. W. 5 alpha-reductase in intact DU145 cells: evidence for isozyme I and evaluation of novel inhibitors. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **2000**, *333*, 201-204.
- (129) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
- (130) Testa, B.; Mayer, J. M. *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*; VHCA, Wiley-VCH, 2003.
- (131) Nousiainen, U.; Torronen, R. Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition. *Gen Pharmacol* **1984**, *15*, 223-227.
- (132) Castagnetta, L. A.; Carruba, G.; Traina, A.; Granata, O. M.; Markus, M. et al. Expression of different 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types and their activities in human prostate cancer cells. *Endocrinology* **1997**, *138*, 4876-4882.
- (133) Lee, H. J.; Wilson, I. B. Enzymic parameters: measurement of V and Km. *Biochim Biophys Acta* **1971**, *242*, 519-522.
- (134) Thigpen, A. E.; Cala, K. M.; Russell, D. W. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 alpha-reductase isozymes. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 17404-17412.
- (135) Negri-Cesi, P.; Colciago, A.; Poletti, A.; Motta, M. 5alpha-reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* **1999**, *41*, 224-232.
- (136) McGowen, R.; Biliran, H., Jr.; Sager, R.; Sheng, S. The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. *Cancer Res* **2000**, *60*, 4771-4778.

- (137) Igarashi, S.; Kimura, T.; Naito, R.; Hara, H.; Fujii, M. et al. A novel class of inhibitors for human steroid 5- α -reductase: phenoxybenzoic acid derivatives. I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1999**, *47*, 1073-1080.
- (138) Stepanov, F. N.; Isaev, S. D. Adamantane and its derivatives; Reaction of α -bromo-substituted ketones and aldehydes of the adamantane series with thioamides. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1970**, *6*, 1189-1195.
- (139) Griera, R.; Armengol, M.; Reyes, A.; Alvarez, M.; Palomer, A. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new cysLT₁ receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 547-570.
- (140) Kim, S.; Kim, Y. C.; Lee, J. I. A new convenient method for the esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 3365-3368.
- (141) Chauffe, L.; Andrews, L.; Keefer, R. M. The effect of carboxyl groups in neighboring side chains on the hydrolysis of substituted benzyl and fluorenyl bromides. *Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 3758-3764.
- (142) Holt, D. A.; Oh, H. J.; Rozamus, L. W.; Yen, H. K.; Brandt, M. et al. Synthesis and evaluation of 3-carboxymethyl steroids as inhibitors of human prostatic steroid 5- α -reductase. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**, *3*, 1735-1738.
- (143) Faragalla, J.; Bremner, J.; Brown, D.; Griffith, R.; Heaton, A. Comparative pharmacophore development for inhibitors of human and rat 5- α -reductase. *J Mol Graph Model* **2003**, *22*, 83-92.
- (144) Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Okumu, F. W.; Siahaan, T. J.; Stella, V. J. et al. Esterase-sensitive cyclic prodrugs of peptides: evaluation of an acyloxyalkoxy moiety in a model hexapeptide. *Pharm Res* **1996**, *13*, 1615-1623.
- (145) Wernly-Chung, G. N.; Mayer, J. M.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Testa, B. Structure-reactivity relationships in the chemical hydrolysis of prodrug esters of nicotinic acid. *Int J Pharm* **1990**, *63*, 129-134.
- (146) McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M. Human xenobiotic metabolizing esterases in liver and blood. *Biochem Pharmacol* **1993**, *46*, 1125-1129.
- (147) McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M. Nature and role of xenobiotic metabolizing esterases in rat liver, lung, skin and blood. *Biochem Pharmacol* **1993**, *45*, 31-36.

- (148) Song, H.; Griesgraber, G. W.; Wagner, C. R.; Zimmerman, C. L. Pharmacokinetics of amino acid phosphoramidate monoesters of zidovudine in rats. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 1357-1363.
- (149) Hutter, M. C.; Hartmann, R. W. QSAR of human steroid 5-alpha-reductase inhibitors: Where are the differences between isoenzyme type 1 and 2? *QSAR & Combinatorial Sciences* **2004**, *23*, 406-415.
- (150) Levy, M. A.; Brandt, M.; Sheedy, K. M.; Holt, D. A.; Heaslip, J. I. et al. Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5 alpha-reductases from Cynomolgus monkey: comparisons with human and rat isoenzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, *52*, 307-319.
- (151) Ellsworth, K. P.; Azzolina, B. A.; Cimisi, G.; Bull, H. G.; Harris, G. S. Cloning, expression and characterization of rhesus macaque types 1 and 2 5alpha-reductase: evidence for mechanism-based inhibition by finasteride. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1998**, *66*, 271-279.
- (152) Streiber, M.; Picard, F.; Scherer, C.; Seidel, S. B.; Hartmann, R. W. Methyl esters of N-(dicyclohexyl)acetyl-piperidine-4-(benzylidene-4-carboxylic acids) as drugs and prodrugs: A new strategy for dual inhibition of 5alpha-reductase type 1 and type 2. *J Pharm Sci* **2004**, *94*, 473-480.
- (153) Stone, K. R.; Mickey, D. D.; Wunderli, H.; Mickey, G. H.; Paulson, D. F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978, *21*, 274-281.
- (154) Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977, *36*, 59-74.
- (155) Reichert, W.; Hartmann, R. W.; Jose, J. Stable expression of the human 5alpha-reductase isoenzymes type I and type II in HEK293 cells to identify dual and selective inhibitors. *J Enzyme Inhib* 2001, *16*, 47-53.
- (156) Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Wang, B.; Borchardt, R. T. Esterase-sensitive cyclic prodrugs of peptides: evaluation of a phenylpropionic acid promoiety in a model hexapeptide. *Pharm Res* 1997, *14*, 11-17.
- (157) Delos, S.; lehle, C.; Martin, P. M.; Raynaud, J. P. Inhibition of the activity of 'basic' 5 alpha-reductase (type 1) detected in DU 145 cells and expressed in insect cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994, *48*, 347-352.

- (158) Thomas, A. P.; Allott, C. P.; Gibson, K. H.; Major, J. S.; Masek, B. B. et al. New nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 1. Synthesis, biological properties, and structure-activity relationships of 2-alkyl benzimidazole derivatives. *J Med Chem* 1992, 35, 877-885.

