

**Entwicklung von Teststrategien zur selektiven
Hemmung von Enzymen der adrenalen
Steroidsynthese unter besonderer Berücksichtigung
von Speziesunterschieden**

Dissertation

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

von

Dipl. Biol. Sabrina Rau

Saarbrücken

2014

Tag des Kolloquiums:	11. April 2014
Dekan:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf W. Hartmann Prof. Dr. Dr. h.c. Hans H. Maurer
Vorsitz:	Prof. Dr. Claus Jacob
Akadem. Mitarbeiter:	Dr. Britta Diesel

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2008 bis Juni 2011 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes angefertigt.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Rolf W. Hartmann für das interessante und vielseitige Thema, das entgegengebrachte Vertrauen, den überlassenen Freiraum und für all das, was ich durch diese Arbeit lernen konnte.

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans H. Maurer für die Übernahme des Koreferates.

Prof. Dr. Claus Jacob für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dr. Britta Diesel für die Übernahme des Beisitzes der Prüfungskommission.

Dr. Christina Zimmer und Dr. Sigrid Ziegler für die gemeinsame Planung, Gestaltung und Betreuung des Biochemie-Praktikums.

Dr. Stefan Boettcher für die Einführung in die Welt der Analytik sowie seine praktische und moralische Unterstützung bei HPLC- und MS/MS-Angelegenheiten.

Den ehemaligen Mitstreitern im Aldosteronsynthese-Projekt: Dr. Christina Zimmer, Dr. Matthias Negri, Dr. Cornelia Grombein, Dr. Lina Yin, Dr. Quingzhong Hu, Dr. Simon Lucas, Dr. Michael Heydel und Dr. Ralf Heim für die gute Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen.

Den Mitarbeitern von Pharmacelsus, besonders Dr. Barbara Birk für die gute Zusammenarbeit bei den *in vivo*-Versuchen, sowie bei Dr. Ursula Müller-Vieira und Dr. Klaus Biemel.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Kollegialität und das tolle Arbeitsklima; vor allem bei Dr. Christina Zimmer, Dr. Claudia Henn, Dr. Ulrike Hille, Dr. Ruth Werth-Brill, Dr. Alexander Oster, Dr. Stefan Boettcher, Sebastian Krug, Christian Schmitt und Marieke Hafner. Vielen Dank für eure Unterstützung, eure offenen Ohren und viele schöne gemeinsam verbrachte Stunden.

Lothar Jager für die tolle Hilfe bei allen technischen Schwierigkeiten.

Martina Schwarz, Katrin Schmitt und Corina Pryzbyla für die tolle Organisation im Sekretariat und ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, meinen Freunden und Christian, die immer an mich geglaubt haben, für ihre Geduld und Unterstützung. DANKE!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
I Einleitung	1
1 Corticosteroide	1
1.1 Bildungsort der Corticosteroide: Aufbau und Funktion der Nebenniere	1
1.2 Regulation und physiologische Wirkung der Mineralocorticoide	5
1.3 Regulation und physiologische Wirkung der Glucocorticoide	11
1.4 Aldosteronsynthese (CYP11B2) und Steroid 11 β -Hydroxylase (CYP11B1): Situation in verschiedenen Spezies	13
2 Aldosteronsynthese als potentielles Drug Target	15
2.1 Pathophysiologie von Aldosteron	15
2.2 Neuer Therapieansatz zur Behandlung aldosteronabhängiger Erkrankungen	17
II Zielsetzung	25
III Ergebnisse	27
1 Miniaturisierung der zellulären Assays mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2	27
1.1 Wahl der Zellzahl	27
1.2 Testvolumen	28
1.3 Inkubationszeit	29
1.4 Validierung des miniaturisierten Zellassays	30
2 Entwicklung von zellfreien Assays mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2	31
2.1 Wahl der Zellzahl	32
	I

2.2	Zellaufschluss	33
2.3	Substrat, benötigte Additive und weitere Bedingungen	34
2.4	Wahl der eingesetzten Homogenatmenge	34
2.5	Inkubationszeit	36
2.6	Validierung der neu entwickelten zellfreien Assays	37
3	Etablierung einer neuen Detektionsmethode	39
3.1	Intraassay-Präzision	41
3.2	Interassay-Präzision	42
3.3	Untersuchung der DMSO-, Ethanol- und Glycerin-Toleranz	43
3.4	Untersuchung der Toleranz gegenüber DTT, PMSF und EDTA	45
3.5	Untersuchung von Deoxycortisol als Substrat des Enzyms CYP11B1	47
3.6	Überprüfung der neuen Detektionsmethode an ausgewählten Inhibitoren	48
4	Miniaturisierung der zellfreien Assays unter Anwendung der neuen Detektionsmethode	53
4.1	Ermittlung eines geeigneten Stoppreagens	53
4.2	Untersuchung der Toleranz gegenüber HgCl ₂ , Acetonitril und DMSO	55
5	Stabilitätsuntersuchungen	57
5.1	Chemische Stabilität	57
5.2	Metabolische Stabilität	59
5.3	Bestimmung von Metaboliten	62
6	Aktivitätsassay mit der humanen adrenocorticalen Tumorzelllinie H295R	65
7	Aktivitätsassay mit Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies	66
8	Löslichkeit in verschiedenen Testmedien	69
9	Biologische Aktivität <i>in vivo</i>	70
9.1	Bioverfügbarkeit	70
9.2	Aktivität nach peroraler Verabreichung im ACTH-stimulierten Rattenmodell	73
9.3	Aldosteronsenkende Wirkung im unstimulierten Rattenmodell	75

9.4	Perorale Applikation über mehrere Tage	76
IV	Diskussion	79
1	Wirkstoffentwicklung	79
2	Entwicklung von Aldosteronsynthase-Inhibitoren	80
3	Miniaturisierung der V79MZ Screeningassays	82
4	Entwicklung von zellfreien Assays	83
5	HTRF [®] als neue Detektionsmethode	86
6	Stabilitätsuntersuchungen	88
7	Aktivität an Nebennieren verschiedener Spezies, <i>in vitro</i> -Modell und Organ-Kulturen	92
8	<i>In vivo</i> Testung am Rattenmodell	95
9	Bewertung der Teststrategie	99
V	Zusammenfassung	103
VI	Summary	104
VII	Material und Methoden	105
1	Material	105
1.1	Laborgeräte	105
1.2	Chemikalien und Reagenzien	106
1.3	Zelllinien	108
1.4	Versuchstiere	109
1.5	Gewebe und Gewebepreparationen	109
1.6	Medien und Lösungen für Arbeitstechniken mit Zellkultur/Zellhomogenat	110
1.7	Lösungen zur Überprüfung der metabolischen Stabilität	112
1.8	Verbrauchsmaterial	113
2	Methoden	114
2.1	Arbeitstechniken mit Zellkulturen	114

2.2	Analytische Grundlagen	118
2.3	Testverfahren mit V79MZh11B1, V79MZh11B2 und V79MZr11B2 im 24-Well-Format mit radioaktiv markiertem Substrat	123
2.4	Testverfahren mit H295R	127
2.5	Miniaturisiertes Testverfahren mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2 im 96 Well-Format mit radioaktiv markiertem Substrat	128
2.6	Miniaturisiertes Testverfahren mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2 im 96 Well-Format ohne radioaktiv markiertes Substrat	132
2.7	Testverfahren mit Zellhomogenat aus V79MZh11B1 und V79MZh11B2 (radioaktiv markiertes Substrat)	134
2.8	Testverfahren mit ganzen Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies	135
2.9	Überprüfung der chemischen Stabilität	138
2.10	Überprüfung der metabolischen Stabilität <i>in vitro</i> mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies	139
2.11	Bestimmung der Metaboliten	141
2.12	<i>In vivo</i> -Versuche	142
VIII	Literaturverzeichnis	146
IX	Anhang	165

Abkürzungen

11 β -HSD1	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ARA	Aldosteronrezeptor-Antagonisten
ARB	Ang II-Rezeptor-Blocker
ASPIRE	Aliskiren Study in Post-MI Patients to Reduce Remodeling
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BSA	Rinder-Serumalbumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CHF	kongestive Herzinsuffizienz
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Becquerel
CNS	zentrales Nervensystem
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study
CRH	Corticotrophin Releasing Hormone
CYP	Cytochrome P450
CYP1A2	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP2B6	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP2C9	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP2C19	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP2D6	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP3A4	hepatisches CYP-Enzym, unspezifische Monooxygenase
CYP11A1	Cholesteroldesmolase, Cholesterol side chain cleavage enzyme
CYP11B1	Steroid-11 β -Hydroxylase

CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17	17 α -Hydroxylase-17,20-Lyase
CYP19	Aromatase
CYP21	21-Hydroxylase
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Deoxycorticosteron
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMPHASIS-HF- Study	Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EPHESUS	Eplerenone Post-acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray Ionisation
FAD286	Fadrozol (CGS 16949A, Racemat)
FAD286A	R(+)-Enantiomer von Fadrozol
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid, simulierter Dünndarmsaft im Nüchternzustand
FCS	fetales Kälberserum
FeSSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid, simulierter Darmsaft nach Nahrungszufuhr
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
G418-Sulfat	Geneticinsulfat
G6P	Glucose-6-Phosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid-Response-Element
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H ₂ O _{bidest}	hochreines Wasser (Millipore Q plus Anlage)

HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTRF	Homogenous Time-Resolved Fluorescence
HTS	High-Throughput Screening
IC ₅₀	benötigte Konzentration für 50 % Hemmung
i. c. v.	intracerebroventriculär
CL _{int}	Intrinsische Clearance
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LC	Flüssigkeitschromatographie
mg	Milligramm
mg/kg KG	Dosis in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min	Minute(n)
MMP1	Matrixmetalloproteinase 1
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (g/mol)
m/z	Masse/Ladung
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphor-Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PIS	Product Ion Scan
PEG	Polyethylenglykol
PHA	primärer Hyperaldosteronismus
PK	Pharmakokinetik
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p. o.	per oral

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rounds per minute
RSS	Reichsteins Substanz S (Deoxycortisol)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
SEM	Standard Error of the Mean
s. c.	subcutan
SGF	Simulated Gastric Fluid, simulierter Magensaft
SHHF Rat	Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rat
StAR-Protein	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
TRF	Time-Resolved Fluoreszenz
(v/v)	volume per volume

I Einleitung

1 Corticosteroide

Als Steroidhormone werden Derivate des Kohlenwasserstoffs Steran bezeichnet, die als Hormone wirken. Sie bilden eine von insgesamt drei Hormonklassen, zu denen sowohl die Peptid- und Glykoprotein hormone, als auch die vom Tyrosin abgeleiteten Hormone gehören. Steroidhormone klassifiziert man nach ihrem Hauptbildungsort in Sexualhormone und Corticosteroide (Corticoide). Die Sexualhormone werden hauptsächlich in den Gonaden synthetisiert und weiter in drei verschiedene Steroidklassen unterteilt: Androgene, Gestagene und Estrogene. Bei den Corticoiden, die in den Nebennieren gebildet werden, wird weiter zwischen Mineralo- und Glucocorticoiden differenziert.

1.1 Bildungsort der Corticosteroide: Aufbau und Funktion der Nebenniere

Die Nebenniere ist eine paarige endokrine Drüse. Die beiden Drüsen liegen meist retroperitoneal, medial zum kranialen Nierenpol, eng an die Wand der *Vena cava caudalis* beziehungsweise der Aorta geschmiegt. Sie sind mit den Nieren durch Binde- und Fettgewebe sowie durch Gefäße verbunden. Beim Menschen sind die Nebennieren unmittelbar an den oberen Nierenpolen anliegend, wobei die rechte dreieckig, die linke halbmondförmig ist. Beide sind jeweils ca. 3 cm lang und 5-10 g schwer. Doch Lage und Gestalt können sowohl speziesspezifische als auch individuelle Unterschiede aufweisen. So liegen z. B. die Nebennieren des Kaninchens etwas weiter von der Niere entfernt als beim Menschen, sind eher rund und von zwei Seiten etwas zusammengedrückt.¹ Die Nebenniere besteht aus zwei Teilen mit unterschiedlicher Entstehung, Funktion und Struktur: dem Nebennierenmark (*Medulla*) und der Nebennierenrinde (*Cortex*), die sich auch makroskopisch deutlich voneinander abgrenzen. Im innenliegenden zum vegetativen Nervensystem gehörenden Nebennierenmark werden die Hormone Adrenalin und Noradrenalin gebildet. Die Zellen der Nebennierenrinde sind zur *de novo*-Synthese von

Steroidhormonen aus Cholesterol befähigt. Die Nebennierenrinde teilt sich radiär in drei Zonen: die außen gelegene *Zona glomerulosa*, daran anschließend die *Zona fasciculata* und die marknahe *Zona reticularis* (Abbildung 1).

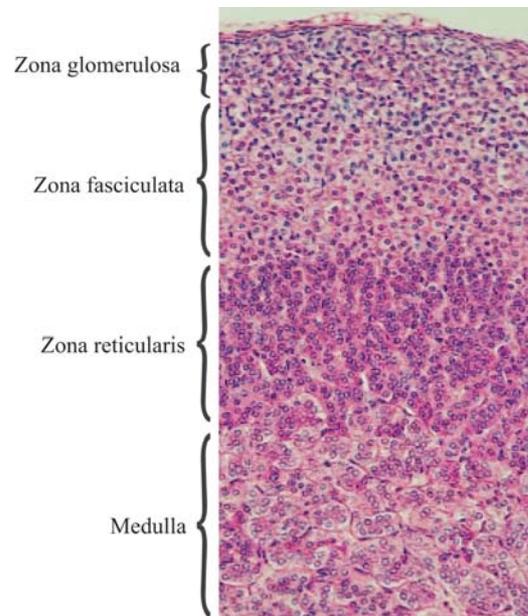


Abbildung 1: Zonierung der humanen Nebenniere (nach Pearson Education, Inc.)

Diese drei Zonen verfügen über eine unterschiedliche Ausstattung an Enzymen und Membranrezeptoren, was die Synthese ihrer charakteristischen Endprodukte gewährleistet. So wird das physiologisch wirksamste Mineralocorticoid Aldosteron in den Zellen der *Zona glomerulosa* gebildet. Das vor über 50 Jahren von Simpson und Tait entdeckte Aldosteron ist maßgeblich an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes beteiligt und kann somit das Blutvolumen und folglich den Blutdruck beeinflussen.² Die Synthese von Aldosteron ist ein mehrstufiger Prozess und beginnt an der inneren Mitochondrienmembran mit der Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon (Abbildung 2). Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt dabei die Translokation des Cholesterols mit Hilfe des Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Proteins an die innere Mitochondrienmembran dar. Die Synthese von Pregnenolon wird durch die Cholesteroldesmolase CYP11A1 (Cholesterol side chain cleavage enzyme) katalysiert. Dabei erfolgen drei Reaktionen: zwei Hydroxylierungen in 20 α - und 22-Position und eine anschließende Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen C₂₀ und C₂₂.³ Pregnenolon wird dann ins Cytosol sezerniert, durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD, lokalisiert an der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums) in Position

3 oxidiert und durch anschließende Isomerisierung der Doppelbindung an C₅ zu Progesteron umgewandelt. Durch die Steroid-21-Hydroxylase (CYP21) an der cytoplasmatischen Membran des endoplasmatischen Retikulums erfolgt eine Hydroxylierung in Position 21, wodurch Deoxycorticosteron (DOC) entsteht. Die Umwandlung von DOC zu Aldosteron erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Oxidationsreaktionen über die Zwischenstufen Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron. Diese Reaktionen werden durch die Aldosteronsynthase (CYP11B2) katalysiert, die sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet und das Schlüsselenzym der Aldosteronbiosynthese darstellt.

Die Glucocorticoide hingegen werden von den Zellen der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde synthetisiert. Mit dem beim Menschen wichtigsten und wirksamsten Vertreter Cortisol wirken sie durch verschiedene Mechanismen regulierend auf den Blutzuckerspiegel. Glucocorticoide fördern die Gluconeogenese aus Aminosäuren in der Leber, hemmen die Glucoseverwertung und den Glucosetransport. Zudem verfügen sie über antiinflammatorische Wirkung durch Steuerung des Zellstoffwechsels der beteiligten Zellen. Cortisol ist ebenfalls am Fettstoffwechsel beteiligt, indem es beispielsweise den Fettabbau im peripheren Gewebe stimuliert. Neben den vorher genannten Eigenschaften besitzt Cortisol zusätzlich eine mineralocorticoide Wirkung. Wegen der gesteigerten Freisetzung in Stresssituationen wird Cortisol auch als Stresshormon bezeichnet. Die Biosynthese von Cortisol erfolgt ausgehend von Cholesterol über Pregnenolon, welches anschließend durch die 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase (CYP17) in Position 17 hydroxyliert wird (Abbildung 2). Das entstandene 17 α -Hydroxypregnenolon wird durch die 3 β -HSD zu 17 α -Hydroxyprogesteron umgewandelt und von CYP21 zu Deoxycortisol (RSS) umgesetzt. Dieses stellt das Substrat für das Schlüsselenzym der Cortisolbiosynthese dar, die Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1). Sie ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bildet durch einfache Oxidation in 11 β -Position Cortisol.

Durch die Verteilung der einzelnen Syntheseschritte auf verschiedene Zellkompartimente wird eine differenzierte Regulation gewährleistet. Dabei spiegelt die Aufteilung der terminalen Synthesewege der Mineralo- und Glucocorticoide auf zwei separate anatomische Areale der Nebennierenrinde das Vorhandensein und die Bedeutung differenzierter Regulationswege wider.

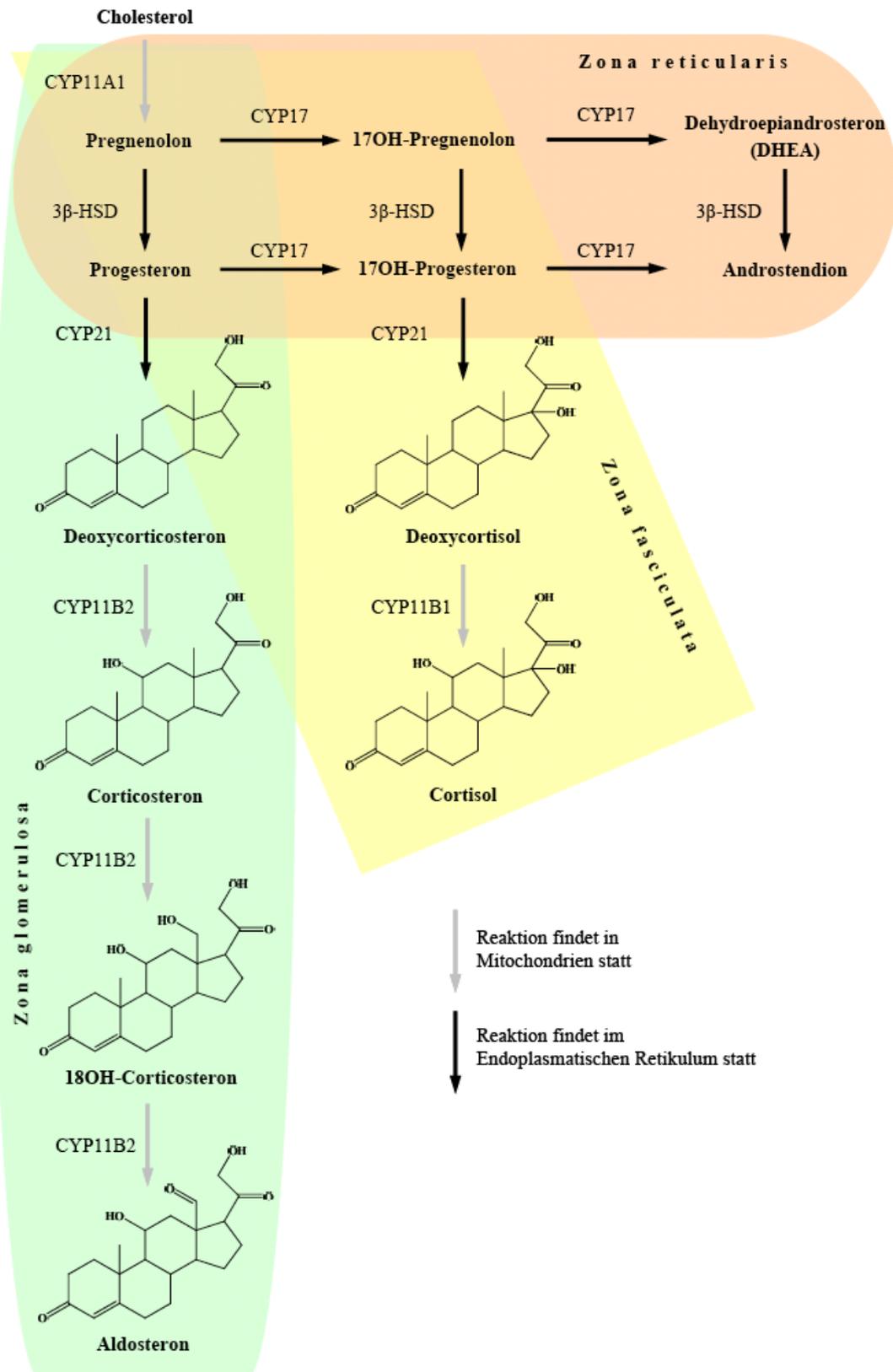


Abbildung 2: Biosynthese der Mineralo- und Glucocorticoide der humanen Nebennierenrinde

1.2 Regulation und physiologische Wirkung der Mineralocorticoide

Unter physiologischen Bedingungen werden pro Tag 100 - 150 µg Aldosteron gebildet. Die adrenale Aldosteronsekretion kann durch sehr unterschiedliche Substanzen stimuliert oder gehemmt werden; hierzu gehören beispielsweise Adrenalin, Adrenomedullin, Stickoxid, Dopamin oder Serotonin.^{4,5} Die Aldosteronsekretion unterliegt somit einem multifaktoriellen Regulationsmechanismus. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine besondere Rolle bei der Konstanterhaltung bzw. Normalisierung des Blutdrucks und des Elektrolythaushalts (Abbildung 3). Hierbei wird die Aldosteronfreisetzung über positive und negative Feedback-Mechanismen durch verschiedene Stimuli innerhalb weniger Minuten reguliert. So wird z. B. bei verminderter Nierenperfusion vermehrt Renin aus den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere freigesetzt.

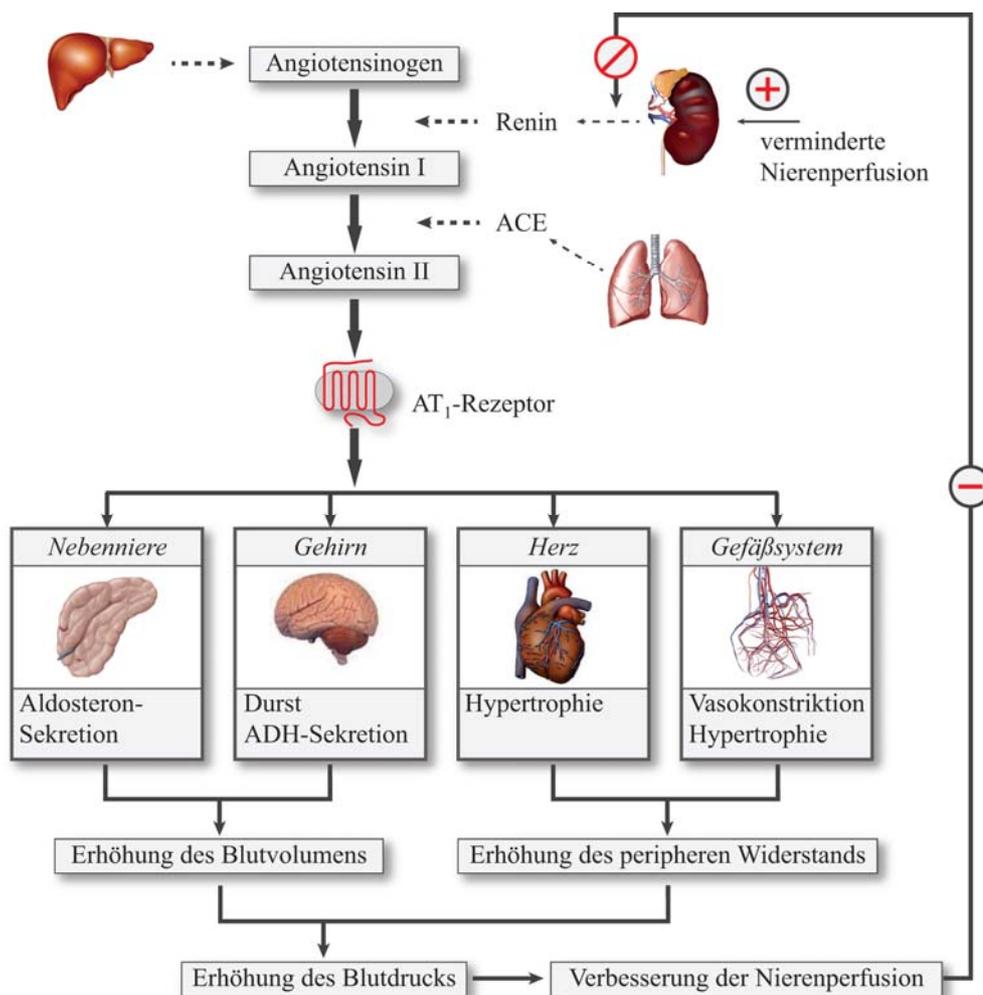


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Im Blut spaltet Renin durch Proteolyse aus Angiotensinogen, einem α_2 -Globulin der Leber, Angiotensin I (Ang I) ab. Dieses biologisch unwirksame Dekapeptid wird dann hauptsächlich im pulmonalen Gefäßsystem durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), einer Dipeptidylcarboxylase, in das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt.

Zum einen führt Ang II mit Hilfe eines spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptors (Ang II Typ 1 Rezeptor, AT₁) im Gefäßsystem zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion und führt somit zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Zum anderen bewirkt Ang II im Hypothalamus die Bildung von Vasopressin (ADH), das neben seiner vasopressorischen Wirkung auch eine antidiuretische Wirkung hat. Dadurch wird die Wasserrückresorption aus dem Harn der Sammelrohre verstärkt. Darüber hinaus bindet es an membranständige Rezeptoren der *Zona glomerulosa*-Zellen und stimuliert so die Synthese und Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, was ebenfalls zur Wasser- und Natriumretention führt. Zudem löst Ang II im Hypothalamus Durstgefühl aus, was durch die Flüssigkeitsaufnahme zusätzlich zu einer Erhöhung des Blutvolumens und somit des Blutdrucks führt. Die Erhöhung des Blutdrucks wiederum wird von den Barorezeptoren in der Niere registriert womit durch einen negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung von Renin unterbunden wird.

Zeitlich lässt sich die durch Ang II gesteigerte Aldosteronproduktion in zwei Phasen unterteilen: eine akute und eine chronische Phase. Bei der akuten Phase kommt es bereits nach wenigen Minuten zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration, was darauf hinweist, dass diesem Effekt keine Proteinsynthese zugrunde liegt. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf einer Aktivierung des StAR-Proteins, was zu einem verstärkten Transport von Cholesterol an die innere Mitochondrienmembran führt. Eine chronische Stimulation durch Ang II führt durch verstärkte Expression von CYP11B2 zu einer gesteigerten Aldosteronsynthese.

Neben Ang II als bedeutendem Stimulus der Aldosteronsekretion spielen auch die K⁺-Ionen-Konzentration sowie das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) eine bedeutende Rolle. So bewirkt ACTH, der dominierende Stimulator der Glucocorticoidsynthese, eine zeitlich begrenzte Erhöhung der Aldosteronkonzentration. Bei chronischer Stimulation durch ACTH kommt es allerdings zum Absinken des Aldosteronplasmalevels.⁶⁻⁸ Auch geringe Änderungen der extrazellulären K⁺-Ionen-Konzentration beeinflussen die Aldosteronproduktion maßgeblich. So kommt es bei einer verminderten K⁺-Ionen-Konzentration zu

einer erhöhten Aldosteronproduktion, vermittelt durch eine Depolarisation der *Zona glomerulosa*-Zellen, was am Ende einer Signalkaskade zu einer verstärkten Expression von CYP11B2 führt.

Die Wirkung von Aldosteron ist ein rezeptorvermittelter Prozess. Eine besonders hohe Anzahl an Mineralocorticoidrezeptoren (MR) findet sich in den ‚klassischen‘ Zielgeweben für die Mineralocorticoidwirkung, den Epithelien von Niere, Colon, Schweiß- und Speicheldrüsen.⁹ In Abwesenheit eines Liganden weist die Ligandenbindungsdomäne des MR diverse Kontaktstellen zu Chaperonen, wie den Hitzeschockproteinen hsp70 und hsp90, sowie zu verschiedenen Immuno- und Cyclophilinen auf.¹⁰⁻¹³ Nach Bindung von Aldosteron an den epithelialen Mineralocorticoid-Rezeptor im Cytosol der Zielzellen kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb dieser Ligandenbindungsdomäne, was zum Abdissoziieren der Chaperone, zur Dimerisierung des Rezeptors und schließlich zur Translokation des Steroid-Rezeptor-Komplexes in den Nucleus führt. Dort bindet der Komplex an die DNA und moduliert als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Proteine. Man spricht auch von genomischen Effekten. Aldosteron reguliert vor allem in den Zellen der proximalen und distalen Abschnitte der Nierentubuli und Sammelrohre den Na^+ -, K^+ - und Wassertransport. Hier führt es zur Aktivierung und verstärkten Expression des epithelialen, luminal gelegenen Natriumkanals (ENaC),¹⁴ erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit¹⁵ und verstärkt die Expression einer basolateralen Na^+/K^+ -ATPase (Abbildung 4).¹⁵⁹ Diese Proteine vermitteln die Rückresorption von Natriumionen aus dem Lumen (ENaC) sowie dessen Transport über die basolaterale Membran in den Blutkreislauf (Na^+/K^+ -ATPase). Dieser Vorgang erfolgt passiv aufgrund der höheren Na^+ -Ionenkonzentration im Urin im Vergleich zum Zellinneren. Darüber hinaus kommt es durch die Na^+/K^+ -ATPase im Austausch gegen Natrium zu einem verstärkten Transport von K^+ -Ionen ins Zellinnere. Ein ähnlicher Mechanismus liegt auch bei H^+ -Ionen vor. Parallel zur gesteigerten Natriumretention kommt es hier aus osmotischen Gründen zu einer verstärkten Wasserretention im Zellinneren und zu einer vermehrten Kaliumausscheidung über den luminalen Kaliumkanal. Gekoppelt ist dies an einen vermehrten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch an der basolateralen Membran.

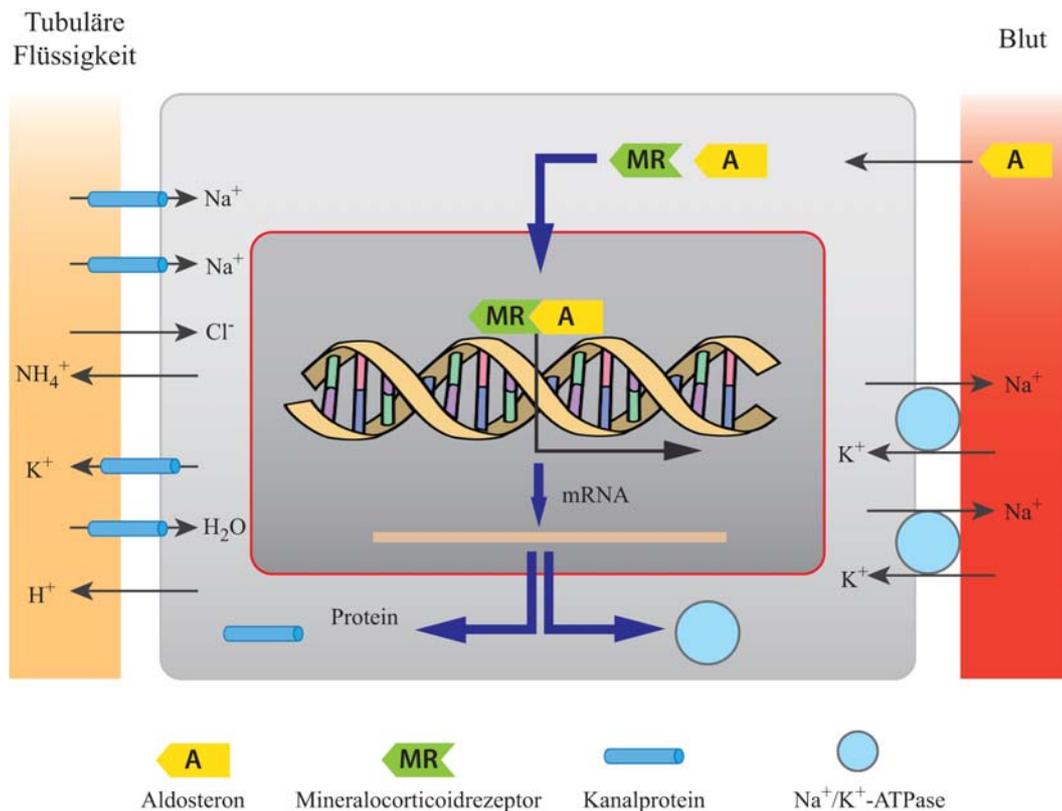


Abbildung 4: Molekularer Mechanismus der Aldosteronwirkung

Neben diesen langsamen, erst innerhalb von etwa 30 Minuten bis mehreren Stunden messbaren, genomischen MR-vermittelten Effekten von Aldosteron konnten auch nicht-genomische Effekte nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer sehr schnell einsetzenden Wirkung innerhalb weniger Minuten können diese nicht mit einem Einfluss auf die Gentranskription erklärt werden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bestätigt, dass diese Wirkungen nicht durch Transkriptions- (Actinomycin) oder Translationshemmer (Cycloheximid) beeinflusst werden können.^{16, 17} Einen der ersten Hinweise auf diese nicht-genomischen Effekte lieferten Spach und Streeten 1964.¹⁸ Sie beobachteten einen hemmenden Einfluss auf den Natriumaustausch in Erythrozyten von Hunden wenige Minuten nach Verabreichung von physiologischen Aldosteronkonzentrationen. Dies machte eine Erklärung durch den klassischen Mechanismus unmöglich, da Erythrozyten keinen Zellkern besitzen. Weitere Hinweise für schnelle Auswirkungen von Aldosteron auf diverse Parameter wurden für verschiedene Zielzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben. So konnte in einer klinischen Studie an gesunden Männern gezeigt werden, dass es durch Injektion von Aldosteron innerhalb weniger Minuten zu einer Veränderung des systemischen Gefäßwiderstandes und des Herzzeitvolumens kommt.^{19, 20} Auch an verschiedenen Zelllinien

wurde eine schnelle Wirkung von Aldosteron auf den Na^+/H^+ -Antiporter und die intrazelluläre Calciumkonzentration nachgewiesen, was vor allem zu pH-Wert-Änderungen in den entsprechenden Zellen führt.^{16, 21, 22} Ob der MR an diesen schnellen Aldosteron-Wirkungen beteiligt ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Einige Studien zeigen, dass es MR-unabhängige Reaktionen gibt, andere hingegen finden MR-abhängige Prozesse.²³ Auch bezüglich der Art dieses MRs ist man sich noch nicht sicher. Viele dieser nicht-genomischen Effekte lassen sich nicht durch den MR-Antagonisten Spironolacton beeinflussen,²⁴ während sie gleichzeitig sehr sensibel auf andere MR-Antagonisten, wie Eplerenon²⁵ oder **RU28318**,²³ reagieren. Andererseits wurden schnelle Aldosteron-Effekte auch an kultivierten Hautzellen von MR-Knockout-Mäusen beobachtet, wobei hier durchaus auch die stark exprimierte Glucocorticoidrezeptoren (GR) eine Rolle spielen könnten.²⁶ Daher gibt es zwei Hypothesen: zum einen könnte es sich bei dem beteiligten MR um den ‚klassischen‘ MR handeln. Zum anderen könnte es sich um einen noch nicht identifizierten in der Zellmembran lokalisierten MR handeln,²⁷⁻³¹ wie er bereits für Progesteron oder Estrogen charakterisiert worden ist.^{32, 33}

Interessanterweise weist der MR neben einer hohen Affinität zu Aldosteron auch eine ähnlich hohe Affinität zu Glucocorticoiden wie Cortisol auf. Diese zeigen hier sogar eine stärkere Affinität als zu ihrem ‚eigenen‘ Glucocorticoidrezeptor. Dass unter physiologischen Bedingungen die Konzentration von Cortisol etwa in 100 bis 1000-fachem Überschuss vorliegt, macht die Notwendigkeit eines weiteren Regulationsmechanismus deutlich. Um die spezifische Aktivierung des MR durch Aldosteron zu gewährleisten, wird in aldosteronsensitiven Geweben zusätzlich die 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11β -HSD2) coexprimiert. Diese NAD^+ -abhängige Short-Chain-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation des biologisch wirksamen Cortisols zum unwirksamen Cortison, das aufgrund der Ketogruppe in Position 11 keine Affinität zum MR aufweist. Der MR ist somit vor unangepasster Aktivierung geschützt. Das Isoenzym 11β -HSD1, eine NADPH-abhängige Reduktase, regeneriert hingegen in glucoseempfindlichen Geweben Cortisol aus inaktivem Cortison.

Neben den klassischen epithelialen Zielgeweben wurden auch andere MR exprimierende nichtepitheliale Gewebe identifiziert. Dazu zählen bestimmte Regionen des ZNS,³⁴⁻³⁶ das Myokard^{37, 38} sowie die Endothel- und glatten Muskelzellen des kardiovaskulären Systems.^{39, 40} Im ZNS spielt der MR vor allem eine Rolle bei der Blutdruckregulation, entweder direkt oder indirekt durch Anregung von Salzappetit und Durst.⁴¹ Doch aufgrund der Tatsache, dass im Gehirn in MR-reichen Bereichen keine 11β -HSD2, die in epithelialen

Gewebe die Aldosteronsensitivität gewährleistet, kolokalisiert zu sein scheint,⁴² ist es schwer, hier zwischen Mineralo- oder Glucocorticoid-vermittelten Effekten zu unterscheiden. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die intracerebroventriculäre (i. c. v.) Verabreichung von Aldosteron in niedrigen Dosen bei Ratten zu einem Blutdruckanstieg führte, während sich bei subcutaner (s. c.) Verabreichung kein Einfluss auf den Blutdruck zeigte.⁴³ Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Infusion des MR-Antagonisten **RU28318** abgeschwächt werden, was für eine aldosteroninduzierte MR-Aktivierung spricht.^{44, 45} Spezifische Mineralocorticoid-Rezeptoren wurden auch bei Kardiomyocyten, in den glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Endokard beschrieben. Im kardiovaskulären System spielt Aldosteron eine Rolle bei der Anpassung des Gefäßwiderstands. Auch die Expression der 11 β -HSD2 im Herzgewebe konnte nachgewiesen werden, allerdings in weitaus geringerer Häufigkeit als in epithelialen Geweben.^{37, 46}

Neben den Nebennieren als Bildungsort für Aldosteron wurden in den letzten Jahren weitere Organe beschrieben, in denen Aldosteron produziert wird. Diese lokale Aldosteronbiosynthese in Herz, Gefäßen und Gehirn wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und stellt einen Bestandteil des lokalen RAAS dar.

Der Arbeitsgruppe um Gomez-Sanchez gelang es, geringe Mengen an Aldosteron im Gehirn adrenaletomierter Ratten nachzuweisen.⁴⁷ Darüber hinaus wurde auch in Homogenaten einzelner Hirnareale, wie z. B. Cortex, Hippocampus oder Hypothalamus von Ratten eine CYP11B2-Expression gezeigt.^{48, 49} Allerdings ist hier die Expression etwa 100 bis 1000-fach niedriger als für die Nebennierenrinde beschrieben. Erstaunlicherweise stimmen im Gehirn die Bereiche der CYP11B2-Expression exakt mit den Bereichen überein, in denen auch CYP11B1, CYP11A1, 3 β -HSD und StAR exprimiert werden und korrelieren zudem mit den Bereichen erhöhter MR-Anzahl.^{50, 51} Dies kann als Hinweis für eine autokrine oder parakrine Wirkungsweise von Corticosteroiden im Gehirn angesehen werden. Darüber hinaus beschreiben Xue *et al.* (2005) eine lokale Produktion von Aldosteron in den Nieren.⁵²

Auch in Zellen des kardiovaskulären Systems konnte die Expression verschiedener an der Aldosteronbiosynthese beteiligter Enzyme und Cofaktoren nachgewiesen werden. So wurde die mRNA der Aldosteronsynthese aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen der humanen Pulmonalarterie isoliert.^{40, 53} Auch im Perfusat isolierter Mesenterialarterien von Ratten konnten geringe Mengen an Aldosteron nachgewiesen werden.⁵³ Interessanterweise konnte im Perfusat adrenaletomierter Ratten sogar eine höhere Aldosteronkonzentration

gemessen werden als in der Kontrollgruppe, was als Beweis für eine lokale Aldosteronsynthese angesehen wurde. Im Gegensatz dazu gelang es der Arbeitsgruppe um Ahmad *et al.* (2004) nicht, diese Ergebnisse zu reproduzieren; sie konnten keine CYP11B2-Expression nachweisen. So ist die lokale Aldosteronsynthese von humanen vaskulären Endothelzellen noch nicht eindeutig geklärt.⁵⁴

Ebenso wird die kardiale Aldosteronproduktion kontrovers diskutiert. Der Nachweis von CYP11B2 mRNA konnte zwar in Proben von gesunden Rattenherzen,⁵⁵ jedoch nicht in humanen mRNA-Proben von gesunden adulten Herzen nachgewiesen werden.^{46, 56} Dennoch konnte sowohl im Perfusat als auch im Homogenat isolierter Rattenherzen Aldosteron gemessen werden.^{55, 57} Die Konzentration ließ sich durch Inkubation mit Ang II erhöhen und entsprach etwa der 17-fachen Konzentration im Plasma. In weiteren Studien sank der kardiale Aldosteronspiegel entsprechend dem Plasmaspiegel nach Adrenalectomie bei Ratten. Dabei konnte zum überwiegenden Teil kein oder nur ein sehr geringer Aldosteronspiegel gemessen werden.^{58, 59} Die Autoren schließen daraus, dass der weitaus größte Teil des kardialen Aldosterons über die Zirkulation von der Nebenniere zum Herzen gelangt und im Herzen allenfalls eine sehr geringe Synthese stattfindet. Auch Chai *et al.* (2006) bestätigen den Befund, dass das Herz in der Lage ist, aus der Zirkulation stammendes Aldosteron zu akkumulieren.⁶⁰

1.3 Regulation und physiologische Wirkung der Glucocorticoide

Beim Menschen beträgt die tägliche Cortisolsekretion 10 - 30 mg. Es fördert vor allem die Gluconeogenese und die Glycogenbildung in der Leber und wirkt damit der blutzuckersenkenden Wirkung von Insulin entgegen. Gleichzeitig ist Cortisol in der Lage, die Glucoseaufnahme im peripheren Gewebe zu hemmen, was diesen Effekt zusätzlich verstärkt. Weiterhin steigert es die Lipolyse bzw. die lipolytische Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin und den Proteinabbau. Cortisol besitzt durch Hemmung der Histamin- und Cytokinproduktion sowie durch Hemmung der Funktion immunkompetenter Zellen zudem antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung. Zudem wird durch Cortisol die Bildung und Freisetzung von Prostaglandinen und Leukotrienen durch Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung gehemmt. Daneben besitzt es auch eine regulatorische Funktion in der Calcium-, Natrium- und Kaliumhomöostase (mineralocorticoide Wirkung) und ist

neben den Katecholaminen das wichtigste Stresshormon. Die adrenale Synthese von Cortisol wird über eine Hormonkaskade reguliert, die als Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) bezeichnet wird (Abbildung 5). Dabei unterliegt die Sekretion einer natürlichen zirkadianen Rhythmik mit einem Maximum am Morgen und einem Minimum um Mitternacht.

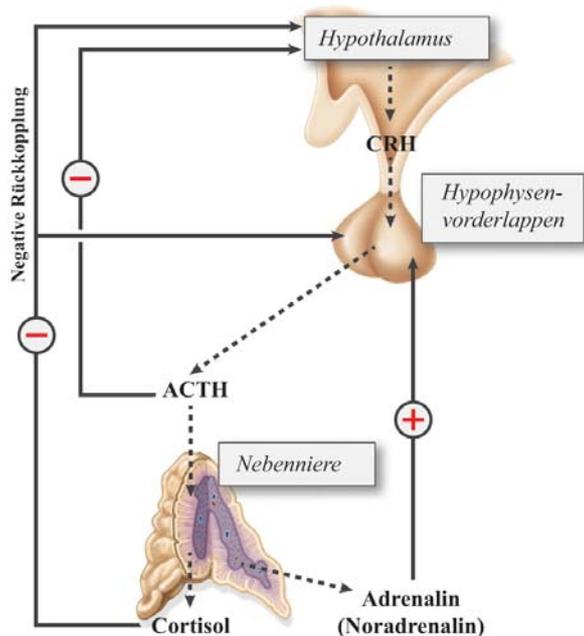


Abbildung 5: Regulation der Glucocorticoid-Freisetzung

Die HPA-Achse beginnt mit dem Corticotropin Releasing Hormon (CRH), das im Hypothalamus durch die Aktivierung übergeordneter Zentren (limbisches System/Hippocampus) gebildet wird. Es wird zum Hypophysenvorderlappen transportiert und stimuliert dort die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Die Wirkung von ACTH auf die Nebennierenrinde wird über den ACTH-Rezeptor vermittelt. Nach Stimulation des transmembranen, G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird durch Steigerung der Expression der Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese die Sekretion von Cortisol induziert. Nach seiner Synthese in den *Zona fasciculata*-Zellen der Nebennierenrinde diffundiert es aus den Zellen ins Blutplasma, wo es größtenteils von einem Plasmaprotein, dem Transcortin, transportiert wird. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus wird bei erhöhtem Cortisolspiegel die Sekretion von CRH und ACTH gehemmt. Sinkt der Cortisolspiegel im Blut, wird die ACTH-Sekretion und somit die Cortisolsynthese wieder gesteigert. Da sich diese Vorgänge innerhalb kürzester Zeit

abspielen, kann Cortisol als Antwort auf einen Stimulus innerhalb von zehn Sekunden sezerniert werden. Neben diesen einfachen Regulationsmechanismen ist die HPA-Achse einer Vielzahl modulatorischer Faktoren unterworfen. Zu diesen Modulatoren zählen neben Hormonen Zytokine und andere Entzündungsmediatoren sowie autonome neuronale Regulationsmechanismen. Seine physiologische Wirkung erzielt Cortisol durch Bindung an den Glucocorticoidrezeptor (GR) im Cytosol seiner Zielzellen. Der Rezeptor-Steroid-Komplex wird in den Zellkern transloziert und bindet als Homodimer an die Glucocorticoid-Response-Elements (GRE) seiner Zielgene, was bei verschiedenen Genen zu modifizierter Genexpression führt. Im Gegensatz zum MR, der nur in Zellen bestimmter Gewebe exprimiert wird, kommt der GR ubiquitär vor.

1.4 Aldosteronsynthase (CYP11B2) und Steroid 11 β -Hydroxylase (CYP11B1): Situation in verschiedenen Spezies

Im Menschen katalysiert das Schlüsselenzym der Glucocorticoidbiosynthese, CYP11B1, die Hydroxylierung von Deoxycortisol (RSS) in Position 11 β zu Cortisol. Dagegen katalysiert das Schlüsselenzym der Mineralocorticoidbiosynthese, CYP11B2, die 11 β -Hydroxylierung von DOC zu Corticosteron. Dieses wird dann durch Hydroxylierung in 18-Position zu 18-Hydroxycorticosteron und schließlich durch Oxidation in Position 18 zu Aldosteron umgesetzt. Das Enzym CYP11B1 setzt neben seinem Substrat RSS mit ähnlicher Aktivität auch DOC durch 11 β -Hydroxylierung zu Corticosteron um. Es besitzt allerdings nicht, wie CYP11B2 die Fähigkeit, die 18 β -Hydroxylierung und -oxidation zu katalysieren. CYP11B1 ist ein reines 11 β -hydroxylierendes Enzym. Neben dieser hohen funktionellen Ähnlichkeit weisen die beiden Enzyme auch sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zueinander auf.

Beim Menschen sind die für CYP11B1 und CYP11B2 kodierenden Gene auf Chromosom 8q21-22 lokalisiert.⁶¹⁻⁶⁴ Die DNA-Sequenzen weisen eine Identität von 93 % auf. Beide Enzyme werden zunächst als Präproteine, bestehend aus 503 Aminosäuren, einschließlich einer 24 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz exprimiert, die nach Translokation in die innere Mitochondrienmembran abgespalten wird. Die resultierenden Enzyme weisen Molekulargewichte von 50 kDa (CYP11B1) und 48,5 kDa (CYP11B2) auf und unterscheiden sich letztlich in nur 29 von 479 Aminosäuren, die alle außerhalb der Substratbindungsstelle lokalisiert zu sein scheinen.⁶⁵⁻⁶⁷ Die Aminosäuresequenz-Identität beträgt 95 %.^{63, 68} Im Gegensatz zum Menschen, bei dem sich das CYP11B-Gen in zwei

unterschiedliche Isoformen entwickelt hat, blieb bei Schwein, Schaf und Rind die funktionale Einheit vorhanden.⁶⁹⁻⁷¹ Bei diesen Spezies werden sowohl die Oxidation in 11 β -Position als auch die beiden Oxidationsschritte in 18-Position von nur einem Enzym katalysiert, das in allen Zonen der Nebennierenrinde exprimiert wird. Bei Ratten stellt sich eine andere Situation dar. Hier existieren vier unterscheidbare Isoformen (CYP11B1, CYP11B2, CYP11B3, CYP11B4) mit funktionaler Differenzierung, wobei CYP11B3 nur in der fetalen Nebennierenrinde exprimiert wird und CYP11B4 ein Pseudogen darstellt.^{72, 73} Ebenso wird beim Meerschweinchen die Existenz eines weiteren Pseudogens postuliert.⁷⁶ Bei Hamster, Meerschweinchen und Hund existieren, wie beim Menschen, zwei CYP11B-Isoenzyme; CYP11B1 katalysiert jeweils die Bildung von Cortisol, CYP11B2 die von Aldosteron.^{74, 75} Im Gegensatz dazu fehlt bei Kaninchen, Maus und Ratte die 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase. Bei diesen Nagerspezies stellt Corticosteron das wichtigste Glucocorticoid dar, das in den Zellen der *Zona fasciculata* aus Deoxycorticosteron gebildet wird. Die Aminosäuresequenz-Identitäten der Aldosteronsynthasen verschiedener Spezies im Vergleich zum humanen Enzym sind in Abbildung 6 dargestellt.

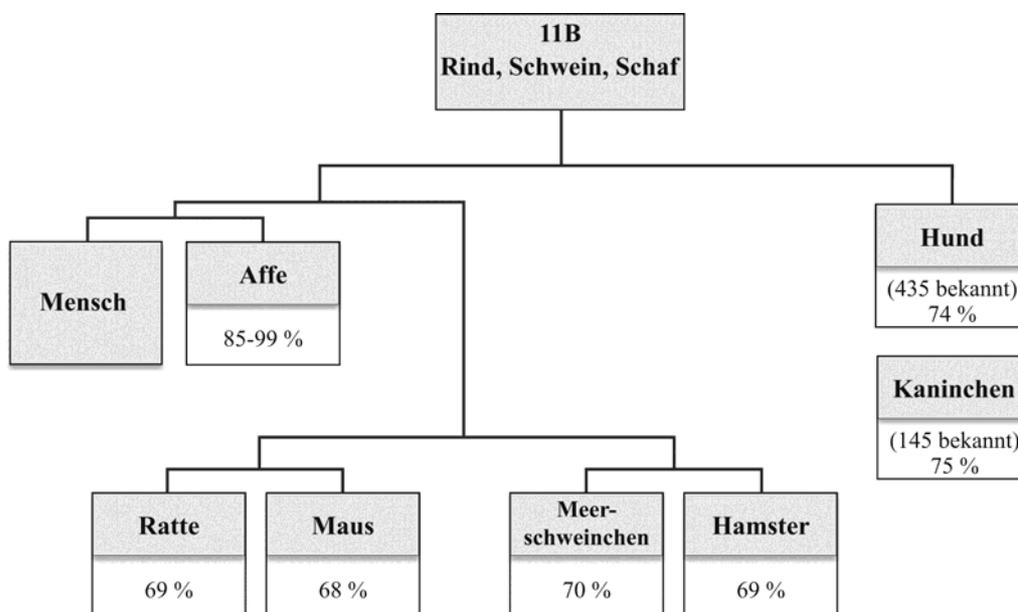


Abbildung 6: Aminosäuresequenz-Identitäten der CYP11B2-Enzyme verschiedener Spezies (aufgeführte % Sequenzidentität bezogen auf das humane CYP11B2-Enzym, BLAST®)⁷⁷

2 Aldosteronsynthese als potentielles Drug Target

2.1 Pathophysiologie von Aldosteron

Erhöhte Plasma-Aldosteronspiegel werden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, wobei eine vermehrte Aldosteronsekretion verschiedene Ursachen haben kann.

Der primäre (adrenale) Hyperaldosteronismus (PHA) wurde erstmals 1955 von Jerome Conn beschrieben und wird folglich auch als Conn-Syndrom bezeichnet.⁷⁸ Dabei beruht die gesteigerte Aldosteronfreisetzung meist auf pathologischen Veränderungen der Nebennieren, während genetische Defekte nur sehr selten eine Rolle spielen. Infolgedessen wird die Reninsekretion durch negatives Feedback reduziert. Als Leitsymptome gelten hier arterielle Hypertonie, Hypokaliämie und in vielen Fällen eine Hybernatriämie.⁷⁹ Dadurch bedingt kommt es zu zahlreichen unspezifischen Symptomen wie z. B. Kopfschmerzen, Muskelschwäche, Müdigkeit, Polyurie und Polydipsie. Weiterhin kann sich infolge der Hypokaliämie eine metabolische Alkalose entwickeln.⁸⁰ Ursächlich für das Conn-Syndrom ist in 50 – 70 % der Fälle ein unilaterales Aldosteron-produzierendes Adenom der Nebennierenrinde. Bei 20 - 30 % der Patienten ist eine bilaterale Nebennierenhyperplasie, auch ideopathische Hyperplasie genannt, verantwortlich. Weitere, sehr seltene Ursachen sind eine primäre unilaterale Hyperplasie, ein Aldosteron-produzierendes Nebennierenkarzinom, der Glucocorticoid-supprimierbare familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1 oder der familiäre Hyperaldosteronismus Typ 2. Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen primärem Hyperaldosteronismus und Insulinresistenz. Mittlerweile geht man davon aus, dass bei mindestens 10 % aller hypertensiven und bei bis zu 23 % der therapieresistenten hypertensiven Patienten ein Conn-Syndrom vorliegt.⁸¹⁻⁸³

Der primäre Hyperaldosteronismus ist vom sekundären, durch extraadrenale Faktoren induzierten Hyperaldosteronismus, abzugrenzen. Die vermehrte Aldosteronsekretion beruht hier auf einer Dysfunktion des RAAS als Folge einer primären Erkrankung und geht deswegen typischerweise mit erhöhten Reninspiegeln einher. Verschiedene Erkrankungen wie reninproduzierende Tumore, Nierenarterienstenosen, Leberzirrhose, chronische Nierenerkrankungen, Herzinsuffizienz oder das sehr seltene Bartter-Syndrom - eine autosomal-rezessiv vererbte renale Erkrankung - können zu einer pathologisch veränderten Regulierung durch das RAAS führen. Dabei wird dem RAAS bei der Pathogenese von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose eine besondere Bedeutung zugeschrieben.^{84, 85} Aber

auch bei Adipositas,⁸⁶ metabolischem Syndrom^{87, 88} und Diabetes⁸⁹⁻⁹¹ können erhöhte Aldosteronlevel beobachtet werden.

Unter Herzinsuffizienz versteht man eine verringerte Pumpleistung des morphologisch veränderten Herzens, wodurch der Organismus nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden kann. Die Herzinsuffizienz kann durch verschiedene primäre Erkrankungen wie z. B. langjährige Hypertonie oder Myokardinfarkt hervorgerufen werden. Durch die unzureichende Organdurchblutung werden verschiedene Kompensationsmechanismen in Gang gesetzt, um die Pumpleistung des Herzens zu verstärken und so eine ausreichende Blutversorgung zu gewährleisten. Um das Schlagvolumen des Herzens zu erhöhen, kommt es, vermittelt durch die renale Minderperfusion, vor allem zu einer Aktivierung des RAAS. Die Freisetzung von Ang II führt zu einer starken Vasokonstriktion und zu einer gesteigerten Natrium- und Wasserrückresorption durch verstärkte Freisetzung von Aldosteron. Beide Effekte haben eine zusätzliche Mehrbelastung des primär schon insuffizienten Herzens zur Folge. Zusätzlich führen der erhöhte Aldosteron- und Ang II-Spiegel durch Strukturveränderungen des Myokards zu einer kardialen Hypertrophie, wodurch sich die Herzfunktion weiter verschlechtert.^{92, 93} Dabei vermittelt Aldosteron durch Aktivierung des MR in kardialen Fibroblasten deren Proliferation und die vermehrte Bildung von Kollagen Typ I und Typ III,⁹⁴ wodurch es zu fibrotischen Strukturveränderungen kommt. Ang II verstärkt die Kollagenakkumulation zusätzlich durch die Hemmung des Schlüsselenzyms der interstitiellen Kollagenegradation, der Metalloproteinase 1 (MMP 1). Auch diese Faktoren führen zu einer zusätzlichen Mehrbelastung des Herzens, da die Verdickung und Versteifung der Ventrikel die Fähigkeit des Herzens zur diastolischen Relaxation verschlechtert.⁹⁵ Dies hat im Sinne eines *Circulus vitiosus* eine weitere Verminderung der renalen Perfusion und somit eine weitere Stimulation des RAAS zur Folge (Abbildung 7).¹⁵⁹ Zusätzlich kommt es zur gestörten Erregungsausbreitung am Herzen, wodurch auch ventrikuläre Arrhythmien begünstigt werden.

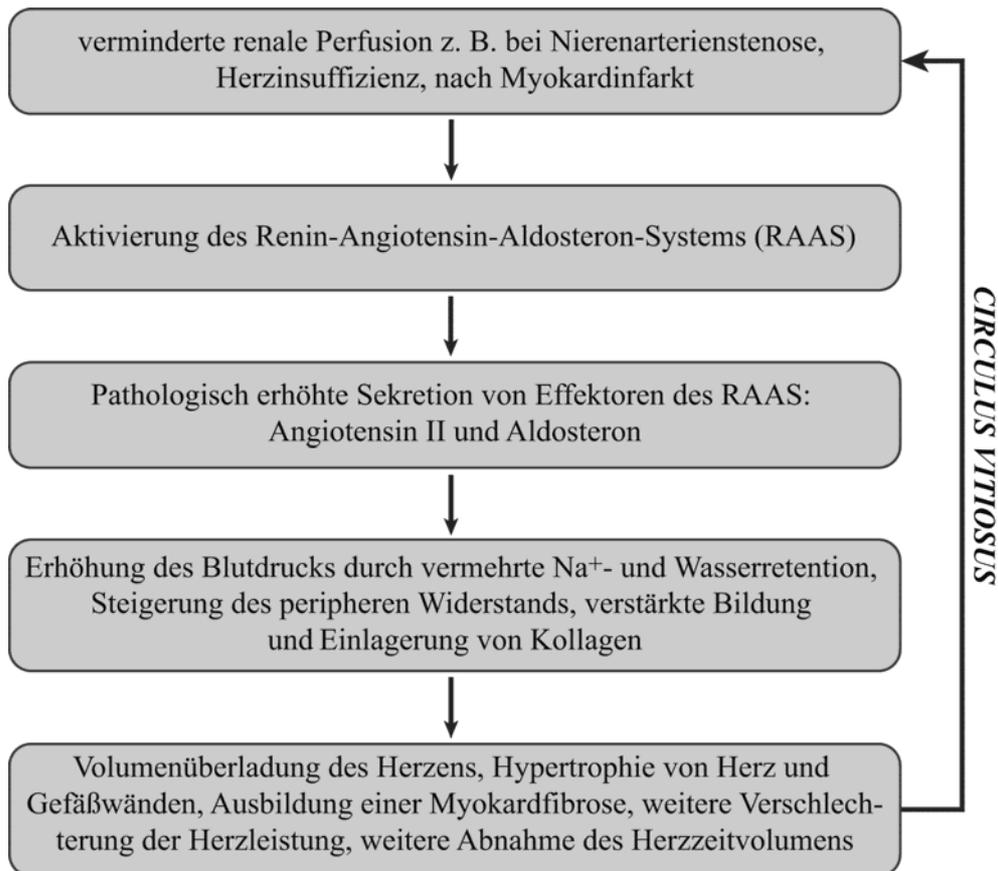


Abbildung 7: Pathophysiologische Aktivierung des RAAS

2.2 Neuer Therapieansatz zur Behandlung aldosteronabhängiger Erkrankungen

Die Beteiligung des RAAS an der Entwicklung und Progression von Herzinsuffizienz und Myokardfibrose ist unbestritten. Gegenwärtig gibt es in Europa etwa 10 Millionen Menschen, die an Herzinsuffizienz leiden. Jedes Jahr werden 300.000 neue Fälle diagnostiziert. Die Tatsache, dass bereits bei einer leichten Herzinsuffizienz die Mortalität 10 - 20 % beträgt, macht die Notwendigkeit einer geeigneten medikamentösen Therapie deutlich. Bei einer symptomatischen Insuffizienz beträgt die Mortalität innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung sogar 60 – 70 %, d. h. ähnlich schlecht wie bei hoch malignen Tumoren.⁹⁶ Zur Therapie sind heute verschiedene Medikamente im Einsatz: solche, die direkt in das RAAS eingreifen und dort die Schlüsselenzyme hemmen oder solche, die durch antagonistische Wirkung die hormonvermittelten Effekte verhindern und so eine Verbesserung von Herzinsuffizienz und Bluthochdruck bewirken. Auch beim primären Hyperaldosteronismus, der für etwa 2 Millionen Bluthochdruckpatienten in Deutschland ursächlich ist, kommt neben der Adrenalektomie eine medikamentöse

Behandlung in Frage. Zudem gehören Pharmaka, die den Sympathikus (Betablocker) oder die Flüssigkeitsretention im Körper hemmen (Diuretika) zur Standardtherapie bei Herzinsuffizienz, ebenso wie der Einsatz von Herzglykosiden.

Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es durch die Dauerstimulation des RAAS zu einer abnormen Aldosteronsekretion, wodurch der Plasma-Aldosteronlevel auf das 20-fache des normalen Wertes ansteigen kann.⁹⁷ Bereits in den 1980er Jahren wurde in der sogenannten CONSENSUS-Studie (North Scandinavian Enalapril Survival Study) eine Verbesserung der Mortalität von Herzinsuffizienzpatienten durch die Hemmung der Ang II-Biosynthese mittels Enalapril nachgewiesen. Dabei lieferte die Korrelation zwischen Plasma-Aldosteronspiegel und Mortalität erste Hinweise auf die Beteiligung von Aldosteron bei kardiovaskulären Erkrankungen. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte in zahlreichen klinischen Studien der positive Effekt von ACE-Hemmern auf Morbidität und Mortalität bei Herzinsuffizienz (z. B. nach Myokardinfarkt) und chronischen Nierenleiden (z. B. als Folge von Bluthochdruck) gezeigt werden.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Ein weiterer Angriffspunkt im RAAS liefert der Ang II-Rezeptor AT_1 . Ang II-Rezeptor-Blocker (ARB), wie der erste in den 1990er Jahren entwickelte Vertreter Losartan, antagonisieren den durch Ang II vermittelten Effekt.¹⁰¹ Dadurch wird eine weitreichendere Ang II-Blockade erreicht, da hier im Gegensatz zu den ACE-Inhibitoren auch mögliche alternative Wege blockiert sind. Zudem treten die für ACE-Hemmer häufigen Nebenwirkungen wie z. B. Reizhusten deutlich seltener auf.

Bei den bisher aufgeführten Therapien hat man sich nur auf das RAS konzentriert und nicht direkt die Aldosteronsynthese oder deren Wirkung am Rezeptor gehemmt. Man ging lange davon aus, dass durch die Hemmung der Ang II-Synthese auch die Aldosteronlevel sinken. Doch die Tatsache, dass es durch ACE-Hemmer^{102, 103} oder ARBs¹⁰⁴ in 30 – 40 % der Fälle nach einem initialen Abfall des Serum-Aldosteronspiegels zum sogenannten Aldosteron-Breakthrough¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, d. h. zu einem Wiederanstieg bis hin zu den Ausgangswerten oder sogar darüber hinaus kommt, macht die Notwendigkeit eines neuartigen Therapiekonzepts deutlich.

Auch Renin, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des RAAS, kann gehemmt werden. An diesem frühen Punkt einzugreifen, ist spezifischer als die ACE-Hemmung oder der AT_1 -Antagonismus, da so die Synthese von Ang II nahezu komplett unterbunden werden kann. Erst im Jahr 2007 wurde mit Aliskiren der erste Renin-Inhibitor zur Behandlung von arterieller Hypertonie zugelassen.¹⁰⁸ Durch die Hemmung der Ang I- und Ang II-Synthese

und der so fehlenden Feedback-Hemmung durch Ang II kann ein Anstieg der Plasma-Aldosteronkonzentration beobachtet werden. Doch im Gegensatz zu ACE-Hemmern oder AT₁-Antagonisten führt die Behandlung mit Renin-Inhibitoren zu einer Abnahme der Reninaktivität und sollte folglich nicht zu einem Aldosteron-Breakthrough führen. Zwar ist die blutdrucksenkende Wirkung von Aliskiren sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Antihypertensiva weitgehend belegt,^{109, 110} jedoch konnte in der 2010 veröffentlichten ASPIRE-Studie (Aliskiren Study in Post-MI Patients to Reduce Remodeling) kein zusätzlicher Nutzen gezeigt werden.¹¹¹ Die ASPIRE-Studie ist eine von insgesamt 14 Studien eines großen klinischen Studienprogramms von Novartis (ASPIRE HIGHER),¹¹² in der mögliche, über die Blutdrucksenkung hinausgehende Effekte des Reninhemmers untersucht werden. Leider konnte die Erwartung, dass der Renin-Inhibitor die Erholung des Herzmuskels nach einem Infarkt fördert, nicht erfüllt werden, wie dies bei ACE-Hemmern oder Ang II-Rezeptorblockern nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Rate von Komplikationen wie Hyperkaliämie, Hypotension und Nierenfunktionsstörungen festgestellt. Auch die Häufigkeit klinischer Ereignisse (z. B. Tod, Re-Infarkt) war ebenso hoch wie bei den Patienten, die nur die Standardtherapie erhielten.

Auch die Hemmung der rezeptorvermittelten Effekte von Aldosteron stellt eine Option bei der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen dar. Die erste Studie, bei der ein Vorteil von Aldosteronrezeptor-Antagonisten (ARA) bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach akutem Herzinfarkt nachgewiesen werden konnte, war die RALES-Studie (Randomized Aldactone Evaluation Study) 1999.¹¹³ In dieser Studie wurde an 1663 Patienten zusätzlich zur Basistherapie mit ACE-Hemmern und Schleifendiuretika der ARA Spironolacton in nicht-blutdrucksenkenden Dosen verabreicht. So konnte die Überlebensrate signifikant verbessert werden; die Mortalität sank im Vergleich zur Placebogruppe um 30 %. Allerdings war die Anwendung von Spironolacton mit häufig auftretenden schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Gynäkomastie, Dysmenorrhoe und Brustschmerzen verbunden, die sich durch die steroidale Struktur der Substanz begründen lassen. Auch bei der 2003 durchgeführten EPHEMUS-Studie (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz des Aldosteronrezeptor-Antagonisten Eplerenon zusätzlich zu den oben genannten Basistherapien die Hospitalisationsrate deutlich gesenkt wird, zudem verringerte sich die Mortalität der Herzinsuffizienz-Patienten um 15 % im Vergleich zur Placebogruppe. Auch in der ergänzenden EMPHASIS-HF-Studie (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) 2010 führte eine Behandlung mit Eplerenon zusätzlich zur

Standardtherapie bei Patienten mit leichter chronischer Herzinsuffizienz zu einer statistisch signifikanten Reduktion der kardiovaskulären Mortalität oder Klinikeinweisungen aufgrund von Herzinsuffizienz um 37 %. Darüber hinaus verfügt Eplerenon über ein besseres Selektivitätsprofil als Spironolacton. Es zeigt keine nennenswerten Affinitäten zu anderen Steroidrezeptoren und verursacht so weniger endokrine Nebenwirkungen. In vielen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Therapie mit ARAs nicht nur vor fibrotischen Veränderungen des Herzens^{113, 114} und der Nieren schützt,^{115, 116} sondern dass ihre Verwendung darüber hinaus zur Rückbildung bereits bestehender Fibrosen führen kann.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Doch bei allen ARAs kommt es zum signifikant erhöhten Auftreten von Hyperkaliämien, die zu Herzrhythmusstörungen führen und das Risiko eines plötzlichen Herztodes erhöhen. Eine von Juurlik *et al.* (2004) veröffentlichte Studie zeigt, dass es in Kanada nach der Veröffentlichung der Ergebnisse von RALES zu einem sprunghaften Anstieg der Verordnungen von Spironolacton kam.¹²⁰ Dieser Anstieg korrelierte mit einer Zunahme der mit Hyperkaliämie assoziierten Klinikeinweisungen und Todesfällen. Ein weiterer Nachteil der ARAs ist, dass diese nicht den pathologisch erhöhten Plasma-Aldosteronspiegel senken, vielmehr scheint sogar das Gegenteil der Fall zu sein, da einige Studien belegen, dass es durch die Gabe von ARAs zu einem weiteren Anstieg des Aldosteronlevels kommt.^{121, 122} Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass hohe Aldosteronplasmakonzentrationen nicht zu einer Down-Regulation des Aldosteronrezeptors führen, sondern zu einer Up-Regulation.^{123, 124}

Neben seiner physiologischen Bedeutung spielt Aldosteron eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Herzinsuffizienz¹²⁵, Myokardfibrose, Arrhythmien,¹²⁵ Bluthochdruck^{126, 127} und Nephropathien.^{128, 129} Trotz der gegenwärtig verfügbaren medikamentösen Therapien bei aldosteronabhängigen Erkrankungen zeigen viele Patienten weiterhin die typischen, mit einer verminderten Lebensqualität einhergehenden Krankheitssymptome. Aber auch die merklich verkürzte Lebenserwartung unter Standardtherapie ist ein Grund dafür, dass die Forschung auf dem Gebiet weiter vorangetrieben wird.

Einen neuen, innovativen Ansatzpunkt zur Reduktion der vermehrten Aldosteronfreisetzung liefert die direkte Inhibition des Schlüsselenzyms der Aldosteronsynthese, die Aldosteronsynthase CYP11B2. Wie bereits erwähnt, konnte in mehreren Studien belegt werden, dass Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen, die mit erhöhten Aldosteronspiegeln assoziiert sind, von einer Antagonisierung der Aldosteronwirkung profitieren. Durch den Einsatz von Aldosteronsynthase-Inhibitoren sollen die

aldosteronvermittelten pro-inflammatorischen und/oder profibrotischen Effekte auf die sogenannten ‚Endorgane‘ verhindert und die Nachteile der MR-Blocker, wie Hyperkaliämie oder das Auftreten des Aldosteron-Breakthrough, vermieden werden.¹³⁰ Zudem können so auch die nichtgenomische Effekte von Aldosteron gehemmt werden.

Die Aldosteronsynthese CYP11B2 als Target wird von unserer Arbeitsgruppe bereits seit 1994 propagiert,¹³¹ ebenso wie die mögliche Anwendung selektiver CYP11B2-Inhibitoren zur Behandlung von Hyperaldosteronismus, Herzinsuffizienz und Myokardfibrose.^{132, 133} Bislang konnte in mehreren *in vivo*-Studien bewiesen werden, dass es sich bei CYP11B2 um ein vielversprechendes Drug-Target handelt. Neuere tierexperimentelle Studien belegen eindrucksvoll, dass das *R*(+)-Enantiomer der Substanz **FAD286** in der Lage ist, den Plasma-Aldosteronspiegel *in vivo* zu senken. Hierbei handelt es sich um einen unselektiven Aromatase-Inhibitor, der zur Therapie von hormonabhängigem Brustkrebs eingesetzt wird.¹³⁴ Aufgrund mangelnder Selektivität kann bei seiner Anwendung eine zusätzliche Hemmung der Corticoidbiosynthese beobachtet werden. Diese Substanz stellt somit den ersten Inhibitor dar, bei dem ein CYP11B2-hemmender Effekt nachgewiesen wurde.^{135, 136} Erst 2005 konnten Fiebeler *et al.* den potentiellen therapeutischen Nutzen eines CYP11B2-Inhibitors zeigen.⁵⁹ In ihrem Versuch kamen transgene Ratten zum Einsatz, bei denen sich aufgrund einer Überexpression der humanen Renin- und Angiotensinogen-Gene ein Bluthochdruck manifestiert. Die Tiere entwickelten schwerste kardiale und renale Schäden, die dazu führten, dass die Mortalität der unbehandelten Tiere nach sieben Wochen 40 % betrug. Wurde den Tieren die Substanz **FAD286** verabreicht, konnten die fibrotischen Gewebsveränderungen an Herz und Nieren abgeschwächt und die kardiale Hypertrophie reduziert werden. Die Sterblichkeit wurde so auf 10 % gesenkt. Dies entsprach in etwa dem Ergebnis, das nach der Durchführung einer Adrenalektomie (Substitution mit Dexamethason) bei einer Vergleichsgruppe von Tieren erreicht wurde. 2006 untersuchten Ménard *et al.* die dosisabhängige Wirkung von **FAD286** und Spironolacton an sogenannten spontan hypertensiven Ratten, einem Tiermodell für humane primäre Hypertonie.¹³⁷ Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt und es wurden zwei unterschiedliche Diäten verabreicht: eine ‚low-salt‘-Diät, um die Aldosteronproduktion zu erhöhen (0,05 % Natrium und 2 % Kalium) und eine ‚high-salt‘-Diät, um diese zu erniedrigen (2 % Natrium und 0,9 % Kalium). Die Versuchstiere, denen zuvor die ‚low-salt‘-Diät verabreicht wurde, zeigten im Vergleich zur anderen Gruppe einen um das 40-fache erhöhten Urin-Aldosteronlevel. In beiden Versuchsgruppen konnte durch Verabreichung von 30 mg/kg **FAD286** der Aldosterongehalt im Urin deutlich gesenkt werden (87 % bei ‚low-salt‘-Diät; 75 % bei ‚high-

salt'-Diät). Die gleiche Dosis Spironolacton führte hingegen zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration (70 % bei ‚low-salt'-Diät; 120 % bei ‚high-salt'-Diät). Die Plasma-Aldosteronlevel nach ‚low-salt'-Diät konnten ebenfalls um 64 % abgesenkt werden, jedoch konnte auch mit höheren Dosen von **FAD286** keine vollständige Hemmung der Aldosteronbiosynthese erreicht werden. Eine signifikante Erhöhung der Plasmakaliumkonzentration, wie sie bei der Therapie mit MR-Antagonisten beobachtet werden kann und zu gefährlichen Hyperkaliämien führt, konnte bei der Behandlung mit dem Aldosteronsynthese-Hemmer nicht beobachtet werden. Minnard-Huiban *et al.* (2008) untersuchten in einer Studie die Wirkung beider Enantiomere von **FAD286**, *R*- und *S*-Fadrozol auf eine bestehende Mykardfibrose bei spontan hypertensiven und herzinsuffizienten Ratten (SHHF-Ratten).¹³⁸ Das Krankheitsbild dieses genetischen Inzuchtstammes weist starke Gemeinsamkeiten zur menschlichen Erkrankung auf, begleitet von erhöhter Plasma-Renin-Aktivität und erhöhtem Aldosteron-Plasmaspiegel. Nach subkutaner Infusion wurden sowohl die Plasma- als auch die Urinkonzentrationen von Aldosteron bestimmt. Beide Enantiomere waren gleichermaßen in der Lage, den Plasma-Aldosteronspiegel zu senken. Doch ausschließlich das *S*-Enantiomer führte in höherer Konzentration zur weiteren Abnahme der Aldosteronkonzentration im Urin. Nur das *R*-Enantiomer war in der Lage, die Mykardfibrose um 50 % zu reduzieren; ein Ergebnis, das dem des applizierten MR-Antagonisten Kaliumcanrenoat bei einer Vergleichsgruppe von Tieren entsprach. Auch in dieser Studie konnten keine erhöhten Plasma-Kaliumkonzentrationen festgestellt werden. In einer weiteren 2008 publizierten Studie wurden Ratten eingesetzt, in denen durch Ligatur der linken Koronararterie ein Herzinfarkt hervorgerufen wurde.¹³⁹ Diese Tiere entwickelten daraufhin eine Herzinsuffizienz, deren Merkmale weitgehend mit denen der menschlichen Herzinsuffizienzpatienten übereinstimmten. Nach einer Langzeittherapie mit **FAD286** wurde eine Verbesserung der Herzleistung nachgewiesen. Darüber hinaus konnte die Substanz sowohl die linksventrikuläre Hypertrophie als auch die Kollagenakkumulation verringern. Diese Ergebnisse entsprachen denen der mit Spironolacton behandelten Vergleichsgruppe, jedoch war nur **FAD286** in der Lage, die Aldosteronkonzentration im Urin zu senken. Bei der Behandlung mit Spironolacton stieg diese sogar innerhalb der Behandlungsdauer von 90 Tagen über den Wert bei unbehandelten Tieren. Somit konnten die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt und der positive Effekt der Hemmung der Aldosteronbiosynthese als therapeutische Option bei Herzinsuffizienz hervorgehoben werden. Auch in einer Studie von Huang *et al.* (2009) konnte eindrucksvoll gezeigt werden,

dass eine Abnahme der Aldosteronlevel zu einer Reduktion der kardialen Fibrose bei Ratten mit Herzinsuffizienz (Herzinfarkt durch Ligatur der linken Koronararterie hervorgerufen) führt.¹⁴⁰ An einem anderen Tiermodell wurde ebenfalls untersucht, ob MR-Antagonismus durch Spironolacton oder Aldosteronsynthese-Hemmung durch **FAD286** ähnlich positive Wirkung auf Organschäden bewirken.¹²⁸ Dazu wurde bei uninephrektomierten Ratten eine ausgeprägte, durch Ang II/Salz-induzierte Herz- und Nierenfibrose hervorgerufen. Dabei zeigte sich, dass beide Wirkstoffe gleichermaßen dazu in der Lage waren, die durch Ang II/Salz-induzierten Organschäden, Hypertrophie, Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Fibrose sowie renale arterielle und kardiale Hypertrophie zu reduzieren. Zudem wurde in weiteren Studien belegt, dass die Abnahme der Aldosteronlevel durch Einsatz von **FAD286** zu einer Reduktion der Endorganschäden und Pathologien bei Aldosteron-assoziierten Krankheiten, wie mit Diabetes assoziierte Arrhythmien und Nephropathien, führt.^{91, 141}

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse bei aldosteronabhängigen Erkrankungen in präklinischen *in vivo*-Studien wurde der therapeutische Nutzen von **FAD286** im Zusammenhang mit Aldosteron-abhängigen Erkrankungen bisher noch nicht an Patienten untersucht. In einer klinischen *Proof of Concept*-Studie über einen Zeitraum von vier Wochen mit dem oral verfügbaren CYP11B2-Inhibitor **LCI699** von Novartis wurde dieser 14 Patienten mit primären Hyperaldosteronismus verabreicht.¹⁴² Im Verlauf der Studie wurden unter anderem die Plasmalevel von Aldosteron, Cortisol und Kalium kontrolliert und der Blutdruck überwacht. Es konnte gezeigt werden, dass eine zweimal am Tag verabreichte Dosis von 1 mg **LCI699** dazu in der Lage war, die Plasma- und Urin-Aldosteronkonzentration um 70 % - 80 % zu reduzieren und damit die Aldosteronsynthese im Menschen zu hemmen. Durch die Behandlung gelang es zudem, vorhandene Hyperkaliämien zu korrigieren. Es zeigte sich auch eine geringe Abnahme des erhöhten systolischen Blutdrucks, jedoch konnte auch eine leichte Hemmung der Cortisolbiosynthese beobachtet werden, was eine Limitierung des Einsatzes dieser Substanz vor allem über einen längeren Zeitraum darstellt.¹⁴³ Dies macht deutlich, dass bei der Entwicklung von Inhibitoren von CYP11B2 aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu CYP11B1 die Selektivität gegenüber der 11 β -Hydroxylase eine entscheidende Rolle spielt. Die positiven Ergebnisse der Studien mit Fadrozol und **LCI699** zeigen, dass die Hemmung der Aldosteronsynthese eine mögliche Alternative zu den bisher verwendeten MR-Antagonisten darstellt. Auch der positive Effekt der CYP11B2-Hemmung auf verschiedene klinische Parameter (Hypertrophie, Fibrose, etc.) ist weitgehend bewiesen. Darüber hinaus bietet die Hemmung der Aldosteronsynthese Vorteile gegenüber den bisher angewendeten Therapien,

wie der Korrektur der Hyperkaliämie und der Möglichkeit einer Beeinflussung der nicht-genomischen Effekte von Aldosteron. Somit besteht weiterhin Bedarf an der Entwicklung von aktiven und vor allem selektiven CYP11B2-Hemmern, da bisher nur die Anwendung von auf dem Markt befindlichen MR-Antagonisten die Möglichkeit bietet, den schädigenden Auswirkungen erhöhter Aldosteronkonzentrationen entgegenzuwirken.

II Zielsetzung

Ein erhöhter Aldosteronspiegel ist maßgeblich an der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie z. B. Herzinsuffizienz, Myokardfibrose, Arrhythmien, Bluthochdruck und Nephropathien beteiligt. Durch Inhibition des Schlüsselenzyms der Aldosteronbiosynthese, der Aldosteronsynthase (CYP11B2), sollen die aldosteronvermittelten pro-inflammatorischen und/oder profibrotischen Effekte auf die sogenannten ‚Endorgane‘ verhindert und die Nachteile der MR-Blocker, wie Hyperkaliämie oder das Auftreten des Aldosteron-Breakthrough, vermieden werden.

In unserer Arbeitsgruppe werden hochpotente Inhibitoren der Aldosteronsynthase entwickelt, wobei diese gleichzeitig eine hohe Selektivität gegenüber der Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1) aufweisen sollen. Dies ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen CYP11B2 und dem Schlüsselenzym der Glucocorticoidbiosynthese essentiell. Um sowohl die Aktivität als auch die Selektivität der synthetisierten Verbindungen zu testen, wurde von Ursula Müller-Vieira im Rahmen ihrer Dissertation ein von Denner *et al.* (1995) bzw. Ehmer *et al.* (2002) entwickelter Screeningassay weiter optimiert und miniaturisiert.^{132, 144-150} Die V79MZ-Zellen, die in unserer Arbeitsgruppe seither routinemäßig in Tests eingesetzt werden, exprimieren entweder das humane CYP11B2- oder das humane CYP11B1-Gen. Dadurch, dass diese Säugerzelllinie keine endogene CYP-Aktivität aufweist, können unspezifische Wechselwirkungen der getesteten Inhibitoren mit anderen CYP-Enzymen ausgeschlossen werden. Ein großer Nachteil dieses Testsystems stellt der Low-Throughput (24-Well-Format) dar, wodurch pro Testansatz nur eine geringe Anzahl an Verbindungen getestet werden kann. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit stellte die Entwicklung von High-Throughput-Testsystemen dar. Für die Etablierung dieser Systeme wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen sollten die bereits etablierten Assays weiter miniaturisiert werden, um im 96-Well-Format durchgeführt werden zu können. Zum anderen sollten entsprechende zellfreie Assays entwickelt werden, auch um die deutlichen Nachteile der zellulären Assays, wie ein hoher Zeitaufwand für die Anzucht und Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien zu umgehen. Um den Durchsatz an zu testenden Verbindungen weiter zu erhöhen, sollte zudem eine neue Detektionsmethode etabliert werden. Bisher war für die Quantifizierung radioaktiv markiertes Substrat notwendig und darüber hinaus eine aufwändige Probenaufbereitung für die HPLC-Analytik. Durch die

Verwendung der nicht-radioaktiven HTRF[®]-Methode, kann auf eine Aufarbeitung des zu analysierenden Probenmaterials verzichtet werden. In einer abschließenden Phase sollte die Validierung der neu etablierten Assays und analytischen Methoden durch einen Vergleich der mit diesen und mit den herkömmlichen Methoden erzielten Ergebnissen erfolgen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, war die Ermittlung weiterer *in vitro*-Daten von Leitverbindungen des Arbeitskreises. Dazu wurde unter anderem die adrenocorticale Tumorzelllinie H295R eingesetzt, welche im Vergleich zu den V79MZ-Zelllinien ein wesentlich komplexeres *in vitro*-Modell darstellt. Diese Zellen exprimieren alle steroidogenen CYP-Enzyme und sezernieren Steroide in qualitativ ähnlichem Maßstab wie die humane Nebennierenrinde. Damit sollte eine erste Aussage im Bezug auf den Einfluss der Inhibitoren auf den Gesamtprozess der Steroidbiosynthese am humanen Enzym getroffen werden.

Ein weiterer Schritt hin zu komplexeren *in vitro*-Modellen stellen Untersuchungen an Organpräparationen dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deswegen ausgewählte Verbindungen auch auf ihre Aktivität an Nebennierenpräparationen verschiedener Spezies untersucht werden, um so weitere Hinweise im Hinblick auf die Auswahl des am besten geeigneten Tiermodells zu gewinnen.

Da die Wirksamkeit einer Substanz nicht nur von ihrer Aktivität gegenüber dem Zielprotein abhängig ist, sondern auch von ihren ADME-Eigenschaften, ist eine Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter bereits in einem möglichst frühen Stadium der Entwicklung potentieller Wirkstoffe wichtig. Deswegen sollten auch, mit Hilfe von Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies, die metabolische Stabilität von ausgewählten Verbindungen untersucht und die entstehenden Metaboliten analysiert werden.

Neben strukturspezifischen Kenntnissen zur Wirksamkeit ist auch die gleichbleibende Qualität der Wirkstoffe von großer Wichtigkeit. Daher sollte die chemische Stabilität ausgewählter Verbindungen in verschiedenen wässrigen Puffersystemen untersucht werden.

Den letzten Schritt einer präklinischen Untersuchung von potentiellen Arzneimitteln stellt die Bewertung ihrer Aktivität *in vivo* dar. Insbesondere zur Bestätigung des neuen Therapiekonzepts ist es erstrebenswert, den Beweis dieses Ansatzes im Sinne eines *Proof of Principle* zu erbringen. Dazu sollte in einem bereits etablierten Rattenmodell sowohl pharmakokinetische als auch pharmakodynamische Daten nach peroraler Gabe einer Leitverbindung ermittelt werden.

III Ergebnisse

1 Miniaturisierung der zellulären Assays mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2

Die bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Assays zur Bestimmung von Aktivität und Selektivität neu synthetisierter Verbindungen wurden bisher im 24-Well-Format durchgeführt.¹⁵⁰ Dafür wurden Zellen, die entweder *hCYP11B2* oder *hCYP11B1* stabil exprimieren, mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert, der Substratumsatz mit und ohne Inhibitor quantifiziert und so die Hemmwirkung des Enzyms bestimmt. Im Hinblick auf einen höheren Substanzdurchsatz sollten diese Assays in ein miniaturisiertes Format (96-Well) überführt werden. Ausgangspunkt für die Optimierung waren die von Ursula Müller-Vieira veröffentlichten Testparameter.¹⁵⁰

1.1 Wahl der Zellzahl

Bei der Wahl der zur Testung notwendigen Aussaatdichte wurde sich an dem bereits etablierten V79MZ-Assay im 24-Well-Format orientiert (siehe VII.2.3). Bei diesem werden für beide Zelllinien (V79MZh11B1, V79MZh11B2) pro Well $0,8 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Flächen pro Well in den beiden Formaten wurden Zellsuspensionen verschiedener Zellzahlen mit Hilfe des CASY[®]TT-Gerät hergestellt und davon jeweils 250 μ l pro Well ausgesät, um die entsprechende Zellzahl pro Well zu erreichen (siehe VII.2.1.7). Die Aussaatdichte wurde zum einen nach 18 h visuell kontrolliert, zum anderen wurde die Konversion des Substrates DOC durch verschiedene Zellzahlen ermittelt. Die Inkubationszeit wurde gemäß dem Assay im 24-Well-Format übernommen (30 min für V79MZh11B1).

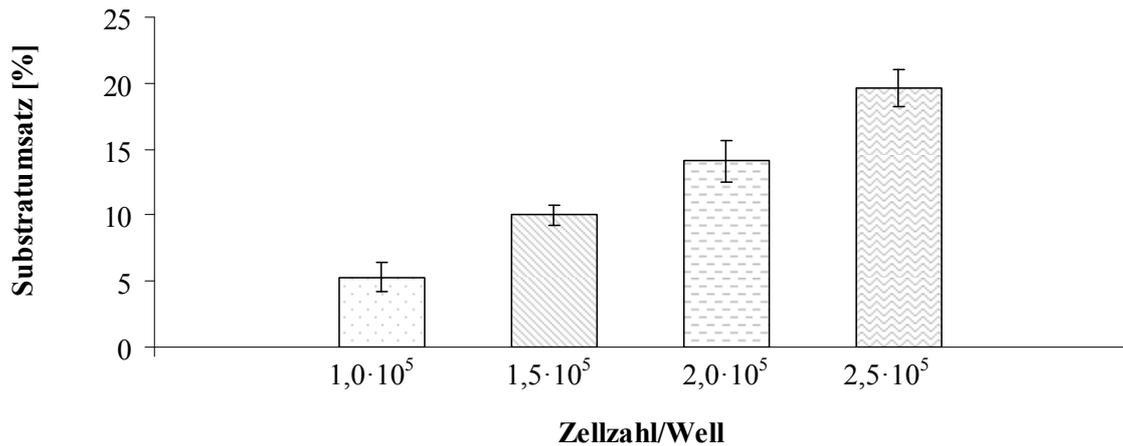


Abbildung 8: Substratumsatz durch verschiedene Zellzahlen pro Well von V79MZh11B1 nach einer Inkubationszeit von 30 min im 96-Well-Format

Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests (jeweils fünffach Werte)

Der Umsatz des Substrats nahm entsprechend der ausgesäten Zellzahl pro Well zu (siehe Abbildung 8). Für die Fläche von $0,3 \text{ cm}^2/\text{Well}$ einer 96-Well-Platte ergab sich für V79MZh11B1 eine optimale Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well, womit ein Umsatz von etwa 14 % erreicht werden konnte. In dieser Konzentration bildeten die Zellen nach Anwachsen über Nacht einen konfluenten Monolayer. Die Zellzahl wurde entsprechend für V79MZh11B2 übernommen.

1.2 Testvolumen

Das Testvolumen wurde entsprechend dem bereits etablierten Assay im 24-Well-Format angepasst. Bei diesem beträgt das Testvolumen insgesamt $500 \mu\text{l}$. Davon sind $450 \mu\text{l}$ Medium mit oder ohne Inhibitor, zu denen $50 \mu\text{l}$ der Substratlösung zum Starten der Reaktion gegeben werden. Da das Arbeitsvolumen der Wells einer 96-Well-Platte ein Gesamtvolumen von $250 \mu\text{l}$ nicht überschreiten sollte, betrug die eingesetzte Flüssigkeitsmenge in diesem Format entsprechend die Hälfte, d.h. zu $225 \mu\text{l}$ Medium mit oder ohne Inhibitor wurden $25 \mu\text{l}$ der Substratlösung gegeben (siehe auch VII.2.5). Dabei musste der Anteil an radioaktiv markiertem DOC entsprechend erhöht werden, um die Detektionsgrenze nicht zu unterschreiten.

1.3 Inkubationszeit

Ausgehend von einer Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung (96-Well-Platte) wurde die optimale Inkubationsdauer in diesem Format bestimmt. Dafür wurden Zeit-Umsatz-Kurven für beide Zelllinien aufgenommen. Dabei sollte der Zeitraum bestimmt werden, in dem der Substratumsatz linear war und es sollte bestimmt werden, nach welcher Inkubationsdauer ein Umsatz von etwa 15 - 25 % erreicht werden konnte.

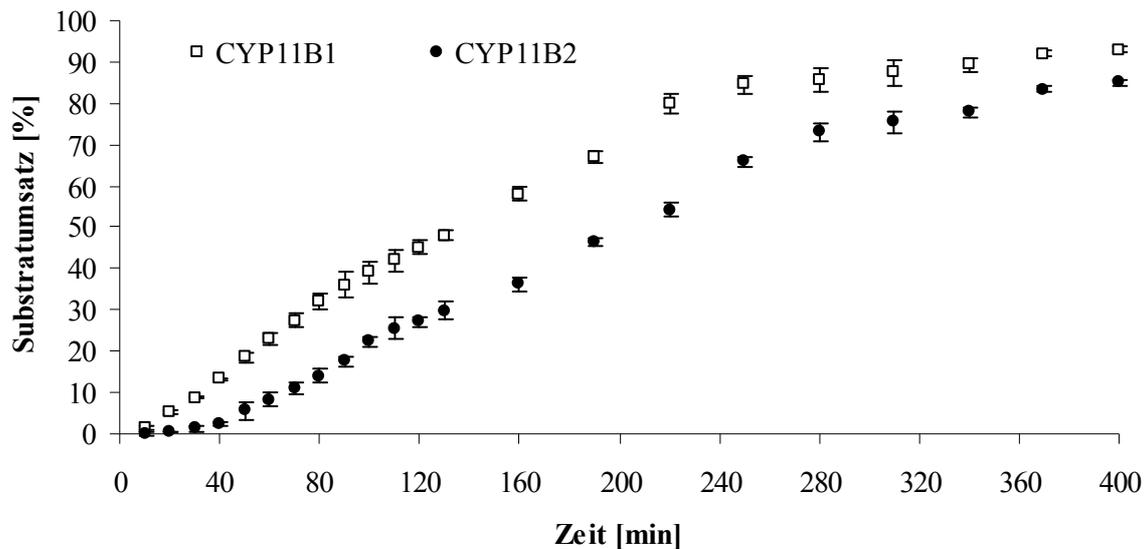


Abbildung 9: Substratumsatz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für V79MZh11B1 und V79MZh11B2 im 96-Well-Format

Eingesetzte Zellzahl: $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well, Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Zeitreihen (jeweils vierfach Werte)

Wie Abbildung 9 zeigt, steigt der Substratumsatz für V79MZh11B1 bis zu einer Inkubationsdauer von 220 min linear mit der Zeit an. Oberhalb von 220 min wird die Kurve flacher. Somit wurde für *hCYP11B1* eine Inkubationszeit von 50 min gewählt, da hier mit etwa 20 % ein ausreichender Substratumsatz erreicht wurde. Der Substratumsatz von V79MZh11B2 steigt zwischen 30 min und 280 min linear an. Auch hier kommt es oberhalb dieses Zeitrahmens zu einem Abflachen der Kurve. Dabei zeigt sich bei *hCYP11B1* zu allen Zeitpunkten ein höherer Umsatz verglichen mit *hCYP11B2*. Für *hCYP11B2* wurde eine Inkubationszeit von 100 min für alle weiteren Tests festgelegt, da hier mit etwa 22 % ein ausreichender Umsatz erzielt werden konnte.

1.4 Validierung des miniaturisierten Zellassays

Zur Validierung der neu entwickelten Zellassays sollten nun die Referenzverbindungen **FAD286** und **FAD286A** herangezogen werden. Außerdem wurden weitere Inhibitoren von *hCYP1B1* und *hCYP11B2* der Arbeitsgruppe getestet und mit den Daten aus den entsprechenden zellulären Assays im 24-Well-Format verglichen.

Tabelle 1: Prozentuale Hemmung [%]^a und IC₅₀-Werte [nM]^b ausgewählter Verbindungen im zellulären *hCYP11B1*-Assay im 96-Well und 24-Well-Format

Verbindung	24-Well-Format	96-Well-Format
DS060	34 %	37 %
MHY079	68 %	66 %
JE020	76 %	69 %
CV050	49 %	53 %
UH215	48 %	53 %
FAD286	6,3 nM	7,9 nM
FAD286A	13,2 nM	15,1 nM

^a: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Test, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM), Hemmstoffkonzentration: 500 nM

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %

^c: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B1 stabil exprimieren

Es zeigt sich, dass die Werte des zellulären Assays für die getesteten Verbindungen im neu etablierten 96-Well-Format mit dem Standardtest im 24-Well-Format sehr gut vergleichbar sind (siehe Tabelle 1). Die Werte der prozentualen Hemmung der Verbindungen **DS060**, **MHY079**, **JE020**, **CV050** und **UH215** stimmen überein. Die geringfügigen Abweichungen liegen im Bereich der Standardabweichung. Auch die bestimmten IC₅₀-Werte der Referenzverbindungen **FAD286** mit 7,9 nM (6,3 nM für 24-Well) und **FAD286A** mit 15,1 nM (13,2 nM für 24-Well) liegen im gleichen Bereich.

Tabelle 2: Prozentuale Hemmung [%]^a und IC₅₀-Werte [nM]^b ausgewählter Verbindungen im zellulären hCYP11B2-Assay im 96-Well und 24-Well-Format

Verbindung	24-Well-Format	96-Well-Format
MHY011 [5 nM]	60 %	54 %
MHY057 [100 nM]	43 %	46 %
RHC155 [2 nM]	81 %	85 %
RHC169 [0,25 nM]	57 %	64 %
YLN015 [15 nM]	52 %	48 %
FAD286	0,76 nM	1,12 nM
FAD286A	0,55 nM	0,68 nM

^a: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Test, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM), verschiedene Hemmstoffkonzentrationen: 0,25 nM - 100 nM

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %

^c: Hamsterfibroblasten, welche das humane CYP11B2 stabil exprimieren

Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, sind die Werte des zellulären Assays für die getesteten Verbindungen im neu etablierten 96-Well-Format mit dem Standardtest im 24-Well-Format ebenfalls sehr gut vergleichbar. Die Werte der prozentualen Hemmung der Verbindungen **MHY011**, **MHY0057**, **RHC155**, **RHC169** und **YLN015** stimmen überein. Die geringfügigen Abweichungen liegen im Bereich der Standardabweichung. Auch die bestimmten IC₅₀-Werte der Referenzverbindungen **FAD286** mit 1,12 nM (0,76 nM für 24-Well) und **FAD286A** mit 0,68 nM (0,55 nM für 24-Well) liegen im gleichen Bereich.

2 Entwicklung von zellfreien Assays mit **V79MZh11B1** und **V79MZh11B2**

Bisher wurden alle neu synthetisierten Substanzen auf Aktivität und Selektivität mit Hilfe eines zellulären Assays getestet, bei dem V79MZ-Zellen entweder hCYP11B2 oder hCYP11B1 stabil exprimieren. Dafür wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem Substrat

inkubiert, der Substratumsatz mit und ohne Inhibitor quantifiziert und so die Hemmwirkung am Enzym bestimmt. Doch zur Unterscheidung zwischen schlechten Inhibitoren und solchen, die eine gute Hemmwirkung besitzen, jedoch eine schlechte Zellgängigkeit aufweisen, ist dieses Testsystem nicht geeignet. Dieser Aspekt spielt allerdings eine entscheidende Rolle bei der Erstellung präziser Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Vor diesem Hintergrund, aber auch durch die bessere Anwendbarkeit zur High-Throughput-Testung, sollten zwei zellfreie Assays entwickelt werden, bei denen die V79MZhCYP11B2- und V79MZhCYP11B1-Zelllinien als Enzymquellen dienen. Diese bieten gegenüber einem zellbasierten Assay den Vorteil, dass keine zeit- und kostenintensive Kultur der Zellen im direkten Vorfeld eines Tests notwendig ist. Bei der Entwicklung der zellfreien Tests mussten verschiedene Parameter bestimmt und optimiert werden. Unter anderem war es notwendig, die optimalen Bedingungen für den Zellaufschluss zu bestimmen. Danach sollten weitere Testparameter, wie einzusetzende Enzymmenge und weitere Inkubationsbedingungen festgelegt werden. Das Gesamtvolumen von 500 μl jedes Testansatzes wurde in Anlehnung an die bereits etablierten zellulären Assays übernommen. Letztlich sollten zur Validierung verschiedene Inhibitoren getestet und die Ergebnisse mit den Daten aus dem entsprechenden zellulären Assay verglichen werden.

2.1 Wahl der Zellzahl

Bei der Wahl der optimalen Zellzahl für den Zellaufschluss lieferte der zelluläre V79MZ-Assay einen ersten Anhaltspunkt. Bei diesem werden pro Well $0,8 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und für eine Dauer von 30 min (V79MZh11B1) bzw. 60 min (V79MZh11B2) inkubiert, um etwa 20 % Substratumsatz zu erhalten. Nach mehreren Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) fiel die Entscheidung auf eine Zellzahl von $1,25 \cdot 10^6$ pro ml für hCYP11B1 und $1,25 \cdot 10^7$ pro ml für hCYP11B2, da mit dieser Zellzahl ein guter Substratumsatz in einer akzeptablen Zeit erreicht werden konnte. Davon ausgehend wurden nun weitere Testparameter optimiert.

2.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen, wie unter VII.2.1.1 und VII.2.1.3 dargestellt, kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 80 % geerntet. Dazu wurden die Zellen von mehreren Zellkulturplatten mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturplatte abgelöst und die Zellzahl, wie unter VII.2.1.7 beschrieben, mit dem CASY[®]TT-Gerät bestimmt. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation die gewünschte Zellzahl durch Verdünnung mit vorgekühltem Homogenatpuffer eingestellt. Der Homogenatpuffer enthielt aus osmotischen Gründen Saccharose. Zudem enthielt der Puffer EDTA. Dieses bindet zweifach geladene Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , die zum einen zu Membranaggregation führen und zum anderen zur Aktivität abbauender Enzyme notwendig sind. Alle weiteren Homogenisierungsschritte erfolgten auf Eis, um die Aktivität von abbauenden Enzymen, wie z. B. Proteasen, zusätzlich zu unterbinden. Zum weiteren Schutz von *hCYP11B1* bzw. *hCYP11B2* wurde dem Homogenatpuffer PMSF (Stammlösung in Isopropanol) zugesetzt. Dieser Protease-Inhibitor hemmt vor allem Serin-Proteasen, indem er irreversibel an das aktive Serin bindet. PMSF wurde erst kurz vor Verwendung zugegeben, da es sich in wässriger Lösung zersetzt. Es wurden verschiedene PMSF-Konzentrationen getestet. Die Endkonzentration wurde auf 0,5 mM festgelegt, da bei dieser Konzentration die höchste Aktivität der Enzyme erreicht wurde. Zusätzlich wurde dem Homogenatpuffer DTT zugesetzt. DTT konserviert Proteine in ihrer funktionalen Form, indem es die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. Die Aktivität der Enzyme wurde mit verschiedenen DTT-Konzentrationen bestimmt. Bei einer Endkonzentration von 2 mM zeigte sich die höchste Aktivität der Enzyme. Der Zellaufschluss der Zellsuspension erfolgte mit einem Ultraschallstab in einem 15 ml Falcon bei 100 % Leistung. Dabei wurde insgesamt dreimal für jeweils 7 s mit 50 s Kühlpause auf Eis aufgeschlossen, um eine Erwärmung der Suspension zu verhindern. Bei diesen gewählten Intervallen der Ultraschallbehandlung zeigte sich eine optimale Zellaufschlussrate bei größtmöglicher Aktivitätsausbeute. Wurden kürzere oder weniger Intervalle gewählt, war der Zellaufschluss ungenügend. Bei längerer oder häufigerer Ultraschallbehandlung konnte ein Aktivitätsverlust der Enzyme festgestellt werden. Das gewonnene Homogenat wurde anschließend für 10 min bei 600 g und 4 °C zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Homogenat bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Dabei ermöglichte der Glycerinanteil von 10 % im

Homogenatpuffer einen Erhalt der Enzymaktivität bei Lagerung über einen längeren Zeitraum.

2.3 Substrat, benötigte Additive und weitere Bedingungen

Die Substratkonzentration wurde in Anlehnung an den zellulären Assay mit der gleichen Zusammensetzung an markiertem und unmarkiertem DOC übernommen. Da es sich bei den Enzymen Aldosteronsynthase und Steroid-11 β -Hydroxylase um NADPH-abhängige Enzyme handelt, muss dieses bei Arbeiten mit aus Zellhomogenat stammenden Enzymen zugesetzt werden. Um die ausreichende Versorgung mit NADPH über den gesamten Inkubationszeitraum zu gewährleisten, wurde dem Reaktionsansatz NADPH-regenerierendes System (siehe VII.1.6) zugesetzt. Es besteht aus NADP, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und wurde 20 min vor Teststart in Assaypuffer angesetzt, damit vorab genügend NADPH gebildet werden konnte.

Der Assay wurde nicht in FKS-haltigem Medium durchgeführt, um eventuell störende Reaktionen durch die im FKS befindlichen Enzyme und andere Faktoren auszuschließen. Deshalb wurde ein definierter Puffer (100 mM KH₂PO₄) verwendet. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung bei optimaler Temperatur zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation jedes Ansatzes in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Schüttler bei 37 °C und 100 rpm.

2.4 Wahl der eingesetzten Homogenatmenge

Ausgehend von der zuvor festgelegten Zellzahl für die Herstellung des Homogenates sollte nun die pro Reaktionsansatz einzusetzende Homogenatmenge optimiert werden. Dabei wurde ein möglichst hoher, noch im linearen Bereich liegender Umsatz bei möglichst geringem Homogenatverbrauch angestrebt.

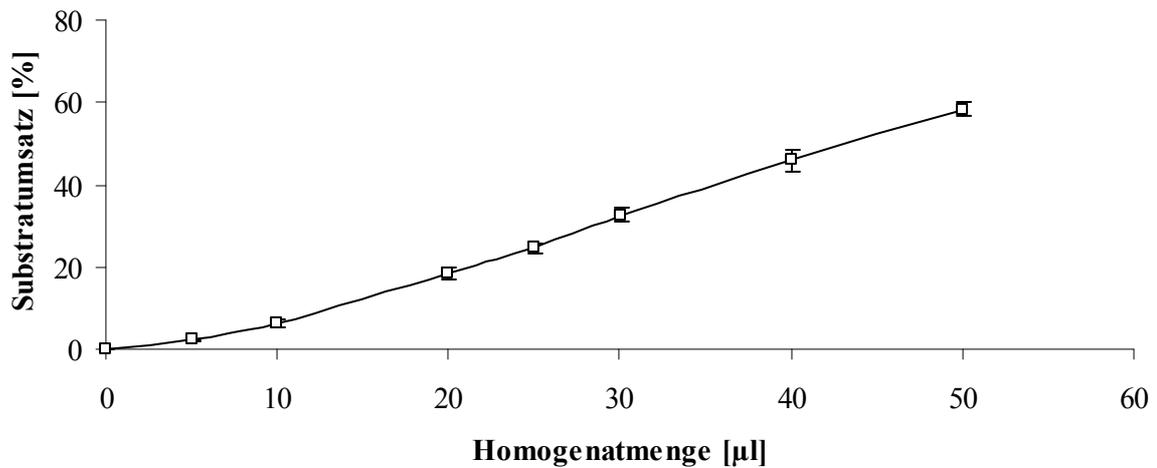


Abbildung 10: Substratumsatz bei verschiedenen V79MZh11B1-Homogenatkonzentrationen

Substrat: DOC (100 nM), Inkubationszeit: 90 min; jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Testansätzen (jeweils Doppelwerte)

Wie Abbildung 10 verdeutlicht, war bei den ausgewählten Homogenatmengen ein linearer Anstieg des Substratumsatzes zwischen 10 und 50 µl zu erkennen. Da mit 25 µl eingesetzter Homogenatmenge ein Substratumsatz von ca. 24 % erzielt werden konnte, wurde diese Menge bei allen weiteren Tests eingesetzt.

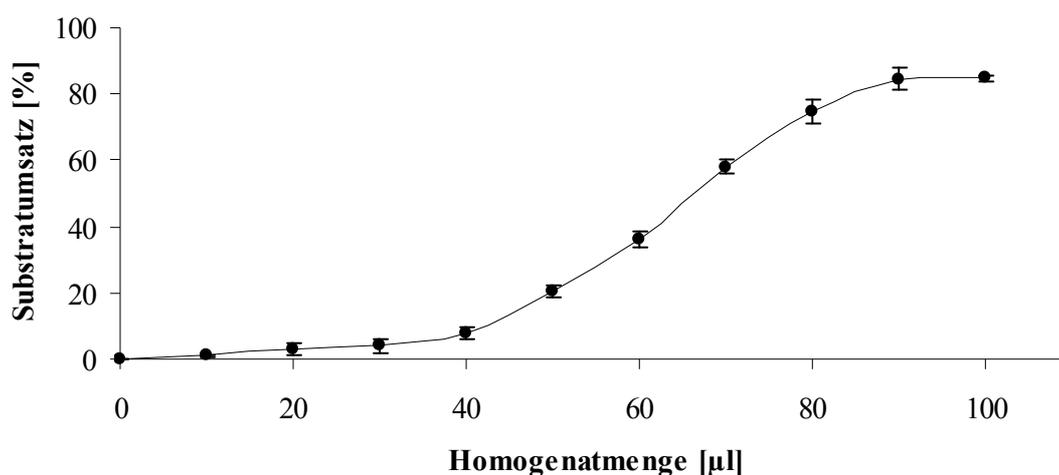


Abbildung 11: Substratumsatz bei verschiedenen V79MZh11B2-Homogenatkonzentrationen

Substrat: DOC (100 nM), Inkubationszeit: 90 min; jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Testansätzen (jeweils Doppelwerte)

Bei den ausgewählten Homogenatmengen war ein linearer Anstieg des Substratumsatzes zwischen 40 und 80 μl zu erkennen (siehe Abbildung 11). Bei allen weiteren Tests wurde eine Homogenatmenge von 50 μl eingesetzt, da hier ein Substratumsatz von ca. 22 % erzielt werden konnte.

2.5 Inkubationszeit

Ausgehend von den bereits festgelegten Parametern, wie der eingesetzten Homogenatmenge und der Substratkonzentration, sollte nun die notwendige Inkubationsdauer bestimmt werden. Dabei musste die Inkubationszeit so gewählt werden, dass sie im linearen Bereich der Umsatz-Zeit-Kurve lag. Um bei den durchgeführten Messungen gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollte ein Substratumsatz im linearen Bereich von etwa 15 – 25 % erhalten werden.

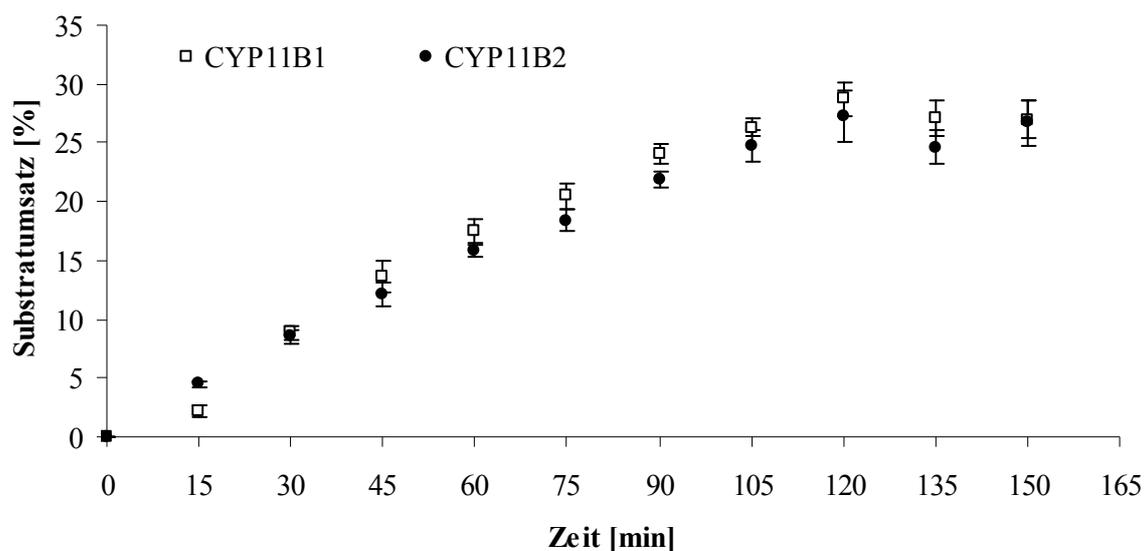


Abbildung 12: Substratumsatz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Eingesetzte Homogenatmengen: V79MZh11B1: 25 μl , V79MZh11B2: 50 μl ; Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Zeitreihen (jeweils Doppelwerte)

Der Substratumsatz steigt bei beiden Enzymen bis zu einer Inkubationsdauer von 120 min linear mit der Zeit an (siehe Abbildung 12). Dabei zeigt das Homogenat aus V79MZh11B1 zu fast allen Zeitpunkten eine höhere Aktivität. Die für die Messung gewählte Inkubationszeit von 90 min liegt im linearen Umsatzbereich. Oberhalb von 120 min kommt flacht die Kurve ab.

2.6 Validierung der neu entwickelten zellfreien Assays

Zur Validierung der neu entwickelten Homogenatassays sollten nun die bekannten Referenzverbindungen **FAD286** und **FAD286A** herangezogen werden. Außerdem wurden weitere Inhibitoren von *hCYP1B1* und *hCYP11B2* der Arbeitsgruppe getestet und mit den Daten aus den entsprechenden zellulären Assays verglichen. Dabei wurde auf Verbindungen aus verschiedenen Substanzklassen zurückgegriffen und jeweils ein Mix aus sehr potenten, mäßig aktiven und wenig aktiven Hemmstoffen ausgewählt.

Tabelle 3: Prozentuale Hemmung [%]^a und IC₅₀-Werte [nM]^b ausgewählter Verbindungen im zellulären und zellfreien *hCYP11B1*-Assay

Verbindung	zellulärer Assay V79MZh11B1 ^c	zellfreier Assay <i>hCYP11B1</i> ^d
CV073	10 %	11 %
CV082	7 %	4 %
DA019	1 %	28 %
UH186	50 %	52 %
UH215	48 %	53 %
CV050	49 %	76 %
CV037	87 %	84 %
UH139	88 %	98 %
UH141	100 %	100 %
FAD286	6,3 nM	4,4 nM
FAD286A	13,2 nM	12,5 nM (9,9 nM ^e)

^a: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM), Hemmstoffkonzentration: 500 nM

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %

^c: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B1 stabil exprimieren

^d: Enzymquelle: Zellhomogenat aus c

^e: La Sala *et al.* (2009)¹⁵¹

Wie Tabelle 3 zeigt, betragen die IC₅₀-Werte für die Referenzverbindung **FAD286** 6,3 nM im zellulären Assay und 4,4 nM im Test mit Zellhomogenat. Ähnlich gut vergleichbar waren auch die Werte für **FAD286A** mit 13,2 nM (zellulär) bzw. 12,5 nM (zellfrei). Für die Hemmstoffe **CV073**, **CV082**, **UH186**, **UH215**, **CV037** und **UH141** waren die prozentualen Hemmwerte bei einer Konzentration von 500 nM nahezu identisch. Lediglich bei den Substanzen **CV050** und **DA019** zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen zellulärem und zellfreiem Assay. Beide zeigten im Test mit dem Enzym aus Zellhomogenat eine höhere Aktivität.

Tabelle 4: Prozentuale Hemmung [%]^a und IC₅₀-Werte [nM]^b ausgewählter Verbindungen im zellulären und zellfreien hCYP11B2-Assay

Verbindung	zellulärer Assay V79MZh11B2 ^c	zellfreier Assay hCYP11B2 ^d
MHY016	7 %	15%
RHC125	16 %	16 %
RHC213	16 %	70 %
HQZ069	67 %	76 %
MHY041	58 %	49 %
HQZ059	41 %	41 %
RHC175	72 %	74 %
RHC155	100 %	100 %
FAD286	0,76 nM	1,09 nM
FAD286A	0,55 nM	0,78 nM (1,6 nM ^e)

^a: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM), Hemmstoffkonzentration: 500 nM

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %

^c: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B2 stabil exprimieren

^d: Enzymquelle: Zellhomogenat aus c

^e: La Sala *et al.* (2009)¹⁵¹

Die IC₅₀-Werte für die Referenzverbindung **FAD286** betragen im zellulären Assay 0,76 nM und 1,09 nM im Test mit Zellhomogenat (vgl. Tabelle 4). Auch die Werte für **FAD286A** waren mit 0,55 nM (zellulär) bzw. 0,78 nM (zellfrei) annähernd identisch. Die Hemmstoffe

MHY016, RHC125, HQZ069, MHY041, HQZ059, RHC175 und **RHC155** zeigten bei einer Konzentration von 500 nM beim zellulären und zellfreien Assay sehr ähnliche prozentuale Hemmwerte. Einzig bei der Substanz **RHC213** wurde ein deutlicher Unterschied bei der prozentualen Hemmung in zellulärem und zellfreiem Assay gemessen. Auch hier war, wie bereits für eine Verbindung im CYP11B1-Assay, die Aktivität des Hemmstoffs im Test mit Enzym aus Zellhomogenat deutlich höher als im zellulären Assay.

3 Etablierung einer neuen Detektionsmethode

Mit den neu entwickelten miniaturisierten zellulären Assays ist es gelungen, den Testdurchsatz an Substanzen merklich zu erhöhen. Jedoch stellt die bisherige Detektionsmethode hier noch einen limitierenden Faktor dar. Um das Substrat sowie die von den Zellen gebildeten Produkte mittels Radioflow-Detektion quantifizieren zu können, ist eine vorangehende HPLC-Trennung von Substrat und Produkt(en) notwendig. Diese zeitintensive Methode verursacht hohe Kosten für Fließmittel und Szintillator. Darüber hinaus ist die Aufarbeitung der Proben zur HPLC-Trennung sehr aufwändig: die Steroide müssen zuerst extrahiert, das Lösemittel abgedampft, die Proben wieder in Fließmittel aufgenommen und in entsprechende Gefäße zur HPLC-Analytik überführt werden. Mit dem Ziel, Kosten- und Zeitaufwand zu reduzieren und so die Wirtschaftlichkeit zu steigern, sollte eine neue miniaturisierbare und automatisierbare Detektionsmethode zur Durchführung im Hochdurchsatz etabliert werden.

Der Begriff High-Throughput Screening (HTS) bezeichnet den Prozess, bei dem die Wirkung einer sehr großen Anzahl von Verbindungen gegen biologische Targets getestet wird. Dabei setzt die Anwendung eines automatisierten HTS bestimmte Eigenschaften des zu verwendenden Assays, wie Stabilität, Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit voraus. Diese Bedingungen waren durch die erfolgreiche, bereits jahrelange Anwendung des zellulären Assays und die im Rahmen dieser Arbeit bereits erzielten Ergebnisse im miniaturisierten Format gegeben. Um einen höheren Substanzdurchsatz zu ermöglichen, sollte der Assay mit Hilfe eines Pipettierroboters durchgeführt werden. Dazu sollte das Pipettierschema möglichst einfach gehalten und der Assay in kleinen Volumina realisierbar sein. Durch die Verwendung von Homogenous Time Resolved Fluoreszenz (HTRF[®], siehe auch VII.2.2.7) als Nachweisttechnik, sollten die Nachteile der Radioflow-Detektion

umgangen werden. Unter anderem lässt sich durch Anwendung dieser Methode die Produktion von radioaktivem Abfall vermeiden. Aufgrund der einfachen und schnellen Messung der Mikrotiterplatten, in denen der Test durchgeführt wird, ist eine Testung von mehr potentiellen Wirkstoffen in kürzerer Zeit möglich. Dadurch ist diese miniaturisierbare Methode als Hochdurchsatz-Screening durchführbar.

Die Technologie der homogenen zeitaufgelösten Fluoreszenz basiert auf der Übertragung der Energie zwischen zwei fluorophoren Molekülen. Dabei werden zeitaufgelöste Fluoreszenz (Time-Resolved Fluorescence, TRF) und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) miteinander kombiniert. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte homogene Methode, d. h. nach Vereinigung der Reagenzien und Inkubation erfolgt die Messung, ohne dass weitere Separations- oder Waschschrte nötig sind. Die verwendeten Testkits zum Nachweis von Aldosteron bzw. Cortisol basieren auf dem Prinzip eines kompetitiven Immunoassays.

Bei jedem Assay hängt die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit von der richtigen Technik und der präzisen Testdurchführung ab. Um den HTRF[®]-Assay im Hochdurchsatz anwenden zu können, musste zum Zwecke der Miniaturisierung gleichzeitig zur Detektionsmethode auch die Testdurchführung auf einem Pipettierroboter etabliert werden. Damit sollte eine zuverlässige Durchführung im kleinen Maßstab (384-Well-Mikrotiterplatte, Gesamtvolumen pro Kavität 10 µl) möglich sein, womit die Voraussetzung für die Anwendung im Hochdurchsatz gegeben ist. Somit war eine Validierung des Gesamtsystems notwendig, bevor die Detektionsmethode im zellulären bzw. zellfreien Assay zum Einsatz kam.

Zur Validierung der gesamten Methode wurde der HTRF[®]-Cortisol-Assay herangezogen. Da bei den beiden HTRF[®]-Kits sowohl die Pipettierschritte als auch die Messung weitgehend übereinstimmen, konnte auf eine gesonderte Validierung des HTRF[®]-Aldosteron-Assays verzichtet werden.

Zur Durchführung aller notwendigen Pipettierschritte des Tests diente ein Pipettierroboter. Nachfolgend sind die einzelnen Arbeitsschritte, die an dem Roboter durchgeführt wurden, aufgezählt:

- Herstellung der Standards durch serielle Verdünnung
- Herstellung der benötigten Arbeitslösungen aus den entsprechenden Stammlösungen von Konjugat und Kryptat

-
- Übertrag der Kontrolle und des Puffers zur Herstellung der Negativ- und Positivkontrollen (Doppelwerte)
 - Vorlegen von 10 µl der Standards/Kontrolle (oder später der zu analysierenden Proben) in die Kavitäten der Platte (Doppelwerte)
 - Zugabe von jeweils 5 µl des entsprechenden Konjugates (XL665-Aldosteron bzw. d2-Cortisol) zu jedem Well
 - Zugabe von jeweils 5 µl des entsprechenden Europiumkryptat-Konjugates (Anti-Aldosteron- bzw. -Cortisol) zu jedem Well

Die Schwierigkeit bestand vor allem in der präzisen und blasenfreien Zugabe sowie der ausreichenden Durchmischung der Reagenzien.

Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit erfolgte die Messung in einem geeigneten Mikroplattenreader. Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe einer Software. Zur Ermittlung der Werte wurde die Analytenkonzentration semilogarithmisch gegen die erhaltenen Delta F%-Werte aufgetragen.

Zur Ermittlung der Methodenpräzision bei der Durchführung mit dem Pipettierroboter wurden die Wiederholungsbedingungen (Intraassay) und Vergleichsbedingungen (Interassay) untersucht. Als Maß für die Präzision gilt der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung). Ein Kriterium für die Richtigkeit der Validierung ist die Übereinstimmung der Messergebnisse der vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen mit den dazu angegebenen Sollwerten.

3.1 Intraassay-Präzision

Die Intraassay-Präzision wird durch mehrfache Messungen der gleichen Proben innerhalb eines Laufes getestet (Reproduzierbarkeit der Ergebnisse). Die so erhaltenen Ergebnisse der einzelnen Messungen sollten möglichst nahe beieinander liegen. Zur Beurteilung der Intraassay-Präzision wurden exemplarisch zwei Konzentrationen der mitgelieferten Cortisol-Kontrollen herangezogen. Es wurden jeweils sechs Messungen in Serie durchgeführt. Dabei diente die errechnete relative Standardabweichung der Charakterisierung der Methodenpräzision. Somit konnte eine Aussage über die Genauigkeit der Messung mit den

verwendeten Materialien (Platten, Abdeckfolie, usw.) im Mikrotiterplattenlesegerät getroffen werden. Die ermittelten Konzentrationen (Messwerte) der beiden Proben sowie die entsprechenden Mittelwerte und die daraus resultierenden Variationskoeffizienten der sechsfachen Bestimmungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Intraassay-Präzision am Beispiel des HTRF[®] Cortisol-Assays

Mittelwert der errechneten Konzentrationen in ng/ml aus sechs aufeinanderfolgenden Messungen

Probe [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
1,13±0,3	1,18	0,08	6,78
0,57±0,15	0,62	0,07	11,3

Bei der Wiederholungsbestimmung (sechsfach) wurde ein Variationskoeffizient von 6,78 % für die Probe mit 1,13 ng/ml und 11,3 % für die 0,57 ng/ml Probe ermittelt. Somit sind die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar.

3.2 Interassay-Präzision

Hierbei wird die Präzision der etablierten Methode in verschiedenen Messreihen und an verschiedenen Tagen mit demselben Probenmaterial unter den gleichen Bedingungen analysiert. Auch hier sollten die Ergebnisse möglichst nahe beieinander liegen. Dazu wurden sowohl Standardreihen als auch zwei Proben mit unterschiedlicher Cortisolkonzentration insgesamt viermal an verschiedenen Tagen, wie zuvor beschrieben, vom Roboter pipettiert und die Konzentrationen ermittelt. Somit sollte eine Aussage über die Genauigkeit des Pipettiervorganges an sich getroffen werden. Die ermittelten Konzentrationen (Messwerte) der beiden Proben sowie die entsprechenden Mittelwerte und die daraus resultierenden Variationskoeffizienten der vier Bestimmungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Interassay-Präzision am Beispiel des HTRF[®]-Cortisol-Assays

Mittelwert der errechneten Konzentrationen in ng/ml aus vier unabhängigen Messreihen

Probe [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
1,13±0,3	1,21	0,18	14,9
0,57±0,15	0,61	0,08	12,9

Bei der Untersuchung der Vergleichsbedingungen wurde ein Variationskoeffizient von 14,9 % für die Probe mit 1,13 ng/ml und 12,9 % für die 0,57 ng/ml Probe ermittelt. Der Pipettiervorgang durch den Roboter kann somit als sehr gut reproduzierbar angesehen werden. Die für die verschiedenen Pipettierschritte ausgewählten Einstellungen am Roboter, wie z. B. Pipettiergeschwindigkeit, Anzahl der Durchmischungsschritte oder Eintauchtiefe der Pipettenspitze wurden für alle weiteren Tests verwendet.

3.3 Untersuchung der DMSO-, Ethanol- und Glycerin-Toleranz

Der HTRF[®]-Assay sollte zur Bestimmung der Aktivität von Inhibitoren in zellulären und zellfreien Enzymtests verwendet werden. Bei diesen werden die verwendeten Stammlösungen der Inhibitoren in DMSO hergestellt und alle weiteren Verdünnungen bis zur gewünschten Konzentration, ebenso wie die Substratlösungen, in Ethanol hergestellt. Deshalb war nach erfolgreicher Etablierung der neuen Detektionsmethode die Untersuchung der DMSO- bzw. Ethanol-Toleranz des HTRF[®]-Assays notwendig. Des Weiteren sind bei den zellfreien CYP11B1- und CYP11B2-Assays zur Lagerung der das Enzym enthaltenen Zellextrakte Puffer notwendig, die 10 % Glycerin (v/v) enthalten. Somit war auch eine Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Assays gegenüber Glycerin notwendig. Zur Untersuchung von möglichen störenden Einflüssen der oben aufgeführten Chemikalien wurden die beiden HTRF[®]-Konjugate zu den zu untersuchenden Proben (verschiedene Konzentrationen von Chemikalien in Verdünnungspuffern) gegeben. Nach der vom Hersteller vorgeschriebenen Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurden die Delta F%-Werte ermittelt. Im Falle einer Beeinflussung der Analytik ab einer bestimmten

Konzentration der Chemikalien, sollte sich dies anhand sich ändernder Delta F%-Werte zeigen.

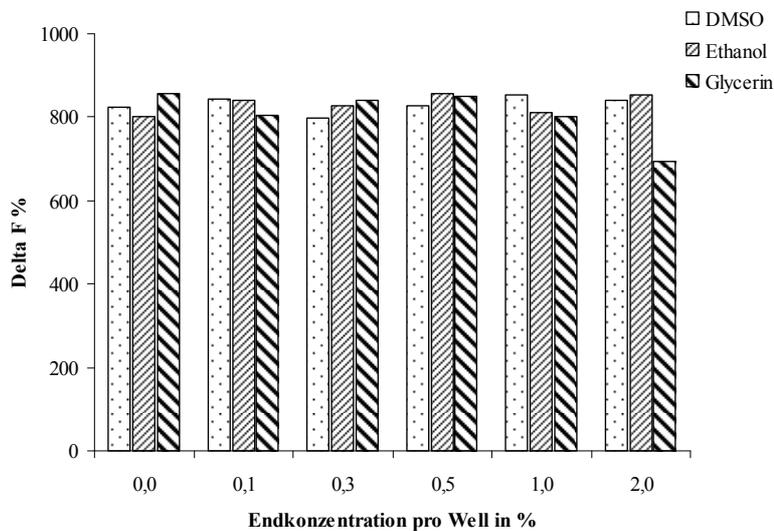


Abbildung 13: Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Cortisol-Assays gegenüber verschiedenen Konzentrationen von DMSO, Ethanol und Glycerin

Überprüfung des Einflusses verschiedener Konzentrationen (0 – 2 % (v/v)) auf den Delta F%-Wert bei der maximalen Signalstärke, d. h. ohne Gegenwart von Cortisol

Wie in Abbildung 13 zu sehen, führten weder DMSO noch Ethanol bis zu einer Konzentration von 2 % zu einer signifikanten Veränderung der Signalstärke. Somit konnte ein störender Einfluss der beiden Lösungsmittel auf die Durchführung der Assays ausgeschlossen werden. Da sowohl bei den zellulären als auch bei den zellfreien Assays durch die Verdünnung der Hemmstoffe und Substrate keine höheren Konzentrationen an DMSO und Ethanol erreicht werden, konnte auf die Untersuchung des Einflusses von höheren Konzentrationen verzichtet werden. Auch bei Glycerin war bis zu einer Konzentration von 1 % keine signifikante Beeinflussung des Signals erkennbar. Lediglich ab einer Konzentration von 2 % konnte eine leichte Abnahme der Signalstärke beobachtet werden. Da jedoch bei der Durchführung eines HTRF[®]-Assays mit aus zellfreiem Assay stammendem Probenmaterial höchstens eine Konzentration von 0,5 % pro Well erreicht wird, kann dies als unkritisch betrachtet werden.

3.4 Untersuchung der Toleranz gegenüber DTT, PMSF und EDTA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zellfreie Assays entwickelt, die bei der Bestimmung von Aktivität und Selektivität chemischer Verbindungen zum Einsatz kommen. Bei der Herstellung des bei diesen Tests verwendeten Zellhomogenates kommen diverse Chemikalien zum Schutz der Enzyme zum Einsatz. Um auch hier einen störenden Einfluss auf die verwendeten HTRF[®]-Assays auszuschließen, sollte die Empfindlichkeit des HTRF[®]-Assays gegenüber diesen Chemikalien untersucht werden. Die Durchführung erfolgte wie bereits unter VII.2.6 beschrieben. Die maximal zu tolerierenden Konzentrationen der verschiedenen Chemikalien wurden anhand der maximal vorhandenen Konzentrationen im Well (Endkonzentrationen) ausgewählt.

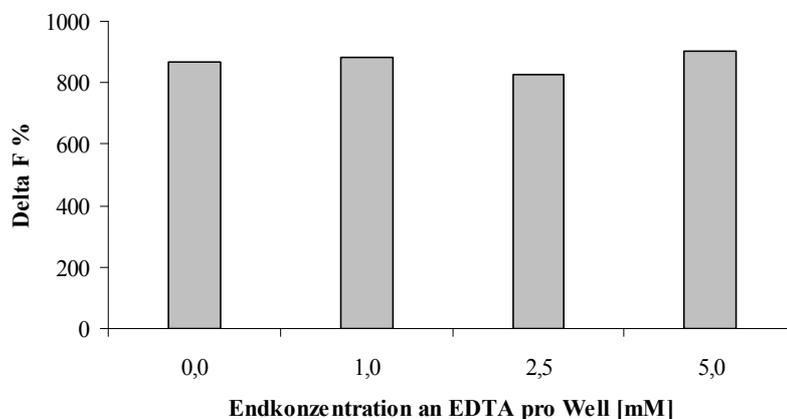


Abbildung 14: Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Cortisol-Assays gegenüber verschiedenen Konzentrationen von EDTA

Überprüfung des Einflusses verschiedener Konzentrationen (0 – 5 mM) auf den Delta F%-Wert bei der maximalen Signalstärke, d. h. ohne Gegenwart von Cortisol

EDTA führte bis zu einer Konzentration von 5,0 mM pro Well zu keiner signifikanten Veränderung der Signalstärke (siehe Abbildung 14).

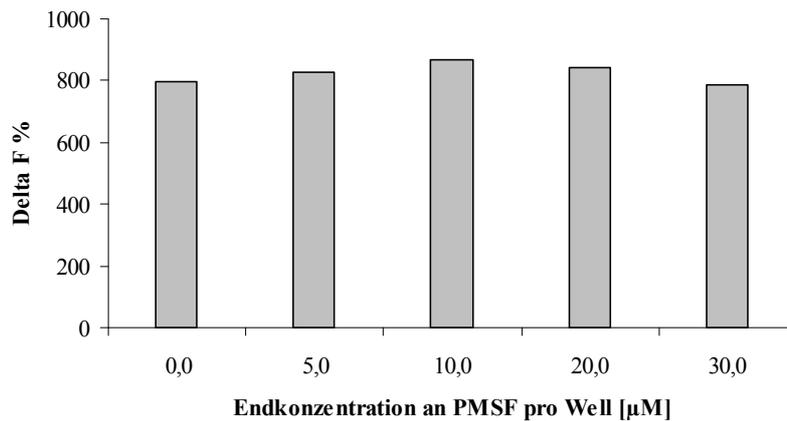


Abbildung 15: Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Cortisol-Assays gegenüber verschiedenen Konzentrationen von PMSF

Überprüfung des Einflusses verschiedener Konzentrationen (0 – 30 µM) auf den Delta F%-Wert bei der maximalen Signalstärke, d. h. ohne Gegenwart von Cortisol

Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, dass es auch bei PMSF-Konzentrationen von bis zu 30,0 µM zu keiner Beeinflussung der Signalstärke kommt.

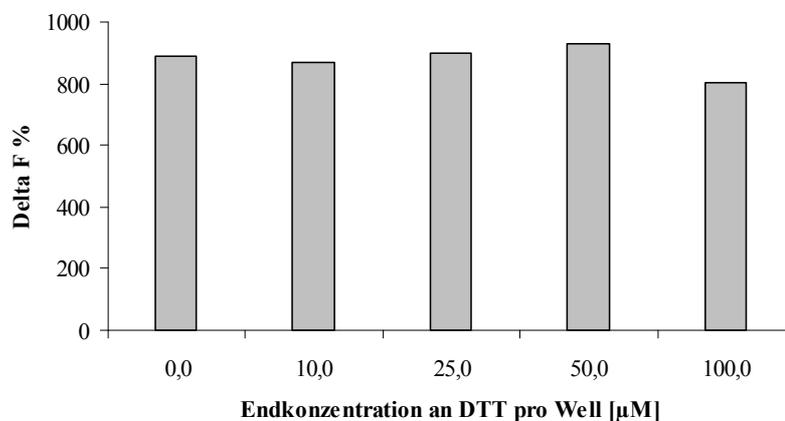


Abbildung 16: Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Cortisol-Assays gegenüber verschiedenen Konzentrationen von DTT

Überprüfung des Einflusses verschiedener Konzentrationen (0 – 100 µM) auf den Delta F%-Wert bei der maximalen Signalstärke, d. h. ohne Gegenwart von Cortisol

Auch bei einer maximalen Konzentration von DTT (100,0 µM pro Well) wurde kein Einfluss auf den ermittelten Delta F%-Wert festgestellt (vgl. Abbildung 16). Somit konnte ein störender Einfluss der getesteten Chemikalien bei den für die Assays relevanten Konzentrationen auf die Durchführung der Tests ausgeschlossen werden.

3.5 Untersuchung von Deoxycortisol als Substrat des Enzyms CYP11B1

Da mit der neuen HTRF[®]-Detektionsmethode nur die Konzentration an Cortisol bestimmt werden kann, konnte für die Bestimmung der CYP11B1-Aktivität nicht auf das bisher verwendete Substrat DOC zurückgegriffen werden. Dieses kann zwar von den Zellen mit gleicher Affinität umgesetzt werden wie das natürliche Substrat RSS,¹⁴⁴ allerdings ist hier das entstehende Produkt Corticosteron. Dagegen wird RSS, das natürliche Substrat des Enzyms, zu Cortisol umgesetzt. Wie Ursula Müller-Vieira in ihrer Dissertation 2005 zeigen konnte, führt der Austausch dieser beiden Substrate RSS und DOC im V79MZh11B1-Assay nicht zu einer signifikanten Veränderung der Hemmwerte von ausgewählten Inhibitoren.¹⁵⁰ Daher sollte nun die Konversionsrate des RSS im 96-Well-Format untersucht werden.

Basierend auf den unter III.1 ermittelten Parametern wurde eine Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung (96-Well-Platte) ausgesät. Der Test erfolgte wie unter VII.2.5 beschrieben. Dabei wurde für das Substrat RSS eine Konzentration von 250 nM eingesetzt. Nachstehende Abbildung zeigt die ermittelte Zeit-Umsatz-Kurve. Zum Vergleich wurde auch die unter III.1.3 mit dem Substrat DOC ermittelte Zeit-Umsatz-Kurve aufgeführt.

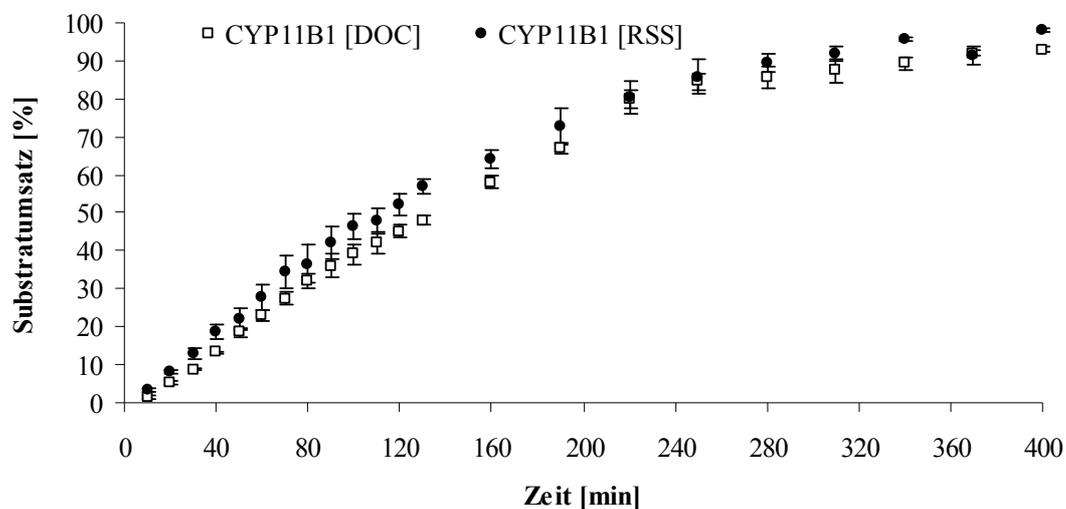


Abbildung 17: Substratumsatz von RSS und DOC in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für V79MZh11B1 im 96-Well Format

Eingesetzte Zellzahl: $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well, Substrat: RSS (250 nM) oder DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Zeitreihen (jeweils zweifach Werte bei RSS bzw. vierfach Werte bei DOC)

Wie Abbildung 17 zeigt, steigt der Substratumsatz für V79MZh11B1 mit RSS als Substrat bis zu einer Inkubationsdauer von 200 min linear mit der Zeit an. Oberhalb von 200 min

wird die Kurve flacher. Dabei zeigt sich bei einer Verwendung von RSS als Substrat zu fast allen Zeitpunkten ein geringfügig höherer Umsatz verglichen mit DOC. Damit konnte gezeigt werden, dass auch unter den neuen Assaybedingungen RSS etwa im gleichen Maße wie DOC von den Zellen umgesetzt wird.

3.6 Überprüfung der neuen Detektionsmethode an ausgewählten Inhibitoren

Zur weiteren Validierung der neu entwickelten HTRF[®]-Detektionsmethode sollten nun die Referenzverbindungen **FAD286** und **FAD286A** herangezogen werden. Darüber hinaus wurden weitere Inhibitoren von *hCYP1B1* und *hCYP11B2* der Arbeitsgruppe getestet. Die so ermittelten IC₅₀-Werte bzw. prozentualen Hemmwerte wurden mit ermittelten Werten aus den entsprechenden Assays mit radioaktiv markiertem Substrat (entsprechend der Versuchsdurchführung wie unter VII.2.3 beschrieben) verglichen.

Tabelle 7: Im zellulären hCYP11B1^a-Assay ermittelte prozentuale Hemmwerte [%] ausgewählter Verbindungen; Gegenüberstellung der Ergebnisse, ermittelt mit dem Standardassay mit radioaktiv markiertem DOC^b oder im HTRF[®]-Assay mit RSS^c als Substrat

Verbindung	Konzentration [μ M]	³ H-DOC	RSS
BT081	0,05	59	27
BT103	30,0	30	34
BT106	3,0	42	31
BT111	1,0	49	44
BT112	3,0	20	26
SE270	2,0	47	33
DS060	0,5	37	23
JE032	0,025	56	38
TG010	0,025	68	76
TG011A1	0,250	20	65

^a: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B1 stabil exprimieren

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM)

^c: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: RSS (250 nM)

Tabelle 8: Im zellulären hCYP11B1^a-Assay ermittelte IC₅₀-Werte [nM] ausgewählter Verbindungen; Gegenüberstellung der Ergebnisse, ermittelt mit dem Standardassay mit radioaktiv markiertem DOC^b oder im HTRF[®]-Assay mit RSS^c als Substrat

Verbindung	³ H-DOC	RSS
JE023	12	20
JE033	11	18
FAD	6	8
FADA	13	21

^a: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B1 stabil exprimieren

^b: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM)

^c: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: RSS (250 nM)

Tabelle 7 zeigt die im zellulären CYP11B1-Assay ermittelten prozentualen Hemmwerte verschiedener Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Es zeigte sich, dass bei der Mehrzahl der getesteten Verbindungen die mit Hilfe der neu etablierten HTRF[®]-Detektionsmethode erhaltenen Werte sehr gut mit denen aus dem Standardtest im 24-Well-Format erhaltenen Werten korrelierten. Lediglich bei den inhibitorischen Aktivitäten der Verbindung **BT081** zeigten sich geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Assayformaten. Diese Abweichung lag mit 23 % etwas über der angestrebten Standardabweichung von 20 %. Einzig bei der Verbindung **TG011A1** sind die Ergebnisse bei einer Konzentration von 250 nM mit einer prozentalen Hemmung von 20 % für den Standardassay und 65 % bei der neu etablierten HTRF[®]-Detektionsmethode sehr unterschiedlich. Bei allen anderen getesteten Verbindungen lagen die Unterschiede in den prozentualen Hemmwerten im Bereich der Standardabweichung. Die bestimmten IC₅₀-Werte (Tabelle 8) der Referenzverbindungen **FAD286** mit 6 nM (8 nM im HTRF[®]-Assay) und **FAD286A** mit 13 nM (21 nM im HTRF[®]-Assay) stimmten sehr gut überein. Zudem wurde auch der IC₅₀-Wert für die beiden Verbindungen **JE023** und **JE033** mit beiden Methoden bestimmt. Auch bei diesen Inhibitoren lagen die Werte im gleichen nanomolaren Bereich.

Tabelle 9: Im zellulären hCYP11B2^a-Assay ermittelte prozentuale Hemmwerte [%] ausgewählter Verbindungen; Gegenüberstellung der Ergebnisse, ermittelt mit dem Standardassay mit radioaktiv markiertem DOC^b oder im HTRF[®]-Assay^c mit unmarkiertem DOC als Substrat

Verbindung	Konzentration [µM]	³ H-DOC	DOC
BT081	0,003	42	68
BT103	0,020	23	25
BT106	0,020	22	13
BT111	0,020	80	45
DS060	0,050	63	44
JE021	0,500	86	56
JE032	0,500	49	51
JE033	0,500	82	81
MHY137	0,003	21	33
MHY144	0,003	58	43
MHY148	0,003	71	51
SE270	0,001	73	53

^a: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B2 stabil exprimieren

^{b, c}: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM)

Tabelle 10: Im zellulären hCYP11B2^a-Assay ermittelte IC₅₀-Werte [nM] ausgewählter Verbindungen; Gegenüberstellung der Ergebnisse, ermittelt mit dem Standardassay mit radioaktiv markiertem DOC^b oder im HTRF[®]-Assay^c mit unmarkiertem DOC als Substrat

Verbindung	³ H-DOC	DOC
JE019	21,9	26,2
JE020	200,3	181,0
FAD	0,8	1,4
FADA	0,6	0,8

^a: Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B2 stabil exprimieren

^{b, c}: Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %, Substrat: DOC (100 nM)

In Tabelle 9 sind für ausgewählte Verbindungen die im zellulären CYP11B2-Assay ermittelten prozentualen Hemmwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass bei der Mehrzahl der getesteten Verbindungen die Werte, die mit Hilfe der neu etablierten HTRF[®]-Detektionsmethode ermittelt wurden, sehr gut mit den Hemmwerten aus dem Standardtest im 24-Well-Format übereinstimmen. Lediglich bei den Verbindungen **BT081**, **MHY148** und **SE270** zeigten sich geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Assayformaten im Bezug auf die inhibitorische Potenz gegenüber der Aldosteronproduktion. Diese Abweichungen lagen allerdings noch im Bereich der Standardabweichung. Bei den beiden Verbindungen **BT111** und **JE021** waren die Unterschiede der mit den beiden Assays ermittelten Werte deutlich größer. Bei dem Hemmstoff **BT111** betrug die prozentuale Hemmung bei einer Konzentration von 20 nM beim Standardassay mit radioaktiv markiertem Substrat 80 %. Im Gegensatz dazu wurde im HTRF[®]-Assay ein Wert von 45 % ermittelt. Bei der Substanz **JE021** betrugen die Ergebnisse bei einer Konzentration von 500 nM 86 % für den Standardassay, verglichen mit einer prozentualen Hemmung von 56 % mit der neu etablierten HTRF[®]-Detektionsmethode. Die bestimmten IC₅₀-Werte (Tabelle 10) der Referenzverbindungen **FAD286** mit 0,8 nM (1,4 nM im HTRF[®]-Assay) und **FAD286A** mit 0,6 nM (0,8 nM im HTRF[®]-Assay) waren nahezu identisch. Zudem wurde auch der IC₅₀-Wert für die beiden Verbindungen **JE019** und **JE020** mit beiden Methoden bestimmt. Auch die Werte für die Substanz **JE019** mit 22 nM im Standardassay und 26 nM im HTRF[®]-Assay stimmten sehr gut überein. Nur für die Substanz **JE020** konnten mit 140 nM (Assay mit radioaktiv markiertem Substrat) und 181 nM (HTRF[®]-Assay) geringe Abweichungen für die inhibitorische Aktivität gegenüber dem Enzym CYP11B2 festgestellt werden.

4 Miniaturisierung der zellfreien Assays unter Anwendung der neuen Detektionsmethode

4.1 Ermittlung eines geeigneten Stoppreagenzes

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die beiden zellfreien Assays als auch die neue HTRF[®]-Detektionsmethode zur Konzentrationsbestimmung von Aldosteron und Cortisol erfolgreich etabliert. Mit dem Ziel, auch die zellfreien Assays im Hochdurchsatz durchführen zu können, sollten diese nun weiter miniaturisiert werden. Gleichzeitig sollte die Bestimmung der Steroidkonzentrationen nicht wie bisher mit radioaktiv markiertem Substrat, sondern mit der neuen HTRF[®]-Methode erfolgen. Dazu war es zunächst notwendig, eine Methode zu finden, mit deren Hilfe die Enzymreaktion im Testansatz gestoppt werden konnte. Diese sollte allerdings keinen störenden Einfluss auf die HTRF[®]-Detektionsmethode zeigen. Darüber hinaus sollte eine zu große Verdünnung der zu bestimmenden Steroide (Aldosteron oder Cortisol) durch die Zugabe eines Stoppreagenzes vermieden werden, um eine Unterschreitung der Detektionsgrenze der HTRF[®]-Assays zu vermeiden.

Folgende Chemikalien wurden auf ihre Fähigkeit, die Enzymreaktion zu stoppen, getestet: Acetonitril, DMSO, Triton X-100 (1,4 % in Assaypuffer) und HgCl₂ (10 mM in Assaypuffer).

Die Eignung der verschiedenen Chemikalien zum Stoppen der Enzymreaktion wurde in einem ersten Schritt exemplarisch am neu entwickelten zellfreien CYP11B2-Assay mit radioaktiv markiertem Substrat getestet. Nachdem sich eine Chemikalie zum Stoppen der Enzymreaktion als geeignet erwies, sollte sie im HTRF[®]-Assay eingesetzt werden, um mögliche störende Einflüsse auf die Detektionsmethode zu ermitteln.

Zunächst wurden pro zu testender Chemikalie vier Ansätze zur Präinkubation, wie unter VII.2.7 beschrieben, hergestellt. Zusätzlich wurden vier weitere Ansätze, die im Weiteren als Kontrolle dienen sollten, angesetzt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Substratlösung getaktet gestartet und die Ansätze bei 37 °C weiter im Schüttler inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 500 µl. Nach einer Inkubationszeit von 80 min wurde jeweils zu vier der insgesamt 16 Ansätze entweder 100 µl Triton X-100, HgCl₂, Acetonitril oder DMSO gegeben und kurz kräftig durchmischt. Unmittelbar danach wurde der Inhalt aus jeweils zwei Eppendorfgefäßen dieser Ansätze sowie zu zwei der Kontrollansätze getaktet

zu 500 µl Ethylacetat in einem frischen Reaktionsgefäß pipettiert. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Enzymreaktion zu 100 % gestoppt wurde. Diese bereits nach 80 min durch Überführung in Ethylacetat gestoppten Ansätze werden im Weiteren als Nullproben und Negativkontrolle bezeichnet. Die Steroide wurden anschließend durch kurzes kräftiges Durchmischen extrahiert und die Ansätze, wie unter VII.2.3 beschrieben, weiter behandelt. Die pro Chemikalie verbliebenen beiden Ansätze sowie die beiden verbleibenden Kontrollen wurden für weitere 40 min inkubiert. Diese Reaktionsansätze werden im Weiteren als Testansätze bzw. Positivproben bezeichnet. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte auch bei diesen Ansätzen ebenso wie bei den beiden verbleibenden Positivkontrollen die Überführung in ein neues Reaktionsgefäß mit Ethylacetat. Auch hier wurden die Proben wie unter VII.2.3 beschrieben, weiter behandelt. Die Ermittlung des jeweiligen Substratumsatzes erfolgte durch HPLC-Trennung, Radiodetektion und Auswertung der Chromatogramme. Anhand des Vergleiches vom Substratumsatz pro Chemikalie im Testansatz bzw. Positivkontrolle mit der entsprechenden Nullprobe bzw. Negativkontrolle konnte eine Aussage über die Eignung der gewählten Substanz zum Stoppen der Enzymreaktion getroffen werden. Nur wenn Umsatz bei Nullprobe und Testansatz gleich waren, konnte die Stoppmethode als geeignet angesehen werden. War allerdings die Menge des umgesetzten Substrates beim Testansatz höher als bei der Nullprobe, war die gewählte Chemikalie nicht dazu geeignet, die Enzymreaktion zu stoppen.

Tabelle 11: Im zellfreien *hCYP11B2*-Assay^a ermittelte Substratumsätze in %^b nach 120-minütiger Inkubation^c zur Testung der Eignung verschiedener Chemikalien zum Stoppen der Enzymreaktion, Positivkontrolle: 32 % Substratumsatz nach 120 min; Negativkontrolle: 18 % Substratumsatz

Stopp-Reagenz	Umsatz [%] nach 120 min (Testansatz)	Differenz (Testansatz-Nullprobe)
Triton X-100	33	+ 15
HgCl ₂	17	- 2
Acetonitril	17	- 1
DMSO	18	0

^a: Enzymquelle: Zellhomogenat aus Hamsterfibroblasten, die das humane CYP11B2 stabil exprimieren, 500 µl Gesamtvolumen pro Ansatz

^b: Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 15 %, Substrat: DOC (100 nM)

^c: nach 80 min Inkubation jeweils Zugabe von 100 µl Stopp-Reagenz, weitere Inkubation für 40 min

Es zeigte sich, dass bis auf Triton X-100 in der eingesetzten Konzentration alle getesteten Chemikalien in der Lage waren, die Enzymreaktion zu stoppen (vgl. Tabelle 11). Sowohl HgCl₂, als auch Acetonitril und DMSO führten in der eingesetzten Konzentration effektiv zum Stopp der Reaktion. Diese sollten nun auf einen möglichen störenden Einfluss auf den HTRF[®]-Assay getestet werden.

4.2 Untersuchung der Toleranz gegenüber HgCl₂, Acetonitril und DMSO

Der HTRF[®]-Assay sollte zur Bestimmung der Aktivität von Inhibitoren in zellfreien Enzymtests verwendet werden. Nach Ermittlung von Reagenzien, die in der Lage waren, die Enzymreaktion im zellfreien *hCYP11B2*-Assay mit radioaktiv markiertem Substrat zu stoppen, sollten diese nun im Hinblick auf mögliche störende Einflüsse auf den HTRF[®]-Assay untersucht werden. Dazu wurden, wie unter VII.2.6 beschrieben, die beiden HTRF[®]-Konjugate mit den Proben (verschiedene Konzentrationen (in % v/v) an HgCl₂, Acetonitril und DMSO in Verdünnungspuffer) inkubiert und die Delta F%-Werte ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

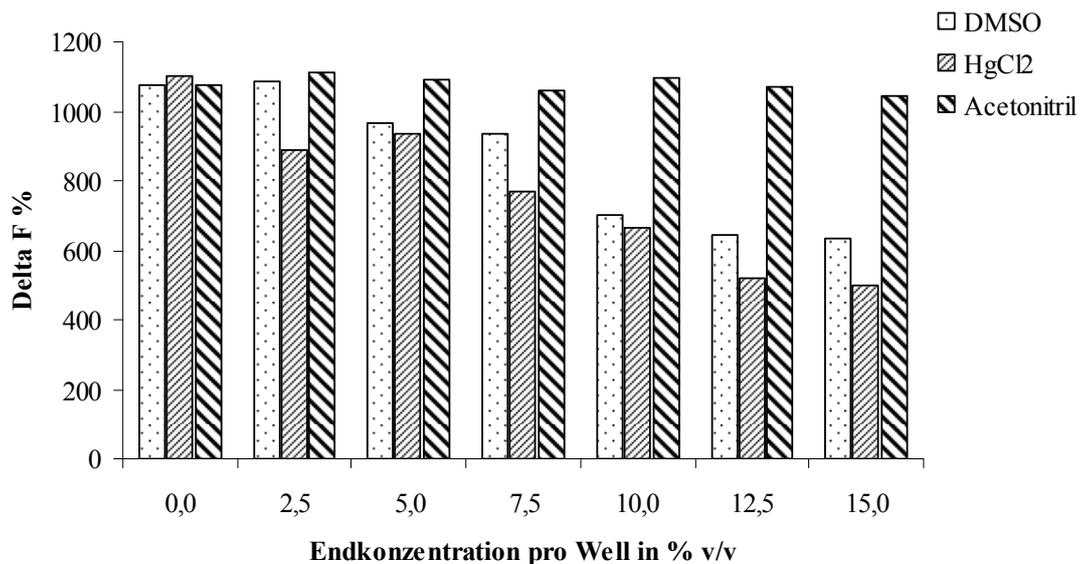


Abbildung 18: Untersuchung der Toleranz des HTRF[®]-Cortisol-Assays gegenüber verschiedenen Konzentrationen von HgCl₂, Acetonitril und DMSO

Überprüfung des Einflusses verschiedener Konzentrationen (0 – 15 % v/v) auf den Delta F%-Wert bei der maximalen Signalstärke, d. h. ohne Gegenwart von Cortisol

Es zeigte sich, dass bei Acetonitril auch eine Endkonzentration von bis zu 15 % v/v pro Well keine signifikante Veränderung der Signalstärke verursacht. Im Gegensatz dazu war schon bei Konzentrationen von 5,0 % v/v für HgCl₂ und DMSO eine signifikante Abnahme der Signalstärke im Vergleich zu der 0 %-Kontrolle zu erkennen. Die Delta F%-Werte waren bei den Chemikalien bei höchster Konzentration von 15 % nur noch etwa halb so groß wie bei den Ausgangswerten ohne Zusatz von Stoppreagenz. Somit sollte für die zellfreien Assays mit *hCYP11B1* und *hCYP11B2* Acetonitril zum Abstoppen der Enzymreaktion verwendet werden. Die Menge zum Abstoppen sollte 20 % des Versuchsansatzes der Enzymassays betragen, was bei den beiden HTRF[®]-Assays (zum Nachweis von Aldosteron oder Cortisol) einer Endkonzentration von 10 % v/v pro Well entspricht.

5 Stabilitätsuntersuchungen

5.1 Chemische Stabilität

Um eine verlässliche Wirksamkeit zu erzielen, ist auch die gleichbleibende Qualität der Wirkstoffe von großer Wichtigkeit. Deswegen sollte die chemische Stabilität bzw. das Maß der Degradierung zweier Substanzen in verschiedenen wässrigen Puffersystemen untersucht werden. Es wurden Substanzen ausgewählt, welche auch im Hinblick auf ihre Aktivität *in vivo* untersucht werden sollten.

Die Untersuchung der chemischen Stabilität erfolgte bei unterschiedlichen pH-Werten (1,2 bis 10,0) über einen Zeitraum von 24 h in gepufferten, wässrigen Lösungen bei 20 °C und 37 °C. Dazu wurden Stammlösungen der Verbindungen **SL242** und **SL272** in DMSO hergestellt und jeweils zu den verschiedenen Puffersystemen gegeben (Endkonzentration 20 µM). Nach der Inkubationszeit erfolgte die Quantifizierung der Substanzen mittels LC-MS/MS (interner Standard: Erythromycin). Gleichzeitig wurde der Gehalt direkt in identisch zubereiteten Lösungen, ohne nachfolgende Inkubation bestimmt (Kontrolle).

Die Quantifizierung der Ausgangskonzentration sowie der verbleibenden Menge erfolgte mit Hilfe von LC-MS/MS. Die in dieser Arbeit ermittelten LC-MS/MS-Daten wurden mit einem Triple-Quadrupol-MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) aufgenommen.

Die Analyse der Proben nach der Probenaufarbeitung erfolgte nach Entwicklung der MS- und der HPLC-Methoden (siehe VII.2.2.3, VII.2.2.6), nach Auswahl substanzspezifischer Ionen oder Fragmente per MS, bei bestimmten Einstellungen und Optimierung des HPLC-Gradienten. Es wurde generell mit ESI und RP-Chromatographie gearbeitet, da diese für die untersuchten Verbindungen am besten geeignet waren. Ziele waren die höchstmögliche Selektivität, hinreichende Sensitivität, kurze Retentionszeiten und Validität der Methoden. Die Quantifizierung der Verbindungen erfolgte anhand der Integration der Peakflächen der Chromatogramme; ihre Identifizierung erfolgte über die dazugehörigen Massenspektren.

Die so ermittelten Konzentrationen der beiden Verbindungen **SL242** und **SL272** in den frisch angesetzten und über 24 h inkubierten Proben wurden miteinander ins Verhältnis gesetzt. Somit konnte der Anteil an zersetzter Substanz ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 und 20 dargestellt.

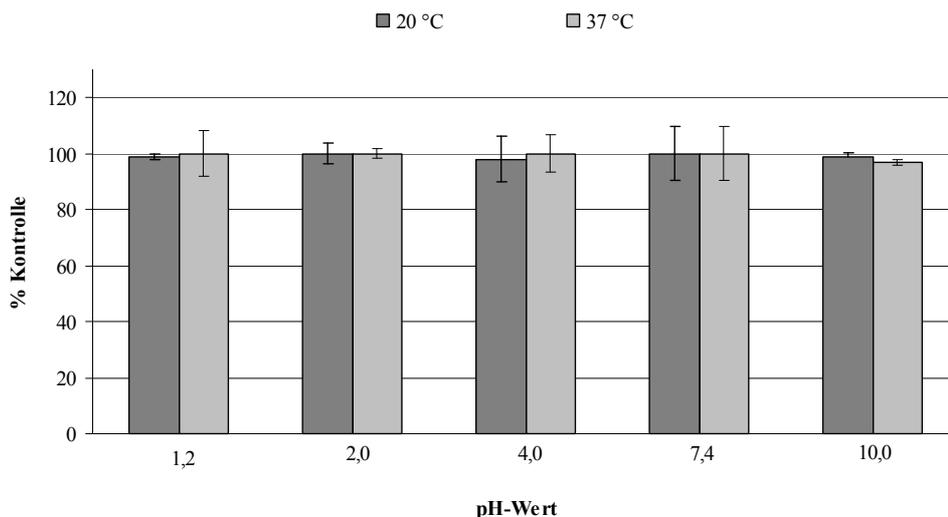


Abbildung 19: chemische Stabilität der Verbindung SL242 bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen nach 24 h

Eingesetzte Konzentration: 20 μ M. Nach 24 h wurden Aliquots entnommen und der Gehalt mit frisch angesetzten Proben verglichen. Analyse mittels LC-MS/MS, jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchsreihen (jeweils Doppelwerte)

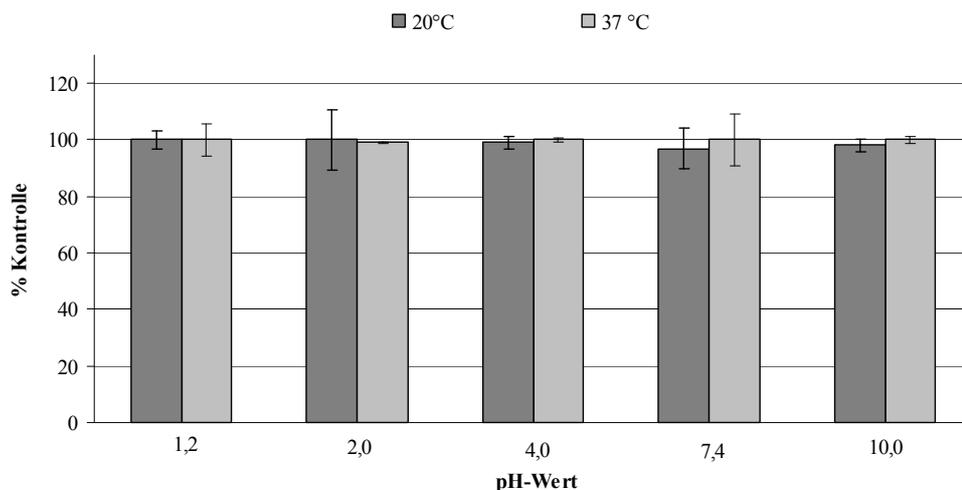


Abbildung 20: chemische Stabilität der Verbindung SL272 bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen nach 24 h

Eingesetzte Konzentration: 20 μ M. Nach 24 h wurden Aliquots entnommen und der Gehalt mit frisch angesetzten Proben verglichen. Analyse mittels LC-MS/MS, jeweils Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchsreihen (jeweils Doppelwerte)

Über den beobachteten Zeitraum von 24 h konnte bei den beiden getesteten Leitverbindungen SL242 und SL272 keine signifikante Degradation festgestellt werden.

5.2 Metabolische Stabilität

Da die Wirksamkeit einer Substanz nicht nur von ihrer Aktivität gegenüber dem Zielprotein abhängig ist, sondern auch von ihren ADME-Eigenschaften, ist eine Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter bereits in einem möglichst frühen Stadium der Entwicklung potentieller Wirkstoffe wichtig. Dabei spielt die Untersuchung der metabolischen Stabilität eine entscheidende Rolle, d. h. die Empfindlichkeit einer Substanz gegenüber Biotransformation. Diese wird ausgedrückt als Halbwertszeit ($t_{1/2}$), d. h. die Zeit, die benötigt wird um die Hälfte des eingesetzten Hemmstoffes abzubauen oder intrinsische Clearance (CL_{int}). Als intrinsische Clearance wird die maximale Aktivität der Leber gegenüber einer Substanz in Abwesenheit anderer physiologischer Faktoren, wie z. B. Durchblutung der Leber oder Proteinbindung bezeichnet.¹⁵² Neben diesen Informationen zum Ausmaß des Abbaus einer Substanz können mit Hilfe der metabolischen Stabilität in Lebermikrosomen auch Informationen über auftretende Metaboliten gewonnen werden.

In der Leber sind vor allem die für viele Biotransformationen wichtigen CYP-Enzyme lokalisiert. Der CYP-vermittelte Metabolismus ist häufig hauptbestimmend für die Verweildauer eines Wirkstoffs im Körper und kann daher verschiedene andere ADME-Parameter beeinflussen. Aus diesem Grund sollte auch im Hinblick auf spätere *in vivo*-Versuche die metabolische Stabilität der beiden Leitsubstanzen **SL242** und **SL272** *in vitro* an Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies untersucht werden.

Eine schnelle und kostengünstige Methode zur Überprüfung der metabolischen Stabilität von Substanzen *in vitro* bietet die Verwendung von Lebermikrosomen.¹⁵³ Diese subzelluläre Fraktion des endoplasmatischen Retikulums der Leber wird durch Homogenisierung und anschließende Zentrifugation von Lebergewebe gewonnen. Sie ist kommerziell erhältlich und enthält die für die Phase-I-Reaktionen hauptsächlich verantwortlichen CYP-Enzyme. Daneben sind zu geringen Anteilen weitere Enzyme, wie z. B. Flavin-abhängige Monooxygenasen und Glucuronyltransferasen enthalten.

Die Untersuchung der metabolischen Stabilität erfolgte mit Hilfe von Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies, unter anderem um einen ersten Hinweis auf das am besten geeignete Tiermodell bzw. erste Hinweise zur Abschätzung der einzusetzenden Dosis für spätere *in vivo*-Studien (u. a. toxikologische Untersuchungen) zu erhalten. Darüber hinaus wurde auch die metabolische Stabilität an humanen Lebermikrosomen untersucht. Verschiedene Spezies exprimieren in ihren Geweben unterschiedliche CYP-Isoenzyme in unterschiedlichen Anteilen und Mengen. Die Strukturunterschiede der Isoenzyme haben

Auswirkungen auf ihre Aktivität und Spezifität. Aufgrund dieser Unterschiede können die Ergebnisse mikrosomaler Untersuchungen keinesfalls direkt auf andere Arten übertragen werden. Für jede zu testende Substanz wurden Lebermikrosomen von Mensch, Ratte, Hamster und Hund eingesetzt. Dazu wurden mehrere Ansätze von **SL242** bzw. **SL272** (Endkonzentration 1 μM , gelöst in Acetonitril) zusammen mit einer definierten Konzentration an Mikrosomen der jeweiligen Spezies und NADP-regenerierendem System in Phosphatpuffer bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von eisgekühltem Acetonitril gestoppt, welches einen internen Standard (Erythromycin) enthielt. Nach kurzem kräftigem Durchmischen und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung der Proteine wurde der Überstand zur Ermittlung des Restgehaltes der Substanz im Verhältnis zur Ausgangskonzentration zur LC-MS/MS-Analytik eingesetzt. (vgl. III.5.1 und VII.2.10).

Zur Berechnung der verbleibenden Menge der Substanz wurden Peakflächen verglichen, ausgedrückt in Prozent der verbleibenden Menge der Substanz verglichen mit dem Zeitpunkt Null, d. h. einem Ansatz, bei dem die Inkubation sofort mit Acetonitril gestoppt wurde (100 %, d. h. keine Metabolisierung). Parallel dazu wurden weitere Kontrollansätze getestet. Zum einen eine Negativkontrolle, welche kein regenerierendes System enthielt und bei der die Mikrosomen zusätzlich vor Versuchsbeginn durch 10-minütiges Erhitzen bei 100 °C im Wasserbad denaturiert wurden. Diese Ansätze dienten zum Nachweis dafür, dass die Abnahme der Konzentration an Ausgangssubstanz nur durch die mikrosomale Aktivität verursacht wurde und keine weiteren Effekte Einfluss auf den Abbau der Inhibitoren hatten. Zusätzlich wurden als Referenzsubstanzen bzw. als Positivkontrollen zum Prüfen der enzymatischen Aktivität der Mikrosomenpräparationen Diazepam und Diphenhydramin eingesetzt, welche in gleicher Weise wie die zu untersuchenden Substanzen behandelt wurden.

Zur Berechnung der Halbwertszeit (min) wurde der verbleibende Anteil der Substanz in Prozent grafisch gegen die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen. Die mikrosomale intrinsische Clearance wird in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein ausgedrückt und entspricht der Geschwindigkeit des Abbaus der Substanz pro mg Protein. Sie wurde unter Berücksichtigung der jeweils erhaltenen Halbwertszeit berechnet (VII.2.10). Als Referenzsubstanzen wurden, wie bereits erwähnt, bei jedem Versuchsansatz ebenfalls Diphenhydramin bzw. Diazepam mitgeführt. Dabei ist Diazepam eine Substanz, die von Rattenlebermikrosomen nur langsam umgesetzt wird (low Clearance Referenz). Im Gegensatz dazu wird Diphenhydramin von diesen schnell umgesetzt (high Clearance

Referenz). Dies konnte für die intrinsische Clearance beim Einsatz von Rattenlebermikrosomen mit Werten von 67 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein für Diazepam und 175 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein für Diphenhydramin bestätigt werden. Für die Umsetzung mit humanen Lebermikrosomen wurde für Diazepam ein Wert von 11 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein und für Diphenhydramin 9 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein ermittelt. Diese Werte stimmen sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten für diese beiden Substanzen überein (Diazepam: 10 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein¹⁵⁴, Diphenhydramin: 7,8 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein).¹⁵⁵

Tabelle 12: Intrinsische Clearance CL_{int} [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein] der beiden Leitsubstanzen SL272 und SL242, ermittelt mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

Spezies	SL272	SL242
Human	28	17
Ratte	96	119
Hund	74	41
Hamster	47	22

Inkubationsvolumen: 200 μl , eingesetzte Proteinkonzentration Human: 0,75 mg/ml; Ratte Hund und Hamster: 0,5 mg/ml, Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 20 %

Wie zu erwarten war, sind erhebliche Unterschiede in der metabolischen Stabilität der beiden Leitsubstanzen mit den Lebermikrosomen der verschiedenen Spezies zu erkennen. Dabei wurde die Substanz **SL242** mit einer CL_{int} von 119 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein in dem Ansatz mit Rattenlebermikrosomen am schnellsten abgebaut. Ebenso wurde die Substanz **SL272** von den Enzymen der Rattenmikrosomen sehr schnell metabolisiert (96 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein). Die Umsetzung der beiden Substanzen war bei den humanen Lebermikrosomen mit 28 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ und 17 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein am geringsten, ebenso wie die Umsetzung der Substanz **SL242** mit Lebermikrosomen des Hamsters (22 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein). Bei allen anderen Spezies lag die hepatische Umsetzung im mittleren Bereich (zwischen 41 und 74 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein).

5.3 Bestimmung von Metaboliten

Unter Biotransformation versteht man die Umwandlung von aktiven, fettlöslichen und ausscheidungsunfähigen Medikamenten in meist inaktive und wasserlösliche Substanzen. Dabei werden Medikamente zunächst vorwiegend durch Phase-I-Reaktionen metabolisiert und danach in einer Phase-II-Reaktion konjugiert. In der Phase-I-Reaktion entsteht aus dem Ausgangsstoff durch Hydroxylierung, Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse ein meist besser wasserlöslicher Metabolit. Um die Phase-I-Reaktionen und die daraus entstehenden Metabolite der beiden Substanzen **SL242** und **SL272** näher zu untersuchen, fand eine Inkubation mit Mikrosomen verschiedener Spezies (Mensch, Ratte, Hund, Hamster) über einen längeren Zeitraum statt. Dazu diente der Versuchsansatz, der bereits bei der Bestimmung der metabolischen Stabilität verwendet wurde mit geringfügigen Modifikationen. Zum einen waren hier die Protein- und Substanzkonzentrationen höher. Zum anderen wurden die Tests mit mehreren Ansätzen über einen längeren Inkubationszeitraum durchgeführt. Nach Zugabe von Ethylacetat zum Stoppen der Reaktion erfolgte die zweimalige Extrahierung der Substanzen mit Ethylacetat durch kurzes kräftiges Durchmischen. Die so erhaltenen organischen Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt, nach Abdampfen der Lösemittelphase und anschließender Rekonstitution in Acetonitril (mit internem Standard) vereinigt und die Metaboliten mittels HPLC-DAD-MS/MS analysiert. Dazu erfolgte die Aufnahme eines Chromatogrammes beim Absorptionsmaximum (λ_{\max}) der zu untersuchenden Substanz. Dabei war es möglich, auch die Metaboliten zu erfassen, da diese in der Regel die Kernstruktur der Muttersubstanz behalten und so auch ein sehr ähnliches Wellenlängenmaximum aufweisen. Gleichzeitig fand eine Aufzeichnung der Full Scan-Massenspektren im positiven ESI-Modus statt. Auch hier zeigen die Metabolite meist die gleichen Fragmente wie ihre Muttersubstanz.¹⁵⁶ Es wurde nach den möglichen Mol-Peaks $[M+H]^+$ der Analyten in einem Bereich von m/z 200 bis 350 gesucht. Zu den im UV-Chromatogramm identifizierten Metabolitenpeaks wurden im Totalionen-Chromatogramm die zugehörigen prädominanten Massen ermittelt und die Peakübereinstimmungen anschließend im Einzelionen-Chromatogramm verifiziert. Die Quantifizierung der identifizierten Metabolite erfolgte bezüglich ihrer relativen Peakfläche im UV-Chromatogramm, bezogen auf die Muttersubstanz.

Ebenso wie bei den betrachteten CL_{int} -Werten, konnten auch hier Unterschiede in den gebildeten Metaboliten bei den verschiedenen Spezies festgestellt werden. Die ermittelten Metabolitenprofile sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

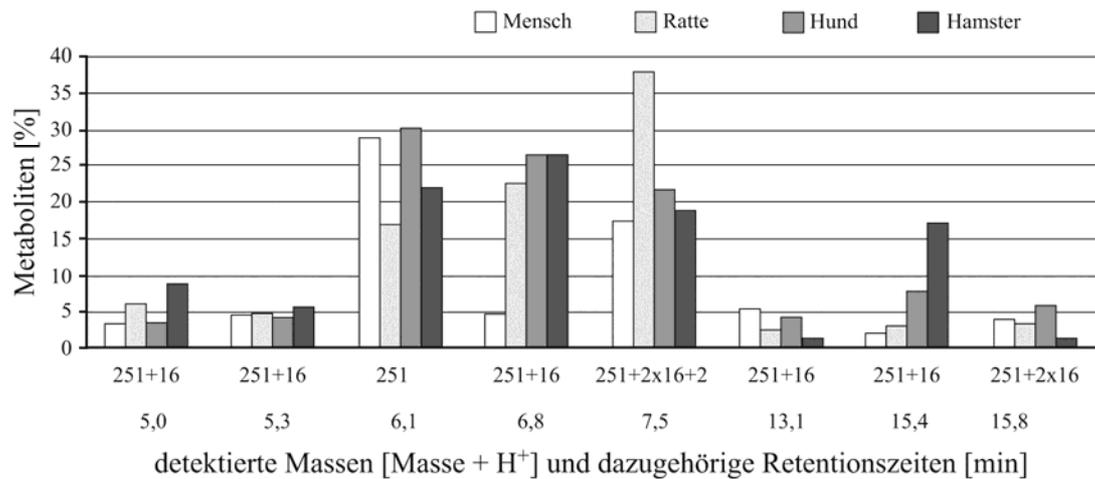


Abbildung 21: Interspezies-Vergleich der Metabolitenprofile nach mikrosomaler Inkubation der Substanz SL272 (MW: 250,3)

Eingesetzte Substanzkonzentration: 10 µM; Inkubationszeiten: Mensch, Hund und Hamster: 180 min, Ratte: 120 min

Wurde die Substanz **SL272** mit Lebermikrosomen der Spezies Mensch, Hund, Hamster und Ratte inkubiert und die Proben per LC-MS/MS analysiert, ergab sich für alle Spezies ein ähnliches Metabolitenmuster. Größere Unterschiede waren lediglich in der Menge der jeweils gebildeten Metaboliten zu sehen. Es konnten bei allen Spezies folgende Peaks mit hohen Intensitäten ermittelt werden: m/z 251 (Muttersubstanz), m/z 267, m/z 285 und m/z 283. Insgesamt wurden sieben Hauptmetabolite aus Phase I identifiziert, wobei hauptsächlich Oxidationen bzw. Hydroxylierungen beobachtet wurden. Dabei traten sowohl monohydroxylierte Metabolite, als auch dihydroxylierte Metabolite auf.

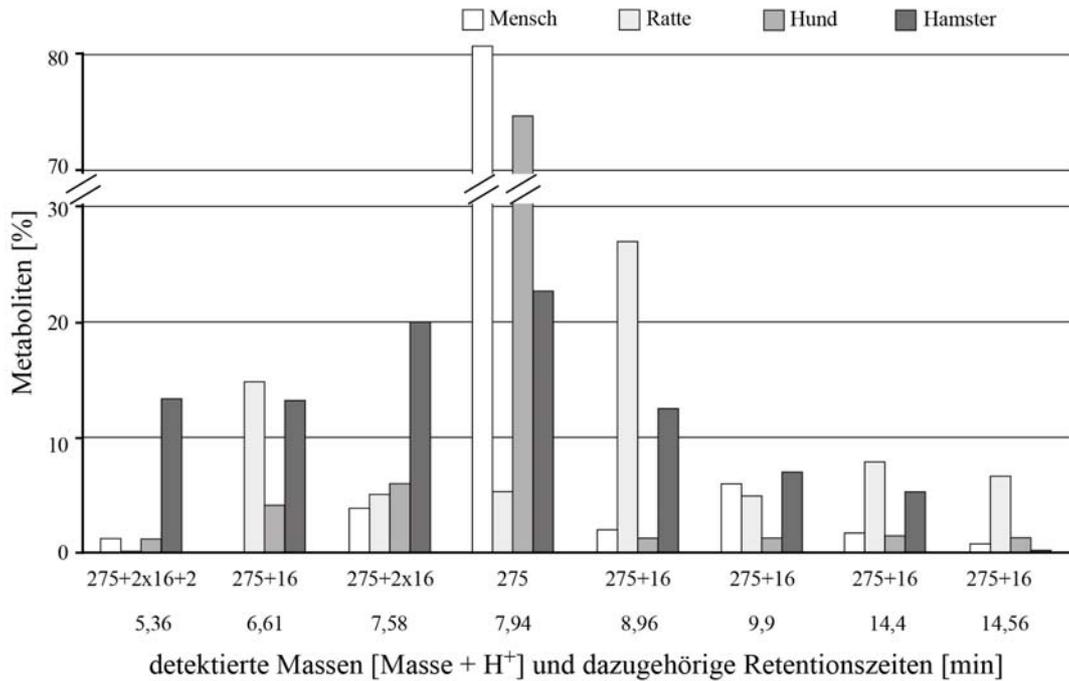


Abbildung 22: Interspezies-Vergleich der Metabolitenprofile nach mikrosomaler Inkubation der Substanz SL242 (MW: 274,3)

Eingesetzte Substanzkonzentration: 10 μM ; Inkubationszeiten: Mensch, Hund und Hamster: 180 min, Ratte: 120 min

Auch bei der Substanz **SL242** ergab sich für alle Spezies ein ähnliches Metabolitenmuster nach Inkubation mit Lebermikrosomen von Mensch, Hund, Hamster und Ratte. Es waren deutliche Unterschiede in der Menge der jeweils gebildeten Metaboliten zu sehen. Bei allen Spezies konnten folgende Peaks mit hohen Intensitäten ermittelt werden: m/z 275 (Muttersubstanz), m/z 291, m/z 307 und m/z 309. Insgesamt wurden sieben Hauptmetabolite aus Phase I identifiziert, wobei hauptsächlich Oxidationen bzw. Hydroxylierungen beobachtet wurden. Dabei traten sowohl monohydroxylierte Metabolite, als auch dihydroxylierte Metabolite auf. Daneben konnten noch folgende Peaks zu geringen Anteilen identifiziert werden: m/z 268, m/z 288, m/z 304 und m/z 340. Diese wurden nicht im Metabolitenprofil aufgenommen, da bei diesen keine Zuordnung der Struktur durch Metabolisierung möglich war (Abb. 22). Aufgrund ihrer ungeradzahligen unprotonierten Massen, muss ihre Bildung mit dem Verlust eines Stickstoffatoms einhergehen. Die Metaboliten m/z 288, m/z 304 und m/z 340 lassen sich dann wieder durch einfache und zweifache Oxidation erklären.

6 Aktivitätsassay mit der humanen adrenocorticalen Tumorzelllinie H295R

Die NCI-H295R-Zelllinie ist eine humane adrenale Karzinomzelllinie in der alle steroidogenen CYP-Enzyme, die im adrenalen Cortex vorkommen (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP21, CYP17, 3 β -HSD, 17 β -HSD und geringe Level an CYP19), exprimiert werden. Damit handelt es sich um ein wesentlich komplexeres Modell, verglichen mit den bisher durchgeführten Ganzzell-Assays mit V79MZ-Zellen. Die NCI-H295R-Zelllinie spiegelt somit die Vorgänge in der humanen Nebennierenrinde wider und stellt daher ein wichtiges Instrument bei der Abschätzung der Selektivität von Hemmstoffen *in vitro* dar. Mit Hilfe dieses Modells sollte eine Voraussage von Wirkungen und Nebenwirkungen von Verbindungen auf die Biosynthesewege der Nebennierenrinde deutlich präziser werden. Der Assay wurde wie von Müller-Vieira *et al.* beschrieben,¹⁵⁷ mit geringen Modifikationen durchgeführt. Getestet wurde die inhibitorische Aktivität der Substanzen **SL242**, **SL272** und **SL125** auf die *de novo* Biosynthese von Aldosteron- und Cortisol. Als Referenzsubstanz diente Fadrozol. Die nach Hemmstoffexposition gebildeten Aldosteron- und Cortisolmengen wurden mit Hilfe spezifischer Immunoassays bestimmt (siehe VII.2.2.1, VII.2.2.2).

Tabelle 13: Prozentuale Hemmwerte [%]^a und IC₅₀-Werte [μ M]^b für die Inhibition der Aldosteron- und Cortisol-Sekretion ausgewählter Verbindungen im H295R-Assay^c

Verbindung	Aldosteron	Cortisol
FAD	0,41	0,35
SL242	55 [0,1 μ M]	50 [0,1 μ M]
SL272	53 [0,4 μ M]	58 [1 μ M]
SL125	18 [500 nM]	50 % [250 nM]

^a: Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 25 %, verschiedene Hemmstoffkonzentrationen: 0,1 μ M - 1 μ M

^b: Mittelwert aus zwei unabhängigen Tests mit drei unterschiedlichen Konzentrationen, jeweils Doppelwerte, Standardabweichung kleiner als 25 %

^c: Quantifizierung der Aldosteron- und Cortisolkonzentration im Zellkulturüberstand mit spezifischen Immunoassays, nach einer Inkubationszeit von 6 h

Die Substanz **SL242** wies die stärkste inhibitorische Wirkung, sowohl auf die Aldosteron- als auch auf die Cortisolsekretion, auf (55 % und 50 % Hemmung bei 0,1 μM). Die Referenzsubstanz **FAD** und die Verbindung **SL272** zeigten eine nahezu identische Hemmwirkung gegenüber der Aldosteronsekretion (IC_{50} : 0,41 μM für **FAD** und 53 %-Hemmung bei 0,4 μM für **SL272**). Die Substanz **SL125** besaß in der getesteten Konzentration von 500 nM mit nur 18 % eine sehr geringe inhibitorische Aktivität. Die Wirkung von **FAD** auf die Cortisolsynthese war mit einem IC_{50} -Wert von 0,35 μM deutlich größer im Vergleich zur Substanz **SL272** mit einer prozentualen Hemmung von 58 % bei 1 μM .

7 Aktivitätsassay mit Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies

Mit Hilfe von V79MZ-Zellen, die entweder *hCYP11B2* oder *rCYP11B2* stabil exprimieren konnte gezeigt werden, dass die am humanen Enzym sehr aktive Verbindung **SL272** gegenüber der Aldosteronsynthese der Ratte nahezu keine Aktivität aufweist.¹⁵⁸ Deswegen sollte nun die CYP11B2-Hemmaktivität der Verbindung an weiteren Spezies getestet werden, um die besten Kandidaten für die Erbringung des *Proof of Concept in vivo* zu bestimmen. Zusätzlich sollte die inhibitorische Aktivität der Verbindung **SL242** an verschiedenen Spezies, sowie die Referenzsubstanz **FAD286A** getestet werden. Dazu wurden entweder ganze Nebennieren (Ratte) oder Nebennieren-Fragmente (Kaninchen, Meerschweinchen) mit Substrat inkubiert, der Substratumsatz mit und ohne den Inhibitor quantifiziert und so die Hemmwirkung am Enzym bestimmt. Die Daten von **SL272** und **SL242** für die Hemmung an Nebennieren der Ratten und **SL272** an Meerschweinchen- und Hamsternebnieren wurden von Christina Zimmer ermittelt und zur Verfügung gestellt. Sie sind nachfolgend zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse in den Abbildungen mit aufgeführt.

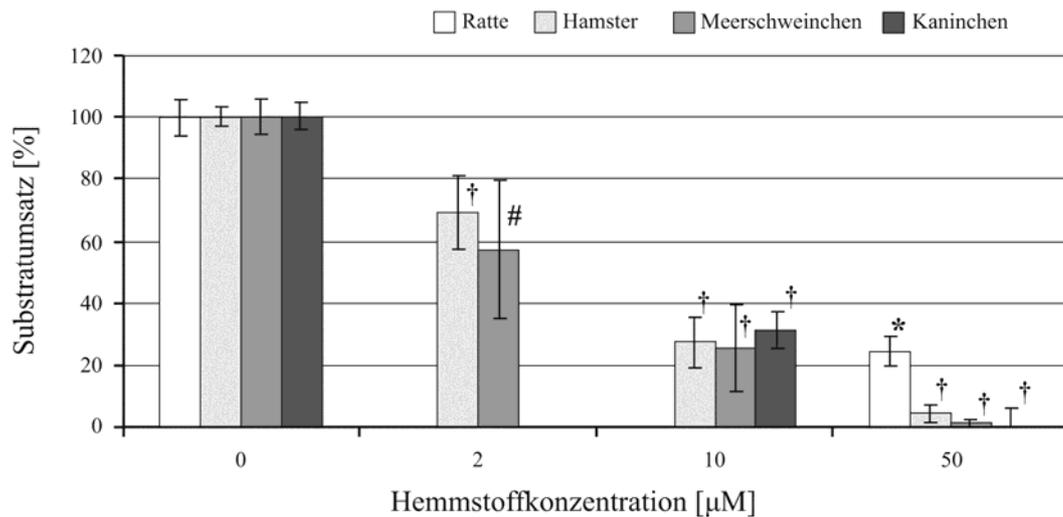


Abbildung 23: Hemmung der Aldosteronbiosynthese durch die Substanz SL242 in Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies

Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus mindestens 4 Ansätzen Signifikanzen: * $p < 0,05$; † $p < 0,003$; # $p > 0,005$

Bei allen Spezies nimmt die Hemmung der Aldosteronbiosynthese wie erwartet mit steigender Konzentration des Hemmstoffes zu. Die größte Hemmwirkung zeigt die Substanz SL242 gegenüber CYP11B2 von Meerschweinchen, Kaninchen und Hamster mit einer prozentualen Hemmung von nahezu 100 % bei einer Konzentration von 50 µM. Bei dieser Konzentration war die Aldosteronbiosynthese der Rattennebenniere nur um etwa 76 % gehemmt. Bei 10 µM war die Hemmung von CYP11B2 mit etwa 75 % bei Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen nahezu identisch.

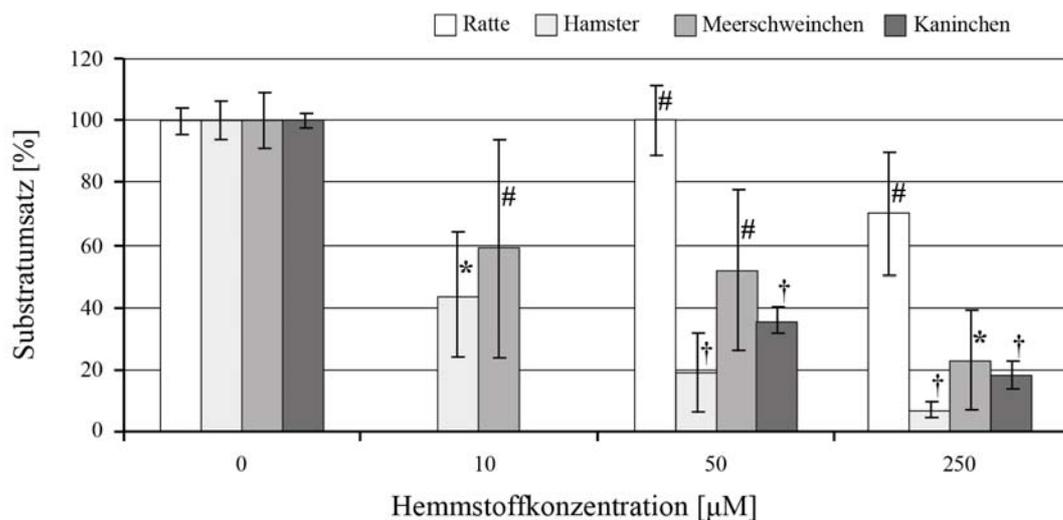


Abbildung 24: Hemmung der Aldosteronbiosynthese durch die Substanz SL272 in Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies

Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus mindestens 4 Ansätzen Signifikanzen: * $p < 0,05$; † $p < 0,003$; # $p > 0,005$

Wie bereits in den vorangegangenen zellulären *in vitro*-Tests mit den V79MZ-Zellen, welche *r*CYP11B2 exprimieren, gezeigt werden konnte,¹⁵⁹ ist der Inhibitor **SL272** auch bei den Versuchen mit Nebennieren nicht in der Lage CYP11B2 der Ratte signifikant zu hemmen. Lediglich in der höchsten Konzentration von 250 μ M hat sich eine geringe Hemmung von etwa 30 % gezeigt. Im Gegensatz dazu ist bereits bei einer Konzentration von 10 μ M eine signifikante Hemmung des Substratumsatzes durch den Hemmstoff bei Hamster (56 %) und Meerschweinchen (41 %) zu sehen. Bei den höheren Konzentrationen 50 μ M und 250 μ M zeigt sich, dass **SL272** die größte Potenz gegenüber der Aldosteronsynthese des Hamsters besitzt, welche sich in einer prozentualen Hemmung von 81 % (50 μ M) bzw. 93 % (250 μ M) zeigt.

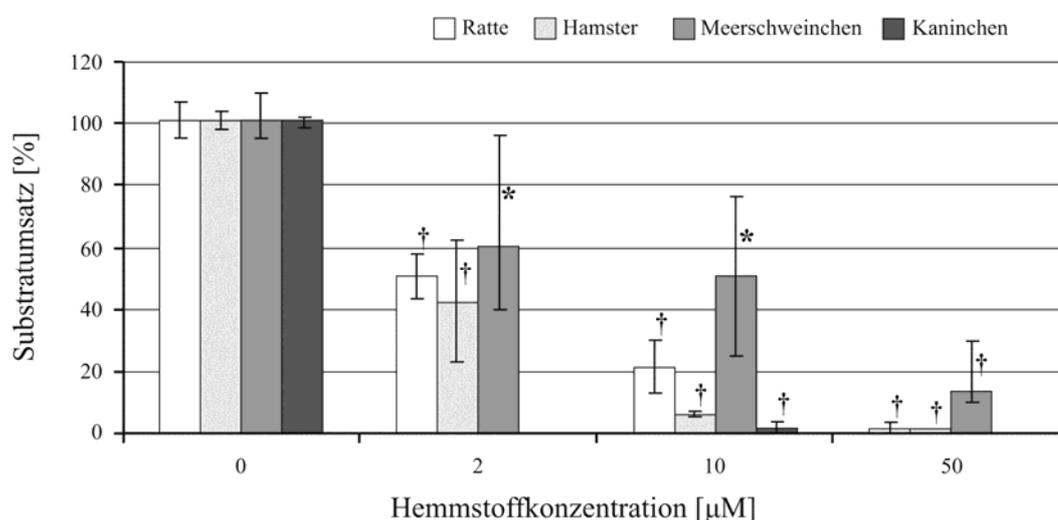


Abbildung 25: Hemmung der Aldosteronbiosynthese durch die Substanz FAD286A in Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies

Substrat: DOC (100 nM), jeweils Mittelwert aus mindestens 4 Ansätzen Signifikanzen: * $p < 0,05$; † $p < 0,003$; # $p > 0,005$

Bei der Referenzsubstanz **FAD286A** zeigte sich die größte Hemmung der Aldosteronsynthese bei den Nebennieren des Kaninchens. Hier konnte bereits mit einer Konzentration von 10 μ M nahezu kein Substratumsatz mehr festgestellt werden. Auch die Aktivität der Substanz gegenüber den Enzymen von Ratte und Hamster war mit 79 % und 94 % bei einer Konzentration von 10 μ M sehr hoch. Bei dieser Konzentration zeigt sich auch die geringere Aktivität gegenüber CYP11B2 des Meerschweinchens am deutlichsten. Hier konnte nur eine Hemmung von etwa 50 % erzielt werden.

8 Löslichkeit in verschiedenen Testmedien

Da die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen auch im Wesentlichen von der Löslichkeit der Wirkstoffe bestimmt wird, sollte vor dem geplanten *in vivo*-Versuch in der Ratte, die Löslichkeit der Substanz **SL242** in verschiedenen Medien untersucht werden. Damit sollten vorab eventuelle Löslichkeits-Probleme bei der maximal einzusetzenden Konzentration des Inhibitors im ausgewählten Vehikel PEG400 aufgezeigt werden (50 mg/kg; 5 ml/kg). Die dazu verwendeten Medien simulieren die unterschiedlichen Zustände (z. B. pH-Wert, Osmolarität) in den verschiedenen Abschnitten im Verdauungstrakt. Nach oraler Einnahme der Substanz gelöst in PEG400 beginnt die Wirkstofffreisetzung im Magen. Dies sollte durch die Untersuchung der Löslichkeit in simuliertem Magensaft (Simulated Gastric Fluid SGF, pH 2,0) untersucht werden. Die beiden weiteren getesteten Medien, simulierter Dünndarmsaft im Nüchternzustand (Fasted State Simulated Intestinal Fluid FaSSIF, pH 6,0) und simulierter Darmsaft nach Nahrungszufuhr (Fed State Simulated Intestinal Fluid FeSSIF, pH 5,0) bilden die pH-Bedingungen, den Einfluss amphiphiler Gallen-Komponenten (Lecithin und Taurocholat), Pufferkapazität und Osmolalität im oberen Dünndarm vor (fasted) und nach (fed) der Nahrungsaufnahme nach.^{160, 161} Auch in diesen sollte die Löslichkeit der Substanz bestimmt werden.

Zur Testung der Löslichkeit wurden 10 mg/ml der Substanz **SL242** in PEG400 gelöst, entsprechend der geplanten einzusetzenden Konzentration von 50 mg/kg. Davon wurden für die drei verschiedenen Ansätze (SGF, FaSSIF und FeSSIF) jeweils 250 µl in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen Testlösung in 10 µl-Schritten. Zwischen jeder Zugabe wurde der Ansatz kurz im Heizblock bei 37 °C erhitzt und für etwa 5 min kräftig durchmischt. Die schrittweise Zugabe erfolgte so lange, bis visuell eine deutliche Trübung zu erkennen war.

Nach Zugabe von insgesamt 60 µl der den Darmsaft nach Nahrungszufuhr simulierenden Testsubstanz (FeSSIF) trat eine deutliche Trübung auf, d. h. etwa dem halben Volumen der Ausgangslösung. Nach Zugabe von insgesamt 160 µl des den Dünndarmsaft im Nüchternzustand simulierenden Mediums trat ebenfalls eine Trübung auf. Da auch nach Zugabe von 200 µl des simulierten Magensaftes (SGF) keine Trübung auftrat wurde hier auf eine weitere Zumischung bis zur eindeutigen Trübung verzichtet.

Aufgrund des erst bei größeren Mengen an zugemischten simulierenden Medien konnte die Gefahr, dass die Substanz **SL242** bei der maximalen Konzentration von 50 mg/kg nach peroraler Applikation im Magen-Darm-Trakt ausfällt, weitgehend ausgeschlossen werden.

9 Biologische Aktivität *in vivo*

Neben der Aktivität eines potentiellen Arzneistoffes am Targetenzym, d. h. seiner Pharmakodynamik, spielen im lebenden Organismus noch weitere Eigenschaften wie z. B. die orale Bioverfügbarkeit oder die Halbwertszeit eine entscheidende Rolle für eine optimale Wirksamkeit. Obwohl heutzutage eine Vielzahl von *in vitro*-Testmethoden für Vorhersagen von pharmakokinetischen Parametern einer Substanz zur Verfügung steht, ist eine Testung am Tiermodell unverzichtbar zur eindeutigen Erstellung eines pharmakokinetischen Profils. Darüber hinaus können nur so auch gleichzeitig mögliche Einflüsse von Regel- und Feedback-Mechanismen untersucht werden. Natürlich müssen bei diesen *in vivo*-Modellen Spezies-Unterschiede zum Menschen berücksichtigt werden. So erfolgt z. B. die Absorption in kleinen Säugern wie der Ratte viel schneller als im Menschen, ebenso wie die Elimination.¹⁶² Trotzdem sind diese Versuche unverzichtbar im Prozess der Arzneimittelentwicklung.

Aufgrund der positiven Ergebnisse, die die Substanz **SL242** bei den verschiedenen zuvor beschriebenen *in vitro* Versuchen erzielte, sollte nun ihre Aktivität auch *in vivo* an einem Rattenmodell getestet werden. In Vorversuchen sollte zunächst die orale Bioverfügbarkeit mit verschiedenen Wirkstoffträgern untersucht werden.

9.1 Bioverfügbarkeit

Um die gewünschte Wirkung erzielen zu können, muss ein Arzneistoff in einer ausreichenden Konzentration und über einen gewissen Zeitraum am Wirkort vorliegen. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der der therapeutisch wirksame Bestandteil aus der pharmazeutischen Formulierung am Wirkort verfügbar ist, bezeichnet man als Bioverfügbarkeit.

Vor der eigentlichen Testung auf Aktivität *in vivo* sollte zunächst die Bioverfügbarkeit der Substanz **SL242** untersucht werden. Dies war wichtig im Hinblick auf eine Beurteilung von Effizienz und Effektivität, auch um eine Abschätzung der einzusetzenden Konzentration und des am besten geeigneten Vehikels vornehmen zu können. Ein guter Indikator für die orale Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln ist die Lipinski's Rule of Five. Wenn mindestens drei

der folgenden vier Bedingungen erfüllt sind, kann von einer guten oralen Bioverfügbarkeit der Substanz ausgegangen werden:

- Molekulargewicht unter 500 g/mol
- Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren nicht mehr als fünf
- Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren nicht mehr als zehn
- log P (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) nicht größer als fünf

Der Inhibitor **SL242** erfüllt all diese Anforderungen (clogP: 3,03; MW: 274) und sollte somit nach peroraler Applikation eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen.

Zum Einsatz für die perorale Applikation kamen dafür zwei gängige Wirkstoffträger: PEG400 und Labrasol[®]. PEG400 ist ein Wirkstoffträger, der in der pharmazeutischen Industrie sehr häufig verwendet wird. Labrasol[®] wurde eingesetzt, da es bestehend aus einer lipophilen Grundlage, zu einer retardierenden Absorption führen kann und es aus pharmakodynamischer Sicht oftmals sinnvoller ist, ein späteres Konzentrationsmaximum im Blut zu haben, um Mehrfachapplikationen zu vermeiden.

Der Hemmstoff **SL242** wurde intravenös (1 mg/kg in PEG400/PBS 1:1) und peroral (5 mg/kg, 25 mg/kg und 50 mg/kg in PEG400 oder 25 mg/kg in Labrasol/Wasser 1:1) jeweils vier männlichen katheterisierten Wistar-Ratten verabreicht (Ausnahme 25 mg/kg: n = 6). Die Blutentnahmen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: Predose (vor der Applikation), 5 (nur i. v.), 15, 30, 45, 60 min, 2, 3, 4, 6, 8 und 24 h. Die Plasmaspiegel wurden anschließend mittels LC-MS/MS-Analytik ermittelt. Durch die Aufnahme der Plasmaspiegel-Zeit-Kurve konnten verschiedene kinetische Parameter mit Hilfe einer Pharmakokinetik-Software (PK Solutions 2.0) bestimmt werden. (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammenfassung der pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Applikationsrouten, Dosen und Formulierungen der Substanz SL242

Vehikel	PEG400/ PBS (1:1)	PEG400	PEG400	PEG400	Labrasol/ H ₂ O (1:1)
Verabreichung	i. v.	p. o.	p. o.	p. o.	p. o.
Dosis [mg/kg]	1	5	25	50	25
C_{p0} [ng/ml]	731,3	-	-	-	-
C_{max obs} [ng/ml]		172,8	1573,2	1356,7	438,0
t_{max obs} [h]	-	0,5	0,8	0,3	2,0
Halbwertszeit [t_{1/2z} h]	5,0	5,5	4,8	4,9	3,3
AUC_{0-tz} [ng*h/ml]	269,1	433,5	5086,8	6187,9	3221,7
AUC_{0-∞} [ng*h/ml]	286,1	444,2	5197,9	6401,4	3242,0
F [%]	100	31	73	45	45
CL/F [l/h*kg]	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

C_{p0} [ng/ml]: errechnete initiale Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe; C_{max obs} [ng/ml]: maximale beobachtete Plasmakonzentration; t_{max obs} [h]: Zeitpunkt bei der C_{max} erreicht wurde; t_{1/2z} [h]: terminale Halbwertszeit der Konzentrations-Zeit-Kurve; AUC_{0-∞} [ng*h/ml]: Area under the curve; F [%]: absolute Bioverfügbarkeit; CL/F [l/h*kg]: total Clearance, normalisiert auf die Bioverfügbarkeit; t_z: Zeit der Entnahme der Probe mit der niedrigsten quantifizierbaren Substratkonzentration

Die intravenöse Applikation von **SL242** führt zu einer schnellen Verteilung und einer langsamen Elimination aus dem Körper. Nach peroraler Applikation mit PEG400 wird **SL242** dosisunabhängig innerhalb einer Stunde absorbiert. Die orale Bioverfügbarkeit ist mit diesem Vehikel bei allen Konzentrationen sehr gut. Es fällt auf, dass die Bioverfügbarkeit mit steigender Dosis wieder abfällt.

Tatsächlich zeigte das pharmakokinetische Profil nach Applikation in Labrasol/Wasser wie erwartet einen späteren Konzentrationspeak (2 h). Die maximale Konzentration, die im Plasma erreicht wurde, betrug aber nur ~30 % gegenüber dem PEG400 als Formulierung und die Bioverfügbarkeit war bei Labrasol/Wasser nur halb so hoch, wie nach Einsatz von PEG400. Dies zeigt, dass das pharmakokinetische Profil der **SL242** nicht unerheblich von der Trägersubstanz abhängt. Aufgrund der besseren Bioverfügbarkeit die mit dem Vehikel

PEG400 erzielt werden konnte, sollte der folgende *in vivo* Test auf Aktivität der Substanz **SL242** auch mit diesem Vehikel durchgeführt werden.

9.2 Aktivität nach peroraler Verabreichung im ACTH-stimulierten Rattenmodell

Nach dem Nachweis der guten oralen Bioverfügbarkeit, sollte nun auch die Wirksamkeit der Substanz nach peroraler Applikation untersucht werden. Aufgrund von bereits durchgeführten Tests mit einem ACTH-stimulierten, katheterisierten Rattenmodell,¹⁵⁸ bei dem die Aldosteron-hemmende Wirkung der Substanz **SL242** nach intravenöser Applikation nachgewiesen werden konnte, sollte dieses Tiermodell auch für die Testung nach peroraler Gabe verwendet werden. Aufgrund von Versuchen zur Bioverfügbarkeit der Substanz, wurde PEG400 als Wirkstoffträger eingesetzt (siehe III.9.1).

Bereits zwei Wochen vor der eigentlichen Studie wurden die Tiere an das experimentelle Handling gewöhnt, um den Stress der Tiere während der Versuche so gering wie möglich zu halten. Dies war dringend erforderlich, da Stress die Testergebnisse aufgrund seines Einflusses auf den Hormonhaushalt verfälschen würde.

Zur Untersuchung der *in vivo*-Wirkung der Substanz **SL242**, wurde zunächst bei insgesamt 12 katheterisierten Wistar-Ratten die Aldosteronbiosynthese durch subkutane Applikation eines ACTH-Depotpräparates (1 mg/kg, etwa 16 h vor Applikation der Substanz) stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Applikation erfolgte jeweils mittels Schlundsonde. Die erste Gruppe erhielt die Trägersubstanz (PEG400) ohne Zugabe des Hemmstoffs und diente im weiteren Verlauf als Kontrollgruppe. Die zweite Gruppe bekam 25 mg/kg der Substanz **SL242** in PEG400 verabreicht. Danach wurden sechs Blutproben innerhalb von 8 h entnommen. Die entstandenen Plasmaproben wurden anschließend geteilt - ein Teil wurde zur Bestimmung der Aldosteronspiegel mittels RIA, zur Erstellung einer Plasmaspiegel-Zeit-Kurve genutzt (vgl. Abbildung 26), der zweite Teil für die Bestimmung der Plasmagehalte mittels LC-MS/MS (vgl. Abbildung 27). Die simultane Messung beider Parameter aus einer Probe erlaubt die Erstellung eines pharmakokinetischen/pharmakodynamischen (PK/PD) Profils.

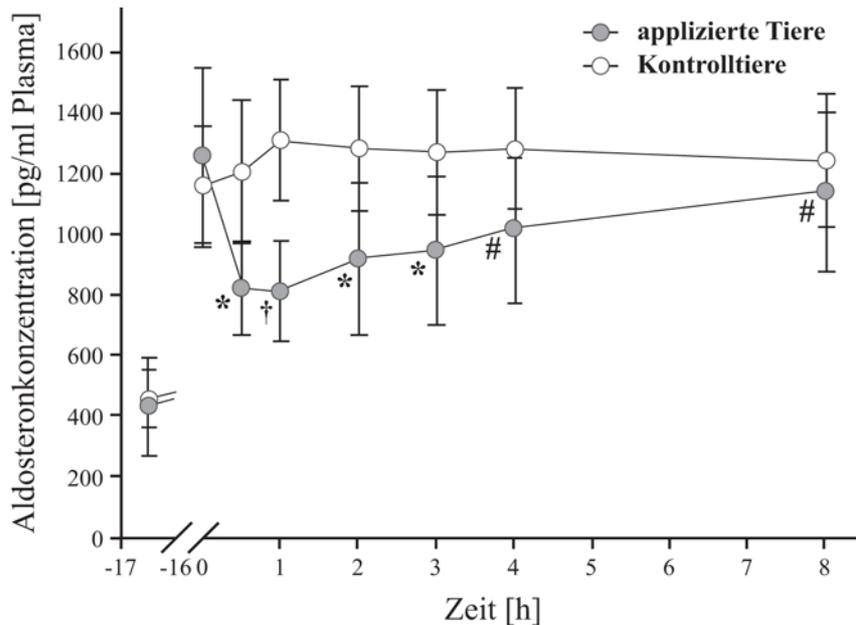


Abbildung 26: Mittlere Aldosteronkonzentration nach einmaliger peroraler Verabreichung von SL242 (25 mg/kg) in ACTH-stimulierten Ratten über einen Zeitraum von 8 h
Männliche Wistar-Ratten (je n = 6); Kontrolltiere: ohne Applikation der Substanz; 16 h vor Applikation der Substanz oder nur des Vehikels; Stimulation der Aldosteronsynthese mit ACTH (1 mg/kg, s. c.); verwendetes Vehikel: PEG400; Signifikanzen: * $p < 0,05$; † $p < 0,003$; # $p > 0,005$

Die Applikation von ACTH (1 mg/kg s. c.) führte zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Aldosteronspiegel (Basalwerte 433 ± 266 pg/ml, nach Stimulation 1260 ± 40 pg/ml). Nach einmaliger peroraler Applikation von **SL242** (25 mg/kg in PEG400) kommt es bei den applizierten Tieren zum signifikanten Absinken der Aldosteronkonzentration (um durchschnittlich 36 %). Dabei konnten individuell unterschiedliche t_{\max} -Werte festgestellt werden (0,5 h – 2 h). Der aldosteronsenkende Effekt war nach einer Stunde hoch signifikant ($p < 0,003$) und bis zu dem Zeitpunkt 3 h nach Applikation noch signifikant ($p < 0,05$). Danach nahm die hemmende Wirkung stetig ab, bis nach ca. 8 h die Aldosteronlevel wieder nahezu ihren stimulierten Ausgangswert erreichten. Im Gegensatz dazu blieb der Plasma-Aldosteronspiegel bei den Kontrolltieren, die nur mit der Trägersubstanz (PEG400) behandelt wurden, nahezu konstant.

Während der Versuchsdurchführung konnten keine toxikologischen Effekte der Substanz festgestellt werden. Alle Tiere zeigten ein normales Verhalten und normale Vitalwerte (wie z. B. Herzfrequenz, Bewegung, Körpertemperatur, etc.; Daten nicht gezeigt).

Neben den Plasma-Aldosteronspiegeln wurden auch die Plasmakonzentrationen der Substanz **SL242** bestimmt. Die simultane Messung beider Parameter aus einer Probe

ermöglichte die Erstellung eines pharmakokinetischen/pharmakodynamischen Profils (siehe Abbildung 27).

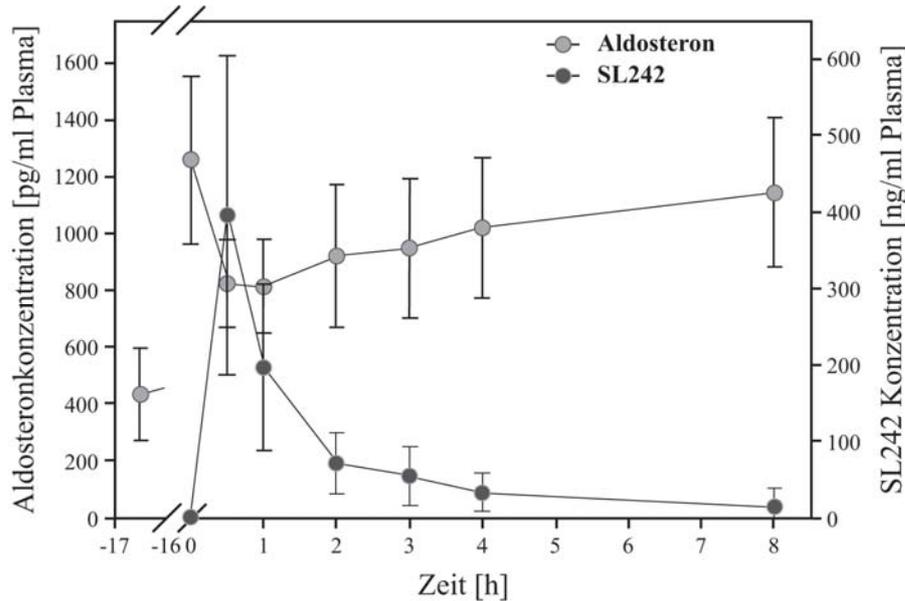


Abbildung 27: PK/PD-Profil: Mittlere Aldosteronkonzentration und Substanzkonzentration im Plasma nach einmaliger peroraler Behandlung mit SL242 in ACTH-stimulierten Ratten

Männliche Wistar-Ratten (n = 6); 16 h vor Applikation der Substanz Stimulation der Aldosteronsynthese mit ACTH (1 mg/kg, s. c.); verwendetes Vehikel: PEG400

Das PK/PD-Profil macht deutlich, dass der Anstieg der Plasmakonzentration der Substanz (Maximum nach etwa 1 h) fast unmittelbar in einer Absenkung des Aldosteronspiegels resultiert. Trotz dem schnellem Abfall der Plasmakonzentration hält der Effekt für mehrere Stunden an. Somit konnte eine aldosteronsenkende Wirkung des Hemmstoffs **SL242** nach einmaliger peroraler Applikation in der Ratte belegt werden.

9.3 Aldosteronsenkende Wirkung im unstimulierten Rattenmodell

Nachdem die aldosteronsenkende Wirkung von **SL242** in *in vivo*-Studien sowohl nach einmaliger peroraler Applikation als auch nach einmaliger intravenöser Applikation in der Ratte nach ACTH-Stimulation gezeigt werden konnte,¹⁵⁸ sollte nun auch die Wirkung der Substanz auf den Aldosteronspiegel in unstimulierten Ratten untersucht werden. Hierzu wurden katheterisierte männliche Wistar-Ratten (n = 6 Tiere pro Gruppe) entweder mit

SL242 (1 mg/kg in PEG400/PBS 1:1, 2 ml/kg) oder ohne Testsubstanz (nur PEG400/PBS 1:1, 2 ml/kg) einmalig intravenös behandelt und die gewonnenen Plasmaproben zur Bestimmung der Aldosteronspiegel mittels RIA eingesetzt.

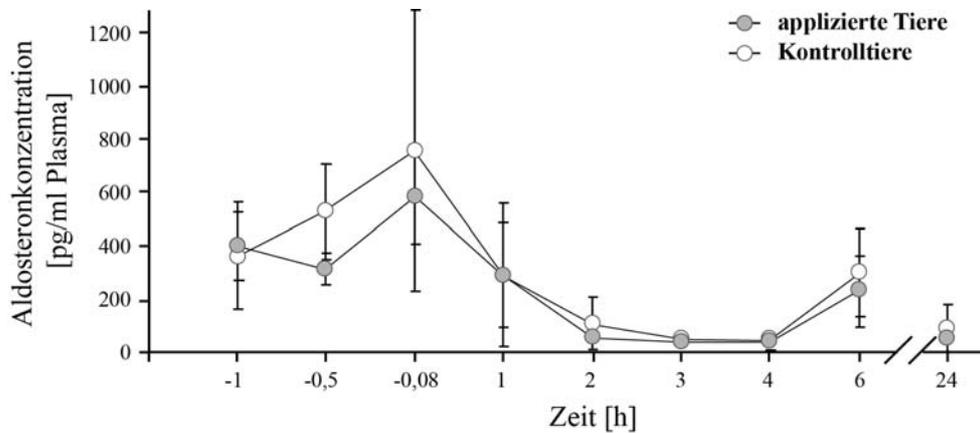


Abbildung 28: Mittlere Aldosteronkonzentration im Plasma nach einmaliger intravenöser Applikation von SL242 (1 mg/kg) in unstimulierten Ratten
Männliche Wistar-Ratten (n = 4); verwendetes Vehikel: PEG400/PBS 1:1

Nach einmaliger i. v. Applikation von **SL242** zeigte sich keine statistisch signifikante Absenkung des Plasma-Aldosteronspiegels. Die Aldosteronspiegel der applizierten Tiere unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen der Kontrolltiere.

9.4 Perorale Applikation über mehrere Tage

In einer weiteren Studie wurden katheterisierte männliche Wistar-Ratten (n = 6 Ratten pro Gruppe) peroral über 5 Tage (einmal täglich) mit dem Vehikel (PEG400, 5 ml/kg) oder mit der Testsubstanz **SL242** (25 mg/kg in PEG400, 5 ml/kg) behandelt. Die Blutentnahmen erfolgten immer eine Stunde vor Applikation, eine Stunde und zwei Stunden nach Applikation über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die Plasmaproben wurden geteilt und zum einen zur Ermittlung der Plasmakonzentrationen der Substanz **SL242** mittels LC-MS/MS-Technologie verwendet. Der andere Teil der Proben wurde zur Messung der Aldosteronspiegel mittels RIA eingesetzt. Während der Studie wurden die Tiere eingehend auf ihr Verhalten und damit Hinweis auf akute Toxizität beobachtet.

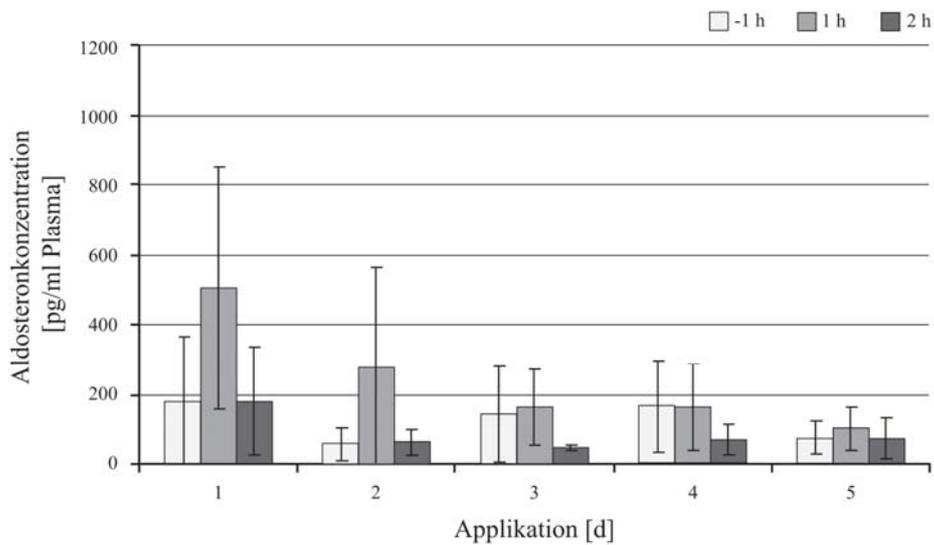


Abbildung 29: Mittlere Aldosteronkonzentration im Plasma der Kontrolltiere peroraler Gabe des Vehikels über einen Zeitraum von fünf Tagen

Männliche Wistar-Ratten (n = 6); verwendetes Vehikel: PEG400; Plasmaproben jeweils eine Stunde vor, eine und zwei Stunden nach der Applikation

Bei den Kontrolltieren zeigte sich an allen Tagen zum Zeitpunkt 1 h nach der peroralen Gabe des Vehikels ein leicht erhöhter Aldosteronspiegel. Dieser Effekt wird allerdings innerhalb der Versuchstage schwächer, so dass am Tag fünf zu allen drei Zeitpunkten ein ähnlich niedriger Aldosteronspiegel vorliegt.

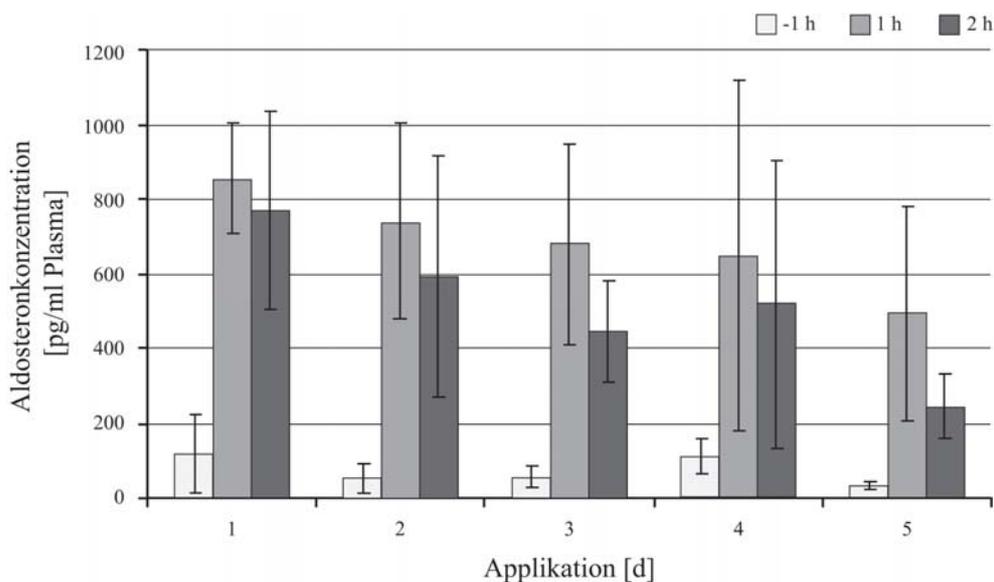


Abbildung 30: Mittlere Aldosteronkonzentration im Plasma der mit SL242 (25 mg/kg) applizierten Tiere nach peroraler Gabe über einen Zeitraum von fünf Tagen

Männliche Wistar-Ratten (n = 6); verwendetes Vehikel: PEG400; Plasmaproben jeweils eine Stunde vor, eine und zwei Stunden nach der Applikation

Bei den applizierten Tieren zeigte sich an allen Tagen zu den Zeitpunkten nach der peroralen Gabe der Substanz ein deutlich erhöhter Aldosteronspiegel (bis zu 8-fach, im Vergleich zum Zeitpunkt 1 h vor Applikation). Dieser Effekt wurde allerdings innerhalb der Versuchstage schwächer, so wie es bereits bei den Kontrolltieren beobachtet werden konnte. Am Tag fünf war der Effekt des erhöhten Aldosteronspiegels 1 h nach Applikation nur noch etwa halb so hoch und 2 h nach Applikation sogar nur noch etwa 1/3 der Aldosteronspiegel an Tag 1.

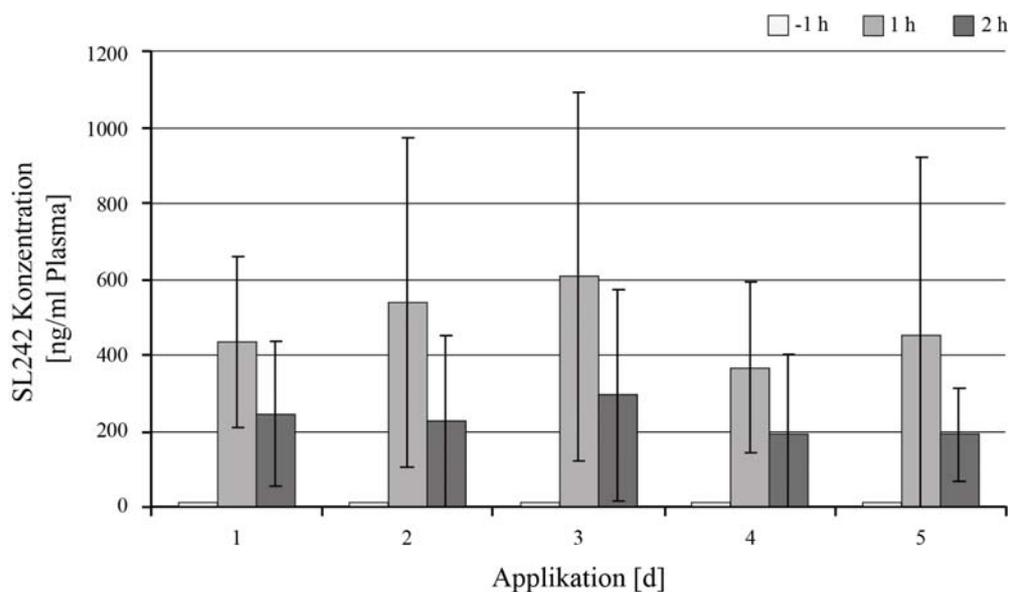


Abbildung 31: Mittlere Plasmakonzentration von SL242, nach peroraler Gabe (25 mg/kg) über einen Zeitraum von fünf Tagen

Männliche Wistar-Ratten (n = 6); verwendetes Vehikel: PEG400; Plasmaproben jeweils eine Stunde vor, eine und zwei Stunden nach der Applikation

Die tägliche perorale Applikation von **SL242** (25 mg/kg) über fünf Tage bewirkt keine Akkumulation der Substanz-Plasmakonzentrationen. Am Tag fünf sind nur sehr geringe und damit vernachlässigbare Konzentrationen 1 h vor der Applikation zu detektieren, so dass auch für einen längeren Applikationszeitraum bei dieser Dosis eine Akkumulation unwahrscheinlich ist.

Die Tiere zeigten während der fünf Tage ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Einzelne Tiere wiesen einen etwas weicheren Stuhlgang auf, was auf das abführend wirkende Vehikel (PEG400) zurückzuführen ist.

IV Diskussion

1 Wirkstoffentwicklung

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Arzneimittelentwicklung ist immer noch ein großer Anteil aller bekannten Krankheiten nicht oder nur unzureichend mit Medikamenten therapierbar. Dies macht die Notwendigkeit intensiver Forschungen, vor allem in der Pharmazie, deutlich. Doch leider ist es von der Target-Identifizierung bis zur Marktzulassung ein weiter Weg. Eine Substanz, die einmal als Wirkstoff in einem Medikament eingesetzt werden soll, durchläuft dabei verschiedene Phasen. Dies hat zur Folge, dass es bis zur Zulassung bisweilen 15 Jahre dauern und bis zu eineinhalb Milliarden Euro kosten kann.¹⁶³ Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente stellt dabei ein Target, also eine mit einer Krankheit in Zusammenhang gebrachte Zielstruktur im Körper dar. Dies kann z. B. ein Enzym sein. Ist ein Target identifiziert, müssen möglichst viele Informationen darüber zusammengetragen werden. Daran schließt sich die Etablierung biologischer Testsysteme an, mit der möglichst viele chemische Moleküle hinsichtlich einer Interaktion, wie z. B. einer hemmenden Wirkung, untersucht werden können. In einem Screening-Prozess beginnt dann die Suche nach potentiellen Wirkstoffkandidaten. Sogenannte Hit-Substanzen, also diejenigen, die die beabsichtigte Wirkung am Target zeigen, werden über verschiedene chemische Modifikationen weiter zu Leitstrukturen entwickelt.¹⁶⁴ Diese müssen z. B. neben der hohen Hemmwirkung am Targetenzym noch weitere Eigenschaften aufweisen. Dazu gehört neben der Selektivität gegenüber anderen, dem Target sehr ähnlichen Strukturen, auch ein gutes pharmakokinetisches Profil. Der Prozess der Lead-Optimierung geht mit der präklinischen Phase einher, in der der potentielle Wirkstoff in immer komplexeren Systemen, sowohl chemisch als auch biologisch weiter charakterisiert und strukturell verbessert wird.¹⁶⁵ Die Ziele bei dieser Verbesserung können unter anderem eine gesteigerte Potenz gegenüber dem Target, eine gesteigerte Selektivität, aber auch eine bessere Bioverfügbarkeit oder verminderte toxische und unerwünschte Nebenwirkungen sein. Dabei geht der Weg von einfachen zu immer komplizierteren Testmodellen, z. B. von zellfreien, über zelluläre *in vitro*-Systemen bis hin zu Organkulturen. Der Prozess endet schließlich mit Tierversuchen in verschiedenen Spezies, mit denen letztlich das *Proof of Concept* erbracht werden muss. Hat sich eine Substanz bei

all diesen Tests als wirksam und unbedenklich erwiesen, folgt die klinische Phase, welche ebenfalls weiter unterteilt ist (Phasen I – III). Hier wird in immer aufwendigeren Studien am Menschen auf Anwendbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit, auch im Vergleich zu einem Placebo, getestet. Erst wenn alle diese Hürden genommen sind, kann die Zulassung auf dem Markt erfolgen. Die Erfahrung zeigt, dass von über 10.000 neu synthetisierten Substanzen im Durchschnitt knapp fünf in Phase-I-Studien am Menschen erprobt werden und nur eine als Medikament die Marktreife erreicht.¹⁶⁶

2 Entwicklung von Aldosteronsynthese-Inhibitoren

Das Steroidhormon Aldosteron ist als Hauptmineralocorticoid maßgeblich an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes beteiligt. Kommt es z. B. durch einen erhöhten Blutverlust zu einem Blutdruckabfall und damit verbunden zu einer Minderperfusion der Niere, wird die Aldosteronsekretion unter Kontrolle des RAAS kurzfristig erhöht. Durch die aldosteronvermittelte erhöhte Wasser- und NaCl-Retention in der Niere bei gleichzeitig vermehrter Ausscheidung von Kalium und Protonen kommt es zur Erhöhung des Blutvolumens. Durch weitere mit der Aktivierung des RAAS einhergehende Mechanismen kann so der Blutdruck aufrechterhalten und eine ausreichende Organdurchblutung sichergestellt werden.

Neben diesen physiologischen Wirkungen ist eine erhöhte Aldosteronsekretion auch mit diversen Erkrankungen assoziiert. So können beispielsweise bei Patienten mit Bluthochdruck,¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Herzinsuffizienz,⁹² Insulinresistenz¹⁷⁰ oder Myokard-Fibrose^{56, 123} chronisch erhöhte Aldosteronspiegel nachgewiesen werden.^{84, 85, 92} Auch bei Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus sind erhöhte Aldosteronspiegel für Komplikationen des kardiovaskulären^{171, 172} und renalen Systems¹⁷³⁻¹⁷⁵ verantwortlich. In klinischen Studien an Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder bei bestehender Herzinsuffizienz konnte bewiesen werden, dass durch die Blockierung der Aldosteronwirkung mit Hilfe von MR-Antagonisten die fibrotischen Strukturveränderungen günstig beeinflusst werden können.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Jedoch ist die Anwendung der MR-Blocker mit diversen, teilweise gravierenden Nebenwirkungen verbunden, die u. a. auf deren steroidale Struktur und die geringe Selektivität gegenüber anderen Steroidrezeptoren zurückzuführen sind.¹⁸⁰

Neben den MR-Blockern stellt auch die Hemmung des Schlüsselenzyms der Aldosteronbiosynthese CYP11B2 eine therapeutische Option dar, um den negativen Effekten erhöhter Aldosteronsekretion entgegenzuwirken. Dabei ist es das Ziel, die Aldosteronkonzentration sowohl im Plasma als auch im Gewebe abzusenken. Gleichzeitig können so auch die MR-vermittelten als auch die MR-unabhängigen Effekte in den Zielorganen vermindert werden. Eine Möglichkeit zur Hemmung der Aldosteronsynthese stellt Fadrozol dar. Dieser unselektive, nicht steroidale Hemmstoff wurde ursprünglich zur Hemmung der Aromatase entwickelt. Fadrozol ist ein racemisches Gemisch von zwei Enantiomeren, wobei das *R*-Enantiomer **FAD286A** die Aldosteronsynthese stärker hemmt als das racemische Gemisch.¹³⁷ Fadrozol und sein *R*-Enantiomer wurden sowohl *in vitro* meist an zellulären Systemen,^{59, 150, 151} als auch *in vivo* an unterschiedlichen, meist Ratten-Modellen charakterisiert.^{59, 128, 139, 181} Dabei konnte der positive Effekt der CYP11B2-Hemmung, z. B. auf Endorganschäden oder fibrotische Veränderungen des Herzens weitgehend belegt werden. Erst kürzlich wurde **LCI699**, eine peroral verfügbare Substanz in präklinischen Studien auch am Menschen eingesetzt. Mit Hilfe dieser Substanz, deren Struktur ähnlich der des **FAD286A** ist, ist es erstmals gelungen, den Plasma- und den Urin-Aldosteronspiegel von gesunden männlichen Probanden unter einer natriumarmen Diät dosisabhängig um bis zu 80 % zu senken.¹⁸² In einer weiteren *Proof of Concept*-Studie an Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus konnte die Substanz ebenfalls eine Senkung des Plasma- und Urin-Aldosteronspiegels um bis zu 80 % bewirken.¹⁴² Gleichzeitig kam es zu einer dosisabhängigen Akkumulation von Deoxycorticosteron (> 700 %) im Plasma, was die Hemmung von CYP11B2 weiter bestätigt. Dieser Effekt ging mit einer schnellen Verbesserung der vorher vorhandenen Hyperkaliämie und einer mäßigen Blutdrucksenkung einher. Darüber hinaus konnte in einer achtwöchigen Studie mit hypertensiven Patienten bei einer täglichen Dosis von 1 mg eine gute Absenkung des Blutdruckes verzeichnet werden.¹⁸³ Allerdings wird der Einsatz der Substanz **LCI699** in höheren Dosen durch ihre gleichzeitige Wirkung auf die Glucocorticoid-Achse limitiert. Bei Verabreichung von 0,5 – 1 mg zweimal am Tag konnten dosisabhängige Erhöhungen sowohl des Plasma-ACTH als auch von 11-Deoxycortisol festgestellt werden, woraufhin die Studie 2010 eingestellt wurde. Dessen ungeachtet stellt die Hemmung der Aldosteronsynthese eine innovative und vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung aldosteronabhängiger Erkrankungen dar. Diese könnten die zurzeit verfügbaren Therapien in naher Zukunft entweder vollständig ersetzen, oder doch zumindest entscheidend verbessern. Die Nebenwirkungen der Substanz **LCI699** auf die Cortisolbiosynthese machen dabei noch einmal deutlich, dass eine

ausreichende Selektivität, vor allem gegenüber CYP11B1 bei der Entwicklung von hoch aktiven CYP11B2-Inhibitoren essentiell ist.¹⁴³

Diese Strategie der Aldosteronsynthese-Hemmung wird bereits seit 1994 von unserer Arbeitsgruppe propagiert.^{131, 133} Dabei wird die Entwicklung nichtsteroidaler Inhibitoren hinsichtlich potentieller Nebenwirkungen bevorzugt. Da bis zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine Röntgenstruktur der Aldosteronsynthese vorlag, erfolgte die Entwicklung der Inhibitoren nach einem rationalen Drugdesign-Konzept. Durch die Modifizierung von Leitstrukturen konnte eine Vielzahl neuer Substanzklassen von aktiven und gleichzeitig selektiven CYP11B2-Inhibitoren entwickelt werden.^{146-149, 184-186} Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zur Evaluierung der biologische Aktivität als auch Selektivität von Aldosteronsynthese-Inhibitoren, bestehende Testsysteme optimiert und neue Assays entwickelt werden.

3 Miniaturisierung der V79MZ Screeningassays

Bei der Entwicklung von Aldosteronsynthese-Inhibitoren sind zur Abschätzung von Aktivität und Selektivität geeignete Testsysteme notwendig. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollten hierfür vor allem *in vitro*-Systeme vorhanden sein, mit denen am eigentlichen Target, dem humanen CYP11B2 getestet werden kann. Zur Identifizierung und Bewertung von Inhibitoren der Aldosteronsynthese wurden im Arbeitskreis Prof. Hartmann bisher stabil transfizierte Zellen verwendet (V79MZ*h*11B1 und V79MZ*h*11B2), die zur Expression von aktivem humanem CYP11B2 (V79MZ*h*11B2) bzw. CYP11B1 (V79MZ*h*11B1) befähigt sind. Die Zelllinie V79MZ wurde hinsichtlich ihrer endogenen Enzymausstattung eingehend charakterisiert.¹⁸⁷ Die Zellen besitzen keine eigene messbare Cytochrom P450-Aktivität. Diese Screeningassays werden in Form von Ganzzell-Assays mit Hilfe von radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt. Zelluläre Assays bieten den Vorteil, dass Testsubstanzen nicht nur auf ihre Aktivität am Target sondern auch gleichzeitig auf weitere wichtige Wirkstoffeigenschaften vorselektiert werden, wie z. B. Membrangängigkeit und Zelltoxizität. Eine Limitierung dieses Testsystems stellt allerdings ihre Durchführung im 24-Well-Format dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die von Ursula Müller-Vieira entwickelten Assays zum Erreichen eines höheren Substanzdurchsatzes weiter optimiert und miniaturisiert.¹⁵⁰ Dazu mussten die eingesetzte

Zellzahl, das Testvolumen und die Inkubationszeit angepasst werden. Die Miniaturisierung erlaubte eine erhebliche Beschleunigung des Verfahrens durch die simultane Bestimmung von IC_{50} -Werten von bis zu 14 Inhibitoren pro 96-Well-Platte. Bisher war nur die Testung von drei Inhibitoren pro Platte (24-Well) möglich. Die Screeningassays eigneten sich nach den oben beschriebenen Modifikationen zur Testung potentieller CYP11B2-Inhibitoren mit größerem Durchsatz an Verbindungen. Die vergleichenden Ergebnisse der neu entwickelten Assays mit Daten aus dem zuvor verwendeten 24-Well-Format korrelierten sehr gut miteinander, so dass der Test für die Routinetestung geeignet ist. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten konnte so die Voraussetzung geschaffen werden, den Test auch in einen automatisierten Arbeitsprozess (Durchführung von Arbeitsschritten durch einen Pipettierroboter) zu integrieren. Darüber hinaus könnte auch eine entsprechende Miniaturisierung der von Christina Zimmer etablierten Assays erfolgen,¹⁵⁸ mit deren Hilfe auf Aktivität bzw. Selektivität gegenüber der Aldosteronsynthese der Ratte getestet werden kann. Auch hier werden V79MZ-Zellen verwendet, die das entsprechende Enzym stabil exprimieren. So könnte auch hier der Substanzdurchsatz merklich gesteigert werden.

4 Entwicklung von zellfreien Assays

Eine weitere Möglichkeit, den Durchsatz an zu testenden Verbindungen zu erhöhen, stellt die Verwendung von zellfreien Assayformaten dar. Das Ziel bei der Assayentwicklung besteht darin, ein einfaches und vor allem zeitsparendes Verfahren zu entwickeln, mit dem neu synthetisierte Verbindungen vorab getestet werden sollen, um eine Vorauswahl an Inhibitoren zu treffen, welche danach das weitere Screening-Verfahren durchlaufen. Im Vergleich zu Ganzzell-Assays kann die zeitaufwendige Kultivierung der Zellen entfallen. Zwar ist so die gleichzeitige Evaluierung der Membrangängigkeit einer Substanz nicht möglich. Allerdings bietet die Verwendung von Enzympräparationen zur Aktivitätsbestimmung die Möglichkeit, schärfere Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten, welche in das weitere Design der Inhibitoren eingehen können. Es besteht nicht die Gefahr, dass hoch aktive Substanzen aufgrund eines schlechten Vermögens die Zellmembran zu passieren vermeintlich schlechte Hemmwerte liefern und so im ersten Screening schon aussortiert werden.

Um die Enzyme Aldosteronsynthase bzw. Steroid-11 β -Hydroxylase zu isolieren, wurden die bereits im Screening-Verfahren eingesetzten Zellen (*hCYP11B1V79MZ* bzw. *hCYP11B1V79MZ*) zur Homogenatherstellung verwendet. Dazu mussten verschiedene Parameter, wie Zellzahl, Zellaufschlussmethode und einzusetzende Homogenatmenge evaluiert und optimiert werden. Da es sich bei den CYP-Enzymen um membrangebundene Enzyme handelt, wurde auch die Fraktionierung der Mitochondrien bzw. der Membran nach dem Zellaufschluss in Betracht gezogen, um die Aktivität des hergestellten Homogenates weiter zu erhöhen. Da sich allerdings in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich damit keine höheren Umsätze als mit dem nicht aufgearbeiteten Homogenat erzielen ließen, wurde von einer Aufarbeitung der Fraktionen abgesehen. Ebenso wie bei den zellulären Assays,¹⁵⁰ zeigte auch hier CYP11B1 eine höhere Aktivität als CYP11B2. Dies konnte durch eine höhere Anzahl an eingesetzten Zellen zur Homogenatherstellung, größeren Homogenatmengen und einer etwas längeren Inkubationszeit kompensiert werden. Bei der Aufnahme der Umsatz-Zeit-Kurven (siehe Abb. 12) fiel auf, dass es hier im Gegensatz zu den ganzen Zellen (Abb. 9) schon nach einer Inkubationsdauer von 120 min zu einem Abflachen der Kurve kam. D. h. schon bei etwa 30 % Substratumsatz kam die Reaktion zum Erliegen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte es sein, dass die eingesetzte Menge an regenerierendem System nicht in der Lage war, eine ausreichende Menge an NADPH zum Elektronentransport am Enzym sicherzustellen. Eine weitere Erklärung könnte Aktivitätsverlust der zu testenden Enzyme selbst gewesen sein, z. B. vermittelt durch proteinabbauende Enzyme. Da jedoch schon bei etwa 90 min mit etwa 20 % ein ausreichender Substratumsatz erreicht wurde, konnte auf weitere Untersuchung der möglichen Ursachen für die Abnahme der Enzymaktivität verzichtet werden. Die ermittelten Parameter zur Durchführung der zellfreien Assays wurden durch die Testung von verschiedenen Inhibitoren des Arbeitskreises validiert. Es zeigte sich, dass die Hemmdaten im Vergleich zu denen mit dem zellulären Assay ermittelten Daten bis auf wenige Ausnahmen sehr gut korrelierten. Die Substanzen **RHC213**, **DA019** und **CV50** zeigten in den zellfreien Assays eine sehr viel höhere Aktivität (CYP11B2: **RHC213** 16 % vs. 70 %; CYP11B1: **DA019** 1 % vs. 28 %; **CV50** 49 % vs. 76 %), verglichen mit den Daten aus den entsprechenden zellulären Assays. Diese Abweichungen zwischen Hemmdaten in zellfreien und zellulären Assays können mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, dass die Hemmstoffe nur bedingt in der Lage sind, die Zellmembran zu überwinden. Dabei spielt die Molekülgröße eine entscheidende Rolle. In der Lipinski's Rule of Five ist dafür ein Grenzwert von 500 Da vorgegeben.¹⁸⁸ Da die Hemmstoffe allerdings Molekulargewichte

zwischen etwa 200 und 300 Da aufweisen, sollte dies nicht die Ursache sein. Neben dem Molekulargewicht spielt auch die Lipophilie eine Rolle. Ein Maß für die Lipophilie einer Substanz ist ihr logP-Wert. Dieser wird abgeleitet von dem Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen Wasser und organischen Lösemitteln, wie z. B. n-Octanol. Um die Zellmembran durch passive Diffusion überwinden zu können, sollte ein logP-Wert von 5 nicht überschritten werden, was bei den betrachteten Substanzen (logP Werte von 1,78 bis 3,87) auch nicht der Fall ist. Neben diesen genannten, die Eigenschaften der Substanzen betreffenden Ursachen, könnten auch die Zellen selbst einen Einfluss auf die Hemmdaten haben. Durch sogenannte Effluxpumpen, wie z. B. der Pgp-Transporter, können Substanzen die in die Zelle gelangt sind, wieder nach außen transportiert werden. Da bei V79MZ-Zellen die Expression von pgp 1 nachgewiesen wurde,¹⁸⁹ könnte dies eventuell eine Rolle bei den unterschiedlichen Hemmdaten zwischen zellulärem und zellfreiem Assay gespielt haben.

Durch die Validierung mit verschiedenen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine zuverlässige Identifikation von Hemmstoffen mit Hilfe des zellfreien Screeningassays möglich ist. Dies belegt auch der Vergleich der ermittelten Hemmdaten für **FAD286A** mit den von La Sala *et al.* ermittelten Ergebnissen (siehe Tabellen 3 und 4).¹⁵¹ Die Hemmdaten stimmen sehr gut überein, obwohl sich das von La Sala *et al.* etablierte Testsystem in diversen Punkten stark unterscheidet. So werden hier beispielsweise Zellen zur Herstellung des Homogenates verwendet, die zusätzlich zu dem jeweiligen CYP-Enzym noch Adrenodoxin und Adrenodoxinreduktase coexprimieren.

Auch die Anwendung des zellfreien *hCYP11B1*-Assays zur Ermittlung der Selektivität der Inhibitoren ist für ein erstes, schnelles Screening geeignet. Die Assays sind einfach durchzuführen und liefern reproduzierbare Ergebnisse. Mithilfe dieser Verfahren können ungeeignete Substanzen ausselektiert werden, bevor sie in den Screeningprozess gelangen und somit Zeit und Ressourcen gespart werden. Darüber hinaus können die zellfreien Assays leicht an ein HTS adaptiert werden. Im Screeningsystem könnten dann im Anschluss an die beiden zellfreien Assays als weiterführende Untersuchungen die zellulären Assays eingesetzt werden.

5 HTRF[®] als neue Detektionsmethode

HTRF[®] ist eine äußerst empfindliche und reproduzierbare Technologie, um verschiedenste Analyten in einem homogenen Assayformat nachzuweisen. Die HTRF[®]-Methode an sich findet mittlerweile eine breite Anwendung in Drug-Discovery-Prozessen.¹⁹⁰ Die Anwendung reicht hier von antikörperbasierten Assays bis hin zu Assays für Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen. Dabei wird immer ein Signal durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptor-Molekül generiert, wenn sich diese in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Ein großer Vorteil besteht dabei in der zeitversetzten Messung der Emission. So kann eine Überlagerung des Fluorophors durch eine womöglich vorliegende Eigenfluoreszenz der getesteten Substanz ausgeschlossen werden. Darüber hinaus können Well-zu-Well-Schwankungen (geringfügig unterschiedliche Mengen an Verbindungen und/oder Additiven), verursacht durch Pipettierfehler oder Ungenauigkeiten ausgeglichen werden. Da bei der HTRF[®]-Technik zwei verschiedenen Emissionswellenlängen gemessen werden (sowohl die Fluoreszenz des Donors- als auch des Akzeptormoleküls werden bestimmt), können diese Well-zu-Well-Schwankung ausgeglichen werden. Dabei dient die Fluoreszenz des Donors als interne Kontrolle. Die Fluoreszenz des Akzeptors stellt den eigentlichen Messwert dar. Da Unterschiede in den einzelnen Kavitäten der Platte durch Pipettierfehler oder aber auch mögliche Störsubstanzen die Emissionsmessung von Donor und Akzeptor in gleichem Masse betreffen, bleibt das Verhältnis der Messwerte unverändert. Zudem können durch das homogene Prinzip des Tests zeitaufwendige Reinigungs- und Waschschriffe umgangen werden, was eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber den herkömmlichen Tests bietet.¹⁹⁰ Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HTRF[®]-Assays wurden zur Quantifizierung von Aldosteron bzw. Cortisol eingesetzt. Dadurch konnten die bisher verwendeten Methoden mit radioaktiv markiertem Substrat bei den zellulären und zellfreien Screeningassays nach dem Einsatz der entsprechenden Menge an nativem Substrat ersetzt werden. Dazu musste zunächst die Intraassay- als auch die Interassay-Präzision untersucht werden. Durch die erhaltenen Variationskoeffizienten zwischen 6 und 14 konnte die Funktionalität des Assays mit den verwendeten Materialien und der Durchführung mit dem Liquid-Handling-System bestätigt werden. Die in verschiedenen Schritten durchgeführten Assays lieferten sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Auch die Untersuchung der Toleranz der HTRF[®]-Technologie gegenüber definierten Konzentrationen verschiedener Chemikalien, die durch die

Durchführung der zellfreien und zellulären Assays im Versuchsansatz vorhanden sind, zeigte, dass diese keinen Einfluss auf die Fluoreszenzmessung an sich hatten.

Ein weiterer Schritt der Etablierung bestand in der Untersuchung von RSS als Substrat, welches das radioaktiv markierte DOC in den Screeningassays mit *hCYP11B1* ersetzen sollte. Dies war notwendig, da mit dem HTRF[®]-Assay nur eine Quantifizierung von Cortisol möglich war. Ein entsprechendes Kit zur Quantifizierung von Corticosteron, welches bei der Umsetzung von DOC durch CYP11B1 entsteht, ist bisher noch nicht kommerziell erhältlich. Durch den Vergleich der beiden Umsatz-Zeit-Kurven von *hCYP11B1* mit DOC bzw. RSS als Substrat zeigte sich, dass mit RSS zu fast jedem Zeitpunkt einen geringfügig höheren Umsatz (bis zu 9 %) vorlag. Doch der zeitliche Verlauf der beiden Kurven war nahezu identisch. Bei der Erstellung der beiden Zeit-Umsatz-Kurven wurde nicht mit exakt den gleichen Passagen gearbeitet. Als Folge des Alterungsprozesses könnten auch Zellveränderungen auftreten, die Auswirkungen auf die Aktivität der Zellen haben, was zu den geringen Unterschieden im Substratumsatz geführt haben könnte.

Somit konnte bestätigt werden, dass CYP11B1 als Substrat neben RSS auch DOC mit gleicher Affinität umsetzen kann, was auch schon von Denner *et al.* gezeigt wurde.¹⁴⁴ Die Validierung der HTRF[®]-Methode mit RSS als Substrat erfolgte durch die Testung verschiedener Hemmstoffe. Die dadurch gewonnenen Daten wurden mit den Hemmwerten aus Tests, die mit der radioaktiven Methode (radioaktives DOC) ermittelt wurden, verglichen. Die Ergebnisse aus den beiden verschiedenen Tests korrelierten sehr gut miteinander (Korrelationskoeffizient = 0,8). Lediglich bei zwei der getesteten Verbindungen (**BT081** und **TG011A1**), wichen die ermittelten Werte für die prozentuale Hemmung stark voneinander ab (59 % zu 27 % und 20 % zu 65 %). Vergleicht man die IC₅₀-Werten der getesteten Verbindungen, so ergibt sich ebenfalls eine gute Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,9). Damit konnte bewiesen werden, dass zum einen RSS als Substrat anstelle von DOC in den Assays verwendet werden kann. Zum anderen konnte so auch gezeigt werden, dass die neu etablierte HTRF[®]-Methode zuverlässige Ergebnisse liefert. Zur abschließenden Validierung der neuen Technologie wurden ebenfalls die mit den beiden verschiedenen Methoden (HTRF[®] und radioaktiv markiertes DOC) erhaltenen Ergebnisse des *hCYP11B2*-Assays verglichen. Auch hier korrelierten die Ergebnisse der prozentualen Hemmwerte und der ermittelten IC₅₀-Werte sehr gut miteinander (Korrelationskoeffizient %-Hemmung: 0,7, IC₅₀: 0,9). Dies war insofern interessant, da bei *hCYP11B2*-Tests mit radioaktiv markiertem Substrat zur Auswertung der Umsetzung von DOC durch die Aldosteronsynthase alle drei entstehenden Produkte (Corticosteron, 18-OH-

Corticosteron und Aldosteron) bei der Berechnung der Hemmwerte mit berücksichtigt werden. Dabei ist der Anteil an gebildetem Aldosteron, auch bei den ungehemmten Kontrollen, immer sehr gering (< 4 %). Dies ist mit der neuen HTRF[®]-Methode nicht mehr möglich. Hier wird nur das entstehende Aldosteron quantifiziert. Die bisherigen Ergebnisse zeigen also, dass die getesteten Inhibitoren von *hCYP11B2* alle drei Oxidationsreaktionen in gleichem Maße hemmen.

Zum Abschluss der Validierung der neuen HTRF[®]-Detektionsmethoden, sollten diese ebenfalls bei den im Rahmen dieser Arbeit bereits etablierten zellfreien Assays angewendet werden. Dazu musste zunächst ein geeignetes Reagenz gefunden werden, mit dem die Enzymreaktion nach der vorgegebenen Inkubationsdauer effektiv abgestoppt werden konnten. Dabei war es wichtig, dass dieses in der eingesetzten Konzentration die Fluoreszenzmessung nicht stört. Darüber hinaus sollte eine zu große Verdünnung der zu bestimmenden Steroide (Aldosteron oder Cortisol) durch die Zugabe des Stoppreagenzes vermieden werden, um eine Unterschreitung der Detektionsgrenze der HTRF[®]-Assays zu vermeiden. Acetonitril (20 % v/v) erfüllte alle diese Bedingungen. Die Kombination aus neuer Detektionsmethode und zellfreiem Assay sollte vor der Routinetestung noch einmal an ausgewählten Inhibitoren validiert werden.

Damit waren alle Voraussetzungen zur Durchführung im HTS geschaffen und somit die Möglichkeit, eine hohe Anzahl an Verbindungen zur Identifizierung neuer Drug-Kandidaten, z. B. aus Substanzbibliotheken zu testen. Durch die Kombination aus zellfreiem Assaysystem, HTRF[®]-Technik, einem Pipettierroboter, der das präzise Pipettieren kleinster Mengen gewährleistet, und einer automatisierten Datenanalyse, werden korrekte Ergebnisse schnell lieferbar.

6 Stabilitätsuntersuchungen

Neben der Aktivität am Targetenzym muss ein Wirkstoff auch über eine ausreichende Selektivität gegenüber anderen Enzymen aufweisen. Darüber hinaus spielen auch seine Eigenschaften bezüglich Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität (ADMET-Parameter) eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung des Phase-I-Metabolismus der beiden Leitsubstanzen **SL242** und **SL272** wurden daher im Rahmen dieser

Arbeit Stabilitätsuntersuchungen mit Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies durchgeführt. Diese Mikrosomenfraktionen weisen zahlreiche membranständige Monooxygenasen der CYP450 Familie auf, die die meisten Phase-I-Reaktionen, wie z. B. Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, zur Einführung von polaren Gruppen katalysieren. Beide Verbindungen zeigten bei den Inkubationen mit den Mikrosomen der Ratte CL_{int} -Werte, die zwischen den Werten der beiden Referenzsubstanzen für high bzw. low Clearance lag. Somit sollten diese bei *in vivo*-Versuchen mit der Ratte eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen. Auch bei allen anderen Spezies lagen die berechneten Werte für CL_{int} beider Verbindungen im guten mittleren Bereich (zwischen 17 und 119 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein). Damit konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen **SL242** und **SL272** eine ausreichende Stabilität gegenüber Enzymen des Phase-I-Metabolismus aufweisen. Lässt man weitere, die Bioverfügbarkeit *in vivo* beeinflussenden Faktoren außen vor, sollten die Substanzen bei *in vivo*-Studien mit diesen Spezies eine Bioverfügbarkeit im akzeptablen Bereich aufweisen. Auch die Umsetzung mit humanen Lebermikrosomen liegt in einem Bereich, der dem für bereits auf dem Markt befindlichen Arzneimitteln entspricht. Die CL_{int} kann jedoch nur bedingt auf die *in vivo*-Situation übertragen werden und dient als erste Abschätzung, da hier sowohl die Adsorption der Substanz an die Bestandteile des Blutes nicht mit berücksichtigt wird, als auch die Tatsache, dass durch den Fluss des Blutes kein statisches System vorliegt.¹⁵³

Der Phase-I- schließt sich ein Phase-II-Metabolismus an, währenddessen die Verbindungen in einer Konjugationsreaktion mittels Transferasen an endogene Moleküle, wie z. B. Glucuronsäure, Glutathion oder Acetylgruppen gekoppelt werden, um anschließend eliminiert zu werden. Dieser Phase-II-Metabolismus kann mit Lebermikrosomen nicht vollständig untersucht werden. Deshalb sollten zur Untersuchung des Phase-II-Metabolismus der Verbindungen weiterführende Studien durchgeführt werden, z. B. mit aus Lebergewebe gewonnenen Hepatocyten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die mit den Lebermikrosomen der verschiedenen Spezies entstehenden Metaboliten untersucht. Dazu diente ein ähnlicher Versuchsansatz, der bereits zur Bestimmung der metabolischen Stabilität verwendet wurde. Um eine ausreichende Metabolisierung der beiden Inhibitoren **SL242** und **SL272** zu gewährleisten, wurden höhere Protein- und Substanzkonzentrationen über einen längeren Inkubationszeitraum eingesetzt. Die oxidativen Umsetzungen erfolgten in Anwesenheit von NADPH. CYPs übertragen ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf ihre Substrate. In Folge dessen sind bei der Metabolisierung Hydroxylierungsreaktionen

vorherrschend. Darüber hinaus können auch Folgereaktionen wie Desalkylierungen stattfinden. Die Daten beider Verbindungen zeigen, dass bei der Metabolisierung hauptsächlich Oxidation/Hydroxylierung auftritt und dass bei der Substanz **SL272** in allen getesteten Spezies jeweils die gleichen Hauptmetabolite, wenn auch in geringfügig unterschiedlichen Anteilen, gefunden wurden. Dagegen sind deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil der Substanz **SL242** zu sehen. Hier weisen die verschiedenen Mikrosomen teilweise relativ starke Unterschiede in der Produktverteilung der gebildeten oxidativen Metabolite auf. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Expression verschiedener CYPs im Lebergewebe der diversen Spezies erklären.^{155, 191} Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass die Enzymausstattung der Gewebe eine unterschiedliche Spezifität in Bezug auf Hydroxylierungen aufweist. So scheint z. B. das Isoenzym, das für den Metabolit bei der Retentionszeit von 8,96 min verantwortlich ist, beim Menschen und beim Hund nur in sehr geringem Maße exprimiert zu werden. Während die Enzyme in der Rattenleber diesen Metabolit vorherrschend bilden. Insgesamt wurde die Substanz **SL242** im Vergleich zu **SL272** weit weniger metabolisiert. Vor allem mit menschlichen Mikrosomen wurden insgesamt nur etwa 20 % umgesetzt. Auch bei der Untersuchung der metabolischen Stabilität waren die ermittelten CL_{int} -Werte für **SL242** bei Mensch, Hund und Hamster geringer als für **SL272**. Allerdings waren die Unterschiede hier weniger deutlich, so dass für die geringe Metabolisierung noch andere Faktoren verantwortlich sein müssen. Es könnte z. B. durch die eingesetzte Konzentration der Substanz zu einer Substrathemmung gekommen sein. Die bei der Überprüfung der metabolischen Aktivität eingesetzte Menge war nur etwa 1/10 der hier eingesetzten Menge. Darüber hinaus könnte die Substanz in dieser Konzentration auch zur Hemmung diverser CYPs geführt haben. Die CYP-Hemmung von **SL242** wurde bereits mit rekombinant exprimierten humanen Enzymen in mit Baculovirus infizierten Insektenzellen untersucht. Dabei handelte es sich um CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4, welche die größte Rolle bei der Biotransformation von Arzneimitteln einnehmen. Für den Inhibitor **SL242** wurde gegenüber dem Enzym CYP2C9 ein IC_{50} -Wert von 2,86 μ M ermittelt.¹⁸⁵ Bei einer eingesetzten Endkonzentration von 2 μ M könnte die Hemmung des Enzyms CYP2C9 also eine Rolle bei dem niedrigen Umsatz gespielt haben. Bei allen anderen getesteten CYP-Enzymen lagen die IC_{50} -Werte im höheren μ M-Bereich und sollten daher nicht für den niedrigen Umsatz verantwortlich sein. Um die Faktoren, die für die geringe Umsetzung verantwortlich waren, zu untersuchen, sollten weiterführende Studien durchgeführt werden. Unter anderem sollten die Metaboliten mit einer niedrigeren Konzentration an eingesetzter Substanz **SL242** noch einmal betrachtet werden.

Ein direkter Vergleich des Umsatzes bei den verschiedenen Spezies ist nur bedingt möglich, da bei den verschiedenen Ansätzen sowohl mit unterschiedlichen Proteinmengen als auch Substratkonzentrationen gearbeitet wurde. Darüber hinaus waren auch die Inkubationszeiten unterschiedlich gewählt, um eine messbare Metabolisierung bei allen Ansätzen zu gewährleisten. Durch die Untersuchung der Metaboliten aus Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies sind erste Abschätzungen möglich, inwieweit ein übereinstimmendes Metabolisierungsmuster der verschiedenen Spezies vorliegt. Die gebildeten Metabolite können zudem z. B. eine toxische Wirkung haben, womit eine genaue Kenntnis der Metaboliten und ihrer Eigenschaften von großer Relevanz ist.

Weiterhin ist anzumerken, dass es bei der Enzymausstattung auch starke individuelle Unterschiede gibt.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Diesem Aspekt wurde zwar mit der Verwendung von gepoolten Mikrosomen aus mehreren Spendern (z. B. von humane Lebermikrosomen: 50 Spender) Rechnung getragen. Allerdings kann damit nur ein kleiner Ausschnitt an möglichen Polymorphismen abgedeckt werden, so dass dies in weiterführenden Studien untersucht werden müsste.

Da die exakten Positionen der Hydroxylierungen nicht aus den MS/MS-Fragmentierungsspektren abzuleiten sind, könnten die Proben zur genaueren Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass relativ große Probemengen benötigt werden.¹⁹⁵ Eine endgültige Bestätigung solcher Strukturvorschläge zur exakten Bestimmung der Identitäten der Metabolite kann jedoch erst durch eine unabhängige Synthese der möglichen Metaboliten und den Vergleich mit den vorliegenden Messdaten erfolgen.

Einen anderen Ansatz zur genauen Untersuchung von Menge und Struktur der gebildeten Metaboliten und den dafür verantwortlichen Enzymen würden transgene Zelllinien bieten, welche die verschiedenen Isoenzyme der CYP-Enzyme oder Glucuronyltransferasen exprimieren und kommerziell erhältlich sind.

7 Aktivität an Nebennieren verschiedener Spezies, *in vitro*-Modell und Organ-Kulturen

Die Zelllinie H295R wurde aus einem invasiven Nebennierenrindentumor etabliert. Die Zellen besitzen die Fähigkeit sowohl zur Sekretion von Mineralo- als auch von Glucocorticoiden sowie von C19-Steroiden.^{196, 197} Die Zelllinie kann deshalb als *in vitro*-Modell der humanen Nebennierenrinde dienen. Im unstimulierten Zustand sezernieren die Zellen Steroide im qualitativ ähnlichen Umfang wie die intakte Nebennierenrinde. Durch verschiedene Stimulationen, wie z. B. Kaliumionen sezernieren die Zellen durch Differenzierung eher Steroide der Glomerulosa.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Andererseits werden die Zellen durch Stimulation mit Aktivatoren des Proteinkinase A-Weges, wie Forskolin, eher Fasciculata-ähnlich.^{196, 201-203} Die Zellkultur erfolgte in Anlehnung an die bereits von Ursula Müller-Vieira beschriebene Methode. Im Gegensatz dazu wurde hier allerdings auf eine Stimulation der Gluco- und Mineralocorticoidbiosynthese verzichtet, um das natürlicherweise vorliegende Steroidmuster der intakten humanen Nebennierenrinde so gut wie möglich abzubilden.

Die von Ursula-Müller-Vieira beschriebenen IC₅₀-Werte für Fadrozol (CYP11B2: 19,0 nM und CYP11B1: 28 nM) konnten in diesem Test nicht bestätigt werden.¹⁵⁷ Die ermittelten IC₅₀-Werte lagen mit 410 nM für die Hemmung der Aldosteronbildung und 350 nM für die Hemmung der Cortisolbiosynthese weit über den von ihr beschriebenen Werten. Die Reihenfolge der Aktivitäten der CYP11B2-Inhibitoren des Arbeitskreises, die mit dem V79-*h*CYP11B2-Test bestimmt wurden, konnten zwar belegt werden (errechnete IC₅₀-Werte: **SL242** 100 nM < **SL272** 400 nM < **SL125** 500 nM), jedoch waren die Aktivitäten im NCI-Testsystem deutlich niedriger als im *h*CYP11B2V79MZ-Zellassay (IC₅₀-Werte: **SL242** 0,2 nM < **SL272** 1,1 nM < **SL125** 28 nM). Für die Selektivitäten der Testsubstanzen im NCI-Zelltest gegenüber *h*CYP11B1 gilt ähnliches (errechnete IC₅₀-Werte: **SL242** 100 nM; **SL272** 1,2 µM; **SL125** 250 nM). Die im V79-Assay erhaltenen sehr guten Selektivitäten der Testverbindungen konnten im NCI-Zelltest ebenfalls nicht bestätigt werden.¹⁸⁵ Aus der Literatur ist bekannt, dass die Steroidbiosynthese der NCI-H295R-Zelllinie durch verschiedene Stimulanzen (z. B. Forskolin, Ang II, Kaliumionen) stark beeinflusst wird.^{198, 204, 205} Somit können durch verschiedene Assaybedingungen Aktivitäten und Selektivitäten von getesteten Inhibitoren beeinflusst werden. Da der von Ursula Müller-Vieira verwendete Serumersatz im Kulturmedium der H295R-Zellen vom Hersteller nicht mehr lieferbar war,

musste auf einen alternativen Serumersatz zurückgegriffen werden. Da in der Literatur beschrieben ist, dass auch die verwendeten Kulturbedingungen, wie z. B. der verwendete Serumzusatz im Zellkulturmedium die Steroidbiosynthese der Zellen beeinflussen, könnte darin ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen IC_{50} -Werte von Fadrozol liegen.²⁰⁶ Um den Einfluss des Serumersatzes auf die Steroidbiosynthese zu ermitteln, sollten Wachstumskurven aufgenommen und das Steroidmuster im Zellkulturüberstand ermittelt werden. Um die beobachteten Abweichungen in den Hemmwerten weiter aufzuklären sollte darüber hinaus die Cytotoxizität der getesteten Substanzen an den H295R Zellen untersucht werden. Ein möglicher cytotoxischer Effekt könnte ebenfalls zu einer Veränderung der Hemmwerte geführt haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass die H295R-Zelllinie sehr empfindlich gegenüber exogenen Substanzen reagiert, was sich u. a. in einer Änderung der Steroidsynthese bemerkbar macht.²⁰⁷⁻²¹² Darüber hinaus könnten auch weitere Steroide im Zellkulturüberstand quantifiziert werden, um Rückschlüsse auf eine eventuelle Hemmung anderer von der Zelllinie exprimierten Enzyme als CYP11B1 und CYP11B2 ziehen zu können. Die NCI-H295R-Zelllinie spiegelt nicht die natürlichen Bedingungen der adulten humanen Nebennierenrinde wider. Sie können nur als Modell der fetalen Nebennierenrinde angesehen werden,¹⁹⁶ denn hier liegen alle exprimierten Enzyme im gleichen Kompartiment vor, die im adulten adrenalen Cortex natürlicherweise durch die Zonierung voneinander getrennt sind. Somit hat die Beeinflussung nur eines einzigen Enzyms in diesem System große Auswirkung auf die gesamte Biosynthese.¹⁵⁰ Zudem kann ein zu testender Hemmstoff nicht nur an das entsprechende Targetenzym binden, sondern theoretisch an die aktiven Zentren aller in der Zelllinie exprimierten Enzyme. Dies hat zur Folge, dass aus den ermittelten Werten keine diskreten Rückschlüsse auf die Aktivität gegenüber dem betrachteten Targetenzym gezogen werden können. Auf Grundlage der oben aufgeführten Tatsachen, und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann geschlossen werden, dass sich das NCI-H295R-Zellsystem nicht zur zuverlässigen Ermittlung der Aktivitäten und Selektivitäten von Inhibitoren der Steroidbiosynthese eignet, auch wenn andere Arbeitsgruppen zu einem anderen Ergebnis kommen.^{208, 210, 211, 213}

Im Hinblick auf die in der präklinischen Phase der Arzneistoffentwicklung notwendigen Tierversuche ist es notwendig, die Aktivität eines potentiellen Wirkstoffes auch am Targetenzym anderer Spezies zu testen. Dabei wird die Ratte üblicherweise als Modell verwendet, u. a. auch um systemische Einflüsse, toxische Wirkungen und pharmakokinetische Aspekte einer Substanz zu untersuchen. Die am häufigsten verwendete

Spezies für *in vivo*-Versuche ist die Ratte. Um vorab die Aktivität an CYP11B2 der Ratte zu testen, wurde daher von Christina Zimmer im Rahmen ihrer Dissertation ein zellbasierter *in vitro*-Assays etabliert, der eine zuverlässige Vorhersage bezüglich der Ratten-CYP11B2-Hemmung zulässt, um potentielle Kandidaten zur Erbringung des *Proof of Principle* zu identifizieren.¹⁵⁸ Dies war notwendig, da die Proteinsequenz-Identität zwischen humanem und Ratten-Enzym lediglich 69 % beträgt (vgl. I.1.4). Da bei einigen mit diesem Assay getesteten Hemmstoffen eine fehlende CYP11B2-Aktivität in der Ratte festgestellt wurde, sollte die Aktivität auch an anderen Spezies mit Hilfe von Tests an Nebennieren und Nebennieren-Fragmenten ermittelt werden. Dieser einfach und schnell durchzuführende Test ist aufgrund relativ großer Schwankungen zwischen den einzelnen Organen nicht geeignet, um geringe Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Verbindungen zu quantifizieren. Allerdings kann hiermit eine Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen von CYP11B2-Hemmaktivität einer Verbindung in der betrachteten Spezies getroffen werden.

In Anlehnung an bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche an Rattennebenieren,^{159, 214, 215} wurden Tests an Organkulturen durchgeführt, bei welchen die Enzymaktivität von CYP11B2 durch Umsatz eines radioaktiv markierten Substrates in Gegenwart bzw. Abwesenheit eines Inhibitors untersucht wird. Getestet wurde an ganzen Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten von Ratte, Meerschweinchen, Hamster und Kaninchen. Durch Inkubation der beiden Leitverbindungen **SL272** und **SL242** sowie der Referenzverbindung **FAD286A** mit den Nebennieren konnte gezeigt werden, dass **SL272** in den Nebennieren von Hamstern die höchste Hemmwirkung auf die Synthese von Aldosteron zeigte (bei 10 µM: 60 % Hemmung). Die beiden Inhibitoren **SL242** und **FAD286A** zeigten die höchste Aktivität mit den Nebennierenfragmenten des Kaninchens. Dabei war **SL242** bei Konzentrationen von 50 µM in der Lage, die Aldosteronproduktion vollständig zu hemmen. Interessanterweise zeigten durchweg alle drei getesteten Verbindungen eine sehr gute Aktivität gegenüber der Aldosteronsynthese des Kaninchens. Dies lässt sich mit der Aminosäuresequenz-Identität erklären, die hier mit 75 % im Vergleich zur humanen CYP11B2 am höchsten ist. Bis auf eine Ausnahme (**FAD286A**) waren bei den Rattennebenieren die höchsten Substanzkonzentrationen notwendig, um einen hemmenden Effekt zu erzielen. Spezies wie Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen oder auch Hund besitzen wie der Mensch zwei Enzyme für die Corticoidsynthese. Jedoch sind Ratten, Mäuse und Kaninchen aufgrund fehlender 17 α -Hydroxylase-Aktivität in der Nebennierenrinde nicht in der Lage Cortisol zu produzieren. In diesen Nagerspezies stellt Corticosteron das wirksamste Glucocorticoid dar, das in den *Zona fasciculata*-Zellen durch

CYP11B1 aus Deoxycorticosteron gebildet wird.^{68, 72, 216, 217} CYP11B2 der Ratte katalysiert sowohl die 11 β - als auch die Hydroxylierung in Position 18, ist aber nicht fähig zur Hydroxylierung in 19-Position. Die Unterschiede in den katalytischen Funktionalitäten zwischen den CYP11B2-Isoformen der verschiedenen Spezies können teilweise durch Konservierungen von Aminosäuren in entscheidenden Regionen erklärt werden. Vergleicht man beispielsweise die CYP11B2-Sequenzen von Mensch, Ratte, Meerschweinchen und Hamster sieht man, dass einige Aminosäurereste des humanen Enzyms nur im Hamster und teilweise im Meerschweinchen konserviert sind, diese allerdings bei der Ratte stark divergieren.^{216, 217}

Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von Nebennieren zur Versuchsdurchführung, war sowohl die Anzahl an zu testenden Verbindungen, als auch der Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen selbiger sehr beschränkt. Um diese Problematik zu umgehen, könnten Nebennieren-Primärzellkulturen etabliert werden.²¹⁸ So würde auch die Möglichkeit bestehen, spezifisch die Nebennierenzonen von Interesse zu separieren²¹⁹ und mit den so gewonnenen Primärzellen entsprechende Aktivitäts- und auch Selektivitäts-Tests durchzuführen.

8 *In vivo* Testung am Rattenmodell

Als letzter Meilenstein in der präklinischen Phase steht die Charakterisierung von Wirkstoffen im Rahmen von *in vivo*-Studien. Jedoch lassen sich aufgrund von diversen Interspezies-Unterschieden zwischen den Versuchstieren (häufig Nager) und dem Menschen leider weder alle Nebenwirkungen der Testsubstanzen noch die Wirksamkeit der Substanz am Target vollständig aufklären. Dabei spielen verschiedene Faktoren, wie z. B. die Größenunterschiede zwischen Mensch und den Versuchstieren, die Unterschiede im pH-Wert des Darmes oder auch die Wahl des Geschlechtes der Versuchstiere eine erhebliche Rolle in Bezug auf die pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und toxikologischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz. Daher sollten die Ergebnisse aus Tierversuchen kritisch betrachtet werden. Dennoch bieten sie die Möglichkeit, die Wirksamkeit und auch mögliche Risiken abzuschätzen.

Nachdem die aldosteronsenkende Wirkung der Verbindung **SL242** bereits in einem Rattenmodell nach intravenöser Verabreichung bewiesen werden konnte,¹⁵⁸ wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ihre Wirkung nach peroraler Gabe untersucht. Zuvor erfolgte die pharmakokinetische Charakterisierung nach peroraler Gabe mit verschiedenen Vehikeln und in unterschiedlichen Konzentrationen. Um vorab eventuelle Löslichkeitsprobleme bei der maximal einzusetzenden Konzentration des Inhibitors aufzuzeigen (50 mg/kg; 5 ml/kg), wurde die Löslichkeit in verschiedenen Testmedien ermittelt. Diese simulieren die unterschiedlichen Zustände (z. B. pH-Wert, Osmolarität) in den verschiedenen Abschnitten im Verdauungstrakt (z. B. Magen, Dünndarm).^{220, 221} Es konnten keine Löslichkeitsprobleme in den relevanten Konzentrationen aufgezeigt werden. Die beste Löslichkeit war im SGF-Medium zu beobachten, da hier die Substanz aufgrund des niedrigen pH-Wertes (pH 2,0) protoniert vorlag.

Zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit erfolgten sowohl eine intravenöse Gabe der Substanz, als auch die perorale Applikation in verschiedenen Konzentrationen in unterschiedlichen Wirkstoffträgern (PEG400/PBS, PEG und Labrasol/Wasser). Die intravenöse Applikation von **SL242** führte zu einer schnellen Verteilung und einer langsamen Elimination aus dem Körper. Nach peroraler Applikation wurde **SL242** dosisunabhängig innerhalb einer Stunde absorbiert. Die orale Bioverfügbarkeit war bei allen Konzentrationen sehr gut, interessanterweise fiel mit steigender Dosis die Bioverfügbarkeit wieder ab. Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein Ausfallen der Substanz im Magen-Darm-Trakt sein, obwohl dies aus den Vorversuchen nicht ersichtlich war. Dies sollte also in weitergehenden *in vitro*-Testungen verifiziert werden. Das pharmakokinetische Profil nach Applikation in Labrasol/Wasser zeigte einen späteren Konzentrationspeak (2 h) verglichen mit PEG400 als Vehikel. Die maximale Konzentration, die im Plasma erreicht wurde, betrug aber nur ~30 % gegenüber dem PEG400 als Formulierung und die Bioverfügbarkeit war bei Labrasol/Wasser nur halb so hoch, wie nach Einsatz von PEG400. Dies zeigt, dass das pharmakokinetische Profil der **SL242**, wie bei den meisten Wirkstoffen nicht unerheblich von der Trägersubstanz abhängt. Zur weiteren Optimierung des Plasmaprofils und der pharmakokinetischen Eigenschaften des Hemmstoffs sollten detailliertere galenische Studien durchgeführt werden. Um das pharmakokinetische Profil der Substanz weiter zu untersuchen, könnten weiterführende *in vivo*-Testungen, wie Exkretionsstudien und Untersuchungen zur Organverteilung durchgeführt werden.

Nach dem Nachweis der guten oralen Bioverfügbarkeit sollte die aldosteronsenkende Wirkung des Inhibitors **SL242** in einem katheterisierten Rattenmodell gezeigt werden. Für

die Untersuchung erfolgte zunächst eine subkutane Applikation von ACTH, 16 h vor Gabe des Aldosteronsynthese-Inhibitors. Dies führte bei allen Versuchstieren zu einer deutlichen Erhöhung der Corticoidspiegel, im Schnitt auf etwa den 3-fachen Wert im Vergleich zum Basallevel. Diese Erhöhung entsprach in etwa dem Faktor, der bereits bei anderen Versuchen der Arbeitsgruppe im ACTH-stimulierten, katheterisierten Rattenmodell erreicht wurde.¹⁵⁹ Durch diese Erhöhung des Corticoidspiegels wird der zirkadiane Rhythmus dieser Hormone ausgesetzt, was die Beobachtung des Aldosteronspiegels unabhängig von der Tageszeit ermöglicht. Dies führte zu einer konstanten Aldosteronkonzentration im Blut der Kontrolltiere über die Dauer des Experimentes. Nach peroraler Gabe der Verbindung **SL242** in einer Dosis von 25 mg/kg KG konnte bereits nach einer Stunde eine hochsignifikante Absenkung der Plasma-Aldosteronlevel um durchschnittlich 36 % gemessen werden. Durch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuch zur Ermittlung der Wirkung des Inhibitors **SL242** nach peroraler Applikation im Rattenmodell konnten die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Experimentes (Applikation i. v.) bestätigt und das *Proof of Principle* auch nach peroraler Gabe erbracht werden.¹⁵⁸ Die Verbindung wurde gut aufgenommen. Bei einer Übertragung des Rattenmodells auf den Menschen würde das bedeuten, dass die Verbindung nur etwa zweimal täglich verabreicht werden müsste. Darüber hinaus sollte die aldosteronsenkende Wirkung, durch die höhere Aktivität des Inhibitors **SL242** am humanen Enzym im Vergleich zu *r*CYP11B2 im Menschen einen größeren Effekt bei gleichzeitig niedrigerer Dosis bewirken.

Bei der vorherigen *in vivo*-Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Substanz **SL242** in der Lage ist, nach peroraler Applikation in ACTH-stimulierten Tieren den Aldosteronspiegel statistisch signifikant zu senken. Danach wurde in einer weiteren Studie untersucht, ob auch ein unstimuliertes Rattenmodell geeignet ist, den Effekt von Aldosteronsynthese-Hemmern zu zeigen. Auch hier wurden katheterisierte männliche Wistar-Ratten verwendet. Interessanterweise konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Plasma-Aldosteronspiegel zwischen den applizierten und den Kontrolltieren gezeigt werden. Dafür könnten zwei verschiedene Ursachen in Frage kommen. Zum einen könnte die verabreichte Substanzmenge von 1 mg/kg KG (i. v. in PEG400/PBS 1:1) zu gering sein, um einen nachweisbaren Effekt zu erzielen. Ein signifikanter aldosteronsenkender Effekt konnte bereits im ACTH-stimulierten Rattenmodell bei einer Konzentration von 25 mg/kg KG gezeigt werden.¹⁵⁹ Zur näheren Untersuchung der negativen Ergebnisse, sollte der Versuch im unstimulierten Rattenmodell mit der gleichen Konzentration wiederholt werden. Ein weiterer Grund für den ausbleibenden aldosteronsenkenden Effekt könnte auch in der

fehlenden ACTH-Stimulation liegen. Das RAAS der Ratte weist, ebenso wie beim Menschen, einen zirkadianen Rhythmus auf, wobei der Licht-Dunkel-Zyklus der Zeitgeber ist.²²²⁻²²⁴ Über den Tag steigt der Aldosteronspiegel im Plasma sehr langsam an, später schneller, bis er etwa am Anfang der Dunkel-Phase die höchste Konzentration erreicht hat. Danach fällt er wieder ab und ist kurz nach Beginn der Licht-Phase am niedrigsten. Da die Messung der Aldosteronspiegel genau in dieser Licht-Phase erfolgten, waren die gemessenen Plasma-Aldosteronspiegel entsprechend dem zirkadianen Rhythmus sehr niedrig (teilweise < 100 pg/ml Plasma). Somit können weitere Absenkungen nur sehr schwer detektiert werden. Die erhöhten Plasma-Aldosteronwerte am Anfang der Messung (vor Applikation der Substanz) wurden wahrscheinlich durch Stressreaktionen der Tiere hervorgerufen.²²⁵⁻²³⁰ Um die genauen Ursachen zu erforschen, müssten weiterführende Studien durchgeführt werden.

In einer weiteren *in vivo*-Studie, bei der nach täglicher peroraler Gabe der Substanz **SL242** (25 mg/kg) über fünf Tage auch täglich die Plasmakonzentrationen der Substanz ermittelt wurden, konnte gezeigt werden, dass es nach Mehrfach-Dosierungen der Substanz **SL242** nicht zu einer Akkumulation der Serum-Gehalte kommt. Daneben wurden auch die Plasma-Aldosteronspiegel ermittelt. Über den Zeitraum von fünf Tagen war bei beiden Gruppen eine Abnahme der Aldosteronspiegel zu beobachten. Da der Aldosteronspiegel nicht nur durch den Tagesrhythmus sondern auch von Stressfaktoren abhängig ist, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Abnahme des Aldosteronspiegels über den Zeitraum von fünf Tagen auf einen gewissen „Gewöhnungseffekt“ zurückzuführen ist. Entgegen den Erwartungen waren bei den applizierten Tieren die Aldosteronspiegel zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h nach Gabe bis zu dreimal höher als bei den unbehandelten Tieren. Toxische Effekte der Substanz über die Dauer von fünf Tagen konnten nicht festgestellt werden. Da bei einer vorherigen *in vivo*-Studie bereits gezeigt werden konnte, dass die Substanz **SL242** in der Lage ist nach peroraler Applikation bei einer Dosis von 25 mg/kg in ACTH-stimulierten Tieren den Aldosteronspiegel statistisch signifikant zu senken, muss davon ausgegangen werden, dass das unstimulierte Rattenmodell nicht dazu geeignet ist, den Effekt von Aldosteronsynthese-Hemmern zu zeigen. Welche Effekte dafür verantwortlich waren, dass nach Gabe der Substanz sogar eine signifikante Erhöhung der Plasma-Aldosteronspiegel beobachtet werden konnte, müsste weiter untersucht werden.

9 Bewertung der Teststrategie

Im Arbeitskreis Prof. Hartmann sollen durch Ligand- und Struktur-basiertes Design hochpotente Inhibitoren der Aldosteronsynthese entwickelt werden, welche sich als potentielle Therapeutika eignen. Hinsichtlich potentieller Nebenwirkungen wird hierbei die Entwicklung nichtsteroidaler Inhibitoren bevorzugt, da so das Risiko einer Affinität zu weiteren steroidbindenden Proteinen geringer ist. Dabei wird das bestehende Screeningsystem zur Identifizierung potentieller Aldosteronsynthese-Hemmstoffe in einem kontinuierlichen Prozess stetig weiter verbessert und um zusätzliche Tests ergänzt. Um die Eigenschaften der Inhibitoren beurteilen zu können, kommen neben biologischen Testsystemen zur Quantifizierung der Hemmwirkung des Wirkstoffs am Target viele weitere Assays zum Einsatz. Die hohen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen CYP11B2 und CYP11B1 machen deutlich, dass auch die Prüfung auf Selektivität der Inhibitoren gegenüber dem Schlüsselenzym der Cortisolbiosynthese bereits im Anfangsstadium der Hemmstoffentwicklung essentiell ist. Diese Testung auf Aktivität und Selektivität erfolgt mit Hilfe einer Säugerzelllinie, den V79MZ-Zellen, welche entweder das humane CYP11B2- oder das CYP11B1-Gen exprimieren. Diese Zellen besitzen keine endogene CYP-Aktivität, wodurch unspezifische Wechselwirkungen der getesteten Inhibitoren mit anderen CYP-Enzymen ausgeschlossen werden können. Es handelt sich bei diesen Zelllinien um einfache Modelle, die neben der Affinität zum Targetenzym lediglich die Permeation durch die Zellmembran berücksichtigen. Diese Zelltests wurden von Ursula Müller-Vieira im Rahmen ihrer Dissertation vom Zellkulturschalenformat ins 24-Well-Format miniaturisiert und optimiert.^{132, 150} Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine weitere Miniaturisierung der beiden Tests, was eine Erhöhung des Substanzdurchsatzes um das 4fache ermöglicht. Daneben erfolgte die Etablierung zweier zellfreier Assays, deren Enzymquelle die beiden V79MZ-Zelllinien darstellen. Durch die Kombination dieser zellfreien Tests mit der Einführung einer neuen Detektionsmethode (HTRF[®]) ist es gelungen, Kosten zu sparen und darüber hinaus den Substanzdurchsatz, auch durch die Anwendbarkeit des Assays mit einem Pipettierroboter weiter zu erhöhen. Die Validierung der beiden zellfreien Tests mit Referenzsubstanzen zeigte, dass so eine zuverlässige Identifikation von aktiven und selektiven CYP11B2-Inhibitoren erreicht werden kann. Zudem ist mit einem zellfreien Assay, im Vergleich zu zellbasierten Tests, die Ableitung präziserer Struktur-Wirkungs-Beziehungen möglich, die in das weitere Inhibitor-design eingehen können. Um zusätzlich die zeit- und kostenintensive Kultur der

V79MZhCYP11B2- und V79MZhCYP11B1-Zelllinien zu umgehen, können diese zellfreien Assays in der Routine-Testung im High-Throughput-Format den zellulären Tests vorgeschaltet werden. Verbindungen, die in diesen Assays sehr gute Werte erzielen, sollten erst danach im aufwändigeren zellulären System getestet werden, um auch die Zellgängigkeit der Substanz zu beurteilen. Sollte sich an diesem Punkt herausstellen, dass eine Substanz eine gute Hemmwirkung aufweist, jedoch nur schwer in der Lage ist die Zellmembran zu passieren, können an diesem Punkt weitere Strukturoptimierungen erfolgen. Neben einer niedrigen CYP11B1-Aktivität spielt auch die Selektivität zu anderen humanen CYP-Enzymen für die Entwicklung neuer Aldosteronsynthase-Inhibitoren eine wichtige Rolle. Daher erfolgt als nächster Schritt im Screeningsystem die Bestimmung der Selektivität gegenüber weiteren steroidogenen CYPs, CYP17 und CYP19 (Aromatase). Diese Tests werden im Arbeitskreis an mit humanem CYP17 und P450 Reduktase co-transfizierten *Escherichia coli* bzw. an Mikrosomen aus humaner Plazenta (CYP19) durchgeführt. Erst wenn die ausgewählte Substanz auch hier hervorragende Selektivitäten aufweist, kann die Untersuchung ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften erfolgen. Ein wichtiger Aspekt ist dabei der Metabolismus in der Leber. Dieser spielt bei der Wirksamkeit der Substanz eine entscheidende Rolle, die durch eine schnelle Metabolisierung nachteilig beeinflusst werden kann. Auch eine Hemmung hepatischer CYP-Enzyme durch den zu testenden Inhibitor wäre nachteilig, da dies unter Umständen zu toxischen Effekten führen kann. Zur Beurteilung des Metabolismus einer Substanz finden daher im Arbeitskreis zwei verschiedene Tests Anwendung. Zum einen wird die Hemmung der sechs wichtigsten humanen hepatischen CYP-Enzyme (1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4), welche zusammen über 95 % des gesamten Arzneistoffmetabolismus ausmachen,²³¹ in sechs unabhängigen Assays untersucht. Dies ermöglicht eine erste Einschätzung der Beeinflussung des Metabolismus. Zum anderen kann eine Beurteilung der metabolischen Stabilität der Inhibitoren mit Hilfe von Lebermikrosomen verschiedener Spezies erfolgen. Nur eine Substanz, die hier eine ausreichende Halbwertszeit aufweist, kann später als Arzneimittel eingesetzt werden. Dadurch, dass die metabolische Stabilität für verschiedene Spezies bestimmt werden kann, ist auch eine erste Beurteilung der Anwendbarkeit in einem späteren *in vivo*-PK-Versuch möglich. So konnte im Rahmen dieser Arbeit neben der Ratte auch der Hamster als mögliches Tiermodell für pharmakokinetische Studien identifiziert werden. Aber auch für die Durchführung von *in vivo*-PD-Studien, muss ein geeignetes Tiermodell gefunden werden. Da die in Frage kommenden Krankheitsmodelle zur Testung von Aldosteronsynthase-Hemmern hauptsächlich an der Ratte etabliert sind, sollte es das Ziel

sein, die *in vivo*-Versuche an dieser Spezies durchzuführen. Um hier zuverlässige Vorhersagen bezüglich der Ratten-CYP11B1 und Ratten-CYP11B2-Hemmung treffen zu können, wurden im Rahmen der Dissertation von Christina Zimmer zwei zellbasierte *in vitro*-Assays etabliert, um potentielle Kandidaten zur Erbringung des *Proof of Principle* bzw. des *Proof of Concept* zu identifizieren.¹⁵⁹ Verbindungen mit Aktivität am humanen CYP11B2 und Selektivität gegenüber relevanten CYP-Enzymen werden an diesen weiteren Tests auf Aktivität und Selektivität gegenüber den Rattenenzymen unterworfen. Analog den entsprechenden humanen Enzymen, werden hier die Rattenenzyme (*r*CYP11B2 und *r*CYP11B1) in V79MZ-Zellen rekombinant exprimiert.

Um neben der Ratte als Tiermodell auch mögliche alternative Spezies zu finden, die als Tiermodelle geeignet sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an bereits in der Arbeitsgruppe von Gertrud Grün und Christina Zimmer vorgenommenen Versuche an Rattennebenieren,^{158, 214} weitere Aktivitätstests etabliert. Bei diesen werden je nach untersuchter Spezies ganze Nebennieren oder Nebennierenfragmente zur Beurteilung der Hemmaktivität der Aldosteronsynthese-Inhibitoren durch Einsatz von radioaktiv markiertem Substrat verwendet. Diese Versuche stellen das letzte Bindeglied zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen dar. Als finaler Test des bestehenden Screeningsystems im Arbeitskreis, steht ein von Häusler *et al.* etabliertes Rattenmodell,²³² um den Beweis der Plasma-Aldosteronabsenkung durch einen Aldosteronsynthese-Hemmstoff im Sinne eines *Proof of Principle* zu erbringen. Dieses *in vivo*-Modell wurde ursprünglich zur Bewertung von Nebenwirkungen des Aromatase-Inhibitors Fadrozol auf die Cortisolbiosynthese von Ratten entwickelten. Im Rahmen dieser Arbeit ist es so gelungen, den aldosteronsenkenden Effekt der Substanz **SL242** nach peroraler Gabe in der Ratte zu beweisen. Somit ist das im Arbeitskreis etablierte Screeningsystem zur Auffindung hochaktiver und selektiver CYP11B2-Inhibitoren dazu geeignet, potentielle Therapeutika zu identifizieren. Durch sinnvolle Kombination verschiedener Assays konnte eine verlässliche und schnelle Auswahl geeigneter Verbindungen getroffen und letztlich eine Substanz identifiziert werden, mit der das *Proof of Principle* gezeigt werden konnte. Als weiterer Schritt sollte die Testung in einem relevanten Krankheitsmodell erfolgen, um den therapeutischen Nutzen einer Hemmung der Aldosteronsynthese zu belegen. Dazu stehen prinzipiell mehrere Modelle zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist beispielsweise ein bereits von Fiebeler *et al.* eingesetztes Rattenmodell,⁵⁹ bei dem eine Überexpression des humanen Angiotensinogen- und des humanen Renin-Gens vorliegt.²³³ Die Ratten entwickeln aufgrund der Überexpression einen Bluthochdruck, welcher unter anderem mit einem erhöhten Plasma-Aldosteronlevel

einhergeht. Ein weiteres geeignetes Krankheitsmodell sind sogenannte spontan hypertensive und herzinsuffiziente Ratten. Das Krankheitsbild dieses genetischen Inzuchtstammes weist starke Gemeinsamkeiten zur menschlichen Erkrankung auf: es ist begleitet von erhöhter Plasma-Renin-Aktivität und einem erhöhten Aldosteron-Plasmaspiegel.¹³⁸

V Zusammenfassung

Das Enzym Aldosteronsynthase (CYP11B2) ist das Schlüsselenzym der Mineralocorticoid-biosynthese und katalysiert die Umsetzung von Deoxycorticosteron zu dem hochpotenten Steroidhormon Aldosteron. Die Hemmung dieses Enzyms stellt ein vielversprechendes Therapiekonzept zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dar, an deren Entstehung und Progression pathologisch erhöhte Aldosteronspiegel beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien und Methoden zur Identifikation und Charakterisierung neuer Aldosteronsynthase-Inhibitoren entwickelt. Mit Hilfe eines miniaturisierten, auf HTRF[®]-Technologie basierten Testverfahrens ist es gelungen Tests im High-Throughput-Format durchzuführen. Damit können sowohl die Aktivität einer Verbindung an CYP11B2, als auch die Selektivität gegenüber CYP11B1 zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden. Neben der Miniaturisierung des bereits im Arbeitskreis etablierten zellulären Testsystems wurden neue, zellfreie Assays zum Screening von Substanzen entwickelt. Darüber hinaus erfolgte die biochemische Charakterisierung einer Leitverbindung. Unter anderem wurde, zur Bestimmung potentieller Spezies für nachfolgende *in vivo*-Studien, die inhibitorische Wirkung auf die Aldosteronsekretion an Nebennierenkulturen verschiedener Spezies untersucht. Schließlich konnte mit dieser Leitverbindung das *Proof of Principle* in der Ratte, nach peroraler Applikation, erbracht werden.

VI Summary

The enzyme aldosterone synthase (CYP11B2) is the key enzyme of mineralocorticoid biosynthesis and catalyzes the conversion of deoxycorticosterone to the highly potent steroid hormone aldosterone. The inhibition of this enzyme represents a promising therapeutical approach for the treatment of cardiovascular diseases, where pathologically elevated aldosterone levels are involved in their development and progression.

In this work, strategies and methods for the identification and characterization of novel aldosterone synthase inhibitors have been developed. With the help of a miniaturized test method, based on HTRF[®]-technology, it was managed to carry out tests in high-throughput format. Thus, both the activity of a compound to CYP11B2, as well as the selectivity for CYP11B1 can be determined in a reliable and reproducible manner. Besides the miniaturization of the already established cellular test by the working group, new cell-free assays for screening of substances have been developed. In addition, the biochemical characterization of a lead compound was carried out. Here, the inhibitory effect on the aldosterone secretion of adrenal cultures of various species was examined. This was done for determination of potential species for subsequent *in vivo* studies. Finally, with this lead compound the *proof of principle* in rat, after oral administration could be provided.

VII Material und Methoden

1 Material

1.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 24 Umkehrmikroskop	Zeiss (Jena)
CASY [®] Modell TT (Zellcounter), (150 µm Kapillare)	Schärfe System Reutlingen
Axiovert 24 Umkehrmikroskop	Zeiss (Jena)
Feinwaage SBC21	Scaltec (Heiligenstadt)
Holten LaminarAir Sterilbank	Heto-Holten (Allerød, Dänemark)
Millipore Q plus Reinstwasseranlage	Millipore (Eschborn)
pH-Meter 766	Knick (Berlin)
Schüttelinkubator Unitron 25	Infors (Stuttgart)
Zellkultur-Inkubatoren Biosafe eco	Integra Biosciences (Fernwald)
Zentrifuge Universal 32 RF	Hettich GmbH (Tuttlingen)
Micro 24-48 R Tischzentrifuge	Hettich GmbH (Tuttlingen)
Multifuge 1S-R	Thermo Scientific
Holten LaminAir Sterilbank	Heto-Holten (Allerød, Danemark)
Wasserbadschüttler (beheizt)	nunc International (Wiesbaden)
Kryobehälter Air Liquide GT50	Kryotechnik GmbH (Düsseldorf)
Ultraschallbad Sorex RK 106 Transistor	Bandelin Electronic (Berlin)
Ultraschallstab Bandelin Sonoplus HD60	Bandelin Electronic (Berlin)
Freezing Container (Cryoline TM)	Nunc International (Wiesbaden)
Wasserbad	Nunc International (Wiesbaden)

Speed Vac (Concentrator SPD121P, Refrigerated Vapor Trap RVT400)	Thermo Scientific
JANUS™ Automated Work Station	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts)
Microplatten Reader POLARstar OMEGA	BMG Labtech GmbH (Ortenberg)
LC/MS-MS:	
Surveyor® Autosampler	
Surveyor® MS-HPLC-System	
TSQ® Quantum MS (ESI, APCI)	ThermoFinnagan (San Jose, USA)
HPLC-System:	
Agilent 1200 Series HPLC-System und Chem-Station® Auswertesoftware	Agilent Technologies (Waldbronn)
Radiodetektor und Szintillatortpumpe	raytest Ramona Star
Nucleodur C18ec, 100-3,2 x 125 mm	Macherey Nagel (Düren)
LKB-Wallac-CliniGamma (γ-Counter)	Wallac (Turku, Finnland)
Pipetten Research® variabel (0,5 µl-1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg)
Vortex	USA Scientific, Inc. (Florida)

1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril, HPLC-grade	Fisher Scientific (USA)
Ameisensäure, p. a.	Sigma-Aldrich (München)
BSA	Sigma-Aldrich (München)
Deoxycortisol (Reichstein Substanz S)	Sigma-Aldrich (München)
DMEM (Pulvermedium)	ccpro (Neustadt)
DMEMHam's F12 (Flüssigmedium)	ccpro (Neustadt)
DMSO, research grade	Serva (Heidelberg)

DTT	Sigma-Aldrich (München)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt)
Erythromycin	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol	Fisher Scientific (USA)
Ethylacetat	Fisher Scientific (USA)
Fadrozol	Ciba-Geigy (Basel-Schweiz)
fetales Kälberserum FBS	Sigma-Aldrich (München)
G418-Sulfat	GERBU Biotechnik GmbH (Wieblingen)
Glucose-6-Phosphat	Sigma-Aldrich (München)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Glycerin, 99% wasserfrei, reinst	Merck Millipore (Darmstadt)
HCl	Sigma-Aldrich (München)
HgCl ₂	Sigma-Aldrich (München)
IST ⁺ Premix	BD Biosciences (Heidelberg)
Panexin	Pan Biotech GmbH (Aidenbach)
K ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich (München)
Kaliumphthalat, monobasisch	FLUKA (Taufkirchen)
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore (Darmstadt)
Methanol, HPLC-grade	Fisher Scientific (USA)
MgCl ₂	Carl Roth (Karlsruhe)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (München)
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth (Karlsruhe)
NaH ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich (München)
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth (Karlsruhe)
NaN ₃	Carl Roth (Karlsruhe)
NaOH	Sigma-Aldrich (München)
Natriumglutamat	ccpro (Neustadt)
Natriumpyruvat	ccpro (Neustadt)

PEG400 (Macrogol)	Fargon (Barsbüttel)
Penicillin/Streptomycin	ccpro (Neustadt)
PMSF	Carl Roth (Karlsruhe)
Quickszint Flow 302 LSC Cocktail	Zinsser Analytik GmbH (Frankfurt)
RSS	Sigma Aldrich
Saccharose	MP Biomedicals GmbH (Eschwege)
Synacthen [®] Depot ACTH	Novartis Pharma (Nürnberg)
Tris Base	Merck Millipore (Darmstadt)
Trypsin/EDTA (steril)	ccpro (Neustadt)

1.3 Zelllinien

1.3.1 V79MZh11B1, V79MZh11B2 und V79MZr11B2

Die Zelllinien wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität des Saarlandes entnommen.

Die Zelllinie V79 wurde aus Lungenfibroblasten eines adulten männlichen Chinesischen Hamsters etabliert.²³⁴ Die Zellen wachsen in Kultur adhärent in einer einlagigen, zusammenhängenden Zellschicht (Monolayer). Die Verdopplungszeit der V79-Zellen beträgt durchschnittlich 10 - 12 h. Ihr Ursprung aus Bindegewebe lässt sich in ihrer Morphologie (spindelförmige Gestalt) deutlich erkennen. V79MZ-Zellen stammen vom sogenannten Mainzer Subklon, der keine messbare endogene Cytochrom P450-Aktivität aufweist. Die eingesetzten stabil transfizierten Zellen V79MZh11B1 und V79MZh11B2 besitzen die Fähigkeit zur Expression von aktivem humanem CYP11B1 (V79MZh11B1) bzw. CYP11B2 (V79MZh11B2).^{144, 145} Die Zelllinien V79MZr11B1 und V79MZr11B2 entsprechend die Enzyme der Ratte.¹⁵⁸

1.3.2 H295R

Die Zelllinie NCI-H295R wurde über ATCC (American Type Culture Collection) bezogen (Katalog. Nr.: CRL-2128). Sie wurde von der pluripotenten NCI-H295R-Zelllinie abgeleitet, welche von Gazdar *et al.* aus einem Nebennierenrinden-Karzinom etabliert worden war.²³⁵

Die Zelllinie zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Zellantwort nach Stimulation mit AT-II und Kaliumionen aus. Die Zellen sind in der Lage Androgene, Estradiol, Mineralo- und Glucocorticoide zu sekretieren.^{198, 201, 203}

1.4 Versuchstiere

Männliche Wistar Ratten, KG: 250 – 350 g, Alter: 6 – 8 Wochen, Tötung: CO₂, Janvier (Le Genest-Saint-Isle) oder Charles River (Europe)

1.5 Gewebe und Gewebepräparationen

1.5.1 Lebermikrosomen

Human: männlich und weiblich, Pool aus 30 Spendern, BD Biosciences (Woburn)

Hamster: Golden Syrian, männlich, KG: 100 g, Pool aus 10 Lebern, BIOPREDIC International (Rennes)

Hund: Beagle, männlich, Pool aus 5 Lebern, Primacyt (Schwerin)

Ratte: Sprague Dawley, Alter: 8 – 10 Wochen, Pool aus 100 Lebern, BD Biosciences (Woburn)

1.5.2 Nebennieren

Hamster: Syrian Aura, männlich, KG: 100 g, Alter: 5 – 8 Wochen, Tötung: CO₂, Janvier (Le Genest-Saint-Isle)

Ratte: Wistar, männlich, KG: 250 g, Alter: 6 – 7 Wochen, Tötung: CO₂, Janvier (Le Genest-Saint-Isle)

Meerschweinchen: Dunkin Hartley, männlich, KG: 200 – 250 g, Alter 4 Wochen, Tötung: CO₂, Janvier (Le Genest-Saint-Isle)

Kaninchen: New Zealand White, männlich, KG: 3,5 – 4 kg, Alter: > 2 Jahre, Narkotisierung mit einer Mischung aus Ketavet und Rompun, danach Tötung durch Blutentzug über die Punktion des Ventrikels, Charles River (Kißlegg)

1.6 Medien und Lösungen für Arbeitstechniken mit Zellkultur/Zellhomogenat

DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, sterilfiltriert)

DMEM Flüssigmedium	500 ml
Fetales Kälberserum	25 ml
Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)	10 ml

Alle Bestandteile wurden steril zusammen gegeben. Das Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt.

G418-Sulfat

Geneticin-Sulfat (G418)	500 mg
HEPES (100 mM)	ad 10 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Eppendorfgläsern bei -20 °C aufbewahrt.

HEPES

HEPES	100 mM
-------	--------

Die Substanz wurde in H₂O bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,3 eingestellt. Der Puffer wurde sterilfiltriert, bei RT aufbewahrt und war für mehrere Monate haltbar.

PBS (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.

NADPH-regenerierendes System (Stammlösung)

a) NADP	(4 mM)
b) Glucose-6-phosphat	(20 mM)
c) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	(20 U/ml)
d) MgCl ₂ ·6 H ₂ O	(20 mM)

Die benötigte Menge der Substanzen a) bis d) wurden jeweils frisch vor einem Assay in Phosphatpuffer gelöst, diese zu jeweils gleichen Teilen gemischt und vor der Verwendung für 20 min bei RT stehen gelassen. Direkt vor dem Teststart wurde die gleiche Menge an d) zugegeben. Die Endkonzentration an regenerierendem System im Testansatz wurde entsprechend der beim Test der metabolischen Stabilität gewählt.

Homogenatpuffer

K ₃ PO ₄	100 mM
Saccharose	250 mM
EDTA	100 mM
Glycerin	10 % (v/v)
PMSF	0,5 mM
DTT	2 mM

Die Substanzen wurden in H₂O bidest. gelöst und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. DTT und PMSF wurden erst kurz vor Verwendung zugegeben. (PMSF Stammlösung: 100 mM)

Assaypuffer (zellfreier Assay)

KH_2PO_4	100 mM
--------------------------	--------

Das Salz wurde in H_2O bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt und war für mehrere Monate haltbar.

Verdünnungspuffer (HTRF[®]-Assay)

Na_2HPO_4	80 mM
NaH_2PO_4	20 mM
BSA	0,25 %
NaN_3	0,02 %

Die Substanzen wurden in H_2O bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt und war für mehrere Wochen haltbar.

Stopp-Reagenzien (zum Abbruch der Enzymreaktion in den zellfreien Assays)

Tris Base	0,5 M Tris Base in Acetonitril
HgCl_2	1 mM in Assaypuffer

1.7 Lösungen zur Überprüfung der metabolischen Stabilität**Phosphatpuffer (100 mM)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	4,48 g
NaH_2PO_4	1,5 g
H_2O bidest.	ad 500 ml

Die Substanzen wurden in H_2O bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt und war für mehrere Wochen haltbar.

NADPH-regenerierendes System (Stammlösung)

siehe 1.6

1.8 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Reagiergefäße (SafeSeal 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. (Numbrecht)
Pipettenspitzen (TipOne 0,1 – 10 µl, 200 µl, 101 – 1000 µl)	Starlab (Ahrensburg)
384-Well Platten (Flat – Bottom, Small Volume)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
96-Well Platten (U-Bottom, V-Bottom)	Nunc International (Wiesbaden)
96-Well Platten (F-Form, Half-A)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
RIA Aldosteron	DRG (Marburg)
HTRF [®] (Aldosterone, Cortisol)	CisBio Assays (Frankreich)
HPLC-Vials 1,5 ml (Braunglas + Mikroeingsätze 150 µl)	VWR (Darmstadt)
RP C18 NUCLEODUR [®] 100-3 (125 × 3 mm)	Macherey-Nagel (Düren)
NUCLEODUR [®] CC8/3-100-3-C18ec (Vorsäule)	Macherey-Nagel (Düren)

1.8.1 Verbrauchsmaterial für Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Kryoröhrchen (Cryoline [™])	Nunc International (Wiesbaden)
Kulturschalen (60,90, 145 mm, Nunclon [™])	Sarstedt Inc. (Newton)
Steritop Sterilfiltereinheit	Millipore (Eschborn)
Sterilfilter Millex [™] (0,22 µm Porendurchmesser)	Millipore (Eschborn)

Falcons (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. (Numbrecht)
Kulturplatten mit Deckel (24-Well; Nunclon™)	Nunc International (Wiesbaden)
Kulturplatten mit Deckel (96-Well; Cellstar®)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
CASY® cups	Schärfe System (Reutlingen)
CASY® ton	Schärfe System (Reutlingen)

2 Methoden

2.1 Arbeitstechniken mit Zellkulturen

Alle Zelllinien wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in speziell beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Der konstante CO₂-Gehalt der Gasphase begünstigt durch ein chemisches Gleichgewicht mit dem NaHCO₃-gepufferten Medium eine weitgehende Konstanthaltung des pH-Wertes. Dies ist essentiell für konstante Wachstumsbedingungen.

2.1.1 Kultivierung von V79MZ

Die Zelllinien V79MZh11B1, V79MZh11B2 und V79MZr11B2 wurden in DMEM kultiviert (Zusammensetzung siehe 1.6). Die Zellen wurden alle 2-3 Tage nach Behandlung mit Trypsin/EDTA passagiert (vgl. 2.1.3). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 h. Die Zellen wurden maximal 20 bis 25-mal passagiert, um mögliche Zellveränderungen auszuschließen.

2.1.2 Kultivierung von H295R

Die Zellen wurden gemäß den Angaben der American Type Culture Collection mit geringen Modifikationen des Protokolls kultiviert. Anstelle des im Protokoll angegebenen NU-Serums wurden dem Medium 5 % Panexin zugesetzt. Die Zellen wurden in 90 mm kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 h.

2.1.3 Passagieren von V79MZ-Zellen

Alle Abläufe erfolgten unter sterilen Bedingungen mit auf 37 °C vortemperierten Lösungen. Um die Konfluenz der Zellen stets unter 100 % zu halten, wurden die Zellen regelmäßig passagiert. Dazu wurde das vorhandene Kulturmedium abgesaugt und die Zellschicht zweimal mit PBS gewaschen. Zum enzymatischen Ablösen der Zellen vom Untergrund wurde der Monolayer mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und die Kulturschale zur Beschleunigung der enzymatischen Reaktion für 5-10 min im CO₂-Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Durch mikroskopische Kontrolle konnte die Zellablösung verfolgt werden. Die Serinprotease Trypsin spaltet dabei die Proteine, welche die Anheftung der Zellen am Substrat vermitteln. EDTA beschleunigt diesen Prozess der Ablösung, indem es zweiwertige Ionen bindet, welche die zellbindenden Membranproteine stabilisieren.

Durch Abspülen mit 2 · 5 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium wurde die Trypsinbehandlung durch die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren gestoppt und die Zellsuspension bei 500 g (5 min, RT) abzentrifugiert. Der trypsinhaltige Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Durch Verdünnung mit Medium wurden die Zellen maximal im Verhältnis 1 zu 10 gesplittet, auf die benötigte Anzahl von Kulturgefäßen verteilt und weiter kultiviert. Um die Expression des rCYP11B2-Enzyms in den Zellen aufrecht zu erhalten, wurde den V79MZr11B2-Zellen zusätzlich G418-Sulfat in einer Endkonzentration von 750 µg/ml zugesetzt.

2.1.4 Passagieren von H295R-Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte, bis auf geringfügige Modifikationen wie bereits für die V79MZ-Zellen unter 2.1.3. beschrieben. Hier erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei nur 300 g. Nach Resuspendierung des Zellpellets wurden die Zellen höchstens im Verhältnis 1:3 gesplittet und weiter kultiviert.

2.1.5 Kryokonservierung von V79MZ- und H295 R-Zellen

Säugerzellen können bei Temperaturen von -196 °C in flüssigem Stickstoff in einer Kältestarre gelagert werden, da bei dieser Temperatur keine biologischen Prozesse mehr ablaufen. Bei Bedarf können die Zellen wieder aufgetaut und angezogen werden. Um die Zellen vor Zerstörung durch Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu schützen, muss dem Einfriermedium ein Gefrierschutz zugesetzt werden.

Das Zellmaterial wurde durch Trypsinbehandlung wie unter Punkt 2.13. beschrieben gewonnen und das so erhaltenen Zellpellet auf Eis gelagert und in 15 ml eisgekühltem Zellkulturmedium (20 % FCS) mit einem Zusatz von 20 % DMSO als Gefrierschutzadditiv resuspendiert und zu 1 ml auf eine entsprechende Menge an vorgekühlten Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einen bei 4 °C vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten „Freezing Container“ überführt. Nach Lagerung dieses Behälters bei –80 °C für 1 d, was eine konstante Abkühlrate von 1 °C/min ermöglicht, wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt.

2.1.6 Auftauen von V79MZ- und H295 R-Zellen

Zum Wiederauftauen der Zellen wurden 10 ml Zellkulturmedium auf 37 °C vorgewärmt. Die Aliquots wurden aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest Eis zu sehen war. Der Inhalt wurde nun direkt mit dem Medium gemischt und die Zellen sofort bei 500 g abzentrifugiert, um das zugesetzte DMSO zu entfernen. Das erhaltene Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und die Zellen in einer Zellkulturschale im Inkubator weiter kultiviert. Um die Expression des *rCYP11B2*-Enzyms in den Zellen aufrecht zu erhalten, wurde den V79MZr11B2-Zellen zusätzlich G418-Sulfat in einer Endkonzentration von 750 µg/ml zugesetzt.

2.1.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des CASY[®]TT-Gerätes. Das Messprinzip beruht auf einer Widerstandsmessung kombiniert mit einer Pulsflächenanalyse. Auf diese Weise kann neben der Bestimmung der Zellzahl und Größenverteilung einer Probe auch die Vitalität der Zellen ermittelt werden. Ebenso wird der Aggregationsgrad der Zellen ermittelt und bei der Berechnung der Zellkonzentration automatisch berücksichtigt. Dazu wird an einer Messkapillare mit definiertem Durchmesser (für eukaryotische Zellen 150 µM), die mit konstantem Fluss einer isotonischen Elektrolytlösung (CASY[®]ton) durchspült wird, ein Niederspannungsfeld angelegt. Dieses System besitzt einen definierten Widerstand der sich ändert, wenn durch eintretende Zellen ein bestimmtes Volumen der Elektrolytlösung verdrängt wird. Diese Widerstandsänderung wird dann per Pulsfläche in ein Messsignal übersetzt. Geschädigte oder tote Zellen werden wegen ihrer defekten Zellmembran, die keine elektrische Barriere mehr darstellt, kleiner oder nur mit der Größe ihres Zellkerns dargestellt.

Somit können nach entsprechender Eichungsmessung (zur Festlegung von Evaluierungs- und Normierungscursor) gemäß den Herstellerangaben des Gerätes für einen Zelltyp lebende, tote Zellen sowie Zellaggregate differenziert werden.

Die Geräteparameter für die Zellzahlbestimmung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

Tabelle 15: Geräteeinstellungen des CASY[®] TT für die Zellzahlbestimmung verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Evaluierungscursor	Normierungscursor
V79MZh11B1; V79MZr11B1	9,88 – 50,00 μM	5,88 – 50,00 μM
V79MZh11B2; V79MZr11B2	7,88 – 50,00 μM	5,38 – 50,00 μM
H295R	11,13 – 50,00 μM	6,13 – 50,00 μM

Zur Zellzahlbestimmung wurden jeweils durch Zugabe der entsprechenden Menge an Zellsuspension (gewonnen wie unter Punkt 2.1.3 und 2.1.4 beschrieben) zu 10 ml CASY[®]ton-Lösung in einem CASY[®]cup gegeben und die Messung nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.8 Herstellung von V79MZh11B1- und V79MZh11B2-Zellhomogenat

Für die Herstellung des Homogenates wurden die Zellen von mindestens drei großen Zellkulturplatten geerntet. Dazu wurde das Kulturmedium über den maximal zu 80 % konfluent gewachsenen Zellen abgesaugt und der Zellmonolayer vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.1.3 beschrieben mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche abgelöst, die Zellen mit frischem Medium aufgefüllt, vereinzelt, die Zellzahl wie unter 2.1.7 beschrieben bestimmt und das Gesamtvolumen notiert. Danach wurde die Zellsuspension bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in PBS gewaschen und erneut bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und die Zellen zur Herstellung einer Zellsuspension mit definierter Zellzahl pro ml in der entsprechenden Menge vorgekühltem Homogenatpuffer resuspendiert ($1,25 \cdot 10^6$ pro ml für hCYP11B1 und $1,25 \cdot 10^7$ für hCYP11B2). Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Ultraschallstab in einem 15 ml Falcon

bei 100 % Leistung. Dabei wurde insgesamt dreimal für jeweils 7 s beschallt. Dazwischen lagen Kühlpausen von 50 s auf Eis. Das gewonnene Zellhomogenat wurde anschließend für 10 min bei 600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Homogenat bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die benötigte Menge an Homogenat konnte so bei Bedarf aufgetaut und verwendet werden. Über einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen war kein signifikanter Aktivitätsverlust festzustellen (Daten nicht gezeigt).

2.2 Analytische Grundlagen

2.2.1 Radioimmunoassay (RIA)

Das Verfahren beruht auf dem Grundprinzip eines Radioimmunoassays, wobei radioaktive und nicht radioaktive Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten ^{125}I -Aldosteron RIA-Kit (DRG, Marburg), zur Ermittlung der Aldosteronkonzentration sind die polyklonalen Anti-Aldosteron-Antikörper an der Innenwand von Polystyrolröhrchen gebunden. Dabei befindet sich im Inkubationsgemisch aller Proben eine definierte Anzahl an markiertem Analyten (hier ^{125}I -Aldosteron), welche mit den unmarkierten Aldosteron aus der zu messenden Probe konkurriert. Die Menge des mit ^{125}I -markierten, an Antikörper gebundenen Analyten ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des in der zu analysierenden Probe vorhandenen, nicht markierten Aldosteron. Die Trennung von freiem und an Antikörper gebundenem Aldosteron wird dabei leicht und schnell durch Dekantieren der mit Antikörper beschichteten Röhrchen erreicht. Die gebundene Radioaktivität kann danach im Gammacounter vermessen werden.

2.2.2 Enzymimmunoassay (EIA)

Dieses immunologische Nachweisverfahren beruht auf dem Grundprinzip eines kompetitiven Immunoassays, das im Gegensatz zum RIA nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Cortisol EIA-Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor) konkurrieren Cortisol und Cortisol-Acetylcholinesterase(AChE)-Konjugate um eine definierte Anzahl an Cortisol-spezifischen Antikörper-Bindungsstellen. Zur Ermittlung der

Cortisolkonzentration sind die Wells einer Mikrotiterplatte mit polyklonalen Anti-Cortisol-Antikörpern beschichtet. Dabei befindet sich im Inkubationsgemisch aller Proben eine definierte Anzahl an markiertem Analyten (hier AChE-Cortisol), welche mit dem unmarkierten Cortisol aus der zu messenden Probe konkurriert. Das nicht gebundene Konjugat (markiert und unmarkiert) wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung für die AChE (Ellman's Reagenz) zugegeben. Durch die Enzymreaktion entsteht eine gelbe Färbung des Mediums. Die Extinktion kann so nach einer definierten Inkubationszeit im Mikrotiterplattenleser gemessen werden. Dabei ist die Intensität der Farbe proportional zur Menge des mit AChE-markierten, an Antikörper gebundenen Analyten, welches wiederum umgekehrt proportional zur Menge an freiem aus der zu analysierenden Probe stammendem Cortisol ist.

2.2.3 Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography, LC) ist ein Teilgebiet der Chromatographie und bezeichnet die Trennung von Stoffgemischen an einer stationären und einer flüssigen mobilen Phase. In dieser Arbeit kam ausschließlich die sogenannte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zum Einsatz. Bei diesem Verfahren wird die mobile Phase (Elutionsmittel) durch eine sogenannte Trennsäule gepumpt, welche die stationäre Phase enthält. Dabei wurden generell eine unpolare stationäre Phase (Nucleodur[®], organisch substituiertes Kieselgel), sowie polare Gemische aus Wasser oder Puffer und Acetonitril bzw. Methanol als mobile Phase verwendet. Es handelte sich also um die sogenannte Umkehrphasenflüssigchromatographie (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC). In diesem System werden die Analyten durch unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte basierend auf verschiedenen Hydrophobizitäten zwischen stationärer und mobiler Phase getrennt (Verteilungschromatographie). Die HPLC-Methoden wurden so entwickelt und optimiert, dass möglichst kurze Laufzeiten, eine hohe Sensitivität und auch Selektivität (Trennung der Peaks) erreicht wurden. Nach der chromatographischen Trennung der Analyten erfolgt die Detektion. Diese erfolgte mittels UV/vis-, Radiodetektion oder Massenspektrometrie (MS).

2.2.4 UV/vis-Messung

Das Messprinzip beruht hier auf der Lichtabsorption von Substanzen im ultravioletten (UV) oder sichtbaren (visuellen, vis) Wellenlängenbereich. Die Messung erfolgt in einem PDA-Detektor (Photodiodenarray-Detektor).

2.2.5 Radiodetektion

Nach Zumischung von Szintillator (lumineszierender Substanzen) wird das die radioaktiv markierten (Tritium, ^3H) Substanzen enthaltene Eluat durch eine Messzelle geleitet, die sich zwischen den Kathoden zweier Photomultiplier befindet. Die radioaktive Strahlung (β -Strahlung) ruft durch Anregung (Szintillator) Lichtblitze hervor, deren Häufigkeit proportional zur auftretenden Strahlungsintensität ist.

2.2.6 LC/MS-MS

LC/MS ist eine Kombination aus Flüssigchromatographie (LC, Liquid Chromatography bzw. HPLC, High Pressure LC) und Massenspektrometrie (MS). Die Massenspektrometrie ist eine Detektionsmethode, mit deren Hilfe eine qualitative und quantitative Bestimmung der Analyten erfolgen kann, auch wenn diese nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer (TSQ-Quantum[®]) mit Elektrosprayionisation (ESI) bei Raumtemperatur eingesetzt (Thermo Finnigan, San Jose, CA, Auswertesoftware: Xcalibur). Bei der ESI werden Lösungen geladener oder polarer Substanzen unter Atmosphärendruck versprüht und ionisiert. Dies stellt eine elementare Voraussetzung zur Detektion der Substanzen im Massenspektrometer dar. Dazu wird die Lösung durch eine Stahlkapillare geleitet, an der ein Hochspannungsfeld angelegt ist (3-5 kV). Mit Hilfe eines Vernebelungsgases (N_2) entstehen dadurch geladene Tröpfchen, welche die Ionen des Analyten enthalten. Diese werden dann entsprechend ihrer Ladung in Richtung des Massenspektrometers fokussiert und können so innerhalb des MS-Systems aufgrund des Verhältnisses ihrer Masse zu ihrer Ladung (Masse/Ladung, m/z) aufgetrennt und detektiert werden. Es resultiert ein Massenspektrum aus dem abgelesen werden kann, in welchen Verhältnissen Ionen welcher Masse gebildet wurden. Dies ermöglicht bei Einzelsubstanzen Rückschlüsse auf die Struktur der Substanz und bei Mischungen quantitative und, nach vorheriger Trennung, qualitative Aussagen. Die Auftrennung und Detektion der Ionen

geschieht mit Hilfe von drei Quadrupolen. Ein besteht aus vier parallel angeordneten zylinderförmigen Elektroden, zwischen denen jeweils eine Wechselspannung und eine Gleichspannung anliegen. Die gegenüberliegenden Elektroden befinden sich dabei auf dem gleichen Potential. Durch Variation der Gleich- und Wechselspannung wird erreicht, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Quadrupol passieren können. Alle anderen Ionen werden nach außen beschleunigt und kollidieren mit den Elektroden. Aus dem Gemisch von Gasphaseionen werden die Ionen der zu messenden Substanz mit Hilfe des ersten Quadrupols (Q1) selektiert und über die sogenannte Kollisionszelle (Q2), einer mit Kollisionsgas gefüllte Zwischenzone, in den zweiten Quadrupol (Q3) geleitet und analysiert. Dabei stellen Q1 und Q3 voll funktionsfähige Quadrupole dar, während Q2 nur mit einer Wechselspannung versorgt wird und die gezielte Fragmentierung der im Q1 ausgewählten Ionen zu Tochterionen ermöglicht.

Zur Methodvalidierung wurden zunächst die MS-Parameter in verschiedenen reinen Lösungsmitteln nach direkter Injektion (ohne vorherige HPLC-Trennung) jeder einzelnen Substanz optimiert. Dazu wurden für jede Verbindung spezifische Ionen ausgewählt und ihre Detektionsparameter wurden optimiert. Analog zum Lösemittel wurde die Verbindung dann in ihrer durch die Versuchsbedingungen vorgegebenen Matrix untersucht, um die Einflüsse der Matrix auf die Detektion abzuschätzen. Im Anschluss daran wurde die HPLC-Methode (mit Schaltventil) optimiert, um mit möglichst kurzen Laufzeiten, möglichst sensitive (Detektionslimit), selektive (eventuell chromatographische Trennung) Quantifizierungen durchführen zu können. Mit Hilfe des Schaltventils kann durch die chromatographischen Trennung der Puffersalze von den Analyten zu Beginn eines chromatographischen Laufes der überwiegende Teil der Salze in den Abfall geleitet werden (etwa die erste Minute zu Beginn der Chromatographie). So kann vermieden werden, dass die Salze in die Ionenquelle gelangen, wo sie störenden Einfluss auf die Ionisation ausüben würden. Die Wahl der mobilen Phasen und ihrer Zusätze wird durch die Kopplung mit der Massenspektrometrie vorgegeben. Für Quantifizierungen wurde generell der SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring) verwendet, der sehr selektiv und sensitiv ist. In manchen Fällen wurde auch der SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) eingesetzt, um die Sensitivität noch zu steigern. Die Quantifizierung der Verbindungen erfolgte anhand der Integration der Peakflächen der Chromatogramme; ihre Identifizierung erfolgte über die dazugehörigen Massenspektren.

2.2.7 HTRF[®]

Die Technologie der homogenen zeitaufgelösten Fluoreszenz (Homogeneous Time-Resolved Fluoreszenz, HTRF[®]) basiert auf der Übertragung der Energie zwischen zwei fluorophoren Molekülen. Dabei werden zeitaufgelöste Fluoreszenz (Time-Resolved Fluoreszenz, TRF) und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) miteinander kombiniert. Dieses Verfahren bietet homogene Tests mit hervorragender Spezifität und Sensitivität. Die TRF-Technik zeichnet sich durch eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz aus, was in den besonderen Fluoreszenzeigenschaften der Lanthanide (hier Europium) begründet ist. Diese besitzen eine extrem lange Halbwertszeitextrem und weisen einen großen Stokes-Shift auf. FRET nutzt den Energietransfer von einem fluoreszierenden Molekül (Donor) auf ein anderes Molekül (Akzeptor). Da sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, kommt es bei großer räumlicher Nähe (< 9 nm) der beiden Moleküle nach Anregung des Donors zum Energietransfer auf den Akzeptor. Dieser emittiert darauf hin Licht bei einer für ihn spezifischen Wellenlänge. Es handelt sich bei den verwendeten Testkits zum Nachweis von Aldosteron bzw. Cortisol um kompetitive Immunoassays. Dabei ist zum Nachweis von Aldosteron das Donormolekül (Europiumkryptat) mit einem Anti-Aldosteron-Antikörper konjugiert, während das Akzeptormolekül direkt mit Aldosteron verbunden ist. (Der Nachweis von Cortisol erfolgt entsprechend äquivalent, mit Anti-Cortisol-Antikörper konjugiertem Europiumkryptat als Donormolekül und einem Akzeptormolekül, das direkt an Cortisol gebunden ist). Dabei konkurrieren das freie Aldosteron aus der zu untersuchenden Probe und das an das Akzeptormolekül konjugierte Aldosteron miteinander um die Antigen-Erkennungsstelle des Antikörpers. Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 320 nm führt nur die Bindung des konjugierten Aldosterons an das Europiumkryptat zu einer FRET-Reaktion, aber nicht das zu quantifizierende, unkonjugierte Aldosteron. Dementsprechend ist die Signalstärke reziprok zur in der Probe enthaltenen Aldosteronmenge. Dabei kann die vom Akzeptor ausgehende Emission detektiert werden, ohne dass gebundene von nicht gebundenen Testbestandteilen getrennt werden müssen. Diese homogene Testform wirkt sich positiv auf Assaybearbeitungszeit und Kosten aus. Darüber hinaus werden durch die Assaydurchführung im 384-Well-Format nur geringste Mengen an Reagenzien verbraucht, wodurch zusätzlich Kosten eingespart werden können.

2.3 Testverfahren mit V79MZh11B1, V79MZh11B2 und V79MZr11B2 im 24-Well-Format mit radioaktiv markiertem Substrat

Um Aktivität (CYP11B2) und Selektivität (CYP11B1) der Hemmstoffe zu testen, wurden die im Folgenden beschriebenen Assays mit den Zelllinien V79MZh11B1 oder V79MZh11B2 durchgeführt. Für ausgewählte Verbindungen wurde darüber hinaus auch auf Aktivität am Rattenenzym (V79MZr11B2) getestet.

Aussaat der Zellen

Anzucht und Passagieren der Zelllinien erfolgten wie unter Punkt 2.1.1 und 2.1.3 beschrieben. Das Zellmaterial von mindestens zwei Kulturschalen wurde durch Trypsinbehandlung gewonnen und die Zellzahl mit Hilfe des CASY[®]TT-Zellzählgerätes (vgl. 2.1.7) bestimmt. Durch Verdünnung der Zellsuspension mit Medium wurde eine Zelldichte von 800.000 Zellen/ml eingestellt (bei V79MZr11B2: 1.000.000 Zellen/ml). Die Verdünnung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 1: } k_1 \times V_1 = k_2 \times V_2$$

k_1 : gewünschte Konzentration (Zellen/ml)

V_1 : gewünschtes Volumen

k_2 : gegebene Konzentration der Zellsuspension

V_2 : einzusetzendes Volumen der Zellsuspension

Von der so erhaltenen Suspension mit definierter Zellzahl wurde jeweils 1 ml in die Vertiefungen der benötigten Anzahl von 24-Well-Platten gegeben. Die Platten wurden bis zum nächsten Tag im Inkubator weiter kultiviert, um ein Anwachsen der Zelle zu gewährleisten.

Substratlösung

hCYP1B1 und hCYP1B2: für die in V79MZ rekombinant exprimierten Enzyme hCYP1B1 und hCYP1B2 wurde als Substrat ³H-markiertes DOC eingesetzt. Dazu wurde ein Mix aus markiertem und unmarkiertem DOC wie folgt hergestellt: 124 µl einer unmarkierten Lösung (0,2 mM DOC in Ethanol) mit 78 µl ³H-markiertem DOC und 1098 µl Ethanol gemischt.

Von dieser Lösung wurden 2,5 µl pro Well eingesetzt, was bei einem Testvolumen von 500 µl einer Endkonzentration von 100 nM entsprach.

rCYP1B2: für das in V79MZ rekombinant exprimierte rCYP11B2 wurde als Substrat ³H-markiertes DOC eingesetzt. Dazu wurde ein Mix aus markiertem und unmarkiertem DOC wie folgt hergestellt: 257,4 µl einer unmarkierten Lösung (0,5 mM DOC in Ethanol) mit 78 µl ³H-markiertem DOC und 965,6 µl Ethanol gemischt. Von dieser Lösung wurden 2,5 µl pro Well eingesetzt, was bei einem Testvolumen von 500 µl einer Endkonzentration von 500 nM entsprach.

Die gewählten optimierten Radioaktivitätsmengen gewährleisteten eine lineare und quantitative Messung, da sie so weit wie nötig über der Detektionsgrenze lagen.

Hemmstofflösungen

Da bei dem Testvolumen von 500 µl die Zugabe an Hemmstofflösung 5 µl betragen sollte, entsprach die Verdünnung der Hemmstofflösung bei Zugabe zum Testansatz dem Faktor 100. Dementsprechend wurden die Hemmstofflösungen in einer 100-fach höheren Konzentration hergestellt, als später im Test erwünscht. Dazu erfolgte eine Einwaage (mindestens 2 mg) der Substanzen und die Herstellung einer 10 mM Stammlösung in DMSO gemäß Gleichung 2. Die weiteren Verdünnungen bis zur erwünschten Konzentration erfolgten in Ethanol. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein minimales Pipettiervolumen von 50 µl und ein Gesamtvolumen von 500 µl pro Verdünnungsschritt nicht unterschritten wurden.

$$\text{Gleichung 2: } \frac{\text{Einwaage Hemmstoff [mg]}}{\text{Molekulargewicht [g/mol]}} \cdot 10^5 = \text{Volumen DMSO in } \mu\text{l}$$

Präinkubation

Am Tag nach der Zellaussaat wurde das vorhandene Medium in den Wells der Platten abgesaugt und durch 450 µl frisches Medium ersetzt. Das Medium enthielt entweder den Hemmstoff (5 µl Hemmstofflösung in Ethanol zu 445 µl Medium) in der gewünschten Konzentration, oder nur Ethanol als Kontrolle. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls Ketoconazol (100 nM) mit getestet. Die Platten wurden daraufhin für eine Stunde im

Inkubator präinkubiert, um eine ausreichende Zellpermeation des Hemmstoffes zu gewährleisten.

Teststart

Der Test wurde durch Zugabe von 2,5 µl Substratlösung, gelöst in 50 µl Medium je Well getaktet gestartet. Danach wurden die Platten weiter im Inkubator aufbewahrt. Die Inkubationszeit für V79MZh11B1 betrug etwa 20 min, für V79MZh11B2 etwa 60 min und für V79MZr11B2 8 h. Durch die gewählten Inkubationszeiten betrug der Substratumsatz jeweils zwischen 15 % und 25 %.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt jeder Vertiefung ebenfalls getaktet entnommen, zu je 500 µl Ethylacetat in einem 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und die Steroide durch 10 minütiges kräftiges Durchmischen extrahiert. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min bei 1250 rpm). Danach wurde die obere, organische Phase entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Lösemittel in einer Speedvac bis zur Trockene abgedampft.

HPLC-Trennung und Radiodetektion

Die Proben wurden zunächst nach Zugabe von je 40 µl eines Methanol-Wasser-Gemisches (75 % Methanol) für 10 min auf einem Schüttler gelöst. Danach wurden die gebildeten radioaktiv markierten Steroide mittels HPLC chromatographisch getrennt. Als stationäre Phase wurde eine C18 Reversed Phase-Säule mit entsprechender Vorsäule eingesetzt. Die Identität der Steroide wurde in einem Vorversuch durch Vergleich der Retentionszeiten der Reinsubstanzen bei 205 nm (UV-Absorption) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µl der Proben injiziert. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus Methanol (A) und Wasser (B, H₂O bidest mit 0,1 % Ameisensäure). Um eine Baseline-Trennung der Steroide zu erhalten, wurde die Elution bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt:

0 – 4 min:	75 % A, 35% B
4 – 5 min:	100 % A
5,01 – 8,5 min:	75 % A, 35 % B
Stopp nach 9 min	

Die Detektion der Radiosignale erfolgte unter Zusatz von 0,6 ml/min Szintillatorflüssigkeit im Radioflowdetektor.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Software (ChemStation[®]), wobei die Flächen unter den erhaltenen Chromatogrammen (Area under the curve, AUC) bestimmt, und der Umsatz des Substrates DOC durch CYP11B2 (human oder Ratte) nach folgender Gleichung berechnet wurde:

$$\text{Gleichung 3: } \% P = \frac{\text{AUC}_B + \text{AUC}_{18\text{-OHB}} + \text{AUC}_{\text{ALDO}}}{\text{AUC}_{\text{DOC}}} \cdot 100$$

% P: Umsatz

AUC_B: AUC von Corticosteron (Produkt)

AUC_{18-OHB}: AUC von 18-Hydroxycorticosteron (Produkt)

AUC_{ALDO}: AUC von Aldosteron (Produkt)

AUC_{DOC}: AUC von Deoxycorticosteron (Substrat)

Bei einem Test mit *h*CYP11B1 ergab sich als einziges Produkt Cortisol.

Bestimmung der prozentualen Hemmung

Die prozentuale Hemmung, die durch einen Hemmstoff in der jeweils eingesetzten Konzentration verursacht wurde, errechnete sich nach Gleichung 4. Dabei dienten die ungehemmten Proben als Kontrollwerte.

$$\text{Gleichung 4: } \% H = \left[1 - \frac{\% S_H}{\% S_K} \right] \cdot 100$$

% H: prozentuale Hemmung

% S_H: Substratumsatz mit Hemmstoff

% S_K: Substratumsatz in Kontrolle

Es wurden jeweils Doppelwerte in mindestens zwei unabhängigen Tests bestimmt.

Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Der IC₅₀-Wert ist die Konzentration eines Hemmstoffs, die eine enzymatische Reaktion zu 50 % hemmt. Er wurde durch die Bestimmung der prozentualen Hemmung bei drei verschiedenen Hemmstoff-Konzentrationen, die im linearen Bereich der sigmoiden IC₅₀-Kurve liegen müssen (log der Hemmstoffkonzentration aufgetragen gegen prozentuale Hemmwerte), berechnet. Die Kalkulation erfolgte durch lineare Regression, dabei wurden nur Werte verwendet, bei denen die Regression der Gerade $> 0,95$ betrug. Es wurden jeweils Doppelwerte in mindestens zwei unabhängigen Tests bestimmt.

2.4 Testverfahren mit H295R

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Steroidsekretion der Zelllinie H295R, wurde der im Folgenden beschriebene Assay durchgeführt.

Aussaat der Zellen

Anzucht und Passagieren der Zelllinien erfolgten wie unter Punkt 2.1.2 und 2.1.4 beschrieben. Das Zellmaterial von mindestens zwei Kulturschalen wurde durch Trypsinbehandlung gewonnen und die Zellzahl mit Hilfe des CASY[®]TT-Zellzählgerätes (vgl. 2.1.7) bestimmt. Durch Verdünnung der Zellsuspension mit Medium wurde eine Zelldichte von 1.000.000 Zellen/ml eingestellt. Die Verdünnung wurde wie bereits unter 2.3 beschrieben, berechnet. Von der so erhaltenen Suspension mit definierter Zellzahl wurde jeweils 1 ml in die Vertiefungen der benötigten Anzahl von 24-Well-Platten gegeben. Die Platten wurden bis zum nächsten Tag im Inkubator weiter kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten.

Hemmstofflösungen

Die Herstellung der Hemmstofflösung erfolgte wie bereits unter 2.3 beschrieben.

Teststart

Am Tag nach der Zellaussaat wurde das vorhandene Medium in den Wells der Platten abgesaugt und durch 450 µl frisches Medium, allerdings ohne Serum ersetzt. Das Medium enthielt entweder den Hemmstoff (5 µl Hemmstofflösung in Ethanol zu 445 µl Medium) in der gewünschten Konzentration, oder nur Ethanol als Kontrolle. Die Platten wurden daraufhin für 6 h im Inkubator inkubiert.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt jeder Vertiefung entnommen und in Aliquoten bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Quantifizierung ausgewählter Steroide mittels spezifischer Immunoassays

Im Zellkulturüberstand wurde der Gehalt an Aldosteron und Cortisol mit Hilfe spezifischer Immunoassays quantifiziert. Zur Bestimmung der Aldosteronkonzentration wurde der ¹²⁵I-Aldosteron RIA-Kit (DRG, Marburg, vgl. 2.2.1) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Bestimmung der Cortisolkonzentration wurde der Cortisol EIA-Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, siehe 2.2.2) gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

Bestimmung der prozentualen Hemmung und des IC₅₀-Wertes

Die Bestimmung der prozentualen Hemmung und des IC₅₀-Wertes erfolgte wie bereits unter 2.3 beschrieben.

2.5 Miniaturisiertes Testverfahren mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2 im 96 Well-Format mit radioaktiv markiertem Substrat

Um den Durchsatz an zu testenden Verbindungen zu erhöhen, sollten die bereits etablierten, im 24-Well-Format durchgeführten zellulären V79MZh11B1- und V79MZh11B2-Assays miniaturisiert werden. Dazu wurden verschiedene Parameter an das neue 96-Well-Format angepasst.

Aussaat der Zellen

Anzucht und Passagieren der Zelllinien erfolgten wie unter Punkt 2.1.1 und VII.2.1.3 beschrieben. Das Zellmaterial einer Kulturschale wurde durch Trypsinbehandlung gewonnen und die Zellzahl mit Hilfe des CASY[®]TT-Zellzählgerätes (vgl. 2.1.7) bestimmt. Durch Verdünnung der Zellsuspension mit Medium wurde für jede Zelllinie eine Zelldichte von $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Berechnung der Verdünnung erfolgte wie bereits unter Punkt 2.3 beschrieben.

Von den so erhaltenen Suspensionen mit definierter Zellzahl wurden jeweils 250 µl in die Vertiefungen der 96-Well-Platten gegeben. Die Platten wurden bis zum nächsten Tag im Inkubator weiter kultiviert, um ein Anwachsen der Zelle zu gewährleisten.

Substratlösung DOC

hCYP1B1 und hCYP1B2: für die in V79MZ rekombinant exprimierte Enzyme hCYP11B1 und hCYP11B2 wurde als Substrat ³H-markiertes DOC eingesetzt. Um die spätere Detektion zu gewährleisten, wurde die Menge an radioaktiv markiertem Substrat im Vergleich zur eingesetzten Menge im 24-Well Format entsprechend erhöht. Dazu wurde ein Mix aus markiertem und unmarkiertem DOC wie folgt hergestellt: 124 µl einer unmarkierten Lösung (0,2 mM DOC in Ethanol) mit 156 µl ³H-markiertem DOC (60 Ci/mmol, 1 mCi/ml) und 1020 µl Ethanol gemischt. Von dieser Lösung wurden 2,5 µl pro Well eingesetzt, was bei einem Testvolumen von 100 µl einer Endkonzentration von 100 nM entsprach.

Substratlösung RSS

hCYP1B1: für das in V79MZ rekombinant exprimierte Enzym hCYP11B1 sollte im Rahmen der Miniaturisierung auch die Konversion des natürlichen Substrates RSS untersucht werden. Dazu wurde entsprechend der bereits oben beschriebenen Substratlösung ³H-markiertes RSS eingesetzt. Die Endkonzentration im Well sollte dabei 250 nM betragen. Dazu wurden von einer ³H-markierten RSS-Lösung (1 mCi/ml, 3 Ci/mmol) 0,19 µl pro Well eingesetzt, was bei einem Testvolumen von 250 µl einer Endkonzentration von 250 nM entsprach.

Hemmstofflösungen/Präinkubationslösungen

Auch bei dem gewählten Gesamttestvolumen von 250 µl sollte die Verdünnung der Hemmstofflösung bei Zugabe zum Testansatz dem Faktor 100 entsprechen. Dabei sollte das zu pipettierende Volumen an Hemmstoff aufgrund der Genauigkeit und besseren Handhabung nicht weniger als 5 µl betragen. Deshalb erfolgte die Herstellung von 500 µl Präinkubationslösung entsprechend der beim 24-Well-Test (siehe 2.3). Von der so hergestellten Lösung (5 µl Hemmstoff in Ethanol zu 495 µl Medium) wurden 225 µl zur Präinkubation eingesetzt. Einwaage, Herstellung einer 10 mM Stammlösung in DMSO sowie alle weiteren Verdünnungen erfolgten ebenfalls wie unter Punkt 2.3 beschreiben.

Präinkubation

Am Tag nach der Zellaussaat wurde das vorhandene Medium in den Wells der Platten abgesaugt und durch 225 µl frisches Medium (Präinkubationslösung) ersetzt. Das Medium enthielt entweder den Hemmstoff (2,5 µl Hemmstofflösung in Ethanol in 222,5 µl Medium) in der gewünschten Konzentration, oder nur Ethanol als Kontrolle. Die Platten wurden daraufhin für eine Stunde im Inkubator präinkubiert, um eine ausreichende Zellpermeation des Hemmstoffes zu gewährleisten.

Teststart

Der Test wurde durch Zugabe von 1,25 µl Substratlösung, gelöst in 25 µl Medium je Well getaktet gestartet. Danach wurden die Platten weiter im Inkubator aufbewahrt. Die Inkubationszeit für V79MZh11B1 betrug etwa 50 min, für V79MZh11B2 etwa 100 min. Durch die gewählten Inkubationszeiten betrug der Substratumsatz jeweils zwischen etwa 20 %.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt jeder Vertiefung ebenfalls getaktet entnommen, zu je 250 µl Ethylacetat in einem 1,5 ml Eppendorfgesäß gegeben und die Steroide durch 10 minütiges kräftiges Durchmischen extrahiert. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min bei 1250 rpm). Danach wurde die obere,

organische Phase entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Lösemittel in einer Speedvac bis zur Trockene abgedampft.

HPLC-Trennung und Radiodetektion mit dem Substrat DOC; Bestimmung der prozentualen Hemmung und Bestimmung des IC₅₀-Wertes

HPLC-Trennung, Radiodetektion und Auswertung erfolgten wie unter 2.3 beschrieben. Auch die Bestimmung der prozentualen Hemmung und der IC₅₀-Werte erfolgte dementsprechend.

HPLC-Trennung und Radiodetektion mit dem Substrat RSS

Die Proben wurden zunächst nach Zugabe von je 40 µl eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (40 % Acetonitril) für 10 min auf einem Schüttler gelöst. Danach wurden die gebildeten radioaktiv markierten Steroide mittels HPLC chromatographisch getrennt. Als stationäre Phase wurde eine C18 Reversed Phase-Säule mit entsprechender Vorsäule eingesetzt. Die Identität der Steroide wurde in einem Vorversuch durch Vergleich der Retentionszeiten der Reinsubstanzen bei 205 nm (UV-Absorption) bestimmt. Es wurden jeweils 10 µl der Proben injiziert. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril (A) und Wasser (B, H₂O bidest mit 0,1 % Ameisensäure). Um eine Baseline-Trennung der Steroide zu erhalten, wurde die Elution bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt:

0 min:	42 % A, 58 % B
1-2 min:	50 % A, 50 % B
3 – 4 min:	100 % A
4,01 – 5,5 min:	42 % A, 58 % B
Stopp nach 6 min	

Die Detektion der Radiosignale erfolgte unter Zusatz von 0,6 ml/min Szintillatorflüssigkeit im Radioflowdetektor. Die Bestimmung der prozentualen Hemmung und der IC₅₀-Werte erfolgte wie unter 2.3 beschrieben.

2.6 Miniaturisiertes Testverfahren mit V79MZh11B1 und V79MZh11B2 im 96 Well-Format ohne radioaktiv markiertes Substrat

Um Bearbeitungszeit und Kosten zu reduzieren, sollte das bisher verwendete radioaktiv markierte Substrat durch nicht radioaktives Substrat ersetzt werden. Die gebildeten Steroide sollten mit Hilfe einer HTRF[®]-Nachweismethode quantifiziert werden. Dazu wurden kommerziell erhältliche Kits der Firma Cisbio verwendet.

Aussaat der Zellen

Anzucht und Passagieren und Aussaat der Zelllinien erfolgten wie unter 2.3 beschrieben.

Substratlösung

hCYP11B1: für das in V79MZ rekombinant exprimierte Enzym hCYP11B1 wurde als Substrat RSS in einer Endkonzentration von 250 nM eingesetzt

hCYP11B2: für die in V79MZ rekombinant exprimierte Enzym hCYP11B2 wurde als Substrat DOC in einer Endkonzentration von 125 nM eingesetzt

Hemmstofflösungen/Präinkubation

Herstellung der Hemmstofflösungen, Präinkubationslösungen und die Präinkubation erfolgten wie unter Punkt 2.3 beschrieben.

Teststart

Der Test wurde durch Zugabe von 1,25 µl Substratlösung, gelöst in 25 µl Medium je Well getaktet gestartet. Danach wurden die Platten weiter im Inkubator aufbewahrt. Die Inkubationszeit für V79MZh11B1 betrug etwa 50 min, für V79MZh11B2 etwa 100 min. Durch die gewählten Inkubationszeiten lag der Substratumsatz in einem gut detektierbaren Bereich. Hier betrug der Substratumsatz jeweils zwischen 15 und 25 %.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 100 µl jeder Vertiefung ebenfalls getaktet entnommen, und in eine frische 96-Well Platte gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, den Zellmonolayer nicht zu zerstören, um ein Verschleppen der Zellen zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur Quantifizierung der Steroide auf Eis gelagert.

Quantifizierung der Steroide mittels HTRF®

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Herstellerangaben und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer und Reagenzien. Dazu wurden jeweils 10 µl des Standards oder der Probe in eine 384-Well-Platte (Low Volume) vorgelegt. Danach wurden jeweils 5 µl der den Akzeptor enthaltenen Lösung (Cortisol-D2 oder Aldosteron XL665) und 5 µl der entsprechenden Kryptatlösung (Aldosteron- bzw. Cortisol-Kryptat) zugegeben. Um die Stabilität des Assays zu überprüfen, wurden zusätzlich zwei Kontrollen (jeweils Doppelwerte) mitgeführt: eine Negativkontrolle, die nur Kryptat enthielt (maximaler Delta F%-Wert) und eine Positivkontrolle, bei der die Probe bzw. der Standard durch die entsprechende Menge Puffer ersetzt wurde (kein Energietransfer). Für jeden Punkt der Kalibrationskurve wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platten wurden mit einer Klebefolie verschlossen und für 1 h (Aldosteron) bzw. 2 h (Cortisol) bei RT inkubiert. Danach wurden eventuelle die Luftblasen durch kurzes Abzentrifugieren bei 1000 rpm entfernt, welche die nachfolgende Messung stören würden. Die Folie wurde vorsichtig entfernt und die Messungen mit einem Mikrotiterplatten-Reader der Firma BMG Labtech mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Anregungswellenlänge:	320 nm
Emmissionswellenlänge 1 (Donor):	620 nm
Emmissionswellenlänge 2 (Akzeptor):	665 nm
Verzögerungszeit:	150 µs
Integrationszeit:	450 µs
Wartezeit:	0,2 s
Anzahl Blitze:	100
z-Position	10

Das Europiumkryptat wurde mit Licht einer Wellenlänge von 320 nm angeregt. Die Emission des Akzeptormoleküls wurde bei 665 nm gemessen, während die Emission von

Europiumkryptat bei 620 nm gemessen wurde. Aus diesen beiden Emissionsmessungen wurde ein Quotient gebildet und der relative Energietransfer Delta F% unter Einbeziehung des Wertes der Negativkontrolle (neg) nach folgender Formel mit Hilfe der Datenanalyse-Software Omega/MARS Data Analysis (BMG Labtech) berechnet (4-Parameter-Fit-Funktion; wobei der „fit“ iterativ durch einen Simplexalgorithmus entwickelt wird, bis ein Minimum in der Summe der Standardabweichungen erreicht wird):

$$\text{Gleichung 5: Delta F\%} = \frac{\text{Kalibrator oder Probenratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \cdot 100$$

$$\text{Ratio} = \frac{A_{665}}{B_{620}} \cdot 10^4$$

Die Negativkontrolle spielt dabei die Rolle einer internen Assaykontrolle. Die berechneten Delta F%-Werte wurden als Funktion der Analytenkonzentrationen aufgetragen. Da es sich beim HTRF[®]-Assay um einen kompetitiven Immunoassay handelt, erhält man eine sigmoide Kurve mit negativer Steigung.

Die Tests wurden nur ausgewertet, wenn die Messergebnisse der mitgelieferten Kontrollen im vom Hersteller angegebenen Sollbereich lagen.

2.7 Testverfahren mit Zellhomogenat aus V79MZh11B1 und V79MZh11B2 (radioaktiv markiertes Substrat)

Um Aktivität (*hCYP11B2*) und Selektivität (*hCYP11B1*) der Hemmstoffe in einem zellfreien Assay zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Assays durchgeführt. Als Enzymquelle dienten die aus den Zelllinien V79MZh11B1 und V79MZh11B2 hergestellten Zellhomogenate (vgl. 2.1.8). Die benötigte Anzahl der bei -80 °C gelagerten Aliquots wurden schonend auf Eis aufgetaut.

Substratlösung und Hemmstofflösungen

Die Substratlösung und Hemmstofflösungen wurde wie unter Punkt 2.3 beschrieben hergestellt.

Präinkubation

Der Assay wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die einzelnen Komponenten des regenerierenden Systems wurden wie unter 1.6. beschrieben in Assaypuffer angesetzt und 20 min vor Gebrauch gemischt. Jeder Testansatz bestand aus regenerierendem System (100 µl) und Zellhomogenat (V79MZh11B1: 25 µl und V79MZh11B2: 50 µl). Die Ansätze wurden mit Assaypuffer zu einem Gesamtvolumen von 450 µl aufgefüllt. Dabei enthielt der Assaypuffer entweder den Hemmstoff (5 µl Hemmstofflösung in Ethanol) in der gewünschten Konzentration oder nur Ethanol als Kontrolle. Die Ansätze wurden für 10 min bei 37 °C im Schüttler (120 rpm) präinkubiert.

Teststart

Der Test wurde in jedem Reaktionsansatz durch Zugabe von 2,5 µl Substratlösung, gelöst in 50 µl Assaypuffer getaktet gestartet. Danach wurden die geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäße weiter im Schüttler bei 37 °C aufbewahrt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 90 min, so dass der Substratumsatz etwa 20 - 25 % betrug.

Teststopp, HPLC-Trennung und Radiodetektion

Teststopp, HPLC-Trennung und Radiodetektion der Proben erfolgte wie bereits unter 2.3 beschrieben.

RSS Cortisolmix, Trennmethode HPLC (B1: Substrat RSS): A: ACN, B: H₂O

0 min:	42 % A, 58 % B
1-2 min:	50 % A, 50 % B
2-4 min :	100 % A
4-5,1 min:	42 % A, 58 % B
Stopp nach 5,5 min	

2.8 Testverfahren mit ganzen Nebennieren oder Nebennieren-Fragmenten verschiedener Spezies

Um die Hemmwirkung ausgewählter Substanzen auf die Aldosteronbiosynthese an weiteren Spezies zu untersuchen, wurden entweder an Nebennieren-Fragmenten oder ganzen

Nebennieren von Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte und Hamster weitere Tests durchgeführt.

Dazu wurden die Nebennieren nach der Entnahme in eisgekühltem PBS kurzweilig bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurden die Nebennieren unter Eiskühlung so gut wie möglich von Fett und Bindegewebe befreit. Dabei war darauf zu achten, die Nebennierenkapsel mit dem Skalpell nicht zu beschädigen. Die Nebennieren von Ratte, Meerschweinchen und Hamster wurden im Ganzen im Test eingesetzt. Die Kaninchennebenieren wurden in 16 etwa gleichgroße Stücke geschnitten. Dabei sollte der jeweilige Anteil an Mark und Rinde der Stücke in etwa gleich sein.

Durchführung

Der Test wurde in verschiedenen Formaten, begründet durch die unterschiedlichen Organgrößen durchgeführt. Dabei wurden die Tests mit den Nebennieren von Ratte, Hamster und Kaninchen im 48-Well-Format mit einem Gesamtvolumen von 500 µl pro Well und der Test mit den Meerschweinchennebenieren im 24-Well-Format mit einem Gesamtvolumen von 750 µl pro Well durchgeführt. Dabei wurden 16-tel Stücke der Kaninchennebenieren je zu acht (entspricht einer halben Nebenniere) randomisiert in den Wells der Platten gepoolt. Als Medium diente DMEM, das auch für den zellulären Assay mit V79MZ-Zellen eingesetzt wurde. Zu den äußeren Wells wurde jeweils aufgrund der Verdunstung nur Medium gegeben.

Hemmstofflösungen

Die Verdünnung der Hemmstofflösungen bei Zugabe zum Testansatz sollte dem Faktor 100 entsprechen. Dementsprechend wurden die Hemmstofflösungen in einer 100-fach höheren Konzentration hergestellt, als später im Test erwünscht. Dazu erfolgte eine Einwaage (mindestens 2 mg) der Substanzen und die Herstellung einer 10 mM oder 50 mM Stammlösung (je nach Endkonzentration) in DMSO gemäß Gleichung 2 (2.3). Die weiteren Verdünnungen bis zur gewünschten Konzentration erfolgten in Ethanol.

Präinkubation

Die Nebennieren oder Nebennierenfragmente wurden zu Medium gegeben, das entweder den Hemmstoff in der gewünschten Konzentration, oder nur Ethanol (bei höheren Konzentrationen auch die entsprechende Menge an DMSO) als Kontrolle enthielt. Die Platten wurden daraufhin für eine Stunde im Inkubator präinkubiert, um eine ausreichende Zellpermeation des Hemmstoffes zu gewährleisten.

Teststart

Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl Substratlösung je Well gestartet (bei 500 µl: 47,5 µl Medium + 2,5 µl ³H-DOC-Mix, bzw. bei 750 µl: 46,25 µl Medium + 3,75 µl ³H-DOC-Mix). Die Endkonzentration an DOC betrug 100 nM pro Well. Danach wurden die Platten weiter im Inkubator aufbewahrt. Aufgrund von Vorversuchen zur Ermittlung des Substratumsatzes (Daten nicht gezeigt) wurden die Inkubationszeiten wie folgt festgelegt:

Ratte, Meerschweinchen und Hamster: 8 h

Kaninchen: 90 min

Die Platten wurden währenddessen etwa alle 45 min geschwenkt. Durch die gewählten Inkubationszeiten betrug der Substratumsatz der Kontrollen jeweils zwischen 13 % und 38 %.

Teststopp

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt jeder Vertiefung ebenfalls getaktet entnommen, zu je dem gleichen Volumen an Ethylacetat in einem 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und die Steroide durch 10 minütiges kräftiges Durchmischen extrahiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie bereits unter 2.3 beschrieben.

HPLC-Trennung, Radiodetektion und Bestimmung der prozentualen Hemmung

HPLC-Trennung, Radiodetektion und Bestimmung der prozentualen Hemmung erfolgten wie bereits unter 2.3 beschrieben.

2.9 Überprüfung der chemischen Stabilität

Durchführung

Für die Untersuchung der chemischen Stabilität bzw. das Maß der Degradierung ausgewählter Substanzen wurden zunächst verschiedene wässrige Puffersysteme (pH 1,2 bis 10) hergestellt. Dazu wurden aus folgenden Substanzen jeweils 0,05 M Lösungen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt und der gewünschte pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

KCl-Puffer (HCl), pH 1,2

KCl-Puffer (HCl), pH 2,0

$\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$ -Puffer (HCl), pH 4,0

KH_2PO_4 -Puffer (NaOH), pH 7,4

KCl/ H_3BO_3 -Puffer (NaOH), pH 10

Die Herstellung der Stammlösungen (2 mM) der Substanzen **SL242** und **SL272** erfolgte in DMSO. Aus diesen wurde anschließend jeweils 20 μl entnommen und in einem Schnappdeckelglas mit den verschiedenen Pufferlösungen auf 2000 μl aufgefüllt (jeweils zwei Ansätze pro Puffer). Die resultierenden Assaylösungen mit definierten pH-Werten (Endkonzentration der zu untersuchenden Substanzen 20 μM) wurden jeweils bei RT auf einem Schüttler oder bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden jeweils 100 μl Aliquots entnommen und zu 900 μl Neutralisationspuffer gegeben und gemischt. Davon wurde je ein Aliquot 1:1 mit DMSO versetzt und die Konzentration der Substanz mittels LC/MS-MS analysiert. Die Standards zur Erstellung der jeweiligen Kalibrierkurve zur Quantifizierung wurden entsprechend den Proben angefertigt.

LC/MS-MS-Analytik

Die Elution wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt (A: Acetonitril; B: Ammoniumacetatpuffer):

0 min:	98 % A, 2 % B
1-6 min:	50 % A, 50 % B
6,0-8 min:	100 % B
8,01-9 min:	98 % A, 2 % B
Stopp nach 10 min	

Folgende Parameter wurden bei der Methodenentwicklung etabliert und für alle Messungen verwendet:

Positiver Ionisierungsmodus, Ionisierungsspannung 4,2 kV, Schutzgasdruck (N_2) $4,0 \times 10^5$ Pa, Hilfgasdruck $1,0 \times 10^5$ Pa, Temperatur der Kapillare: 400 °C.

Kollisionsexperimente wurden mit den Standard-Instrument-Parametern unter Verwendung einer Kollisionsenergie von 35 V, einer kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) von 10 V und einem Kollisionsgasdruck (Ar) von 1,5 mTorr durchgeführt.

2.10 Überprüfung der metabolischen Stabilität *in vitro* mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

Durchführung

Zur Bestimmung der metabolischen Stabilität wurden Lebermikrosomen-Präparationen verschiedener Spezies (Mensch, Ratte, Hamster, Hund) verwendet. Dazu wurden mehrere identische Ansätze der zu untersuchenden Substanzen (Endkonzentration 1 μ M) zusammen mit den Mikrosomen der jeweiligen Spezies bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Jeder Inkubationsansatz (180 μ l) enthielt 90 μ l einer Mikrosomensuspension bestimmter Proteinkonzentration (Ratte, Hund, Hamster: 0,5 mg/ml; Mensch: 0,75 mg/ml) in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) und 90 μ l eines NADP-regenerierenden Systems (NADP: 1 mM, Glucose-6-Phosphat: 5 mM, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase: 5 U/ml, $MgCl_2$: 5 mM). Dieser Ansatz wurde etwa 20 min vor Reaktionsstart bei RT präinkubiert.

Teststart

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l der zu testenden Substanz (Stocklösung: 10 nM in ACN verdünnt auf 20 % in ACN) gestartet. Zusätzlich wurden jeweils zwei Negativkontrollen (zuvor für 30 min im Wasserbad gekochte Mikrosomen ohne regenerierendes System) und zwei Positivkontrollen (Diphenhydramin und Diazepam) mitgeführt.

Teststopp

Nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30 und 60 min, jeweils Doppelwerte, Negativkontrolle: 60 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl eisgekühltem Acetonitril gestoppt, welches einen internen Standard (Erythromycin, 1 µM in ACN) enthielt. Nach kurzem kräftigen Durchmischen und anschließender Zentrifugation bei 5000 g wurde der erhaltene Überstand bei -20 °C gelagert oder direkt zur LC-MS/MS-Analytik eingesetzt (vgl. 2.2.6). Die Wiederfindungsrate wurde in der gleichen Matrix bestimmt und lag für alle Substanzen über 60 % (Daten nicht gezeigt). Entsprechende Proben der Substanzen zur Erstellung von Kalibriergeraden wurden hergestellt und ebenfalls per LC/MS-MS analysiert.

Zur Berechnung der verbleibenden Menge der Substanz wurden die Peakflächen verglichen. Die Menge an verbleibender Substanz in den Proben wurde als verbleibender Prozentsatz im Vergleich zum Zeitpunkt Null (100 % = Ansatz, bei dem die Inkubation mit Acetonitril sofort gestoppt wurde) ausgedrückt. Diese verbleibenden Anteile wurden grafisch gegen die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen. Parallel dazu wurden weitere Kontrollansätze mitgeführt um zu zeigen, dass die Abnahme der Substanz nur durch den mikrosomalen Abbau verursacht wurde. Zusätzlich wurden als Referenzsubstanzen bzw. als Positivkontrollen zum Prüfen der enzymatischen Aktivität der Mikrosomenpräparationen Diazepam und Diphenhydramin in gleicher Weise eingesetzt wie die zu untersuchenden Substanzen. Zur Berechnung der Halbwertszeit wurde der verbleibende Anteil der Substanz in Prozent grafisch gegen die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen.

Die mikrosomale intrinsische Clearance (CL_{int}) ist die maximale Aktivität der Leber (mikrosomale Proteine) gegenüber einer Substanz in Abwesenheit anderer physiologischer Faktoren, wie z. B. Durchblutung der Leber oder Proteinbindung.¹⁵² Sie wurde berechnet auf Grundlage der Abnahme der Ausgangskonzentration. Dazu wurde die Steigung (-k) der Regressionsgeraden aus dem Logarithmus der Testsubstanz und den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt. Die Eliminationskonstante k entspricht $\ln 2/t_{1/2}$ (Kinetik erster Ordnung). Danach kann die CL_{int} nach folgender Formel berechnet werden:

Gleichung 6: $CL_{int} = k \cdot V \cdot f_u$ [µl/min/mg Protein]

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

V = Inkubationsvolumen [µl] / mikrosomale Proteinkonzentration [mg]

f_u = ungebundene Fraktion, hier 1

LC/MS-MS-Analytik

Folgende Parameter wurden bei der Methodenentwicklung etabliert und für alle Messungen verwendet:

Positiver Ionisierungsmodus, Ionisierungsspannung 4,2 kV, Schutzgasdruck (N₂) 4,0 x 10⁵ Pa, Hilfsgasdruck 1,0 x 10⁵ Pa, Temperatur der Kapillare: 400 °C.

Kollisionsexperimente wurden mit den Standard-Instrument-Parametern unter Verwendung einer Kollisionsenergie von 35 V, einer kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) von 10 V und einem Kollisionsgasdruck (Ar) von 1,5 mTorr durchgeführt.

Alle Proben wurden mit Hilfe eines Autosamplers injiziert (Surveyor[®], Thermo Finnigan) mit einem Injektionsvolumen von 15 µl. Als stationäre Phase diente eine RP C18 NUCLEODUR[®] 100-3 (125 x 3 mm) Säule (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland). Die mobile Phase bestand aus Ammoniumacetatpuffer (A, 10 nM) und Acetonitril (B) mit jeweils 0,1 % v/v Trifluoressigsäure (TFA). Dabei diente der Zusatz von 0,1 % TFA der Erhöhung der Ionisierungsausbeute.

Die Elution wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit dem gleichen Gradientenprogramm durchgeführt, wie bereits unter 2.9 beschrieben.

2.11 Bestimmung der Metaboliten

Durchführung

Die Durchführung erfolgte wie bereits unter 2.10 beschrieben mit geringfügigen Modifikationen. Die Inkubation der Substanzen mit Mikrosomen verschiedener Spezies (Mensch, Ratte, Hund, Hamster) fand hier über einen längeren Zeitraum statt (Ratte 120 min, Hamster, Mensch und Hund 240 min) mit höherer Protein- (1,33 mg/ml) und Substanzkonzentrationen (20 µM). Pro Spezies wurden insgesamt 12 Ansätze hergestellt und die erhaltenen Überstände vereinigt, aufkonzentriert und zur LC/MS-MS Analytik eingesetzt.

LC/MS-MS-Analytik

Die Metaboliten wurden mittels HPLC-DAD-MS/MS analysiert. Dazu erfolgte zunächst die Aufnahme eines Chromatogrammes beim Absorptionsmaximum (λ_{\max}) der zu untersuchenden Substanz (Muttersubstanz). Gleichzeitig fand eine Aufzeichnung der Full Scan-Massenspektren im positiven ESI-Modus statt. Es wurde nach den möglichen Molpeaks $[M+H]^+$ der Analyten in einem Bereich von m/z 200 bis 350 gesucht. Zu den im UV-Chromatogramm identifizierten Metabolitenpeaks wurden im Totalionen-Chromatogramm die zugehörigen prädominanten Massen ermittelt und die Peakübereinstimmungen anschließend im Einzelionen-Chromatogramm verifiziert. Die Quantifizierung der identifizierten Metabolite erfolgte bezüglich ihrer relativen Peakfläche im UV-Chromatogramm, bezogen auf die Muttersubstanz.

Die Einstellungen zur LC/MS-MS Analytik entsprachen denen, wie bereits unter 2.10. beschrieben. Die Elution wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit folgendem Gradientenprogramm durchgeführt:

0 min:	98 % A, 2 % B
11-12 min:	50 % A, 50 % B
12,01-17 min:	100 % B
17,01-19 min:	98 % A, 2 % B
Stopp nach 20 min	

2.12 *In vivo*-Versuche

Bei den Studien wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 250 – 350 g eingesetzt. Diese wurden in einem separaten, klimatisierten Raum bei 20 – 24 °C bei einem 12-stündig alternierenden Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Die Implantation eines permanenten Silikonkatheters in die Halsvene der Tiere erfolgte bereits zwei Tage vor der Hemmstoffapplikation. Dazu wurden die Tiere mit einer Mischung aus Ketamin (90 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) narkotisiert. Dieser Katheter ermöglichte die berührungsfreie und somit möglichst stressfreie Blutentnahme im gesamten Verlauf der

Studie. Nach jeder Blutentnahme wurde jeweils zum Ausgleich des Volumenverlustes die entsprechende Menge an physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

Zur Bestimmung der Aldosteron- bzw. Hemmstoffkonzentration im Plasma wurden die Blutproben jeweils in heparinhaltige Spritzen gezogen (15 ml, 500 IE/ml), in Röhrchen überführt und bis zur Koagulation bei RT aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 645 g und 4 °C für 10 min. Das so gewonnene Serum (Überstand) wurde bis zur Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Konzentration der Substanz **SL242** im Plasma, wurde den Proben zur Proteinfällung ACN (mit internem Standard) zugesetzt. Nach kräftigem Durchmischen für 30 s wurden die Proben für 10 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden die Proteine für 5 min bei 5000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Danach erfolgte die Analytik per LC-MS/MS. Die Standards zur Erstellung der Kalibrierkurven der Verbindung wurden unter Verwendung von blank-Plasma angefertigt.

Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der Software „PK-Solutions 2.0 (Summit Research Services, Montrose USA). Die Aufnahme einer Plasmaspiegel-Zeit-Kurve ermöglicht die Bestimmung verschiedener kinetischer Parameter.

Die Aldosteronkonzentrationen in den einzelnen Plasmaproben wurde mit einem kommerziell erhältlichen ¹²⁵I-RIA-Kit (DRG, Marburg) nach Herstellerangaben bestimmt (siehe 2.2.1). In jedem Assay wurden auch Kontrollen sowohl mit hoher, als auch mit niedriger Aldosteronkonzentration mit gemessen. Die Ergebnisse der Kontrollen lagen innerhalb des vom Hersteller angegebenen Vertrauensbereiches.

2.12.1 Bioverfügbarkeit

Die peroralen Applikation der Substanz erfolgte mit den beiden Wirkstoffträgern PEG400 und Labrasol®.

Der Hemmstoff **SL242** wurde intravenös (1 mg/kg in PEG400/PBS 1:1) und peroral (5 mg/kg, 25 mg/kg und 50 mg/kg in PEG400 oder 25 mg/kg in Labrasol/Wasser 1:1) jeweils vier männlichen katheterisierten Wistar-Ratten verabreicht (Ausnahme 25 mg/kg: n = 6). Die Blutentnahmen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: Predose (vor der

Applikation), 5 (nur i. v.), 15, 30, 45, 60 min, 2, 3, 4, 6, 8 und 24 h. Die Bestimmung der Konzentration der Substanz **SL242** im Plasma erfolgte, wie bereits unter 2.10 beschrieben.

2.12.2 Aktivität nach peroraler Applikation

Bereits zwei Wochen vor der eigentlichen Studie wurden die Tiere an das experimentelle Handling gewöhnt, um den Stress der Tiere während der Versuche so gering wie möglich zu halten. Dies war dringend erforderlich, da Stress die Testergebnisse aufgrund seines Einflusses auf den Hormonhaushalt verfälschen würde.

Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: mit ACTH-stimulierte Kontrollgruppe (ihnen wurde nur das Vehikel verabreicht) und ACTH-stimulierte, mit Hemmstoff behandelte Gruppe von Tieren. Zur Bestimmung der individuellen basalen Plasma-Aldosteronspiegel der Tiere wurden die ersten Blutproben (400 µl, Predose) bereits 18 h vor der Verabreichung des Inhibitors entnommen. 16 h vor der peroralen Gabe der Substanz **SL242** bzw. des Vehikels wurde den Tieren eine Dosis ACTH (1 mg/kg; 1 ml/kg als Synacthene Depot, Novartis) s. c. verabreicht. Dies diente der Stimulation Corticoidbiosynthese. Nach der Verabreichung des Inhibitors (n = 6) bzw. des Vehikels (n = 6) (Positivkontrolle) über eine Schlundsonde, erfolgten weitere Entnahmen von Blutproben (jeweils 500 µl) nach 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 h. Die Plasmaproben wurden geteilt, und wie bereits beschrieben zur Ermittlung der Konzentration von Hemmstoffen und Aldosteron eingesetzt.

2.12.3 Unstimuliertes Rattenmodell

Hierzu wurden katheterisierte männliche Wistar-Ratten (n = 6 Tiere pro Gruppe) entweder mit **SL242** (1 mg/kg in PEG400/PBS 1:1, 2 ml/kg) oder ohne Testsubstanz (nur PEG400/PBS 1:1, 2 ml/kg) einmalig intravenös behandelt und die gewonnenen Plasmaproben zur Bestimmung der Aldosteronspiegel mittels RIA eingesetzt (siehe 2.2.1).

2.12.4 Applikation über mehrere Tage

Katheterisierte männliche Wistar-Ratten (n = 6 Ratten pro Gruppe) wurden p. o. über einen Zeitraum von 5 Tagen mit dem Vehikel (PEG400, 5 ml/kg) oder mit der Testsubstanz **SL242** (25 mg/kg in PEG400, 5 ml/kg) jeweils einmal täglich behandelt. Die Blutentnahmen erfolgten immer eine Stunde vor Applikation, eine Stunde und zwei Stunden nach

Applikation über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die Plasmaproben wurden geteilt und wie bereits beschrieben, zur Ermittlung der Plasmakonzentrationen der Substanz **SL242** und der Aldosteronkonzentration verwendet.

VIII Literaturverzeichnis

1. Müller, J., Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin. *Verlag G. Eichler* **1836**.
2. Simpson, S. A.; Tait, J. F.; Wettstein, A.; Neher, R.; Von Euw, J.; Schindler, O.; Reichstein, T., [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid]. *Experientia* **1954**, 10, (3), 132-133.
3. Lieberman, S.; Lin, Y. Y., Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450 (sc). *J Steroid Biochem Mol Biol* **2001**, 78, (1), 1-14.
4. Nussdorfer, G. G.; Rossi, G. P.; Mazzocchi, G., Role of adrenomedullin and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* **1997**, 18, (7), 1079-1089.
5. Hanke, C. J.; O'Brien, T.; Pritchard, K. A., Jr.; Campbell, W. B., Inhibition of adrenal cell aldosterone synthesis by endogenous nitric oxide release. *Hypertension* **2000**, 35, (1 Pt 2), 324-328.
6. Fuchs-Hammoser, R.; Schweiger, M.; Oelkers, W., The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1-24) on renin, renin-substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete man. *Acta Endocrinol (Copenh)* **1980**, 95, (2), 198-206.
7. Holland, O. B.; Carr, B., Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology* **1993**, 132, (6), 2666-2673.
8. Aguilera, G.; Kiss, A.; Lu, A.; Camacho, C., Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr Res* **1996**, 22, (4), 433-443.
9. Farman, N.; Rafestin-Oblin, M. E., Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* **2001**, 280, (2), F181-192.
10. Bruner, K. L.; Derfoul, A.; Robertson, N. M.; Guerriero, G.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E. S.; Litwack, G., The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* **1997**, 7, (2), 85-98.
11. Couette, B.; Jalaguier, S.; Hellal-Levy, C.; Lupo, B.; Fagart, J.; Auzou, G.; Rafestin-Oblin, M. E., Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **1998**, 12, (6), 855-863.
12. Binart, N.; Lombes, M.; Rafestin-Oblin, M. E.; Baulieu, E. E., Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, (23), 10681-10685.
13. Pratt, W. B.; Toft, D. O., Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **1997**, 18, (3), 306-360.

14. Staruschenko, A.; Patel, P.; Tong, Q.; Medina, J. L.; Stockand, J. D., Ras activates the epithelial Na⁽⁺⁾ channel through phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J Biol Chem* **2004**, 279, (36), 37771-37778.
15. Soundararajan, R.; Zhang, T. T.; Wang, J.; Vandewalle, A.; Pearce, D., A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* **2005**, 280, (48), 39970-39981.
16. Doolan, C. M.; Harvey, B. J., Modulation of cytosolic protein kinase C and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon. *J Biol Chem* **1996**, 271, (15), 8763-8767.
17. Moura, A. M.; Worcel, M., Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* **1984**, 6, (3), 425-430.
18. Spach, C.; Streeten, D. H., Retardation of Sodium Exchange in Dog Erythrocytes by Physiological Concentrations of Aldosterone, in Vitro. *J Clin Invest* **1964**, 43, 217-227.
19. Romagnì, P.; Rossi, F.; Guerrini, L.; Quirini, C.; Santemma, V., Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis* **2003**, 166, (2), 345-349.
20. Schmidt, B. M.; Oehmer, S.; Delles, C.; Bratke, R.; Schneider, M. P.; Klingbeil, A.; Fleischmann, E. H.; Schmieder, R. E., Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension* **2003**, 42, (2), 156-160.
21. Gekle, M.; Golenhofen, N.; Oberleithner, H.; Silbernagl, S., Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (19), 10500-10504.
22. Oberleithner, H.; Weigt, M.; Westphale, H. J.; Wang, W., Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange and raises cytoplasmic pH in target cells of the amphibian kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (5), 1464-1468.
23. Grossmann, C.; Benesic, A.; Krug, A. W.; Freudinger, R.; Mildenerger, S.; Gassner, B.; Gekle, M., Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* **2005**, 19, (7), 1697-1710.
24. Falkenstein, E.; Tillmann, H. C.; Christ, M.; Feuring, M.; Wehling, M., Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **2000**, 52, (4), 513-556.
25. Michea, L.; Delpiano, A. M.; Hitschfeld, C.; Lobos, L.; Lavandero, S.; Marusic, E. T., Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* **2005**, 146, (3), 973-980.
26. Haseroth, K.; Gerdes, D.; Berger, S.; Feuring, M.; Gunther, A.; Herbst, C.; Christ, M.; Wehling, M., Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, 266, (1), 257-261.
27. Grossmann, C.; Freudinger, R.; Mildenerger, S.; Husse, B.; Gekle, M., EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *J Biol Chem* **2008**, 283, (11), 7109-7116.

28. Mihailidou, A. S., Nongenomic cardiovascular actions of aldosterone: a receptor for all seasons? *Endocrinology* **2005**, 146, (3), 971-972.
29. Funder, J. W., Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* **2006**, 147, (12), 5564-5567.
30. Boldyreff, B.; Wehling, M., Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2003**, 85, (2-5), 375-381.
31. Chai, W.; Danser, A. H., Why are mineralocorticoid receptor antagonists cardioprotective? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2006**, 374, (3), 153-162.
32. Stefano, G. B.; Prevot, V.; Beauvillain, J. C.; Cadet, P.; Fimiani, C.; Welters, I.; Fricchione, G. L.; Breton, C.; Lassalle, P.; Salzet, M.; Bilfinger, T. V., Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* **2000**, 101, (13), 1594-1597.
33. Zhu, Y.; Rice, C. D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P., Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (5), 2231-2236.
34. de Kloet, E. R.; Van Acker, S. A.; Sibug, R. M.; Oitzl, M. S.; Meijer, O. C.; Rahmouni, K.; de Jong, W., Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* **2000**, 57, (4), 1329-1336.
35. Coirini, H.; Marusic, E. T.; De Nicola, A. F.; Rainbow, T. C.; McEwen, B. S., Identification of mineralocorticoid binding sites in rat brain by competition studies and density gradient centrifugation. *Neuroendocrinology* **1983**, 37, (5), 354-360.
36. Gomez-Sanchez, C. E.; Zhou, M. Y.; Cozza, E. N.; Morita, H.; Foecking, M. F.; Gomez-Sanchez, E. P., Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* **1997**, 138, (8), 3369-3373.
37. Lombes, M.; Alfaidy, N.; Eugene, E.; Lessana, A.; Farman, N.; Bonvalet, J. P., Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* **1995**, 92, (2), 175-182.
38. Pearce, P.; Funder, J. W., High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1987**, 14, (11-12), 859-866.
39. Kornel, L., Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* **1994**, 7, (1), 100-103.
40. Hatakeyama, H.; Miyamori, I.; Fujita, T.; Takeda, Y.; Takeda, R.; Yamamoto, H., Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **1994**, 269, (39), 24316-24320.
41. Cooney, A. S.; Fitzsimons, J. T., Increased sodium appetite and thirst in rat induced by the ingredients of liquorice, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid. *Regul Pept* **1996**, 66, (1-2), 127-133.

42. Diaz, R.; Brown, R. W.; Seckl, J. R., Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* **1998**, 18, (7), 2570-2580.
43. Peysner, K.; Henry, C. A.; Malvin, R. L., Central infusion of aldosterone increases blood pressure by mechanisms independent of Na retention. *Clin Exp Hypertens A* **1990**, 12, (3), 399-414.
44. Gomez-Sanchez, E. P.; Venkataraman, M. T.; Thwaites, D.; Fort, C., ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am J Physiol* **1990**, 258, (4 Pt 1), E649-653.
45. Gomez-Sanchez, E. P.; Fort, C.; Thwaites, D., Central mineralocorticoid receptor antagonism blocks hypertension in Dahl S/JR rats. *Am J Physiol* **1992**, 262, (1 Pt 1), E96-99.
46. Kayes-Wandover, K. M.; White, P. C., Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, 85, (7), 2519-2525.
47. Gomez-Sanchez, E. P.; Ahmad, N.; Romero, D. G.; Gomez-Sanchez, C. E., Is aldosterone synthesized within the rat brain? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2005**, 288, (2), E342-346.
48. Gomez-Sanchez, C. E.; Zhou, M. Y.; Cozza, E. N.; Morita, H.; Eddleman, F. C.; Gomez-Sanchez, E. P., Corticosteroid synthesis in the central nervous system. *Endocr Res* **1996**, 22, (4), 463-470.
49. MacKenzie, S. M.; Clark, C. J.; Fraser, R.; Gomez-Sanchez, C. E.; Connell, J. M.; Davies, E., Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J Mol Endocrinol* **2000**, 24, (3), 321-328.
50. Furukawa, A.; Miyatake, A.; Ohnishi, T.; Ichikawa, Y., Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* **1998**, 71, (6), 2231-2238.
51. Agarwal, M. K.; Mirshahi, F.; Mirshahi, M.; Rostene, W., Immunochemical detection of the mineralocorticoid receptor in rat brain. *Neuroendocrinology* **1993**, 58, (5), 575-580.
52. Xue, C.; Siragy, H. M., Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* **2005**, 46, (3), 584-590.
53. Takeda, Y.; Miyamori, I.; Yoneda, T.; Iki, K.; Hatakeyama, H.; Blair, I. A.; Hsieh, F. Y.; Takeda, R., Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* **1995**, 25, (2), 170-173.
54. Ahmad, N.; Romero, D. G.; Gomez-Sanchez, E. P.; Gomez-Sanchez, C. E., Do human vascular endothelial cells produce aldosterone? *Endocrinology* **2004**, 145, (8), 3626-3629.
55. Silvestre, J. S.; Robert, V.; Heymes, C.; Aupetit-Faisant, B.; Mouas, C.; Moalic, J. M.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C., Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* **1998**, 273, (9), 4883-4891.

56. Young, M. J.; Clyne, C. D.; Cole, T. J.; Funder, J. W., Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, 86, (11), 5121-5126.
57. Takeda, Y.; Yoneda, T.; Demura, M.; Miyamori, I.; Mabuchi, H., Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension* **2000**, 36, (4), 495-500.
58. Gomez-Sanchez, E. P.; Ahmad, N.; Romero, D. G.; Gomez-Sanchez, C. E., Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology* **2004**, 145, (11), 4796-4802.
59. Fiebeler, A.; Nussberger, J.; Shagdarsuren, E.; Rong, S.; Hilfenhaus, G.; Al-Saadi, N.; Dechend, R.; Wellner, M.; Meiners, S.; Maser-Gluth, C.; Jeng, A. Y.; Webb, R. L.; Luft, F. C.; Muller, D. N., Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation* **2005**, 111, (23), 3087-3094.
60. Chai, W.; Garrelts, I. M.; de Vries, R.; Danser, A. H., Cardioprotective effects of eplerenone in the rat heart: interaction with locally synthesized or blood-derived aldosterone? *Hypertension* **2006**, 47, (4), 665-670.
61. Taymans, S. E.; Pack, S.; Pak, E.; Torpy, D. J.; Zhuang, Z.; Stratakis, C. A., Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 83, (3), 1033-1036.
62. Chua, S. C.; Szabo, P.; Vitek, A.; Grzeschik, K. H.; John, M.; White, P. C., Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (20), 7193-7197.
63. Mornet, E.; Dupont, J.; Vitek, A.; White, P. C., Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* **1989**, 264, (35), 20961-20967.
64. Wagner, M. J.; Ge, Y.; Siciliano, M.; Wells, D. E., A hybrid cell mapping panel for regional localization of probes to human chromosome 8. *Genomics* **1991**, 10, (1), 114-125.
65. Belkina, N. V.; Lisurek, M.; Ivanov, A. S.; Bernhardt, R., Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *J Inorg Biochem* **2001**, 87, (4), 197-207.
66. Gotoh, O., Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* **1992**, 267, (1), 83-90.
67. Bottner, B.; Bernhardt, R., Changed ratios of glucocorticoids/mineralocorticoids caused by point mutations in the putative I-helix regions of CYP11B1 and CYP11B2. *Endocr Res* **1996**, 22, (4), 455-461.
68. Bureik, M.; Lisurek, M.; Bernhardt, R., The human steroid hydroxylases CYP11B1 and CYP11B2. *Biol Chem* **2002**, 383, (10), 1537-1551.
69. Bulow, H. E.; Mobius, K.; Bahr, V.; Bernhardt, R., Molecular cloning and functional expression of the cytochrome P450 11B-hydroxylase of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, 221, (2), 304-312.

70. Yanagibashi, K.; Haniu, M.; Shively, J. E.; Shen, W. H.; Hall, P., The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 beta-, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J Biol Chem* **1986**, 261, (8), 3556-3562.
71. Müller, J., Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **1998**, 25, S79-85.
72. Mellon, S. H.; Bair, S. R.; Monis, H., P450c11B3 mRNA, transcribed from a third P450c11 gene, is expressed in a tissue-specific, developmentally, and hormonally regulated fashion in the rodent adrenal and encodes a protein with both 11-hydroxylase and 18-hydroxylase activities. *J Biol Chem* **1995**, 270, (4), 1643-1649.
73. Zhou, M.; Xue, D.; Foecking, M. F.; Gomez-Sanchez, C. E., Stable expression of rat cytochrome P450 11 beta-hydroxylase (CYP11B1) and aldosterone synthase (CYP11B2) in MA-10 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1995**, 52, (6), 523-528.
74. Domalik, L. J.; Chaplin, D. D.; Kirkman, M. S.; Wu, R. C.; Liu, W. W.; Howard, T. A.; Seldin, M. F.; Parker, K. L., Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **1991**, 5, (12), 1853-1861.
75. LeHoux, J. G.; Mason, J. I.; Bernard, H.; Ducharme, L.; LeHoux, J.; Veronneau, S.; Lefebvre, A., The presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in the hamster adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1994**, 49, (2-3), 131-137.
76. Bulow, H. E.; Bernhardt, R., Analyses of the CYP11B gene family in the guinea pig suggest the existence of a primordial CYP11B gene with aldosterone synthase activity. *Eur J Biochem* **2002**, 269, (15), 3838-3846.
77. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**, 215, (3), 403-410.
78. Conn, J. W.; Louis, L. H., Primary aldosteronism: a new clinical entity. *Trans Assoc Am Physicians* **1955**, 68, 215-231; discussion, 231-213.
79. Lorenzo Romero, J. G.; Salinas Sanchez, A. S.; Segura Martin, M.; Hernandez Millan, I.; Ruiz Mondejar, R.; Lopez Rubio, E.; Virseda Rodriguez, J. A., [The Conn syndrome. The clinical and surgical aspects of 18 cases of adrenal adenoma]. *Actas Urol Esp* **1999**, 23, (1), 14-21.
80. Nussberger, J., Investigating mineralocorticoid hypertension. *J Hypertens Suppl* **2003**, 21, (2), S25-30.
81. Grossmann, C.; Gekle, M., New aspects of rapid aldosterone signaling. *Mol Cell Endocrinol* **2009**, 308, (1-2), 53-62.
82. Mulatero, P.; Stowasser, M.; Loh, K. C.; Fardella, C. E.; Gordon, R. D.; Mosso, L.; Gomez-Sanchez, C. E.; Veglio, F.; Young, W. F., Jr., Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89, (3), 1045-1050.

83. Funder, J. W.; Carey, R. M.; Fardella, C.; Gomez-Sanchez, C. E.; Mantero, F.; Stowasser, M.; Young, W. F., Jr.; Montori, V. M., Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **2008**, *93*, (9), 3266-3281.
84. Brilla, C. G., Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* **2000**, *25*, (3), 299-306.
85. Brilla, C. G., Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res* **2000**, *47*, (1), 1-3.
86. Bentley-Lewis, R.; Adler, G. K.; Perlstein, T.; Seely, E. W.; Hopkins, P. N.; Williams, G. H.; Garg, R., Body mass index predicts aldosterone production in normotensive adults on a high-salt diet. *J Clin Endocrinol Metab* **2007**, *92*, (11), 4472-4475.
87. Essick, E. E.; Sam, F., Cardiac hypertrophy and fibrosis in the metabolic syndrome: a role for aldosterone and the mineralocorticoid receptor. *Int J Hypertens* **2011**, 346985.
88. Bochud, M.; Nussberger, J.; Bovet, P.; Maillard, M. R.; Elston, R. C.; Paccaud, F.; Shamlaye, C.; Burnier, M., Plasma aldosterone is independently associated with the metabolic syndrome. *Hypertension* **2006**, *48*, (2), 239-245.
89. Tomlinson, K. C.; Gardiner, S. M.; Hebden, R. A.; Bennett, T., Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* **1992**, *44*, (1), 103-150.
90. Hollenberg, N. K.; Stevanovic, R.; Agarwal, A.; Lansang, M. C.; Price, D. A.; Laffel, L. M.; Williams, G. H.; Fisher, N. D., Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. *Kidney Int* **2004**, *65*, (4), 1435-1439.
91. Shimoni, Y.; Chen, K.; Emmett, T.; Kargacin, G., Aldosterone and the autocrine modulation of potassium currents and oxidative stress in the diabetic rat heart. *Br J Pharmacol* **2008**, *154*, (3), 675-687.
92. Lijnen, P.; Petrov, V., Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* **2000**, *32*, (6), 865-879.
93. Funder, J. W., Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol* **2004**, *217*, (1-2), 263-269.
94. Khan, N. U.; Movahed, A., The role of aldosterone and aldosterone-receptor antagonists in heart failure. *Rev Cardiovasc Med* **2004**, *5*, (2), 71-81.
95. Robert, V.; Heymes, C.; Silvestre, J. S.; Sabri, A.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C., Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* **1999**, *33*, (4), 981-986.
96. Cowie, M. R.; Mosterd, A.; Wood, D. A.; Deckers, J. W.; Poole-Wilson, P. A.; Sutton, G. C.; Grobbee, D. E., The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* **1997**, *18*, (2), 208-225.

97. Jessup, M., Aldosterone blockade and heart failure. *N Engl J Med* **2003**, 348, (14), 1380-1382.
98. Pfeffer, M. A.; Braunwald, E.; Moye, L. A.; Basta, L.; Brown, E. J., Jr.; Cuddy, T. E.; Davis, B. R.; Geltman, E. M.; Goldman, S.; Flaker, G. C.; et al., Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* **1992**, 327, (10), 669-677.
99. Lewis, E. J.; Hunsicker, L. G.; Bain, R. P.; Rohde, R. D., The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **1993**, 329, (20), 1456-1462.
100. Wenzel, U. O., Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of renal disease: evidence from clinical studies. *Contrib Nephrol* **2001**, (135), 200-211.
101. Duncia, J. V.; Carini, D. J.; Chiu, A. T.; Johnson, A. L.; Price, W. A.; Wong, P. C.; Wexler, R. R.; Timmermans, P. B., The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med Res Rev* **1992**, 12, (2), 149-191.
102. Staessen, J.; Lijnen, P.; Fagard, R.; Verschueren, L. J.; Amery, A., Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol* **1981**, 91, (3), 457-465.
103. Lijnen, P.; Staessen, J.; Fagard, R.; Amery, A., Increase in plasma aldosterone during prolonged captopril treatment. *Am J Cardiol* **1982**, 49, (6), 1561-1563.
104. Naruse, M.; Tanabe, A.; Sato, A.; Takagi, S.; Tsuchiya, K.; Imaki, T.; Takano, K., Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **2002**, 40, (1), 28-33.
105. Bomback, A. S.; Klemmer, P. J., The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol* **2007**, 3, (9), 486-492.
106. Borghi, C.; Boschi, S.; Ambrosioni, E.; Melandri, G.; Branzi, A.; Magnani, B., Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol* **1993**, 33, (1), 40-45.
107. Jorde, U. P.; Vittorio, T.; Katz, S. D.; Colombo, P. C.; Latif, F.; Le Jemtel, T. H., Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. *Circulation* **2002**, 106, (9), 1055-1057.
108. Stanton, A.; Jensen, C.; Nussberger, J.; O'Brien, E., Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. *Hypertension* **2003**, 42, (6), 1137-1143.
109. Duprez, D. A.; Munger, M. A.; Botha, J.; Keefe, D. L.; Charney, A. N., Aliskiren for geriatric lowering of systolic hypertension: a randomized controlled trial. *J Hum Hypertens* **2010**, 24, (9), 600-608.

110. Villamil, A.; Chrysant, S. G.; Calhoun, D.; Schober, B.; Hsu, H.; Matrisciano-Dimichino, L.; Zhang, J., Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. *J Hypertens* **2007**, *25*, (1), 217-226.
111. Stiles, S., ASPIRE: Adding aliskiren to post-MI meds won't help ventricular function. *the heart.org* **2010**.
112. Lee, H. Y.; Oh, B. H., Cardio-renal protection with aliskiren, a direct renin inhibitor, in the ASPIRE HIGHER program. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **2009**, *7*, (3), 251-257.
113. Zannad, F.; Alla, F.; Dousset, B.; Perez, A.; Pitt, B., Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* **2000**, *102*, (22), 2700-2706.
114. Izawa, H.; Murohara, T.; Nagata, K.; Isobe, S.; Asano, H.; Amano, T.; Ichihara, S.; Kato, T.; Ohshima, S.; Murase, Y.; Iino, S.; Obata, K.; Noda, A.; Okumura, K.; Yokota, M., Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study. *Circulation* **2005**, *112*, (19), 2940-2945.
115. Blasi, E. R.; Rocha, R.; Rudolph, A. E.; Blomme, E. A.; Polly, M. L.; McMahon, E. G., Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* **2003**, *63*, (5), 1791-1800.
116. Rocha, R.; Stier, C. T., Jr.; Kifor, I.; Ochoa-Maya, M. R.; Rennke, H. G.; Williams, G. H.; Adler, G. K., Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* **2000**, *141*, (10), 3871-3878.
117. Young, M.; Funder, J. W., Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* **2004**, *145*, (7), 3153-3157.
118. Nishikawa, N.; Yamamoto, K.; Sakata, Y.; Mano, T.; Yoshida, J.; Umekawa, S.; Hori, M.; Yasuhara, Y.; Sonoyama, T.; Harada, A.; Masuyama, T., Long-term effect of spironolactone on cardiac structure as assessed by analysis of ultrasonic radio-frequency signals in patients with ventricular hypertrophy. *Circ J* **2005**, *69*, (11), 1394-1400.
119. Sato, A.; Hayashi, M.; Saruta, T., Relative long-term effects of spironolactone in conjunction with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular mass and diastolic function in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* **2002**, *25*, (6), 837-842.
120. Juurlink, D. N.; Mamdani, M. M.; Lee, D. S.; Kopp, A.; Austin, P. C.; Laupacis, A.; Redelmeier, D. A., Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med* **2004**, *351*, (6), 543-551.
121. Rousseau, M. F.; Gurne, O.; Duprez, D.; Van Mieghem, W.; Robert, A.; Ahn, S.; Galanti, L.; Ketelslegers, J. M., Beneficial neurohormonal profile of spironolactone in severe congestive heart

- failure: results from the RALES neurohormonal substudy. *J Am Coll Cardiol* **2002**, 40, (9), 1596-1601.
122. Yamaji, M.; Tsutamoto, T.; Kawahara, C.; Nishiyama, K.; Yamamoto, T.; Fujii, M.; Horie, M., Effect of eplerenone versus spironolactone on cortisol and hemoglobin A(c) levels in patients with chronic heart failure. *Am Heart J* **2010**, 160, (5), 915-921.
123. Delcayre, C.; Swynghedauw, B., Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* **2002**, 34, (12), 1577-1584.
124. de Resende, M. M.; Kauser, K.; Mill, J. G., Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci* **2006**, 78, (26), 3066-3073.
125. Struthers, A. D., Aldosterone: cardiovascular assault. *Am Heart J* **2002**, 144, (5 Suppl), S2-7.
126. Weber, M. A., Clinical implications of aldosterone blockade. *Am Heart J* **2002**, 144, (5 Suppl), S12-18.
127. Tomaschitz, A.; Pilz, S.; Ritz, E.; Obermayer-Pietsch, B.; Pieber, T. R., Aldosterone and arterial hypertension. *Nat Rev Endocrinol* **2010**, 6, (2), 83-93.
128. Lea, W. B.; Kwak, E. S.; Luther, J. M.; Fowler, S. M.; Wang, Z.; Ma, J.; Fogo, A. B.; Brown, N. J., Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt. *Kidney Int* **2009**, 75, (9), 936-944.
129. Sato, A.; Hayashi, K.; Naruse, M.; Saruta, T., Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* **2003**, 41, (1), 64-68.
130. Krum, H.; Nolly, H.; Workman, D.; He, W.; Roniker, B.; Krause, S.; Fakouhi, K., Efficacy of eplerenone added to renin-angiotensin blockade in hypertensive patients. *Hypertension* **2002**, 40, (2), 117-123.
131. Hartmann, R. W., Selective inhibition of steroidogenic P450 enzymes: Current status and future perspectives. *Eur J Pharm Sci* **1994**, 2, 15-16.
132. Ehmer, P. B.; Bureik, M.; Bernhardt, R.; Muller, U.; Hartmann, R. W., Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2002**, 81, (2), 173-179.
133. Hartmann, R. W.; Muller, U.; Ehmer, P. B., Discovery of selective CYP11B2 (aldosterone synthase) inhibitors for the therapy of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *Eur J Med Chem* **2003**, 38, (4), 363-366.
134. Schieweck, K.; Bhatnagar, A. S.; Matter, A., CGS 16949A, a new nonsteroidal aromatase inhibitor: effects on hormone-dependent and -independent tumors in vivo. *Cancer Res* **1988**, 48, (4), 834-838.
135. Lamberts, S. W.; Bruining, H. A.; Marzouk, H.; Zuiderwijk, J.; Uitterlinden, P.; Blijd, J. J.; Hackeng, W. H.; De Jong, F. H., The new aromatase inhibitor CGS-16949A suppresses aldosterone

- and cortisol production by human adrenal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **1989**, 69, (4), 896-901.
136. Demers, L. M.; Melby, J. C.; Wilson, T. E.; Lipton, A.; Harvey, H. A.; Santen, R. J., The effects of CGS 16949A, an aromatase inhibitor on adrenal mineralocorticoid biosynthesis. *J Clin Endocrinol Metab* **1990**, 70, (4), 1162-1166.
137. Menard, J.; Pascoe, L., Can the dextroenantiomer of the aromatase inhibitor fadrozole be useful for clinical investigation of aldosterone-synthase inhibition? *J Hypertens* **2006**, 24, (6), 993-997.
138. Minnaard-Huiban, M.; Emmen, J. M.; Roumen, L.; Beugels, I. P.; Cohuet, G. M.; van Essen, H.; Ruijters, E.; Pieterse, K.; Hilbers, P. A.; Ottenheijm, H. C.; Plate, R.; de Gooyer, M. E.; Smits, J. F.; Hermans, J. J., Fadrozole reverses cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive heart failure rats: discordant enantioselectivity versus reduction of plasma aldosterone. *Endocrinology* **2008**, 149, (1), 28-31.
139. Mulder, P.; Mellin, V.; Favre, J.; Vercauteren, M.; Remy-Jouet, I.; Monteil, C.; Richard, V.; Renet, S.; Henry, J. P.; Jeng, A. Y.; Webb, R. L.; Thuillez, C., Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J* **2008**, 29, 2171-2179.
140. Huang, B. S.; White, R. A.; Ahmad, M.; Tan, J.; Jeng, A. Y.; Leenen, F. H., Central infusion of aldosterone synthase inhibitor attenuates left ventricular dysfunction and remodelling in rats after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **2009**, 81, (3), 574-581.
141. Siragy, H. M.; Xue, C., Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol* **2008**, 93, (7), 817-824.
142. Amar, L.; Azizi, M.; Menard, J.; Peyrard, S.; Watson, C.; Plouin, P. F., Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. *Hypertension* **2010**, 56, (5), 831-838.
143. Azizi, M.; Amar, L.; Menard, J., Aldosterone synthase inhibition in humans. *Nephrol Dial Transplant* **2013**, 28, (1), 36-43.
144. Denner, K.; Doehmer, J.; Bernhardt, R., Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells. *Endocr Res* **1995**, 21, (1-2), 443-448.
145. Denner, K.; Vogel, R.; Schmalix, W.; Doehmer, J.; Bernhardt, R., Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P45011B1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics* **1995**, 5, (2), 89-96.
146. Ulmschneider, S.; Muller-Vieira, U.; Klein, C. D.; Antes, I.; Lengauer, T.; Hartmann, R. W., Synthesis and evaluation of (pyridylmethylene)tetrahydronaphthalenes/-indanes and structurally modified derivatives: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem* **2005**, 48, (5), 1563-1575.

147. Ulmschneider, S.; Muller-Vieira, U.; Mitrenga, M.; Hartmann, R. W.; Oberwinkler-Marchais, S.; Klein, C. D.; Bureik, M.; Bernhardt, R.; Antes, I.; Lengauer, T., Synthesis and evaluation of imidazolylmethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolylmethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem* **2005**, 48, (6), 1796-1805.
148. Voets, M.; Antes, I.; Scherer, C.; Muller-Vieira, U.; Biemel, K.; Barassin, C.; Marchais-Oberwinkler, S.; Hartmann, R. W., Heteroaryl-substituted naphthalenes and structurally modified derivatives: selective inhibitors of CYP11B2 for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *J Med Chem* **2005**, 48, (21), 6632-6642.
149. Voets, M.; Antes, I.; Scherer, C.; Muller-Vieira, U.; Biemel, K.; Marchais-Oberwinkler, S.; Hartmann, R. W., Synthesis and evaluation of heteroaryl-substituted dihydronaphthalenes and indenenes: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *J Med Chem* **2006**, 49, (7), 2222-2231.
150. Müller-Vieira, U., Dissertation: Selektive Inhibition der Aldosteronsynthese CYP11B2 als neues Therapiekonzept bei Herzinsuffizienz und Myokardfibrose. Entwicklung und Evaluierung einer Teststrategie unter besonderer Berücksichtigung der adrenocorticalen Tumorzelllinie NCI-H295R. *Universität des Saarlandes, Saarbrücken* **2005**.
151. LaSala, D.; Shibanaka, Y.; Jeng, A. Y., Coexpression of CYP11B2 or CYP11B1 with adrenodoxin and adrenodoxin reductase for assessing the potency and selectivity of aldosterone synthase inhibitors. *Anal Biochem* **2009**, 394, (1), 56-61.
152. Baranczewski, P.; Stanczak, A.; Sundberg, K.; Svensson, R.; Wallin, A.; Jansson, J.; Garberg, P.; Postlind, H., Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* **2006**, 58, (4), 453-472.
153. Venkatakrisnan, K.; Von Moltke, L. L.; Greenblatt, D. J., Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* **2001**, 41, (11), 1149-1179.
154. Obach, R. S., Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* **1999**, 27, (11), 1350-1359.
155. Obach, R. S.; Kalgutkar, A. S.; Soglia, J. R.; Zhao, S. X., Can in vitro metabolism-dependent covalent binding data in liver microsomes distinguish hepatotoxic from nonhepatotoxic drugs? An analysis of 18 drugs with consideration of intrinsic clearance and daily dose. *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (9), 1814-1822.
156. Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Kuuranne, T.; Auriola, S., Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom* **2003**, 38, (4), 357-372.

157. Muller-Vieira, U.; Angotti, M.; Hartmann, R. W., The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an in vitro screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11beta-hydroxylase) inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2005**, *96*, (3-4), 259-270.
158. Ries, C.; Lucas, S.; Heim, R.; Birk, B.; Hartmann, R. W., Selective aldosterone synthase inhibitors reduce aldosterone formation in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2009**, *116*, (3-5), 121-126.
159. Zimmer, C., Dissertation: Erweiterung der Testplattform zur Charakterisierung von Aldosteronsynthaseinhibitoren unter besonderer Berücksichtigung von Speziesunterschieden. *Universität des Saarlandes, Saarbrücken* **2010**.
160. Galia, E.; Nicolaidis, E.; Horter, D.; Lobenberg, R.; Reppas, C.; Dressman, J. B., Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* **1998**, *15*, (5), 698-705.
161. Dressman, J. B.; Amidon, G. L.; Reppas, C.; Shah, V. P., Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* **1998**, *15*, (1), 11-22.
162. Smith, D. A. v. d. W., H. ; Walker, D.K. , Methods and Principles in Medicinal Chemistry: Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. *Wiley-VCH* **2006**.
163. Adams, C. P.; Brantner, V. V., Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood)* **2006**, *25*, (2), 420-428.
164. Nadin, A.; Hattotuwigama, C.; Churcher, I., Lead-oriented synthesis: a new opportunity for synthetic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, (5), 1114-1122.
165. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **2011**, *162*, (6), 1239-1249.
166. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G., The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* **2003**, *22*, (2), 151-185.
167. Newton-Cheh, C.; Guo, C. Y.; Gona, P.; Larson, M. G.; Benjamin, E. J.; Wang, T. J.; Kathiresan, S.; O'Donnell, C. J.; Musone, S. L.; Camargo, A. L.; Drake, J. A.; Levy, D.; Hirschhorn, J. N.; Vasan, R. S., Clinical and genetic correlates of aldosterone-to-renin ratio and relations to blood pressure in a community sample. *Hypertension* **2007**, *49*, (4), 846-856.
168. Vasan, R. S.; Evans, J. C.; Larson, M. G.; Wilson, P. W.; Meigs, J. B.; Rifai, N.; Benjamin, E. J.; Levy, D., Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med* **2004**, *351*, (1), 33-41.
169. Meneton, P.; Galan, P.; Bertrais, S.; Heudes, D.; Hercberg, S.; Menard, J., High plasma aldosterone and low renin predict blood pressure increase and hypertension in middle-aged Caucasian populations. *J Hum Hypertens* **2008**, *22*, (8), 550-558.
170. Garg, R.; Hurwitz, S.; Williams, G. H.; Hopkins, P. N.; Adler, G. K., Aldosterone production and insulin resistance in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, *95*, (4), 1986-1990.

171. Rossi, G. P.; Sacchetto, A.; Visentin, P.; Canali, C.; Graniero, G. R.; Palatini, P.; Pessina, A. C., Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* **1996**, 27, (5), 1039-1045.
172. Suzuki, T.; Abe, H.; Nagata, S.; Saitoh, F.; Iwata, S.; Ashizawa, A.; Kuramochi, M.; Omae, T., Left ventricular structural characteristics in unilateral renovascular hypertension and primary aldosteronism. *Am J Cardiol* **1988**, 62, (17), 1224-1227.
173. Rossi, G. P.; Bernini, G.; Caliumi, C.; Desideri, G.; Fabris, B.; Ferri, C.; Ganzaroli, C.; Giacchetti, G.; Letizia, C.; Maccario, M.; Mallamaci, F.; Mannelli, M.; Mattarello, M. J.; Moretti, A.; Palumbo, G.; Parenti, G.; Porteri, E.; Semplicini, A.; Rizzoni, D.; Rossi, E.; Boscaro, M.; Pessina, A. C.; Mantero, F., A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* **2006**, 48, (11), 2293-2300.
174. Rossi, G. P.; Bernini, G.; Desideri, G.; Fabris, B.; Ferri, C.; Giacchetti, G.; Letizia, C.; Maccario, M.; Mannelli, M.; Matterello, M. J.; Montemurro, D.; Palumbo, G.; Rizzoni, D.; Rossi, E.; Pessina, A. C.; Mantero, F., Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension* **2006**, 48, (2), 232-238.
175. Sechi, L. A.; Novello, M.; Lapenna, R.; Baroselli, S.; Nadalini, E.; Colussi, G. L.; Catena, C., Long-term renal outcomes in patients with primary aldosteronism. *Jama* **2006**, 295, (22), 2638-2645.
176. Pitt, B.; Zannad, F.; Remme, W. J.; Cody, R.; Castaigne, A.; Perez, A.; Palensky, J.; Wittes, J., The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **1999**, 341, (10), 709-717.
177. Pitt, B.; Remme, W.; Zannad, F.; Neaton, J.; Martinez, F.; Roniker, B.; Bittman, R.; Hurley, S.; Kleiman, J.; Gatlin, M., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* **2003**, 348, (14), 1309-1321.
178. Menard, J., The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone. *Mol Cell Endocrinol* **2004**, 217, (1-2), 45-52.
179. Jansen, P. M.; Danser, A. H.; Imholz, B. P.; van den Meiracker, A. H., Aldosterone-receptor antagonism in hypertension. *J Hypertens* **2009**, 27, (4), 680-691.
180. Stier, C. T., Jr.; Koenig, S.; Lee, D. Y.; Chawla, M.; Frishman, W. H., Aldosterone and aldosterone antagonism in cardiovascular disease: focus on eplerenone (Inspra). *Heart Dis* **2003**, 5, (2), 102-118.
181. Menard, J.; Gonzalez, M. F.; Guyene, T. T.; Bissery, A., Investigation of aldosterone-synthase inhibition in rats. *J Hypertens* **2006**, 24, (6), 1147-1155.
182. Menard, J.; Watson, C.; Rebello, S.; Yiming, Z.; Dole, W., Hormonal and electrolyte response to the aldosterone synthase inhibitor LCI699 in sodium depleted healthy subjects free. *Am Coll Cardiol* **2010**, (55), A61-E583.
183. Calhoun, D. A.; White, W. B.; Krum, H.; Guo, W.; Bermann, G.; Trapani, A.; Lefkowitz, M. P.; Menard, J., Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary

hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. *Circulation* **124**, (18), 1945-1955.

184. Lucas, S.; Heim, R.; Negri, M.; Antes, I.; Ries, C.; Schewe, K. E.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Hartmann, R. W., Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach. *J Med Chem* **2008**, *51*, (19), 6138-6149.

185. Lucas, S.; Heim, R.; Ries, C.; Schewe, K. E.; Birk, B.; Hartmann, R. W., In vivo active aldosterone synthase inhibitors with improved selectivity: lead optimization providing a series of pyridine substituted 3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one derivatives. *J Med Chem* **2008**, *51*, (24), 8077-8087.

186. Yin, L.; Hu, Q.; Hartmann, R. W., 3-Pyridyl substituted aliphatic cycles as CYP11B2 inhibitors: aromaticity abolishment of the core significantly increased selectivity over CYP1A2. *PLoS One* **7**, (11), e48048.

187. Glatt, H.; Gemperlein, I.; Turchi, G.; Heinritz, H.; Doehmer, J.; Oesch, F., Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol* **1987**, *1*, (4), 313-334.

188. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46*, (1-3), 3-26.

189. Vanoye, C. G.; Altenberg, G. A.; Reuss, L., Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by a hydrophobic contaminant in commercial gluconate salts. *Am J Physiol* **1999**, *276*, (6 Pt 1), C1439-1442.

190. Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; Trinquet, E.; Knapik, G. P.; Xie, B., HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* **2009**, *3*, 22-32.

191. Chauret, N.; Gauthier, A.; Martin, J.; Nicoll-Griffith, D. A., In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and horse. *Drug Metab Dispos* **1997**, *25*, (10), 1130-1136.

192. Zhou, S. F.; Liu, J. P.; Chowbay, B., Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* **2009**, *41*, (2), 89-295.

193. McGraw, J.; Waller, D., Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, (3), 371-382.

194. Ma, M. K.; Woo, M. H.; McLeod, H. L., Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* **2002**, *59*, (21), 2061-2069.

195. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D., Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS in pharmaceutical research and development. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2000**, *748*, (1), 233-258.

196. Staels, B.; Hum, D. W.; Miller, W. L., Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* **1993**, 7, (3), 423-433.
197. Rainey, W. E.; Bird, I. M.; Sawetawan, C.; Hanley, N. A.; McCarthy, J. L.; McGee, E. A.; Wester, R.; Mason, J. I., Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J Clin Endocrinol Metab* **1993**, 77, (3), 731-737.
198. Bird, I. M.; Hanley, N. A.; Word, R. A.; Mathis, J. M.; McCarthy, J. L.; Mason, J. I.; Rainey, W. E., Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* **1993**, 133, (4), 1555-1561.
199. Clark, B. J.; Pezzi, V.; Stocco, D. M.; Rainey, W. E., The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* **1995**, 115, (2), 215-219.
200. Li, L. A.; Lin, T. C., Interacting influence of potassium and polychlorinated biphenyl on cortisol and aldosterone biosynthesis. *Toxicol Appl Pharmacol* **2007**, 220, (3), 252-261.
201. Rainey, W. E.; Bird, I. M.; Mason, J. I., The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol* **1994**, 100, (1-2), 45-50.
202. Hilscherova, K.; Jones, P. D.; Gracia, T.; Newsted, J. L.; Zhang, X.; Sanderson, J. T.; Yu, R. M.; Wu, R. S.; Giesy, J. P., Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicol Sci* **2004**, 81, (1), 78-89.
203. Bird, I. M.; Word, R. A.; Clyne, C.; Mason, J. I.; Rainey, W. E., Potassium negatively regulates angiotensin II type 1 receptor expression in human adrenocortical H295R cells. *Hypertension* **1995**, 25, (6), 1129-1134.
204. Hilbers, U.; Peters, J.; Bornstein, S. R.; Correa, F. M.; Jöhren, O.; Saavedra, J. M.; Ehrhart-Bornstein, M., Local renin-angiotensin system is involved in K⁺-induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells. *Hypertension* **1999**, 33, (4), 1025-1030.
205. Hu, C. W.; Webb, R. L.; Jeng, A. Y., Synergistic stimulation of aldosterone production in human adrenocortical carcinoma NCI-H295R cells by endothelin-1 and angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* **2004**, 44 Suppl 1, S289-292.
206. Hecker, M.; Newsted, J. L.; Murphy, M. B.; Higley, E. B.; Jones, P. D.; Wu, R.; Giesy, J. P., Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol* **2006**, 217, (1), 114-124.
207. Furuta, C.; Noda, S.; Li, C.; Suzuki, A. K.; Taneda, S.; Watanabe, G.; Taya, K., Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles regulate steroidogenic gene expression and steroid synthesis in the human H295R adrenocortical cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* **2008**, 229, (1), 109-120.
208. Gracia, T.; Hilscherova, K.; Jones, P. D.; Newsted, J. L.; Zhang, X.; Hecker, M.; Higley, E. B.; Sanderson, J. T.; Yu, R. M.; Wu, R. S.; Giesy, J. P., The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects. *Ecotoxicol Environ Saf* **2006**, 65, (3), 293-305.

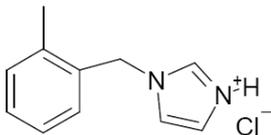
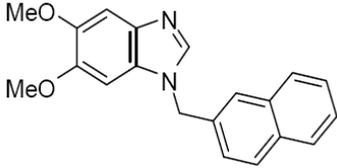
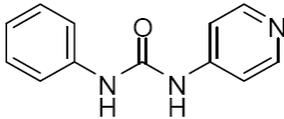
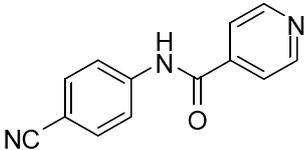
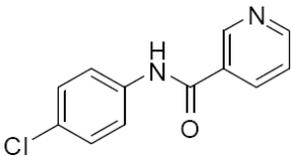
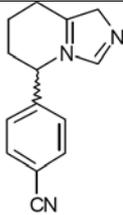
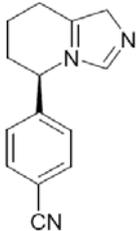
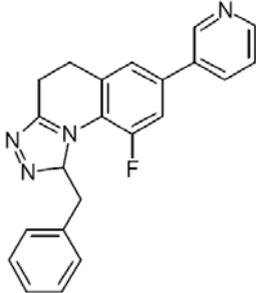
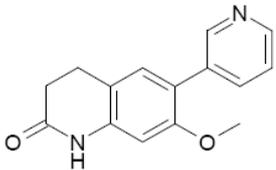
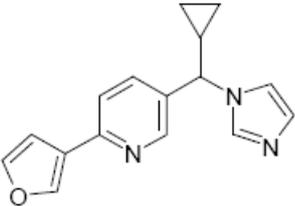
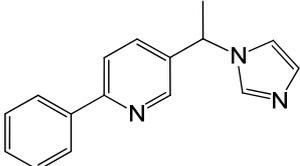
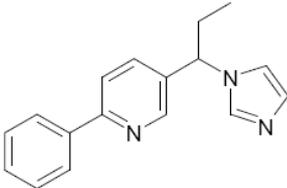
209. Blaha, L.; Hilscherova, K.; Mazurova, E.; Hecker, M.; Jones, P. D.; Newsted, J. L.; Bradley, P. W.; Gracia, T.; Duris, Z.; Horka, I.; Holoubek, I.; Giesy, J. P., Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects. *Environ Int* **2006**, 32, (6), 749-757.
210. Gracia, T.; Hilscherova, K.; Jones, P. D.; Newsted, J. L.; Higley, E. B.; Zhang, X.; Hecker, M.; Murphy, M. B.; Yu, R. M.; Lam, P. K.; Wu, R. S.; Giesy, J. P., Modulation of steroidogenic gene expression and hormone production of H295R cells by pharmaceuticals and other environmentally active compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* **2007**, 225, (2), 142-153.
211. Hecker, M.; Giesy, J. P., Novel trends in endocrine disruptor testing: the H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 390, (1), 287-291.
212. Nakamura, Y.; Aoki, S.; Xing, Y.; Sasano, H.; Rainey, W. E., Metastin stimulates aldosterone synthesis in human adrenal cells. *Reprod Sci* **2007**, 14, (8), 836-845.
213. Kau, M. M.; Kan, S. F.; Wang, J. R.; Wang, P. S., Inhibitory effects of digoxin and ouabain on aldosterone synthesis in human adrenocortical NCI-H295 cells. *J Cell Physiol* **2005**, 205, (3), 393-401.
214. Grün, G. L., Dissertation: Mammatumor-hemmende Aromatase-Inhibitoren vom Benzykloalken-Typ: Untersuchungen zur Selektivität und in vivo-Wirkung. *Universität des Saarlandes, Saarbrücken* **1994**.
215. Scherer, C. B. A., Dissertation: Arzneistoffentwicklung: Screening-Methoden zur Evaluierung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter. *Universität des Saarlandes, Saarbrücken* **2007**.
216. Nonaka, Y.; Matsukawa, N.; Ying, Z.; Ogihara, T.; Okamoto, M., Molecular nature of aldosterone synthase, a member of cytochrome P-450(11 beta) family. *Endocr Res* **1991**, 17, (1-2), 151-163.
217. Nonaka, Y.; Okamoto, M., Functional expression of the cDNAs encoding rat 11 beta-hydroxylase [cytochrome P450(11 beta)] and aldosterone synthase [cytochrome P450(11 beta, Aldo)]. *Eur J Biochem* **1991**, 202, (3), 897-902.
218. Chen, M.; Hornsby, P. J., Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm Metab Res* **2006**, 38, (9), 549-555.
219. Casson, P. R.; Buster, J. E.; Callas, P. M.; Hornsby, P. J., Human chorionic gonadotropin does not alter patterns of adrenal androgen secretion in primary human adrenal reticularis and fasciculata cell culture. *Menopause* **2007**, 14, (2), 316-319.
220. Klein, S., The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *Aaps J* **2000**, 12, (3), 397-406.

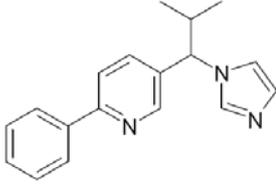
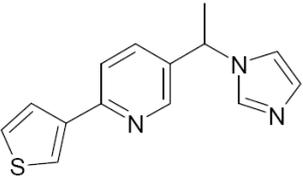
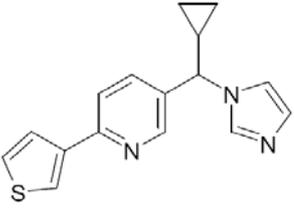
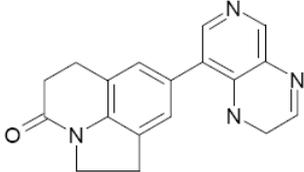
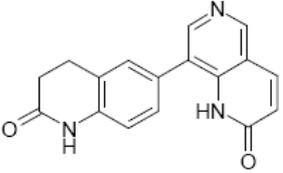
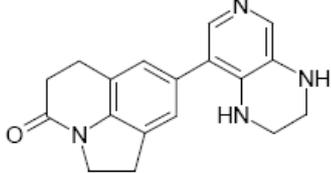
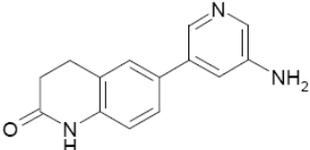
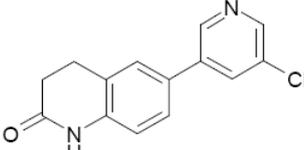
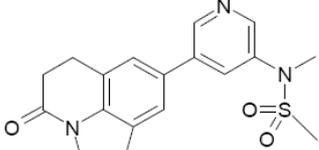
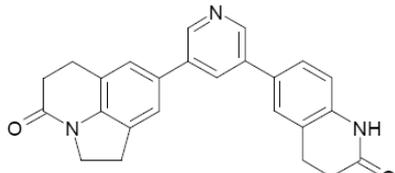
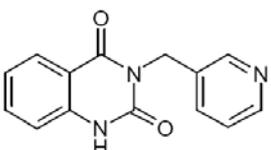
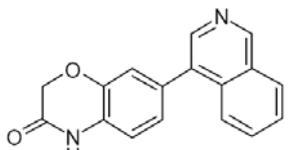
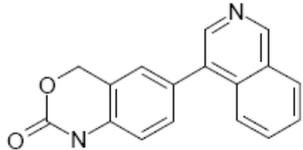
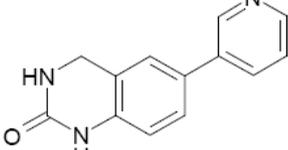
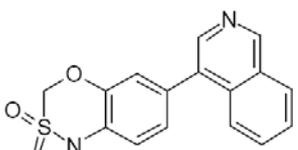
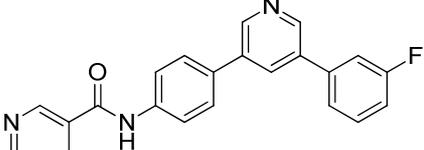
221. Nicolaidis, E.; Galia, E.; Efthymiopoulos, C.; Dressman, J. B.; Reppas, C., Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data. *Pharm Res* **1999**, 16, (12), 1876-1882.
222. Hilfenhaus, M., Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system in the rat. *Arch Toxicol* **1976**, 36, (3-4), 305-316.
223. Charloux, A.; Gronfier, C.; Lonsdorfer-Wolf, E.; Piquard, F.; Brandenberger, G., Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans. *Am J Physiol* **1999**, 276, (1 Pt 1), E43-49.
224. DeForrest, J. M.; Davis, J. O.; Freeman, R. H.; Stephens, G. A.; Watkins, B. E., Circadian changes in plasma renin activity and plasma aldosterone concentration in two-kidney hypertension rats. *Hypertension* **1979**, 1, (2), 142-149.
225. Kubzansky, L. D.; Adler, G. K., Aldosterone: a forgotten mediator of the relationship between psychological stress and heart disease. *Neurosci Biobehav Rev* **2010**, 34, (1), 80-86.
226. Zimmerman, R. S.; Frohlich, E. D., Stress and hypertension. *J Hypertens Suppl* **1990**, 8, (4), S103-107.
227. Sigg, E. B.; Keim, K. L.; Sigg, T. D., On the mechanism of renin release by restraint stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **1978**, 8, (1), 47-50.
228. Sarrieau, A.; Mormede, P., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the inbred Brown Norway and Fischer 344 rat strains. *Life Sci* **1998**, 62, (16), 1417-1425.
229. Golin, R. M.; Gotoh, E.; Said, S. I.; Ganong, W. F., Pharmacological evidence that the sympathetic nervous system mediates the increase in renin secretion produced by immobilization and head-up tilt in rats. *Neuropharmacology* **1988**, 27, (12), 1209-1213.
230. Pignatelli, D.; Pinto, P.; Azevedo, M. E.; Magalhaes, M. M.; Magalhaes, M. C., Acute stress effects on the adrenal cortex in the rat. A biochemical and immunohistochemical study. *Endocr Res* **1996**, 22, (4), 445-451.
231. Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E., Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* **2001**, 58, (5-6), 737-747.
232. Hausler, A.; Monnet, G.; Borer, C.; Bhatnagar, A. S., Evidence that corticosterone is not an obligatory intermediate in aldosterone biosynthesis in the rat adrenal. *J Steroid Biochem* **1989**, 34, (1-6), 567-570.
233. Luft, F. C.; Mervaala, E.; Muller, D. N.; Gross, V.; Schmidt, F.; Park, J. K.; Schmitz, C.; Lippoldt, A.; Breu, V.; Dechend, R.; Dragun, D.; Schneider, W.; Ganten, D.; Haller, H., Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* **1999**, 33, (1 Pt 2), 212-218.
234. Ford, D. K.; Yerganian, G., Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* **1958**, 21, (2), 393-425.

235. Gazdar, A. F.; Oie, H. K.; Shackleton, C. H.; Chen, T. R.; Triche, T. J.; Myers, C. E.; Chrousos, G. P.; Brennan, M. F.; Stein, C. A.; La Rocca, R. V., Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **1990**, 50, (17), 5488-5496.

IX Anhang

Übersicht der getesteten Verbindungen mit Strukturformeln

CV037		CV050	
CV073		CV082	
DA019		FAD286	
FAD286A		HQZ059	
HQZ069		JE019	
JE020		JE021	

JE023		JE032	
JE033		MHY011	
MHY016		MHY041	
MHY057		MHY137	
MHY144		MHY148	
RHC125		RHC155	
RHC169		RHC175	
RHC213		SE270	

SL242		SL272	
TGA010		TG011A1	
UH139		UH141	
UH186		UH215	
YLN015			