

Dopingmittel der Zukunft und deren Nachweis

Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) und HIF-Stabilisatoren

Ein Beitrag von
Mario Thevis
Wilhelm Schänzer
 Institut für
 Biochemie
 Zentrum für
 Präventive Doping-
 forschung
 Deutsche Sport-
 hochschule Köln

Neue Entwicklungen der pharmazeutischen Industrie stellen einen nahezu unerschöpflichen Pool kommender Medikamente dar, von denen zahlreiche aufgrund ihrer therapeutischen Zielsetzung großes Missbrauchspotenzial im Sport besitzen. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) und HIF-Stabilisatoren, welche im Wesentlichen das Muskelwachstum bzw. die körpereigene Erythropoietin-Produktion stimulieren. Nachweisverfahren für diese niedermolekularen Verbindungen sind daher von großer Bedeutung für die Dopinganalytik, und erste Erfolge sind mit Hilfe der Massenspektrometrie bereits zu verzeichnen. Obwohl diese Verbindungen noch keine Marktreife erreicht haben, zielt die Präventive Dopingforschung in der Analytik auf eine frühzeitige Implementierung neuer Substanzen in Screening-Verfahren ab, um einen Missbrauch einzudämmen.

Der Wunsch, die eigene körperliche Leistungsfähigkeit mit Hilfe legaler wie illegaler Methoden zu steigern, ist wahrscheinlich so alt wie der sportliche Wettbewerb. Entwicklungen pharmazeutischer Produkte zur Behandlung schwerwiegender Krankheiten sowie die zeitgenössische Suche nach

Erweiterungen analytischer Verfahren sind die Folge. Eines der wichtigsten Merkmale der Verbotsliste der WADA ist der Zusatz „...and substances with a similar chemical structure or similar biological effect(s)...“, womit neue oder verwandte Verbindungen auch ohne namentliche Erwähnung in das Verbot eingeschlossen werden. Zu solchen Neuerungen zählen unter anderem kürzlich vorgestellte selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) sowie *hypoxia-inducible transcription factor* (HIF) Stabilisatoren. Während die erstgenannte Substanzklasse eine Gruppe von Wirkstoffen mit großem anabolem Potenzial repräsentiert, zielen HIF-Stabilisatoren auf eine gesteigerte Erythropoese ab. Beide Effekte sind für bestimmte Sportarten von besonderem Interesse, und daher werden Vertreter dieser neuen Therapeutika als dopingrelevant eingestuft und als Konsequenz in Routine-Untersuchungen von Dopingkontroll-Proben zukünftig einbezogen.



Foto: querschnitt/PIXELIO

effektiven *Anti-Aging* Substanzen liefern einen nahezu unerschöpflichen Pool neuer Therapeutika. Diese sind gelegentlich bis häufig mit einem erheblichen Potenzial zum Missbrauch im Sport behaftet. Dopingkontroll-Laboratorien sind aufgefordert, diese neuen Verbindungen möglichst effizient und retrospektiv zu erfassen. Dadurch ist die Liste verbotener Substanzen und Methoden der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) sowie das Dopingkontroll-System ein sehr dynamisches Feld geworden, und regelmäßige Aktualisierungen sowie

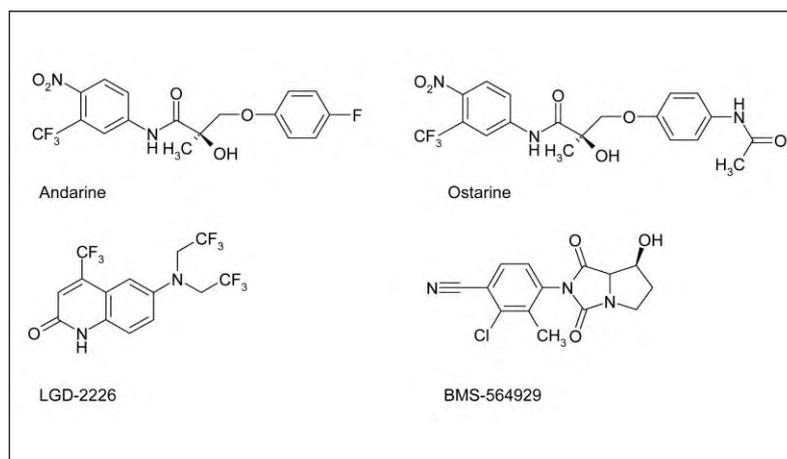
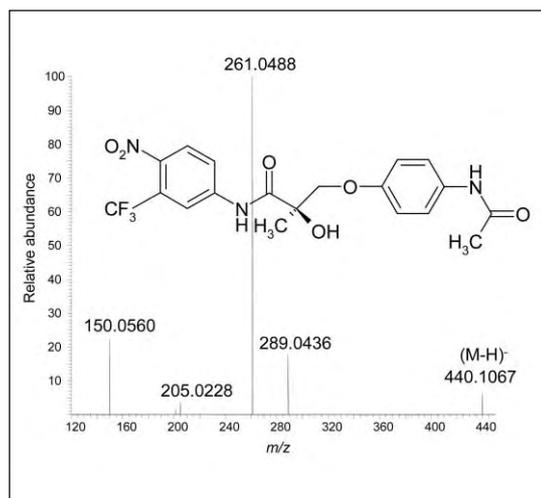
Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs)

Körpereigene Androgene wie das Testosteron sind von essenzieller Bedeutung für die Entwicklung primärer und sekundärer männlicher Charakteristika, wie z.B. die Ausbildung der Geschlechtsorgane bzw. Muskel- und Knochenmasse, Körperbehaarung, etc. Zudem hat Testosteron vorteilhafte Auswirkungen auf die körperliche Leistungsfähigkeit. Und zahlreiche synthetische Analoga wurden über mehrere Jahrzehnte hergestellt, um effektiv anämische Zustände und Hypogonadismus zu behandeln sowie die männliche Zeugungsfähigkeit zu kontrollieren. Steroidersatztherapien mittels synthetischer Testosteronpräparate oder anabol-androgener Steroide zeigten jedoch zahlreiche uner-

wünschte Eigenschaften, wie z.B. Lebertoxizität, Förderung des Prostatawachstums, negative Auswirkungen auf Plasma-HDL-Werte und das kardiovaskuläre System oder Brustwachstum bei Männern (Gynäkomastie). Diese Wirkungen werden in erster Linie durch eine fehlende Gewebeselektivität der steroidalen Wirkstoffe hervorgerufen, d.h., die Androgene stimulieren nicht ausschließlich das gewünschte Zielgewebe der Muskeln und Knochen. Zudem werden bestimmte Effekte, wie z.B. das Prostatawachstum, durch das aktive Stoffwechselprodukt Dihydrotestosteron um ein Vielfaches amplifiziert. Daher wurden seit etwa zehn Jahren Studien zu Androgenrezeptor Modulatoren durchgeführt, deren Struktur nicht auf klassischen Steroiden wie Testosteron basiert, 1998 wurden erste nicht-steroidale SARMs präsentiert. Seitdem sind zahlreiche Substanzklassen mit SARMs-Eigenschaften bekannt geworden, von denen die weit fortgeschrittenen in Abb. 1 aufgezeigt sind. Zu diesen gehören so genannte Arylpropionamide (Ostarine, Andarine), Hydantoinone (BMS-564929) und Chinolinone (LGD-2226).

SARMs – Potenzial und Nachweis

Die Produkte Andarine und Ostarine der Firma GTx Inc. (Abb. 1) haben die klinische Testphase IIB begonnen und in *proof-of-concept* Studien mit gesunden männlichen Probanden klinisch vielversprechende Ergebnisse geliefert. Es wurde ein statistisch signifikanter Zuwachs der fettfreien Körpermasse bei einer 12-wöchigen Verabreichung von 3 mg Ostarine täglich belegt, wobei im Durchschnitt 1.4 kg Muskelmasse mit einhergehender Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit festgestellt wurde, ohne dass kontrollierte Diäten oder Trainingseinheiten vorgegeben oder durchgeführt wurden. Dabei wurden keine der üblichen Nebenwirkungen aus Steroidersatztherapien registriert; Blutwerte sowie Prostata blieben unbeeinträchtigt. In Tierversuchen mit Hydantoinen wie BMS-564929 (Abb. 1) wurden besondere Selektivitäten bezüglich der Muskelgewebe festgestellt, und die Stabilität der Chinolinone wie LGD-2226



(Abb. 1) gegenüber typischen Abbauprozessen von Steroiden nach oraler Gabe sind ebenfalls berichtet worden.

Abb. 1: Strukturen verschiedener SARMs.

Diese Ergebnisse waren für die WADA aber auch für Dopingkontroll-Laboratorien Anlass zu handeln. Es wurden nicht nur Referenzmaterialien hergestellt, im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln wurden auch schon Nachweisverfahren etabliert. Wie in anderen analytischen Verfahren zur Bestimmung dopingrelevanter Verbindungen auch, wurden die Zielsubstanzen aus Urin extrahiert und mit Hilfe chromatographischer und massenspektrometrischer Systeme identifiziert. Dabei werden analytisch-chemische „Fingerabdrücke“ (Produkt-Ionen-Spektren) erstellt, von denen zwei in Abb. 2 dargestellt sind. Die charakteristischen Merkmale (Ionen, welche bestimmte chemische Strukturen der Verbindungen repräsentieren, z.B. m/z 261 oder m/z 241) werden als Indikator für die Anwesenheit solcher Substanzen in Urinproben verwendet und erlauben die Erfassung ganzer Substanzklassen. Somit wird die Verwendung der eigentlichen Therapeutika sowie modifizierte Designer-Analoga durch dopende Sportler erkennbar.

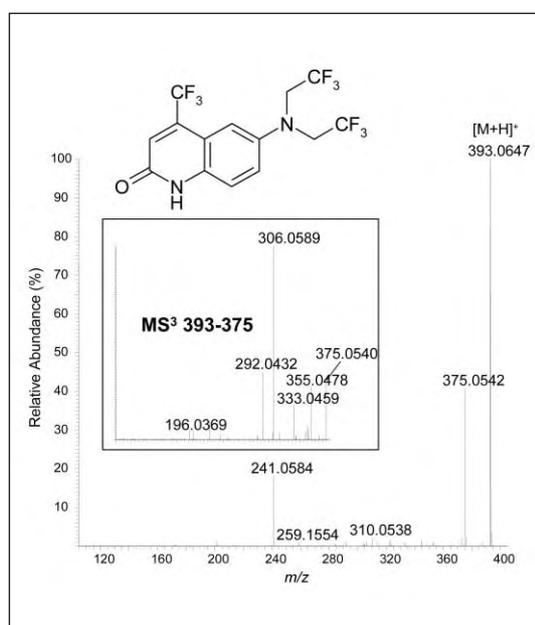


Abb. 2: „Fingerabdrücke“ (Electrospray Produkt-Ionen Spektrum) zweier SARMs: Ostarine (a) und LGD-2226 (b). Typische Produkt-Ionen beider Substanzklassen sind m/z 261 bzw. 241 und erlauben neben den hier dargestellten Verbindungen die Detektion analoger Strukturen.

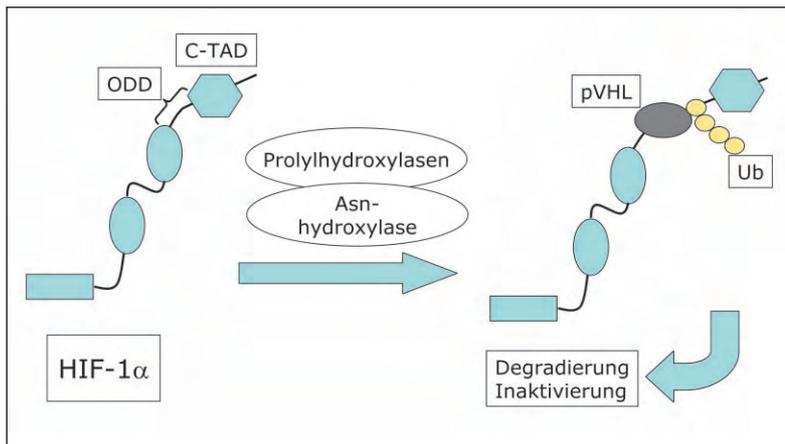
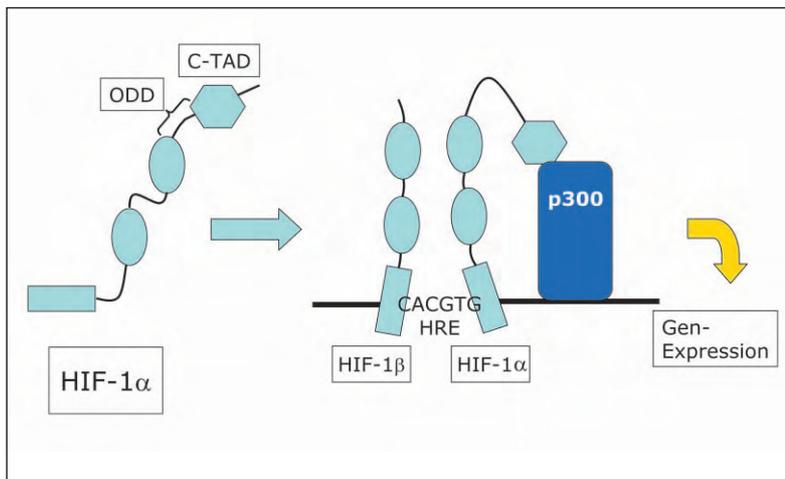


Abb. 3:

Schematischer Ablauf der Stabilisierung bzw. Degradierung des HIF-Komplexes und damit verbundener EPO-Produktion.

a) Die HIF-1 α Einheit besitzt eine Sauerstoff-abhängige Degradierungsdomäne (ODD – oxygen-dependent degradation domain), welche unter Normoxie durch Prolylhydroxylasen oxidiert wird und daraufhin durch einen Ubiquitin-Ligase-Komplex sowie Bindung des von-Hippel-Lindau Proteins (pVHL) markiert und schließlich abgebaut wird. Dadurch wird die Produktion von EPO unterbunden.

b) Unter Hypoxiebedingungen fehlt der Sauerstoff zur Oxidation der ODD und ein stabiler Komplex zwischen HIF-1 α und HIF-1 β sowie weiteren Co-Aktivatoren (p300) kann im Zellkern gebildet werden, der die Genexpression des EPOs verstärkt. HIF-Stabilisatoren verhindern die enzymatisch katalysierte Oxidation der ODD und sorgen so unter Normoxie für eine HIF-Komplexbildung, welche die EPO-Produktion ermöglicht.



HIF-Stabilisatoren – Potenzial und Nachweis

Die Gegenwart bestimmter Mengen zirkulierenden Sauerstoffs erlaubt es Enzymen wie Prolylhydroxylasen, die HIF-1 α Untereinheit zu modifizieren und somit zum gezielten Abbau durch proteasomale Degradierung zu markieren, wie in Abb. 3 schematisch dargestellt ist.

Niedermolekulare Verbindungen mit oraler Bioverfügbarkeit wie z.B. 2-Oxoglutarat Analoga, Oxalylglycin und L-Mimosin (Abb. 4) besitzen die Fähigkeit, die enzymatische Hydroxylierung und somit Destabilisierung des HIF Komplexes zu unterbinden. Dadurch wird die endogene EPO-Produktion und konsequenterweise die Erythropoese signifikant gesteigert. Das wahrscheinlich fortgeschrittenste Produkt dieser neuen Substanzklasse ist FG-2216 (FibroGen Inc.), dessen genaue Struktur bisher unbekannt ist, aber nachweislich auf einem Isochinolin-3-Carbonsäureamidgerüst basiert, dessen Template in Abb. 4 zu sehen ist. Erste Studien mit FG-2216 haben eine dosisabhängige, bis zu 300-fache Steigerung der EPO-Plasmakonzentration in Primaten gezeigt, welche eine immense Steigerung der Erythropoese zur Folge hat. Aufgrund dieses Potenzials ist ein Missbrauch solcher Substanzen im Sport nicht auszuschließen, und gewöhnliche Tests zur Bestimmung rekombinanten EPOs würden negativ ausfallen, da die gesamte ausgeschiedene Menge körpereigen produziert wurde.

Daher ist eine Bestimmung der HIF-Stabilisatoren von besonderem Interesse und mit Hilfe der Massenspektrometrie bei Modell-Substanzen bereits erfolgreich gezeigt worden. Die Substanz 5 (Abb. 4) wurde im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule synthetisiert und massenspektrometrisch untersucht, wobei ein charakteristischer „Fingerabdruck“ (Produkt-Ionen-Spektrum) generiert wurde, der in Abb. 5 zu sehen ist. Sollte dieser oder ein diagnostischer Teil und somit eine strukturell verwandte Verbindung in Urinproben von Sportlern vorgefun-

HIF-Stabilisatoren

Die Produktion von Erythrozyten wird wesentlich beeinflusst und kontrolliert durch die Sauerstoffsättigung des Blutes. Unter reduzierten Sauerstoffbedingungen werden verschiedene Mechanismen gestartet, die zur gesteigerten Erythropoese führen und somit die Anzahl der roten Blutkörperchen erhöhen, um das Defizit transportierten Sauerstoffs auszugleichen. Das Schlüsselhormon dieses Prozesses ist das Erythropoietin (EPO), welches vermehrt unter Hypoxie gebildet wird und maßgeblich die Erythropoese steuert. Auslöser der endogenen EPO Produktion ist Sauerstoffmangel, wodurch Proteinkomplexe der *hypoxia-inducible transcription factors* (HIF), insbesondere der HIF-1 α Untereinheit, nicht oxidiert und somit nicht abgebaut werden können. Die intakten HIF Komplexe (bestehend aus HIF-1 α , HIF-1 β und p300/CREB), welche schließlich die EPO-Produktion starten, können daher als zelluläre Sauerstoffsensoren bezeichnet werden. Um Therapien gegen Blutarmut einzuleiten, bieten sich pharmazeutisch daher zwei Ansatzpunkte, die entweder auf einer EPO-Substitution basieren oder durch pharmakologische Stabilisierung der HIF-Komplexe unter Normoxie erreicht werden. In beiden Fällen kommt es zu einer gesteigerten Erythropoese, welche die Zahl der roten Blutkörperchen erhöht und so anämische Zustände korrigiert.

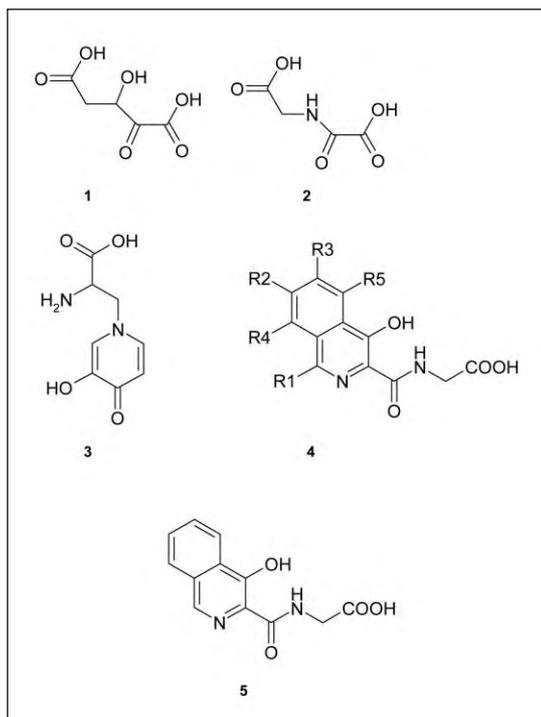


Abb. 4:
Typische Vertreter der HIF-Stabilisatoren.
1) 2-Oxoglutarat, 2) Oxalylglycin, und 3) L-Mimosin. Das so genannte Template der Isochinoline (4) besitzt variable Substituenten, welche mit R gekennzeichnet sind, und (5) ist ein Modell-HIF-Stabilisator mit entsprechendem Isochinolin-Nukleus.

den werden, ist ein Verstoß gegen die Dopingregeln zu verzeichnen.

Fazit

Stetig werden neue Medikamente entwickelt um Krankheiten zu bekämpfen oder bestehende Therapeutika durch bessere oder leichter anwendbare Produkte zu ersetzen. Zahlreiche solcher Produkte können im Sport zur Leistungsmanipulation eingesetzt werden und sind daher durch die WADA verboten. Die Kontrolle dieses Verbots erfolgt durch

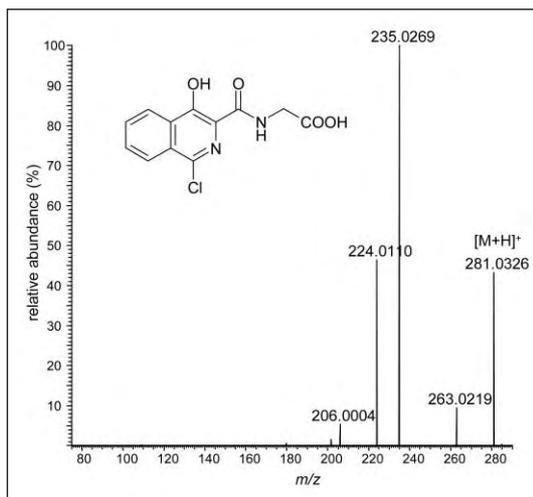


Abb. 5:
„Fingerabdruck“ (Electrospray Produkt-Ionen Spektrum) eines Modell-HIF-Stabilisators.

Dopinganalysen und bedarf einer kontinuierlichen Verbesserung, Erweiterung und Aktualisierung der Nachweisverfahren. Eine frühzeitige und somit präventive Implementierung soll dabei einen Vorsprung dopender Athleten eingrenzen.



Prof. Dr. Mario Thevis, geboren 1973, studierte an der RWTH Aachen Chemie sowie Sportwissenschaften an der Deutschen Sporthochschule Köln, an der er 2001 auch promovierte. Nach einer Tätigkeit als Post-Doc an der University of California Los Angeles habilitierte Thevis 2004 im Fach Biochemie an der DSHS Köln. Seit Februar 2006 ist Thevis Professor für Präventive Dopingforschung an der Deutschen Sporthochschule. Seine Forschungsschwerpunkte liegen in der massenspektrometrischen Charakterisierung und Analytik dopingrelevanter nieder- und hochmolekularer Verbindungen.

E-Mail: m.thevis@biochem.dshs-koeln.de