



Untersuchungen zum Phytoestrogen
8-Prenylnaringenin aus Hopfen für den Einsatz in
der Hormon-Ersatz-Therapie

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Olaf Schaefer

geboren am 10. Januar 1975 in Osnabrück

2004

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. med. Wolf-Dieter Schleuning

Tag der Promotion/Disputation: 25. Juni 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis April 2004 mit Schwerpunkt in der Abteilung Gynecology & Andrology (Female Health Care) der Schering AG, Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Schleuning durchgeführt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde weder als Diplomarbeit noch als ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Berlin, im April 2004

Olaf Schaefer

Zusammenfassung

Die Perimenopause der Frau ist gekennzeichnet durch eine stetige Abnahme der ovariellen Estrogen-Produktion, wodurch vasomotorische (Hitzewallungen), psychische (Stimmungsschwankungen, Libido-Verlust) und somatische (urogenitale Veränderungen) Symptome bedingt sind. Die schwerwiegendste, durch chronischen Estrogen-Mangel hervorgerufene Erkrankung bei der Frau ist jedoch Osteoporose. Die Hormon-Ersatz-Therapie (HRT) wird heute als Standard zur Behandlung der peri- und postmenopausalen Symptomatik (PMS) eingesetzt. Sie beruht auf der Gabe eines Estrogens, was zur Verhinderung einer unerwünschten Uterusstimulation die Kombination mit einem Gestagen notwendig macht. Jüngste Langzeitstudien haben nicht nur zusätzliche Risiken dieser kombinierten Behandlungsmethode in Bezug auf Brust- und Endometriumkrebs sowie venösen Thromboembolismus aufgezeigt, sondern auch den bislang propagierten Schutzeffekt gegen Herzinfarkt nicht bestätigt.

Ein idealer Wirkstoff wäre ein Estrogenrezeptor(ER)-Ligand, der gewebespezifisch estrogenere Wirkungen am Knochen und Gehirn zeigt, ohne gleichzeitig die Brustdrüse, die Leber und den Uterus zu stimulieren. Verschiedene synthetische ER-Liganden, sogenannte selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wurden zur Behandlung von Osteoporose/Brustkrebs entwickelt. Sie eignen sich wegen ihres pharmakologischen Profils jedoch nicht zur Behandlung der PMS.

Ein möglicher Alternativansatz stellt die Erforschung von in der Natur vorkommenden, estrogenen Substanzen dar. Phytoestrogene sind polyphenolische, sekundäre Pflanzenstoffe mit vergleichsweise schwacher estrogenere Aktivität, die auch in diversen Nahrungsmitteln vorkommen. Epidemiologische Studien unterstützen die These, dass die Aufnahme von Phytoestrogenen mit der Nahrung positive Wirkungen auf eine Reihe von estrogenabhängigen Erkrankungen beim Menschen hat. Das Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin (8-PN) wurde kürzlich u.a. als estrogenere Bestandteil des Hopfens identifiziert und zugleich als stärkstes bisher bekanntes pflanzliches Estrogen beschrieben.

In dieser Arbeit wurden grundlegende pharmakologische Studien zur Eignung von 8-PN mit Hinblick auf die HRT durchgeführt. 8-PN wurde in Rezeptorbindungs- sowie Transaktivierungsstudien in humanen Zellen als reiner ER-Agonist mit ER α -Spezifität identifiziert, der keine antiestrogenere Wirkungen besitzt und kein Ligand für andere Steroidrezeptoren ist.

In Genexpressionsanalysen an MCF-7 Brustcarcinoma-Zellen wurde kein qualitativer Unterschied von 8-PN zu 17 β -Estradiol in der Regulation von Marker-Genen gefunden, allerdings war die estrogenere Wirkung in diesen Kulturen deutlich geringer als in Knochenzellen.

In Tiermodellen mit weiblichen Ratten und transgenen Mäusen wurde eine ausgeprägte estrogenere Wirkung im Knochen und Hirn gefunden, bei gleichzeitig geringer Stimulation des Uterus. Diese *in vivo* Daten kennzeichnen 8-PN als ein natürliches SERM dessen pharmakologisches Profil den Einsatz für die HRT ohne Gestagenzusatz möglich erscheinen lässt.

Es wurden in dieser Arbeit mittels organisch-chemischer Synthese von Hapten-Derivaten erstmalig Bioassays zum sensitiven (radio)-immunologischen Nachweis (RIA und ELISA) von 8-PN entwickelt. Kinetik-Studien in Ratte und Hund zeigten vergleichsweise geringe Metabolisierung und einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf von 8-PN. Für eine mögliche dermale Anwendung bei Altershaut peri- und postmenopausaler Frauen wurden Studien zur perkutanen Resorption, Kinetik und Metabolismus von 8-PN in der Haut haarloser Mäuse durchgeführt. Es wurden Formulierungen gefunden, die eine Applikation von 8-PN in die Haut ohne eine systemische Belastung gewährleisten könnten.

Auf Grundlage der vorliegenden Studien wurde eine vorklinische Entwicklung von 8-PN begonnen, die zu einer klinischen Phase-Ia-Studie an 24 menopausalen Frauen führte.

Schlagerwörter: Phytoestrogene, HRT, 8-Prenylnaringenin

Abstract

The female peri-menopause is characterized by a continuous decrease in endogenous estrogen production due to cessation of ovarian function, accompanied by vasomotor (hot flushes), psychological (mood disturbances, loss of libido) and somatic (urogenital atrophy) symptoms. Still, the most severe disease linked to chronic estrogen deficiency is osteoporosis. Hormone replacement therapy (HRT) is the current medical standard for the treatment of peri- and postmenopausal symptoms (PMS). It is based on exogenous estrogen administration that requires the combination with a progestin in order to prevent unwanted uterine stimulation. Recent long-term clinical studies have not only revealed additional risks arisen from this combined treatment in regard to mammary and endometrial cancer as well as venous thromboembolism, but also failed to confirm the to date propagated protective effects against heart attack.

The „perfect drug“ in this sense would be an estrogen receptor (ER) ligand with tissue selective estrogenic effects in bone and brain without stimulation of the mammary gland, the liver and the uterus at the same time. Several synthetic ER ligands, named selective estrogen receptor modulators (SERMs), have been developed to target osteoporosis/mammary cancer but failed to treat PMS due to their pharmacological profile.

An alternative approach is directed towards the investigation of naturally occurring estrogenic substances. Phytoestrogens are polyphenolic, secondary plant metabolites with comparatively weak estrogenic activity that can also be found in various foods. Epidemiological studies support the idea that intake of phytoestrogens with foodstuffs has beneficial effects on a number of estrogen related disorders in humans. The phytoestrogen 8-Prenylnaringenin (8-PN) was recently identified as the estrogenic compound in hop and shown to be the most potent plant derived estrogen described so far.

In this work, basic pharmacological studies were performed to test 8-PN for its potential use in HRT. 8-PN was characterized as a pure ER agonist with some ER α specificity in receptor binding assays and transactivation assays in cultured human osteosarcoma cells. It bears no intrinsic anti-estrogenic activity and is not a ligand to other human steroid receptors.

Gene expression analysis in cultured MCF-7 mammary carcinoma cells showed no qualitative difference in regulation of marker genes by 8-PN compared to endogenous 17 β -estradiol, although estrogenicity of 8-PN was relatively lower in these cells than in cultured osteosarcoma cells.

Animal studies with female rats and transgenic mice displayed a pronounced estrogenic effect in bone and brain with only little uterine stimulation. These *in vivo* data draw a picture of 8-PN as a natural SERM with a pharmacological profile that may allow for the use in HRT with no need for supplementation with a counteracting progestin.

For the first time ever, highly sensitive bioassays for (radio)-immunological detection of 8-PN (RIA and ELISA) were developed in this work by means of organic synthesis of hapten derivatives. Kinetic studies in rat and dog exhibited a relatively limited degree of metabolism and an extensive enterohepatic circulation of 8-PN. Studies on percutaneous resorption, kinetics and metabolism in hairless mouse skin were performed with regard to potential dermal applications in ageing skin of menopausal women. Vehicles were found that may serve as potent carriers of 8-PN into the skin and avoid an unwanted systemic load.

Pre-clinical drug development for 8-PN was initiated based on the presented studies and led to a clinical phase-Ia trial including 24 postmenopausal women.

Key words: Phytoestrogens, HRT, 8-Prenylnaringenin

Abkürzungen

$[\alpha]_{D, \text{Aceton}}$	Optischer Drehwert (in Aceton)
$^1\text{H-NMR}$	Protonen-Magnetresonanz
Å	Angström
AA	Aminosäure
Amp	Ampicillin
AR	Androgenrezeptor
ATCC	American Type Culture Collection, (Manassas, VA, USA)
$\text{AUC}_{0-24\text{h}}$	Area under curve (von 0-24 h)
AZ	Analysenzertifikat (STA, Schering AG)
B/R	Benzylbenzoat / Rizinus Öl
BMD	Bone mineral density (Knochendichte)
br	verbreitert (Protonenmuster im NMR)
BV	Bioverfügbarkeit
cBSA	Cationized bovine serum albumine
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
CHD	Coronary heart disease
CVS	Cardio-vascular system
d	Tage, dublett (NMR)
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
$\text{d}_6\text{-Aceton}$	Deutero-Aceton (NMR)
$\text{d}_6\text{-DMSO}$	Deutero-DMSO (NMR)
DCC	Dextran-coated charcoal
dd	Doppel-Dublett (NMR)
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEE	Diethylether
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
E_2	17β -Estradiol
EA	Ethylacetat
ee	Enantiomerenreinheit
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen response element
$\text{Eu}[\text{FOD}]_3$	Europium-tris(6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-dimethyl-3,5-oktandionat)
FSH	Follicle-stimulating hormone
g	Gravitation
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
hCYP_{450}	Human cytochrome P-450
HDL	High density lipo-protein
HPCD	Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
HPLC	High performance liquid chromatography
HRT	Hormone replacement therapy (Hormonersatz-Therapie)
hsp	Heat-shock protein

i.g./p.o.	Intragastral / per os (über Magen-Darmtrakt)
i.v.	Intravenös
ILCL	Interlab Cell Line Collection, Genua (IT)
IPA	Isopropylalkohol (2-Propanol)
IR	Infrarot (Spektroskopie)
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
LDL	Low density lipo-protein
LH	Lutenizing hormone
m	Multipllett (NMR)
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCS	Micro crystal suspension
min	Minute
MOMCl	Methoxymethylchlorid
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekülgewicht / Mittelwert
OS-	Syntheseprotokoll-Nr. (O. Schaefer)
OVX	Ovariectomie
P(Ph) ₃	Triphenylphosphin
p.a.	Per Analysis (HPLC-Qualität)
PBS ⁻	Phosphate buffered saline w/o Mg ²⁺ /Ca ²⁺
Ph	Phenyl
PI-3-K	Phosphatidylinosit-3-Kinase
PK	Pharmakokinetik
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PR	Progesteronrezeptor
quart.	Quartett (NMR)
quin.	Quintett (NMR)
rac.	Racemisch
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
s	Sekunde, singluett (NMR)
s.c.	Subkutan
SBG	Steroid binding globulin (Hund)
SD	Standardabweichung
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SHAM	Kontrolloperation
SHBG	Sex hormone binding globulin (Mensch)
Smp.	Schmelzpunkt
SR	Steroidrezeptor
STA	Strukturaufklärung, Schering AG
T	Temperatur
t	Zeit, Triplett (NMR)
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin Layer Chromatographie
TMS	Tetramethylsilan (NMR-Standard)
VTE	Venous thromboembolism
ZK	Zentralkartei chemischer Substanzen (Schering AG)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Steroid-Hormone.....	1
1.1.1 Biosynthese und Klassifizierung von Steroid-Hormonen.....	1
1.2 Estrogene, ER & Wirkmechanismus.....	3
1.2.1 „Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden“-Achse.....	3
1.2.2 Estrogenrezeptor.....	3
1.2.3 Molekularer Wirkmechanismus von Estrogenen.....	5
1.3 Menopause, HRT und SERMs.....	7
1.3.1 Peri- und Postmenopausale Symptomatik.....	7
1.3.2 Estrogene und Altershaut.....	9
1.3.3 Hormon-Ersatz-Therapie (HRT).....	10
1.3.4 SERMs.....	12
1.4 Phytoestrogene.....	14
1.4.1 Phytoestrogene.....	14
1.4.2 8-Prenylnaringenin.....	17
1.4.3 Phytoestrogene und HRT.....	18
1.5 Ziel der Arbeit.....	19
2. ERGEBNISSE.....	22
2.1 Chemie.....	22
2.1.1 Synthese von 8-PN.....	22
2.1.2 Synthese von Hapten-Derivaten.....	24
2.1.3 ³ H-Tracer-Synthese.....	28
2.2 In vitro Untersuchungen.....	31
2.2.1 Rezeptor-Bindung.....	31
2.2.1.1 Bindung ER α und ER β	31
2.2.1.2 Bindung an PR, GR, MR und AR.....	33
2.2.2 Transaktivierung und Transsuppression.....	34
2.2.2.1 Transaktivierung über ER α und ER β	34
2.2.2.2 Transsuppression von ER α und ER β	36
2.2.2.3 AR-Transaktivierung.....	38
2.2.2.4 AR-Transsuppression.....	39
2.2.3 Zellproliferation (E-Screen).....	39

2.2.4 Genexpression.....	42
2.2.4.1 Bax und Bcl-2.....	43
2.2.4.2 pS2.....	45
2.2.4.3 c-Fos und Srf.....	46
2.2.4.4 ER α , VDR und PR.....	48
2.2.4.5 E-Cadherin.....	51
2.3 In vivo Untersuchungen.....	52
2.3.1 Uterus-Wachstum-Test.....	52
2.3.2 Gewebespezifische Estrogenität im ERE-Luc ⁺ Maus-Modell.....	53
2.3.3 BMD-Studien an der OVX-Ratte.....	55
2.4 Pharmakokinetische Untersuchungen.....	59
2.4.1 Pharmakokinetik & Metabolismus.....	59
2.4.1.1 Weibliche Wistar Ratte.....	59
2.4.1.2 Weibliche Beagle Hunde.....	62
2.4.1.3 ADME-Profil und Bioverfügbarkeit in Ratte und Hund.....	64
2.4.2 Dermale Penetration, Resorption und Metabolismus.....	67
2.4.2.1 Franz-Kammer Modell.....	67
2.4.2.2 Metabolismus & Radio-HPLC.....	71
2.5 Assay-Entwicklung.....	76
2.5.1 Immunisierung, Antiserumgewinnung & ELISA.....	76
2.5.2 Probenvorbereitung.....	80
2.5.3 Antiserum-Spezifität.....	81
2.5.3.1 HPLC-Fraktionierung von Pool-Serum.....	81
2.5.3.2 Kreuzreaktivitäten mit strukturanalogen Verbindungen aus Hopfen.....	84
2.5.4 ELISA vs. RIA.....	86
3. DISKUSSION.....	87
3.1 Chemie von 8-PN.....	88
3.1.1 Biosynthese und Laborherstellung von 8-PN.....	88
3.1.2 Isomerisierung im organisch-wässrigen Medium.....	90
3.2 8-PN als pflanzliches SERM.....	92
3.2.1 Pharmakologisches in vitro Profil von 8-PN.....	92
3.2.2 In vivo Pharmakologie von 8-PN.....	94
3.2.3 Pharmakokinetik und Metabolismus.....	98
3.2.4 Pharmakokinetik in der Haut.....	102
3.3 Bioanalytik.....	103
3.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	106

4. MATERIAL & METHODEN	108
4.1. Chemische Methoden und Materialien	108
4.1.1 <i>Allgemeine Organisch-Chemische Synthesen</i>	108
4.1.2 <i>Isotopenchemie</i>	109
4.2 Molekularbiologische u. biochemische Methoden & Materialien	109
4.2.1 <i>Puffer und Lösungen</i>	109
4.2.2 <i>Steroid-Rezeptor-Bindung</i>	111
4.2.2.1 <i>ER-Bindung</i>	111
4.2.2.1.1 <i>Gewinnung von ER-reichem Cytosol</i>	111
4.2.2.1.2 <i>ER-Bindungs-Assay</i>	111
4.2.3 <i>Verwendete Zellen</i>	112
4.2.4 <i>Verwendeter Bakterienstamm</i>	112
4.2.5 <i>Verwendete Plasmide</i>	113
4.2.6 <i>Transaktivierung und Transsuppression</i>	113
4.2.6.1 <i>Kultur und Assay in U2-OS Zellen</i>	113
4.2.6.2 <i>Kultur und Assay in PC-3 Zellen</i>	114
4.2.7 <i>In vitro Proliferation von MCF-7 und T47D</i>	114
4.2.7.1 <i>Zellkultur und Assay-Durchführung</i>	114
4.2.8 <i>In vitro Expressionsanalyse in MCF-7 Zellen</i>	115
4.2.8.1 <i>Zellkultur</i>	115
4.2.8.2 <i>RNA-Isolierung und cDNA-Erststrangsynthese</i>	115
4.2.8.3 <i>Real-time quantitative PCR (SYBR™ Green)</i>	115
4.2.8.4 <i>Verwendete RT-PCR-Primer</i>	117
4.3 Pharmakologische Methoden und Materialien	119
4.3.1 <i>ELISA-Messung von 8-PN in biologischen und nicht-biologischen Proben</i>	119
4.3.2 <i>HPLC-Fraktionierung von Serum- und Urinproben</i>	119
4.3.3 <i>Aufarbeitung von Geweben und Fäces aus Kinetikstudien</i>	120
4.3.4 <i>Chirale HPLC-Analyse der Enantiomere 2S(-)8-PN und 2R(+)-8-PN</i>	121
4.3.5 <i>Konjugatsspaltung biologischer Proben</i>	121
4.3.6 <i>Franz-Kammer Haut-Diffusions-Modell</i>	122
4.3.7 <i>Radio-HPLC</i>	123
4.4 Tierexperimentelle Materialien und Methoden	124
4.4.1 <i>Studien zur in vivo Estrogenität</i>	124
4.4.1.1 <i>Uterus-Wachstumtest an der juvenilen Ratte</i>	124
4.4.2 <i>Studien zur Pharmakokinetik von 8-PN</i>	124
4.4.2.1 <i>Pharmakokinetik-Studie an weiblichen Wistar-Ratten (KIST20020123)</i>	124
4.4.2.2 <i>Pharmakokinetik-Studie an weiblichen Beagle-Hunden (KIST20020177)</i>	125

4.4.3 Methoden zur Antikörper-Gewinnung aus Kaninchen.....	125
4.4.3.1 Konjugat-Synthese	126
4.4.3.2 Immunisierung und Titerbestimmung	126
4.4.3.3 Herstellung von Peroxidase-Tracern für ELISA	127
5. ANHANG	128
5.1 Chemische Synthesen.....	128
5.1.1 Isotopenchemie	137
5.2 Chemische Strukturen	139
5.3 Physikochemische Daten von 8-PN.....	140
6. LITERATUR	142
7. PUBLIKATIONEN	150
8. LEBENSLAUF	151
9. DANKSAGUNG	152

1. EINLEITUNG

1.1 Steroid-Hormone

Die Steuerung komplexer physiologischer Vorgänge in multizellulären Organismen erfordert ein abgestimmtes Zusammenspiel von hochwirksamen Botenstoffen. Neben dem Nervensystem, das für eine schnelle und zielgerichtete Steuerung ausgelegt ist, besitzen höhere Eukaryoten mit dem Hormonsystem noch ein weiteres System zur Informationsübertragung, das erheblich langsamer und nachhaltiger wirkt. Reproduktion und Verhalten, Wachstum und Entwicklung, Immunantwort, Aufrechterhaltung des Elektrolyt-, Wasser- und Nährstoffgleichgewichts, der Zellstoffwechsel und das Energiegleichgewicht werden unter anderem von Hormonen reguliert (Lucas and Granner, 1992). Sie werden in speziellen Drüsen bzw. Geweben produziert, nach Bedarf systemisch freigesetzt und wirken in geringsten Konzentrationen und z.T. über weite Entfernungen spezifisch auf Zielzellen innerhalb des Organismus.

1.1.1 Biosynthese und Klassifizierung von Steroid-Hormonen

Steroid-Hormone stellen eine wichtige Untergruppe von Hormonen des endokrinen Systems dar. Auf sie entfallen beim Menschen etwa 15 % aller vorkommenden Hormone. Die Biosynthese der Steroide erfolgt als Teil des Fettstoffwechsels hauptsächlich in der Nebennierenrinde (Adrenocortex), den Gonaden und der Plazenta der Frau. Daneben werden Steroide in geringem Maße auch in der Peripherie, z.B. dem weißen Fettgewebe produziert (Meseguer et al., 2002). Ausgehend vom Cholesterol teilen sich die Steroide in fünf Hauptklassen auf (Abb. 1). Die Cortex-Steroide der Nebennierenrinde leiten sich vom Progesteron bzw. Hydroxyprogesteron ab. Glucocorticoide kontrollieren den Protein-, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel und sind wichtige Immun-Mediatoren bei Entzündungsprozessen. Die Mineralocorticoide haben regulativen Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt und den Tonus. Androgene, Estrogene und Gestagene gehören zu den Sexual-Steroiden, die hauptsächlich von Testis bzw. Ovar und Plazenta gebildet werden. Androgene steuern beim Mann vor allem die Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale wie auch die Spermatogenese.

Estrogene regulieren vornehmlich die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsmerkmale und zusammen mit den Gestagenen den Menstruationszyklus und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Estrogene werden aus Androgenen durch enzymatische Oxidation synthetisiert. Das beteiligte Cytochrom P-450 Enzym (Aromatase) findet sich auch in vielen Geweben (Knochen, Hirn, Fettgewebe, Gefäßmuskelzellen etc.) wo es zirkulierendes Testosteron in Estradiol umwandelt, das wiederum vor Ort wichtige physiologische Aufgaben erfüllt. Die weite Verbreitung von Aromatase im Organismus macht deutlich, dass die Estrogen-Effekte an einzelnen Geweben bzw. Organen nicht zwangsläufig die Estrogen-Konzentration im Blut widerspiegeln.

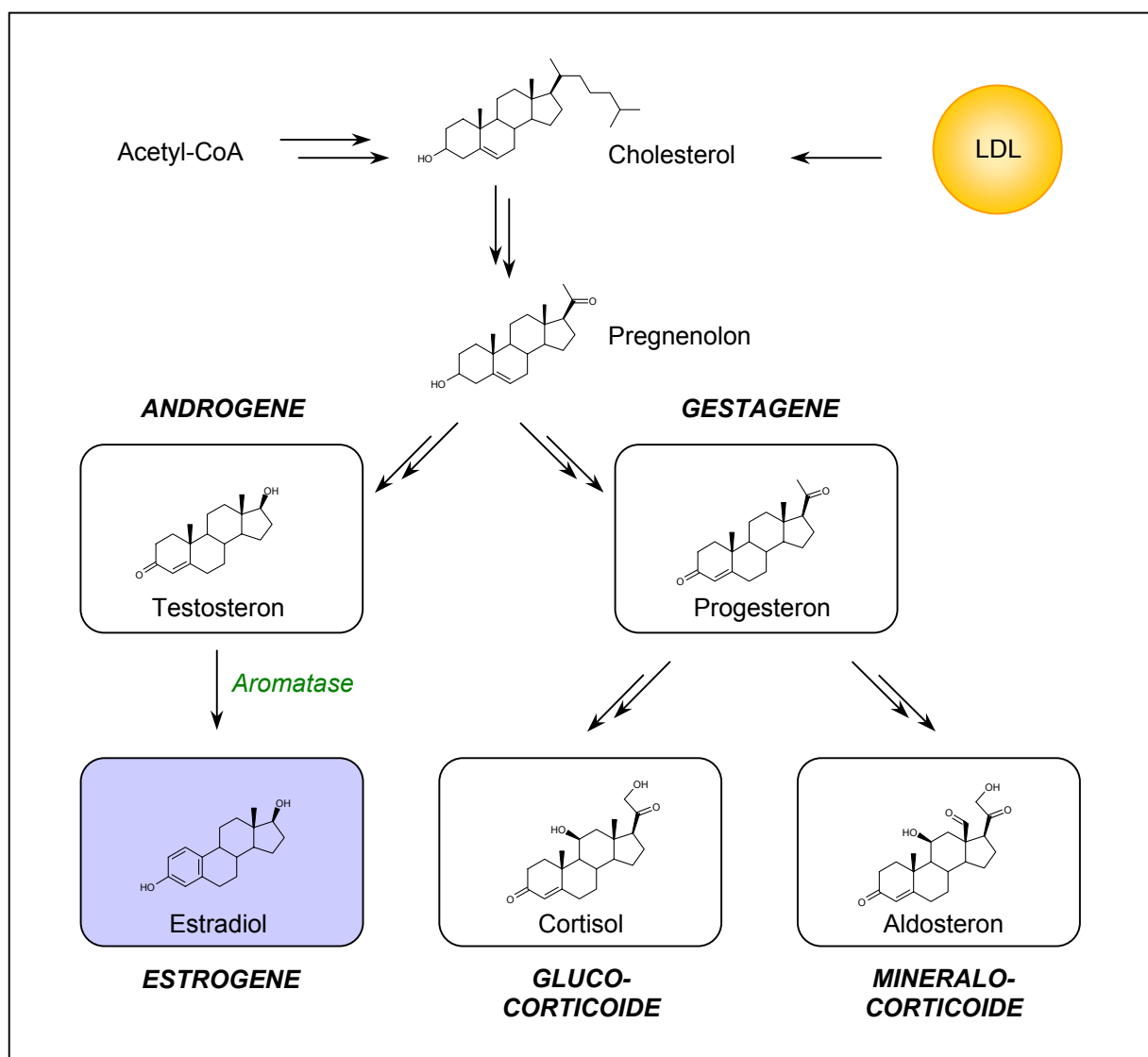


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Biosynthese der fünf verschiedenen Klassen von Steroid-Hormonen ausgehend vom Cholesterol über den gemeinsamen Vorläufer Pregnenolon. Das in vielen Geweben exprimiert Cytochrom-P450-Enzym Aromatase katalysiert die Synthese von Estradiol aus Testosteron.

1.2 Estrogene, ER & Wirkmechanismus

1.2.1 „Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden“-Achse

Die Produktion von Estrogenen im Ovar der Frau unterliegt der neuro-hormonalen Regulation durch den Hypothalamus und die Hypophyse (Laycock and Wise, 1996). Als steuernde Größe schütten spezielle Neurone des Hypothalamus "gonadotropin-releasing hormone" (GnRH) aus. Die Freisetzung des Dekapeptides über die GnRH-Neurone erfolgt dabei synchron und pulsatil, wobei der Pulsrhythmus abhängig ist von der Zyklusphase der Frau und der Circadianrhythmik. GnRH gelangt durch das Pfortadersystem direkt in den Hypophysenvorderlappen und regt diesen zur Synthese und Ausschüttung der dipeptidergen Gonadotropine „lutening hormone“ (LH) und „follicle-stimulating hormone“ (FSH) an. Diese gelangen über die Blutbahn zum Ovar. LH induziert dort in den Thekazellen G-Protein vermittelt die Synthese von Testosteron und Androstendion, das in den Granulosazellen unter FSH-Einwirkung zu 17 β -Estradiol (E₂) umgewandelt wird. Progesteron (*Corpus Luteum*) und das Peptidhormon Inhibin (Granulosazellen) werden ebenfalls im Ovar produziert und ins Blut abgegeben.

E₂ und Progesteron üben eine Feedback-Kontrolle auf GnRH, LH und FSH sowohl auf hypothalamischem als auch auf hypophysärem Niveau aus. Bereits leicht erhöhte E₂-Spiegel bewirken eine rasche Inhibition der GnRH-Ausschüttung. Der Effekt wird durch hohe Progesteron-Spiegel zusätzlich verstärkt. E₂ und Progesteron modulieren dabei in unterschiedlichem Maße sowohl die Amplitude als auch die Frequenz der hypothalamischen GnRH-Freisetzung. Neben diesem negativen Feedback-Loop löst Estradiol in hohen Konzentrationen durch positive Rückkopplung einen LH-Peak aus, der zur Ovulation führt. Hierfür müssen die Estrogen-Spiegel allerdings über mindestens 24 h deutlich (2-4 fach) ansteigen. Inhibin wirkt regulierend auf die Follikelreifung und es hemmt die FSH-Ausschüttung der Hypophyse.

1.2.2 Estrogenrezeptor

Vor mehr als 40 Jahren wurde aufgrund der spezifischen Bindung von E₂ in Uterusgewebe die Existenz eines spezifischen Rezeptors postuliert (Jensen and Jacobsen, 1962), der 1986 als Estrogenrezeptor (ER) aus MCF-7 Brustkrebszellen kloniert wurde (Green et al., 1986). Erst 1995 wurde ein weiterer Estrogenrezeptor aus Ratten-Prostata cDNA isoliert (Kuiper et al., 1996). Der frühere Estrogenrezeptor wurde daraufhin als ER α klassifiziert, der neu klonierte

als ER β . Beide ER gehen trotz ihres hohen Konservierungsgrades (ca. 60 %) auf Aminosäureebene nicht durch alternative Transkription des gleichen Gens hervor, sondern werden von unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen codiert.

ER α und ER β gehören zur Familie der nukleären Steroidrezeptoren, zu der auch der Androgen- (AR), Progesteron- (PR), Glucocorticoid- (GR) und der Mineralocorticoidrezeptor (MR) gehören. Sie sind allesamt ligandenabhängige Rezeptoren mit einem gemeinsamen strukturellen Aufbau (Evans, 1988) bestehend aus drei unabhängigen funktionellen Domänen, verbunden durch eine "hinge-region" (Abb. 2). Der N-Terminus der Steroidrezeptoren beherbergt eine ligandenunabhängige AF1 (Activation Function) Domäne, die für Protein-Protein-Interaktionen des Rezeptors und die Aktivierung der Transkription von Zielgenen essentiell ist. Die AF1 Domänen von ER α und ER β unterscheiden sich deutlich in ihrer Sequenz, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Aktivität beider Rezeptoren in verschiedenen Promotor- und Co-Faktor-Kontexten ist (Cowley and Parker, 1999).

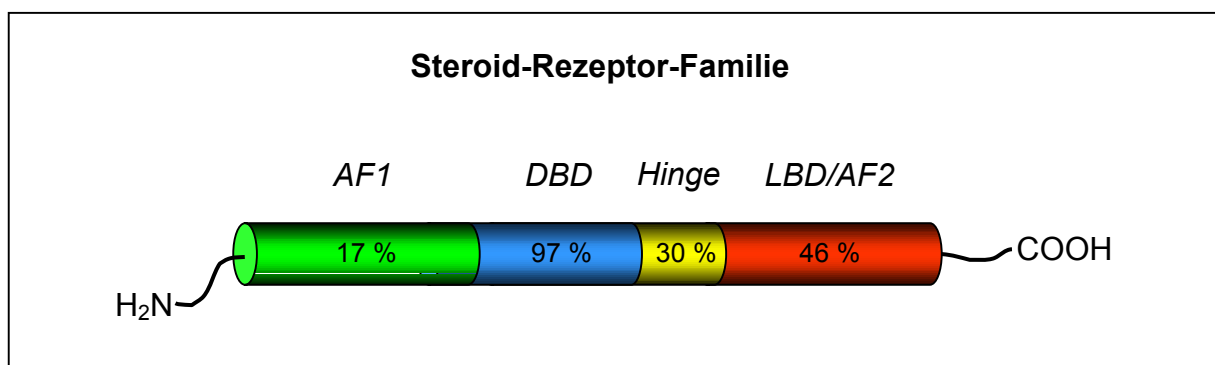


Abbildung 2: Schematische Darstellung des modularen Domänen-Aufbaus der Steroidrezeptor-(SR)-Familie der Kernrezeptoren. AF1: Transkriptionelle Regulation; DBD: DNA-Bindung und Rezeptor-Dimerisierung; LBD: Liganden-Bindung/AF2 transkriptionelle Regulation. Innerhalb der Elemente ist die prozentuale Aminosäuresequenzhomologie der einzelnen Domänen von ER α (595 AA) und ER β (530 AA) angegeben.

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist die am besten konservierte Struktur innerhalb der SR-Familie. Sie enthält zwei Zink-Finger Strukturen und spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-Dimerisierung und der Bindung an spezifische Sequenzelemente der DNA, den Steroid-Responsiv-Elementen (SRE). Einer kurzen "hinge-region" folgt C-terminal die Liganden-Bindungs-Domäne LBD, die die Liganden-Bindungstasche formt. Darüber hinaus enthält die LBD eine AF2-Domäne, die direkt mit Co-Aktivator-Proteinen interagiert. Auch diese Domäne ist zwischen ER α und ER β nur schwach konserviert.

ER α und ER β binden E₂ mit fast identischer Affinität und zeigen zudem ein ähnliches Bindungsprofil für viele natürliche und synthetische Liganden (Kuiper et al., 1997). Die biologische Funktion beider Isoformen ist teilweise redundant. Dennoch gibt es signifikante Unterschiede zwischen beiden Rezeptoren in Hinblick auf Gewebeverteilung, Phänotyp der jeweiligen Knock-out Mäuse und ihrer transkriptionellen Aktivität (Dechering et al., 2000; Saunders et al., 1998; Taylor and Al-Azzawi, 2000). RT-PCR und Immunhistochemie haben die unterschiedliche Verteilung von ER α und ER β aufgezeigt. Im Säuger wird ER α vor allem im Uterus, Leber, Brust, im kardiovaskulären System, im Knochen sowie in einigen Bereichen des Gehirns exprimiert. ER β ist nicht nur in den Ovarien der Frau und der Prostata sondern auch in vielen anderen Geweben wie etwa Lunge, Blase, Herz, Nebenniere, Thymus, Niere, Hypothalamus, Hypophyse und der Haut vorhanden.

1.2.3 Molekularer Wirkmechanismus von Estrogenen

In Abwesenheit eines Liganden liegt der ER im Komplex mit inhibitorischen Chaperonen im Kern vor (Sanchez et al., 1990). Lipophiles E₂ wird im Blutstrom an "sex-hormone-binding-globulin" (SHBG) bzw. Serumalbumin gebunden transportiert und gelangt über Diffusion durch die Lipidmembranen der Zell-Oberfläche und des Kerns in den Nukleus (Abb. 3). Die Bindung an den ER führt zu einer Konformationsänderung und der Dissoziation der Chaperone vom Rezeptor. Der Liganden-aktivierte ER α /ER β homo- bzw. hetero-dimerisiert (Kumar and Chambon, 1988) und bindet DNA spezifisch über ein Estrogen-Responsives-Element (ERE), das aus einem 13 Basenpaare umfassenden Palindrom besteht. Das DNA-gebundene ER-Dimer interagiert mit nukleären Co-Faktoren was zu einer spezifischen transkriptionellen Regulation des Zielgens führt. Die Interaktion mit zellulären Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erfolgt sowohl promotor- als auch zelltypspezifisch (Tora et al., 1989).

Neben den genomischen Wirkungen des ER als nukleärer Transkriptionsfaktor wurden neuerdings auch sogenannte schnelle, nicht genomische Effekte von Estrogenen in verschiedenen Geweben beobachtet (Levin, 2002). Diese raschen Estrogen-Wirkungen werden über membranständige ERs (Pappas et al., 1995) vermittelt, die an cytosolische Signaltransduktions-Proteine gekoppelt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Estrogene an der Zelloberfläche eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden auslösen (Nadal et al., 2001). E₂ aktiviert beispielsweise den „mitogen-activated protein kinase“- (MAPK)-Signalweg innerhalb

weniger Sekunden. Auch zellulärer Ca^{2+} -Influx und die Bildung von cAMP und IP_3 werden durch E_2 stimuliert (Levin, 2002).

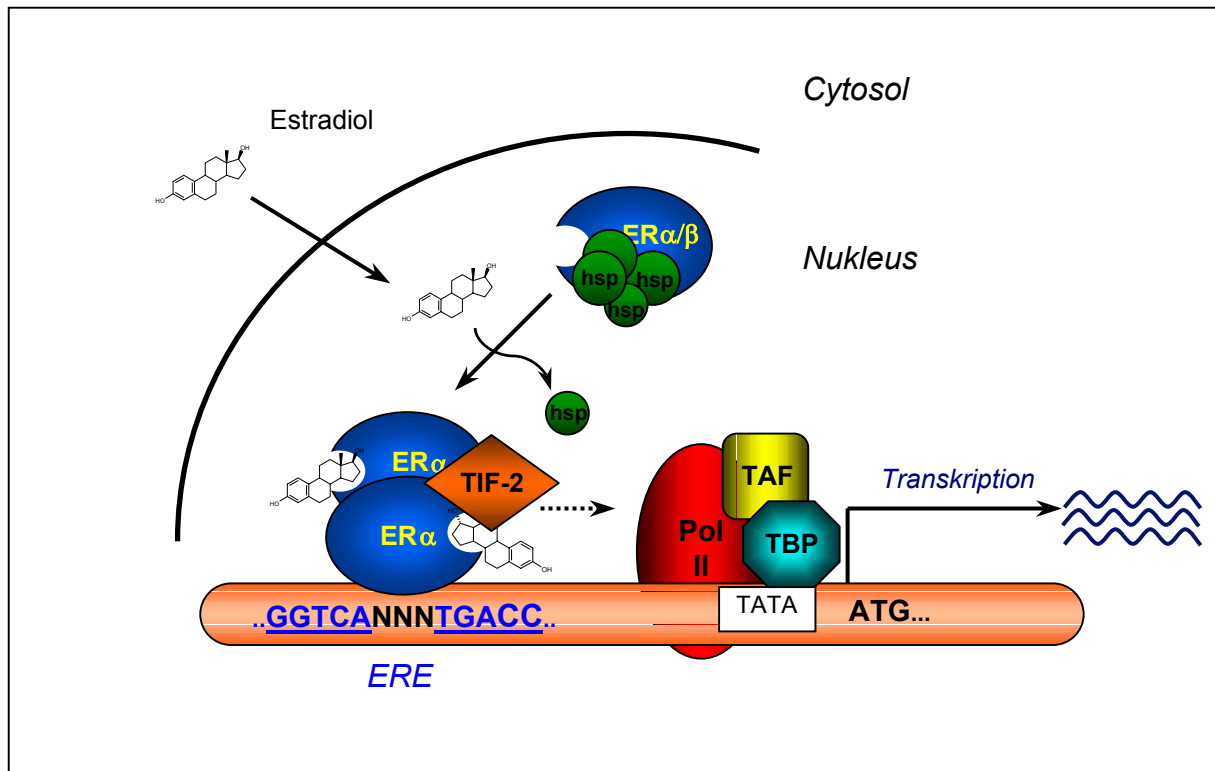


Abbildung 3: Schematische Darstellung der klassischen, genomischen Estrogen-Wirkung. Lipophiles E_2 gelangt über die Plasma- und Kernmembran in den Nucleus und bindet an den Estrogenrezeptor (ER) α bzw. β . Die Liganden-Bindung verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors, was zur Dissoziation der inhibierenden Hitze-Schock-Proteine (hsp) führt. Der aktivierte Rezeptor homo- bzw. heterodimerisiert und bindet an spezifische, palindromische Estrogen-Responsive-Elemente (ERE) auf der DNA. Rekrutierung spezifischer Co-Aktivatoren wie SRC-1, SRC-2 (TIF-2/GRIP-1) oder p300/CBP bewirkt in diesem Fall die Bildung des Initiationskomplexes und nachfolgend die Transkription des Zielgenes durch die RNA-Polymerase II.

Transfektionen von $\text{ER}\alpha$ bzw. $\text{ER}\beta$ in ER-negative Zellen führten zur Expression sowohl des nukleären als auch des Plasmamembranrezeptors (mER), was auf ein gemeinsames Transkript von ER und mER hindeutet (Razandi et al., 1999). Ergebnisse anderer Gruppen wiederum lassen den Schluss zu, dass ER und mER zwar ähnliche funktionelle Strukturen besitzen, sich jedoch sowohl genetisch als auch pharmakologisch voneinander unterscheiden (Nadal et al., 2001). Kürzlich wurde von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, dass Estrogene über die Membranrezeptoren und deren nachgeschaltete Signalwege auch mit anderen Mitogenen in-

teragieren können. Ein entsprechender „cross-talk“ zwischen Estrogenen und Wachstumsfaktoren wurde für IGF-1, EGF und TGF- α beschrieben (Filardo, 2002; Klotz et al., 2002; Seo and Leclercq, 2002). Diese neuen Studien belegen, dass das klassische Modell der genomischen Estrogen-Wirkung allein über den nukleären ER unvollständig ist und um die Membranrezeptoren sowie die komplexen Interaktionen mit anderen cytoplasmatischen Signaltransduktionswegen erweitert werden muss.

1.3 Menopause, HRT und SERMs

Die World Health Organisation (WHO) definiert die Menopause der Frau als das dauerhafte Ende der Menstruation bedingt durch den Verlust an ovariell-follikulärer Aktivität (WHO, 1996). Sie wird rückblickend auf den Zeitpunkt der letzten Monatsblutung datiert, wenn diese kontinuierlich über 12 Monate ausgeblieben ist. Die Perimenopause (Klimakterium) beginnt mit den ersten Anzeichen der einsetzenden Menopause und erstreckt sich bis mindestens ein Jahr nach Beginn der Menopause. Das Durchschnittsalter der Frau bei Eintritt in die Perimenopause liegt bei 47 Jahren. Sie dauert im Schnitt bis zu vier Jahre an, wonach sie in die Postmenopause übergeht (Treloar, 1981).

1.3.1 Peri- und Postmenopausale Symptomatik

Die Perimenopause ist durch eine stetige Abnahme der endokrinen Aktivität der Ovarien gekennzeichnet. Wenn die Anzahl der Follikel eine kritische Grenze unterschreitet, treten Veränderungen der Hormonproduktion auf. Zunächst nimmt die ovarielle Produktion von Inhibin ab. Die Produktion von FSH durch die Hypophyse steigt stark, die von LH mäßig an. Anovulatorische Zyklen treten vermehrt auf. Letztlich reagieren die Follikel nicht mehr auf die ausgeschütteten Gonadotropine, die Ovulation bleibt dauerhaft aus. In der Postmenopause sinkt auch die Produktion der ovariellen und später auch der adrenalen Androgene. Die zuvor erhöhten Gonadotropine gehen zurück und die Estrogen-Spiegel sinken auf ein dauerhaft niedriges Niveau ab.

Vasomotorische, psychische und somatische Symptome setzen durch den Estrogen-Mangel ein. Zu den klassischen Beschwerden des Klimakteriums zählen Hitzewallungen („hot flushes“), Tachykardien, Stimmungsschwankungen, Schlafstörungen, nächtliche Schweißausbrüche und Libido-Verlust. Hinzu kommen urogenitale Veränderungen, die durch die Atrophie der Vaginal- und Uterusschleimhaut gekennzeichnet sind und u.a. zu einer erhöhten Anfälligkeit für Harnwegsinfektionen führen. Auch Inkontinenz wird zu einem Problem (Greendale et al., 1998; Hextall, 2000; Tatarzyn et al., 1979). Daneben hat der Estrogen-Mangel einen direkten Einfluss auf das Cardio-Vaskular-System (CVS). Die Leber reagiert mit einer Umstellung der Produktion von Serum-Lipiden. Die Konzentration von HDL im Serum nimmt ab während die von LDL zunimmt, wodurch das Risiko von Arteriosklerose ansteigt. Die ausbleibenden, relaxierenden Wirkungen von Estrogenen auf das Gefäßendothel über die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die verminderte Expression anti-oxidativer Enzyme bewirken zusammen mit dem Wechsel der Serum-Lipide insgesamt eine Zunahme des Risikos für koronare Herzerkrankungen (CHD) bei der postmenopausalen Frau (Chambliss and Shaul, 2002; Hsu et al., 2001; Prelevic and Jacobs, 1997). Das Progesteron-Defizit bei anovulatorischen Zyklen kann sich in Wasserretention und Ödembildung und in Kopfschmerzen äußern (Steck, 2003).

Der wichtigste Langzeit-Effekt von Estrogen-Mangel ist der Verlust an Knochendichte (Osteoporose). Osteoporose betrifft überwiegend postmenopausale Frauen und die Häufigkeit und der Schweregrad nehmen mit dem Andauern der Estrogen-Defizienz zu. Die knochenprotektiven Eigenschaften von Estrogenen sind klar belegt (O'Connell et al., 1998). Sie haben einen stimulierenden Effekt auf die knochenbildenden Osteoblasten, während die für die Resorption und Umwandlung von Knochengewebe verantwortlichen Osteoklasten durch Estrogene gehemmt werden. Bei andauerndem Estrogen-Mangel verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung höherer Osteoklasten-Aktivität, was mit einer allmählichen Calcium-Mobilisierung aus dem Knochen einhergeht. Dies äußert sich in einer abnehmenden Knochendichte (BMD) und einer erhöhten Morbidität. So nimmt die Häufigkeit vor allem von Hüftgelenksfrakturen bei postmenopausalen Frauen deutlich zu (WHO, 1994).

Interessanterweise variiert die Häufigkeit des Auftretens peri- und postmenopausaler Beschwerden sowie deren Ausprägung lokal sehr stark. Während in westlichen Zivilisationen klimakterische Beschwerden sehr häufig vorkommen, sind diese bei asiatischen Frauen weniger oft zu beobachten. Auch das Risiko von Hüftgelenksfrakturen ist bei älteren Japanerinnen deutlich geringer als bei Europäerinnen und Nordamerikanerinnen gleichen Alters. Ein

Grund für diese lokalen Effekte wird u.a. in den unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten der einzelnen Populationen gesehen (WHO, 1994).

1.3.2 Estrogene und Altershaut

Die Haut ist ein heterogenes Gewebe mit vielfältigen Funktionen wie z.B. Infektionsabwehr, UV-Schutz, Thermoregulation und Kontrolle des Wasserhaushaltes. Darüber hinaus ist sie ein endokrines Organ, das Vorläufer der adrenalen Sexualsteroiden aus der Nebennierenrinde (v.a. Dihydroepiandrosteron, DHEA) lokal zu Androgenen und Estrogenen metabolisiert. Estrogene zeigen zahlreiche direkte Wirkungen auf alle Bereiche der Haut, was mit dem breiten Vorkommen des Estrogenrezeptors in der Haut einhergeht.

Seit langem ist bekannt, dass Estrogene für den vitalen Erhalt der humanen Haut eine wesentliche Rolle spielen. Die Menge an dermalem Kollagen und dessen Vernetzung, die Dicke der Dermis und der Grad ihrer Vaskularisierung werden von Estrogenen positiv beeinflusst, was vor allem durch die Veränderungen der Haut bei postmenopausalen Frauen deutlich wird (Brincat, 2000). Die mitotische Aktivität der Epidermis wird durch Estrogene ER-vermittelt stimuliert (Punnonen, 1972). Dabei ist die Menge an ER in der Haut an verschiedenen Bereichen des Körpers durchaus unterschiedlich. Im Vergleich zu Brust- und Oberschenkelhaut mit relativ geringem Anteil an ER werden besonders hohe Mengen des Estrogenrezeptors in der facialis Epidermis exprimiert (Hasselquist et al., 1980). In der humanen Haut kommt vornehmlich der ER β vor (Thornton et al., 2003). Immunhistochemische Analysen zeigen ER β -Expression in tieferen Zellschichten, vor allem in den Zellkernen des *Stratum Basale* und *Stratum Spinosum*, weniger im *Stratum Granulosum*, während das *Stratum Corneum* frei von ER β Protein ist (Thornton, 2002).

In einer Studie mit postmenopausalen Frauen nahm der Gehalt an Kollagen mit einer durchschnittlichen Rate von etwa 2 % pro Jahr über 15 Jahre nach Eintritt in die Menopause ab, wenn diese keine Hormon-Substitution erhielten (Brincat et al., 1987). Tägliche, topische Gabe von E₂ führte zu einer deutlichen Zunahme des Kollagenbestandteiles 4-Hydroxyprolin über die gesamte Dauer der Behandlung (Varila et al., 1995). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Haut zeigten zudem eine morphologische Verbesserung der Kollagenfasern (Sauerbronn et al., 2000). Topisch verabreichte Estrogene fördern außerdem die Wundheilung sowohl bei Männern als auch bei Frauen (Ashcroft et al., 1997).

1.3.3 Hormon-Ersatz-Therapie (HRT)

Seit nunmehr über 50 Jahren werden klimakterische Symptome der Frau sowie Krankheiten, die auf peri- und postmenopausalen Estrogen-Mangel zurück zu führen sind, über die exogene Gabe von Estrogenen (Hormon-Ersatz-Therapie, HRT) behandelt. Für die orale Therapie sind u.a. E₂ (frei bzw. konjugiert als „pro-drug“), Ethinylestradiol, Estron oder Mischungen konjugierter, equiner Estrogene (Premarin[®]) verfügbar. Darüber hinaus sind verschiedene lokale Anwendungen auf dem Markt, die eine gleichmäßigere Freisetzung (Pflaster) bzw. lokal begrenzte Wirkung (z.B. Vaginalring) ermöglichen. Bei vorhandenem Uterus ist die zusätzliche Gabe eines Gestagens prinzipiell erforderlich, da die alleinige Estrogen-Therapie das Risiko von Endometriums-Neoplasien (Hyperplasie und Carcinom) drastisch erhöht. Estrogen-Progestin-Kombinationspräparate sind daher in den meisten Fällen üblich, was mit einer regelmäßigen Entzugsblutung einher geht. HRT-Patientinnen nach Hysterektomie benötigen hingegen keine Kombinations-Therapie.

HRT, als alleinige Estrogen-Therapie oder in Kombination mit einem Gestagen, ist die wirksamste Behandlungsmethode für o.g. perimenopausale Symptome, die bei mehr als 90 % aller Patientinnen erfolgreich ist (Shanafelt et al., 2002). Neben den klassischen klimakterischen Beschwerden schützt die HRT am effektivsten vor estrogenabhängiger, postmenopausaler Osteoporose (Delmas, 2002). Zahlreiche klinische Studien Mitte der 90er Jahre wiesen auf die positiven Effekte von HRT in Bezug auf die Senkung des Risikos koronarer Herzerkrankungen hin (Herrington and Klein, 2003). Dies wurde unterstützt durch Beobachtungen, dass Estrogene das Lipoprotein-Profil im Serum, das Gefäßendothel sowie weitere vaskuläre Faktoren günstig beeinflussen (Prelevic and Jacobs, 1997). Neben der Therapie von „hot flashes“ wurde bei HRT-Patientinnen auch eine Verbesserung der kognitiven Leistungen und ein leicht geringeres Risiko für ZNS-Erkrankungen (Alzheimer's disease, Morbus Parkinson) gefunden (Grimes and Lobo, 2002). Die Häufigkeit von Dickdarmkrebs ist bei HRT-Patientinnen deutlich reduziert (USPSTF, 2003).

Auf der anderen Seite erhöht die Estrogenbehandlung im Rahmen der HRT das Risiko für „venous thromboembolism“ (VTE). Ursächlich hierfür ist eine etwa zweifach erhöhte Expression von Gerinnungsfaktoren. Dies trifft sowohl für Thrombosen der tiefen Venen als auch für pulmonare Embolien zu (USPSTF, 2003). Das Risiko der Progression bereits vorhandener Mamma-Tumore wird vor allem durch die Kombination von Estrogenen und Gestagenen erhöht, während eine alleinige Estrogen-Gabe einen deutlich geringeren Effekt hat

(HFBC, 1997). Die wichtigsten Zielorgane der HRT und ihr Effekt in der peri- und postmenopausalen Frau sind in Abbildung 4 dargestellt.

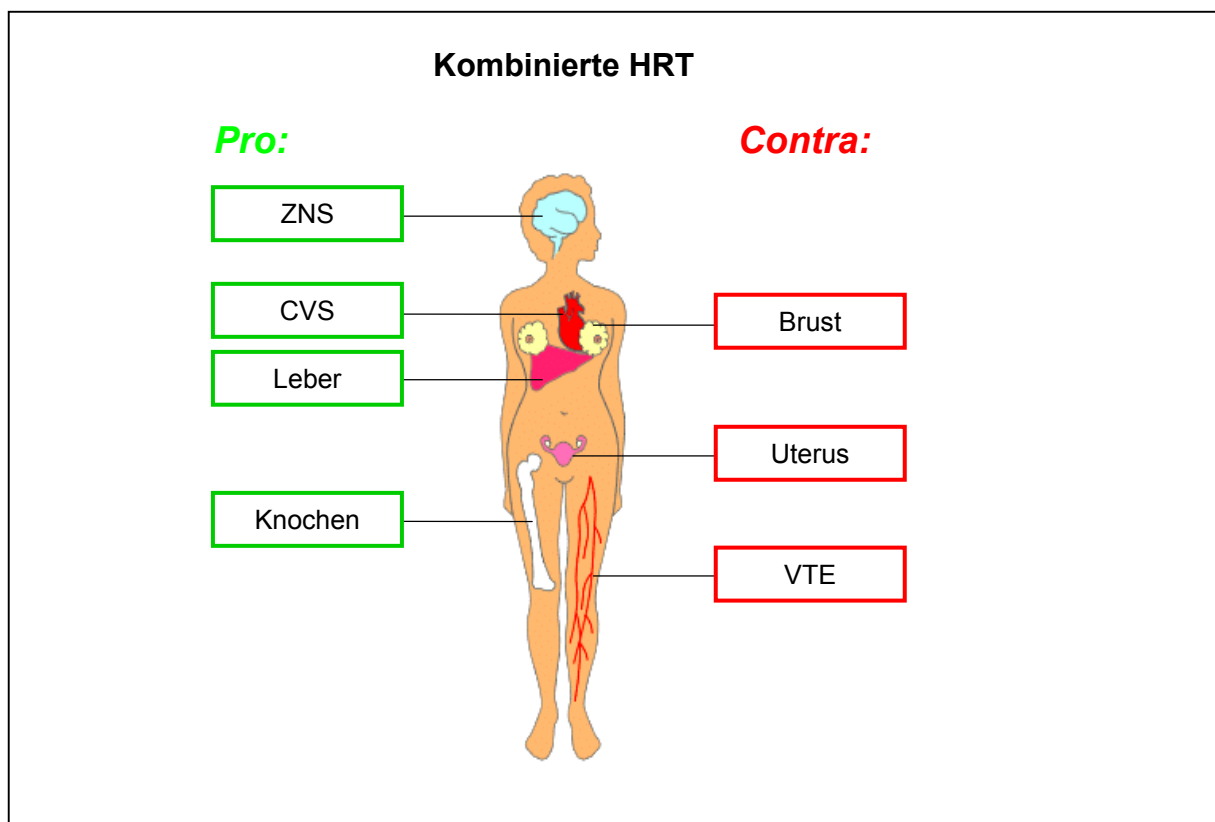


Abbildung 4: Differentielle Wirkungen der klassischen kombinierten HRT bei der peri- bzw. postmenopausalen Frau mit intaktem Uterus. Estrogen-Gestagen-Präparate haben positive Wirkungen auf Gehirn und CVS, die Serum-Lipide (Leber) und die Knochendichte, aber auch negative Effekte durch Progestine auf das Brustgewebe (Progression von Mamma-Tumoren) und den Uterus (Zwischen- bzw. Entzugblutungen) und durch Estrogene auf den venösen Thromboembolismus (VTE). Die Wirkungen auf das cardio-vaskuläre System (CVS) sind seit neuesten Studien umstritten.

Die bislang positive öffentliche Meinung zu HRT hat sich nach Veröffentlichung der Women's Health Initiative (WHI) Studie im Sommer 2002 deutlich verändert (WHI, 2002). In dieser breit angelegten klinischen Studie sollte der Langzeit-Effekt einer Estrogen-Gestagen-Kombinationstherapie (Prempro®) über einen Zeitraum von 8.5 Jahren an über 16.000 gesunden, postmenopausalen Frauen zwischen 50-79 Jahren untersucht werden. Das durchschnittliche Alter zu Beginn der Studie betrug 63 Jahre. Die Studie wurde überraschend nach 5.2 Jahren abgebrochen, da die Risiken für die Patientinnen den Nutzen überstieg. Bei den untersuchten Patientinnen führte die Behandlung nach 4-5 Jahren zu einem gesteigerten Risiko für

Myokardinfarkt (+24 %, absolut: +7 pro 10.000 Patientinnen), invasivem Brustkrebs (+26 %, +8), Schlaganfall (+41 %, +8) und VTE (+111 %, +18). Gerade postmenopausale Frauen über 65 Jahr waren eine besonders gefährdete Gruppe. Die Risiken für Hüftgelenksfrakturen (-34 %, -5) und Dickdarmkrebs (-37 %, -6) waren hingegen durch die HRT verringert. Eine weitere Studie (Million Women Study, UK) stützte mit ähnlichen Ergebnisse die kritische Betrachtung der kombinierten Estrogen-Gestagen-HRT besonders im Hinblick auf das erhöhte Risiko, vorexistierenden Brust- und Endometriumskrebs zu promovieren (MWS, 2003). Diese Studie wurde in einem jüngeren Klientel und mit diversen Marktpräparaten durchgeführt.

Klimakterische Beschwerden und hormonell induzierte Osteoporose sind besonders in der westlichen Welt weit verbreitet und machen meist eine Therapie unabdingbar. Estrogene sind bis heute der „Gold-Standard“ zur Behandlung dieser Beschwerden. Bei ca. 10 % der Frauen mit perimenopausalen Symptomen ist HRT aufgrund von Vorerkrankungen und besonderen Risiken (CHD, VTE, Mamma-Carcinoma etc.) contraindiziert (Seibel, 2003). In Anbetracht der Tatsache, dass für die meisten gesunden peri- bzw. postmenopausalen Frauen nur eine Kombination von Estrogenen und Gestagen möglich ist, stellt sich nach den jüngsten Studien die Frage nach therapeutischen Alternativen. Die durch die Gabe von Progestinen bekannten Nachteile (zyklische Entzugsblutungen) und die kürzlich aufgezeigten Risiken (Brustkrebs, CHD etc.) sind erheblich. Eine wirksame (Estrogen-)Therapie ohne Zusatz eines Gestagens würde damit eine echte Innovation für die HRT bedeuten. Da eine solche Therapie mit den im Markt vorhandenen Estrogenen definitiv nicht erreichbar ist, hat die pharmazeutische Industrie viele Anstrengungen unternommen, Substanzen zu identifizieren, die ein Gewebe-spezifisches Wunschprofil der estrogenen Wirkung zeigen.

1.3.4 SERMs

Estrogene werden zur Prävention und Behandlung peri- und postmenopausaler Symptome sowie als Kontrazeptiva eingesetzt. Zur Bekämpfung von estrogenprogressiven Krankheiten, z.B. des hormonabhängigen Mamma-Carcinoms, werden seit längerem sog. Anti-Estrogene verwendet. Sie binden an den Estrogenrezeptor, supprimieren jedoch die ER-vermittelte Signaltransduktion/Transkription. Überraschenderweise zeigten einige synthetische Anti-Estrogene eine agonistische Aktivität, abhängig vom untersuchten Gewebe. Tamoxifen und

Raloxifen (Abb. 5) sind beide starke ER-Liganden, die antagonistische und agonistische Effekte auf verschiedene Zielgewebe zeigen (Hall et al., 2001; McDonnell, 1999). Tamoxifen wird als Estrogen-Antagonist für die Behandlung des hormonabhängigen Mamma-Carcinoms verwendet, zeigt zugleich aber eine estrogene Wirkung am Knochen (EBCTCG, 1998; Love et al., 1992). Raloxifen wirkt als Anti-Estrogen in der Brustdrüse und im Endometrium und ist zugleich osteoprotektiv im Knochengewebe (Johnston et al., 2000). Zur Kennzeichnung von derartigen Substanzen, die unter Beibehaltung der positiven estrogenen Wirkungen auf Knochen und CVS nicht wie die natürlichen Estrogene zusätzlich Brust- und Uteruswachstum stimulieren, wurde der Begriff des „selective estrogen receptor modulator“ (SERM) eingeführt (Osborne et al., 2000). Die biologische Wirkung der SERMs wurde durch die Entdeckung des ER β und die z.T. gewebespezifische Expression beider ER-Subtypen klarer, da sie meist spezifische Liganden für ER α bzw. ER β sind. Darüber hinaus spielt der ERE- und Co-Faktor-Kontext in den Zellen der verschiedenen Gewebe eine wichtige Rolle bei der biologischen Aktivität von Estrogenen und SERMs (Hall et al., 2002). SERMs bewirken durch Bindung an ER α bzw. ER β strukturelle Veränderungen des Rezeptors, die die Rekrutierung bestimmter Co-Faktoren begünstigt bzw. verhindert. Abhängig von der Verteilung unterschiedlicher Co-Faktoren entsteht so ein gewebespezifischer Effekt, ohne dass hierfür gewebespezifische Rezeptoren nötig wären (Sadovsky and Adler, 1998).

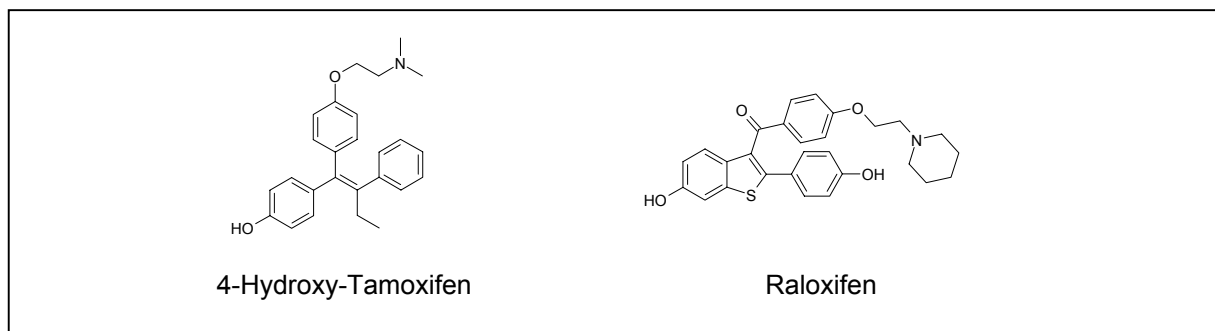


Abbildung 5: Chemische Strukturen der bekanntesten, selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) OH-Tamoxifen und Raloxifen.

In Europa und den USA sind SERMs zur Behandlung und Chemoprävention von Brustkrebs (Tamoxifen) und zur Osteoporoseprävention (Raloxifen) zugelassen, obwohl sie ernstzunehmende Nebenwirkungen aufweisen. Tamoxifen erhöht das Risiko für Endometriumkrebs und, wie auch Raloxifen, die Häufigkeit venöser thromboembolischer Erkrankungen (VTE) (Barret-Connor et al., 2002). SERMs stellen derzeit keine wirkliche Alternative zur HRT dar,

da sie aufgrund ihres pharmakologischen Profils die perimenopausale Symptomatik (Hitzewallungen) nicht lindern können bzw. sogar noch verschärfen. Sie werden jedoch bei Frauen eingesetzt, bei denen HRT contraindiziert ist und die gleichzeitig Hitzewallungen tolerieren. Die Entwicklung neuer SERMs ist Gegenstand intensiver Forschung mit dem Ziel eines pharmakologischen Ideal-Profiles, welches Knochenprotektion, Verbesserung des HDL/LDL-Verhältnisses, Verbesserung der vasomotorischen Instabilität (Hitzewallungen) ohne gleichzeitige Stimulation von Endometrium und Brustdrüsen umfasst. Dieses Ziel wird bislang weiter über einen Anti-Estrogen Ansatz verfolgt und nicht über die Möglichkeiten, die sich aus der Existenz gewebespezifischer Co-Faktoren ergeben.

1.4 Phytoestrogene

1.4.1 Phytoestrogene

Phytoestrogene sind polyphenolische, nicht-steroidale, sekundäre Pflanzenstoffe mit estrogenen Aktivität. Erstmals beschrieben wurden sie wegen ihrer antifertilen Wirkung auf weibliche Schafe in Herden, die auf Weiden mit hohem Anteil von Rot-Klee (*Trifolium subterraneum*) in Australien gehalten wurden (Bennetts et al., 1946). In Rot-Klee wurden beträchtliche Mengen der Phytoestrogene Formononetin und Biochanin A nachgewiesen, deren estrogenen Metabolite den natürlichen Zyklus der weiblichen Tiere beeinflussten (Adams, 1995).

In jüngster Zeit haben verschiedene epidemiologische Studien die These untermauert, dass die Aufnahme von Phytoestrogenen mit der Nahrung beim Menschen positive Wirkungen auf eine Reihe von estrogenabhängigen Indikationen hat. Hierzu gehören vor allem Prostata-Carcinom (Denis et al., 1999), Mamma-Carcinom (Lee et al., 1991), Osteoporose (Potter et al., 1998), Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Bakhit et al., 1994) und klassische perimenopausale Beschwerden (Baird et al., 1995). Diese Erkrankungen sind in der westlichen Welt sehr verbreitet, während sie in der asiatischen Bevölkerung mit traditionell hohem Anteil phytoestrogenreicher Soja-Produkte in der Nahrung eher selten anzutreffen sind. Bei Emigranten aus diesen Ländern, die ihre typischen asiatischen Essgewohnheiten aufgegeben und auf eine "westliche" Ernährung umgestellt haben, häufen sich wiederum o.g. Krankheiten (Bingham et al., 1998). Die Phytoestrogen-Konzentrationen in Urin und Serum einzelner Populationen

korreliert mit einem deutlich geringeren Risiko für estrogenabhängige Erkrankungen (Adlercreutz et al., 1982; Adlercreutz et al., 1991). Weitest gehend ungeklärt ist noch, welche Nebenwirkungen durch den vermehrten Konsum von Phytoestrogenen entstehen können (Abe, 1999), weshalb diese Stoffklasse aktuell intensiv untersucht wird.

Anhand ihrer chemischen Strukturen werden Phytoestrogene in Isoflavonoide, Flavonoide, Coumestane, Stilbene und Lignane unterteilt (Cos et al., 2003). β -Resorcylnsäure-Lactone werden von Pilzen gebildet und auch als Mycoestrogene klassifiziert. Sie gehören zusammen mit den pflanzlichen Estrogenen zur Familie der Xenoestrogene (Abb. 6). In der Natur dienen die polyphenolischen Substanzen den Pflanzen als Gerb- und Farbstoffe sowie als Phytoalexine zur Abwehr von Pilz- und Mikrobenbefall (Tahara et al., 1994). Für Isoflavonoide wurde zudem eine Rolle bei der Besiedlung von stickstoffarmen Böden diskutiert, da sie stimulierend auf stickstofffixierende Bakterien wirken (Krishnan and Pueppke, 1993).

Isoflavonoide bilden die mit Abstand größte und bekannteste Gruppe an Phytoestrogenen. Sie werden fast ausnahmslos von Leguminosen gebildet (King and Young, 1999). Sojabohnen können davon bis zu 0.2 % des Frischgewichts enthalten (Reinli and Block, 1996). Daidzein und Genistein sind die wichtigsten Vertreter der Isoflavonoide. Sie kommen in der Pflanze überwiegend als inaktive Glucoside (Daidzin und Genistin) und als 4'-Methyletherderivate (Formononetin bzw. Biochanin A) vor und werden von der Darmflora in die aktiven Aglycone bzw. Desmethyl-derivate gespalten. Genistein kann von der Mikroflora des Gastrointestinaltraktes weiter zu Equol, einer ebenfalls estrogenen Verbindung, umgewandelt werden (Day et al., 1998; Hur et al., 2000). Einige Isoflavonoide sind Aromatase-Hemmer (Adlercreutz et al., 1993), stimulieren die SHBG-Bildung (Mousavi and Adlercreutz, 1993) und besitzen nicht-hormonelle Wirkungen wie eine Inhibition von Tyrosin-Kinasen (Akiyama et al., 1987), der Angiogenese (Fotsis et al., 1995) und DNA-Topoisomerase I und II (Okura et al., 1988). Daneben wirken sie anti-oxidativ. Coumestane wie das Coumestrol sind den Isoflavonoiden strukturell nah verwandt. Ihr Hauptvorkommen ist mit Alfalfa, Sojasprossen und Rot-Klee ähnlich dem von Genistein und Daidzein (Davis et al., 1999).

Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) gehört zur Gruppe der Stilbene, es findet sich vor allem in der Schale von Weintrauben (*Vitis vinifera*) sowie in Erdnüssen. Roter Wein enthält deutlich mehr Resveratrol als weißer, weshalb man diese Verbindung zumindest teilweise zur Erklärung des „French Paradox“ heranzieht, jener Beobachtung, dass Bewohner des westlichen Mittelmeerraumes trotz relativ fettreicher Nahrung erheblich weniger anfällig für CVD sind als Mitteleuropäer (Soleas et al., 1997).

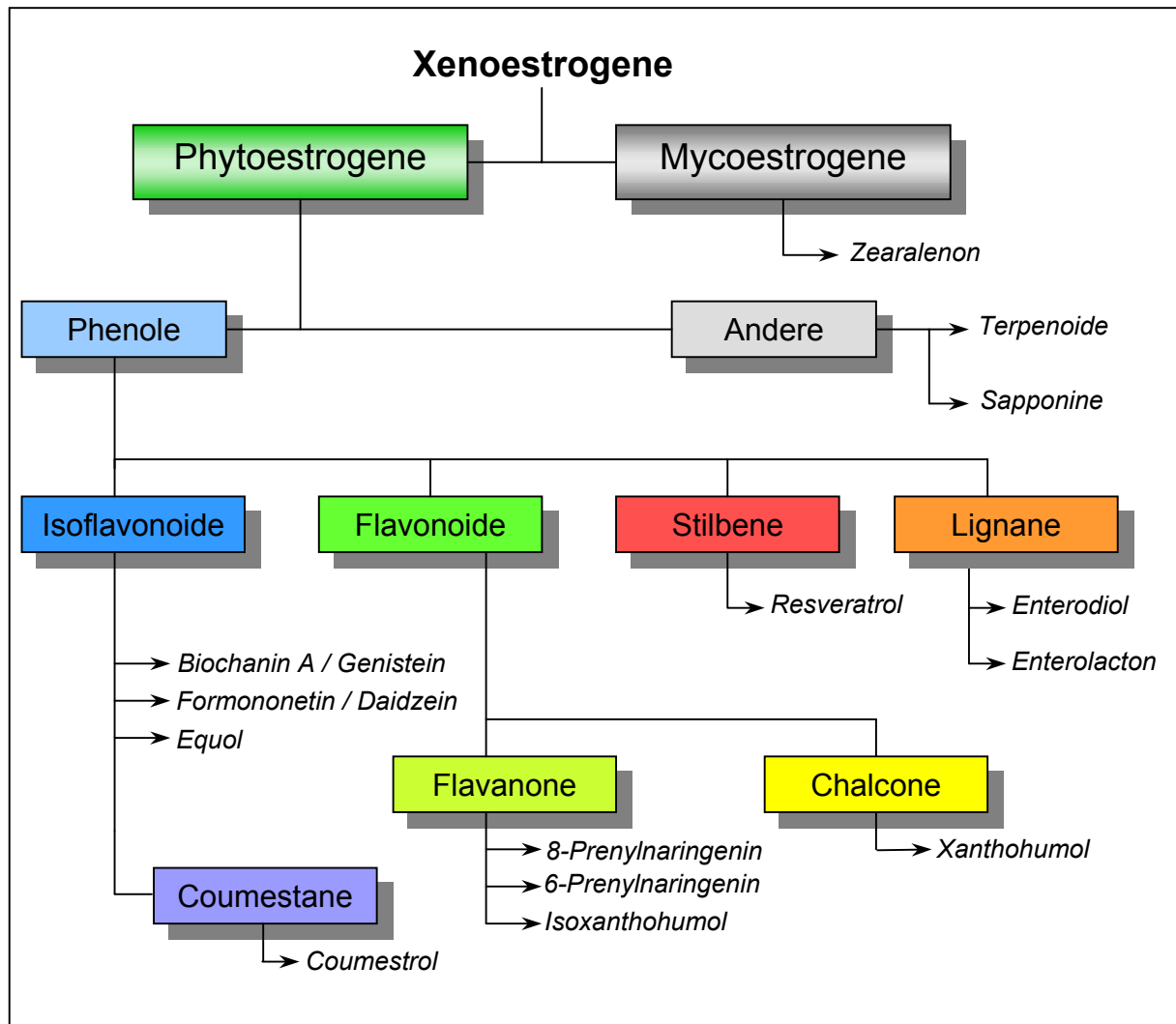


Abbildung 6: Schematische Klassifizierung der natürlichen Xenoestrogene in Nahrungsmitteln mit den wichtigsten Vertretern der einzelnen Substanzklassen (kursiv).

Lignane wie Enterodiol und Enterolacton kommen hauptsächlich in Getreiden, Ölsaaten und Früchten vor. Sie werden ebenfalls als glucosidische bzw. methyletherische Vorläufer von den Pflanzen produziert und im Darm in die aktiven Formen gespalten (Borriello et al., 1985).

Flavonoide spielten als Phytoestrogene bis vor kurzem noch eine untergeordnete Rolle, da sie nicht in den üblichen Nahrungsmitteln vorkommen. Die prenylierten Flavonoide Isoxanthohumol und das intensiv gelbe Xanthohumol sind Bestandteile des Hopfens (*Humulus lupulus* L.), der von der Brauindustrie als Bitterstoff und natürliches Konservierungsmittel dem Bier zugesetzt wird. Daneben finden sich in den Dolden der weiblichen Hopfen-Pflanze 6-Prenylnaringenin sowie das isomere 8-Prenylnaringenin (Stevens et al., 1999b; Stevens et al., 2000). Abbildung 7 zeigt die chemischen Strukturen der wichtigsten Phyto- und Mycoestrogene nach ihrer Klassenzugehörigkeit.

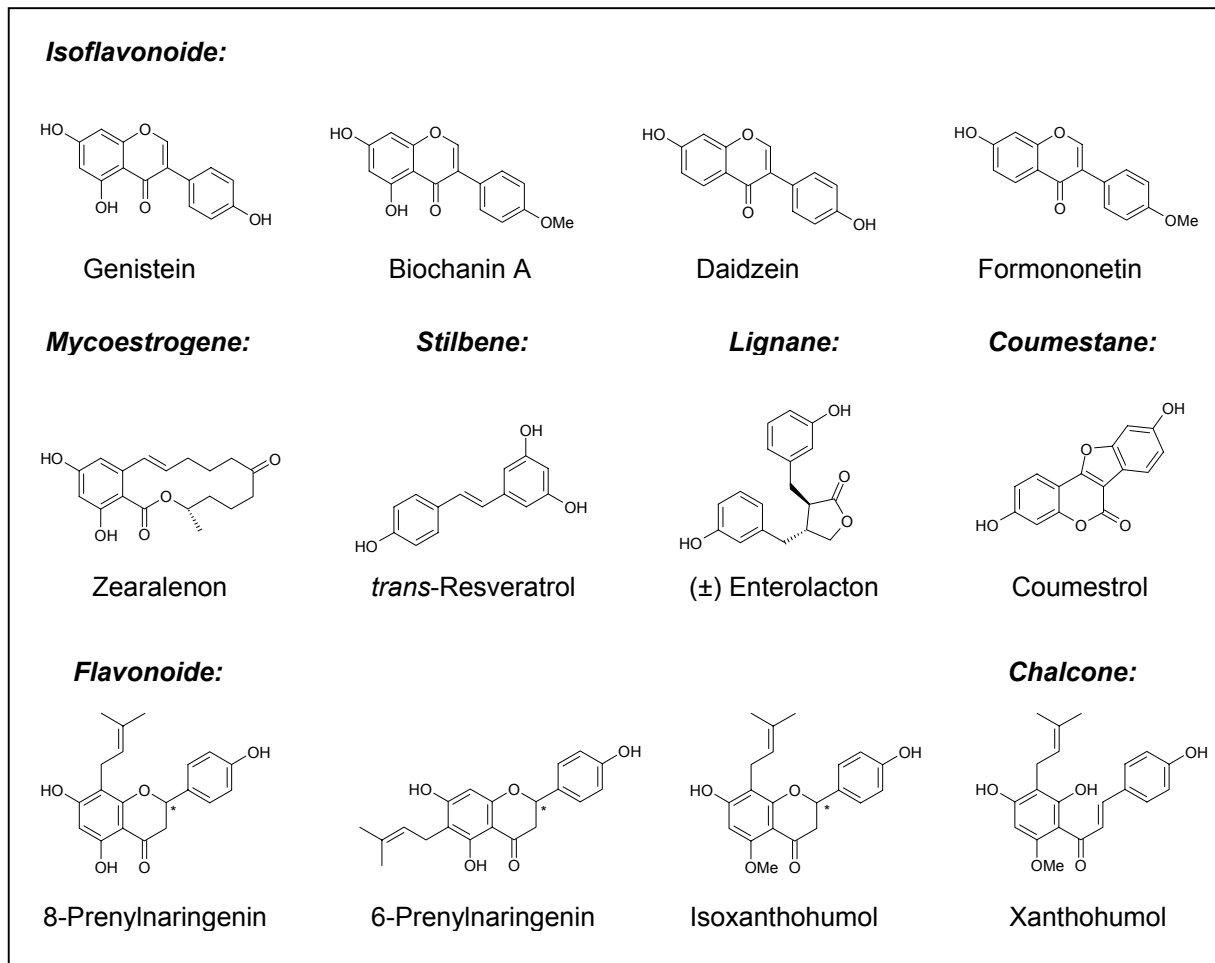


Abbildung 7: Chemische Strukturen der wichtigsten Phyto- und Mycoestrogene nach ihrer Klassenzugehörigkeit.

1.4.2 8-Prenylnaringenin

8-Prenylnaringenin (8-PN) wurde erstmals vor 25 Jahren als Bestandteil von *Compositae* beschrieben (Bohlmann et al., 1979). Seine estrogene Wirkung war jedoch lange unbekannt und wurde erst durch die parallele Identifizierung als Phytoestrogen aus dem Kernholz des thailändischen Baumes *Anaxagorea luzonensis* A. Gray (Kitaoka et al., 1998) sowie als estrogene Substanz in Hopfen (Malawski, 1997) und Bier (Milligan et al., 1999) entdeckt. Die wichtigste natürliche Quelle von 8-PN ist die Hopfen-Dolde, wo es zusammen mit anderen prenylierten Flavonoiden und Bittersäuren in dem Wachs (Lupulin) der Lupulin-Drüsen gebildet wird (Abb. 8). Je nach Hopfensorte und Erntezeitpunkt können bis zu 15 mg/kg 8-PN in getrocknetem Hopfen enthalten sein, im Bier etwa bis zu 200 µg/l (Stevens et al., 1999b). Eine

estrogene Wirkung von Hopfen wurde schon länger vermutet, ohne jedoch die Ursache zu kennen, da früher bei Hopfenpflückerinnen gehäuft Zyklusstörungen auftraten (Metka, 2001).

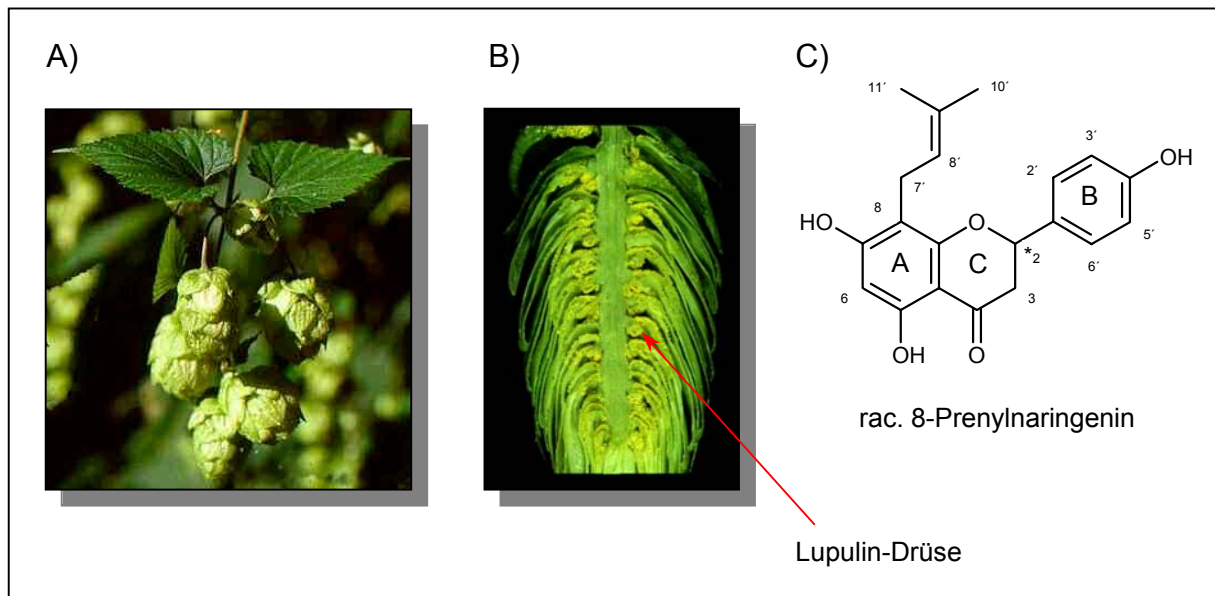


Abbildung 8: Hopfen als natürliche Quelle von 8-PN. A) Dolde der weiblichen Hopfenpflanze; B) Querschnitt einer Dolde mit gelben Lupulin-Drüsen, die u.a. 8-PN enthalten. C) Chemische Struktur des racemischen 8-PN: Triphenolisches 3-Ring-System mit Isopentenyl-Rest („Prenyl“) an Position 8 des A-Ringes des Naringenins.

Beide Enantiomere des 8-PN, 2*R*(+) und 2*S*(-), wurden durch *in vitro* Bindungsstudien als starke ER-Liganden charakterisiert. Sowohl (+)8-PN als auch (-)8-PN wurden bei Transaktivierungsassays in Hefezellen als sehr potente Phytoestrogene beschrieben (Gester et al., 2001; Milligan et al., 1999; Milligan et al., 2000). Die isomeren Derivate 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol zeigten hingegen kaum ER-Bindungsaffinität bzw. Estrogenität (Milligan et al., 2000). Für 8-PN wurden zudem in mehreren *in vitro* Studien anti-cancerogene und antioxidative Eigenschaften berichtet (Henderson et al., 2000; Miranda et al., 1999; Rong et al., 2001).

1.4.3 Phytoestrogene und HRT

Klinische Studien mit Phytoestrogenen als Alternative zur klassischen HRT haben bislang keine klaren Ergebnisse erbracht. Die Gabe von Isoflavonoiden, als Konzentrate oder in Form

von Nahrungsmitteln, hatte zwar signifikante aber nur leichte Effekte auf die klassischen perimenopausalen Symptome wie z.B. Hitzewallungen (Albertazzi et al., 1998; Scambia et al., 2000). Auch wurde in einigen Studien mit Isoflavonen eine messbare Verbesserung der Knochendichte (BMD) berichtet (Clifton-Bligh et al., 2001; Potter et al., 1998), während bei anderen Untersuchungen mit Lignanene keine Verbesserung der Biomarker für Knochenmetabolismus gefunden wurden (Lucas et al., 2002).

Wurzelstammextrakte der Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*) werden seit längerem zur Behandlung der perimenopausalen Symptomatik auf dem Markt angeboten. Erst in den letzten Jahren wurden Placebo-kontrollierte klinische Studien durchgeführt und nach dem möglichen Wirkprinzip in den Extrakten gesucht. Jarry et al. haben zwar eine Bindung von Extraktbestandteilen am ER β gefunden haben (Jarry et al., 2003), bis heute ist jedoch ungeklärt, über welchen Mechanismus und über welche Substanzen eine mögliche Wirkung entfaltet wird. Eine klinische Studie (Jacobson et al., 2001) an 85 Frauen nach Brustkrebs-OP, mit und ohne Tamoxifen-Behandlung, zeigte keine Effekte von *C. racemosa* auf Hitzewallungen, LH-Serumkonzentrationen oder FSH-Spiegel. Der Placebo-Effekt betrug etwa 25 % (Abnahme der Hitzewallungen). Auch andere Studien kamen zu keinem eindeutigen klinischen Wirknachweis dieser Extrakte auf menopausale Beschwerden.

Der breite gesundheitliche Nutzen der mit der Nahrung aufgenommenen Phytoestrogene wie Isoflavonoide, Coumestane, Lignane und Stilbene ist in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Arbeiten, in epidemiologischen sowie in klinischen Studien gezeigt worden. Klassische perimenopausale Beschwerden können durch die Zufuhr dieser Substanzen nicht behandelt, aber doch zumindest abgeschwächt werden. Hingegen ist ihre Wirksamkeit zur Behandlung chronischer peri- und vor allem postmenopausaler Symptome wie Osteoporose nicht belegt. Dies begründet sich in erster Linie durch die im Vergleich zu E₂ um mehrere Größenordnungen geringere Estrogenität. Zudem wurden bis dato nahezu alle klinischen Studien mit Nahrungsstoffen bzw. angereicherten Extrakten mit verschiedenen Phytoestrogenen durchgeführt, nicht mit entsprechenden Reinsubstanzen (Cos et al., 2003).

1.5 Ziel der Arbeit

Die klassische HRT mit Estrogen/Gestagen-Kombinationspräparaten ist die bis heute effektivste Therapie zur Behandlung peri- und postmenopausaler Beschwerden der Frau. Sie ist in

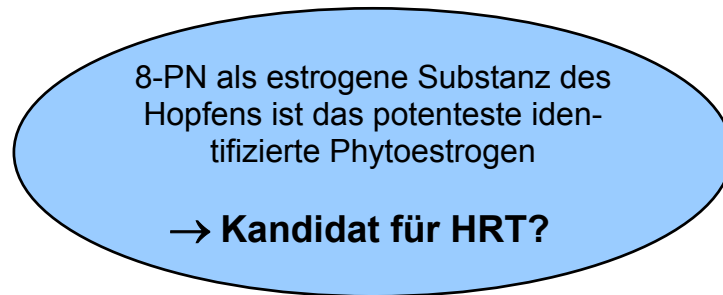
den meisten westlichen Ländern seit den 70er Jahren medizinischer Standard geworden. Nachteile dieser Behandlungsmethode ergeben sich aus dem Gestagenzusatz, einer Notwendigkeit zur Verhinderung estrogeninduzierter Endometriums-Neoplasien bei noch vorhandenem Uterus. Zyklische Entzugsblutungen auch noch in der Menopause sind der Preis der kombinierten HRT für eine effektive Behandlung der klinischen Symptomatik und der Prophylaxe der hormonabhängigen Osteoporose. Jüngste Langzeitstudien haben nun nicht nur zusätzliche Risiken der Behandlungsmethode aufgezeigt (erhöhtes Risiko für die Progression vorexistierender und hormonabhängiger Mamma- und Endometriums-Carcinome, erhöhtes Risiko für Thrombosen) sondern auch einen erhofften Schutzeffekt gegenüber dem Herzinfarkt nicht bestätigt.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma wäre die Auffindung eines ER-Liganden, der keine oder nur sehr schwache estrogene Wirkungen auf die Leber, den Uterus und die Brustdrüse entfaltet und gleichzeitig eine ausreichend hohe Estrogenität am Knochen besitzt und den regulatorischen Feedback-Mechanismus auf den GnRH-Pulsgenerator im Hypothalamus (Hitzewallungen) bedienen kann. Die internationale Forschung setzt darauf, diesen Liganden aus dem Gebiet der Anti-Estrogene zu identifizieren, was allerdings wegen der Notwendigkeit des neuroendokrinen Rückkopplungsmechanismus zu GnRH bzw. LH/FSH kritisch zu sehen ist.

Ein möglicher alternativer Ansatz ist die intensivere Erforschung von in der Natur vorkommenden Substanzen mit estrogener Wirkung. Phytoestrogene sind pflanzliche Metabolite mit ER-Affinität und estrogener Wirkung. Allerdings ist die Potenz dieser Substanzen im Vergleich zu endogenen Estrogenen gering, was sie für die Behandlung von peri- und postmenopausalen Beschwerden ebenso problematisch macht wie die weithin noch ungeklärten Nebenwirkungen hoher und chronisch eingenommener Dosen. Für das kürzlich als Estrogen charakterisierte 8-PN aus Hopfen wurde eine hohe ER-Affinität und die höchste bislang für Phytohormone gemessene Estrogenität (Hefe-Assay) berichtet. Damit ist 8-PN die aus der Pflanzenwelt grundsätzlich geeignetste Substanz für eine vertiefte vorklinische Untersuchung zu Wirkungen und Nebenwirkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten entsprechende grundlegende Untersuchungen zur Eignung von 8-PN für die HRT durchgeführt werden. Das Forschungs- und Entwicklungsprojekt umfasste die Schwerpunkte (A) organisch-chemische Synthese, (B) *in vitro* molekularbiologische und biochemische Untersuchungen, (C) *in vivo* Studien zum Wirkprofil, (D) *in/ex vivo* Pharmakologie und Pharmakokinetik und (E) Assay-Entwicklung zur Bestimmung von 8-PN (siehe auch Abb. 9).

Ausgangspunkt



Ziele

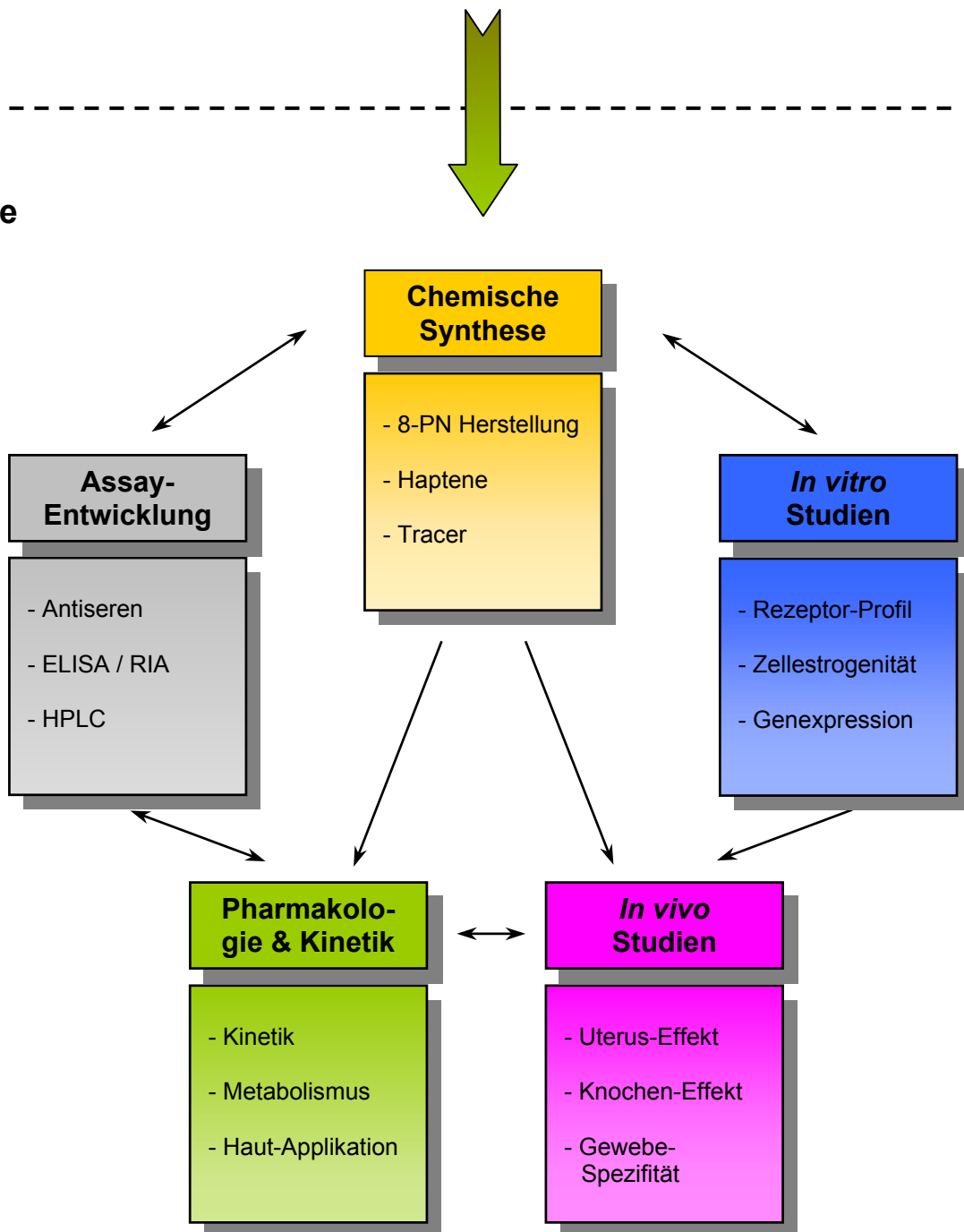


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Forschungs- und Entwicklungsziele dieser Arbeit.

2. ERGEBNISSE

2.1 Chemie

Detaillierte Syntheseprotokolle zu den in diesem Abschnitt beschriebenen Verbindungen und deren physikochemische Daten finden sich gesondert aufgeführt im Anhang (5.1).

2.1.1 Synthese von 8-PN

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war keine chemische Synthese für 8-PN beschrieben, die eine einfache Herstellung im Labor über den Milligramm-Maßstab hinaus erlaubte. Die bekannteste Synthese verlief über die direkte aromatische C-Alkylierung („Prenylierung“) des Naringenins, z.B. mit Prenylalkohol und BF_3 -Etherat als Lewis-Säure in THF (Tahara et al., 1994). Die Nachteile sind der geringe Umsatz und vor allem die fehlende Selektivität der Reaktion, was zur Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten (Regio-Isomere, Mehrfachprenylierungen) führt. Das saure Milieu begünstigt zudem intramolekulare Cyclisierungen benachbarter Prenyl- und OH-Gruppen. Eine abschließende, aufwändige chromatographische Reinigung ist notwendig, was zu insgesamt sehr geringen Ausbeuten führt.

Eine kürzlich beschriebene Synthese (Gester et al., 2001) vermeidet diese Nachteile und führt die Prenylgruppe chemo- und regioselektiv über einen 5-O-Prenylether in das Naringenin ein, was die Ausbeute erhöht und die chromatographische Reinigung vereinfacht. Die Synthese ist nachfolgend in Abb. 10 dargestellt und wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit als Syntheseverfahren von 8-PN verwendet, dessen Produkt für alle anschließenden chemischen und biologischen Experimente Anwendung fand. In diesem Abschnitt nicht näher erwähnte Nebenprodukte organischer Synthesen wurden ggf. ebenfalls isoliert und in den anschließenden biologischen Studien mit untersucht. Es wird an gegebener Stelle darauf hingewiesen.

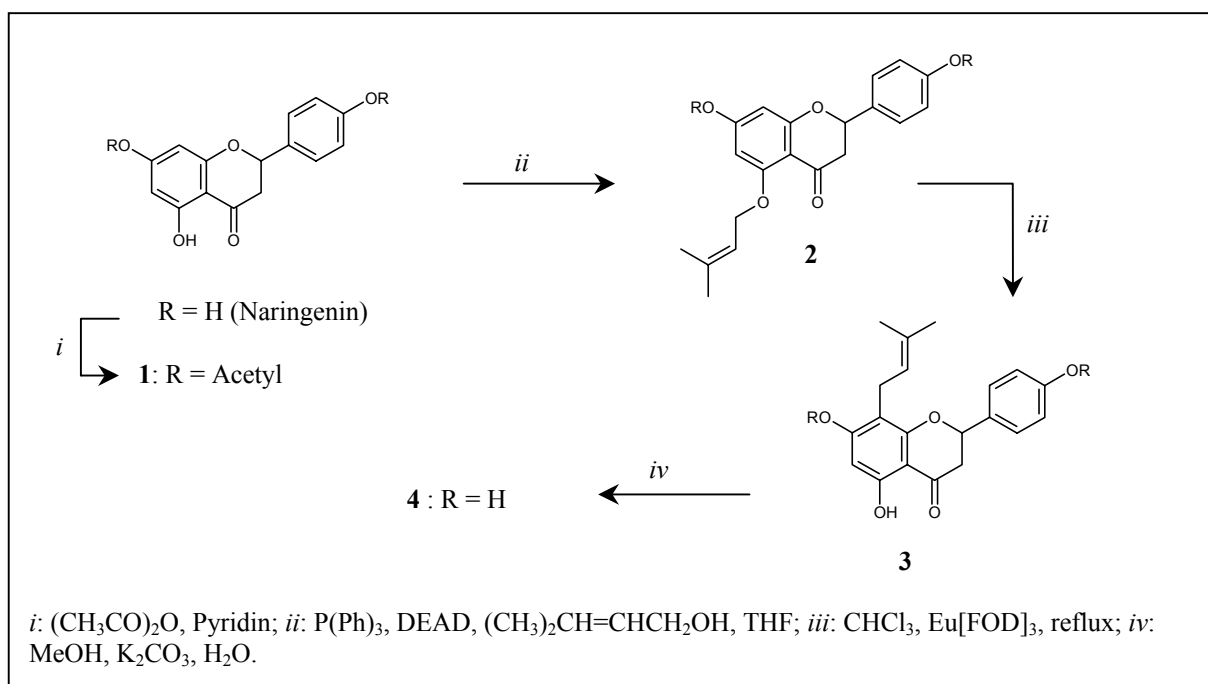


Abbildung 10: 4-Stufen-Synthese von racemischem 8-Prenylnaringenin nach Gester et al. ausgehend von racemischem Naringenin.

Bei der Synthese nach Gester et al. wurden zunächst die beiden reaktiven 4'-und 7-Phenolgruppen des racemischen Naringenins als Acetate geschützt, während die 5-OH Gruppe über die Keto-Gruppe in 1,3-Abstand π -Elektronen delokalisieren kann und deshalb deutlich weniger nucleophil reagiert. Der Prenylrest wurde erst als aktivierter Prenylalkohol in das Diacetat **1** über eine Mitsunobu-Kopplung an der 5-OH-Gruppe eingeführt. Im nächsten Schritt wurde der Prenylether **2** in einer Europium-(III)-katalysierten Domino-Claisen-Cope-Umlagerung in das 8-PN-Diacetat **3** isomerisiert. Die Reaktion verläuft über 6-(1,1-Dimethylallyl)-Naringenin als Intermediat, das bei unvollständiger Reaktion isoliert werden kann. Die domino-sigmatrope Umlagerung des Prenylrestes in die 8C-Position am A-Ring konnte ebenso thermisch durch Rückflussieren in Dekalin (Sdp.: 182-188 °C) erreicht werden, allerdings mit geringeren Ausbeuten und unter verlängerten Reaktionszeiten als bei der Europium-(III)-katalysierten Reaktion. Die basische Verseifung des Diacetates **3** lieferte schließlich das freie, racemische 8-PN **4** mit einer über alle Stufen berechneten Gesamtausbeute von ca. 41 %.

Als Nebenprodukt der Verseifung geht in geringen Mengen racemisches 6-PN hervor, das als Rotations-Isomer rasch durch reversible Ringöffnung zwischen 1O und dem asymmetrischen 2C bei hohen bzw. niedrigen pH-Werten entsteht. Entsprechend führt dieser Isomerisierungseffekt zum Verlust der optischen Aktivität reiner, gelöster Enantiomere bei drasti-

schen pH-Werten in protischen Lösemitteln. Ebenso durch lewis-saure Bedingungen katalysiert ist die irreversible, intramolekulare Cyclisierung des Prenylrestes mit der benachbarten 7-OH-Gruppe unter Ausbildung eines 2,2-Dimethyldihydropyran-Ringes („cyclisiertes 8-PN“). In fester Form sind sowohl die Enantiomere als auch das Racemat unter Standardbedingungen über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr stabil. Gleiches gilt für ethanolische Lösungen und Lagerung bei -20 °C.

2.1.2 Synthese von Hapten-Derivaten

Zur Generierung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen 8-PN für biologisch-quantitative Nachweismethoden (ELISA und RIA) wurden verschiedene, kopplungsfähige Carbonsäure-Haptene von 8-PN hergestellt. Diese wurden anschließend als aktivierte Carbo-diimidester an kationisiertes Rinderserumalbumin (cBSA) für die Immunisierung, bzw. Ovalbumin (OVA) zur Titerbestimmung, als Carrier-Proteine gekoppelt. cBSA besitzt pro Proteinnmolekül ca. 8-10 freie Aminogruppen auf der Oberfläche, an die Carbonsäurederivate des 8-PN über Amidbindungen kovalent verknüpft und dadurch als Immunogen präsentiert werden können.

Um eine möglichst optimale Immunogenität von 8-PN trotz niedrigem Molekulargewichtes und geringer Hydrophilie zu erreichen, wurden zwei Strategien bei der Synthese der 8-PN-Carbonsäurederivate verfolgt. Zum einen sollte durch Längenvariation des Linkers, über den 8-PN an cBSA gebunden ist, ein für die Immunantwort idealer „Präsentations-Abstand“ vom cBSA-Carrierprotein erzielt werden. Andererseits sollten durch alternative Verknüpfung des Linkers an verschiedenen Positionen im 8-PN Molekül (4'-bzw. 7-OH) zwei unterschiedliche Bereiche des 8-PN als antigene Determinanten auf der Oberfläche des cBSA exponiert werden. Zusätzlich wurden von einigen Haptenen die optisch reinen Enantiomeren isoliert und für die Immunisierung eingesetzt, um Antiseren zu gewinnen, die spezifisch gegen das jeweilige Enantiomer reagieren.

Im folgenden Synthese-Schema (Abb. 11) ist die Herstellung der ersten sechs Carbonsäurederivate dargestellt.

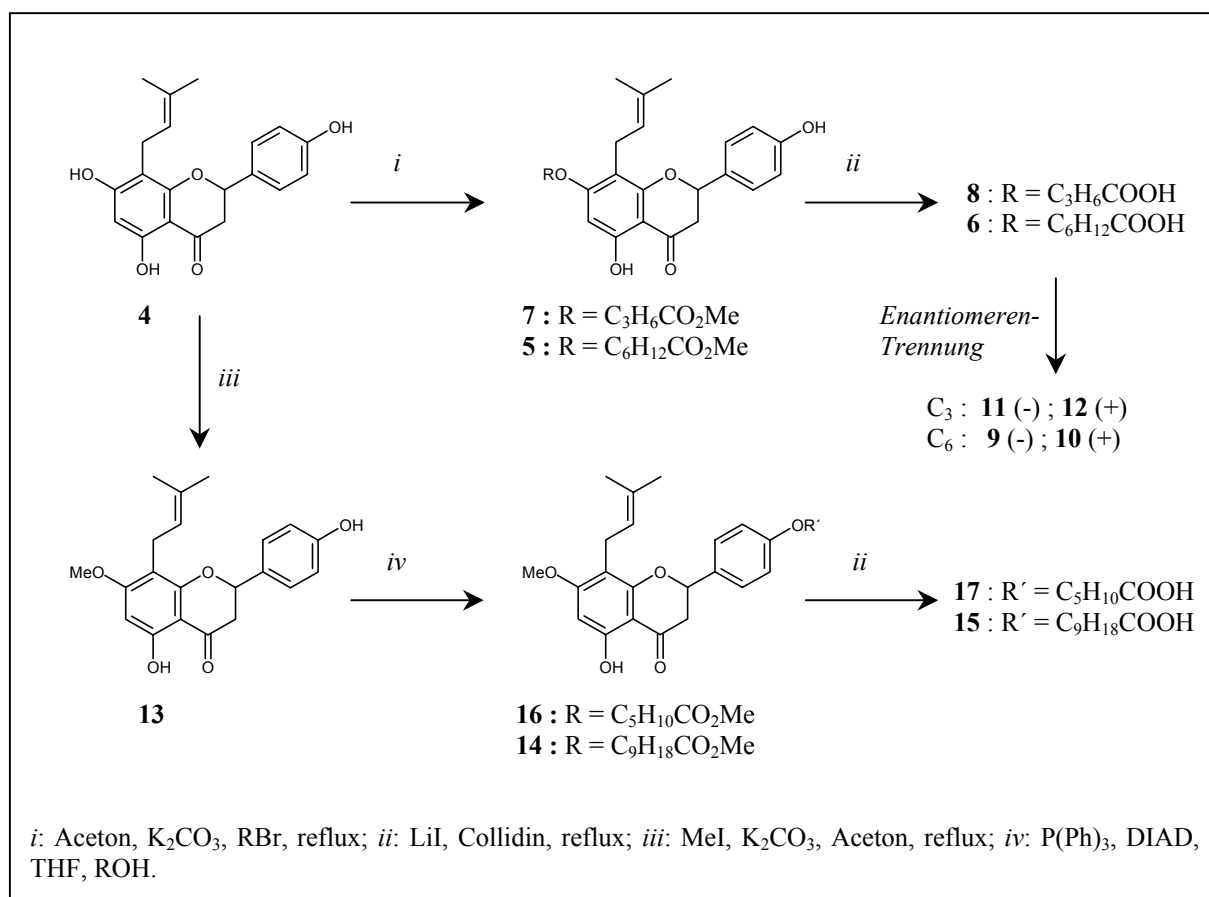


Abbildung 11: Synthese chiraler 7-OH verbrückter Carbonsäuren mit C_3 - bzw. C_6 -Linker sowie racemischer 4'-OH verbundener Carbonsäuren mit C_6 - und C_9 -Linker. Anbindung des Linkers an 4'-OH erforderte eine irreversible Methylierung der 7-OH-Gruppe.

Ausgehend vom 8-PN **4** wurden zunächst die primären Bromide des Heptansäuremethylester bzw. Butansäuremethylester an der kinetisch reaktiveren 7-OH in einer klassischen Williams-Ethersynthese zu den Verbindungen **5** und **7** verethert. Die Methylester wurden anschließend nucleophil mit Lithiumiodid in Collidin zu den freien Säuren **6** und **8** gespalten, da eine typische Verseifung unter basischen bzw. sauren Bedingungen zur Ringöffnung an 2C und zu Isomerisierung (s.o.) führte. Per chiraler HPLC wurden die freien Säuren in die jeweiligen Enantiomerenpaare **9** und **10** bzw. **11** und **12** getrennt. Für die Synthese an 4'-OH musste die 7-OH zuvor zu **13** methyliert werden, da eine reversible Schutzgruppenchemie nicht erfolgreich war. Diese chemische Veränderung des 8-PN an der zu erwartenden determinanten Seite des Moleküls musste in Kauf genommen werden. Die Veretherung zum Phenoxydecansäuremethylester **14** bzw. Phenoxyhexansäuremethylester **16** nach Mitsunobu verlief glatt und lieferte ausreichend hohe Ausbeuten. Die Methylesterspaltung zu den freien Säuren **15** und **17**

erfolgte analog mit Lithiumiodid in Collidin. Diese Säuren wurden als HPLC gereinigte Racemate für die Kopplung an Carrier-Proteine verwendet.

Die Fa. Biogenes Gesellschaft für Biopolymere mbH (Berlin-Köpenick) führte die Herstellung der cBSA-Konjugate sowie die tierexperimentellen Arbeiten zur Antikörperherstellung aus (siehe unter 4.4.3). Je zwei Kaninchen wurden pro cBSA-Konjugat immunisiert, in ein- bis zweiwöchigem Abstand insgesamt sieben Mal nach Erstimmunisierung geboostert und eine Woche nach dem letzten Boost ausgeblutet. Die Titerverläufe wurden anhand von insgesamt vier Zwischenblutungen dokumentiert. Schon bei den ersten Titerbestimmungen wurde deutlich, dass die Immunogenität der Konjugate mit zunehmender Linkerlänge stark abfällt. Auch die Einführung der Methoxy-Gruppe an 7-OH bei den Haptenen **15** und **17** wirkte sich deutlich negativ auf die Titerentwicklung aus. Vermutlich bewirkte die erhöhte Hydrophobie durch den langen aliphatischen Linker bzw. *O*-Methylierung eine Beeinträchtigung der antigenen Präsentation auf cBSA sowie insgesamt eine Verringerung der Immunogenität (siehe unter 2.5.1).

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse wurde ein weiteres Hapten hergestellt, das über 4'-OH verknüpft ist, einen kurzen C₁-Linker und eine freie 7-OH-Gruppe besitzt. Da die 7-OH im 8-PN nicht reversibel geschützt werden konnte, wurde eine racemische Synthese der Carbonsäure ausgehend vom Naringenin durchgeführt, welche nachfolgend in Abbildung 12 dargestellt ist.

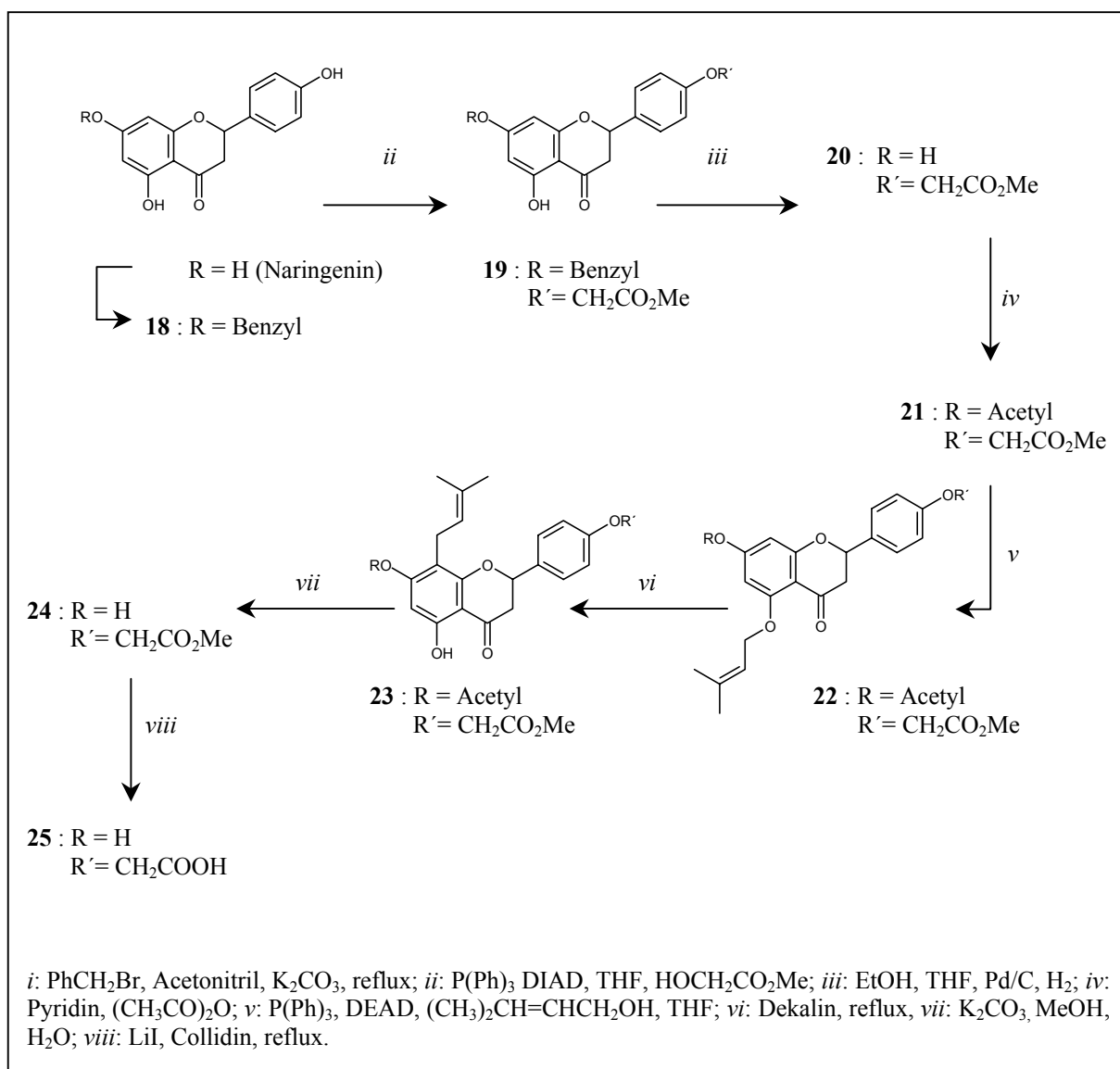


Abbildung 12: Synthese des verbesserten, racemischen Hapten-Derivates von 8-PN mit C₁-Linker an 4'-OH und freier 7-OH-Gruppe ausgehend von Naringenin.

Die Verknüpfung des Linkers an 4'-OH wurde diesmal auf der Stufe des unsubstituierten Naringenins vorgenommen, das danach analog zur oben beschriebenen Synthese selektiv prenyliert wurde. Hierzu wurde zunächst regioselektiv die 7-OH Gruppe als Benzylether **18** geschützt, in den anschließend in einer Mitsunobu-Reaktion der kurze C₁-Linker zum 4'-Phenoxyessigsäuremethylester **19** eingeführt werden konnte. Die Ausbeute hierbei war deutlich geringer als bei vergleichbaren Mitsunobu-Reaktionen mit längerkettigen primären Hydroxycarbonsäureestern, da die OH-Gruppe in C₁-Abstand zum Ester deutlich schwächer nucleophil ist. Der Austausch der Schutzgruppen an 7O erfolgte über das freie Phenol **20**, welches dann analog zur Synthese von 8-PN zu **21** acetyliert wurde. Dieser zusätzliche Schritt

des Schutzgruppenaustauschs auf dieser Stufe wurde notwendig, da sowohl eine regioselektive Acetylierung an 7-OH des Naringenins einerseits, als auch die reduktive Entfernung der Benzylschutzgruppe nach späterer Einführung der Prenylgruppe andererseits nicht erfolgreich waren. Die folgende Herstellung des Prenylethers **22** wiederum nach Mitsunobu, die thermische Domino-Claisen-Cope-Umlagerung zum 8-Prenylderivat **23**, Freisetzung der 7-OH zu **24** und Methylesterspaltung zur freien Säure **25** konnten nach dem selben Prinzip wie zuvor beschrieben durchgeführt werden. Nach HPLC-Reinigung wurde **25** als Racemat zur Herstellung des cBSA-Konjugates und Immunisierung verwendet.

Die Resultate der Immunisierung mit den einzelnen Hapten-cBSA-Konjugaten sind unter 2.5.1 beschrieben.

2.1.3 ³H-Tracer-Synthese

Eine Reihe von pharmakologischen Analysen und Untersuchungen werden erst durch die Verfügbarkeit eines radioaktiven Tracers möglich. Für die vorliegende Arbeit war zur Entwicklung des Radio-Immuno-Assays (RIA) für 8-PN und für weitere *in vitro*-Studien (perkutante Resorption an Maushaut, Extraktionstests, Bestimmung von Verteilungskoeffizienten) ein markierter Tracer unverzichtbar.

Die Tritium-Markierung organischer Moleküle stellt eine sehr rasche und effiziente Methode zur Tracer-Synthese dar. Aromatische Wasserstoffatome in Molekülen eignen sich gut für eine Halogenierung und anschließende Dehalogenierung mit Tritium. Der Einbau von ³H-Isotopen erfolgt üblicherweise als Einstufen-Reaktion über einen Palladium katalysierten Halogenaustausch in Tritium-Atmosphäre. ³H-Tracer sind im Gegensatz zu den meisten anderen Isotopen (z.B. ¹⁴C, ³²P, ¹²⁵I) im Labor einfacher zu handhaben. ¹⁴C-Tracer besitzen zwar eine vergleichsweise höhere chemische und metabolische Stabilität, haben aber dafür eine deutlich geringere spezifische Aktivität als Tritium-Tracer. ¹⁴C-Tracer erfordern zudem meist mehrstufige Synthesen, was eine umfangreiche Isotopenchemie voraussetzt. Andere Isotope scheiden für kleine organische Moleküle in den meisten Fällen aus.

Als Vorbereitung für den ³H-Markierung wurde zunächst eine einfache Halogenierung von 8-PN durchgeführt (Abb. 13).

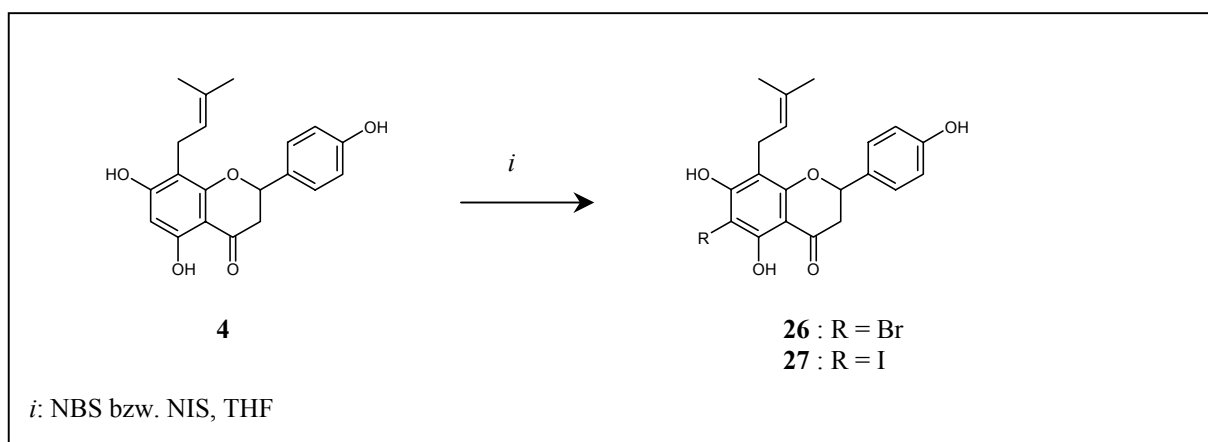


Abbildung 13: Synthese von 6-Bromo-8-Prenylnaringenin und 6-Iodo-8-Prenylnaringenin.

Die 6C-Halogenierung von 8-PN **4** mit einem Moläquivalent *N*-Bromsuccinimid (NBS) bzw. *N*-Iodsuccinimid (NIS) zu 6-Bromo-8-Prenylnaringenin **26** und 6-Iodo-8-Prenylnaringenin **27** verlief problemlos, begünstigt durch das saure Wasserstoffatom ($^1\text{H-NMR}$ -Spektrum) an 6C mit zwei vicinalen Phenolgruppen. Ein Überschuss an NBS bzw. NIS führte zur unerwünschten Halogenierung der Doppelbindung am Prenylrest und nicht wie erwartet am aromatischen C-Ring des Moleküls. Es zeigte sich nachfolgend, dass die 6C-Position für eine Tritiummarkierung ungeeignet ist, da nach Halogen- ^3H -Austausch der Tritiumeinbau wegen der hohen Acidität des Wasserstoffatoms nicht stabil war und ein rascher Austausch gegen Protonen des Lösemittels stattfand.

Die chemisch äquivalenten und laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektren deutlich weniger aciden 3'- und 5'-Positionen am C-Ring ließen hingegen einen stabilen Einbau erwarten. Da eine direkte Halogenierung der aromatischen Wasserstoffe am C-Ring nicht möglich war, wurde eine *de novo*-Synthese des 8-PN als 3',5'-Dibromoderivat durchgeführt. Durch den Austausch von insgesamt zwei Halogenatomen sollte zudem später eine höhere spezifische Aktivität des Tracers erreicht werden. Das Chromanon-Gerüst des Dibromo-8-PN wurde hierbei in einem Schlüsselschritt durch Aldol-Kondensation von 2,4,6-Tri-OH-Acetophenon mit 3,5-Dibromo-4-OH-benzaldehyd und anschließendem Ringschluss zum Tri-Cyclus aufgebaut, die folgende Prenylierung daran anschließend nach bewährter Methode durchgeführt. Die Synthese ist nachfolgend in Abb. 14 zusammengefasst.

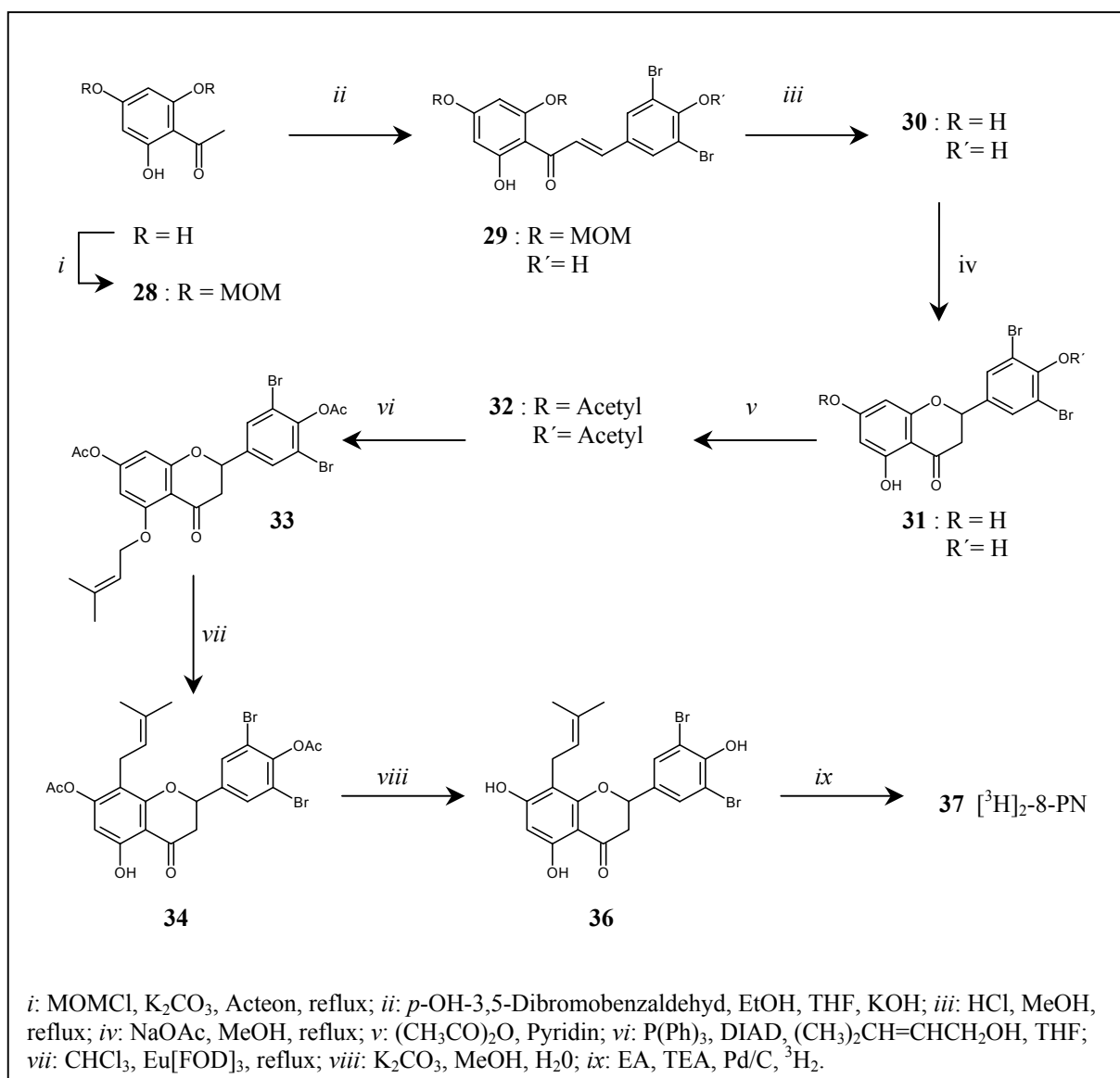


Abbildung 14: Synthese von 3',5'-Dibromo-8-Prenylnaringenin als Vorstufe zur Herstellung des radioaktiven ³H-Tracers [³H]₂-8-PN.

2,4,6-Trihydroxyacetophenon wurde zunächst an 2- und 4-OH als Di-Methoxymethylether **28** geschützt, dessen MOM-Schutzgruppen unter basischen Bedingungen der Aldolkondensation stabil sind. Die dritte Phenolgruppe an 6C ist durch Nachbarschaft zur Ketogruppe vergleichsweise inaktiv (s.o.) und musste nicht zusätzlich geschützt werden. Durch Aldolkondensation mit 3,5-Dibromo-4-Hydroxybenzaldehyd in konzentrierter, eiskalter KOH wurde das konjugierte, intensiv gelbfarbige Enon **29** hergestellt. Saure Entfernung der MOM-Schutzgruppen lieferte das freie Phenol **30**, das unter schwach basischen Bedingungen über Ringschluss zwischen 10-2C zum farblosen Dibromo-Naringenin **31** reagierte. Die weitere Chemie über das geschützte Diacetat **32**, den 5-O-Prenylether **33**, das 8-Prenylisomer **34** so-

wie die Verseifung der Acetate zum freien 3',5'-Dibromo-8-Prenylnaringenin **36** verlief analog der unter 2.1.1 beschriebenen 8-PN Synthese, ausgehend vom Naringenin.

Die Tritiiierung unter $^3\text{H}_2$ -Atmosphäre zum 3',5'-Di- ^3H -8-PN **37** wurde über Nacht in einer Mikrohydrieranlage ausgeführt und verlief glatt. Die Stabilität der Tritiummarkierung wurde durch mehrmaliges Abdampfen und Anlösen des gereinigten Tracers mit Methanol ohne beobachtbaren Aktivitätsverlust bestätigt. Die spezifische Aktivität des Tracers wurde mit 2.22 GBq/mg (6.0 GBq/ μM) bestimmt.

2.2 *In vitro* Untersuchungen

2.2.1 Rezeptor-Bindung

Zur Erstellung des Bindungsprofils von 8-PN, Syntheseprodukten, anderer Phytoestrogene sowie natürlicher und synthetischer Liganden an humane Steroidrezeptoren wurden *in vitro* Bindungsstudien mit rekombinanten Rezeptoren durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf einer kompetitiven Verdrängung des natürlichen, radioaktiv markierten Liganden von seinem Rezeptor durch Zugabe steigender Konzentrationen an Testligand. Die anhand der Verdrängungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lassen sich ins Verhältnis zum natürlichen Liganden setzen und daraus prozentuale Werte für die relative spezifische Bindungsaffinität (RBA) errechnen.

2.2.1.1 Bindung ER α und ER β

Die Bindung an die humanen Estrogenrezeptor-Subtypen ER α und ER β wurde mit rekombinantem Protein aus dem Cytosol infizierter SF-9 Zellen durchgeführt. Die gelösten Rezeptoren wurden zunächst mit radioaktivem 17 β -Estradiol prä-inkubiert. Als interner Standard wurde „kaltes“ E₂ benutzt und die Konzentrationen bei halber Verdrängung gleich 100 % RBA gesetzt. Die graphische Darstellung der Rezeptorbindung der wichtigsten Phytoestrogene liefert Abb. 15, die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Der Kompetitionsfaktor KF ist der Quotient aus $\text{RBA}_{\text{Referenz}} / \text{RBA}_{\text{Testligand}}$. Niedrige KF-Werte entsprechen demnach einer hohen Rezeptoraffinität. Die Differenz von KF für ER α und ER β beschreibt die Rezeptorspezifität innerhalb der Subtypen.

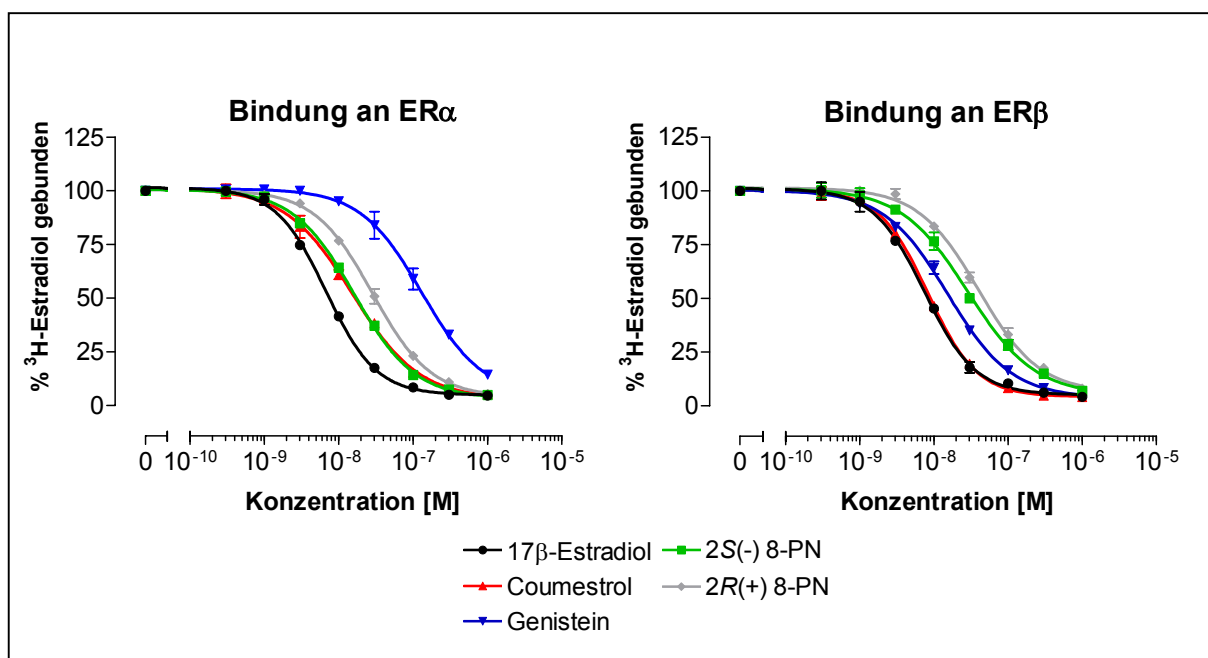


Abbildung 15: Bindung ausgewählter Phytoestrogene an rekombinanten humanen ER α und ER β im Vergleich zu 17 β -Estradiol.

Ligand	Humaner ER α			Humaner ER β		
	IC ₅₀ [nM]	RBA [%]	KF	IC ₅₀ [nM]	RBA [%]	KF
17 β -Estradiol	5.5	100	1	5.1	100	1
2S(-) 8-PN	15	37	2.7	31	16	6.1
2R(+) 8-PN	31	18	5.8	47	11	9.2
6-PN	70	8	13	65	8	13
7-Methoxy-8-PN	140	4	25	170	3	33
Cyclisiertes 8-PN	190	3	35	250	2	49
4',7-Diacetyl-8-PN	160	4	28	205	3	40
Naringenin	270	2	49	270	2	53
Genistein	130	4	24	16	32	3.1
Formononetin	65	8	12	230	2	45
Coumestrol	13	42	2.4	7.1	72	1.4
Daidzein	130	4	24	140	4	27
Xanthohumol	150	4	27	160	3	31
Isoxanthohumol	200	3	36	230	2	45
<i>p</i> -Octylphenol	120	5	22	200	3	39
Estriol	15	37	2.7	22	23	4.3
Estron	30	18	5.5	43	12	8.4
Raloxifen	5.4	102	0.9	16	32	3.1

Tabelle 1: Kompetitive Rezeptorbindung an rekombinatem, humanem ER α und ER β . RBA = Relative Bindungsaffinität, KF = Kompetitionsfaktor.

Die Studien zeigten für beide Enantiomere des 8-PN eine hohe Bindungsaffinität zum humanen Estrogenrezeptor, die nur wenig geringer war als die von 17β -Estradiol und ähnlich hoch wie die der natürlichen Estrogene Estron und Estriol. Auffällig war die jeweils etwa 2-fach höhere Affinität zum ER α im Vergleich zu ER β . Dabei war die *S*(-) Form ein etwas besserer Ligand für beide Rezeptortypen als die *R*(+) Form ($KF_{\alpha} = 2.7$ bzw. 5.8 und $KF_{\beta} = 6.1$ bzw. 9.2). Vergleichbar hohe ER-Affinitäten wurden für die Phytoestrogene Coumestrol und Genistein gefunden, allerdings mit umgekehrter Rezeptorspezifität. 8-PN ist das erste bekannte ER α spezifische Phytoestrogen überhaupt.

Die Affinität, aber vor allem auch die Spezifität von 8-Prenylnaringenin zu ER α bzw. ER β wird maßgeblich durch die Prenylgruppe in 8C-Position bestimmt. Hingegen sind die phenolischen OH-Gruppen an 7C und 4'C für Affinität aber nicht für Spezifität verantwortlich. Dies wird durch Vergleich der Bindungswerte von Naringenin und dem regio-isomeren 6-PN deutlich. Intramolekulare Veretherung des Prenylrestes zum cyclisierten 8-PN, einseitige 7-O-Methylierung oder beiderseitige Acetylierung der phenolischen OH-Funktionen führen zum Bindungsverlust an beide Rezeptorsubtypen.

Die Hopfenbestandteile Xanthohumol und Isoxanthohumol, die sowohl in der Dolde als auch im Bier in weitaus größeren Mengen als das strukturverwandte 8-PN vorkommen, zeigen keine oder nur sehr schwache Bindung an den ER. Die Phytoestrogene Formononetin, Daidzein und *p*-Octylphenol sind ebenfalls nur sehr schwache Liganden. Eine Ausnahme bildet Raloxifen, das als synthetisches SERM stark an den ER bindet und zum ER α eine höhere Affinität besitzt als das natürliche E $_2$.

2.2.1.2 Bindung an PR, GR, MR und AR

Die Bindung von 8-PN an den humanen Progesteron-, Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptor wurde in analoger Weise wie oben beschrieben für den Estrogenrezeptor untersucht. Es wurde für keinen dieser Steroidrezeptoren eine messbare Bindung beobachtet. Strukturvergleiche von 8-PN mit Gestagenen sowie steroidal Mineralo- bzw. Glucocorticoiden ließen dieses Resultat bereits erwarten, da keine ligandenspezifischen Übereinstimmungen in den Molekülstrukturen erkennbar sind. Eine mögliche Androgenrezeptoraktivität von 8-PN wurde direkt im Zell-Assay getestet (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

2.2.2 Transaktivierung und Transsuppression

Aus der Rezeptorbindung allein lässt sich keine Aussage über eventuelle agonistische oder antagonistische Aktivitäten von Substanzen am jeweiligen Rezeptor treffen. Andererseits schließt eine fehlende Bindung eine klassische biologische Wirkung am Rezeptor grundsätzlich aus. Deshalb wurden zur näheren Charakterisierung die Rezeptor-affinen Substanzen aus der Bindungsstudie in transient transfizierten Zellen *in vitro* auf Transaktivierung und Transsuppression hin getestet.

2.2.2.1 Transaktivierung über ER α und ER β

Humane Osteosarcoma-Zellen (U2-OS) wurden transient mit einem Expressionsplasmid für ER α bzw. ER β sowie einem Estrogen-responsivem Luciferase-Reporterplasmid cotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 18 h mit verschiedenen Verdünnungen von Liganden inkubiert, danach lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde wiederum 17 β -Estradiol mitgeführt. Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen wurde als EC₅₀-Werte aus der graphischen Auswertung bestimmt (Abb. 16). Die EMR (Equi-molar Ratio) errechnet sich aus dem Quotienten von EC_{50(Ligand)} / EC_{50(Referenz)} und ist gering für stark transaktivierende Substanzen. Die Efficacy ist der prozentuale Wert des maximalen Signals bei der höchsten eingesetzten Konzentration im Vergleich zur Referenz. Die Ergebnisse für die getesteten Substanzen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

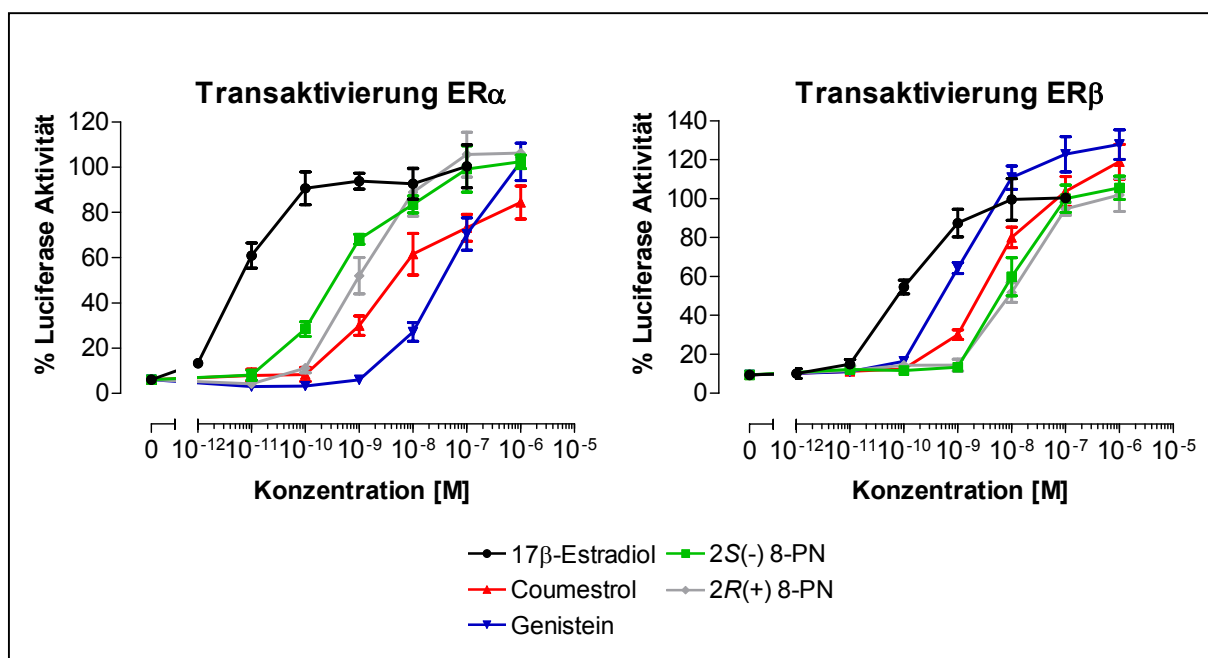


Abbildung 16: Transaktivierung von transient exprimiertem ER α und ER β durch ausgewählte Phytoestrogene und 17 β -Estradiol in humanen U2-OS Zellen.

Ligand	Humaner ER α			Humaner ER β		
	EC ₅₀ [nM]	EMR	Effic. [%]	EC ₅₀	EMR	Effic. [%]
17 β -Estradiol	0.005	1	100	0.05	1	100
2S(-) 8-PN	0.35	70	100	12.5	250	110
2R(+) 8-PN	1.0	200	100	16	320	100
6-PN	>100	>20.000	>100	>350	>7.000	>70
7-Methoxy-8-PN	>400	>800.000	>50	>1.000	>20.000	>35
Cyclisiertes 8-PN	>200	>400.000	>100	>1.000	>20.000	>10
Naringenin	>300	>600.000	>100	>250	>5.000	>100
Genistein	>40	>8.000	>100	5.2	104	135
Formononetin	32	6.400	100	45	900	100
Coumestrol	4.0	800	85	1.2	24	130
Daidzein	>75	>15.000	>120	>30	>600	>140
Xanthohumol	>300	>600.000	>60	>1.000	>20.000	>35
Isoxanthohumol	250	500.000	>100	>1.000	>20.000	>40
p-Octylphenol	>300	>600.000	>25	>1.000	>20.000	>10
Promensil [®]	>200	>400.000	>120	45	900	>130
Estriol	0.085	17	90	0.9	18	80
Estron	0.5	100	90	3	60	80
Raloxifen	-	-	n.a.	-	-	n.a.

Tabelle 2: Transaktivierung von ER α und ER β in humanen U2-OS Zellen. EMR = Equi-molar Ratio; Effic. = Efficacy.

Die Transaktivierung von humanen U2-OS Zellen zeigte sehr deutlich, dass 8-PN der stärkste bisher gefundene, pflanzliche ER α Agonist ist. Die über ER α vermittelte estrogene Wirkung von 8-PN übertraf die von Coumestrol und Genistein um eine bzw. zwei Größenordnungen. Im Gegensatz zu allen übrigen getesteten Phytoestrogenen war 8-PN ein wesentlich schwächerer Agonist für ER β als für ER α . Im direkten Vergleich zu E₂ zeigte 2S(-)8-PN an ER α eine nur ca. 70-fach und an ER β eine etwa 250-fach geringere Aktivität. Das 2R(+) Enantiomer war an beiden Rezeptoren etwas weniger wirksam. Die Hopfeninhaltsstoffe 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol besaßen ebenso wie Naringenin keine nennenswerten estrogenen Eigenschaften. Methylierung an 7-OH sowie Cyclisierung des Prenylrestes im 8-PN führten zum Verlust der ER-vermittelten Transaktivierung. Raloxifen zeigte erwartungsgemäß keine estrogene Wirkung in U2-OS Zellen. Promensil[®] ist ein natürlicher Extrakt aus Rot-Klee (*Trifolium subterraneum*) und wird von der Fa. Novagen als Naturprodukt gegen Estrogenmangel für Frauen in der Menopause vertrieben. Als Wirkstoff wird ein Gemisch aus Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A angeführt. Gemäß den Analyseangaben des Herstellers über die Mengenverhältnisse der Phytoestrogene wurde aus den Tabletten eine DMSO-Stammlösung erstellt und getestet. Eine Transaktivierung über ER α wurde nicht und über ER β nur in hohen Konzentrationen gefunden. Die Ergebnisse der Transaktivierung spiegelten damit qualitativ die Daten aus den Bindungsstudien wider, wonach für ER-Agonisten die rezeptorspezifische Bindungsaffinität mit der zellulären Transaktivierung korreliert. Eine interessante Ausnahme bildete Coumestrol, das auf Grund der starken Rezeptoraffinität eine deutlich höhere Estrogenität im Transaktivierungs-Assay erwarten ließ, als tatsächlich gefunden wurde.

2.2.2.2 Transsuppression von ER α und ER β

Klassisch lassen sich Liganden entweder als Agonisten oder Antagonisten am Zielrezeptor charakterisieren. In Anwesenheit von konkurrierenden Liganden, unterschiedlicher Co-Faktoren und in stark unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt können Liganden ein biphasisches Profil zeigen. Solche Stoffe werden, leicht mißverständlich, als Partial-Agonisten bzw. Partial-Antagonisten bezeichnet. Zur Untersuchung von potentiell antagonistischen Eigenschaften der oben getesteten Substanzen wurden diese auf ER-Transsuppression hin analysiert. Mit ER α - bzw. ER β -Expressionsplasmid und Luciferase-Reporterkonstrukt cotransfizierte U2-OS Zellen wurden zusammen mit E₂ ($3 \cdot 10^{-11}$ M für ER α und $3 \cdot 10^{-10}$ M für ER β) und mit zwei Konzentrationen von Testligand inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen an 17 β -Estradiol entsprechen dem etwa 10-fachen der EC₅₀-Werte aus der Transaktivie-

rungsstudie. Die gemessene Abnahme der Luciferase-Aktivität im Lysat der behandelten Zellen wurde als Maß für die antagonistischen Eigenschaften des Liganden herangezogen. In Abb. 17 sind die Ergebnisse für eine Auswahl der wichtigsten Substanzen graphisch dargestellt.

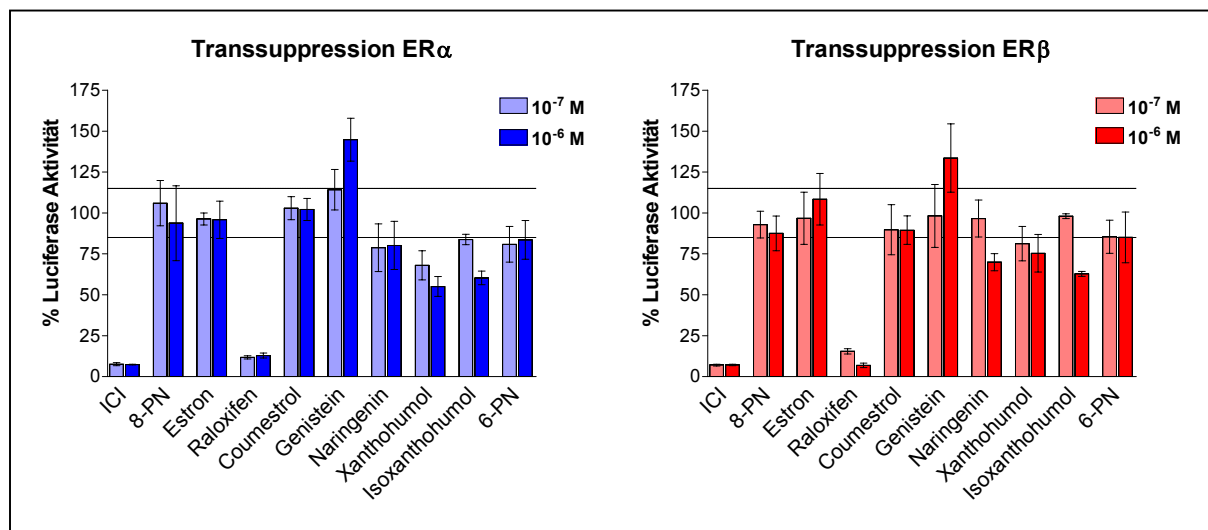


Abbildung 17: Transsuppression von ER α und ER β in humanen U2-OS Zellen. Transient co-transfizierte Zellen wurden mit $3 \cdot 10^{-11}$ M E₂ für ER α bzw. $3 \cdot 10^{-10}$ M E₂ für ER β und mit Testliganden behandelt.

In beiden für die Transsuppression eingesetzten Konzentrationen zeigten 8-PN, Estron, Coumestrol, Genistein, Naringenin und 6-PN keinen antagonistischen Effekt zu E₂ weder an ER α noch ER β . Vielmehr war bei allen genannten Substanzen ein neutrales Verhalten zu E₂ in diesem Test zu beobachten. Als Ausnahme bewirkte Genistein an beiden Rezeptoren sogar eine deutliche, dosisabhängige Zunahme der E₂-vermittelten Transkription bis auf 150 % des reinen E₂-Wertes. Das Anti-Estrogen ICI als positive Kontrolle unterdrückte das E₂-Signal effektiv und auch Raloxifen zeigte den schon vorher beschriebenen anti-estrogenen Effekt in den U2-OS Zellen. Schwach antagonistische, dosisabhängige Wirkungen zeigten Xanthohumol und Isoxanthohumol. Beide Substanzen binden an ER α und ER β ca. 30-50-fach schwächer als E₂ und zeigten keine signifikante agonistische Aktivität in der Transaktivierung.

2.2.2.3 AR-Transaktivierung

Anstelle eines Rezeptorbindungstest für den humanen Androgenrezeptor analog zu ER, PR und GR wurde für 8-PN und ausgewählte Phytoestrogene die AR-Aktivität in Zellkultur bestimmt. Die humane Prostata-Carcinom Zelllinie PC-3 besitzt endogen keinen AR und wurde für die Transaktivierung mit einem AR-Expressionsplasmid und einem Luc-Reporterplasmid transient co-transfiziert. Die Behandlung der Zellen und die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte wie bei den U2-OS Zellen beschrieben. Als androgene Referenz wurde das synthetische, anabole Steroid R1881 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

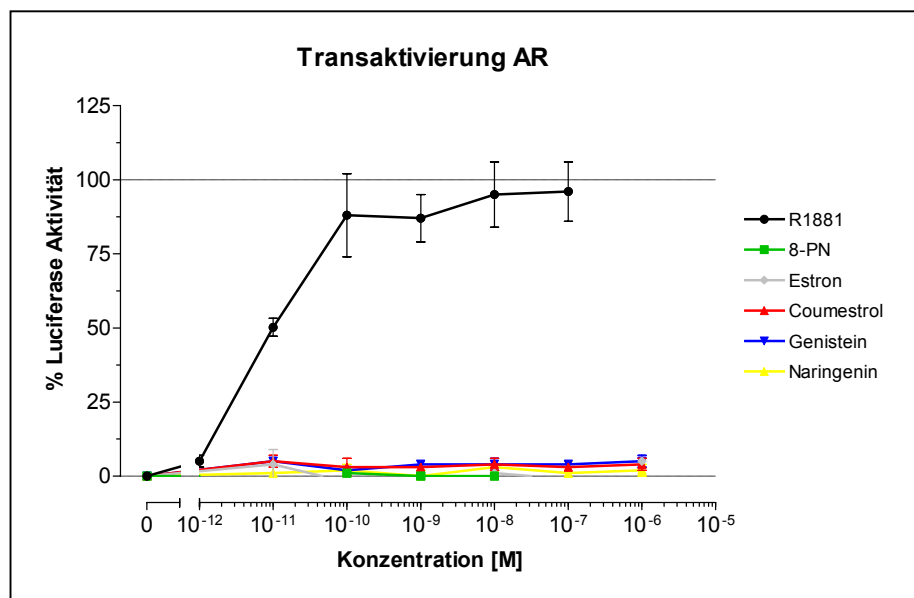


Abbildung 18: Transaktivierung des Androgenrezeptors (AR) in humanen PC-3 Zellen. Das synthetische Androgen R1881 diente als Positiv-Kontrolle.

Das synthetische Androgen R1881 zeigte ein deutliches Signal bei einer EC₅₀ von ca. 10⁻¹¹ M. Bei allen getesteten Phytoestrogenen konnte keine androgene Aktivität nachgewiesen werden.

2.2.2.4 AR-Transsuppression

Co-transfizierte PC-3 Zellen wurden mit den Liganden aus 2.2.2.3 in Anwesenheit von 10^{-10} M R1881 inkubiert und die Abnahme der Luciferase-Aktivität gemessen (Abb. 19).

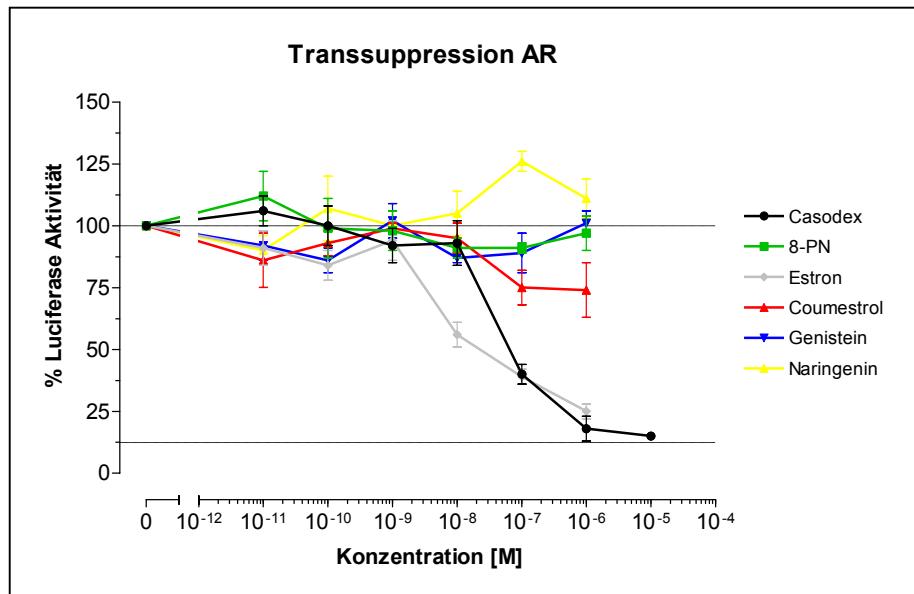


Abbildung 19: Transsuppression des Androgenrezeptors (AR) in humanen PC-3 Zellen. Dem Kulturmedium wurde 10^{-10} M des synthetischen Androgens R1881 zugesetzt.

Weder 8-PN noch die übrigen Phytoestrogene zeigten Antagonismus am AR. Das synthetische Anti-Androgen Casodex[®] (AstraZeneca), welches auch zur Behandlung von Prostata-Tumoren eingesetzt wird, unterdrückte sehr wirksam die Transaktivierung des humanen AR. Auch natürliches Estron wirkte in diesem Testsystem antagonistisch auf die androgenvermittelte Luciferase-Expression.

2.2.3 Zellproliferation (E-Screen)

MCF-7 und T47D sind hormonsensitive, humane Mamma Carcinoma Linien. Die Proliferation dieser Zelltypen lässt sich durch Estrogene stimulieren und sie bieten dadurch einen empfindlichen *in vitro* Test auf Estrogenität in diesem speziellen Gewebe (Katzenellenbogen et al., 1987). Erhöhte endogene Estrogen-Spiegel, wie auch die Gabe von exogenen Estrogenen, werden zusammen mit einer hohen ER-Expression mit einem gesteigerten Brustkrebs-Risiko assoziiert (Nenci et al., 1988). MCF-7 exprimieren endogen überwiegend ER α während in

T47D beide Rezeptoren etwa gleich verteilt vorliegen. Die potenten Phytoestrogene 8-PN, Genistein und Coumestrol wurden mit E₂ und Estron in diesem E-Screen auf mögliche gewebespezifische Estrogenität hin verglichen (Abb. 20 und 21). Raloxifen als Negativ-Kontrolle ist bekannt als selektiver Estrogenrezeptor Modulator (SERM), der auf Mamma-Tumore wachstumshemmend wirkt. Als Kontrolle, dass die Proliferation ER-vermittelt verlief, wurden die Assays in Anwesenheit des ER-Antagonisten Tamoxifen durchgeführt.

Die natürlichen Estrogene E₂ und Estron zeigten in beiden Zelllinien den mit Abstand stärksten proliferativen Effekt mit einer EC₅₀ für E₂ von ca. 5·10⁻¹² M (MCF-7) und etwa 2·10⁻¹⁰ M (T47D) bzw. 2·10⁻¹⁰ M (MCF-7) und 9·10⁻¹⁰ M (T47D) für Estron. 8-PN war in beiden Zelltypen etwa um den Faktor 15-20 schwächer als Estron und 250-1.000-fach schwächer als E₂. Dies war insofern überraschend, als dass in den Transaktivierungs-Assays relativ zu E₂ und Estron eine wesentlich höhere Aktivität für 8-PN gefunden wurde. Morphologisch wurden keinerlei Unterschiede zwischen den E₂, Estron und 8-PN behandelten Zellen gefunden.

Die Phytoestrogene Coumestrol und Genistein zeigten lediglich im hohen, zweistelligen nM-Bereich proliferative Effekte in den Zellen, was einer um den Faktor 100 geringeren Estrogenität im Vergleich zu 8-PN entsprach. Interessant hierbei war zudem die höhere Aktivität von Genistein gegenüber Coumestrol, was im umgekehrten Verhältnis zu den Ergebnissen der Transaktivierung stand. 8-PN zeigte im Vergleich eine stärkere Wirkung in MCF-7 Zellen, was sehr gut mit der höheren Aktivität an ER α korrelierte.

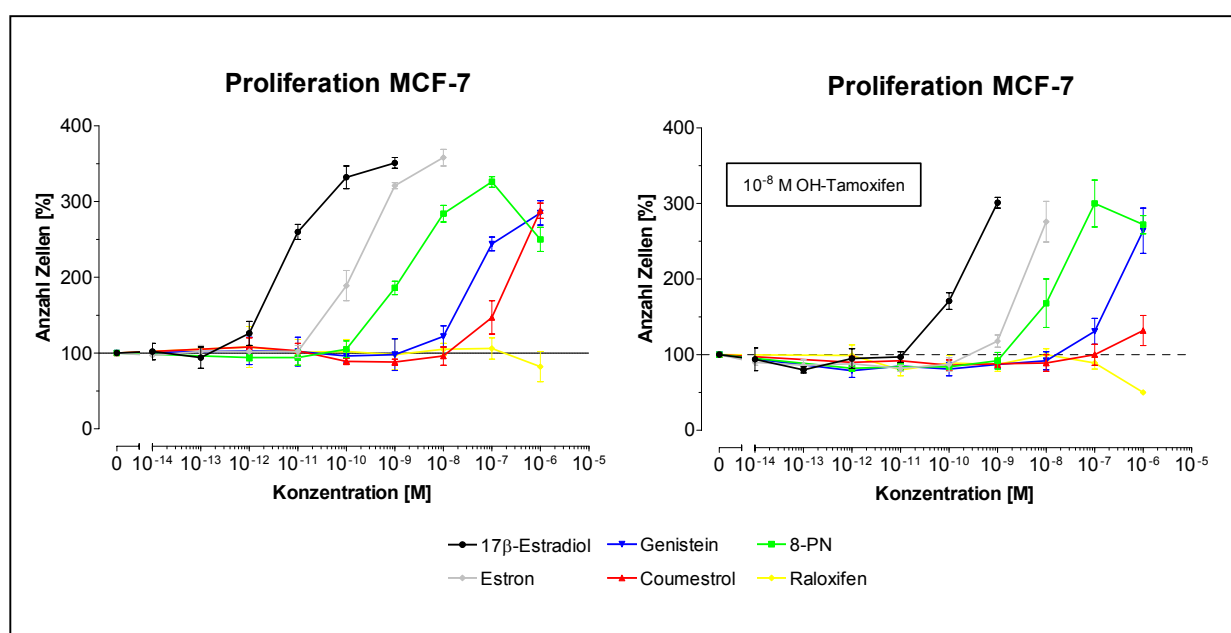


Abbildung 20: Estrogenabhängige Stimulation der Zellproliferation von MCF-7 Zellen über fünf Tage mit und ohne 4-Hydroxy-Tamoxifen im Kulturmedium.

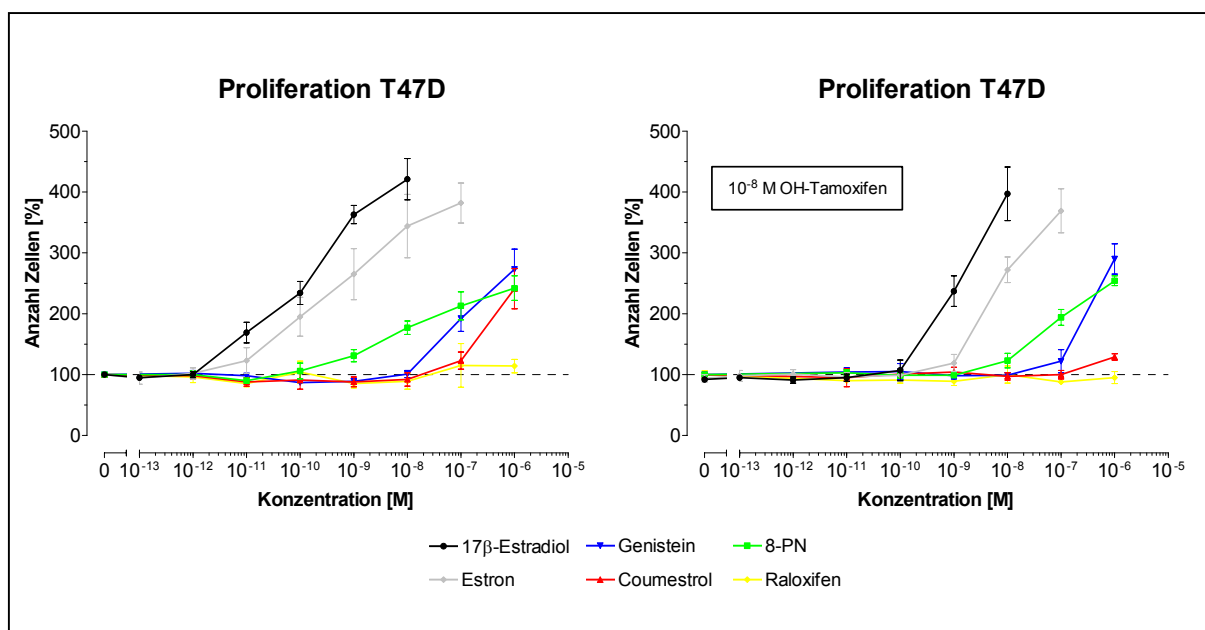


Abbildung 21: Estrogenabhängige Stimulation der Proliferation von T47D Zellen über fünf Tage mit und ohne 4-Hydroxy-Tamoxifen im Kulturmedium.

Raloxifen zeigte erwartungsgemäß keinen stimulierenden Effekt auf MCF-7 und T47D Zellen. Die Zugabe von 10⁻⁸ M Hydroxy-Tamoxifen bewirkte bei allen getesteten Substanzen eine Abnahme der E-Screen-Aktivität in der gleichen Größenordnung, was auf eine ER-vermittelte Proliferation schließen ließ. In MCF-7 war eine überraschende Abnahme der Proliferation ausschließlich durch 8-PN im μM -Bereich zu beobachten. Dieser Effekt war jedoch nicht durch ER vermittelt, da die Zugabe von OH-Tamoxifen die Abnahme der Proliferation nicht antagonisierte. Möglicherweise war der Hemmeffekt durch Inhibition der Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors und Inhibition der DNA Polymerase II bedingt, wie er bereits für andere Phytoestrogene bei höheren Konzentrationen beschrieben wurde (Akiyama et al., 1987; Markovits et al., 1989).

Die Ergebnisse der Proliferation von humanen Brust-Tumorzellen erweiterten die Daten der vorangegangenen Transaktivierungsstudien, in denen 8-PN als äquipotent zu Estron und nur geringfügig weniger estrogen als E₂ charakterisiert wurde. Eine mögliche Gewebespezifität der estrogenen Wirkungen von 8-PN könnte aufgrund der veränderten Effektrelation zu E₂ und Estron vermutet werden. Außerdem wurde in MCF-7 Kulturen eine biphasische bzw. die Proliferation hemmende Wirkung von 8-PN im μM -Bereich festgestellt, die nicht ER-vermittelt verlief. Es wurde daraufhin zunächst *in vitro* an ausgewählten Genen das Expressionsmuster von 8-PN, E₂ und Genistein in MCF-7 untersucht.

2.2.4 Genexpression

Ausgehend von den Ergebnissen aus den Proliferations-Assays wurde für MCF-7 Zellen ein eingeschränktes Expressionsprofil definierter Gene erstellt, mit dem eine potentiell differentielle oder gewebespezifische Wirkung von 8-PN gegenüber E₂ untersucht werden sollte. Die zu untersuchenden Gene wurden dabei nach folgenden fünf zellphysiologischen Kategorien ausgewählt (Tab. 3).

Funktion	Marker-Gen
Apoptose	<i>bcl-2</i> und <i>bax</i>
Proliferation/Wachstum	<i>c-fos</i> und <i>srf</i>
„Klassischer“ Estrogen-Marker	<i>pS2</i>
Hormon-Rezeptoren	<i>pr</i> , <i>era</i> , <i>vdr</i>
Morphologie/Zelladhäsion	<i>e-cad</i>

Tabelle 3: Untersuchte Marker-Gene und ihre physiologische Zuordnung zu Zellfunktionen bei der RT-PCR Analyse in MCF-7 mit den Estrogenen Genistein, 8-PN und E₂.

MCF-7 Zellen wurden mit je drei verschiedenen Konzentrationen von Genistein, E₂ und 8-PN behandelt. Die Konzentrationen von 8-PN und E₂ wurden maßgebend durch die Ergebnisse der Proliferations-Assays in MCF-7 bestimmt. Die geringste Konzentration entsprach derjenigen ohne erkennbare Stimulation, die mittlere der jeweiligen EC₅₀-Konzentration und die höchste Konzentration der bei maximaler Antwort bzw. Umkehrung des stimulierenden Effektes. So ergaben sich für E₂ 10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M und 10⁻⁶ M und für 8-PN entsprechend 10⁻¹¹ M, 10⁻⁸ M und 10⁻⁶ M. Die Konzentrationen von Genistein wurden gleich denen von 8-PN gewählt. Die mRNA wurde nach 6 h und 48 h isoliert, um frühe sowie späte Effekte der Gen-Regulation erkennen zu können.

Die relative mRNA-Expression in MCF-7 Zellen wurde mittels quantitativer RT-PCR mit SYBR-Green[®] bestimmt, wobei Cyclophilin (*CyP*) als Referenz-Gen diente.

2.2.4.1 Bax und Bcl-2

Das weibliche Brustdrüsenepithel sowie das Endometrium unterliegen fortlaufend zyklischer Apoptose, bedingt durch die sich verändernden Estrogen-Spiegel während des weiblichen Zyklus. Unter anderem wurden Bax und Bcl-2 als modulatorische Elemente des natürlichen Zelltodes identifiziert (Reed et al., 1996; Wang and Phang, 1995). Überexpression von Bcl-2 führte zur Hemmung von Apoptose und zu höheren Überlebensraten von Zellen, die einem Apoptose-Stimulus ausgesetzt waren. Die anti-apoptotische Wirkung entfaltet Bcl-2 neben der Hemmung von p53 vor allem durch die Interaktion mit Bax, einem Transmembranprotein, das Apoptose durch die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C induzieren kann. Das Verhältnis von Bcl-2:Bax Protein wird daher als eine kritische Stellgröße angesehen, ob eine Zelle in Apoptose übergeht (Sato et al., 1994).

Über die mRNA-Spiegel von *bax* und *bcl-2* sollte indirekt die Regulation der Proteine durch die Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂ untersucht werden (Abb. 22 und 23). Für Genistein war beschrieben, dass es apoptotisch auf MCF-7 wirkt und dieser Effekt zumindest teilweise auf die Beeinflussung des Bcl-2:Bax Systems zurückgeführt werden konnte (Leung and Wang, 2000; Po et al., 2002).

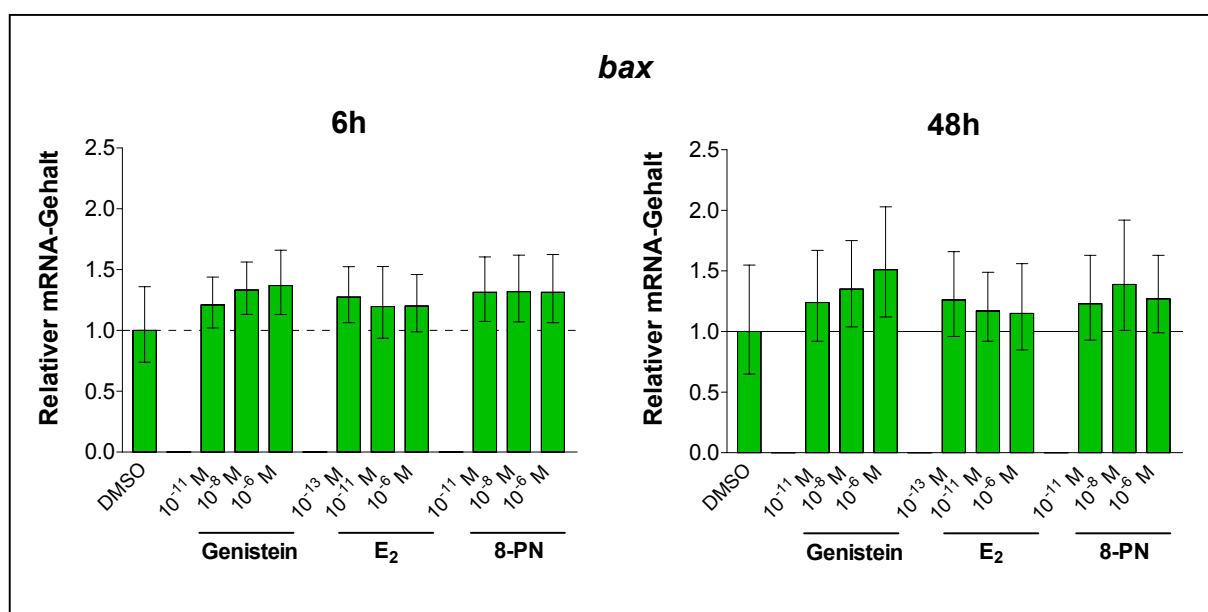


Abbildung 22: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *bax*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

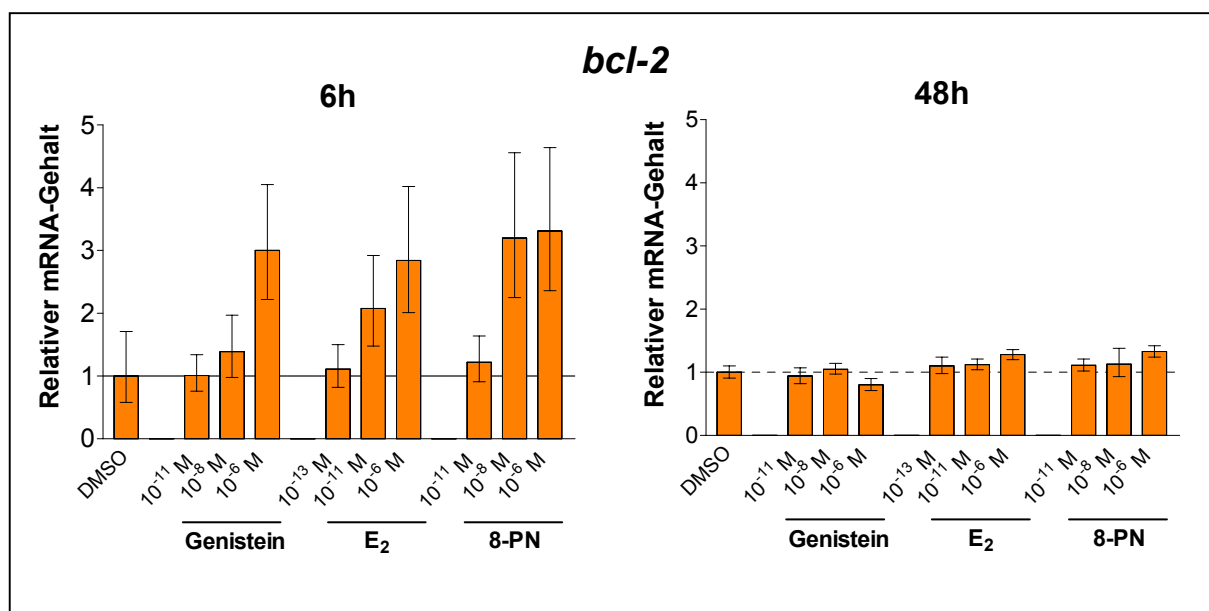


Abbildung 23: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *bcl-2*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

Die Expression von *bax* in MCF-7 wurde durch Genistein am deutlichsten beeinflusst und war zudem klar dosisabhängig. Mit zunehmender Konzentration an Genistein stieg die *bax*-Expression bereits nach 6 h auf ca. 140 % der Kontrolle und lag nach 48 h bei etwa 150 %. 8-PN zeigte zu beiden Zeitpunkten keinen erkennbaren Einfluss auf die Regulation. E₂ bewirkte insgesamt eine geringfügige Abnahme an *bax* mRNA mit steigender Konzentration. Für *bcl-2* zeigte sich nach 6 h bei allen Substanzen ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression um mehr als das Dreifache gegenüber der Kontrolle (höchste Konzentration). Dieser deutliche Effekt war nach 48 h nicht mehr erkennbar. Andere Veränderungen zu diesem Zeitpunkt waren nicht mehr deutlich von den Streuungen abgrenzbar.

Die Ergebnisse bestätigten die Literaturdaten, wonach Genistein über die Veränderung im Bcl-2:Bax-System hemmend auf MCF-7 wirkt. Zunächst kam es nach 6 h zu einer deutlichen Zunahme an Bcl-2 gegenüber Bax, was sich allerdings nach 48 h umkehrte. Dieser Langzeiteffekt konnte für Genistein jedoch nicht klar im Proliferations-Assay wieder gefunden werden, so dass vermutlich dieses Signal zu schwach war bzw. durch andere Mechanismen überlagert war. Im Gegensatz dazu ist die beobachtete Proliferations-Hemmung durch 8-PN im µM-Bereich nicht durch Verschiebung des Bcl-2:Bax-Systems bedingt, da 8-PN die Expression beider Gene nicht über 48 h hinaus beeinflusst. Damit gilt als wahrscheinliche Erklärung die oben beschriebene, inhibitorische Wirkung auf die Tyrosin-Kinase-Aktivität

des EGF/FGF-Rezeptors und/oder die DNA Polymerase II. In diesen Enzymen blockiert Genistein kompetitiv die ATP-Bindungsstelle. Natürliches E₂ hatte über das Bcl-2:Bax-System einen leicht anti-apoptotischen Einfluss auf MCF-7 Zellen, was der starken Induktion der Zellproliferation nicht widerspricht. Die rasche Hochregulation der Bcl-2-Expression durch Estrogene ist durch Aktivierung der „mitogene activated kinase“ MAPK bedingt. Diese „Schutzwirkung“ von Estrogenen ist mehrfach beschrieben (Dykens et al., 2003; Levin, 2002; Linford et al., 2000).

2.2.4.2 pS2

pS2 (TFF-1) gehört zur Familie der Trefoil-Factor (TFF) Proteine. TFFs sind kleine sekretorische Peptide von ca. 60 Aminosäuren Länge und durch eine stark konservierte, cysteinreiche sog. „trefoil-domain“ charakterisiert. Überwiegend exprimiert sind die drei humanen TFFs im Gastrointestinaltrakt, wo sie beim Schutz der Mucosa eine Rolle spielen. Bei der Untersuchung und Behandlung von malignen Mamma-Tumoren wurden TFF-1 und TFF-3 als sensitive, estrogenresponsive Marker entdeckt, obwohl ihre physiologische Rolle in diesem Gewebe bislang noch unklar ist (Maggiolini et al., 2001; May and Westley, 1995). Abb. 24 zeigt die Regulation von pS2 auf mRNA-Ebene.

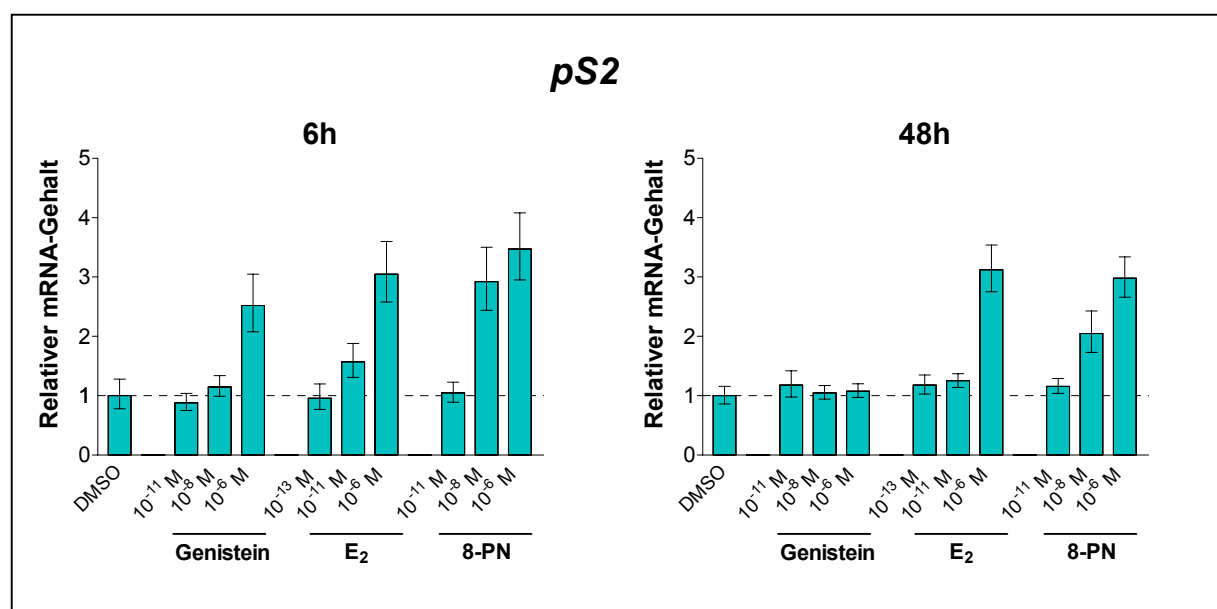


Abbildung 24: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von pS2-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

Nach 6 h zeigten alle drei getesteten Substanzen eine deutliche, konzentrationsabhängige Induktion der *pS2*-Expression, die bei 8-PN mit dem 3.5-fachen gegenüber Kontrolle am stärksten ausfiel. Die Korrelation von *pS2*-Expression zu Zell-Proliferation war innerhalb der Konzentrationsschritte bei allen Substanzen gegeben. Während bei 8-PN und E₂ die Induktion nach 48 h nahezu unvermindert war, hatte Genistein zu diesem Zeitpunkt keinen induzierenden Effekt mehr. Dies könnte einerseits durch rasche Metabolisierung begründet sein, oder jedoch andere, ligandenspezifische Ursachen haben.

2.2.4.3 c-Fos und Srf

Die mitogene Regulation der Zellproliferation geht einher mit der Induktion sog. „immediate early genes“ wie z.B. *c-jun* und *c-fos*, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung nachgeschalteter und für das Zellwachstum essentieller Gene spielen. Die Induktion der Proto-Onkogene *c-fos* und *c-jun* und die nachfolgende Bildung des AP1-Transkriptionskomplexes wird von E₂ über Aktivierung von ER und Bindung an ERE in den Promotorregion von *c-fos* bzw. *c-jun* bewirkt. Über mER induziert E₂ allerdings auch nicht-genomisch die Expression von *c-fos*. Dies geschieht über die Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelte Aktivierung der MAPK sowie PI-3-K und den entsprechend nachgeschalteten Signalwegen. Extrazelluläre Mitogene (Insulin, IGF-1), Cytokine und „Stressfaktoren“ induzieren *c-fos* ebenfalls über die Aktivierung von intrazellulären Kinase-Kaskaden (Duan et al., 1998).

Der „serum response factor“ (Srf) ist ein Transkriptionsfaktor, der sog. „Serum-response-Elemente“ (SRE) in der Promotorregion vieler wachstumsregulierender Gene bindet und deren Expression reguliert. So werden in MCF-7 via Srf die nicht genomischen Effekte von Estrogenen und Mitogenen co-operativ über die Aktivierung des *c-fos* Proto-Oncogens vermittelt (Duan et al., 2001; Duan et al., 2002). Für Genistein wurde gezeigt, dass es die Expression von *srf* konzentrationsabhängig verringert und damit die Expression von *c-fos* und gleichsam die Proliferation unterdrücken kann (Chen and Davis, 2003). Abb. 25 und 26 zeigen die Expression von *srf* und *c-fos* in MCF-7 nach Behandlung mit Genistein, E₂ und 8-PN.

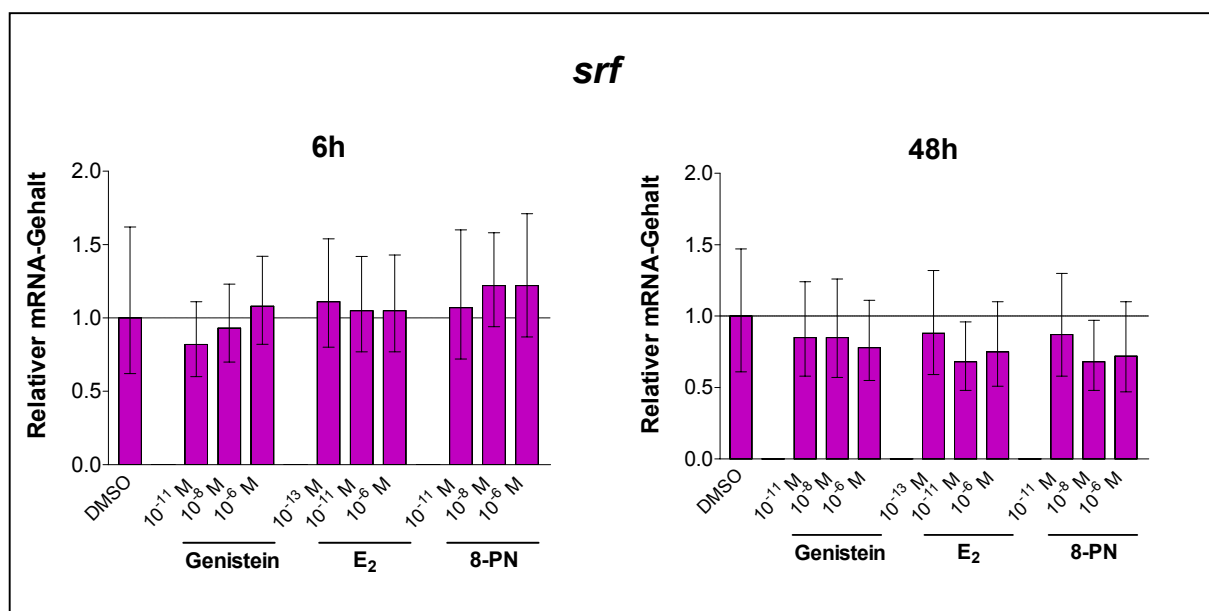


Abbildung 25: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *srf*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

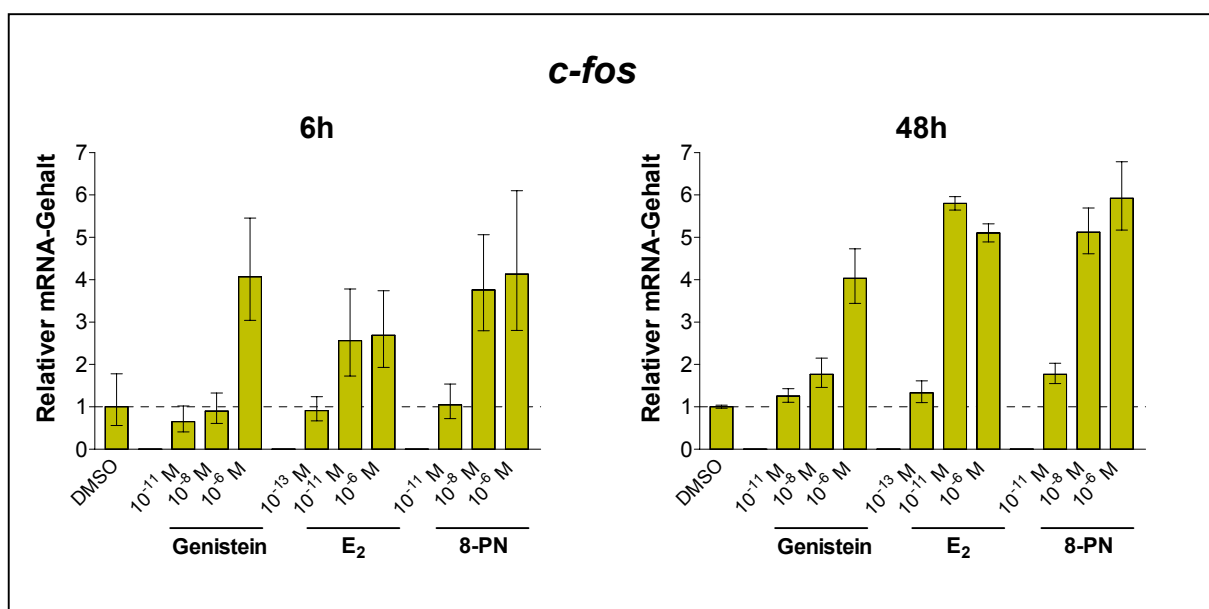


Abbildung 26: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *c-fos*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

Für *srf* war nach 6 h keine signifikante Regulation durch Genistein, 8-PN und E₂ gegenüber Kontrolle zu beobachten. Die C_t-Werte für *Srf* und Cyclophilin als Standard lagen eng zusammen, wodurch der Fehler überproportional zunahm. Nach 48 h war eine geringfügige Abnahme der *srf*-Expression gegenüber Kontrolle für alle Substanzen zu beobachten, allerdings war auch hier der Fehler zu groß für eine wirkliche Signifikanz. Im Gegensatz zu den publizierten Daten wurde für Genistein auf mRNA Ebene keine Suppression von *srf* gefunden, die sich auf die Expression von *c-fos* hätte auswirken können.

Die Expression des Proto-Onkogen *c-fos* wurde bereits nach 6 h von allen drei Estrogenen konzentrationsabhängig induziert. Genistein und 8-PN zeigten bei 1 µM eine stärkere Induktion als E₂, wobei die Effekte des Genisteins insgesamt weniger ausgeprägt waren. Nach 48 h stieg die Expression durch E₂ und 8-PN bei mittlerer und höchster Konzentration auf das Fünf- Sechsfache gegenüber Kontrolle an. Eine Suppression durch Genistein wurde nicht beobachtet.

2.2.4.4 ERα, VDR und PR

Wie bei den meisten der Ligand-Rezeptor abhängigen Signalübertragungswege haben auch Steroidhormone direkten Einfluss auf die Expression der beteiligten Rezeptoren. Der für den eigenen Zielrezeptor meist negative „Feedback-Loop“ sorgt dabei für eine Zeit- und Intensitätsbegrenzung des vom Liganden vermittelten Signals. Allerdings werden auch zeitlich nachfolgende physiologische Prozesse durch Rezeptorinduktion vorbereitet. Für Estrogene ist bekannt, dass sie die Expression der jeweiligen ER unterdrücken (Shupnik et al., 1989). Dies erfolgt über die Rekrutierung von nukleären Co-Repressoren durch den aktivierten ER. Gestagene haben eine den Estrogenen nachgeschaltete, schwangerschaftsvorbereitende Funktion im weiblichen Zyklus. So induzieren Estrogene etwa in Uterus- und Brüstdrüsengewebe sehr stark die Expression des Progesteron-Rezeptors (PR), während im gleichen Gewebe die ER-Expression unterdrückt wird (Manni et al., 1981).

Der Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) spielt neben der Steuerung der Calcium- und Knochenhomöostase eine wichtige Rolle bei der Wachstumsregulation vieler solider Tumore. 1,25(OH)₂D₃ wirkt apoptotisch auf MCF-7 in dem es die Expression von Bcl-2 unterdrückt und gleichzeitig die Translokation von Bax aus dem Plasma in die Mitochondrien bewirkt (Welsh et al., 2002). Der VDR wird daher seit einiger Zeit als ein mögliches „target“ bei der Behandlung und Prävention von Brustkrebs und anderen Tumoren untersucht (Welsh et al., 2003; Wietzke and Welsh, 2003). Abb. 27, 28 und 29 zeigen die Expression der Rezeptoren.

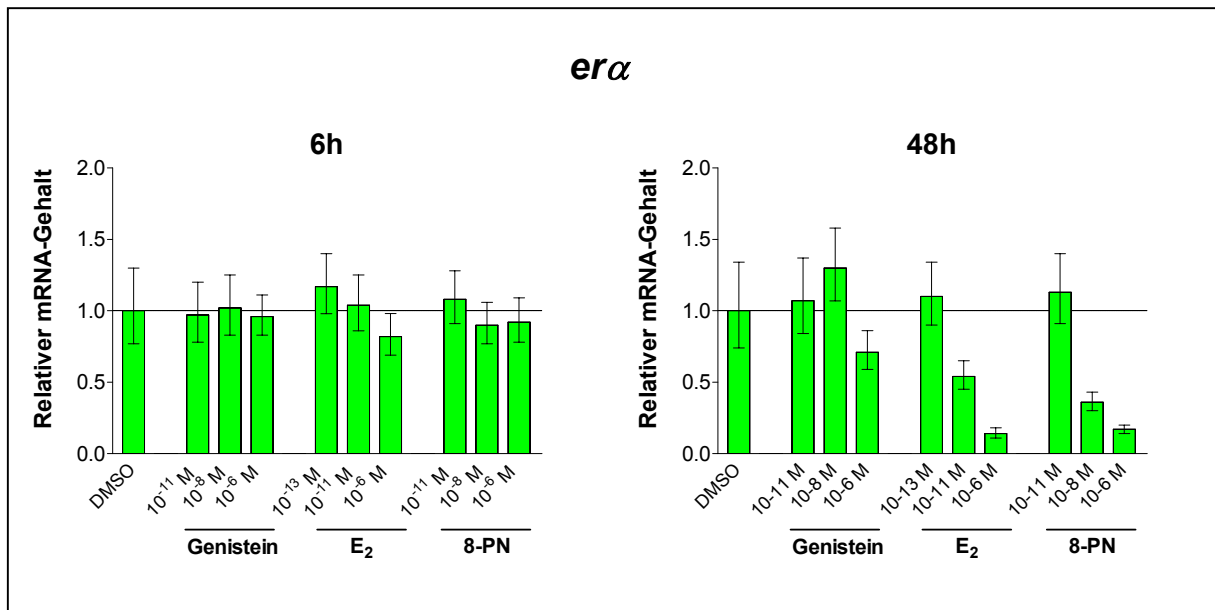


Abbildung 27: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *era*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

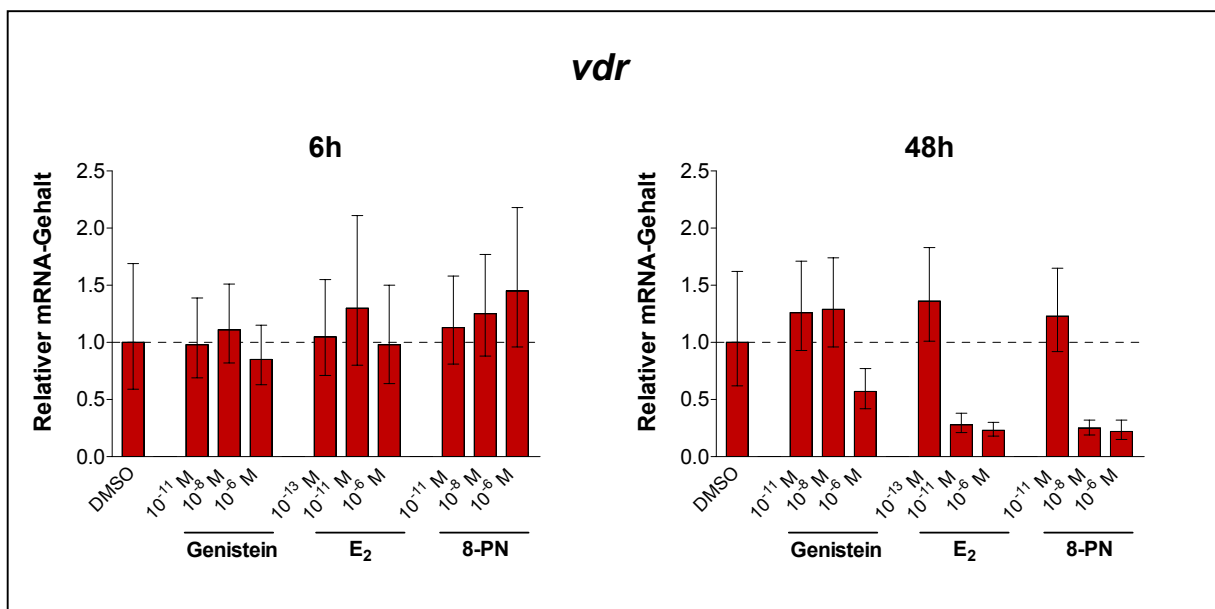


Abbildung 28: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *vdr*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

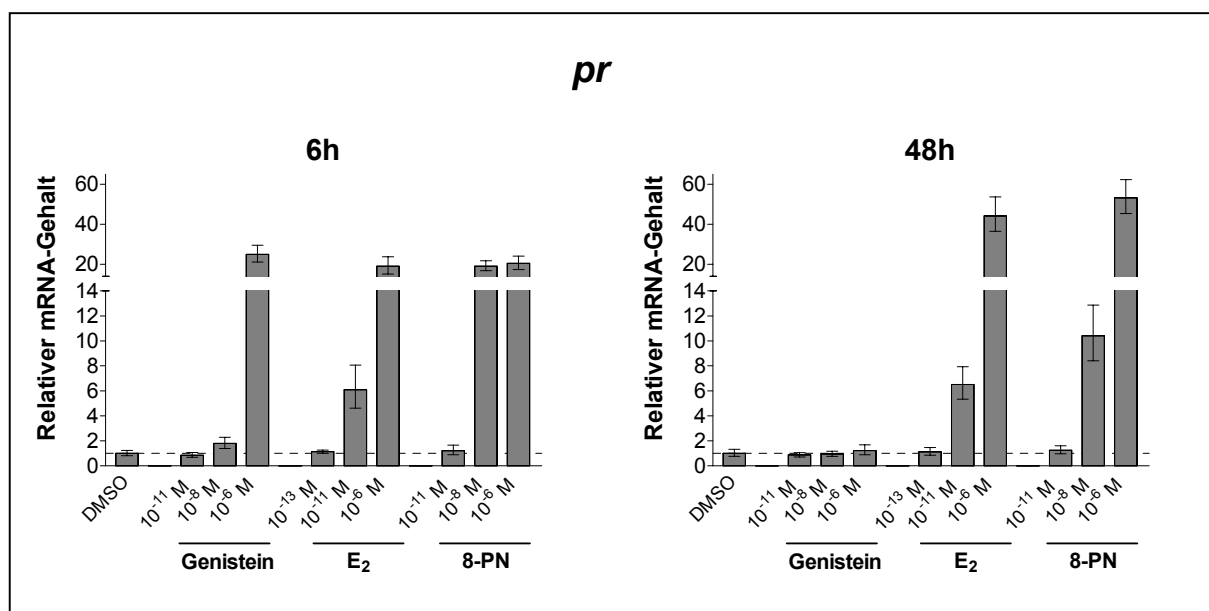


Abbildung 29: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *pr*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

Die Expression von *era* in MCF-7 wurde in den hier gewählten Konzentrationen für E₂ und 8-PN von beiden Substanzen deutlich und quantitativ in fast identischem Ausmaß unterdrückt. Dieser Effekt deutete sich bereits nach 6 h an und war nach 48 h am stärksten. In den höchsten Konzentrationen sank der mRNA-Gehalt auf unter 20 % des Kontrollwertes. Genistein zeigte nur einen schwachen Effekt, der lediglich nach 48 h und bei 10⁻⁶ M mit einer ca. 75 % igen Absenkung gegenüber Kontrolle signifikant war.

Ein zu *era* analoges Bild zeigte sich in der Regulation des VDR. Nach 48 h zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Suppression von *vdr* durch E₂ und 8-PN, die bei den höchsten Konzentrationen bis 25 % der Kontrolle absank. Genistein reduzierte in der höchsten Dosis und nach 48 h die VDR-mRNA auf etwa die Hälfte.

Die stärkste Regulation der untersuchten Hormon-Rezeptoren wurde für *pr* beobachtet. Alle drei Substanzen zeigten bereits in der mittleren Konzentration, Genistein in der höchsten, nach 6 h eine deutliche Induktion von PR-mRNA auf etwa den 20-fachen Wert gegenüber Vehikel. Dieser Effekt war nach 48 h für Genistein vollständig verschwunden, während die *pr*-Expression durch E₂ und 8-PN auf das 60-Fache im Vergleich zur Kontrolle zunahm.

2.2.4.5 E-Cadherin

E-Cadherin ist als ein extrazelluläres Adhäsionsprotein an der Verknüpfung der Plasmamembranen benachbarter Zellen beteiligt und somit für die Aufrechterhaltung des Zellverbandes verantwortlich. Der E-Cadherin/Catenin-Komplex ist in Epithelzellen ein wirksamer Suppressor gegen Tumorinvasion. Dieser Komplex ist in der MCF-7 Mamma-Carcinoma Zelllinie ebenfalls exprimiert, jedoch funktional eingeschränkt in der invasiven MCF-7/6 Variante. Es konnte gezeigt werden, dass 8-PN die E-Cadherin abhängige Zellaggregation und das Zellwachstum in dieser invasiven Linie stimuliert (Rong et al., 2001). Hingegen hatte 8-PN keinen Effekt auf die Invasion von MCF-7/6 im Hühnerherz-Assay *in vitro*. In diesen Wirkungen ähnelt 8-PN sehr dem natürlichen E₂. Abb. 30 zeigt die Expression von *e-cad* in MCF-7.

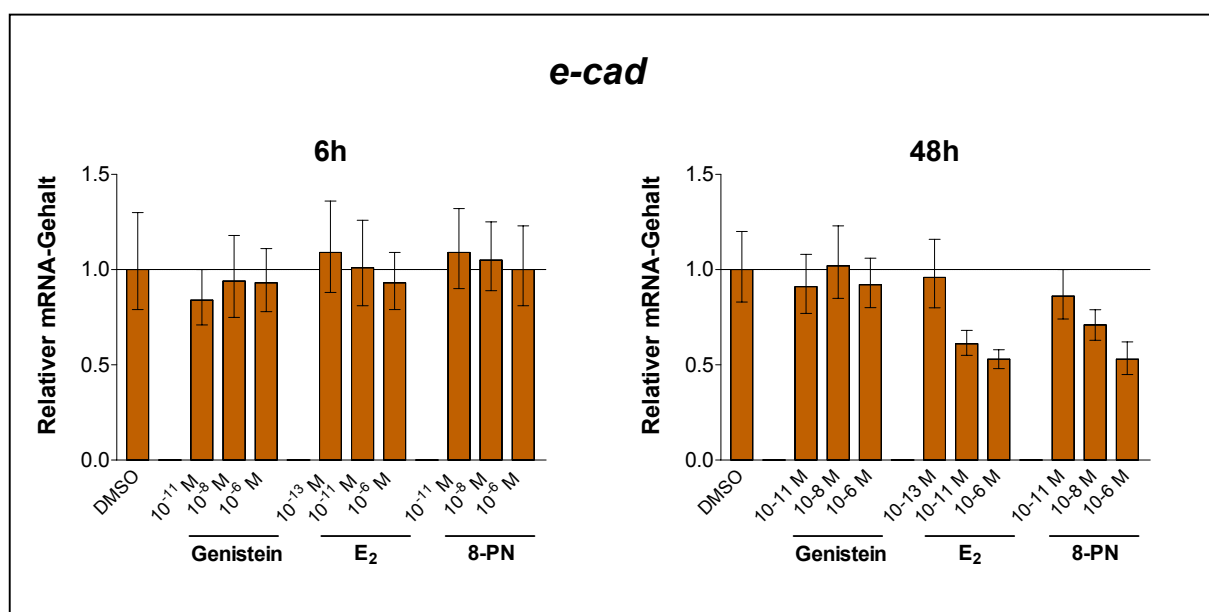


Abbildung 30: Semi-Quantitative RT-PCR-Analyse von *e-cad*-mRNA in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Phytoestrogene Genistein und 8-PN sowie E₂. MW ± SD, N=2

Die Expression von *e-cad* in MCF-7 wurde durch 8-PN und E₂ nach 48 h signifikant reduziert, bei gleichzeitiger Stimulierung der Proliferation und sichtbarer Aggregation. Dieser Effekt ist quantitativ für beide Substanzen bei 10⁻⁶ M fast identisch, mit jeweils ca. 50 % iger Suppression gegenüber Vehikel. Für Genistein war kein signifikanter Effekt auf die Expression von *e-cad* zu beobachten. Möglicherweise erfolgt die Regulierung des Adhäsionskomplexes nicht über E-Cad-Induktion oder aber das Expressionsfenster wurde nicht getroffen.

2.3 In vivo Untersuchungen

2.3.1 Uterus-Wachstum-Test

Der Uterus-Wachstum-Test an der juvenilen Ratte ist eine etablierte Methode zur empfindlichen Bestimmung der *in vivo*-Estrogenität von Substanzen (Fritzemeier and Hegele-Hartung, 1999). Vor der Geschlechtsreife produzieren die Ovarien kaum endogenes E₂ und der Uterus reagiert sehr sensitiv auf exogene Estrogen-Gaben. Das Gewebe proliferiert und lagert vermehrt Wasser ein, was zu einer deutlichen Gewichtszunahme führt. Das Endometrium wird ebenfalls stimuliert und verdickt sich, was durch Höhenwachstum des luminalen Epithels histologisch quantifiziert werden kann. Die dosisabhängige Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes bezogen auf das Körpergewicht sowie die Höhe des luminalen Epithels sind in Abb. 31 für beide Enantiomere des 8-PN dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurde E₂ in einer Standarddosierung von 1.5 µg/kg·d appliziert.

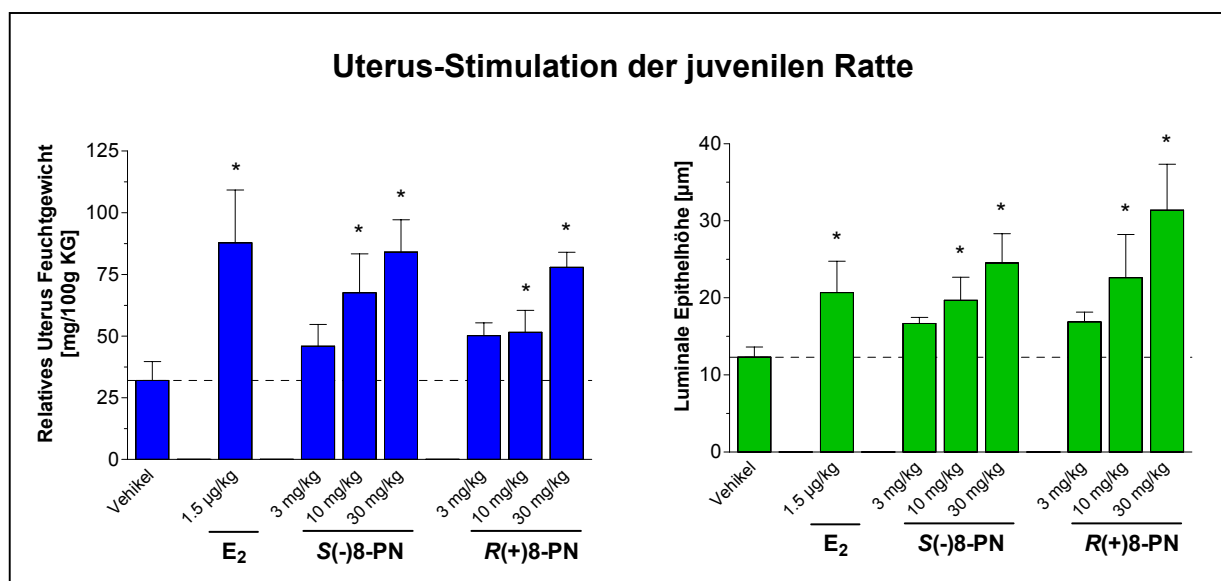


Abbildung 31: Veränderung von Uterusgewicht und luminaler Epithelhöhe nach Estrogen-Gabe an der juvenilen Ratte. Den Tieren wurde an drei aufeinander folgenden Tagen s.c. appliziert, an Tag 4 die Uteri entnommen und examiniert. P < 0.05 zu Vehikel

Beide Enantiomere des 8-PN führten nach drei Tagen zu einer signifikanten Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes, das in der höchsten Dosierung von 30 mg/kg·d etwa 93 % bzw. 82 % der E₂-Kontrolle erreichte. Der morphologische Effekt auf das Endometrium verhielt sich qualitativ analog zu den Uterusgewichten. In der höchsten Dosierung bewirkte die R(+) Form eine gegenüber E₂ erhöhte Stimulation des luminalen Epithels.

In der juvenilen Ratte zeigten beide Enantiomere des 8-PN eine klare dosisabhängige Estrogenität an Uterus und Endometrium gegenüber Vehikel. Sowohl qualitativ als auch quantitativ war zudem kein signifikanter Unterschied von S(-)- und R(+)-Isoform erkennbar. Im direkten Vergleich zu E₂ war die effektive Dosis allerdings etwa 20.000-fach höher (1.5 µg bzw. 30 mg/kg). Diese Untersuchung lieferte gleichzeitig eine erste *in vivo* Äquivalenzdosis von 8-PN zu E₂, was als Orientierung für weitere Tierstudien dienen sollte.

2.3.2 Gewebespezifische Estrogenität im ERE-Luc⁺ Maus-Modell

Diese Studie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Adriana Maggi (Universität Mailand) durchgeführt.

Die ERE-Luc⁺ Maus bietet ein neuartiges Tiermodell zur Studie von gewebespezifischen Estrogenen bzw. SERMs. Die ERE-Luc⁺ transgenen Mäuse exprimieren ubiquitär ein Luciferase-Reporter-Genkonstrukt, welches über ein doppeltes Estrogen-Response-Element (ERE) in Verbindung mit einem Minimalpromotor kontrolliert wird. Die estrogenabhängige Aktivierung von ER kann sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* verfolgt werden (Ciana et al., 2003). Für insgesamt 26 Gewebe konnte die Expression des Konstruktes nachgewiesen werden, die E₂-induzierte Reporter-Gen-Expression in 15 Geweben (Ciana et al., 2001). Die Luciferase-Expression in den einzelnen Geweben korreliert mit der ER-vermittelten Transkription.

Ziel der Studie war die Überprüfung der potentiellen Gewebespezifität von 8-PN aus den vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen. Heterozygoten, männlichen ERE-Luc⁺-Mäusen wurde i.p. 250 µl ölige Dosierlösung appliziert. 6 h post-Applikation wurden die Tiere getötet. Prostata, Leber, Knochen sowie Hirn wurden entnommen und auf Luciferase-Aktivität getestet (Abb. 32). Weitere Gewebe wurden zwar entnommen aber nicht analysiert. Es wurden männliche Tiere für die Untersuchung eingesetzt, um den durch endogene Estrogene verursachten Hintergrund gering zu halten. Die verabreichten Dosen waren nicht identisch sondern wurden mit Hinblick auf die Äquipotenz der vorherigen Studie gewählt. Ein direkter

quantitativer Vergleich ist insofern nur bedingt möglich, vielmehr ging es in der Studie um vergleichende Untersuchung einer Gewebespezifität von 8-PN.

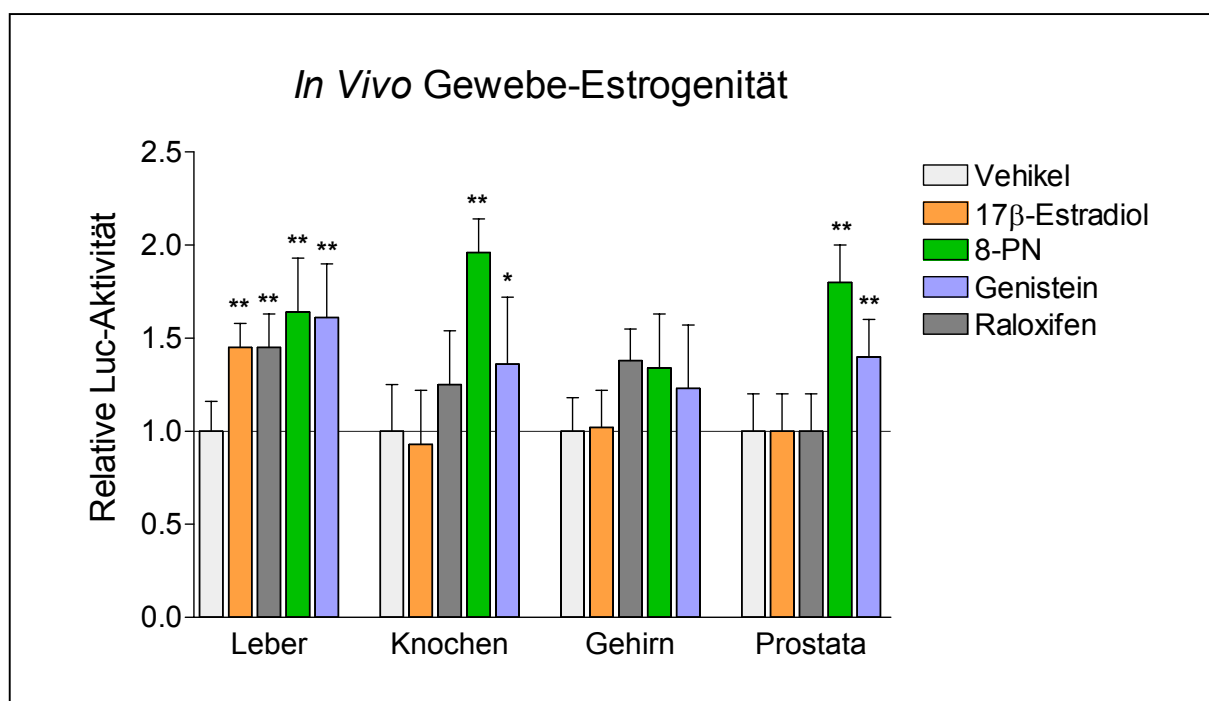


Abbildung 32: Studie zur gewebespezifischen *in vivo* Estrogenität von E₂, 8-PN, Genistein und Raloxifen im transgenen ERE-*Luc*⁺ Maus Modell. Neun männlichen Mäusen pro Gruppe wurden 1.5 µg/kg E₂, 30 mg/kg 8-PN, 30 mg/kg Genistein bzw. 5 µg/kg Raloxifen i.p. appliziert, die Organe nach 6 h entnommen und auf induzierte Enzymaktivität hin untersucht. **: P<0.01; *: P<0.05 zu Vehikel

Die höchste spezifische Wirkung gegenüber Kontrolle wurde für 8-PN im Knochen (200 %) und in der Prostata (180 %) gefunden. Die Leber-Estrogenität aller vier verabreichten Substanzen war mit ca. 150-160 % im Vergleich zur Kontrolle nahezu identisch. Estrogene Aktivität im Hirngewebe war für Genistein, Raloxifen und 8-PN vergleichbar und mit 125-140 % deutlich höher als für E₂ (102 %). Raloxifen und E₂ zeigten im Prostatagewebe lediglich schwache bis keine Luciferase-Induktion. Als Schlussfolgerung aus dieser Studie ließ sich 8-PN als Estrogen mit der höchsten Gewebeselektivität und mit Schwerpunkt auf Knochen- und Prostatagewebe ableiten. Die eingesetzten Dosierungen von 8-PN und E₂ hatten in der juvenilen Ratte einen äquipotenten Einfluss auf das Uterusgewicht. In der Kombination der Studie zum Uterusgewicht und den Daten aus dem ERE-*Luc*⁺ Maus Modell ließ sich eine klare Hypothese zur selektiven estrogenen Wirkung von 8-PN in verschiedenen Geweben ableiten

(Knochen>Prostata>Uterus). Die besonders interessante Spezifitätserhöhung im Knochengewebe im Vergleich zum Uterus war nun in einer weiteren Untersuchung abzuklären.

2.3.3 BMD-Studien an der OVX-Ratte

Die Studie wurde von Leiras Oy in Turku, Finnland durchgeführt. Leiras Oy gehört zum Schering-Konzern und nimmt globale F&E-Funktionen wahr. Teile dieser Studie sind hier nachfolgend aufgeführt.

Ziel der Studie war es, die Wirkung von 8-PN auf die Knochendichte und gleichzeitig auf das Uterusgewicht in der adulten, ovariectomierten (OVX) Ratte zu untersuchen. Die OVX-Ratte wird als klassisches Tiermodell für die HRT bzw. Studie von Estrogen-Mangelzuständen eingesetzt, da dieses Modell der Physiologie der Menopause bei der Frau am ehesten entspricht. Der durch das Entfernen der Ovarien (erwachsene Ratte) bedingte Estrogen-Mangel führt zu einem deutlich messbaren Verlust an Knochendichte und Uterusgewicht. Substitution durch 1.5 µg/kg·d exogenes E₂ führt zur kompletten Hemmung des Verlustes an Knochenmasse bzw. zur Wiederherstellung der Knochenmasse sowie zur Normalisierung des Uterusgewichtes. Die Messung von Knochendichte und Uterusgewicht erlaubt damit die Untersuchung estrogener Substanzen auf ihre Knochenspezifität hin.

In der ersten Studie wurden sechs weibliche Sprague-Dawley Ratten (13-14 Wochen alt) pro Gruppe ovariectomiert (OVX) beziehungsweise SHAM-operiert (SHAM). An Tag 1 nach der Operation erhielt die SHAM-Gruppe Vehikel (30 % Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin, HPCD) und die OVX-Gruppen Vehikel bzw. S(-)8-PN zu 1 mg/kg·d, 3 mg/kg·d und 30 mg/kg·d. Die Behandlung wurde für vier Wochen bis Tag 28 fortgesetzt und die Tiere anschließend getötet. Es wurden die Uteri entnommen und gewogen. Die Knochendichte (BMD) wurde *ex vivo* an der linken, proximalen Tibia radiologisch bestimmt (Abb. 33). Es wurde S(-)8-PN anstelle des Racemats eingesetzt, um eine möglichst hohe Wirkung bei den eingesetzten Dosierungen zu erzielen. Spätere Studien (s.u.) zeigten, dass es *in vivo* keinen Unterschied in der Wirkung zwischen beiden Enantiomeren bzw. deren Gemisch gibt.

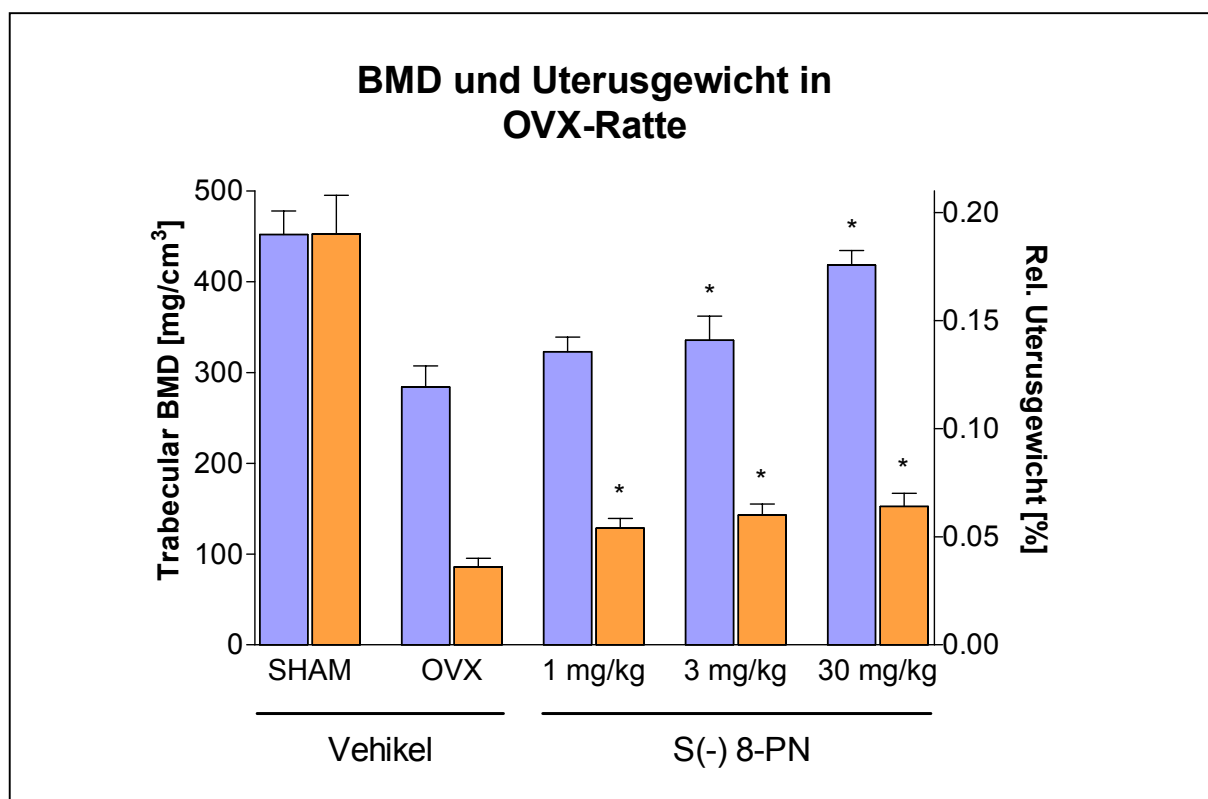


Abbildung 33: 1. BMD-Studie zur Veränderung von Knochendichte (blau) und Uterusgewicht (rot) an adulten OVX-Ratten nach 4-wöchiger Behandlung mit 1 mg/kg, 3 mg/kg und 30 mg/kg S(-) 8-PN pro Tag nach s.c.-Gabe. 6 Tiere pro Gruppe. $P < 0.01$ zu Vehikel

Im Vergleich zu den SHAM-operierten Tieren führte Ovariectomie (OVX) bei den Tieren nach vier Wochen zu einer deutlichen Abnahme an trabekularer Knochendichte (63 %) und einer noch stärkeren Verringerung der relativen Uterusgewichts (19 %). Die überproportionale Abnahme beim Uterusgewicht ist u. a. auf eine durch die Ovariectomie induzierte Gewichtszunahme der Ratten zurückzuführen. Die s.c.-Gabe von S(-)8-PN bewirkte eine klar dosisabhängige Zunahme an Knochendichte, die ab der mittleren Dosierung statistisch signifikant war und bei 30 mg/kg-d auf 93 % im Vergleich zur SHAM-Gruppe zunahm. Dem gegenüber war der Effekt auf den Uterus nur gering und es war zudem keine vergleichbare Dosisabhängigkeit festzustellen. In der mittleren und höchsten Dosierung bewirkte S(-)8-PN eine Zunahme des relativen Uterusgewichtes auf 33 % verglichen mit SHAM-Tieren. Histologische Untersuchungen bestätigten einen nur geringen Effekt auf das lumenale Epithel des Endometriums. Während die geringste Dosierung keinen Einfluss auf die induzierte Gewichtszunahme hatte, wurde diese durch die mittlere und höchste Dosierung unterdrückt. Allerdings lag die Gewichtszunahme in den beiden höheren Dosisgruppen noch leicht über der aus der SHAM-Gruppe.

In einer zweiten Studie sollte der Effekt von *S(-)*-8-PN sowie dem Racemat in direktem Vergleich zu E_2 (als Hemihydrat) unter den gleichen Versuchsbedingungen wie oben beschrieben untersucht werden. Zusätzlich wurde der Effekt von E_2 in zwei verschiedenen Vehikeln (ölig sowie wässrig) auf den Einfluss der Formulierung hin untersucht. Sechs Gruppen mit je sechs (acht für die 8-PN Gruppen) weiblichen Sprague-Dawley Ratten (12-14 Wochen alt) wurden wiederum ovariectomiert (OVX) beziehungsweise SHAM-operiert (SHAM). An Tag 1 nach der Operation erhielt die SHAM-Gruppe Vehikel (30 % HPCD) und die fünf OVX-Gruppen entweder Vehikel, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ E_2 in Benzylbenzoat/Rizinus Öl (B/R) bzw. HPCD oder 20 mg/kg *S(-)*-8-PN bzw. 20 mg/kg racemisches 8-PN in HPCD. Die Behandlung wurde für vier Wochen fortgesetzt und die Tiere an Tag 28 getötet. Es wurden die Uteri entnommen und gewogen. Die Knochendichte (BMD) wurde *ex vivo* an der linken, proximalen Tibia radiologisch bestimmt (Abb. 34).

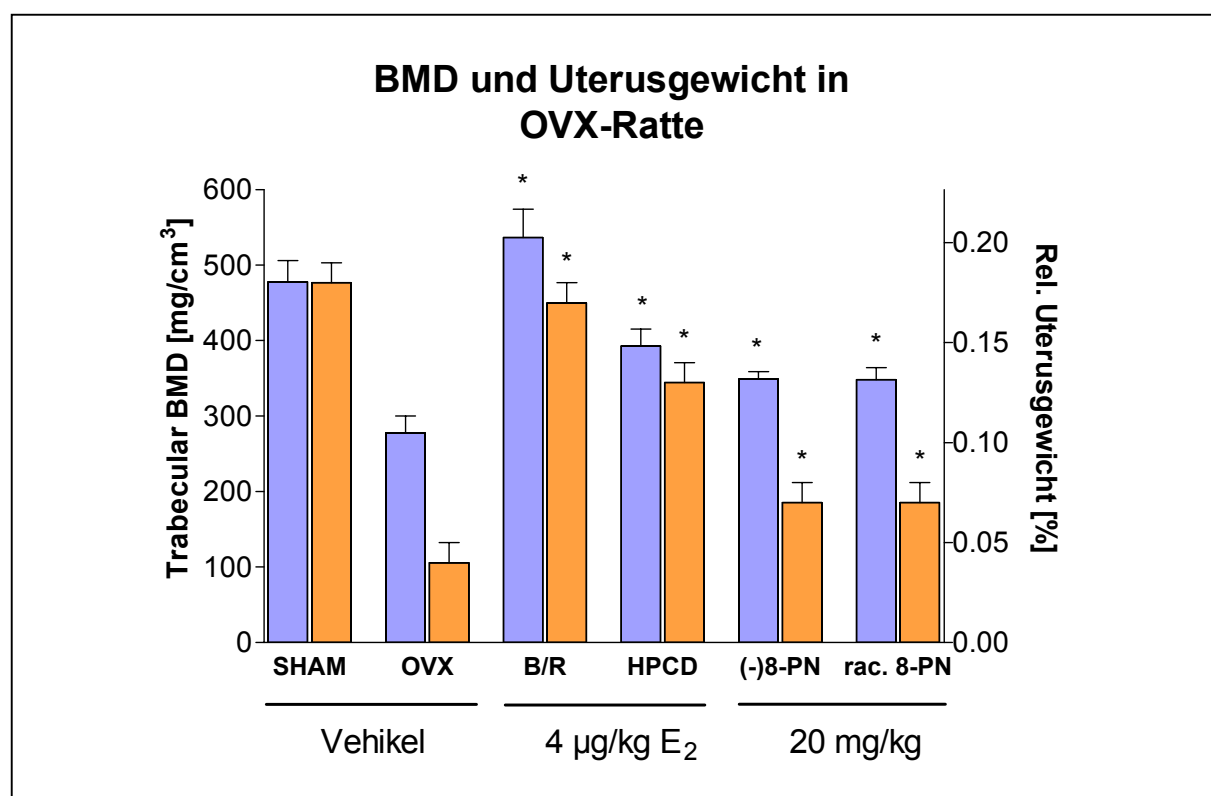


Abbildung 34: 2. BMD-Studie zur Veränderung der trabekulären Knochendichte (blau) und des relativen Uterusfeuchtgewichts (rot) an adulten OVX-Ratten nach 4-wöchiger s.c.-Behandlung mit 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ E_2 in Benzylbenzoat/Rizinus Öl (B/R) bzw. HPCD sowie 20 mg/kg *S(-)*-8-PN bzw. rac. 8-PN in HPCD pro Tag. N=8 Tiere pro 8-PN-Gruppe, sonst je N=6. P<0.01 zu Vehikel

Die OVX-induzierte Gewichtszunahme wurde in beiden E₂-Gruppen verhindert und konnte in beiden 8-PN-Gruppen reduziert werden, war jedoch in letzteren gegenüber SHAM erhöht. Die relativen Uterusgewichte waren in der Gruppe E₂-HPCD leicht, in beiden 8-PN Gruppen deutlich reduziert gegenüber den SHAM-Tieren. Die Uterusgewichte der E₂-B/R-Gruppe waren quasi identisch zu SHAM. Die durch die Ovariectomie induzierte Abnahme an trabekulärer Knochendichte wurde durch E₂-B/R vollständig wiederhergestellt und in den anderen Gruppen vermindert. Es wurden keine Unterschiede in den BMD-Parametern der E₂-HPCD und den beiden 8-PN-Gruppen festgestellt.

Die Effekte von E₂ auf das relative Uterusgewicht und die trabekuläre BMD unterschieden sich abhängig vom eingesetzten Vehikel. In öliger Formulierung verabreicht bewirkte E₂ eine vollständige Wiederherstellung des Uterusgewichts und der BMD auf das Niveau der SHAM-Gruppe, während die identische Dosis in HPCD eine gleichermaßen deutlich schwächere Wirkung zeigte. Dies zeigt sehr klar, dass die Wirksamkeit von E₂ auf Knochen und Uterus durch die Art der Formulierung verändert werden kann, vermutlich durch eine unterschiedliche Kinetik der systemischen Freisetzung, nicht jedoch das eigentliche pharmakologische Profil. Übertragen auf 8-PN bedeutet dies wiederum, dass die beobachtete Gewebespezifität der estrogenen Wirkungen substanzspezifisch sein muss und nicht durch die Art der Formulierung bedingt ist. Zudem sind die Effekte des Racemats und die von 2S(-)8-PN *in vivo* identisch.

2.4 Pharmakokinetische Untersuchungen

Pharmakokinetische Studien haben eine Brückenfunktion zwischen den vorklinischen Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit und der klinischen Entwicklung. Ziel der vorliegenden Studien war es, Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (ADME) in den toxikologisch und pharmakologisch genutzten Tierarten zu untersuchen, soweit dieses ohne ^{14}C -markierte Substanz möglich war. Aus den Ergebnissen war ein pharmakokinetisches Profil von 8-PN zu entwickeln, das als Grundlage für die erste klinische Studie dienen konnte.

2.4.1 Pharmakokinetik & Metabolismus

Die Studien zur Pharmakokinetik und Metabolismus von 8-PN am Tier wurden mit dem Racemat in Form von Einzeldosen in weiblichen Wistar Ratten und Beagle Hunden durchgeführt. HPLC-MS/MS Analysen von Serum, Plasma, Gewebehomogenat, Urin und Fäces wurden nach eigener Probenvorbereitung bei der Fa. Pharmanalyt in Baden, Österreich durchgeführt.

2.4.1.1 Weibliche Wistar Ratte

Die Untersuchungen in der Ratte wurden jeweils in zwei Teilen durchgeführt, die perorale und parenterale Gaben von 8-PN umfassten. 39 weiblichen Wistar Ratten wurden 30 mg/kg im wässrigen Vehikel s.c. verabreicht sowie 33 Ratten 250 mg/kg i.g. als wässrige Mikrokristallsuspension (MCS). Von je drei Ratten pro Versuch und Zeitpunkt wurden Seren gewonnen und als Poolprobe vermessen (Abb. 35). Die drei zum Zeitpunkt 24 h getöteten Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten, um zusätzlich Fäces sowie Urine zu gewinnen. Ratten aus beiden Studienteilen wurden zu drei Zeitpunkte Lebern und Gehirne entnommen, vereinigt, homogenisiert und ebenfalls auf 8-PN-Gehalt vermessen (Abb. 36).

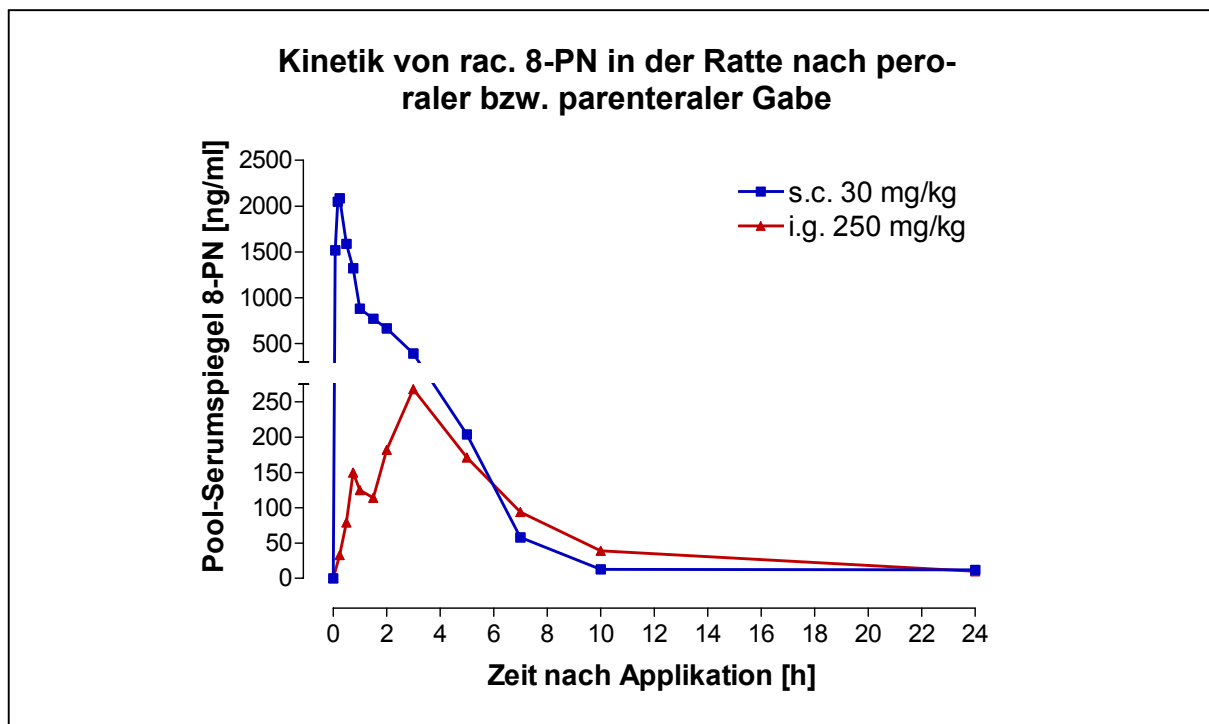


Abbildung 35: Serumspiegel von racemischem 8-PN in weiblichen Wistar Ratten nach Einmalgabe von 30 mg/kg s.c. sowie 250 mg/kg i.g. Die Seren von N=3 Tieren pro Zeitpunkt wurden zusammengefasst und per HPLC-MS/MS vermessen.

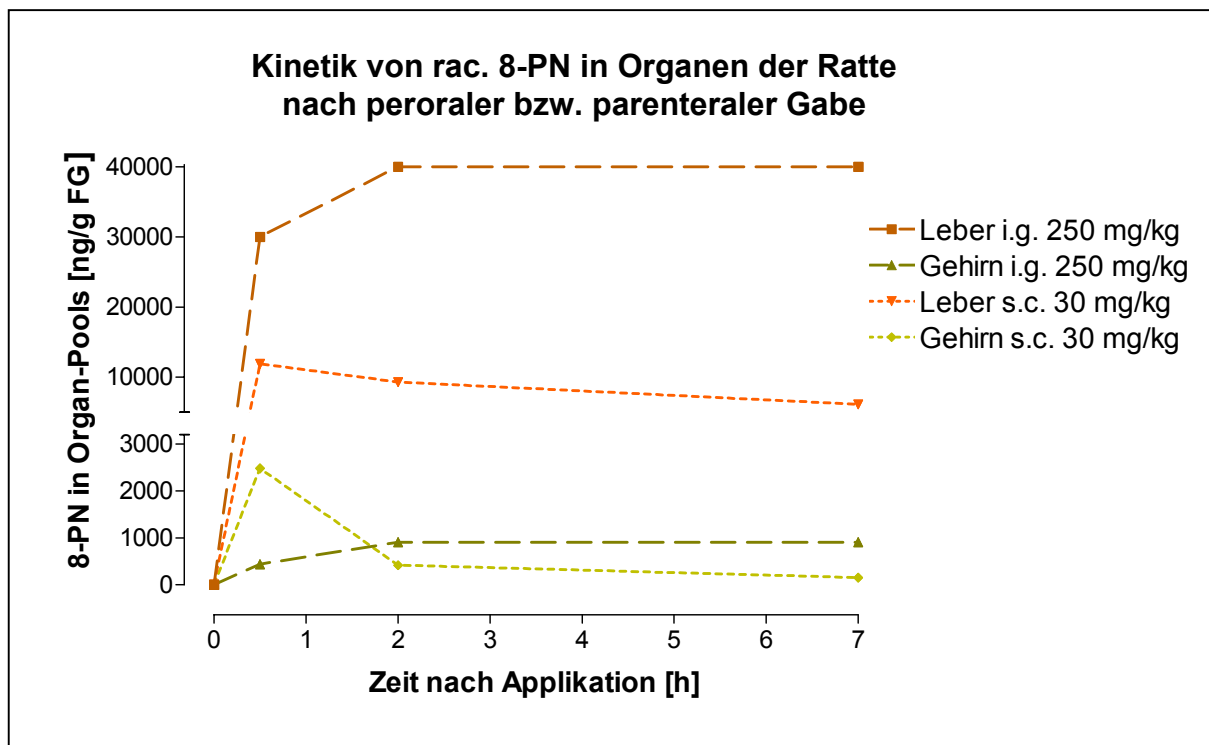


Abbildung 36: Kinetik von 8-PN in Leber und Gehirn von weiblichen Wistar Ratten nach s.c. Gabe von 30 mg/kg bzw. 250 mg/kg i.g. Organ-Pools von N=3 Tieren.

Aus dem Verlauf der Serumspiegel nach s.c.- bzw. i.g.-Gabe (Abb. 35) wurde mit Hilfe der Auswertesoftware „Topfit“ die wesentlichen pharmakokinetischen Parameter für 8-PN ermittelt (Tab. 4).

Gruppe	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	AUC _(0-24h) [ng·h/ml]	CL [ml/min·kg]	t _{1/2} [h]	BV [%]
Ratte, s.c.	2087	0.25	3921	127	1.47	100
Ratte, i.g.	268	3	1686	-	0.97	5.9

Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameter von 8-PN ermittelt aus Pool-Seren (N=3) nach s.c. und i.g. Verabreichung von 30 mg/kg (s.c.) bzw. 250 mg/kg (i.g.) an weiblichen Wistar Ratten. Auswertung mit „Topfit“. AUC_(0-24h) = Fläche unter Kurve über 24 h; CL = Clearance; BV = absolute Bioverfügbarkeit, C_{max} = maximale Konzentration zum Zeitpunkt t_{max}, t_{1/2} = Halbwertszeit im Serum

Die Ausscheidungen von drei Ratten wurden über 24 h gesammelt und analysiert. Urine wurden nach enzymatischer Konjugatspaltung (Glucuronidase / Aryl-Sulfatase) auf 8-PN vermessen sowie die über Fäces ausgeschiedene Menge an 8-PN bestimmt. Die durchschnittliche Massebilanz nach 24 h ist in Tab. 5 dargestellt.

Gruppe	Urin (gespalten) [% der Dosis]	Fäces [% der Dosis]	Gesamt [% der Dosis]
Ratte, s.c.	23.7 ± 10.9*	45.5 ± 4.7*	68.3 ± 4.7
Ratte, i.g.	0.19 ± 0.08	43.6 ± 12.7	43.8 ± 12.7

Tabelle 5: Aus N=3 Tieren gemittelte 24 h-Massenbilanz von 8-PN nach s.c. und i.g. Gabe von 30 mg/kg (s.c.) bzw. 250 mg/kg an weiblichen Wistar Ratten. *) Aufgrund von Fäces-Kontamination im Urin in einem Stoffwechselläufig hier nur N=2 für s.c.-Bilanz.

Die Konzentration an Phase-II-Metaboliten von 8-PN im Vergleich zu freiem Wirkstoff wurde durch Konjugatspaltung im Serum bestimmt. Es wurde dazu ein über 24 h gewichteter Serum-Pool (WP) aus den Pool-Seren für jeden Zeitpunkt erstellt, der die mittlere Konzentration über 24 h repräsentierte, also nach Multiplikation mit 24 h die Gesamtfläche unter der Kurve

ergab. Zusätzlich wurde das Verhältnis von Konjugaten zu freiem 8-PN im 24 h Urin ermittelt (Tab. 6).

Gruppe	Freies 8-PN in WP ₍₀₋₂₄₎ -Serum [% von Gesamt]	Freies 8-PN in 24 h Urin [% von Gesamt]
Ratte, s.c.	73.7	32.8 ± 5.5
Ratte, i.g.	29.2	85.2 ± 22.9

Tabelle 6: Anteil von Phase-II-Metaboliten nach Konjugatspaltung im Serum und 24 h Urin nach s.c. und i.g. Gabe von 30 mg/kg (s.c.) bzw. 250 mg/kg (i.g.) an weiblichen Wistar Ratten. WP = gewichteter Serum Pool über 24 h nach Applikation.

2.4.1.2 Weibliche Beagle Hunde

Die Hundestudien wurden mit jeweils drei einzelnen Tieren pro Versuchsteil durchgeführt, für die individuelle Serum-, Urin- und Fäces-Werte gemessen wurden. Für die parenterale Gabe wurden 10 mg/kg als i.v. Kurzinfusion verabreicht, für die perorale Studie 125 mg/kg als MCS. Alle Hunde wurden für 24 h in Stoffwechselkäfigen gehalten. Der Verlauf der Serumspiegel über 24 h pro Tier ist in Abb. 37 dargestellt. Die pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 7, die 24 h-Massebilanz in Tab. 8 und das Verhältnis von Konjugaten zu freiem Wirkstoff in Serum und Urin in Tab. 9 zusammengefasst.

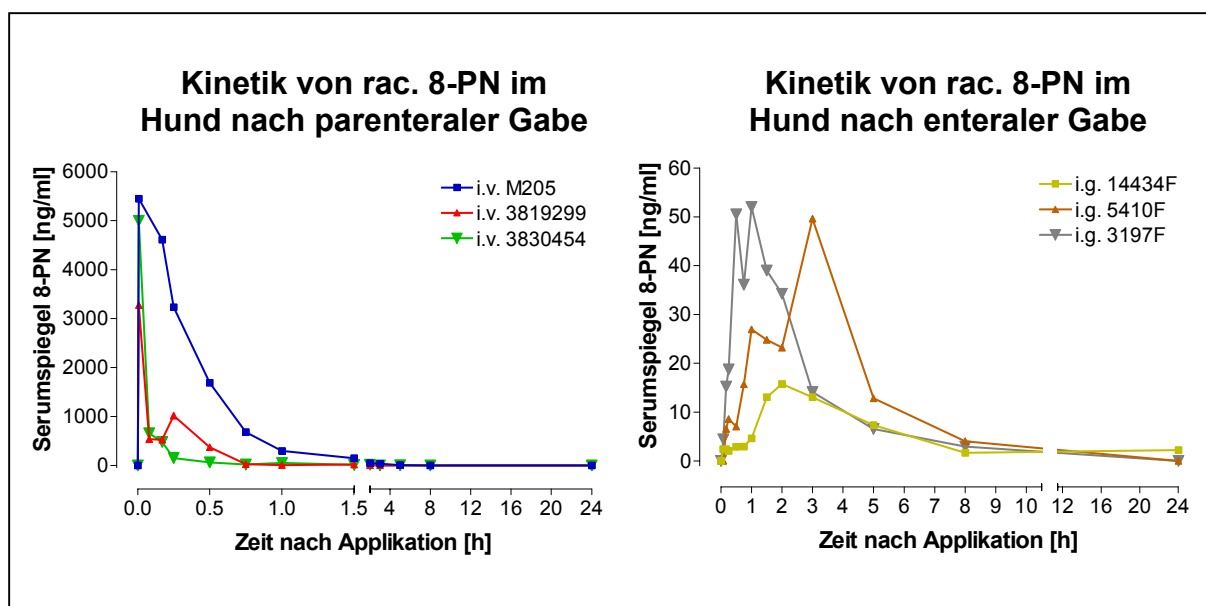


Abbildung 37: Serumspiegel von racemischem 8-PN in weiblichen Beagle Hunden nach Einmal-Gabe von 10 mg/kg i.v. bzw. 125 mg/kg i.g. Die Seren von sechs individuellen Tieren wurden per HPLC-MS/MS vermessen.

Gruppe	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	AUC _(0-24h) [ng·h/ml]	CL [ml/min·kg]	t _{1/2} [h]	BV [%]
Hund, i.v. ²	4140 ± 1216	0.017 ± 0	402 ± 98	388 ± 76	0.9 ± 0.4	100
Hund, i.g.	39.1 ± 20	2.0 ± 1.0	137 ± 35	N/A	1.8 ± 0.4	2.9 ¹

Tabelle 7: Pharmakokinetische Parameter von 8-PN ermittelt aus Einzelseren (N=3) nach i.v.- bzw. i.g.-Gabe von 10 mg/kg (i.v.) & 125 mg/kg (i.g.) an weibliche Beagle. Auswertung mit „topfit“. ¹⁾ nicht korrigiert auf unvollständige Absorption. ²⁾ Parameter für i.v. Gabe wurden mit zwei Hunden berechnet da Tier M205 stark abweichende Werte zeigte, vermutlich wegen Leberfunktionsstörung. Dieses Tier war stark übergewichtig.

Gruppe	Urin (gesamt) [% der Dosis]	Fäces [% der Dosis]	Gesamt [% der Dosis]
Hund, i.v.	17.8 ± 2.6	38.0 ± 11.9	55.8 ± 10.8
Hund, i.g.	1.32 ± 0.86	67.4 ± 12.4	68.7 ± 11.6

Tabelle 8: Gemittelte (N=3) 24 h-Massenbilanz von 8-PN nach i.v. und i.g. Gabe von 10 mg/kg (i.v.) bzw. 125 mg/kg (i.g.) an weiblichen Beagle Hunden.

Gruppe	Freies 8-PN in WP ₍₀₋₂₄₎ -Serum [% von Gesamt]	Freies 8-PN in 24 h Urin [% von Gesamt]
Hund, i.v.	43.3 ± 4.7	22.6 ± 0.2
Hund, i.g.	27.5 ± 3.8	37.3 ± 2.5

Tabelle 9: Anteil von Phase-II-Metaboliten nach Konjugatspaltung im Serum und 24 h Urin nach i.v. und i.g. Gabe von 10 mg/kg (i.v.) bzw. 125 mg/kg (i.g.) an weiblichen Beagle Hunden. WP = gewichteter Serum Pool über 24 h nach Applikation.

2.4.1.3 ADME-Profil und Bioverfügbarkeit in Ratte und Hund

Basierend auf den Befunden der Studien an Ratte und Hund ließ sich ein ADME-Profil für 8-PN erstellen. Für die typischen pharmakokinetischen Eigenschaften Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME) sowie absolute Bioverfügbarkeit folgende Ergebnisse festhalten:

Absorption

Das Ausmaß der Absorption nach peroraler Gabe der MCS-Formulierung an Ratte und Hund ließ sich über den Vergleich zur parenteraler Gabe anhand der prozentualen Dosisanteile, die unverändert über Fäces ausgeschieden wurden, abschätzen. Bei der Ratte lag der über Fäces ausgeschiedene Anteil nach i.g. Administration von 250 mg/kg bei knapp 44 % der Gesamtdosis, bei s.c. Gabe von 30 mg/kg bei etwa 45 %. In diesem Fall konnte von einer vollständigen enteralen Absorption ausgegangen werden. Beim Hund lagen diese Werte bei ca. 67 % nach i.g.- und etwa 45 % (ohne Tier M205) nach i.v.-Gabe, so dass bei den peroral verabreichten 125 mg/kg eine enterale Absorption von wenigstens knapp 80 % erreicht wurde. Insgesamt wurde 8-PN in Form der MCS von beiden Spezies bis zu 250 mg/kg vermutlich vollständig absorbiert.

Distribution

Nach s.c.-Gabe von 8-PN bei der Ratte als wässrige Lösung mit HPCD erfolgte eine rasche Freisetzung in die systemische Zirkulation mit Maximalkonzentrationen schon nach etwa 15 Minuten. Die subkutane Administration hatte somit keinerlei Depot-Effekt und konnte als äquivalent zur i.v.-Gabe angenommen werden. Nach i.g.-Administration wurden sowohl beim Hund als auch bei der Ratte die maximalen Serumkonzentrationen als Doppel-Peak im Bereich 1 h und 2-4 h post-Applikation gefunden, so dass ein enterohepatischer Kreislauf wahrscheinlich erschien. 8-PN zeigte spezifische Bindung an Serumproteine in der Ratte und SBG-Bindung im Hund, äquivalent zu E₂. Die untersuchten Gewebekonzentrationen von 8-PN in der Ratte nach s.c.-Gabe waren gegenüber Serum deutlich erhöht, im Mittel etwa 6.5-fach bei der Leber und ca. 1.6-fach beim Gehirn. Nach i.g.-Gabe waren die entsprechenden Relationen noch höher, mit ca. 350 für die Leber und 6.6 für das Gehirn. Eine gute Durchlässigkeit für die Blut-Hirn-Schranke konnte somit belegt werden. Die hohen Konzentrationen in der Leber beweisen deren wichtige Rolle bei der Ausscheidung (biliäre Elimination).

Metabolismus

Aus der Massenbilanz war bereits deutlich, dass 8-PN zwar konjugiert, aber nicht wesentlich über Phase-I-Reaktionen metabolisiert wurde. Bei beiden Spezies wurden sowohl nach enteraler als auch parenteraler Gabe etwa 50-70 % der Gesamt-Dosis unverändert ausgeschieden, also weder über Phase-I- noch Phase-II-Reaktionen metabolisiert werden. Dennoch wurden von 8-PN im begrenzten Maße Phase-II-Metaboliten gefunden. Glucuronat-/Sulfat-Konjugate im Urin der Ratte (s.c.) trugen nach Spaltung weitere 16 % der Gesamt-Dosis zur Massenbilanz bei, aber nur 0.04 % der Dosis nach i.g.-Gabe. Beim Hund waren diese Werte knapp 15 % (i.v.) bzw. 0.83 % (i.g.) jeweils bezogen auf die Gesamt-Dosis. Im 24 h-Serum-Pool von Ratte und Hund war der Anteil an Konjugaten von 8-PN nach i.g.-Behandlung etwa doppelt so hoch wie die der freien Substanz. Nach parenteraler Gabe waren beim Hund Konjugate und freie Substanz etwa im gleichen Verhältnis während bei der Ratte die Konjugate nur ca. 25 % im Vergleich zur freien Substanz ausmachten.

Ein wichtiger Punkt bei racemisch auftretenden Substanzen ist, ob der Metabolismus evtl. enantioselektiv ablaufen könnte. Da keine ausgeprägte Phase-I-Metabolisierung gefunden wurde, war es keine Überraschung, dass die Analyse repräsentativer Serumproben mit chiraler HPLC keinen enantioselektiven Metabolismus in keiner der beiden Spezies ergab.

Exkretion

Der hohe Dosis-Anteil an unverändert via Fäces ausgeschiedener Substanz in allen vier Studien zeigt eine primäre Exkretion von 8-PN über die Leber in die Galle. Nimmt man freie und konjugierte Anteile zusammen, so war nach parenteraler Gabe das Verhältnis von renaler zu biliärer Exkretion 0.52 in Ratten bzw. 0.41 in Hunden. Die Verhältnisse verschoben sich nach enteraler Verabreichung von 8-PN noch deutlich stärker in Richtung biliärer Exkretion (0.02 beim Hund bzw. 0.004 bei der Ratte), was auf eine extensive prä-systemische Eliminierung durch die Leber hindeutete. Hohe Dosisanteile wurden nach Absorption und Transport zur Leber direkt über die Galle in den Darm exkretiert. Ein enterohepatischer Kreislauf scheint aufgrund der mehr-gipfligen Serumverläufe stattgefunden zu haben.

Bioverfügbarkeit

Durch Vergleich der Flächen unter der Serumspiegel-Zeitkurve (AUC) nach intragastraler und parenteraler Gabe wurde die absolute Bioverfügbarkeit (BV) bestimmt. Sie lag in der Ratte bei 5.9 % der verabreichten Dosis von 250 mg/kg und im Hund bei 2.9 % der 125 mg/kg Dosis. Die Korrektur der BV im Hund wegen der nur 80 %igen Absorption ergab einen effektiven Wert von 3.4 %. Die relative geringen Werte für die BV in beiden Tierarten war vor allem durch die prä-systemische Eliminierung bedingt. Ein „first-liver-pass“-Effekt mit starker Metabolitenbildung wurde nicht beobachtet.

2.4.2 Dermale Penetration, Resorption und Metabolismus

Neben der regulatorischen Funktion in reproduktiven Organen spielen Estrogene auch eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie anderer Gewebe, wie etwa der Haut. Alterung, Pigmentierung, Behaarung und Entstehung von Hautkrebs werden unter anderem durch Estrogene mit beeinflusst (Thornton, 2002). Die durch den Rückgang endogener Estrogen-Spiegel bedingten Symptome der Altershaut bei der Frau wie z.B. Feuchtigkeitsverlust, Kollagenabbau, Dickenverlust der Dermis etc. lassen sich wirksam durch dermale Applikation von Estrogenen behandeln. Phytoestrogenen werden zunehmend von der Kosmetik-Industrie (Novadiol[®], Vichy) als „anti-ageing“ Produkte in der Behandlung der Altershaut eingesetzt. *In vitro* Studien mit 8-PN an dermalen Fibroblasten zeigten einen deutlich induzierenden Einfluss auf die Synthese von Prokollagen-I und Decorin, während die Sekretion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) unterdrückt wurde (Donovan et al., 2002). Der positive Effekt von 8-PN auf Prokollagen-I und Decorin war hierbei im direkten Vergleich zu eingesetzten Estradiol-Konzentrationen sogar deutlich höher, als dies allein durch die estrogenische Wirkung hervorgerufen sein konnte. *In vivo* Studien bzw. klinische Untersuchungen von 8-PN auf die Altershaut wurden bislang nicht veröffentlicht.

Im Hinblick auf eine mögliche dermale Anwendung von 8-PN sowie als Teil von Anforderungen zur Arbeitssicherheit bei Produktion wurde im Rahmen der pharmakokinetischen Untersuchungen Studien zur dermalen Penetration und transdermalen Resorption an Haut von haarlosen Mäusen durchgeführt. Ziel war es, verschiedene experimentelle Formulierungen zu testen und Daten über die Metabolisierung und Verteilung von 8-PN im Modell der Mauhaut zu gewinnen.

2.4.2.1 Franz-Kammer Modell

Für die Studien wurde das Franz-Kammer Modell eingesetzt (Abb. 38). Das explantierte Hautfeld der haarlosen Maus wurde mit dem *Stratum Corneum* nach außen zwischen die Verschlüsse der Kammer gespannt. Mit radioaktivem Tracer verschnittenes 8-PN wurde in verschiedenen Formulierungen und in einer Fläche von 2 cm² auf das Hautfeld aufgetragen. Das in der Diffusions-Kammer konstant nachgeführte Rezeptormedium simulierte den systemischen Abtransport vom Applikationsort, so dass ständig „perfect sink“ Bedingungen für die hindurchtretende Substanz herrschten. Die maximale Löslichkeit von 8-PN in PBS + 0.1 % BSA wurde zuvor mit 10 µg/ml bestimmt. Es wurden 200 mg 8-PN in 70 µl Formulierung

aufgetragen, um möglichst eine „infinite dose“ über einen experimentellen Zeitraum von 30 h sicher zu stellen. Über einen Fraktionssammler und Szintillations-Zähler wurde die Aktivität in den Fraktionen gemessen, woraus dann der transdermale Fluss für die einzelnen Formulierungen errechnet wurde. Ausgewählte Fraktionen wurden zur Untersuchung des Metabolismus einer Radio-HPLC unterzogen.

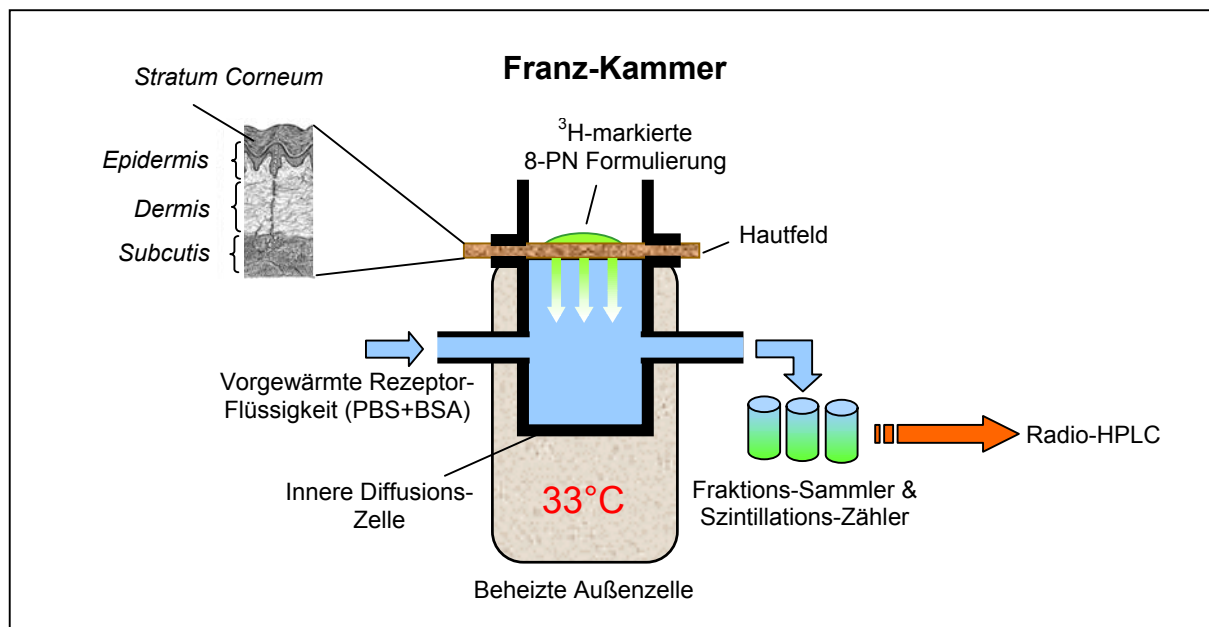


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Franz-Kammer zur Bestimmung der transdermalen Resorption von 8-PN mit verschiedene Formulierungen in der Haut von männlichen haarlosen Mäusen.

Es wurden insgesamt fünf verschiedene Experimental-Formulierungen für 8-PN mit der Franz-Kammer getestet. Die Versuche wurden unabhängig voneinander wiederholt, mit je drei Hautfeldern pro Formulierung. Hydrophiles Propylenglykol (PG) und lipophiles Isopropylmyristat (IPM) wurden jeweils als Monoformulierungen verwendet. Lauroglykol und Transcutol (beide von Fa. Gattefossé, Frankreich) wurden im Verhältnis 8:2 zu einer amphiphilen Formulierung gemischt. Auf der Basis von Propylenglykol wurden zwei Formulierungen mit Penetrationsverstärkern hergestellt, indem 10 % (v/w) Laurinsäure (LS) bzw. 10 % (v/v) Laurylalkohol (LA) beigemischt wurden. Über 10 h nach Applikation wurden zunächst 2 h-Fraktionen gesammelt, ab 10 h post-Applikation 4 h-Fraktionen. Über die gemessene Gesamtaktivität wurden der transdermale Fluss von 8-PN durch die Haut in das Rezeptormedium für den Zeitraum 0-30 h errechnet. Das Ergebnis der gemessenen Flüsse in Abb. 39 dargestellt.

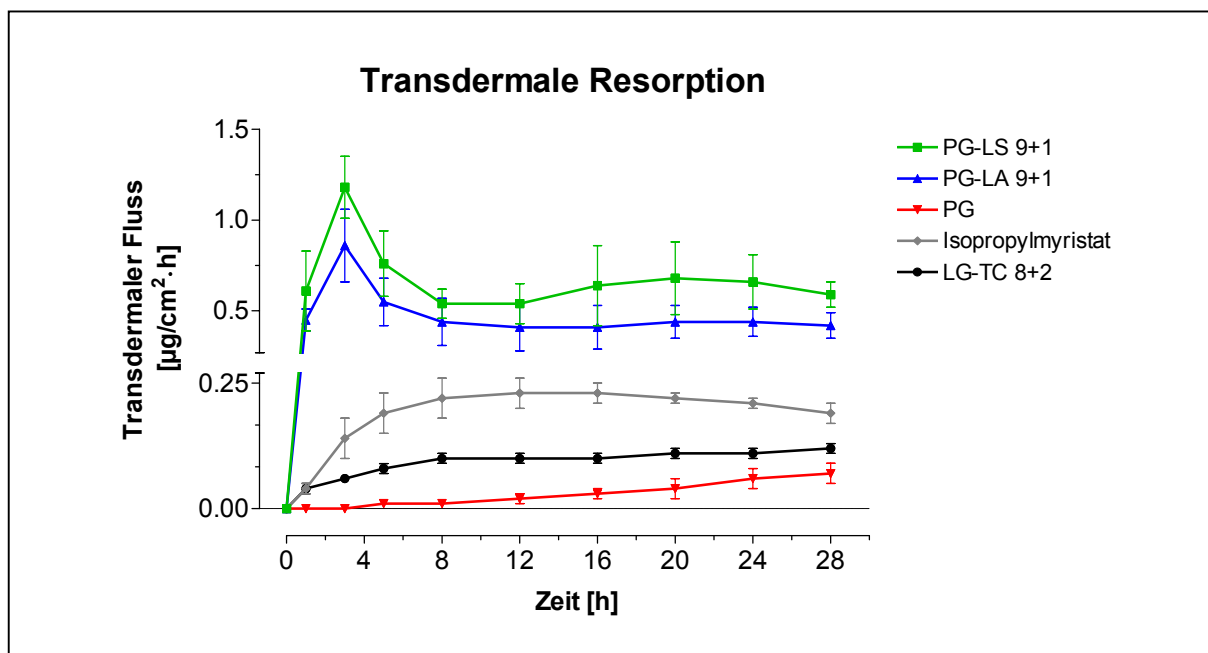


Abbildung 39: Transdermale Flüsse von 8-PN durch Haut von der haarlosen Maus mit verschiedenen Formulierungen über 30 h nach Applikation. Errechnet durch gemessene Gesamtaktivität von $^3\text{H}_2$ -8-PN in den Fraktionen. PG = Propylenglykol, LG = Laurglykol, TC = Transcutol, LA = Laurylalkohol, LS = Laurinsäure.

Die Art der Formulierung hatte erheblichen Einfluss auf die Resorption durch die Haut. Propylenglykol als einzelnes Vehikel bewirkte bis ca. 20 h nach Applikation fast keinen Durchtritt von 8-PN durch die Haut in das Rezeptormedium. Die amphiphile Formulierung aus Laurglykol und Transcutol zeigte nach einer in diesem Modell typischen "lag-time" von 8 h einen schwachen aber immerhin konstanten Fluss von ca. $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$. Isopropylmyristat als lipophiles Vehikel bewirkte den höchsten Fluss von den einfachen Formulierungen ($0.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$). Die Beimischung von 10 % der Penetrationsverstärker Laurylalkohol bzw. Laurinsäure zu Propylenglykol als Basis-Formulierung hatte einen sehr starken Effekt auf die transdermale Resorption, wobei sich die Effekte beider Substanzen auf die absoluten Flüsse nur wenig voneinander unterschieden (0.45 bzw. $0.65 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$). Der Kurvenlauf dieser Formulierungen wies auf zwei überlagerte Effekte hin. In der Zeit bis 6 h nach Applikation wurde 8-PN durch die rasche Diffusion von LA und LS ins Rezeptormedium „mitgerissen“, was durch den steilen Anstieg zu Beginn gekennzeichnet ist. In der Folgezeit nahm dieser Effekt deutlich ab und der, wie bei IPM und LG-TC beobachtete, passive Transport von 8-PN bestimmte maßgeblich den gemessenen Fluss. Dieser war jedoch deutlich erhöht, da das *Stratum Corneum* seine Barrierefunktion verloren hatte. Die applizierte Menge pro Hautfeld war ausrei-

chend für die angestrebten „infinite dose“ Bedingungen, da ein gleichmäßig hoher Stofftransport bis 30 h post-Applikation zu beobachten war.

Die wesentliche Barriere beim transdermalen Substanz-Transport stellt das *Stratum Corneum* dar, das als obere Begrenzung der Haut aus 20-100 Schichten abgestorbener Keratocyten gebildet wird. Der Aufbau des *Stratum Corneum* wird mit dem „brick and mortar“ Modell anschaulich beschrieben (Elias, 1981). Die große Menge an langkettigen Lipiden („mortar“) und den darin eingelagerten Eiweißen („bricks“) macht es zu einem wirksamen Schutz gegenüber Oberflächenpenetration. Laurinsäure und -alkohol lagern sich in die soliden Lipidschichten ein und brechen die quasi-kristallinen Strukturen auf. Diese reversible „Verflüssigung“ der *Corneum*-Lipide ermöglicht den Durchtritt von weniger lipophilen Substanzen durch das *Stratum Corneum*. Nach Beendigung des Versuchs wurde eine Verteilung und Massebilanz für 8-PN nach 30 h auf Grundlage der messbaren Aktivität erstellt (Abb. 40). Dazu wurden die Hautfelder entnommen und die überschüssige Formulierung mit Wattestäbchen entfernt. Das *Stratum Corneum* wurde durch mehrfaches Abziehen mit Tesa-Film von der Hautoberseite abgelöst. Die Resthaut wurde fein zerschnitten. Nach Extraktion in Essigester wurde von allen Fraktionen Aliquote im Szintillator-Zähler vermessen.

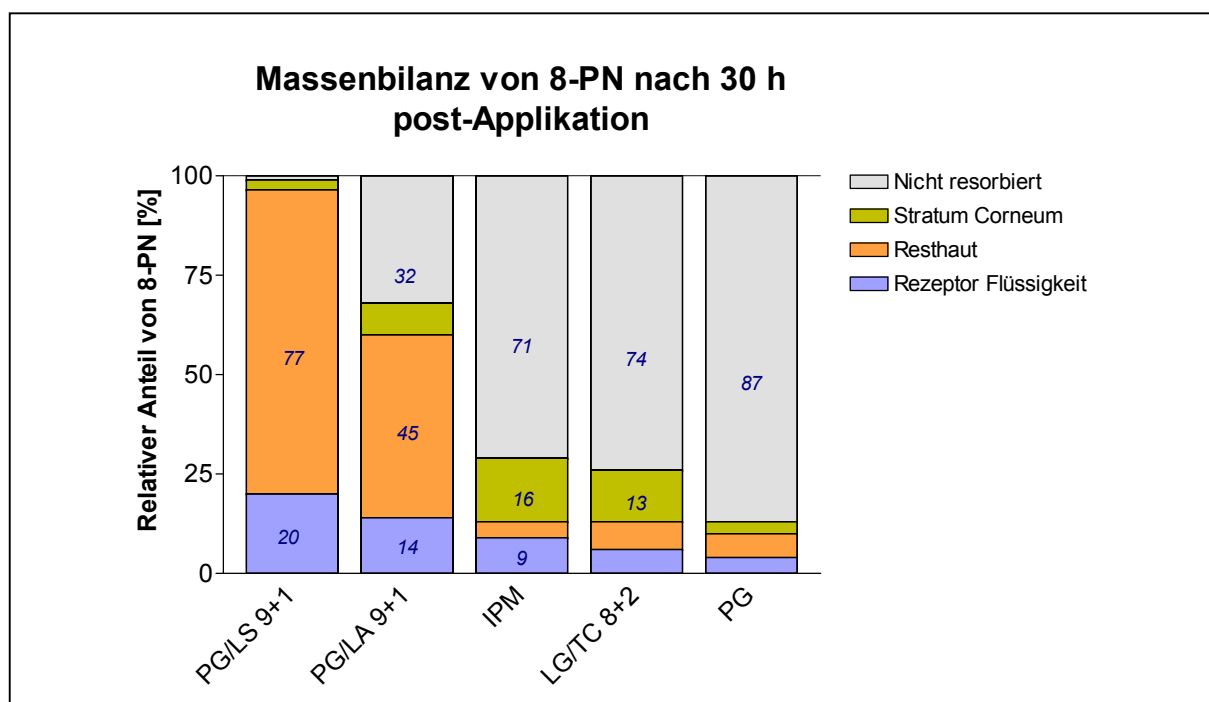


Abbildung 40: Relative Massenbilanz von 8-PN nach 30 h post-Applikation auf Grundlage der gemessenen ³H-Aktivität mit verschiedenen Formulierungen. Die absolute Wiederfindung lag zwischen 75-95 %.

Obwohl die beobachteten Flüsse der Formulierungen mit Penetrationsverstärkern LS und LA hoch waren, wurde mit 77 % (LS) bzw. 45 % (LA) der Hauptteil an 8-PN nach 30 h in der Resthaut und nicht im Rezeptormedium gefunden. Die Kombination von Propylenglykol und Penetrationsverstärker war eine geeignete Formulierung, um 8-PN in die Haut zu bringen, ohne große Mengen der systemischen Seite (Rezeptormedium) zuzuführen. Laurinsäure ergab gegenüber Laurylalkohol wegen besserer Penetration durch das *Stratum Corneum* höhere Konzentrationen in der Haut. Diese experimentelle Formulierung erschien im Maushaut-Modell als fast idealer Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Formulierung für den Einsatz in der Altershaut am Menschen. Die übrigen drei Formulierungen wurden nur sehr schlecht resorbiert, was sich durch den hohen Massenanteil (71-87 %) auf der Oberfläche ausdrückte und bereits anhand der geringen Flüsse erwartet wurde.

2.4.2.2 Metabolismus & Radio-HPLC

Für die Bestimmung der transdermalen Flüsse und die Massenbilanz von 8-PN nach Applikation wurde der Übersicht halber die jeweilige Gesamtaktivität zu Grunde gelegt. Die Bildung ebenfalls radioaktiver Metabolite blieb hierin unberücksichtigt. Die Haut metabolisiert jedoch Xenobiotika in beträchtlichem Umfang vor allem über das Cytochrom P-450 Enzym-System in Phase-I-Reaktionen (Kao and Carver, 1990). Der Metabolismus der explantierten Haut sollte unter den Bedingungen der Franz-Kammer für ca. 10 h funktionsfähig bleiben, bevor die Zellen anfangen abzusterben. Für die Analyse der zu erwartenden Metaboliten wurde eine Radio-HPLC Methode entwickelt, mit der eine Peak-Quantifizierung möglich war. Eine genaue Analyse der Metabolite wurde nicht vorgenommen.

In Abb. 41-43 sind für drei Zeitpunkte die Radio-Chromatogramme des Rezeptormediums der Formulierung mit dem höchsten Fluss (PG-LS 9+1) dargestellt. Abb. 44 und 45 zeigen die Stabilität des Tracers in der Formulierung nach 8 Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. den EA-Extrakt des Resthaut 30 h post-Applikation. Die Retentionszeiten und Peak-Verhältnisse waren repräsentativ und entsprachen in etwa denen der übrigen Formulierungen, so dass ein Formulierungseffekt auf Stabilität und Metabolisierung vernachlässigt werden konnte. Die Peaks wurden nach ihrer Retentionszeit in drei Gruppen plus Substanz-Peak eingeteilt. Gruppe 1: 2.6-2.9 min; Gruppe 2: 11.8-12.8 min; Gruppe 3: 14.9-16.1 min; $[^3\text{H}]_2\text{-8-PN}$: 18.1-18.4 min.

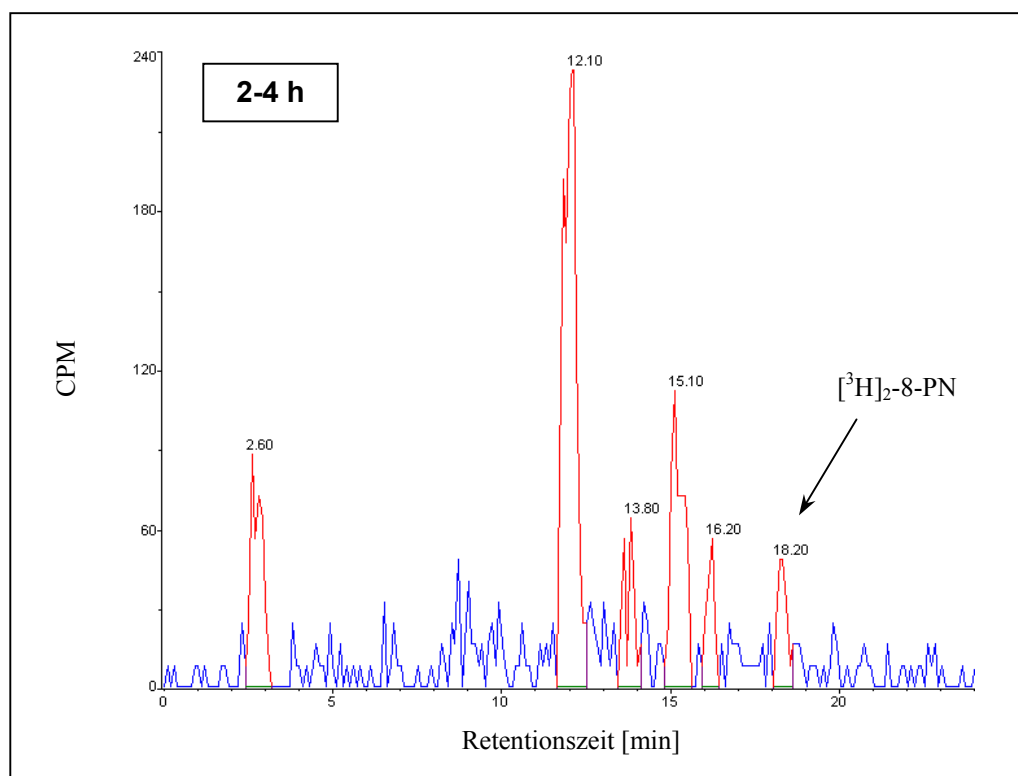


Abbildung 41: Radio-Chromatogramm vom Rezeptormedium der Fraktion 2-4 h post-Applikation. Formulierung für 8-PN: PG-LS 9+1 (v/w); Injektionsvolumen 20 μl .

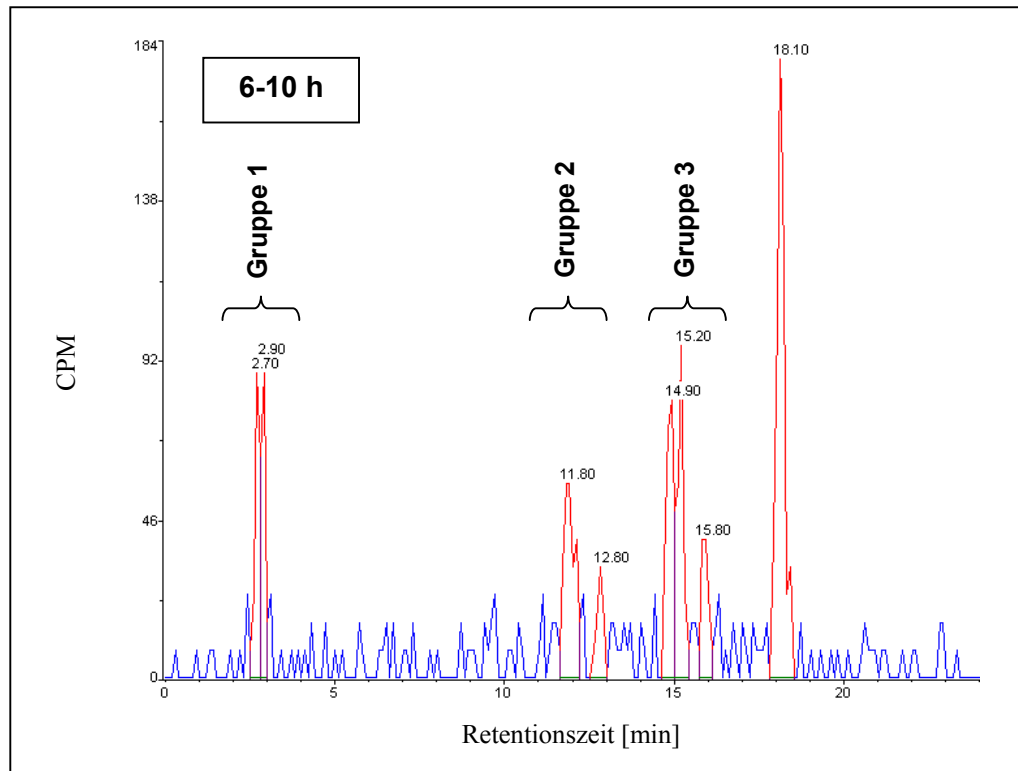


Abbildung 42: Radio-Chromatogramm vom Rezeptormedium der Fraktion 6-10 h post-Applikation. Formulierung für 8-PN: PG-LS 9+1 (v/w); Injektionsvolumen 20 μl .

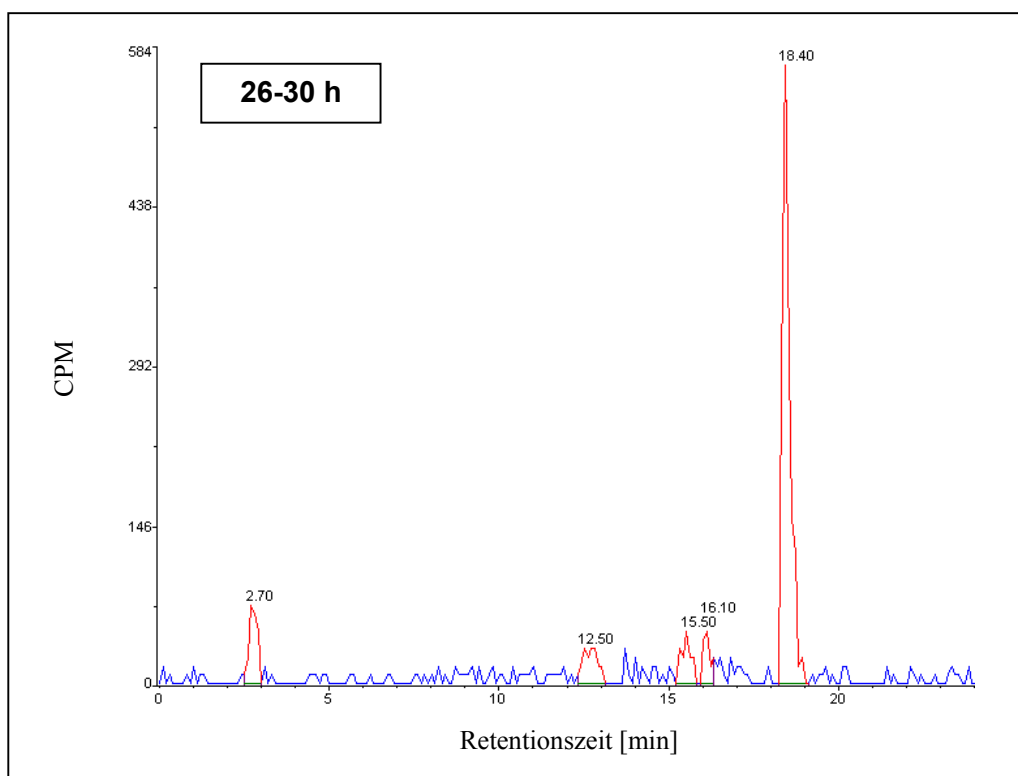


Abbildung 43: Radio-Chromatogramm vom Rezeptormedium der Fraktion 26-30 h post-Applikation. Formulierung für 8-PN: PG-LS 9+1 (v/w); Injektionsvolumen 100 μ l.

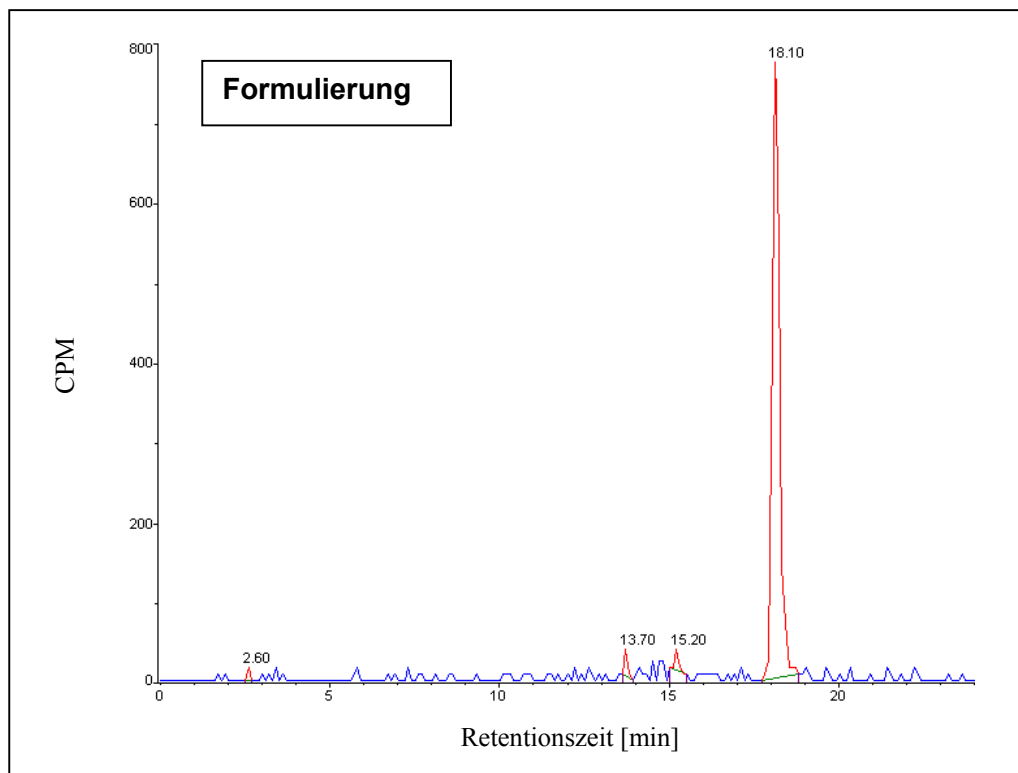


Abbildung 44: Radio-Chromatogramm der Formulierung für 8-PN PG-LS 9+1 (v/w) nach 8-wöchiger Lagerung bei -20 °C; Injektionsvolumen 20 μ l (verdünnt).

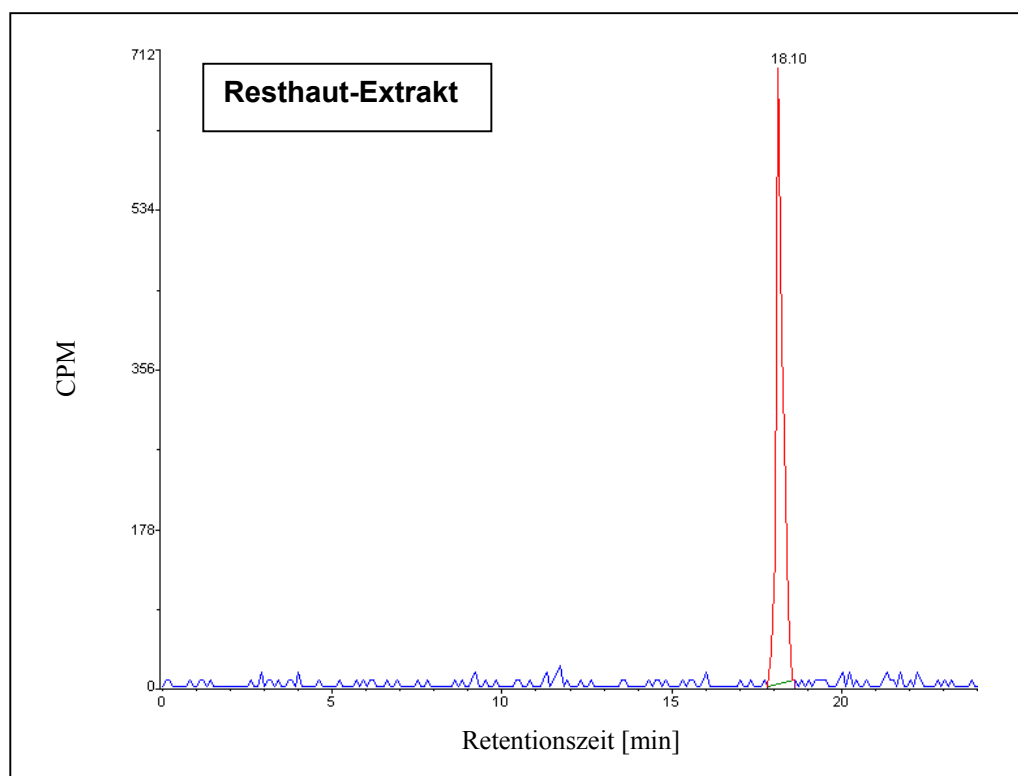


Abbildung 45: Radio-Chromatogramm vom Resthaut-Extrakt (Ethylacetat) 30 h post-Applikation. Formulierung für 8-PN: PG-LS 9+1 (v/w); Injektionsvolumen 10 μ l.

Die Radio-Chromatogramme der Rezeptorflüssigkeit zeigten vor allem zu Beginn der Fraktionssammlung deutliche Metabolitenbildung, wobei unverändertes 8-PN mit ca. 15 % nur geringfügig zur Gesamtaktivität beitrug. Drei wesentliche Peak-Gruppen wurden identifiziert, die alle deutlich polarer waren als 8-PN, da sie unter Reversed-Phase-Bedingungen vor dem Tracer eluierten. Dies ist typisch für hydrophile Phase-I-Metaboliten, die durch Oxidation und/oder Hydroxylierung entstehen. Enzymatische Konjugatsspaltung hatte keinen Einfluss auf das Metabolitenmuster. Gegen Ende der Applikation verringerte sich der Anteil an Metaboliten zu Gunsten von unverändertem Wirkstoffes, der nach 26-30 h ca. 70 % der Gesamtaktivität ausmachte. Das Radio-Chromatogramm des Ethylacetat-Extraktes aus zerkleinerter Resthaut nach 30 h zeigte ausschließlich 8-PN als aktiven Bestandteil. Die Stabilität von 8-PN war durch die Mischformulierung aus Propylenglykol und Laurinsäure (9+1) auch nach acht Wochen Lagerung nicht messbar beeinträchtigt.

Der relative Metabolitenverlauf der drei Peak-Gruppen und des Wirkstoffs im Rezeptormedium gegen die Zeit ist in Abb. 46 dargestellt.

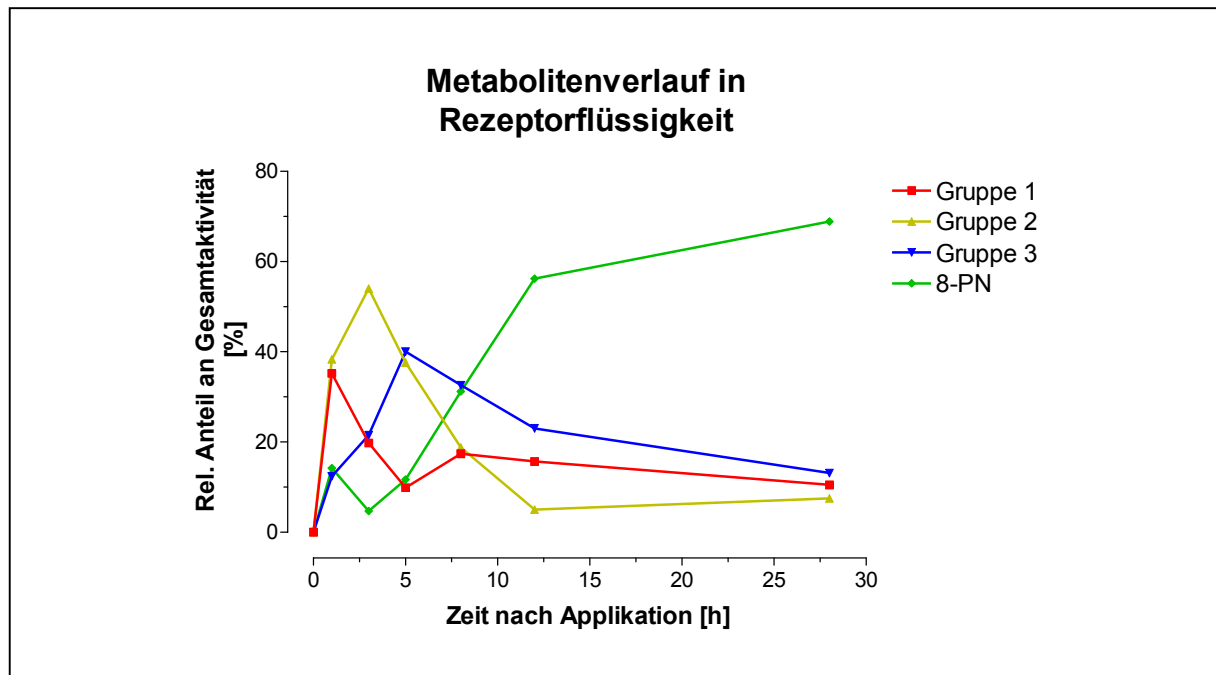


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf von Metabolitengruppen und 8-PN im Rezeptormedium nach Applikation in PG-LS 9+1 (v/w), gemessen über die relative Radioaktivität.

Der Anteil der Metaboliten war in den ersten sieben Stunden nach Applikation sehr hoch und fiel fortan kontinuierlich ab. Mit 40 % für Gruppe 1 nach 1 h erreichte die sehr hydrophilen Metaboliten ihren höchsten Anteil. Die etwas schwächer hydrophilen Metabolite der Peak-Gruppen 2 und 3 hatten mit 55 % nach 3 h bzw. 40 % nach 5 h ihren maximalen Anteil an der Gesamtaktivität. Diese beiden Metabolitengruppen ließen sich wie 8-PN mit Ether aus dem Rezeptormedium extrahieren, während Gruppe 1 in der wässrigen Phase verblieb. Ab 8 h überwog mit 32 % unverändertes 8-PN, das nach 29 h post-Applikation 70 % der Radioaktivität ausmachte, während es für die drei Peak-Gruppen jeweils ca. 10 % waren.

2.5 Assay-Entwicklung

2.5.1 Immunisierung, Antiserumgewinnung & ELISA

Die unter 2.1.2 hergestellten Hapten-Derivate wurden von der Fa. Biogenes zur Gewinnung von Antiseren gegen 8-PN aus Kaninchen eingesetzt. Dazu wurden diese an kationisiertes, bovines Serumalbumin (cBSA) gekoppelt und gelöst mit Adjuvants (Fa. Biogenes) jeweils zwei Tieren intramuskulär injiziert. Analog dem Immunisierungsplan (4.4.3.2) wurden die Kaninchen in regelmäßigen Abständen geboostert und Serumproben zur Titerbestimmung entnommen. Serumverdünnungen wurde dazu per kompetitivem ELISA gegen Konjugate aus Ovalbumin (OVA) und den jeweiligen Hapten-Derivaten vermessen (Abb. 47).

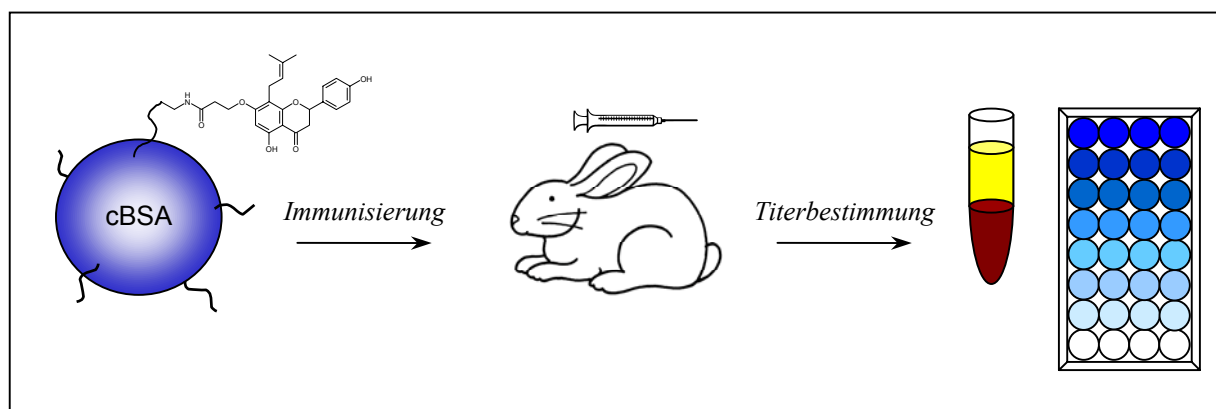


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Gewinnung von Antiseren gegen 8-PN aus Kaninchen. An kationisiertes Rinderserumalbumin (cBSA) gekoppelte Hapten-Derivate des 8-PN wurden für die Immunisierung eingesetzt. Bestimmung der Antikörpertiter im Serum wurde mit Ovalbumin-Hapten-Konjugaten per ELISA durchgeführt.

Das Prinzip des kompetitiven ELISA ist schematisch in Abb. 48 dargestellt. Für den RIA wurde analog vorgegangen und anstelle des Peroxidase (POD)-Hapten-Konjugates wurde als Kompetitor der radioaktive 8-PN-Tracer eingesetzt. Die Messung erfolgte entsprechend am Szintillationszähler.

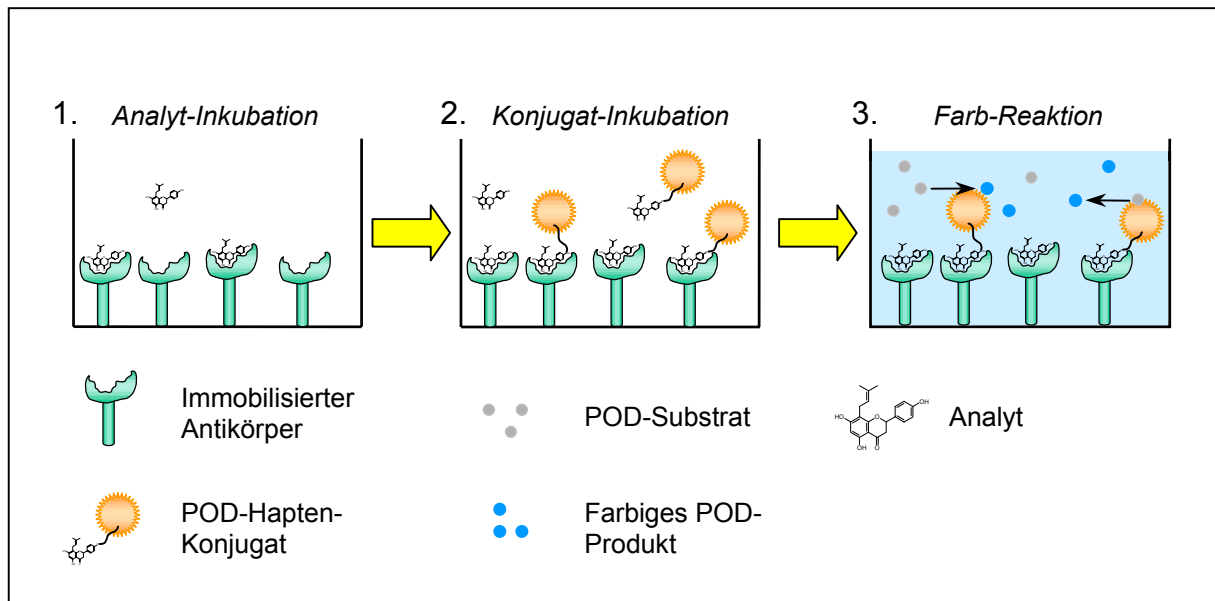


Abbildung 48: Schematische Darstellung des kompetitiven ELISA für 8-PN. 1: mit spezifischem Antiserum beschichtete Mikrotiter-wells werden mit der Probe des Analyten zunächst vorinkubiert. 2: durch anschließende Inkubation mit dem POD-Hapten-Konjugat binden diese kompetitiv an freie Antikörper. 3: nach Waschen erfolgt die Farbreaktion durch Zugabe von POD-Substrat. Die optische Dichte wird photometrisch bestimmt.

Der zeitliche Verlauf der Serومتiter der Tiere wurde für alle eingesetzten cBSA-Konjugate verfolgt (Abb. 49). Dabei wurde deutlich, dass die Länge des Linkers zwischen 8-PN und cBSA erheblichen Einfluss auf die Titerentwicklung hatte. Bei den relativ kurzen, C₃-verbrückten Konjugaten war ein deutlicher Anteil spezifischer Antikörper im Serum bereits nach den ersten drei Boosterungen (1. Blutentnahme) festzustellen. Die nachfolgenden Boosts brachten nur eine leichte Erhöhung der Serومتiter gemessen im ELISA mit den entsprechenden OVA-Konjugaten, führten jedoch zu einer deutlichen Verbesserung des Serums hinsichtlich Spezifität und Sensitivität gegenüber 8-PN.

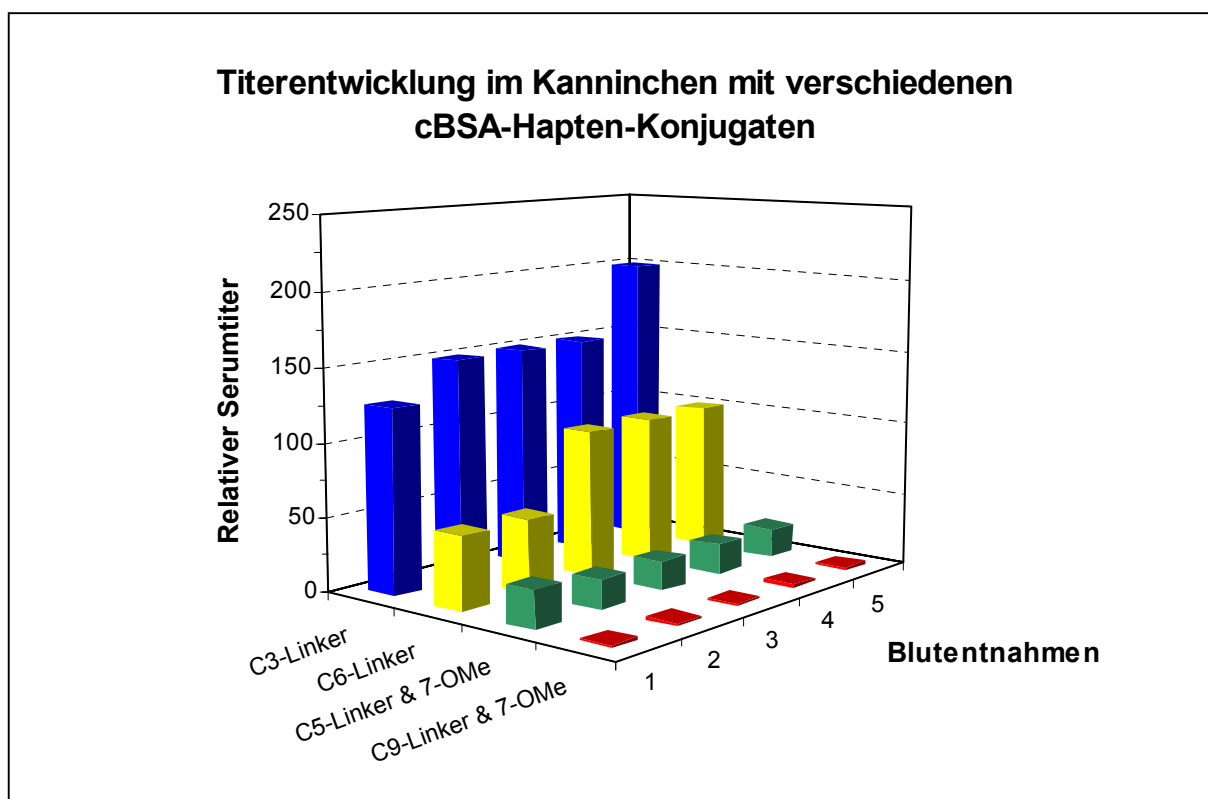


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf des mittleren, relativen Serumentiters für verschiedene cBSA-Hapten-Konjugate nach Immunisierung im Kaninchen. Mittelwerte aus jeweils zwei Tieren und eingesetztem Konjugat. C₃-Linker: Haptene **11** u. **12**; C₆-Linker: **9** u. **10**; C₅-Linker **17**; C₉-Linker: **15**.

Die Konjugate mit den längeren C₆-Linkern waren bereits deutlich weniger immunogen als die mit um drei Kohlenstoffatome kürzeren Linkern. Es wurden keine vergleichbaren Serumentiter über die gesamte Dauer der Immunisierung erhalten und die Spezifitätsreifung der Seren gegenüber 8-PN war weniger ausgeprägt. Die Methylierung der 7-OH Gruppe in den 4'-OH-verbrückten Konjugaten führte zu einem starken Verlust an Immunogenität und keiner Erhöhung der Serumentiter über die gesamte Behandlung. Die Kombination C₉-Linker und 7-Methoxygruppe brachte fast keine Immunantwort im Kaninchen. Der Hauptgrund für die abnehmende Antikörperbildung im Tier mit steigender Linkerlänge und *O*-Methylierung lag sehr wahrscheinlich an der erhöhten Hydrophobie dieser Konjugate, die einerseits die Verfügbarkeit im Kaninchen wesentlich beeinträchtigte und zudem die immunogenen polaren Epitope im Molekül verringerte.

Abb. 50 zeigt beispielhaft einen ELISA für 8-PN mit Antiseren von zwei Kaninchen, die mit dem verbesserten C₃-Hapten **25** / OS-130 (2.1.2) immunisiert wurden. Trotz identi-

scher Titer zeigte das Serum von Tier 4560 eine leicht höhere Spezifität für 8-PN als das Tier 4561, welches der gleichen Immunisierung unterzogen wurde.

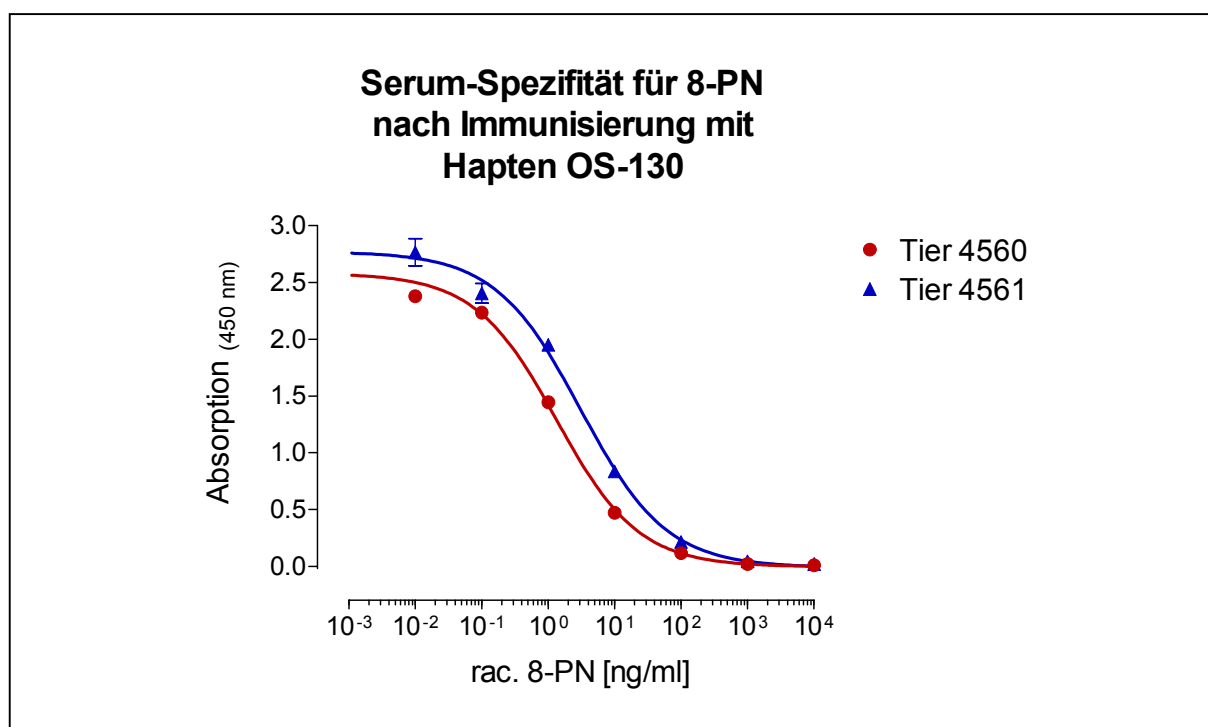


Abbildung 50: Kompetitiver ELISA für racemisches 8-PN mit zwei verschiedenen Antisera aus Kaninchen, die jeweils mit dem gleichen cBSA-Hapten-Konjugat immunisiert wurden. Tier 4560 zeigte eine gegenüber Tier 4561 verbesserte Affinität gegen den Analyten bei gleichen Serumtiter.

Der lineare Messbereich für 8-PN lag in diesen Beispielen zwischen 0.1-10 ng/ml (Tier 4560) bzw. 0.5-50 ng/ml (Tier 4561).

Die Fa. Biogenes hat aus den gewonnenen Antisera drei ELISA-Kits für 8-PN bereitgestellt. Dazu wurden über Chromatographie an Protein-A-Sepharose das Gesamt-IgG der Tiere isoliert, die mit den Haptenen **11** (-) und **12** (+) sowie **25** (rac.) immunisiert worden waren. 96-well Platten wurden mit der jeweiligen IgG-Fraktion beschichtet und die entsprechenden ELISA-Tracer über Kopplung der Haptene an Peroxidase (POD) hergestellt. Zusätzlich wurden die Gesamt-IgG-Fractionen für die Messung über einen RIA aliquotiert und lyophilisiert.

2.5.2 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung von 8-PN via ELISA/RIA aus biologischem Material (Urin, Serum, Plasma, Hopfen, Bier etc.) sollte ein geeignetes Protokoll für die Probenvorbereitung erarbeitet werden, um 8-PN aus den komplexen biologischen Matrices zu isolieren. Je 1 ml Humanserum wurde zunächst in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit 8-PN dotiert und anschließend drei verschiedenen Vorbereitungen unterzogen. 0.5 ml Serum wurde zum einen mit 0.5 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit 4 ml Diethylether extrahiert. Der Ether-Extrakt wurde nach Abdampfen im Stickstoffstrom in Puffer aufgenommen und im ELISA vermessen. Parallel dazu wurde das Serum über zwei verschiedene RP-Probensäulen (Bond Elute Certify I und II) vorbereitet. Das Serum wurde unverdünnt auf die konditionierten RP-Säulen gegeben, die stationäre Phase zweimal mit AcN/H₂O 1:2 gewaschen und anschließend mit AcN/H₂O 2:1 eluiert. Das eingedampfte Eluat wurde ebenfalls in Puffer gelöst und im ELISA der 8-PN-Gehalt bestimmt. Es wurde hierzu das gegen das Racemat von 8-PN gerichtete Antiserum von Tier 4560 verwendet. Abb. 51 zeigt den Matrix-Effekt durch Humanserum für alle drei Probenvorbereitungen.

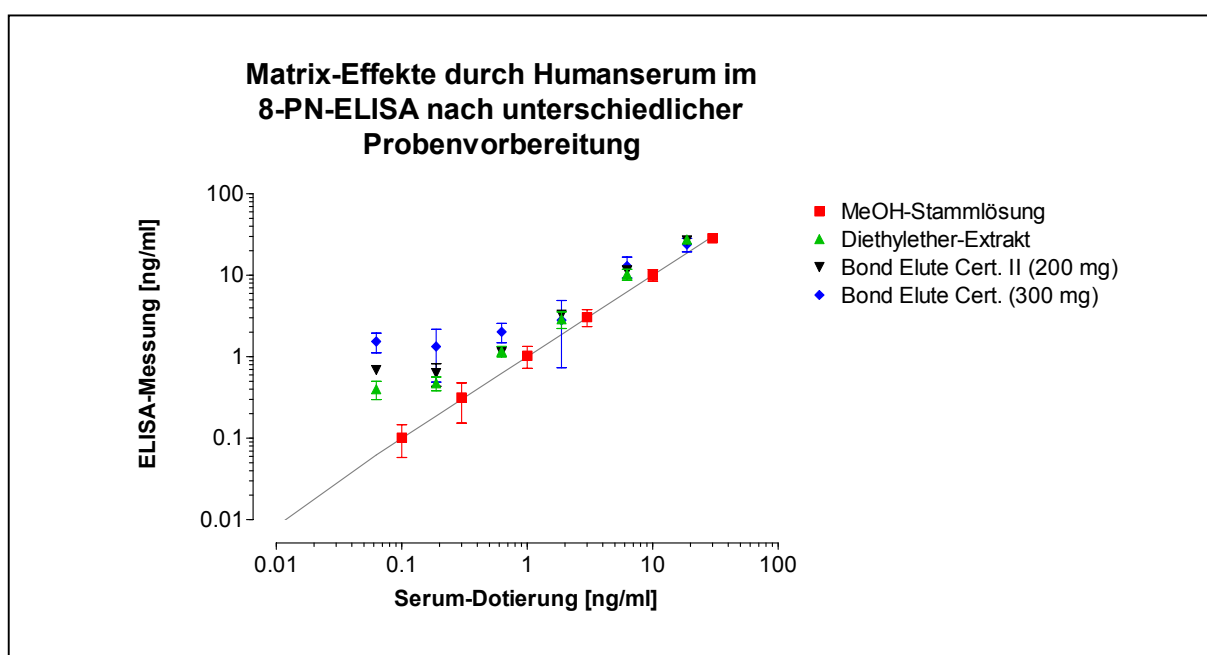


Abbildung 51: Matrixeffekt bei der ELISA-Messung von 8-PN in Humanserum in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung via Diethylether-Extraktion sowie RP-Säulenreinigung. Als Standard wurde die zum Dotieren verwendete, methanolische Stammlösung von 8-PN vermessen. Das Antiserum gegen rac. 8-PN stammte von Tier 4560.

In allen Probenvorbereitungen wurde mindestens die eingesetzte Menge an 8-PN gefunden. Im Bereich von unter 1 ng/ml an 8-PN im Serum zeigte sich eine erkennbare Abweichung der Messung zu höheren Werten als die der Dotierung, was auf den Matrixeffekt des Serum zurückzuführen war. Die Ether-Extraktion aus Serum konnte diesen Fehler gegenüber den Säulen deutlich geringer halten. Die schlechteste Abtrennung von kreuzreagierenden Matrixbestandteilen wurde mit der Bond Elute Certify (200 mg) erreicht.

Für Serum, Urin Plasma und Bierproben wurde die Diethylether-Extraktion als Methode der Probenvorbereitung eingesetzt. Die effektive Messgrenze des ELISA für 8-PN bei dieser Art der Vorbereitung lag bei >1 ng/ml, die des RIA bei >0.1 ng/ml.

2.5.3 Antiserum-Spezifität

2.5.3.1 HPLC-Fraktionierung von Pool-Serum

Die gute Sensitivität des Antiserums von Tier 4560 für die Bestimmung von 8-PN wurde durch die niedrige effektive Messgrenze im ELISA und RIA nach Diethylether-Extraktion gezeigt (s.o). Um Aussagen zur Spezifität treffen zu können, wurden Serumproben aus der Tierkinetikstudie an der Ratte (2.4.1.1) mittels HPLC fraktioniert. Potentiell kreuzreagierende Metaboliten konnten so vom Zielanalyten 8-PN getrennt und die gesammelten Fraktionen einzeln per ELISA vermessen werden.

0.5 ml der 24 h AUC-Poolseren von Ratten nach s.c.-Behandlung mit 30 mg/kg 8-PN und 1.5 ml der 24 h AUC-Poolseren nach i.g.-Gabe von 250 mg/kg 8-PN wurden mit Ether extrahiert, die abgedampften Extrakte in 100 μ l Methanol aufgenommen. Zusätzlich wurden Extrakte von Kontrollserum und mit 50 μ g/ml 8-PN dotiertem Serum hergestellt. Bis zu 20 μ l der methanolischen Lösungen wurden in die HPLC-Anlage injiziert. Über einen Fraktionensammler wurden insgesamt bis zu 40 Fraktionen zu je einer Minute gesammelt, abgedampft und Aliquots per ELISA auf Aktivität vermessen. Die Chromatogramme der Serum-Extrakte sind in Abb. 52 sowie die dazugehörigen ELISA-Auswertungen in Abb. 53 dargestellt.

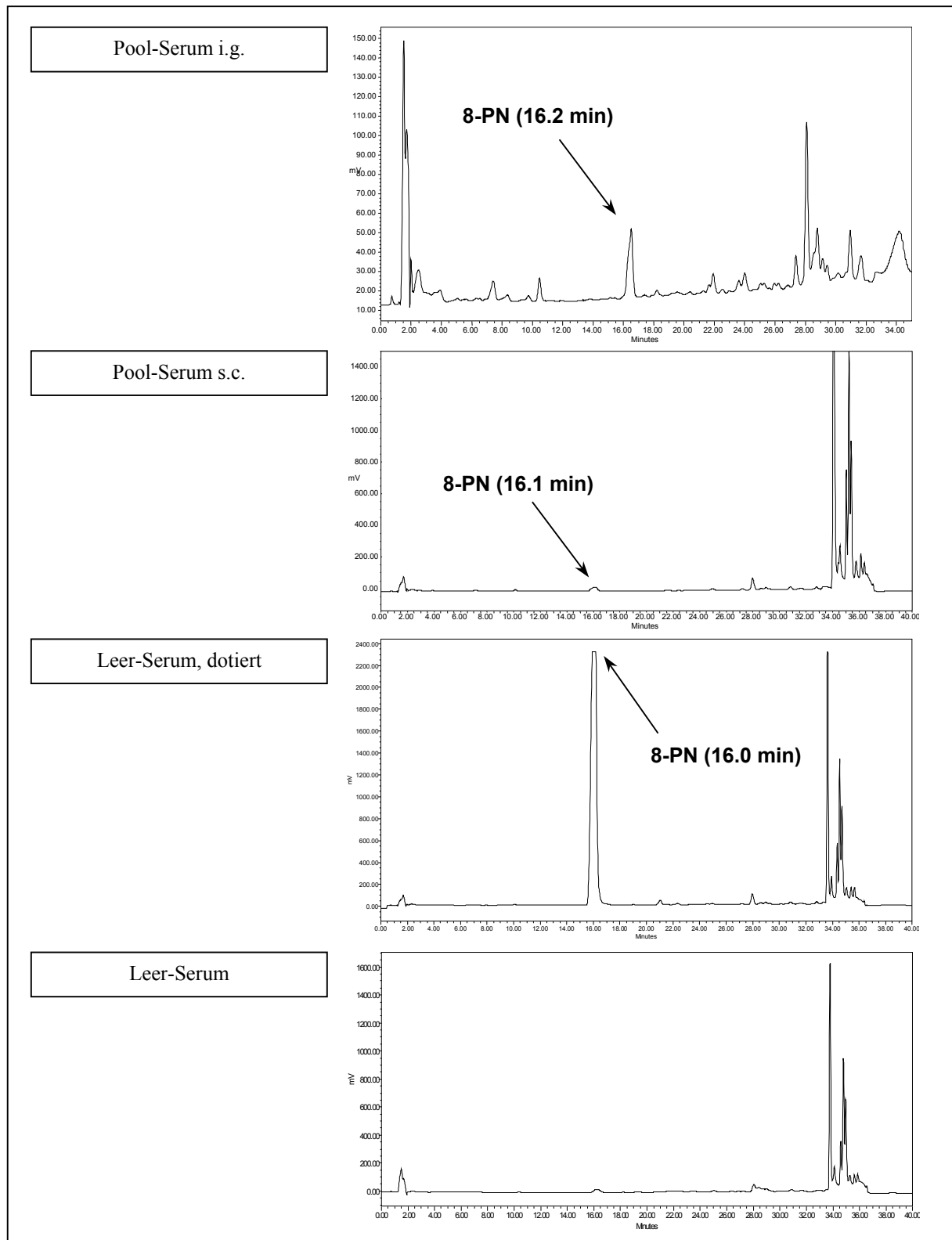


Abbildung 52: HPLC-Chromatogramme von Serum-Extrakten aus AUC_{24h}-Poolseren von weiblichen Wistar-Ratten aus der Studie 2.4.1.1 (s.c.-Applikation von 30 mg/kg 8-PN bzw. i.g.-Applikation von 250 mg/kg 8-PN) sowie Leerserum mit und ohne Zusatz von 50 µg/ml 8-PN. Detektion: UV-DAD (210 nm).

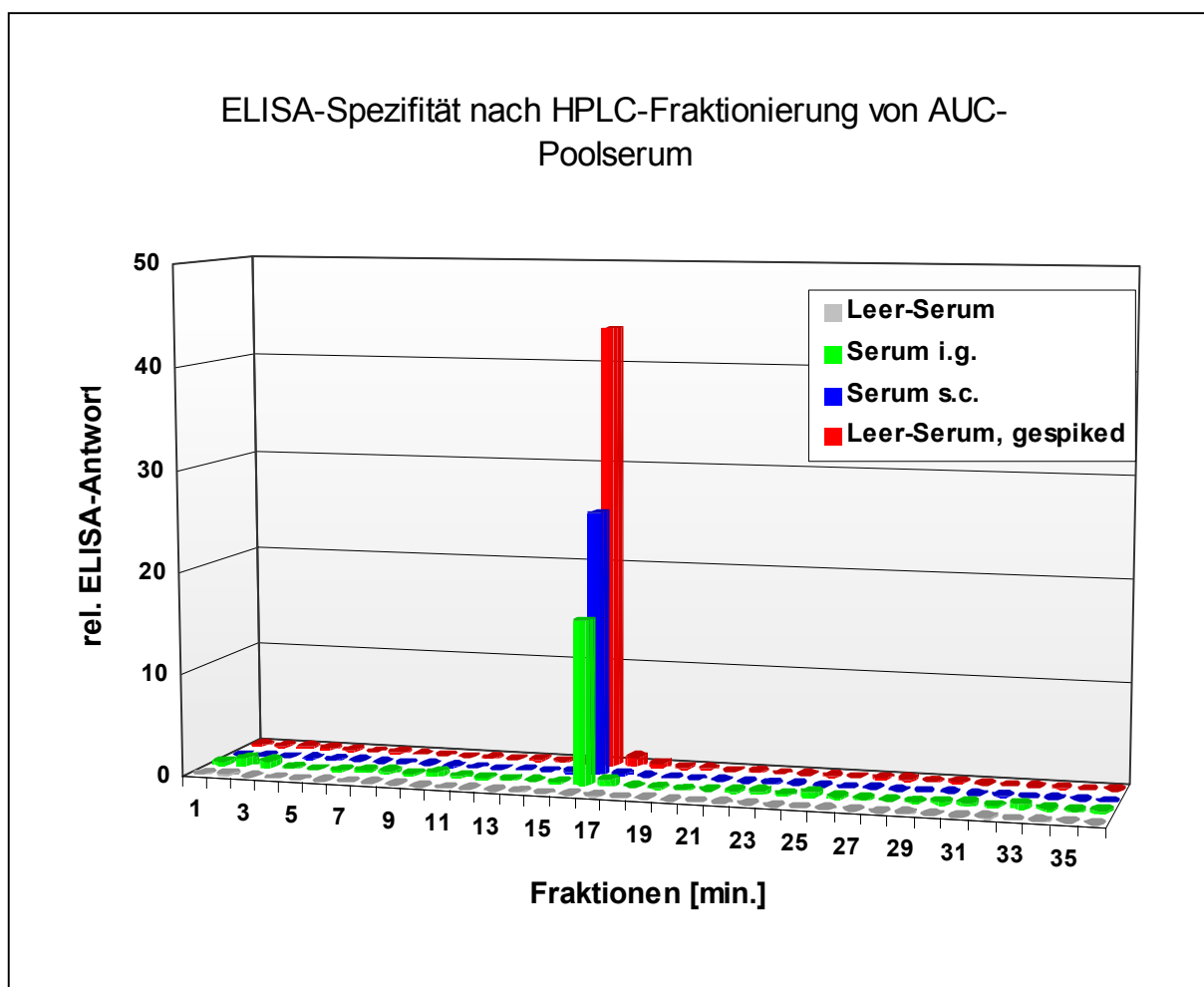


Abbildung 53: ELISA der HPLC-Fractionen (jeweils 1 min) von Serum-Extrakten aus AUC_{24h}-Poolseren von weiblichen Wistar-Ratten sowie Leerserum mit und ohne Zusatz von 8-PN. Vom dotierten Serum wurde ein verdünntes Aliquot eingesetzt. Antiserum gegen racemisches 8-PN (Tier 4560).

Die HPLC-Chromatogramme der AUC_{24h}-Pool-Seren zeigen ein leicht durch Serumbestandteile überlagertes UV-Signal von 8-PN nach einer konstanten Retentionszeit von 16 min. Die gleiche Retentionszeit wurde für das dotierte Kontrollserum gefunden. Wesentliche UV-detectierbare Verunreinigungen zeigten sich, neben dem üblichen Injektions-Peak, erst am Ende der jeweiligen HPLC-Läufe, was unter Reversed-Phase-Bedingungen auf stark hydrophobe Substanzen schließen lässt. Hydrophile Metabolite des 8-PN sollten wenn dann vor dem 8-PN Peak eluieren und ebenfalls mittels UV erkennbar werden.. Die Verunreinigungen konnten demnach der Serum-Matrix zugeordnet werden. Die Extraktion mit Diethylether zeigte sich bereits nach HPLC-Analyse des Extraktes als wirkungsvolle Methode zur Abtrennung von 8-PN von polarerer Metaboliten und hydrophilen Serumbestandteilen.

Im ELISA mit Antiserum gegen racemisches 8-PN (Tier 4560) zeigten die AUC_{24h}-Pool-Seren ein scharfes Signal in der 16 min-Fraktion, was dem 8-PN-Peak aus dem UV-Chromatogrammen entsprach, während alle übrigen Fraktionen keine messbare Aktivität enthielten. Das dotierte Kontrollserum lieferte ebenso nur ein einziges Signal bei 16 min, das Leerserum hingegen keines.

Die Spezifität der Messung von 8-PN in Serum (sowie damit auch analog in Plasma und Urin) mittels der gewonnenen Antiseren ist gegeben. Potentiell kreuzreagierende Metaboliten wurden ebenso wie der Großteil an polaren Matrixbestandteilen effizient durch die Probenvorbereitung entfernt bzw. zeigten keine Kreuzreaktivität. Unpolare Bestandteile der Serum-Matrix zeigten keine Immun-Interaktion im ELISA.

2.5.3.2 Kreuzreaktivitäten mit strukturanalogen Verbindungen aus Hopfen

Hopfenextrakte und z.T. auch Bierproben stellen eine weitaus komplexere Matrix für einen Immuno-Assay gegen 8-PN dar als tierische Proben, weil sie dem 8-PN strukturähnliche Substanzen in verschiedenen großen Mengenverhältnissen enthalten können. Im getrockneten Hopfen beispielsweise ist im Schnitt eine etwa gleiche Menge von 8-PN, des isomeren 6-PN sowie Isoxanthohumol vorhanden. Der Gehalt an Xanthohumol, der biologischen Vorläuferverbindung des 8-PN, ist etwa 200-fach höher. Im Bier wiederum sind im Durchschnitt die Verhältnisse von 6-PN, 8-PN und Xanthohumol zueinander etwa identisch während Isoxanthohumol im Vergleich ca. 20-fach höher liegt (Stevens et al., 1999a; Stevens et al., 1999b).

Tabelle 10 zeigt die prozentualen molaren Kreuzreaktivitäten der drei gewonnenen Antiseren für 2*S*(-)8-PN (Serum A, Hapten **11**, Tier 4052), 2*R*(+)8-PN (Serum B, Hapten **12**, Tier 4055) und das Racemat (Serum C, Hapten **25**, Tier 4561) gegen die Enantiomere von 8-PN sowie gegen 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol.

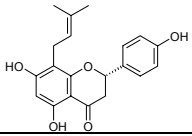
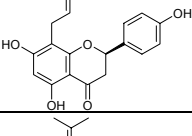
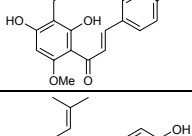
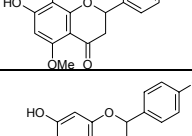
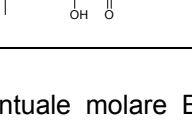
Analyt	Serum-Kreuzreaktivitäten [%]		
	A (Tier 4052)	B (Tier 4055)	C (Tier 4561)
2 <i>S</i> (-) 8-PN 	100	9.1	100
2 <i>R</i> (+) 8-PN 	8.6	100	98
Xanthohumol 	0.6	2.2	0.02
Isoxanthohumol 	84	2.2	0.1
rac. 6-PN 	0.2	4.6	0.2

Tabelle 10: Prozentuale molare ELISA-Kreuzreaktivitäten von drei Antisera aus Kaninchen hergestellt für A: 2*S*(-) 8-PN, B: 2*R*(+) 8-PN und C: racemisches 8-PN gegenüber den strukturverwandten Verbindungen 6-PN (Racemat), Xanthohumol und Isoxanthohumol. Reaktivität gegenüber Zielanalyt entspricht 100 %.

Die beiden „chiralen“ Antisera A und B, die mit jeweils dem optisch reinen Hapten gegen das entsprechende Enantiomer des 8-PN erzeugt wurden, zeigen beide ca. 9 % Kreuzreaktivität gegenüber dem Spiegelisomer. Zudem ist die Kreuzreaktivität für Xanthohumol für Serum A mit 84 % nahezu identisch hoch wie gegen das 2*S*(-)8-PN, den eigentlichen Zielanalyten. Auch Xanthohumol (0.6 bzw. 2.2 %) und 6-PN (0.2 bzw. 4.6 %) werden von beiden Antisera noch in beachtlichem Maße erkannt. Dies ist sofern verständlich, da die entsprechenden Haptene über einen 7-OH-Linker am A-Ring des Moleküls mit cBSA konjugiert wurden. Der determinante Bereich des Moleküls war der phenolische B-Ring am chiralen 2C-Atom. Diese Struktur ist den allen getesteten Verbindungen gemeinsam. Sie unterscheiden sich vornehmlich über die Strukturen am A- und C-Ring. Serum C, welches über die 4'-OH-Gruppe am B-Ring konjugiert war, diskriminiert sehr effektiv 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol (0.2, 0.02 bzw. 0.1 %). Da das racemische Hapten für die Immunisierung verwendet wurde war die Erkennung der Enantiomere des 8-PN nahezu identisch (98 bzw. 100 %).

Gemäß dem gefundenen Kreuzreaktivitäts-Profil waren die polyklonalen Antiseren A und B vor allem für die chirale 8-PN-Analytik im Tier und Mensch mit ELISA/RIA geeignet, da hier die zu erwartenden Matrices und Metaboliten deutlich unterschieden werden können. Eine knapp 10 %ige Kreuzreaktivität gegenüber dem Spiegelisomer musste in Kauf genommen werden. Serum C, welches gegen das Racemat gerichtet war, konnte auf Grund der hohen Spezifität für 8-PN sowohl für die Kinetik als auch in komplexeren Matrices wie Bier und Hopfen eingesetzt werden, vorausgesetzt die Anteile kreuzreagierender Analyten übersteigt die des 8-PN nicht um mehr als 2-3 Größenordnungen. Hiervon war in Anbetracht bekannter Analysedaten nicht auszugehen.

2.5.4 ELISA vs. RIA

Die Bestimmungen von 8-PN im Serum und Urin von Hund und Ratte aus der Pharmakokinetik-Studie (2.4.1) als auch Analysen von Bierproben wurden sowohl per ELISA als auch HPLC-MS/MS (Fa. Pharanalyt) durchgeführt. Die Korrelation der Messdaten aus beiden Methoden lag im Mittel bei 80-200 %. Zudem war die Inter-Assay-Varianz der ELISA unbefriedigend hoch. Diese hohen Streuungen gaben Anlass zu einer Qualitätsprüfung der ELISA mit Hinblick auf die Stabilität der eingesetzten Komponenten. Es zeigte sich, dass sämtliche POD-Hapten-Konjugate rasch degradierten und nur einige Wochen stabil waren. Die maximale optische Dichte der Farbreaktion in den ELISA fiel danach stetig ab und war ein deutlicher Hinweis auf Dekomposition der entsprechenden Enzym-Konjugate. Die mit Antiserum beschichteten Mikrotiter-Platten sowie die übrigen Gebrauchslösungen zeigten hingegen keinen wesentlichen Qualitätsverlust. Das Problem der Instabilität der Konjugate konnte nicht beseitigt werden. Die Auswertung der Kinetikstudien wurde daraufhin mit der HPLC-MS/MS Analytik unternommen.

Um die Problematik der Enzym-Hapten-Konjugate zu umgehen, wurde für die weitere Bioanalytik der RIA eingesetzt. Die lyophilisierten IgG-Fractionen der Antiseren waren ebenso stabil wie der ^3H -Tracer. Potentielle Varianzen bei der Beschichtung von Mikrotiter-wells entfielen zudem. Die Probenvorbereitung war identisch zum ELISA und eine gute Korrelation zwischen RIA und HPLC-MS/MS gegeben. Alle folgenden Studien zur Tier- und Human-Kinetik sowie zur Bier- bzw. Hopfenanalyse, die nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit lagen, wurden von externen Stelle (Fa. CellTrend GmbH) mit den bereitgestellten RIA durchgeführt.

3. DISKUSSION

Die vorgelegten Studien zu 8-PN waren mit dem Ziel geplant worden zu prüfen, ob dieses wirkstärkste Phytoestrogen einige allgemeine sowie spezifische Voraussetzungen für eine volle Arzneimittelentwicklung für den Bereich der HRT erfüllen könnte. Zu diesen Voraussetzungen gehören unter anderem:

- I.** Herstellung der Substanz mit einem Reinheitsgrad von >95 % in Mengen, die weitere Prüfungen erlaubten (Gramm-Maßstab), Trennung der Enantiomeren;
- II.** Aufzeigen von Möglichkeiten zur wirtschaftlichen Produktion der Substanz im Kilo-Maßstab für intensivere vorklinische Tests;
- III.** Schaffung eines analytischen Systems mit ausreichender Spezifität, hoher Sensitivität und geringem apparativen Aufwand;
- IV.** Aufzeigen eines *in vitro* pharmakologischen Profils, das sich, im Sinne der medizinischen Anwendung, positiv von Profilen bekannter Substanzen abhebt;
- V.** Nachweis der Besonderheiten der Wirkqualitäten in *in vivo*-Modellen, denen eine ausreichend hohe Prädiktivität für die Wirkung am Menschen zugebilligt wird;
- VI.** Aufstellung eines pharmakokinetischen Modells in den für die Toxikologie relevanten Spezies mit dem Ziel, die Daten der vorklinischen Sicherheit und Verträglichkeit sinnvoll auf die Erstanwendung beim Menschen übertragen zu können;
- VII.** Schaffung einer Basis für Überlegungen zu Alternativen oraler Applikationsformen bzw. zu alternativen medizinischen Anwendungen, z.B. topischen Anwendungen für systemische oder lokale Wirkungen;

Nachfolgend werden die einzelnen Arbeiten und Studien in diesen Zusammenhang gestellt, also auf die Erfüllung der Voraussetzungen überprüft, ob mit 8-PN eine volle Arzneimittelentwicklung begonnen werden könnte.

3.1 Chemie von 8-PN

3.1.1 Biosynthese und Laborherstellung von 8-PN

Das natürliche Vorkommen von 8-PN ist weit weniger ausgeprägt als das von anderen und nicht prenylierten Phytoestrogenen. Die Prenylierung von Flavonoiden ist auf wenige, höhere Pflanzenfamilien beschränkt. *Asteraceae*, *Fabaceae* und *Urticaceae*, zu der auch die Familie der *Cannabaceae* (Hopfen) zählt, machen etwa 80 % aller berichteten Quellen für Prenylflavonoide aus (Barron and Ibrahim, 1996). Die Biosynthese von 8-PN in der Pflanze (Stevens et al., 1998) verläuft über Phenylalanin und durch Coenzym A aktiviertes Malonat (Malonyl-CoA). Phenylalanin, das aus Shikimat hervorgeht, bildet den B-Ring und wird zunächst über Hydroxylierung und oxidative Desaminierung in Coumarsäure überführt und auf Coenzym A übertragen. Der A-Ring wird durch sequentielle Kondensation von 3 Acetyl-CoA Einheiten vorbereitet, die jeweils durch Decarboxylierung von Malonyl-CoA bereitgestellt werden. Die Chalcon-Synthase bildet das bicyclische Chalcon-Naringenin, das säurekatalysiert in das Flavanon Naringenin umgewandelt wird. Chalcon und Flavanon stehen in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander, was zur Racemisierung des Naringenins führt. Die spezifische Übertragung der Prenylseitenkette an 8C erfolgt enzymatisch als Prenylpyrophosphat durch die Prenyltransferase. Für die Prenyltransferase aus kultivierten Zellen von *Sophora flavescens* wurde eine Stereospezifität für 2*S*(-)Naringenin beschrieben (Yamamoto et al., 2000). In methanolischen Pflanzenextrakten wurde jedoch auch 2*R*(+)8-Prenylnaringenin nachgewiesen (Kitaoka et al., 1998). Möglicherweise ist die enzymatische Prenylierung nicht streng stereoselektiv bzw. es existieren weitere Isoformen der Prenyltransferase. Daneben ist auch nicht auszuschließen, dass die wässrige Probenbehandlung bei der Extraktion zu einer teilweisen Racemisierung von 2*S*(-)8-PN führt (s.u.).

Die wichtigste natürliche Quelle für 8-PN ist der Hopfen, eine in Europa, Asien und Nordamerika weit verbreitete Kulturpflanze. Allerdings ist der Gehalt mit nur ca. 0.015 % der Trockenmasse für eine wirtschaftliche Wirkstoffgewinnung zu gering. Die chemische Synthese stellt deshalb die einzige Möglichkeit zur Herstellung größerer Mengen an Reinsubstanz dar. Die meisten beschriebenen Synthesen nutzen das natürliche Naringenin als Ausgangsmaterial. Es kann einfach durch Extraktion und saure Zuckerspaltung aus den Schalen von Citrusfrüchten gewonnen werden, die große Mengen des entsprechenden Glucosids (Naringin) enthalten. Naringin ist auch für den bitteren Geschmack der Schalen und Früchte

verantwortlich. In Abb. 54 ist die Biosynthese der labortechnischen Totalsynthese, wie sie in dieser Arbeit zur Herstellung des Tracers eingesetzt wurde, vergleichend gegenüber gestellt.

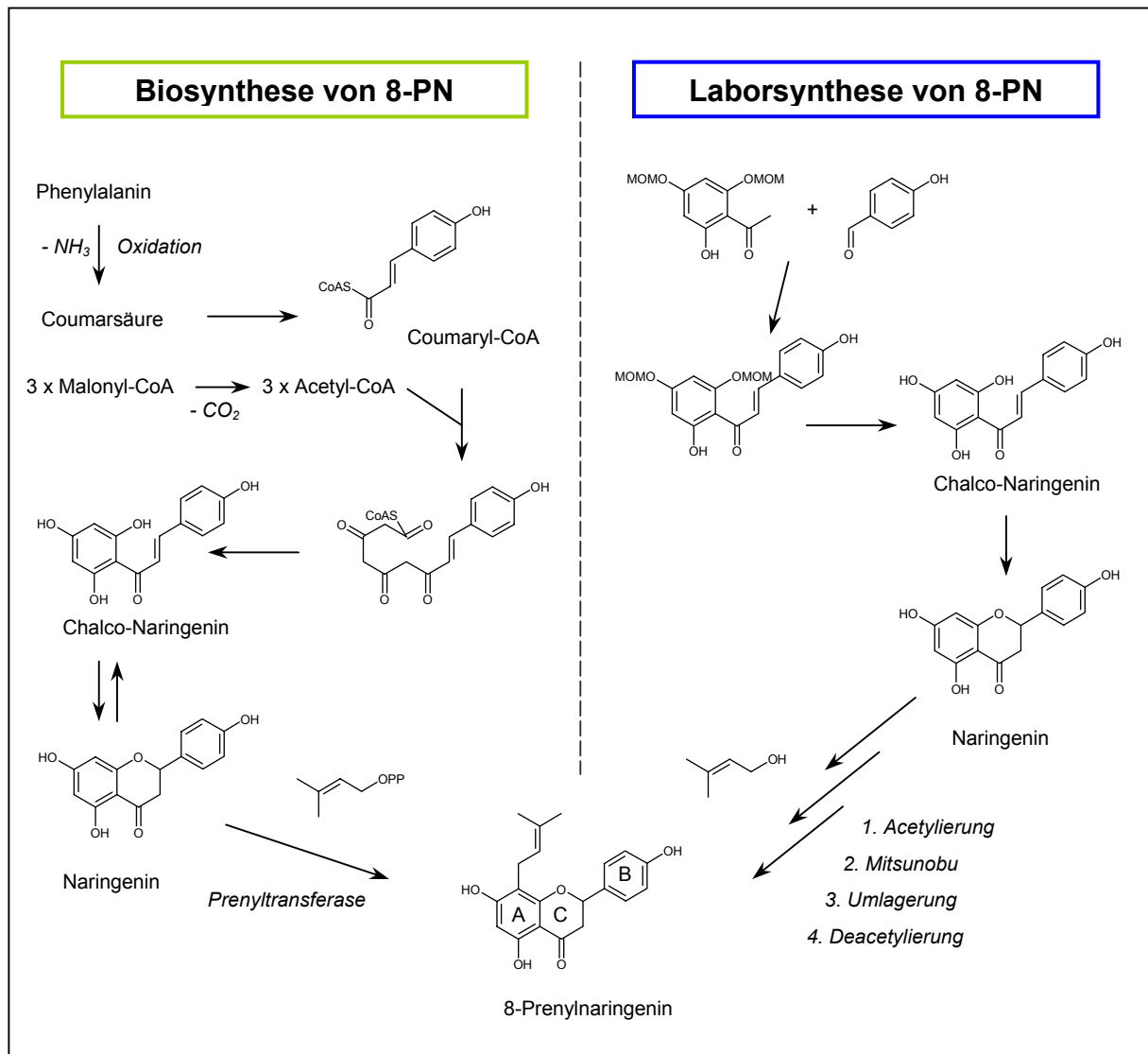


Abbildung 54: Vergleich der Biosynthese von 8-PN mit der in dieser Arbeit beschriebenen Totalsynthese. In der Pflanze wird Phenylalanin aus dem Shikimat-Stoffwechsel zur Bildung des B-Ringes eingesetzt, der A-Ring wird sequentiell aus drei Acetyl-CoA Einheiten aufgebaut. Die Prenyltransferase überträgt Prenylpyrophosphat selektiv auf 8C des Naringenins.

Die Labor-Synthese bis zur Stufe des Naringenins ist eng an den Mechanismus der Biosynthese angelehnt. Der A-Ring wird *en bloc* aus geschütztem Trihydroxyacetophenon aufgebaut, was vier C_2 -Einheiten entspricht. Der B-Ring wird als 4-Hydroxybenzaldehyd eingeführt, entsprechend dem um einen C_2 -Baustein reduzierten Phenylalanin. Beide Komponenten werden über eine Aldolkondensation zum Chalco-Naringenin bzw. Naringenin zusammenge-

führt. Der wesentliche Unterschied besteht in der Aktivierung sowie chemo- und regioselektiven Einführung der Prenylgruppe. Während dieses in der Pflanze in einem einzigen Schritt enzymatisch katalysiert wird, benötigt die organische Synthese hierzu vier Schritte. Das Endprodukt ist ein zudem Racemat.

Die von Gester et al. beschriebene 8-PN-Synthese ausgehend vom Naringenin stellt eine geeignete Methode zur Herstellung geringer Mengen an Wirkstoff (Gramm-Bereich) dar (Gester et al., 2001). Diese Synthese ist eine deutliche Verbesserung gegenüber den bis dahin bekannten direkten Prenylierungen von Naringenin, die durch geringe Ausbeuten und eine Vielzahl schwer abtrennbarer Nebenprodukte gekennzeichnet waren. Die gute Zugänglichkeit zum Naturstoff Naringenin lässt zudem eine Totalsynthese von 8-PN ausgehend von Trihydroxyacetophenon und 4-Hydroxybenzaldehyd wenig sinnvoll erscheinen. Sie ist jedoch eine gute synthetische Methode für gezielte Veränderungen am Chromanon-Gerüst, wie dies beispielsweise bei der Herstellung des $^3\text{H}_2$ -Tracers nötig war.

Durch entsprechende Optimierungen ließ sich die Synthese nach Gester et al. auf eine Produktion von 8-PN im kg-Maßstab und darüber hinaus übertragen. Wesentliche Synthesekriterien wie Verfügbarkeit und effiziente Nutzung von Ausgangsmaterialien und Chemikalien, gesteigerte Ausbeute, einfache Reinigung und hohe Substanzqualität konnten erfüllt und im Rahmen eines Patentes gesichert werden (Bohlmann et al., 2003).

3.1.2 Isomerisierung im organisch-wässrigen Medium

Die wesentlichen Herausforderungen bei den durchgeführten organischen Synthesen resultierten u.a. aus der hohen pH-Sensitivität des Flavanongerüsts im organisch-wässrigen Medium. Während die Struktur in reiner wässriger Säure oder Base inert ist, führten pH-Werte < 3 bzw. > 10 in organisch-wässrigen Medien zur Isomerisierung. Die Eliminierung an 3C führt zur reversiblen Öffnung des Pyranringes, wodurch freie Rotationsmöglichkeit entsteht. Die optische Aktivität chiraler Flavonoide geht verloren und es kommt zur Bildung von Isomeren. Dieser Effekt wurde als „Wesley-Moser-Rearrangement“ für Flavonoide bereits früher beschrieben (Mukerjee and Seshadri, 1955). Unter den beschriebenen Bedingungen liegen offenes Chalcon und geschlossenes Flavonoid in einem Gleichgewicht vor. Säure begünstigt den Ringschluss zum Flavonoid, während Base die Bildung des Chalcons fördert. Die Anwesenheit von Wasser ist notwendig (Abb. 55).

In der Praxis tritt dieser Effekt bei der Extraktion von Hopfen-Dolden bzw. beim Brauprozess auf, wodurch die Chalone des Hopfens (Xanthohumol, Desmethylxanthohumol) überwiegend in die entsprechenden Flavanone (Isoxanthohumol, 6-PN bzw. 8-PN) umgewandelt werden (Stevens et al., 1999a) und im Bier erscheinen. Aus Untersuchungen an Frischpflanzenteilen des Hopfens ergaben sich Hinweise, dass 8-PN, 6-PN und Isoxanthohumol dort möglicherweise in nur sehr geringen Konzentrationen vorkommen könnten und deren verstärkte Anwesenheit in technischen Extrakten und im Bier überwiegend prozessbedingt sein könnte (Stevens et al., 1999a).

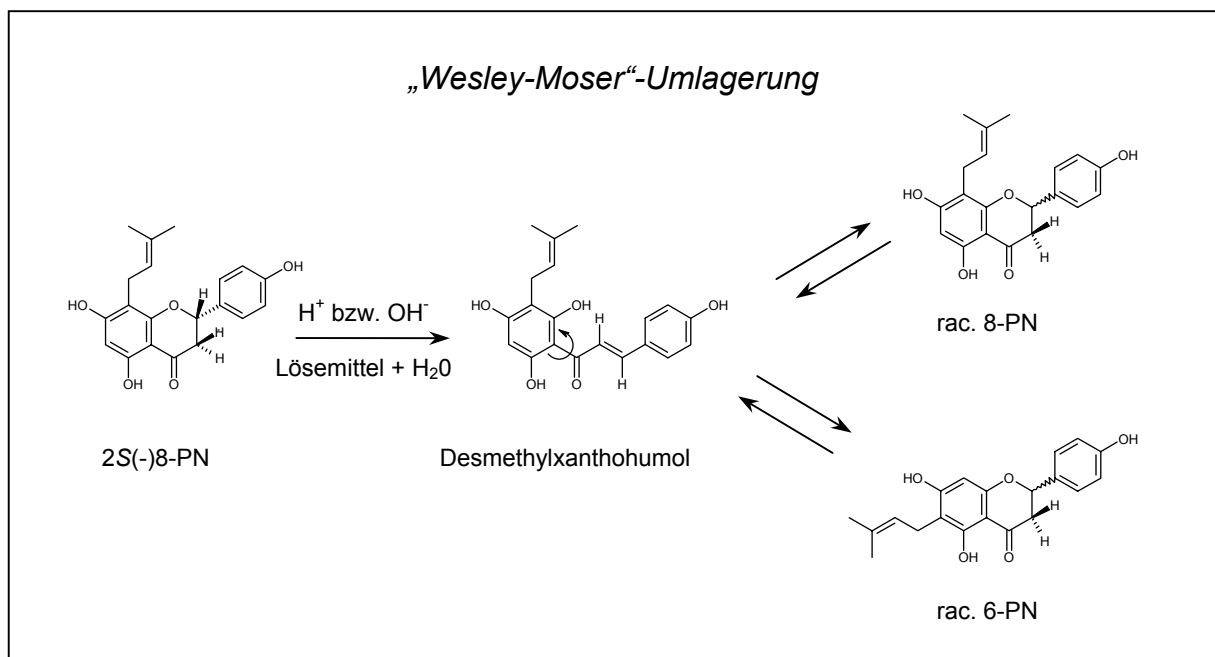


Abbildung 55: „Wesley-Moser“-Umlagerung von Flavanonen am Beispiel der Isomerisierung von chiralem 2S(-)-8-PN in organisch wässrigem Milieu bei pH-Werten ≥ 10 bzw. ≤ 4 . Basische Eliminierung der sauren Protonen an 3C bzw. saure O-Protonierung des Pyranringes führt zur Bildung des offenen, optisch inaktiven Chalcones (Desmethylxanthohumol). Der anschließende, reversible Ringschluss liefert racemisches 8-PN und 6-PN.

3.2 8-PN als pflanzliches SERM

3.2.1 *Pharmakologisches in vitro Profil von 8-PN*

Malawski und Kitaoka konnten als erste die estrogenen Eigenschaften von 8-PN sowohl über eine hohe ER-Bindungsaffinität als auch über eine entsprechend starke Transaktivierung in transgenen Hefezellen zeigen (Kitaoka et al., 1998; Malawski, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Enantiomere von 8-PN mit einer Reihe von Phytoestrogenen, synthetischen SERMs sowie endogenen Steroiden auf ER-, AR-, PR-, GR- und MR-Bindung sowie Transaktivierung von ER und AR in humanen Zellkulturen verglichen. Einzelne, aus der Literatur bekannte Daten konnten bestätigt und in einen breiteren Kontext gestellt werden. Für 8-PN ergab sich ein detailliertes, für Phytoestrogene einzigartiges Rezeptorbindungsprofil (Schaefer et al., 2003). Beide 8-PN-Enantiomere sind subtypenspezifische ER-Liganden mit zwei- bis dreifach höherer Affinität zu ER α , wobei die 2*S*(-) Form ein leicht stärker affiner ER-Ligand ist als 2*R*(+). Damit ist 8-PN das erste Phytoestrogen mit ausgeprägter ER α -Spezifität. 8-PN ist zudem kein Ligand für die übrigen Steroidrezeptoren, was von anderer Stelle für den AR und PR bestätigt wurde (Zierau et al., 2003). In ER α -/ER β -Transaktivierungsstudien mit transfizierten humanen U2-Osteosarcoma-Zellen konnte 8-PN als potentestes Phytoestrogen charakterisiert werden, das etwa 10-fach bzw. 100-fach stärker war als die bekanntesten Isoflavonoide Coumestrol bzw. Genistein. Im Vergleich zu E₂ wurde eine ca. 70-fach niedrigere Aktivität gefunden. Die Potenz der estrogenen Aktivität entspricht der des natürlichen Estrons. Enantiomerenaktivität sowie ER-Subtypenspezifität decken sich mit den Ergebnissen der Bindungsstudie. 8-PN ist ein reiner ER-Agonist ohne intrinsische antiestrogene Aktivität. Es war keine AR-Interaktion in transient transfizierten humanen Prostata-Carcinoma-Zellen (PC-3) zu beobachten.

8-PN zeigte einen ER-vermittelten, stimulierenden Effekt auf die Proliferation von estrogenempfindlichen MCF-7 und T47D Kulturen. Dieser war im Vergleich zu E₂ und Estron 2-3 Größenordnungen schwächer. Damit zeigte sich 8-PN in diesem Modell insgesamt als deutlich schwächeres Estrogen als in den Osteosarcoma-Zellen. Qualitativ waren keine Unterschiede in Hinblick auf Zellaggregation von MCF-7 zwischen E₂ und 8-PN feststellbar. Im μ M Konzentrationsbereich hemmte 8-PN die Proliferation beider Tumorkulturen, was sehr wahrscheinlich auf eine potente, kompetitive Inhibition der EGFR-Tyrosin-Kinaseaktivität

zurückzuführen ist, wie es auch schon für Isoflavonoide beschrieben wurde (Akiyama et al., 1987). Die Phytoestrogene konkurrieren dabei mit ATP um die Bindungsstelle an der Tyrosin-Kinase und imitieren nicht etwa ein Tyrosin-Substrat. Dieses könnte ein interessanter Effekt mit Hinblick auf eine HRT-Anwendung sein, da Konzentrationen in der Größenordnung der IC_{50} , systemisch erreicht werden könnten. Ein *per se* tumorstatistischer Effekt in der Mamma durch Hemmung der EGF-Rezeptortyrosinkinase ist hier prinzipiell positiv zu bewerten (Katzenellenbogen et al., 1987) und wirkt der, erst bei relativ hohen Konzentrationen vorhandenen, ER-vermittelten Proliferation entgegen. In anderen Arbeiten (Pepper, 2002) wurde ebenfalls eine starke inhibitorische Aktivität von 8-PN auf die Tyrosin-Kinase-Aktivität von EGFR und auch FGFR gefunden. Dort wurde ein eindeutig anti-angiogener Effekt in bovinen Thorax-Aorta-Endothelzellen (BAE) und bovinen Microvaskularendothelzellen (BME) beschrieben, die mit b-FGF und v-EGF stimuliert wurden. Die IC_{50} -Werte lagen im einstelligen μM Bereich. Bei diesen Konzentrationen fand Pepper in BAE auch eine Induktion des „tissue type plasminogen activator“ (tPA) bei gleichzeitig herabgesetzter tPA-Inhibitor Aktivität, was auf eine zusätzlich anti-thrombotische Wirkung von 8-PN schließen lässt. Die anti-angiogene Wirkung von 8-PN wurde auch am Hühnerembryo im „early CAM-Assay“ belegt (Pepper et al., 2004), wobei IC_{50} -Werte von $<1 \mu\text{M}$ gefunden wurden.

Die von Genistein, E_2 und 8-PN dosisabhängig induzierte Genexpression in MCF-7 Zellen wurde exemplarisch für neun estrogenregulierte Gene untersucht. Zwischen E_2 und 8-PN konnte in diesem Versuchskontext kein qualitativer Unterschied in der Regulation von *bax*, *bcl-2*, *pS2*, *c-fos*, *srf*, *era*, *pr*, *vdr* und *e-cad* mRNA festgestellt werden. 8-PN vermittelte auf alle untersuchten Gene ein rein ER-agonistisches Signal. Im Gegensatz zu Genistein (Po et al., 2002; Wang and Phang, 1995) wird das *bax:bcl-2* System auf mRNA-Ebene von 8-PN auch in μM nicht beeinflusst, so dass die verminderte Proliferation von MCF-7 mit einiger Sicherheit nicht auf die *bax*-induzierte Apoptose zurückzuführen ist. Vielmehr ist die o.g. Tyrosin-Kinase-Inhibition als Grund für die Abnahme der Proliferation anzunehmen.

Anti-oxidative Eigenschaften von 8-PN (IC_{50} : $0.9 \mu\text{M}$) wurden am Modell der Cu^{2+} induzierten LDL-Oxidation in mehreren Studien nachgewiesen (Miranda et al., 2000b; Shirataki et al., 2001; Toda and Shirataki, 2000). Der Schutz vor Oxidation wird über die aliphatische Prenylseitenkette erreicht, da Naringenin alleine in diesen Studien ohne Effekt war. In dieser Eigenschaft ähneln die prenylierten Flavonoide und Chalcone den ebenso pflanzlichen Tocopherolen (Vitamin E), die neben einem Chromanring eine lange aliphatische Seitenkette besitzen, die als Reduktionsmittel dient und ungesättigte Fettsäuren und Proteine vor Oxidation schützen. Die anti-oxidativen Eigenschaften von Phytoestrogenen werden zumindest teil-

weise für die neuroprotektive Wirkung dieser Substanzklasse diskutiert (Youdim et al., 2002). Darüber hinaus spielt die Estrogen-vermittelte Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Levin, 2002) eine wichtige Rolle beim Schutz der Neuronen vor zellulären Stressoren (Dykens et al., 2003; Linford et al., 2000).

Henderson konnte in Studien mit humanen Cytochrom P-450 Enzymen (hCYPs) einen klaren inhibitorischen Effekt von 8-PN und anderen prenylierten Flavonoiden auf CYP1A2 zeigen, einem Schlüsselenzym bei der Aktivierung von polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen zu cancerogenen Metaboliten (Henderson et al., 2000). Hingegen hatte 8-PN keinen Effekt auf CYP3A4 aus Leber-Mikrosomen, das den biologischen Abbau von Xenobiotika und pharmazeutischen Wirkstoffen katalysiert. Naringenin hingegen ist ein wirksamer Inhibitor der CYP3A4. Prenylierung des Chromanongerüsts bewirkt jedoch eine grundlegende Veränderung der hCYP-inhibitorischen Eigenschaften innerhalb dieser Substanzklasse.

Das durch die *in vitro* Studien erhaltene pharmakologische Profil beschreibt 8-PN als einen potenten, reinen ER-Agonisten mit den selektiven Rezeptorbindungseigenschaften eines natürlichen, pflanzlichen SERMs. Anti-angiogene, anti-thrombotische und anti-oxidative Eigenschaften machen 8-PN zu einem idealen Kandidaten für die HRT. Die inhibitorische Aktivität auf CYP1A2 könnte zudem bei andauernder Behandlung das Risiko von chemisch induzierten Tumoren reduzieren. Ob die im Vergleich zu Estradiol und Estron sehr geringe Estrogenität von 8-PN in den MCF-7 und T47D-Zellen, die aus Mamma-Tumoren entwickelt wurden, Rückschlüsse auf gewebespezifische Unterschiede in der Estrogenität der Substanzen erlaubt, ist vor dem Hintergrund der De-Differenzierung derartiger Zelllinien eher unsicher. Andererseits sind die in der Osteosarcoma-Zelllinie (U2-OS) gefundenen Potenzen der Substanzen weniger unterschiedlich, was mit den *in vivo*-Daten (s.u.) in gewisser Übereinstimmung steht.

3.2.2 In vivo Pharmakologie von 8-PN

Die Tierstudien an der juvenilen Ratte, der ovariectomierten adulten Ratte und der transgenen Luc⁺-Maus belegen eine klare *in vivo* Estrogenität von 8-PN bei einer s.c.-Dosis von 15-30 mg/kg. Die Aktivität von 2R(+)-8-PN ist im Kurzzeittest an der juvenilen Ratte nur marginal schwächer als von 2S(-)-8-PN und konnte im Modell der OVX-Ratte nicht gefunden werden,

was sich mit den Ergebnissen aus der Rezeptorbindung und den Transaktivierungsstudien deckt.

Die tägliche Gabe von 20-30 mg/kg 8-PN über einen Zeitraum von vier Wochen verhinderte wirkungsvoll und dosisabhängig den durch Ovariectomie induzierten Verlust an Knochendichte in der adulten Ratte. Der Effekt von 8-PN auf die Stimulation des Uterus ist hingegen weniger eindeutig. In der juvenilen Ratte wirkten beide Enantiomere bei 30 mg/kg im Vergleich zu 1.5 µg/kg E₂ ähnlich stark estrogen, während dies in der Knochenstudie an der ovariectomierten Ratte bei gleicher Dosis nicht der Fall war. Beide Tiermodelle unterschieden sich im Wesentlichen durch das Alter und Vorbehandlung (Ovariectomie) der Tiere und die Dauer der Behandlung (3 Tage bei der juvenilen Ratte, 28 Tage bei der BMD-Studie). Der Uterus-Wachstum-Test an der juvenilen Ratte ist sicher der empfindlichere Nachweis für uterine *in vivo* Estrogenität. Allerdings besitzt das Modell der ovariectomierten, adulten Ratte eine größere Vorhersagekraft für die Indikation postmenopausale Osteoporose und HRT. Die Ergebnisse des Uterus-Wachstum-Tests dienen als Beleg für eine prinzipielle uterotrophe Wirkung von 8-PN, die auch in der BMD-Studie gefunden wurde. Jedoch war in den OVX-Ratten dieser Effekt weit weniger ausgeprägt als aus der Uterus-Studie erwartet werden konnte, nicht dosisabhängig und deutlich geringer als für E₂ in einer gleichermaßen Knochen-effektiven Dosis. Die schwache uterotrophe Wirkung von 8-PN wurde sowohl durch die Uterusgewichte als auch die histologische Untersuchung des luminalen Epithels bestätigt. Zieht man die histologischen Daten von E₂ aus der 2. BMD-Studie heran, ergibt sich für 8-PN eine im direkten Vergleich etwa 10-fach höhere Spezifität für Knochen gegenüber Uterus. Andersherum gesagt ergibt sich bei der Gabe von 8-PN bzw. E₂ in Dosierungen, die die Tiere jeweils vor OVX-induziertem Verlust an Knochendichte schützen, für E₂ ein zehnfach höherer Effekt auf den Uterus als für 8-PN. Übertragen auf den Menschen würde dies bedeuten, dass die Behandlung von postmenopausalen Frauen mit einer knochenprotektiven Dosis von 8-PN (äquivalent zu 1-2 mg E₂/Tag) in einem estrogenen Uteruseffekt resultierte, der nur noch 0.1-0.2 mg E₂/Tag entspräche und demnach unter den „no effect dose level“ (NOEL) fallen würde. Peri- bzw. postmenopausale Symptome ließen sich so ohne Beigabe eines Gestagens und damit ohne wiederkehrende Blutungen behandeln.

Die knochenspezifische Estrogenität von 8-PN wurde im Luc⁺-Modell mit männlichen Mäusen bestätigt. Während die estrogenen Wirkung in der Leber für 8-PN, Raloxifen, Genistein und E₂ in den jeweiligen Dosierungen nach 6 h ähnlich ausgeprägt war, zeigte 8-PN im Knochen - und ebenso in der Prostata - den höchsten Effekt.

Miyamoto et al. untersuchten in einer Studie an OVX-Ratten ebenfalls den Effekt von 8-PN auf Knochen und Uterus im Vergleich zu E₂ (Miyamoto et al., 1998). Es wurde das gleiche Tiermodell wie bei der BMD-Studie verwendet. Den Tieren wurde allerdings nur eine Dosis 8-PN (30 mg/kg) und E₂ (10 µg/kg) als Positivkontrolle über einen Zeitraum von 14 Tagen s.c. appliziert. Als Ergebnis wurde für beide Applikationen ein vollständiger Schutz vor OVX-induziertem BMD-Verlust festgestellt. Allerdings zeigten sich auch am Uterus eine deutliche Wirkung beider Substanzen, was die Autoren zu der Schlussfolgerung veranlasste, dass 8-PN als ER-Agonist sowohl im Knochen als auch im Uterus wirkt. Um eine schnelle Antwort aus der Studie zu erhalten, wurde der Behandlungszeitraum auf 2 Wochen gegenüber 4 Wochen bei der Leiras-Studie verkürzt. Deshalb war eine höhere Dosis E₂ (10 µg/kg) als in der hiesigen Vergleichsstudie (4µg/kg) notwendig. Ein solches Studien-Design mit Überdosierung erscheint weniger geeignet zur Ermittlung von quantitativ nicht übermäßig großen pharmakologischen Unterschieden, obwohl die später entdeckte Gewebespezifität von 8-PN (Knochen > Uterus) sich auch bereits in der Miyamoto-Studie andeutete, ohne dass dieses von den Autoren gewürdigt wurde. Die 8-PN Dosierung in dieser Studie war durch Voruntersuchungen festgelegt worden, in denen eine volle Uterusantwort gesucht wurde. Die Formulierung von 8-PN für die OVX-Ratten war ölig, was mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer pharmakokinetischen Akkumulation führte. Die gewählte Dosis und Formulierung von 8-PN führte zu einer deutlich uterotrophen Wirkung, doch war diese Dosis mit Hinblick auf die Knochenwirkung vermutlich höher als nötig. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Dosierungen von 8-PN und E₂ in der Miyamoto-Studie aufgrund der kurzen Behandlungsdauer höher als bei einer 4-Wochen-Behandlung erforderlich gewählt wurden und dadurch aller Wahrscheinlichkeit nach pharmakologische Unterschiede zwischen beiden Substanzen überdeckt wurden.

Die *in vivo* Studien an Ratte und Maus ergänzen das in Bezug auf HRT insgesamt günstige pharmakologische Profil von 8-PN um die spezifische Gewebeestrogenität am Knochen gegenüber Uterus (Abb. 57). Die Möglichkeit zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und vor allem postmenopausler Osteoporose ohne gleichsame Stimulation des Endometriums stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber der klassischen HRT dar. Bislang ist jedoch noch völlig unklar, worauf die zweifelsfrei vorhandene Gewebespezifität von 8-PN beruht. Anders als die bekannten synthetischen SERMs wie Raloxifen und Tamoxifen besitzt 8-PN keine klar abgetrennte Selektivität für entweder ER α oder ER β . 8-PN ist zudem ein reiner ER-Agonist ohne versteckte antagonistische Eigenschaften. Die unterschiedliche Ex-

pression von ER α und ER β sowie von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren in verschiedenen Geweben könnten eine wichtige Rolle bei der spezifischen Wirkung haben (Kuiper et al., 1997; Martini and Katzenellenbogen, 2003). Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz findet sich im allosterischen Zusammenspiel von Ligand, Rezeptor, DNA und Co-Faktoren in verschiedenen Geweben. Neue Studien zeigen, dass die Sequenz des „estrogen response element“ (ERE) in der Promotorregion verschiedener Zielgene die ER-vermittelten Wirkungen natürlicher und synthetischer Liganden beeinflusst (Hall et al., 2002). Dies geschieht über Konformationsänderung des ER-Liganden-Komplexes, was zur Veränderung der Co-Faktor-Bindungstasche führt. Liganden- und DNA-induzierte Veränderungen der Steroidrezeptor-Proteinstruktur und Co-Faktor Rekrutierung können so als regulatorische Komponenten für differentielle Genexpression in verschiedenen Geweben dienen (Hall and Korach, 2002).

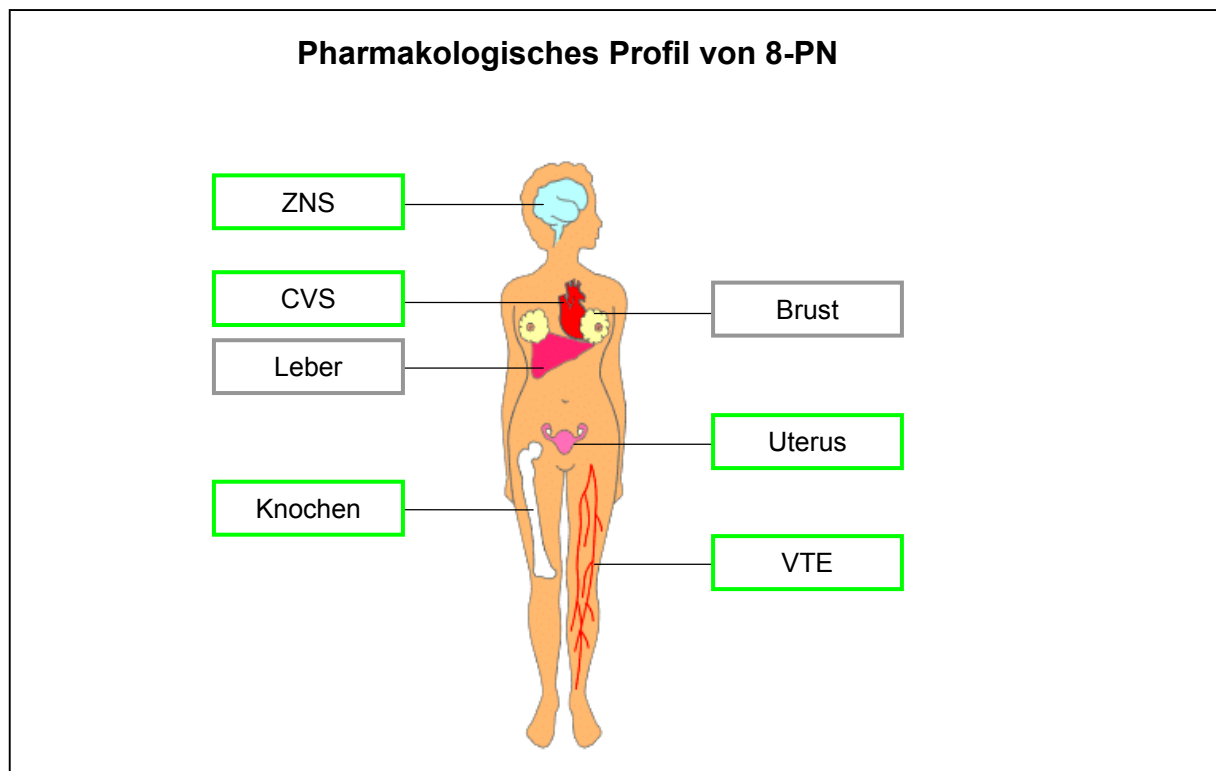


Abbildung 56: Pharmakologisches Profil von 8-PN aus den *in vivo* und *in vitro* Studien. Die Knochenprotektion bei gleichzeitig geringer uterotroper Wirkung wurde in der OVX-Ratte gezeigt und mit Daten aus der Luc⁺-Maus untermauert. Estrogene Wirkung auf das ZNS wurde im Luc⁺-Maus-Modell gezeigt. Anti-oxidative, anti-thrombotische und neuroprotektive *in vitro* Wirkungen (CVS, VTE und ZNS) wurden von anderen Gruppen nachgewiesen. Noch genauer zu untersuchen bleibt der Effekt von 8-PN auf Brust und Leber.

3.2.3 *Pharmakokinetik und Metabolismus*

Die Studien zur Pharmakokinetik (PK) von 8-PN wurden in weiblichen Ratten und Hunden als Einzeldosis-Applikationen in jeweils zwei Teilen durchgeführt (enteral sowie parenteral). Wistar Ratten wurden 30 mg/kg in wässrigem Vehikel subkutan injiziert, wie dies auch bei der BMD-Studie an OVX-Tieren vorgenommen wurde. Die intragastrale Gabe von 250 mg/kg 8-PN als Mikrokristallsuspension (MCS) entsprach der höchsten Dosis im akuten Toxizitätstest, der außerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die PK-Studien in Beagle Hunden wurden als intravenöse Kurzinfusion von 10 mg/kg einer wässrig-alkoholischen Lösung sowie oraler Gabe von 125 mg/kg einer wässrigen MCS vorgenommen.

8-PN wurde bis zu den geprüften Höchstdosen von 125-250 mg/kg nach enteraler Gabe in Form der MCS von der Ratte vollständig und vom Hund nahezu vollständig (80 %) absorbiert, was aus dem Vergleich der Ausscheidung unveränderter Substanz über Fäces nach parentaler und enteraler Applikation hervorgeht. Die systemische Freisetzung nach s.c.-Gabe bei der Ratte erfolgte ohne erkennbaren Depoteffekt mit maximalen Serumkonzentrationen nach bereits 10-15 Minuten, was einer Verteilung wie nach i.v.-Injektion beim Hund sehr nahe kommt.

Der Verlauf der Serumkonzentration von 8-PN in der Ratte zeigt nach enteraler Gabe ein erstes Maximum nach ca. 45-60 Minuten sowie ein weiteres nach etwa 3 h. Bei der individuellen Betrachtung der Serumspiegel der Hunde werden ebenfalls zwei Konzentrationspeaks nach ca. 60 Minuten sowie zwischen 2.5-4 h erkennbar. Dieser Verlauf ist typisch bei einem extensiven enterohepatischen Kreislauf, der bereits für Isoflavonoide beschrieben wurde (Sfakianos et al., 1997; Watanabe et al., 1998; Yueh and Chu, 1977). Die Blut-Hirnschranke ist uneingeschränkt durchlässig für 8-PN, wobei im Hirn gleich hohe bzw. höhere Spiegel erreicht werden als im Serum. Die höheren Konzentrationsverhältnisse von Hirn zu Serum nach oraler Gabe im Vergleich zur s.c.-Applikation spiegeln sehr wahrscheinlich einen langen Absorptionsprozess sowie eine enterohepatische Rezirkulation einer noch unbekannteren Dosismenge wider, die zu einem veränderten Gleichgewicht zwischen Eliminierung von und Flux in das Gehirn über den betrachteten Zeitraum von 7 h führt. Die hohen Leberkonzentrationen von 8-PN resultieren aus einer überwiegenden biliären Exkretion, wie sie in beiden Spezies beobachtet wurde. 8-PN bindet im Serum des Hundes spezifisch an SBG sowie an humanes SHBG, was mit der strukturellen Ähnlichkeit zu endogenen Steroiden begründet werden kann.

Es wurden in dieser Arbeit keine speziellen Studien zu Metabolismus und Wirkstoffinteraktion auf der Ebene der Biotransformation von 8-PN in Ratte und Hund durchgeführt. Es existieren jedoch *in vitro* Daten zum Metabolismus von 8-PN und Xanthohumol in Lebermikrosomen-Fractionen aus Mensch bzw. Ratte (Nikolic et al., 2004; Yilmazer et al., 2001a; Yilmazer et al., 2001b). Nach diesen Studien werden die Prenylflavonoide, analog zu den Isoflavonoiden, vornehmlich über Phase-II-Reaktionen metabolisiert. Glucuronidierung von Xanthohumol fand ausschließlich an 7-OH sowie 4'-OH statt (Abb. 57). Nikolic et al. fanden insgesamt zwölf Metabolite von 8-PN nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen. Phase-I-Reaktionen traten vor allem an der Prenylseitenkette auf, wo sowohl die terminalen Methylgruppen als auch die allylische Doppelbindung CYP-vermittelt oxidiert bzw. hydroxyliert wurden.

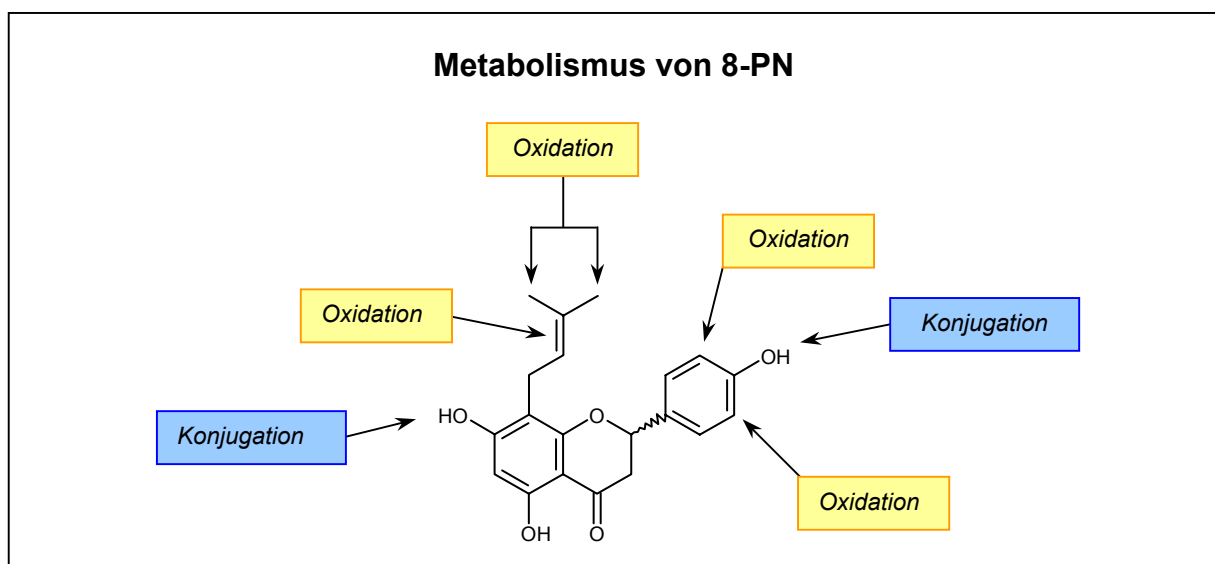


Abbildung 57: Art und Position der häufigsten mikrosomalen, hepatischen *in vitro* Metabolisierung von 8-PN. Orange: Phase-I-Metabolisierung; Blau: Phase-II-Metabolisierung.

Kernhydroxylierungen waren hauptsächlich an den 3'/5'-C Positionen des B-Ringes zu beobachten, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als an der Prenylkette. Interessanterweise wurde für einen isomeren Phase-I-Metaboliten, der durch Hydroxylierung am Prenylrest entsteht, eine moderate aber sehr selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2 (COX-2) gefunden (Jang et al., 2002). In den eigenen Kinetik-Studien an Ratte und Hund wurde nur eine geringe Phase-I-Metabolisierung von 8-PN beobachtet, da 50-70 % der Dosis entweder unverändert oder aber als Konjugate ausgeschieden wurden. Dieses deckt sich zwar auf den ersten Blick nicht mit den *in vitro* Studien, steht jedoch auch nicht im Gegensatz dazu, denn die im Modell

mikrosomaler Abbaureaktionen auffindbaren Metabolite mögen wegen einer raschen Konjugation der Substanz *in vivo* keine Relevanz besitzen. Das geringe Ausmaß der Phase-I-Metabolisierung von 8-PN steht in einem deutlichen Gegensatz zum Abbau von endogenen sowie den meisten synthetischen Steroiden der 19-nor-Testosteron-Reihe, die eine extensive hepatische Phase-I-Metabolisierung durchlaufen. Sie werden zu einer großen Anzahl hydrophiler Metaboliten umgewandelt deren metabolischer Aufklärungsgrad häufig unterhalb 50 %, manchmal sogar unter 20 % der Dosis liegt.

Der systemisch verfügbare Anteil von 8-PN wird in Ratte und Hund als freier Wirkstoff oder in Form von Konjugaten über die Leber und die Niere ausgeschieden. Nach enteraler Gabe wird 8-PN in hohem Maße prä-systemisch über die Leber eliminiert. Der hohe Anteil der ausgeschiedenen Dosis in den Fäces spiegelt dabei biliäre Exkretion wider. Die absolute Bioverfügbarkeit, die aus dem Vergleich der Serumspiegel-Zeitverläufe nach enteraler und parenteraler Gabe errechnet wurde, lag bei Ratte bei 5.9 % (250 mg/kg) und beim Hund bei, um die unvollständige Absorption korrigierten, 3.4 % (125 mg/kg). Diese recht geringe absolute Bioverfügbarkeit ist wie schon erwähnt ein Resultat der prä-systemischen Elimination, und nicht durch einen extensiven, metabolischen „first-pass“-Effekt der Leber bedingt.

In der Leber gebildete Konjugate mit einem Molekulargewicht >300 g/mol werden in der Regel bevorzugt in die Gallenflüssigkeit abgegeben, Konjugate mit einem Molekulargewicht <300 g/mol vornehmlich ins Blut (Lüllmann and Mohr, 2001). Biliär eliminierte Konjugate können von Darmbakterien enzymatisch gespalten und der freie, lipophile Wirkstoff wieder resorbiert werden. Wie auch für Genistein, Daidzein und anderen Isoflavonoiden beschrieben (Sfakianos et al., 1997; Watanabe et al., 1998), wird freies 8-PN (MW: 340.37 g/mol) über einen extensiven enterohepatischen Kreislauf (Abb. 58) „recycled“, was seine systemische Verweildauer erheblich verlängert. Dieser Effekt trat für 8-PN in allen hier untersuchten Spezies auf ist auch beim Menschen zu beobachten (s.u.). Dadurch könnten, bei gleichzeitig verlangsamter enteraler Resorption, relativ flache Serumspiegel über große Zeitfenster erreicht werden. Dies würde einerseits tägliche Mehrfachgaben zur Aufrechterhaltung eines Minimum-Serumspiegels überflüssig machen, zum anderen hätte es einen vorteilhaften pharmakologischen Effekt, da extreme Spitzen im Serumverlauf verhindert würden. Die Dosierungen könnten somit relativ präzise auf den gewünschten Effekt (Knochenprotektion) eingestellt werden. Negative Effekte auf den Uterus, wie sie bei Überdosierungen zu erwarten wären, würden verhindert. Das geringe Ausmaß der Biotransformation über Phase-I-Reaktionen ist ein Vorteil der Substanz im Bereich der klinischen Entwicklung, da das weite Feld der Arzneimittelwechselwirkungen auf der Ebene der Biotransformation deutlich über-

sichtlicher gestaltet und auf einige Schlüsselstudien reduziert werden kann. Auch die Ausscheidung von unveränderter oder nur konjugierter Substanz mit dem Urin ist ein Entwicklungsvorteil, da klinische Studien zu alternativen Formulierungen und zur PK in diversen Populationen allein über die wenig aufwändige Analyse von Sammel-Urinen begleitet werden könnten.

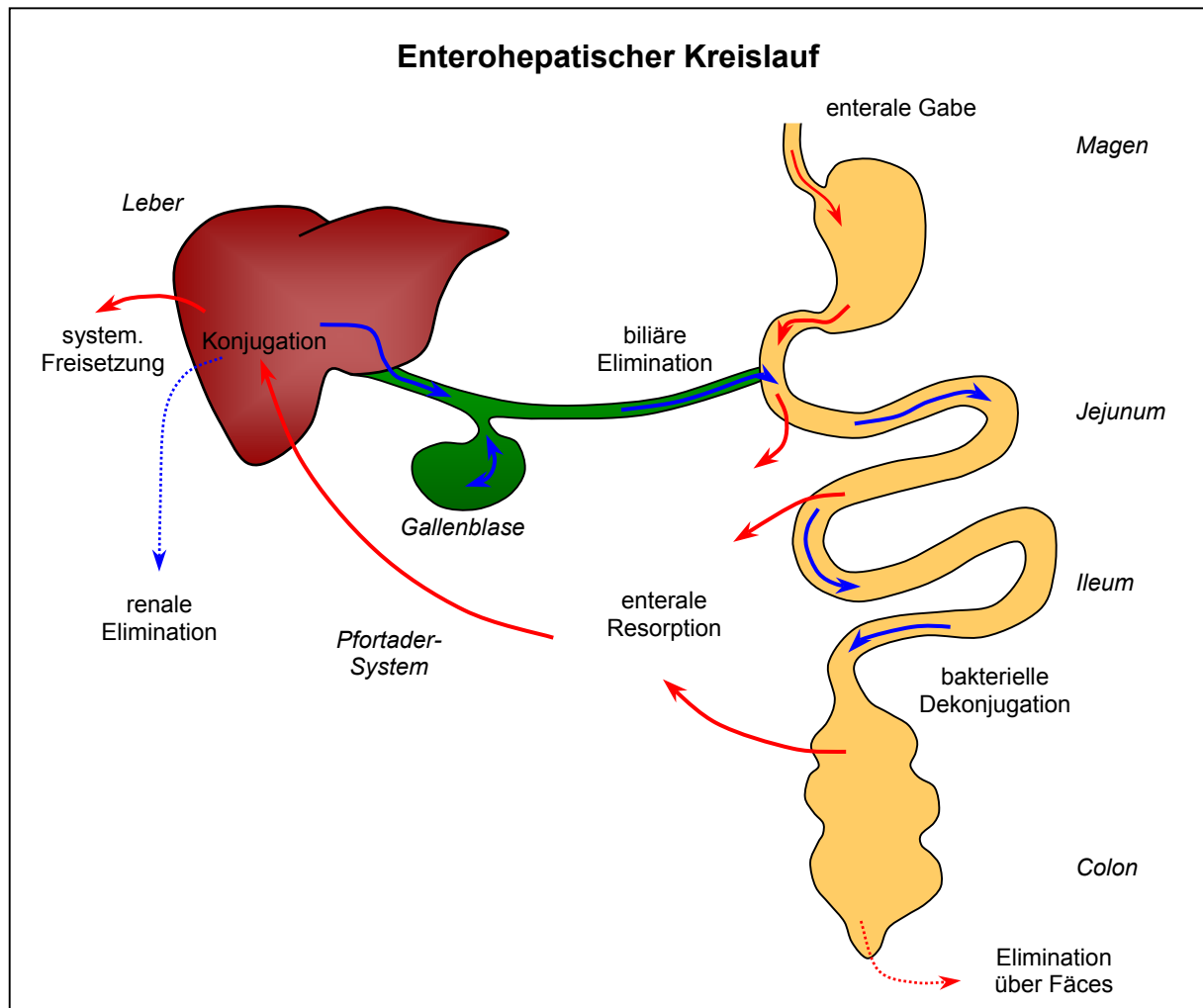


Abbildung 58: Schematische Darstellung des enterohepatischen Kreislaufes, wie er auch für 8-PN bei Ratte, Hund und Mensch zu beobachten ist. Nach oraler Gabe gelangt freier Wirkstoff (rot) über enterale Resorption in das Pfortadersystem und wird der Leber zugeführt. Dort erfolgt, neben der systemischen Freisetzung unveränderter Substanz, vorwiegend Phase-II-Metabolisierung und die hydrophilen Konjugate (blau) werden größtenteils direkt über die Galle biliär eliminiert. Darmbakterien spalten die Konjugate und lipophiler Wirkstoff gelangt nach Rückresorption wieder in den Kreislauf. Freier Wirkstoff wird hauptsächlich über Fäces ausgeschieden, daneben werden, in deutlich geringerem Umfang, Konjugate aus dem Blut mit dem Urin eliminiert.

3.2.4 Pharmakokinetik in der Haut

Mechanistische *ex vivo* Studien zur perkutanen Resorption und Metabolismus von 8-PN wurden im Modell der Franz-Kammer mit Haut von männlichen, haarlosen Mäusen durchgeführt. Es wurden insgesamt fünf verschiedene experimentelle Formulierungen für die Applikation von 8-PN in die Haut untersucht. Daran anschließend wurde die Verteilung von 8-PN in der Haut sowie einzelne Fraktionen mittels Radio-HPLC auf Metabolismus von 8-PN analysiert.

Eine Formulierung auf Grundlage von hydrophilem Propylenglykol unter Beimischung von Laurinsäure bzw. Laurylalkohol als Penetrationsverstärker zeigte den mit Abstand größten Effekt auf die perkutane Resorption von 8-PN in die Maushaut. Kombinationen polarer Basisformulierungen mit amphiphilen bzw. lipophilen „Enhancer“-Substanzen sind eine gängige Methode für die dermale Applikation von Wirkstoffen (Williams and Barry, 1992). Propylenglykol erhöht aufgrund seiner Hydrophilie als Donor-Phase die thermodynamische Aktivität von 8-PN während Laurinsäure die Löslichkeit innerhalb der Haut verbessert. Diese günstige Formulierungs-Eigenschaft wird als „push-pull“-Effekt bezeichnet (Kadir et al., 1987). Laurinsäure verbessert außerdem die Durchlässigkeit des *Stratum Corneum*, indem die quasi-kristallinen Lipide verflüssigt werden und die „brick and mortar“-Struktur aus Fetten und eingelagerten Proteinen aufgebrochen wird, was die initiale Penetration durch diese Barriere erst ermöglicht. Der Einfluss von Kettenlänge, Verzweigung und Sättigungsgrad von Fettsäuren hat Einfluss auf ihre Eigenschaft als Penetrationsverstärker (Williams and Barry, 1992; Williams and Barry, 2004). Laurinsäure (C₁₂) ist die wirkungsvollste, geradkettige Fettsäure zur Penetrationsverstärkung und hat sich als effektiver Enhancer verschiedener lipophiler Substanzen, u.a. für Testosteron, erwiesen (Aungst et al., 1990).

Der überwiegende Anteil von 8-PN verblieb mit der PG-LS Formulierung in der Epidermis und Dermis, der transdermale Fluss war verhältnismäßig gering. Bei der topischen Estrogenbehandlung von Altershaut ist genau diese lokale Wirkstoffkonzentration erwünscht. Die haarlose Maushaut ähnelt in ihrem Resorptionsverhalten der des Menschen. Auf die humane Situation übertragen hieße dies, dass die lokal effektive Dosis in der klinischen Anwendung mit einer entsprechenden Formulierung so gering ausfallen würde, dass die systemische (Estrogen-) Belastung durch perkutane Resorption vernachlässigbar wäre.

In vitro Studien an humanen dermalen Fibroblasten haben die starke estrogene Aktivität von 8-PN auf die Decorin- und Prokollagen-I-Synthese bestätigt (Donovan et al., 2002). Gleichzeitig wurde eine deutliche Verminderung von Prostaglandin-E₂ (PGE₂) beobachtet,

einem Immun-Mediator, der durch Cyclooxygenase-Katalyse aus Arachidonsäure gebildet wird. Letzteres könnte zumindest teilweise ein Effekt der COX-2 Inhibition durch Phase-I-Metaboliten (Jang et al., 2002) darstellen. 8-PN wird von der murinen Haut, nach Applikation in PG-LS, fast ausschließlich über Phase-I-Reaktionen metabolisiert. Enzymatische Konjugatspaltung mit Glucuronidase / Aryl-Sulfatase hatte keinen signifikanten Effekt auf das gefundene Metabolitenmuster. Dieser Befund ist insofern nicht ungewöhnlich, da sich die Ausstattung an metabolischen Enzymen von Haut und Leber unterscheiden (Kao and Carver, 1990) und Konjugation vornehmlich in der Leber und z.T. auch im Darmepithel stattfindet. Allerdings war eine Identifizierung der Metaboliten nicht Gegenstand der Studie und wäre wohl auch aufgrund zu geringer Metabolitenmengen gescheitert. Die hydrophilen Phase-I-Metaboliten machen zu Beginn der Applikation den Hauptteil des transdermalen Flusses aus, während 8-PN in der Epidermis und Dermis akkumuliert. Mit Nachlassen der vitalen Funktionen der explantierten Haut nimmt entsprechend die Metabolisierung ab.

Die durchgeführten mechanistischen Studien zur dermalen Resorption, Verteilung, Kinetik und Metabolismus bei der haarlosen Maus können als Grundlage für eine pharmazeutische Entwicklung von 8-PN für die Anwendung beim Menschen dienen. Entsprechende Produkte mit weniger potenten Phytoestrogenen wie Genistein und Daidzein werden bereits auf dem Markt als „anti-ageing“ Cremes angeboten (Novadiol[®], Vichy). Anhand der gesammelten Daten scheint eine topische Applikation für 8-PN erreichbar, die die gewünschten estrogenen Effekte in der Altershaut ohne systemische Belastung bewirkt.

3.3 Bioanalytik

Zur quantitativen Bestimmung von 8-PN in biologischen Proben wurden in dieser Arbeit erstmals immunologische Assays (ELISA und RIA) entwickelt. Klassische Analysemethoden für 8-PN in Hopfen- und Bierproben via „gas chromatography/mass spectrometry in single ion-monitoring mode (GC/MS-SIM)“ (Tekel et al., 1999) sowie „high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)“ (Stevens et al., 1999b) wurden bereits zuvor beschrieben. Diese Methoden sind jedoch mit einem erheblichen technischen

Einsatz verbunden und erfordern aufwändige Probenvorbereitungen, weshalb sie sich nur bedingt für den Durchsatz großer Probenzahlen eignen. Immunoassays besitzen eine höhere Sensitivität, benötigen eine vergleichsweise minimale Probenvorbereitung und sind somit für die Hochdurchsatzanalyse biologischer Proben sehr gut geeignet.

Kleine organische Moleküle sind aufgrund ihrer geringen Größe nicht immunogen. Es wurden deshalb verschiedene Haptene mit freier COOH-Gruppe von 8-PN hergestellt, die als Amide an cBSA gekoppelt wurden, um eine spezifische Immunantwort hervorzurufen. Dabei wurden verschiedene Linker-Längen sowie unterschiedliche Positionen im Molekül für die Synthese ausgewählt. Die Länge des Säure-Linkers hatte wesentlichen Einfluss auf die Immunogenität des Hapten-cBSA-Konjugates, während die Position der Funktionalisierung in diesem Zusammenhang unerheblich war. Kurzkettige Linker (C₂-C₃) erzielten deutlich höhere Titer der gewonnenen Kaninchen-Antiseren und eine höhere Spezifität als längere (C₆-C₉). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Gruppen für Hapten-Konjugate von Isoflavonoiden (Bennetau-Pelissero et al., 2000; Lapcik et al., 1997; Lapcik et al., 1998). Als Erklärung wird hier die bei kurzen Linkern geringere Flexibilität der Haptenstruktur auf der BSA-Oberfläche angeführt, was zu einer effektiveren, weil starrerem, Antigen-Präsentation führt (Bennetau-Pelissero et al., 2000). Allerdings spielt hierbei auch die insgesamt abnehmende Polarität des Antigens eine Rolle. Die *O*-Methylierung von 8-PN bewirkte eine deutlich herabgesetzte Immunogenität bei ansonsten konstanter Linker-Länge.

Die Immunisierung wurde über sechs Monate fortgeführt, wobei die Titerentwicklung dokumentiert wurde. Es wurden insgesamt drei polyklonale Kaninchen-Antiseren für die Entwicklung von kompetitiven ELISA/RIA ausgewählt, die spezifisch gegen 2*R*(+), 2*S*(-) bzw. racemisches 8-PN gerichtet waren. Die Titer in den Tieren lagen relativ hoch und die gewonnenen Antiseren zeigten gute Sensitivität gegenüber dem Zielanalyten. Die IC₅₀-Werte aus den ELISA-Eichkurven der Seren mit Standardlösungen von 8-PN lagen im Bereich von 1 ng/ml, die maximale Nachweisgrenze bei ca. 4 pg pro Ansatz. Vergleichbare IC₅₀-Werte von kompetitiven ELISA für Phytoestrogene und Alkaloide kommen in Bereiche zwischen 0.8-20 ng/ml (Bennetau-Pelissero et al., 2000; Lee et al., 2000). Im Vergleich zum ELISA zeigen RIA eine bis zu 10-100 fach höhere Sensitivität (Bennetau-Pelissero et al., 2000). Lapcik et al. entwickelten einen RIA gegen Daidzein mit einer maximalen Nachweisgrenze von 0.4 pg pro Ansatz (Lapcik et al., 1997). Für den kompetitiven RIA der drei gewonnenen Antiseren wurde gegenüber den entsprechenden ELISA allerdings nur eine Steigerung der Sensitivität etwa um den Faktor zwei erreicht, mit IC₅₀-Werten im Bereich von 0.5-0.75 ng/ml aus Standardlösungen und einer maximalen Nachweisgrenze von ca. 2 pg/Ansatz. Dies ist jedoch

auch methodisch bedingt, da in dieser Arbeit ^3H -Tracer eingesetzt wurden. Die in der Literatur beschriebenen ^{125}I -Tracer können aufgrund der sehr viel höheren spezifischen Aktivität quasi masselos eingesetzt werden, wodurch sich die Sensitivität steigern lässt.

Zur Analyse von Serum und Urin aus Kinetikstudien wurde das gegen das Racemat gerichtete Antiserum C eingesetzt. Die effektive Nachweisgrenze des ELISA lag für diese Proben matrix-bedingt bei 1 ng/ml für den RIA bei 0.2 ng/ml. Die RIA-Messung wurde als Standardmethode etabliert, da keine ausreichende Lagerungs-Stabilität der Enzym-Hapten-Konjugate des ELISA gegeben war.

Die Kreuzreaktivitäten der drei Antiseren gegenüber strukturähnlichen Substanzen wie 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol fielen durchaus unterschiedlich aus. Die Seren gegen 2*S*(-)-8-PN (Serum A) und 2*R*(+)-8-PN (Serum B) zeigten beide ca. 10 % Kreuzreaktivität gegen das jeweils andere Enantiomer. Xanthohumol, Isoxanthohumol und 6-PN wurden von beiden Seren ebenfalls in geringem Maße erkannt. In Bezug auf die Spezifität der Antiseren spielte die Position der Hapten-Funktionalisierung eine entscheidende Rolle. Antiserum C, das über das 4'-OH verknüpfte Hapten erzeugt wurde, diskriminiert sehr effektiv 6-PN, Xanthohumol und Isoxanthohumol (0.2, 0.02 bzw. 0.1 % Kreuzreaktivität). Diese Unterschiede in Kreuzreaktivitäten in Abhängigkeit von der Position der Hapten-Funktionalisierung sind aufgrund der Haptenanbindung und der vornehmlich präsentierten Strukturteile verständlich und wurden in analoger Weise für andere Haptene gefunden (Bennetau-Pelissero et al., 2000; Lapcik et al., 1997; Lee et al., 2000). Die Spezifität des Antiserums C ist auch im Vergleich mit denen aus den genannten Gruppen sehr hoch. Es ist für die Bioanalytik von 8-PN in Mensch und Tier verwendbar, zumal keine Kreuzreaktivitäten mit den strukturell sehr verschiedenen, endogenen Steroiden gefunden wurden. Für Bier- und Hopfenproben ist der RIA, ein nicht um mehrere Größenordnungen höherer Gehalt an Xanthohumol und Isoxanthohumol vorausgesetzt, ebenfalls einsetzbar.

Mit den hier entwickelten ELISA bzw. RIA stehen erstmalig Bioanalysemethoden für die hochsensitive und effiziente Messung von 8-PN in diversen biologischen Matrices zur Verfügung. Damit wird es möglich sein, 8-PN in verschiedenen natürlichen Proben sowie in Nahrungsmitteln zu bestimmen. Sie sind darüber hinaus Voraussetzung für die Bearbeitung großer Probenzahlen mit z.T. sehr geringen Konzentrationen an 8-PN und komplex zusammengesetzten Matrices, wie sie bei klinischen Studien anfallen.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von 8-PN als möglichen Kandidaten für die HRT zur Behandlung peri- und postmenopausaler Erkrankungen bei der Frau. Die bisher als Standard-Therapie angewandte, kombinierte HRT als Estrogen-Gestagen-Kombination verursacht, neben den zyklischen Entzugsblutungen, ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs, Herzinfarkt, Schlaganfall und Thromboembolismus (Grimes and Lobo, 2002; MWS, 2003; WHI, 2002). Synthetische SERMs wie Tamoxifen und Raloxifen, die zur Behandlung von Brustkrebs und Osteoporose eingesetzt werden, haben keinen bzw. negativen Einfluss auf die perimenopausale Symptomatik (Barret-Connor et al., 2002).

Die durchgeführten biochemischen und molekularbiologischen Studien haben 8-PN als einen reinen ER-Agonisten sowie als potentestes Phytoestrogen mit erkennbarer ER α -Spezifität charakterisiert. Im Tiermodell mit weiblichen Ratten wurde eine ausgeprägte Gewebespezifität der estrogenen Wirkung für Knochen gefunden, bei gleichzeitig nur geringer Stimulation des Uterus. Die knochenselektive Wirkung wurde in transgenen, männlichen Mäusen bestätigt. Hier wurden zudem vergleichsweise hohe estrogenen Effekte in Hirn und Prostata gefunden. Diese *in vivo* Daten kennzeichnen 8-PN als ein natürliches SERM. Andere Gruppen haben zusätzliche, vor allem in Hinblick auf HRT positive *in vitro* Eigenschaften von 8-PN gefunden. Hierzu zählen vor allem anti-angiogene, anti-thrombotische, antioxidative sowie neuroprotektive Wirkungen (Dykens et al., 2003; Linford et al., 2000; Miranda et al., 2000a; Pepper, 2002; Pepper et al., 2004; Shirataki et al., 2001; Toda and Shirataki, 2000).

Das gefundene pharmakologische Profil von 8-PN lässt einen Einsatz im Rahmen der HRT ohne zusätzliche Gabe eines Gestagens möglich erscheinen. Dies würde einen erheblichen Vorteil gegenüber der klassischen, kombinierten HRT bzw. synthetischen SERMs bedeuten. Die hier vorgelegten Schlüsselstudien haben überzeugend demonstrieren können, dass 8-PN ein geeigneter neuer Entwicklungskandidat für eine volle Arzneimittelentwicklung sein könnte, da wesentliche Voraussetzungen hierfür geschaffen wurden. Folgerichtig wurde eine vorklinische Entwicklung auf Basis der vorgelegten Arbeit begonnen. Die Ergebnisse dieser, auf die Erstanwendung bei der Frau ausgerichteten, präklinischen Arbeiten zeigten ein unauffälliges sicherheitspharmakologisches und toxikologisches Profil und gaben Anlass zu einer klinischen Phase-Ia-Studie an 24 menopausalen Frauen. Jeweils sechs Frauen wurden einmalig entweder Placebo, 50 mg, 250 mg oder 750 mg 8-PN oral verabreicht. Die Studie wurde

doppelblind durchgeführt. Die notwendige Bioanalytik zur Bestimmung von 8-PN in Serum und Urin wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Erste Ergebnisse der klinischen Studie zeigen eine sehr gute Verträglichkeit sowie die Existenz eines extensiven enterohepatischen Kreislaufes. Nach vollständiger Auswertung der Phase-Ia-Studie sollten nachfolgende klinische Studien Aussagen über die Wirksamkeit in Hinblick auf die perimenopausale Symptomatik, Knochenprotektion und Stimulation des Endometriums sowie zur Dosisfindung liefern. Hieraus ergäbe sich eine detailliertere Bewertung von 8-PN für den Einsatz in der HRT.

Im Rahmen der weiteren klinischen Entwicklung wären dann auch die Langzeiteffekte auf Leber (HDL/LDL, SHBG-Induktion) und Brustdrüse zu untersuchen, die präklinisch bzw. im Rahmen kurzer klinischer Studien nicht erhoben werden können.

Aus der Beobachtung einer ausgeprägten Estrogenität in der Prostata männlicher Luc⁺-Mäuse ergibt sich eine weitere interessante, mögliche Anwendung. Estrogene werden u.a. zur Hormonbehandlung von Prostatakrebs eingesetzt. Aufgrund der Nebenwirkungen von natürlichen Estrogenen (Gynäkomastie) werden in alternativen Therapien bereits Phytoestrogene verwendet (Morrissey and Watson, 2003). Die prostataspezifische estrogene Wirkung von 8-PN in der Maus in Zusammenhang mit der beobachteten Tyrosinkinase-Inhibition lassen zumindest eine nähere Untersuchung dieser Indikation aus der jetzigen Sicht heraus sinnvoll erscheinen.

4. MATERIAL & METHODEN

4.1. Chemische Methoden und Materialien

4.1.1 Allgemeine Organisch-Chemische Synthesen

Alle nichtradioaktiven Arbeiten zu den organischen Synthesen wurden mit handelsüblich verfügbaren Chemikalien (Fa. Sigma-Aldrich, Roth, Merck, Fluka) durchgeführt. Syntheseprotokolle und physikochemischen Daten sind im Anhang (siehe unter 5.1) beschrieben. Naringenin als Ausgangsmaterial zur Synthese von 8-Prenylnaringenin und Derivaten wurde von Senn-Chemicals (Dielsdorf, CH) bzw. Kaden Biochemicals (Hamburg) bezogen. Glasgeräte wurden vor Gebrauch im Trockenschrank ausgeheizt. Als Schutzgas wurde trockenes Argon verwendet, Reaktionstemperaturen gegebenenfalls per Innenthermometer überwacht. Bei nasschemischen Synthesen wurden Lösemittel in p.a.-Qualität eingesetzt, die über Molsieb (3.0-4.0 Å; Merck) gelagert wurden. Für die analytische TLC (Kieselgel-TLC-Platten; Merck) und präparative LC (Kieselgel; 40-60 µm, 320-400 mesh; Merck) sowie für Aufarbeitungen wurden Lösemittel der Schering AG eingesetzt. Überschüssiges Lösemittel wurden im Wasserbad am Vakuum-Rotationsverdampfer (Büchi) entfernt, die abschließende Trocknung erfolgte an der Ölvakuumpumpe (Neuberger) bzw. im Vakuumtrockenschrank (Heraeus) bei 20-60 °C und 50-200 mbar.

HPLC-Analysen und -Präparationen von Syntheseprodukten wurden vom HPLC-Labor Medizinische Chemie 4 (MedChem 4, Schering AG) durchgeführt. Bedingungen sind entsprechend den Syntheseprotokollen angegeben. Ebenso wurden Schnell-NMR Analysen von gereinigten Verbindungen von der Spektrometrie (Scientific Secretariat, Schering AG) durchgeführt (AMX 300 Bruker, 300 MHz). Hierzu wurden 5-10 mg Substanz in 0.8 ml NMR-Lösemittel gelöst und vermessen (Interner Standard TMS). Massenspektrometrische Untersuchungen (Triple Quadrupol TSQ 700, Finning; Elektronenstoß-Ionisation 70 eV, m/z 54-850) erfolgten durch die Abteilung Physikalische Chemie der Schering AG. Schmelzpunkte wurden am Schmelzpunktautomaten (Mettler) ermittelt.

Die Identitätsprüfung aller hergestellter Verbindungen sowie Drehwertbestimmung chiraler Produkte wurde von der Abteilung für Strukturaufklärung (STA, Schering AG) mittels NMR-, MS-, IR- und UV-VIS-Standardmethoden erbracht und ein entsprechendes Analysen-

zertifikat erstellt. Nach Erfassung der physikalischen Daten erfolgte der Eintrag in die Schering-interne Zentralkartei. Jeder der in die Zentralkartei eingestellten Verbindungen wurde eine Nummer (ZK-Nummer) zugeordnet.

4.1.2 Isotopenchemie

Die radioaktive Markierung zur Herstellung der ^3H -Tracer von racemischem sowie 2*R*(+)-8-PN und 2*S*(-)-8-PN wurde in der Abteilung für Isotopenchemie der Schering AG durchgeführt. Die Hydrierung mit Tritiumgas (Amersham-Buchler, Braunschweig) erfolgte in einer Mikrohydrieranlage, in der die Aufnahme von Tritiumgas online überwacht werden konnte (siehe unter 5.1.1).

Die Stabilität des Tritium-Einbaus im Molekül wurde durch Radioaktivitätsbilanzierung nach wiederholtem Lösen und Eindampfen der markierten Probe in Methanol bestätigt. Radioaktivitätsmessung erfolgte nach der Flüssig-Szintillations-Methode (siehe auch unter 4.3.6). Die Reinheit des Tracers wurde unmittelbar vor Verwendung über Radio-HPLC Messung (siehe unter 4.3.7) bestimmt.

4.2 Molekularbiologische u. biochemische Methoden & Materialien

4.2.1 Puffer und Lösungen

Gebräuchliche Puffer und Lösungen für biochemische und molekularbiologische Routine-Anwendungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (Sambrook and Russel, 2000). Deionisiertes Wasser wurde gegebenenfalls zusätzlich in einer Millipore-Anlage ultrafiltriert.

Steroidrezeptor- Präparations-Puffer	0.02 mM	Tris-HCl pH 7.5
	0.5 mM	EDTA
	2 mM	DTT
	20 mM	Molybdat
	0.3 mM	PMSF
	0.3 mM	Aprotinin [®] (Sigma)
	1 mM	Pepstatin [®] (Sigma)
	10 mM	Leupeptin [®] (Sigma)
20 % (v/v)	Glycerin	
Steroidrezeptor-Bindungs- Puffer	10 mM	Tris-HCl pH 7.4
	1.5 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
Aktivkohle-Puffer	10 mM	Tris-HCl pH 7.4
	1.5 mM	EDTA
	15 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	Aktivkohle
	0.2 % (w/v)	Dextran T70
Gewebe-Homogenat-Puffer	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris-HCl, pH 7.6
	1 mM	EDTA
1 M Acetat-Puffer pH 4.6	30 ml	1 M NaOH
	50 ml	1 M HOAc
Franz-Kammer Rezeptor- Lösung	1 x	PBS
	1 mg/ml	BSA
	100 U/ml	Penicillin (Roche)
	100 µg/ml	Streptomycin (Roche)

Tabelle 11: Übersicht der nicht als Standard-Puffer beschriebenen Gebrauchslösungen.

4.2.2 Steroid-Rezeptor-Bindung

Die Bindung der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen und Synthesederivate an humane Steroidhormon-Rezeptoren (SR) sowie die Untersuchungen zur Transaktivierung und Transsuppression im *in vitro* Zellsystem ist nachfolgend beispielhaft für den Estrogenrezeptor (ER) beschrieben. Analoge Studien wurden für den Androgen-Rezeptor (AR), Progesteron-Rezeptor (PR), Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) und Glucocorticoid-Rezeptor (GR) durchgeführt.

4.2.2.1 ER-Bindung

4.2.2.1.1 Gewinnung von ER-reichem Cytosol

SF-9 Insektenzellkulturen wurden nach Vorschrift (K.-H. Fritzemeier und C. Hegele-Hartung, 1999) über das Baculovirus-Expressionssystem für humanen ER α bzw. ER β infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 15 min bei 100 x g (Heraeus Variofuge 3.2 RS, 600 rpm) geerntet. Das Zellpellet wurde in 1/10 des Kulturvolumens in eiskaltem Präparations-Puffer resuspendiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Auftauen und Einfrieren wurden dreimal wiederholt, das Homogenat dann für 1 h bei 100.000 x g (Beckmann UZ, Ti 75, 40.000 rpm) zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration (BioRad) und Einstellung auf ca. 5-7 μ g/ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.2.1.2 ER-Bindungs-Assay

Der Bindungsansatz wurde in 96-well Platten durchgeführt. 5 μ l der Liganden-Lösungen (10 % DMSO) in aufsteigenden Konzentrationen wurden als Doppelwerte mit 15 μ l 13,33 nM (2,4,6,7-³H)-17- β Estradiol (80 Ci/mmol; NEN) und 30 μ l SF-9 Cytosol gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Auf Mikrofiltrations-Platten (Eppendorf) wurden 50 μ l/well Aktivkohle-Puffer vorgelegt, 45 μ l des Inkubationsansatzes zugegeben und unter Vakuum (Packard) filtriert. Nach Zugabe von 200 μ l/well Microszint-40TM (Packard) wurden die Platten mit Klarsichtfolie versiegelt und im Luminometer (TopCount NXT, Packard) vermessen. Die Experimente wurden dreimal wiederholt.

4.2.3 Verwendete Zellen

Zelltyp	Beschreibung	Kulturbedingungen	Herkunft
U2-OS	Humanes Osteosarcom, kein endogener ER α / β	D-MEM™, 10 % FCS, PSG, 37 °C, 7.5 % CO ₂	ATCC (HTB-96)
PC-3	Humanes Prostata-Adenocarcinom kein endogener AR	RPMI™ 1640, 10 % FCS, PSG, 37 °C, 5 % CO ₂	ATCC (CRL-35)
MCF-7	Humanes Mamma-Adenocarcinom, ER α >ER β	RPMI™ 1640, 10 % FCS (5 % CCS), PSG, Insulin, (E ₂), 37 °C, 5 % CO ₂	ATCC (HTB-22)
T47D	Humanes Mamma-Carcinom, ER α / β	RPMI™ 1640, 10 % FCS (5 % CCS), PSG, Insulin, (E ₂), 37 °C, 5 % CO ₂	ICLC (HTL-98003)

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien.

4.2.4 Verwendeter Bakterienstamm

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	supE44, DlacU169, f80, lacZDM15, hsdR17, recA1, 'endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Invitrogen

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten *E.coli*-Stämme

Medien für Bakterienkulturen, Transformation nach der Hitzeschock-Methode und Selektion auf Ampicillin-Agarplatten wurden wie zuvor beschrieben hergestellt bzw. durchgeführt (Sambrook and Russel, 2000).

4.2.5 Verwendete Plasmide

Vector	Beschreibung	Klonierungen	Herkunft
pGL3	Eukaryotischer Luciferase-Reporter; <i>luc</i> ⁺ , SV 40 poly (A), f1 origin, <i>amp</i> ^r	(ERE) ₂ <i>tk</i> bzw. (ARE)-MMTV	Promega
pSG5	Mammalia Expressions-Vector; SV 40 / T 7 Promotor, SV 40 poly (A), f1 origin, <i>amp</i> ^r	Full length cDNA ER α , ER β , AR	Stratagene

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid-DNA wurde in üblicher Weise (Sambrook and Russel, 2000) in DH5 α Zellen amplifiziert und mit dem Quiaprep Spin Miniprep kit bzw. Plasmid Maxi kit (Qiagen) isoliert.

4.2.6 Transaktivierung und Transsuppression

4.2.6.1 Kultur und Assay in U2-OS Zellen

Humane U2-OS Zellen wurden in phenolrotfreiem D-MEMTM (Gibco BRL) mit 5 % FCS (Seromed) und 100 U/ml Penicillin / 100 μ g/ml Streptomycin (Seromed) / 2 mM L-Glutamin (PSG) (Gibco BRL) bei 37°C und 7.5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h auf Magermedium (phenolrotfreies D-MEMTM mit 5 % CCS und PSG) wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert und 10⁴ Zellen/100 μ l pro well in Magermedium auf 96-well Platten ausgebracht. Nach 16 h erfolgte Transfektion mit 2 ng/well pSG5 (ER α / β) und 100 ng/well pGL3 MMTV-(ERE)₂*luc*⁺ mit FuGENETM 6 Reagenz (Roche) in Opti-MEMTM (Gibco BRL). Am Tag drei erfolgte die Behandlung mit Testsubstanzen in Magermedium. Stammlösungen von Liganden wurden als 10⁻³ M in DMSO angesetzt und in D-MEMTM verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO auf den Zellen 0,1 % betrug. Nach 16-18 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 30 μ l „Lysis Reagent“ (Promega) pro well 30 min lysiert. Nach Zugabe von je 30 μ l *Luciferase Substrate A* und *B* (PharMingen) pro well wurden die Platten am Luminometer (Dynatech ML3000) vermessen. Luciferaseaktivitäten wurden 4-fach bestimmt und die Experimente dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Zur Transsuppression wurden die co-transfizierten Zellen in Magermedium nach Zusatz von 3 \cdot 10⁻¹¹ M E₂ für ER α bzw. 3 \cdot 10⁻¹⁰ M

E₂ (ZK 5018 Schering AG) für ERβ mit den Liganden behandelt. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte als Zweipunktmessung als 10⁻⁷ M und 10⁻⁶ M Verdünnungen.

4.2.6.2 Kultur und Assay in PC-3 Zellen

PC-3 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, 10 % FCS und PSG bei 5 % CO₂ kultiviert. 6 h vor Transfektion wurden 10⁷ Zellen in einer 162 cm² Kulturflasche auf Magermedium RPMI™ 1640, 5 % CCS und PSG ausgebracht und dann mit 24 µg pGL3-MMTV-ARE-*luc*⁺ und 3 µg pSG5(AR) mit FuGENE™ in Opti-MEM™ transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Waschen mit PBS⁻ trypsinisiert und 2·10⁴ Zellen/50 µl pro well auf 96-well Platten ausgebracht. 6 h später erfolgte die Behandlung mit Testsubstanzen in Magermedium. Stammlösungen von Liganden wurden als 10⁻³ M in DMSO angesetzt und in RPMI™ 1640 verdünnt, so dass die Endkonzentration an DMSO auf den Zellen 0,1 % betrug. Nach 16-18 h wurde das Medium entfernt und nach Zugabe von 100 µl/well LucLite (Packard) wurden die Platten am Luminometer (Dynatech ML3000) vermessen. Für die Transsuppression wurden die co-transfizierten PC-3 Zellen in Magermedium nach Zusatz von 10⁻¹⁰ M R1881 (Schering AG) mit den Liganden behandelt. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte als Verdünnungsreihe.

4.2.7 In vitro Proliferation von MCF-7 und T47D

4.2.7.1 Zellkultur und Assay-Durchführung

Beide humane Brustkrebs-Zelllinien wurden in phenolrotfreiem RPMI™ 1640 Medium (Gibco BRL), 10 % FCS, 1 U/ml Insulin (Sigma), 10⁻¹⁰ M E₂ (Schering AG) und PSG bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert und auf 96-well Platten (5.000 Zellen/100 µl pro well) in Kulturmedium ausgebracht. Am Tag zwei erfolgte die Behandlung mit Testsubstanzen nach Waschen mit PBS⁻ in 200 µl/well Magermedium aus phenolrotfreiem RPMI™ 1640, 5 % CCS, 1 U/ml Insulin und PSG. Für die Kontrollen wurden dem Medium 10⁻⁸ M 4-Hydroxy-Tamoxifen (Schering AG) zugegeben. Die Behandlung wurde an Tag fünf wiederholt. Stammlösungen wurden 10⁻³ M in DMSO angesetzt und in RPMI 1640 verdünnt, so dass die Endkonzentration an DMSO auf den Zellen 0,1 % betrug. Am Tag acht wurden 20 µl 11 %ige Glutardialdehyd-Lösung pro well zugegeben und 15 min bei RT fi-

xiert. Die Platten wurden mehrmals mit aqua bidest gewaschen und luftgetrocknet. Danach wurden 100 µl/well Kristallviolett-Färbelösung zugegeben und 20 min bei RT gefärbt. Die Platten wurden mehrfach mit aqua bidest gewaschen, nach Lufttrocknung mit 100 µl/well 10 %iger Essigsäure versetzt und der Farbstoff 20 min herausgelöst. Photometrische Messung erfolgte bei 595 nm mittels 96-well Reader (Tecan). Alle Werte wurden 4-fach bestimmt und die Experimente dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

4.2.8 In vitro Expressionsanalyse in MCF-7 Zellen

4.2.8.1 Zellkultur

MCF-7 Zellen wurden wie unter 2.7.1 beschrieben kultiviert. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurde auf CCS-Magermedium gewechselt. Einen Tag vor Beginn wurden für die 6 h-Inkubation 10^6 Zellen/well in 3 ml Medium auf 6-well Platten ausgebracht, für die 48 h-Inkubation entsprechend $5 \cdot 10^5$ Zellen/well. Behandlungen mit Liganden wurden analog wie unter 2.7.1 beschrieben ebenfalls in CCS-Magermedium mit final 0,1 % DMSO durchgeführt und das Medium nach 6 bzw. 48 h vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und danach entweder direkt im Well mit Lysis-Puffer (Qiagen RNeasy™ Kit) behandelt oder zunächst eingefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

4.2.8.2 RNA-Isolierung und cDNA-Erststrangsynthese

Lysate der MCF-7 Zellen wurden homogenisiert (QIA-Shredder™) und die Gesamt-RNA über das RNeasy™ System (Qiagen) isoliert, wobei ein DNase-Verdau auf der Säule eingeschlossen wurde. Die Ausbeute und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt und 5µg Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Erststrangsynthese gemäß dem First-Strand cDNA Synthesis Kit™ (Amersham Biosciences) eingesetzt. Gereinigte RNA und cDNA wurden in ddH₂O bei -80 °C gelagert.

4.2.8.3 Real-time quantitative PCR (SYBR™ Green)

Zur Validierung der PCR-Effizienz für Target- und Referenzgene wurde zunächst ein Gesamt-cDNA-Template aller Proben (2.8.2) hergestellt, vorab 1:10 verdünnt und hiervon eine Reihe von sechs aufeinander folgenden 1:2 Verdünnungen hergestellt. Für jedes zu untersuchende Gen wurde ein Master-Mix mit Primern hergestellt, zu dem im Well das entsprechen-

de cDNA-Template pipettiert wurde. Als Referenzen wurde humanes Cyclophilin (*CyP*) gewählt. Auf einer *Micro-Amp Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems) wurden so die Reihen mit identischem Template (sieben Verdünnungen und eine No-Template-Control (NTC)) sowie jeweils zwei Spalten mit identischem Master Mix belegt, so dass pro Template-Verdünnung und Gen Doppelwerte bestimmt werden konnten. Beispiel eines PCR-Ansatzes:

SYBRTM-Green Master Mix:

225.0	μl	2x SYBR TM Green (Applied Biosystems)
13.5	μl	Primer-Mix (forward + reverse, je 10 μM)
31.5	μl	ddH ₂ O
<hr/>		
250.0	μl	

PCR-Ansatz:

15	μl	SYB TM R-Green Master Mix
10	μl	cDNA Template
<hr/>		
25	μl	

Die 96-well Platte wurde mit durchsichtiger Abdeckfolie (Applied Biosystems) verschlossen und im *ABITM SDS 7700* (Applied Biosystems) für 10 min auf 95°C erhitzt und dann 40 Zyklen (15 sec 95° C, 60 sec 60° C) unterzogen.

Zur Amplicon-Analyse wurden direkt im Anschluss an die PCR im *ABITM SDS 7700* Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgenommen (15 sec 95° C; 20 sec 60° C, 19:59 min linear bis 95° C, 15 sec 95° C). Für die Berechnung der PCR-Effizienzen wurden die einzelnen ΔC_t -Werte für jedes Target-Gen ($C_{t(\text{target})} - C_{t(\text{referenz})}$) gegen den Logarithmus der cDNA-Menge der einzelnen Verdünnungsstufen aufgetragen. Im Idealfall einer gleich effizienten Amplifikation von Referenz- und Target-Gen ergeben sich konstante ΔC_t -Werte über den

gesamten Verdünnungsbereich. Vergleichbare PCR-Effizienzen von Target- und Referenz-Gen sind in dem Fall gegeben, wenn für die Ausgleichsgerade der ΔC_t -Werte gilt:

$$f(x) = a \cdot x + b ; \text{ mit } |a| \leq 0.1$$

Gleichung 1: Geradengleichung zur Bestimmung von PCR-Effizienzen zwischen Target-Gen und Referenz-Gen in Abhängigkeit der Template-Verdünnungen.

Für die quantitative Expressionsanalyse in verschiedenen Proben wurde nach Ermittlung von ΔC_t ($C_{t(\text{target})} - C_{t(\text{referenz})}$) der $\Delta\Delta C_t$ -Wert ($\Delta C_{t(\text{Kontrolle})} - \Delta C_{t(\text{Probe})}$) bestimmt und dieser umgerechnet in die relative Expression des Target-Gens in der Probe im Vergleich zur Kontrolle:

$$\text{Rel. Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der relativen Expression eines Target-Gens im Vergleich zum Referenz-Gen über den $\Delta\Delta C_t$ -Wert.

Da sich der Fehler in dieser Berechnung exponentiell fortpflanzt, wurden aus den Standardabweichungen (SD) der jeweiligen $\Delta\Delta C_t$ -Werte positive und negative Fehler separat errechnet.

4.2.8.4 Verwendete RT-PCR-Primer

Geeignete Primerpaare für die RT-PCR Genexpressionsanalyse in humanen MCF-7 Zellen wurden mit dem Programm *ABI PrimerExpress*[®] (Applied Biosystems) ausgewählt und von Invitrogen Life Technologies bezogen. Primer-Stammlösungen (100 μM) in ddH₂O wurden bei -20 °C gelagert. Gebrauchslösungen wurden zu 10 μM angesetzt.

Gen	Gen-ID	Primer-Sequenz (5'→3')	T _m Primer	Länge Amplicon	T _m Amplicon
<i>bax</i>	NM138761	f: <i>CTCAGGATGCGTCCACCAA</i>	62.4 °C	86 bp	79.6 °C
		r: <i>CATCCTCTGCAGCTCCATGTT</i>	61.8 °C		
<i>bcl-2</i>	NM000633	f: <i>TGGCCTTCTTTGAGTTCGGT</i>	61.2 °C	108 bp	81.2 °C
		r: <i>GCCGGTTCAGGTA CT CAGTCA</i>	61.7 °C		
<i>c-fos</i>	NM005252	f: <i>ACTCCCAGCTGCACTGCTTAC</i>	61.8 °C	131 bp	83.0 °C
		r: <i>GAGCTGAGCGAGTCAGAGGAA</i>	61.3 °C		
<i>CyP</i>	NM000942	f: <i>GAAGTTGGCCGCATGAAGA</i>	61.1 °C	67 bp	77.9 °C
		r: <i>GCCTAAAGTTCTCGGCCGT</i>	60.9 °C		
<i>E-Cad</i>	NM004360	f: <i>CACCAACGATAATCCTCCGATC</i>	62.0 °C	82 bp	77.8 °C
		r: <i>GGTGATTACGACGTTAGCCTCG</i>	62.3 °C		
<i>ERα</i>	NM000125	f: <i>ATTGGTCTCGTCTGGCGCT</i>	62.4 °C	105 bp	79.6 °C
		r: <i>CTCCACCATGCCCTCTACACA</i>	62.5 °C		
<i>PR</i>	NM000926	f: <i>CCGGGCACTGAGTGTTGAAT</i>	62.5 °C	86 bp	75.0 °C
		r: <i>GTTTCACCATCCCTGCCAAT</i>	61.2 °C		
<i>pS2</i>	NM003225	f: <i>CCCTCCCAGTGTGCAAATAAG</i>	60.9 °C	93 bp	79.4 °C
		r: <i>TGGAGGGACGTCGATGGTAT</i>	61.8 °C		
<i>srf</i>	NM003131	f: <i>GACCGGCAAGGCACTGATT</i>	62.6 °C	130 bp	81.3 °C
		r: <i>CTCCGACACCTGGTAGGTGAG</i>	61.2 °C		
<i>VDR</i>	NM000376	f: <i>CCTTCACCATGGACGACATG</i>	61.5 °C	78 bp	79.1 °C
		r: <i>CGGCTTTGGTCACGTCACT</i>	61.4 °C		

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten RT-PCR-Primer für die Expressionsanalyse in humanen MCF-7 Zellen.

4.3 Pharmakologische Methoden und Materialien

4.3.1 ELISA-Messung von 8-PN in biologischen und nicht-biologischen Proben

Für die Probenvorbereitung zur ELISA-Messung von 8-PN wurden von den Proben Diethyletherextrakte hergestellt. Hierzu wurden 250 µl Probe in einem 10 ml RIA-Glasröhrchen mit 250 µl physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius) verdünnt, mit 4 ml frischem Diethylether überschichtet und für 30 min im Überkopffrotor (Heidolph) extrahiert. Es wurde für 10 min bei 1.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Proben danach 5 min im EtOH-Trockeneisbad ausgefroren. Die flüssige Etherphase wurde dekantiert, im Stickstoffstrom bei RT zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 ml ELISA-Puffer sorgfältig gelöst (Vortexer).

Die Durchführung des ELISA erfolgte gemäß der Anleitung der Fa. Biogenes, die das kompetitive ELISA-Kit im Auftrag hergestellt hat. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt, Puffer-Gebrauchslösung und POD-Konjugatgebrauchslösung zuvor durch Verdünnung hergestellt. Auf den mit Antikörper beschichteten 96-well Platten wurden 100 µl Probenlösung bzw. Standardlösung pro well als Dreifach-Werte unter Schütteln für 10 min inkubiert, nach Zugabe von 50 µl pro well POD-Konjugatlösung für weitere 30 min. Nach Entleeren der wells, 4-maligem Waschen mit aqua bidest und Entfernen der Restfeuchtigkeit durch mehrmaliges Ausklopfen der Platten auf Zellstoff wurden 100 µl frische Färbelösung pro well zugesetzt und im Dunkeln unter Schütteln für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Stoppreagenz wurden die Platten bei 450 nm am ELISA-Reader vermessen und mit dem Programm *WinEasyFitting*[®] (Teacan) ausgewertet.

4.3.2 HPLC-Fraktionierung von Serum- und Urinproben

Zur HPLC-Fraktionierung wurden die Serum- und Urinproben zunächst wie unter 4.3.1 beschrieben über Ether-Extraktion vorbereitet. Der abgedampfte Ether-Extrakt von 0.5-1.5 ml Serum bzw. Urin wurde in 100 µl MeOH p.a. aufgenommen und Aliquots von 10-20 µl auf die Säule gegeben (HPLC-Anlage Waters 2690 Alliance Separation Module).

Stationäre Phase	X-Terra MS C ₁₈ 5 µm (2.1 x 150 mm)
Mobile Phase	A: Acetonitril p.a. B: 0.01 M NaH ₂ PO ₄ pH: 3.0
Gradient	0.0-0.5 min : 30 % A (isokratisch) 0.5-10.0 min : 30 % bis 40 % A (linear) 10.0-30.0 min : 40 % bis 70 % A (linear) 30.0-33.0 min : 99 % A (isokratisch) 33.0-45.0 min : 30 % A (isokratisch)
Fluss & Druck	0.3 ml/min ; 0-600 bar (min-max)
Temperatur	40 °C (Säule)
Retentionszeit	ZK 222302 : 16.2 min
Detektorsystem	UV-DAD (210 nm)

Tabelle 16: HPLC-Bedingungen für die Fraktionierung von Serum- und Urinproben aus Ratte.

Es wurden 1-min-Fractionen gesammelt, per ELISA vermessen und mit dem zugehörigen Chromatogramm ausgewertet.

4.3.3 Aufarbeitung von Geweben und Fäces aus Kinetikstudien

Hirn und Leber von Ratten aus Pharmakokinetikstudien wurden direkt nach Entnahme bei -20 °C gelagert. Die Gewebe wurden nach Auftauen gewogen und mit etwa der 5-fachen Menge an Homogenatpuffer im Elektropotter (Braun) für ca. 1 min im Eiswasserbad vollständig homogenisiert. Fäcesproben von Ratten wurden direkt in MeOH p.a. aufgenommen und am Ultra-Turrax (Janke&Kunkel) homogenisiert. Fäces von Hunden wurden zunächst bei 60°C im Trommeltrockner getrocknet und anschließend in MeOH p.a. homogenisiert. Von allen Fäcesproben wurden nach Sedimentation die MeOH-Überstände zur Analyse gewonnen. Gewebekomponenten wurden wie Serumproben behandelt.

4.3.4 Chirale HPLC-Analyse der Enantiomere 2S(-)8-PN und 2R(+)-8-PN

Sowohl für die Analyse im Anschluss an die Enantiomeren-Trennung von rac. 8-PN (ZK 222302) in 2S(-)8-PN (ZK 222660) und 2R(+)-8-PN (ZK 222661, siehe auch unter 5.1) als auch für die Analyse des Metabolismus der beiden Enantiomere in Tierstudien wurden eine chirale HPLC-Analytik eingesetzt. Serum-, Urin- und Fäcesproben wurden wie beschrieben (siehe 4.3.1) zunächst über Diethyletherextraktion bzw. Methanolextraktion vorbereitet und die Extrakte anschließend direkt injiziert.

Stationäre Phase	Chiralpak AD, 250 x 4,6 mm, 10 µm
Mobile Phase	A: Hexan p.a. B: Ethanol p.a.
Gradient	0-15 min: 20 % B (isokratisch)
Fluss & Druck	1 ml/min; 0-400 bar (min-max.)
Temperatur	21 °C (Säule)
Detektor	UV-DAD 290 nm
Retentionszeiten	ZK 222660 (-) : 7.4 min ZK 222661 (+): 6.0 min
Quantifizierung	AUC (100 %-Methode)

Tabelle 17: HPLC-Bedingungen zur Enantiomeren-Trennung von 8-PN.

4.3.5 Konjugatsspaltung biologischer Proben

Von Serum und Galle wurden 0.8 ml Probe mit 0.2 ml 1 M Acetat-Puffer auf pH 4.8 eingestellt. Urinproben wurden 1:2 mit 1 M Acetat-Puffer pH 4.8 verdünnt, je 300 µl Rezeptormedium aus Franz-Kammer Versuchen wurden mit 50 µl Acetat-Puffer pH 3.5 angesäuert. Nach

Zugabe von 20 µl (ca. 0.1 U) β-Glucuronidase / Aryl-Sulfatase (aus *Helix pomatia*, Roche) wurde für 12-18 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Messung der Restenzymaktivität geprüft. Dazu wurden 20 µl Inkubationsgemisch mit 200 µl einer Lösung von 10 mg/ml 4-Nitrophenyl-β-D-glucosiduronid (Roche) in 1 M Acetat-Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Trat keine sichtbare Gelbfärbung durch freigesetztes 4-Nitrophenol ein, wurde die Konjugatspaltung durch Zugabe von frischem Enzym wiederholt.

4.3.6 Franz-Kammer Haut-Diffusions-Modell

Vor Beginn des Experimentes wurde das Rezeptor-Medium auf 65 °C und die Franz-Kammern auf ca. 33 °C vorgeheizt, der Fluss durch die Akzeptorkammer auf 2 ml/min eingestellt. Die Mäuse (Harlan-Winkelmann MF-1 hr/hr; männlich, haarlos, 25-30 Wochen alt) wurden in Diethylether-Atmosphäre getötet und die Haut im Bereich von Brust und Rücken vorsichtig präpariert, wobei das subkutane Fettgewebe möglichst vollständig entfernt wurde. Aus einer Maus wurden 3 Hautfelder präpariert, für jedes Hautkammerfeld wurden ca. 3 cm² haarlose Haut benötigt. Die Häute wurden mit der *Stratum Corneum* Seite auf die Unterseite der Donorkammer gelegt, geglättet und zurechtgeschnitten. Nach Fixierung und Einsetzen in den Thermostatblock folgte die Spülung der Kammern mit Rezeptor-Medium, bis eventuelle Luftblasen vollständig entfernt waren. Vor Probenauftragung wurden etwa 1 ml Vorfraktion gesammelt.

Zur Herstellung der Formulierungen wurden je 1.4 mg unmarkiertes rac. 8-PN (ZK 222302) in 350 µl EtOH gelöst und mit 1.3 MBq (35 µCi) tritiiertem ZK 222302, in 200 µl EtOH, verschnitten. Nach Abblasen des Lösemittels im Stickstoffstrom bei RT wurde der kristalline Rückstand in 140 µl frisch angesetzter Prüfformulierung gelöst. Es wurden 20 µl der Formulierung (200 µg ZK 222302) pro Hautfeld appliziert und mit der Pipettenspitze vorsichtig gleichmäßig verteilt. Drei Standards zu je 20 µl wurden von jeder Formulierung entnommen. Der Versuch wurde über 30 h unter nicht-okklusiven Bedingungen durchgeführt. In den ersten sechs Stunden nach Applikation wurden 2 h-Fractionen gesammelt, nach 6-30 h wurden 4 h-Fractionen aufgefangen. Nach Beendigung wurde die Haut aus den Kammern entfernt, Formulierungsüberstand durch vorsichtiges Abtupfen mit Wattestäbchen (5x) aufgenommen. Das *Stratum Corneum* wurde durch Abreißen (3x) mit Tesafilm (Beiersdorf) isoliert und die Resthaut mit einer Schere fein zerkleinert. Wattestäbchen, Tesafilm-Abrisse und die Resthaut wurden in 4 ml Ethylacetat über Nacht bei 4 °C extrahiert.

Aliquots von 1 ml jeder Probe wurden mit 4 ml Atomlight (Packard) Flüssigzintillator-Reagenz versetzt und im Szintillator-Counter als Doppelwerte vermessen. Quenchkorrekturen wurden mit der internen SOAP-Software (Schering AG) durchgeführt, Flüsse und Verteilung der Substanz anhand der spezifischen Aktivität aus den Dreifach-Werten bestimmt. Die Experimente wurden zweifach durchgeführt.

4.3.7 Radio-HPLC

Stationäre Phase	Kromasil C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm
Mobile Phase	A: Acetonitril p.a. B: H ₂ O p.a. mit 0.2 % HOAc p.a. (v/v)
Gradient	0.0-1.0 min : 20 % A (isokratisch) 1.0-20.0 min : 20 % bis 80 % A (linear) 20.0-21.0 min : 80 % bis 20 % A (linear) 21.0-25.0 min : 20 % A (isokratisch)
Fluss & Druck	1 ml/min ; 0-400 bar (min-max)
Temperatur	21 °C (Säule)
Retentionszeit	[³ H] ₂ -ZK 222302 : 18.2 min
Detektorsystem	Durchfluss-Zelle: 525TR (Packard) Szintillator: Ultima-Flo™ (Packard)

Tabelle 18 : HPLC-Bedingungen für die Analyse von radioaktivem [³H]₂-8-PN.

Die Analyse ausgewählter Proben aus den Franz-Kammer Versuchen (siehe 4.3.6) auf [³H]₂-ZK 222302 wurde über eine Radio-HPLC Anlage (2x Kontron HPLC-Pump 420, Autosampler 460) durchgeführt. Wässrige Proben wurden direkt injiziert (max. 200 µl). Proben in organischen Lösemitteln wurden vor Injektion in Start-Eluent (20 % Acetonitril) verdünnt.

4.4 Tierexperimentelle Materialien und Methoden

4.4.1 Studien zur *in vivo* Estrogenität

4.4.1.1 Uterus-Wachstumstest an der juvenilen Ratte

Der Uterus-Wachstumstest wurde in der Abteilung Gynecology&Andrology / Female Health Care der Schering AG durchgeführt. Sechs weibliche Ratten im Alter von 21-25 Tagen wurde pro Gruppe eingesetzt. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde den Tieren 0.5 ml Testsubstanz, gelöst in Ethanol/Arachisöl 2:1 (v/v), s.c. ins Nackenfell injiziert. Am vierten Tag wurden die Tiere getötet, die Uteri entnommen, Vaginal- und Lumen-Flüssigkeit entfernt, gewogen und das relative Uterusgewicht berechnet. Die Uteri wurden anschließend in 3.7 %iger Formaldehyd-Lösung (pH 7.1) fixiert und für histologische Untersuchungen vorbereitet. Dazu wurden sie in Paraffin eingebettet und am Mikrotom in transverse Sektionen von 5 µm Dicke geschnitten. Die histologischen Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und die Höhe des luminalen Uterusepithels unter dem Mikroskop bestimmt.

4.4.2 Studien zur Pharmakokinetik von 8-PN

Insgesamt zwei Kinetik-Studien zu rac. 8-PN (ZK 222302) an Ratte und Hund wurden in Zusammenarbeit mit der Funktion Präklinische Pharmakokinetik (PPhK) der Schering AG durchgeführt.

4.4.2.1 Pharmakokinetik-Studie an weiblichen Wistar-Ratten (KIST20020123)

Die Untersuchung wurde an erwachsenen, weiblichen Ratten (Wistar, 180-210 g; Versuchstier-Züchtung, Schönwalde) durchgeführt. Dazu wurden einer Tiergruppe 250 mg ZK 222302 pro kg Körpergewicht (BW) intragastral (i.g.) als *Bolus* in Form einer Mikrokristallsuspension (MCS) in Wasser verabreicht. Einer zweiten Gruppe Ratten wurden 30 mg ZK 222302/kg BW ebenfalls als *Bolus* in Form einer wässrigen Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HPCD)-Lösung subkutan (s.c.) ins Nackenfell injiziert.

Zur Bestimmung der Konzentration von ZK 222302 im Serum wurde den Tieren Blut aus der *Vena Cava* entnommen. Drei Tiere pro Zeit-Messpunkt wurden mit Diethylether betäubt und entblutet. 3-4 ml Blut wurden in Serum-Monovetten (Sarstedt) abgenommen. Das

Serum wurde durch Zentrifugation (20 min, 1000x g, 4 °C) gewonnen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Poolproben über den gesamten Messbereich (AUC-Pool) wurden durch Zusammenführung zeitlich gewichteter Anteile für jeden Messpunkt und jedes Tier hergestellt. Aliquots dieser Pools wurden zur Konjugatspaltung (siehe 4.3.5) mit β -Glucuronidase / Arylsulfatase behandelt, um den Anteil an konjugiertem ZK 222302 in Serum zu bestimmen.

Zu jeweils drei Messpunkten wurde den Tieren nach Entbluten Leber und Hirn entnommen und wie unter 4.3.3 beschrieben aufgearbeitet. Je drei Tiere pro Gruppe wurden über 24 h in Stoffwechsellkäfigen gehalten, um individuelle Urin- und Fäcesproben zu erhalten. Diese wurden entsprechend individuell analysiert.

4.4.2.2 Pharmakokinetik-Studie an weiblichen Beagle-Hunden (KIST20020177)

Zwei Gruppen mit je drei erwachsenen, weiblichen Beagle-Hunden (S. Morini, Italien und Marshall Farms, USA) wurden in dieser Kinetik-Studie eingesetzt.

Der ersten Gruppe wurden 125 mg ZK 222302/kg BW intragastral (i.g.) als *Bolus* in Form einer Mikrokristallsuspension (MCS) in Wasser verabreicht. Der zweiten Gruppe wurden 10 mg ZK 222302/kg BW als Infusion in Form einer wässrigen Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HPCD)-Lösung intravenös (i.v.) über 1 min in die *Vena Cephalica* des Vorderbeines injiziert. Zur Konzentrationsbestimmung von ZK 222302 im Serum wurden den Tieren 4-5 ml Blut aus der *Vena Cephalica* des anderen Beines entnommen. Das Serum wurde durch Zentrifugation (20 min, 1000x g, 4 °C) gewonnen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Poolproben über den gesamten Messbereich (AUC-Pool) wurden durch Zusammenführung zeitlich gewichteter Anteile für jeden Messpunkt eines jeden Tieres hergestellt. Aliquots dieser Pools wurden zur Konjugatspaltung (4.3.5) mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase behandelt, um den Anteil an konjugiertem ZK 222302 in Serum zu bestimmen. Individuelle 24h-Urin- und Fäcesproben wurden gesammelt und entsprechend analysiert (siehe 4.3.1 bzw. 4.3.3).

4.4.3 Methoden zur Antikörper-Gewinnung aus Kaninchen

Die Arbeiten zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen wurden von der Fa. Biogenes Biopolymere mbH (Berlin-Köpenick) nach hausinternen Standardprotokollen durchgeführt.

4.4.3.1 Konjugat-Synthese

Die Carbonsäuren der Haptene wurden mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDAC) und *N*-Hydroxysuccinimid in die aktiviertes Diimidester überführt und in Acetonitril an die Carrier-Proteine cBSA (Immunsierung) bzw. Ovalbumin (Titerbestimmung) gekoppelt. cBSA-Konjugate wurden zur Reinigung gegen PBS dialysiert, die OVA-Konjugate an Sephadex G-25 gereinigt. Durch spektrophotometrisch Vermessung im Vergleich zu reinem cBSA und OVA wurde der Beladungsgrad der Carrierproteine anhand des Extinktionskoeffizienten von 8-PN ($\epsilon_{293\text{nm}} = 16.500$), abgeschätzt. Die cBSA-Konjugate wurde bis zur Immunsierung in PBS verdünnt bei -20°C gelagert.

4.4.3.2 Immunsierung und Titerbestimmung

Die Immunsierung am Kaninchen erfolgte in zwei Tieren pro cBSA-Konjugat Dazu wurden intramuskulär 1 mg Konjugat in 0.5 ml PBS emulgiert und mit 1.0 ml Adjuvant (Biogenes) gespritzt.

Zeitpunkt	Behandlung	Bemerkung
0. Woche	Blutentnahme und Erstimmunsierung	1 ml Prä-Immuns Serum
1. Woche	1. Boost	-
2. Woche	2. Boost	-
4. Woche	3. Boost	-
5. Woche	1. Blutentnahme	5 ml zur Titerbestimmung
8. Woche	4. Boost	-
9. Woche	2. Blutentnahme	5 ml zur Titerbestimmung
12. Woche	5. Boost	-
13. Woche	3. Blutentnahme	5 ml zur Titerbestimmung
17. Woche	6. Boost	-
18. Woche	4. Blutentnahme	5 ml zur Titerbestimmung

28. Woche	7. Boost	-
29. Woche	5. Blutentnahme	50 ml (Ausblutung)

Tabelle 19 : Behandlungsschema zur Gewinnung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen mit cBSA-Konjugaten.

Nach jeder Blutentnahme wurde eine Titerbestimmung vorgenommen und die Titerentwicklung über die Behandlungsdauer verfolgt. Für Beschichtung von Mikrotiterplatten wurde aus 10 ml Serum das Gesamt-IgG über Chromatographie an Protein-A-Sepharose gewonnen.

4.4.3.3 Herstellung von Peroxidase-Tracern für ELISA

Die Carbonsäure-Haptene wurden mittels EDAC/NHS-Methode, analog zur Kopplungsmethode für die Carrier-Protein, an Peroxidase (POD, Boehringer) konjugiert. Die erhaltenen Peroxidase-Konjugate wurden an Sephadex G-25 mit PBS gereinigt und in stabilisierter Form bei +4 °C aufbewahrt. Der Beladungsgrad des POD-Konjugates wurde wie oben beschrieben spektrophotometrisch bestimmt.

5. ANHANG

5.1 Chemische Synthesen

[1]

Essigsäure-4-(7-acetoxy-5-hydroxy-4-oxo-chroman-2-yl)-phenylester
(OS-022; AZ 230204; ZK 308193)

3.0 g (11 mMol) Naringenin (Senn-Chemicals) wurden in 12 ml trockenem Pyridin gelöst, im Wasserbad auf RT gekühlt und 2.2 ml (23 mMol) Essigsäureanhydrid zugetropft. Nach Zugabe wurde für weitere 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Der leicht klebrige, ockerfarbene Niederschlag wurde abfiltriert, in EA aufgenommen und mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 ml Methanol ausgekocht. Es wurden nach Abkühlen, Filtration und Trocknung 3.2 g (9.0 mMol) **1** als feine farblose Nadeln erhalten (82 %). C₁₉H₁₆O₇. MW 356.33 g/mol. Smp: 141.1°C (MeOH). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 2.26 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.90 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.45 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 5.72 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.37 (d, 1H, *J*=2 Hz), 6.39 (d, 1H, *J*=2 Hz), 7.21 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.59 (d, 2H, *J*=8 Hz), 11.92 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 356 (M⁺, 28 %), 271 (46), 166 (43), 153 (95), 120 (100).

[2]

Essigsäure-4-(7-acetoxy-5-(3-methyl-but-2-enyl-oxy)-4-oxo-chroman-2-yl)-phenylester
(OS-023; AZ 230205; ZK 308194)

1.4 g (3.9 mMol) **1** wurden mit 1.25 g (4.8 mMol) P(Ph)₃ und 0.59 ml (5.8 mMol) 3-Methyl-2-buten-1-ol in 48 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 1.0 ml (6.3 mMol) DEAD in 12 ml trockenem THF zugetropft und nach Erwärmen auf RT für 2 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der dunkle, ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden

1.17 g (2.8 mMol) **2** als farbloser Feststoff erhalten (71 %). C₂₄H₂₄O₇. MW 424.45 g/mol. Smp: 115.8°C (Hexan/EA). ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.76 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.79 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.09 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 4.62 (d, 2H, *J*=7 Hz), 5.49 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.61 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.45 (d, 1H, *J*=2 Hz), 6.50 (d, 1H, *J*=2 Hz), 7.21 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.62 (d, 2H, *J*=8 Hz). (EI⁺)-MS: *m/z* 424 (M⁺, 10), 381 (14), 356 (60), 314 (40), 271 (49), 153 (41), 120 (100), 107 (31), 69 (97).

[3]

Essigsäure-4-(7-acetoxy-5-hydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl)-phenylester
(OS-024; AZ 230206; ZK 308949)

2.6 g (6.2 mMol) **2** wurden in 100 ml trockenem Dekalin unter kräftigem Rühren für 48 h rückflusiert (Badtemperatur: 200°C). Nach Abkühlen wurde das Lösemittel im Vakuum (98°C, 40 mbar) entfernt und der dunkle, ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 1.7 g (4.0 mMol) **3** als farbloser bis leicht gelblicher Feststoff erhalten (65 %). C₂₄H₂₄O₇. MW 424.45 g/mol. Smp: 142.9°C (Hexan/EA). ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.60 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.96 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.18 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.32 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 5.07 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.71 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.32 (s, 1H), 7.22 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.64 (d, 2H, *J*=8 Hz), 11.86 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 424 (M⁺, 45), 381 (85), 367 (33), 339 (26), 327 (32), 219 (86), 205 (90), 192 (63), 177 (98), 165 (88), 120 (100), 91 (39), 69 (48).

[4]

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**8-Prenylnaringenin****(OS-039; AZ 230207; ZK 222302)**

0.89 g (2.1 mMol) **3** wurden in 22 ml Methanol gelöst und 42 mg (0.3 mMol) K_2CO_3 eingetragen. Nach Zugabe von 0.6 ml Wasser wurde für 3 h bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der orange, ölige Rückstand in EA aufgenommen und mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 614 mg (1.8 mMol) **4** als leicht gelblicher Feststoff erhalten (86 %). $C_{20}H_{20}O_5$. MW 340.437 g/mol. Smp: 192°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 1.54 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.72 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.08 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.21 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.09 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.42 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 5.97 (s, 1H), 6.79 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.31 (d, 2H, $J=8$ Hz), 9.55 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 340 (M^+ , 66), 285 (18), 205 (80), 177 (89), 165 (100), 120 (32).

[4a]

2R (+) 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**2R(+) 8-Prenylnaringenin****(OS-009; AZ 230226; ZK 222661)**

und

[4b]

2S (-) 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**2S(-) 8-Prenylnaringenin****(OS-009; AZ 230234; ZK 222660)**

1.0 g (2.94 mMol) racemisches **4** wurden in 9 ml EtOH und 13.5 ml Hexan gelöst (45 mg/ml) und via chiraler HPLC getrennt (01-203). Stationäre Phase Chiralpak AD 20 μ m; 250x50.8 mm; Fluss 60 ml/min. Isokratischer Eluent Hexan/EtOH 9+1. UV-Detektor PDA 280 nm.

4a(+): 445 mg (1.31 mMol); Retentionszeit 28.0 min; Reinheit 99.8 % (99 % ee); $[\alpha]_D, Aceton$: +27.2°; Smp: 193.2°C (CH_2Cl_2); $C_{20}H_{20}O_5$; MW 340.37 g/mol.

4b(-): 490 mg (1.44 mMol) Retentionszeit 41.5 min; Reinheit 93.4 % (88.8 % ee); $[\alpha]_D, Aceton$: -25.0°; Smp: 192.8°C (CH_2Cl_2); $C_{20}H_{20}O_5$; MW 340.37 g/mol.

[5]

7-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxy-heptansäuremethylester**(OS-050; AZ 230211; ZK 308195)**

1.06 g (2.50 mMol) **4** wurden mit 1.30 g (5.81 mMol) 7-Bromheptansäuremethylester in 30 ml trockenem Aceton gelöst und 210 mg (1.52 mMol) K_2CO_3 eingetragen. Es wurde für 16 h unter Rühren rückflussiert. Nach Abkühlen wurde auf $NaHCO_3$ -Lösung gegossen und mit EA extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der gelbe, ölige Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 518 mg (1.08 mMol) leicht verunreinigter **5** als gelber Schaum erhalten (43 %). $C_{28}H_{34}O_7$. MW 482.57 g/mol. Smp: n.a. 1H -NMR (d_6 -Aceton, 300 MHz): δ 1.48 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 1.57 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 1.63 (s, 6H), 1.65 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 1.84 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 2.30(t, 2H, $J=7$ Hz) 2.79 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.17 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.24 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.63 (s, 3H), 4.11 (t, 2H, $J=6$ Hz), 5.16 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.48 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.15 (s, 1H), 6.91 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.55 (s, 1H), 12.28 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 482 (M^+ , 80), 467 (53), 347 (50), 219 (61), 177 (100), 165 (79).

[6]

7-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxy-heptansäure**(OS-069; AZ 230214; ZK 308197)**

1.48 g (3.14 mMol) **5** und 1.46 g (11 mMol) wasserfreies LiI wurden in 40 ml trockenem 2,4,6-Collidin vorgelegt und unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt (Badtemperatur 185°C). Die zunächst trübe, gelbe Lösung wurde rasch klar und rot, ein klumpiger Niederschlag fiel aus. Nach 4 h wurde abgebrochen, nach Abkühlen mit EA verdünnt und auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung annähernd neutral gewaschen (pH 5-6), über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der schmutzig gelbe Rückstand wurde in wenig CH_2Cl_2 ausgerührt und nach Filtration und Trocknung 960 mg (2.05 mMol) saubere **6** in Form beiger Plättchen erhalten (65 %). $C_{27}H_{32}O_7$. MW 468.55 g/mol. Smp: 167.8°C (CH_2Cl_2). 1H -NMR (d_6 -Aceton, 300 MHz): δ 1.48 (quin, 2H,

$J=6$ Hz), 1.57 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 1.63 (s, 6H), 1.65 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 1.84 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J=7$ Hz) 2.79 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.17 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.24 (d, 2H, $J=7$ Hz), 4.11 (t, 2H, $J=6$ Hz), 5.16 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.48 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.15 (s, 1H), 6.91 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.55 (s, 1H), 10.41 (s (br), 1H), 12.28 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 468 (M⁺, 4), 165 (28), 69 (48), 58 (100).

[7]

4-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxy-butansäuremethylester

(OS-068; AZ n.a.; ZK 308196)

Analog zur Synthese von **5** wurden 1.83 g (5.38 mMol) **4** mit 2.04 g (11.3 mMol) 4-Brombutan-säuremethylester in 25 ml trockenem Aceton gelöst und 440 mg (3.23 mMol) K₂CO₃ eingetragen. Es wurde für 9 h unter Rühren rückflussiert. Nach Abkühlen wurde auf NaHCO₃-Lösung gegossen und mit EA extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der gelbe, ölige Rückstand wurde an Kiesegel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 1.8 g (4.08 mMol) leicht verunreinigter **7** als gelblicher Schaum erhalten (76 %). C₂₅H₂₈O₇. MW 440.49 g/mol. Smp: n.a. ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.63 (s, 6H), 2.12 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 2.55 (t, 2H, $J=7$ Hz) 2.80 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.24 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.63 (s, 3H), 4.12 (t, 2H, $J=6$ Hz), 5.16 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.15 (s, 1H), 6.92 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.56 (s, 1H), 10.63 (s (br), 1H), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: n.a.

[8]

4-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxy-butansäure

(OS-070 AZ 230215; ZK 308198)

Analog zur Synthese von **6** wurden 1.80 g (4.08 mMol) **7** und 1.64 g (12.3 mMol) wasserfreies LiI in 40 ml trockenem 2,4,6-Collidin vorgelegt und unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt (Badtemperatur 185°C). Die zunächst trübe, hellgelbe Lösung wurde rasch klar und färbte sich rötlich, ein klumpiger dunkelroter Niederschlag fiel aus. Nach 2 h wurde abgebrochen, nach Abkühlen mit EA verdünnt

und auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung annähernd neutral gewaschen (pH 5-6), über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der zähe, dunkelbraune Rückstand wurde in wenig CH₂Cl₂ ausgerührt und nach Filtration und Trocknung 730 mg (1.71 mMol) saubere **8** in Form beiger Plättchen erhalten (42 %). C₂₄H₂₆O₇. MW 426.47 g/mol. Smp: 186.1°C (CH₂Cl₂). ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.63 (s, 6H), 2.12 (quin, 2H, $J=6$ Hz), 2.55 (t, 2H, $J=7$ Hz) 2.80 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.24 (d, 2H, $J=7$ Hz), 4.17 (t, 2H, $J=6$ Hz), 5.16 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.15 (s, 1H), 6.92 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.56 (s, 1H), 10.63 (s (br), 1H), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 427 (M⁺, 57), 341 (34), 248 (65), 161 (100), 104 (56).

[9]

2S (-) 7-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxyheptansäure

(OS-100/F1; AZ 230230; ZK 308929)

und

[10]

2R (+) 7-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxyheptansäure

(OS-100/F2; AZ230231; ZK 308930)

960 mg (2.05 mMol) **6** wurden in IPA gelöst (24 mg/ml) und per chiraler HPLC getrennt (01-358). Stationäre Phase Chiralpak AD 20 μ m; 250x60 mm. Fluss 80 ml/min. Isokratischer Eluent Hexan/IPA 85+15 (0.1 % TFA). UV-Detektor PDA 214 nm.

9(-): 318 mg (0.68 mMol); Retentionszeit 13.6 min; Reinheit 94.9 % (99 % ee); $[\alpha]_D$, Aceton : -22.5°; Smp: 155.6°C (Hexan/IPA); C₂₇H₃₂O₇; MW 468.55 g/mol.

10(+): 317 mg (0.68 mMol) Retentionszeit 16.7 min; Reinheit 95.8 % (91 % ee); $[\alpha]_D$, Aceton : +20.9°; Smp: 154.8°C (Hexan/IPA); C₂₇H₃₂O₇; MW 468.55 g/mol.

[11]

2S (-) 4-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yloxybutansäure

(OS-101/F1; AZ 230232; ZK 308931)

und

[12]

2R (+) 4-[5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-7-yl-oxybutansäure**(OS-101/F2; AZ 230233; ZK 308932)**

680 mg (1.59 mMol) **8** wurden in IPA gelöst (34 mg/ml) und per chiraler HPLC getrennt (01-359). Stationäre Phase Chiralpak AD 20 μm ; 250x60 mm. Fluss 80 ml/min. Isokratischer Eluent Hexan/IPA 85+15 (0.1 % TFA). UV-Detektor PDA 214 nm.

11(-): 331 mg (0.78 mMol); Retentionszeit 14.9 min; Reinheit 92.7 % (99 % ee); $[\alpha]_{\text{D}, \text{Aceton}}$: -24.2°; Smp: 185.5°C (Hexan/IPA); $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$; MW 426.46 g/mol.

12(+): 293 mg (0.69 mMol) Retentionszeit 20.0 min; Reinheit 98.6 % (97 % ee); $[\alpha]_{\text{D}, \text{Aceton}}$: +22.6°; Smp: 186.7°C (Hexan/IPA); $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$; MW 426.46 g/mol.

[13]

5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-7-methoxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on**(OS-074; AZ 230216; ZK 308199)**

1.9 g (5.6 mMol) **4** wurden in 30m trockenem Aceton gelöst und 770 mg (5.6 mMol) K_2CO_3 eingetragen. Nach Zugabe von 0.63 ml (10.1 mMol) Methyljodid wurde unter Rühren für 1.5 h rückflusiert. Nach Abkühlen auf RT wurde filtriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der zähe Rückstand wurde in EA aufgenommen, nacheinander mit NaHCO_3 -Lösung und NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Rohprodukt an Kiesegel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 1.46 g (4.12 mMol) **13** als farbloses Pulver erhalten (74 %). $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$. MW 354.44 g/mol. Smp: 168.1°C (Hexan/EA). $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton, 300 MHz): δ 1.61 (s, 6H), 2.80 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.17 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.21 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.92 (s, 3H), 5.14 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.15 (s, 1H), 6.91 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8.51 (s, 1H), 12.27 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 354 (M^+ , 100), 339 (34), 311 (36), 299 (25), 233 (21), 219 (76), 206 (45), 191 (75), 179 (72), 120 (78), 91 (63), 77 (37), 69 (45), 65 (35), 45 (90).

[14]

10-{4-[5-Hydroxy-7-methoxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-dekansäuremethylester**(OS-086; AZ 230221; ZK 308201)**

1.6 g (4.51 mMol) **13** wurden mit 1.89 g (7.22 mMol) $\text{P}(\text{Ph})_3$ und 1.61 ml (7.67 mMol) 10-Hydroxydekansäuremethylester in 50 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 1.47 ml (9.47 mMol) DEAD in 15 ml trockenem THF zugetropft. Die tiefrote Lösung wurde langsam auf RT erwärmt und für 1.5 h gerührt, wobei sich der Ansatz gelb färbte. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der dunkelbraune, ölige Rückstand an Kiesegel chromatographiert (Hexan/EA 7:3). Es wurden 1.45 g (2.69 mMol) **14** als farbloser Feststoff erhalten (60 %). $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_7$. MW 538.68 g/mol. Smp: 78.9°C (Hexan/EA). $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton, 300 MHz): δ 1.30-1.42 (m, 10H), 1.50 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.62 (s, 6H), 1.80 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J=8$ Hz) 2.81 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.21 (d, 2H, $J=9$ Hz), 3.62 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.04 (t, 2H, $J=7$ Hz) 5.14 (t, 1H, $J=9$ Hz), 5.51 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.16 (s, 1H), 7.00 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.49 (d, 2H, $J=8$ Hz), 12.26 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 538 (M^+ , 24), 523 (21), 219 (100), 206 (43), 191 (58), 179 (96), 120 (74).

[15]

10-{4-[5-Hydroxy-7-methoxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-dekansäure**(OS-095; AZ 230228; ZK 308927)**

Analog zur Synthese von **6** und **8** wurden 1.05 g (1.95 mMol) **14** und 910 mg (6.82 mMol) wasserfreies LiI in 25 ml trockenem 2,4,6-Collidin vorgelegt und unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt (Badtemperatur 185°C). Die zunächst trübe, hellgelbe Lösung wurde rasch klar und färbte sich rötlich, ein klumpiger dunkelroter Niederschlag fiel aus. Nach 2 h wurde abgebrochen, nach Abkühlen mit EA verdünnt und auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl -Lösung annähernd neutral gewaschen (pH 5-6), über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der braune Rückstand wurde in Hexan verrieben und nach Filtration und Trocknung 950 mg (1.81 mMol) saubere **15** als gelb-brauner Feststoff erhalten (93 %). $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_7$. MW 524.65 g/mol. Smp: 116.4°C (Hexan). $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton, 300 MHz): δ 1.30-1.42 (m, 10H), 1.51 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.62 (s, 6H), 1.80 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 2.29

(t, 2H, $J=8$ Hz) 2.82 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.21 (d, 2H, $J=9$ Hz), 3.92 (s, 3H), 4.04 (t, 2H, $J=7$ Hz) 5.14 (t, 1H, $J=9$ Hz), 5.51 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.16 (s, 1H), 7.01 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.50 (d, 2H, $J=8$ Hz), 10.39 (s (br), 1H) 12.26 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 524 (M⁺, 48), 509 (32), 469 (36), 219 (81), 179 (100), 120 (93), 69 (62), 55 (64).

[16]**6-{4-[5-Hydroxy-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-hexansäuremethylester****(OS-090; AZ 230223; ZK 308202)**

Analog zur Synthese von **14** wurden 2.0g (5.64 mMol) **13** mit 3.34 g (12.75 mMol) P(Ph)₃ und 1.99 g (13.60 mMol) 6-Hydroxyhexansäuremethylester in 55 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 2.61 ml (16.80 mMol) DEAD in 15 ml trockenem THF zugetropft. Die gelb-orange Lösung wurde langsam auf RT erwärmt und für 1.5 h gerührt, wobei sich der Ansatz hellgelb färbte. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand an Kiesegel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 1.31 g (2.71 mMol) **16** als farbloser Feststoff erhalten (48 %). C₂₈H₃₄O₇. MW 482.57 g/mol. Smp: 93.9°C (Hexan/EA). ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.53 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.61 (s, 6H), 1.69 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.82 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 2.36 (t, 2H, $J=8$ Hz) 2.81 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.21 (d, 2H, $J=9$ Hz), 3.63 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.04 (t, 2H, $J=7$ Hz) 5.14 (t, 1H, $J=9$ Hz), 5.50 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.16 (s, 1H), 7.01 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.49 (d, 2H, $J=8$ Hz), 12.26 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 482 (M⁺, 34), 467 (22), 427 (15), 219 (100), 206 (48), 191 (55), 179 (74), 120 (54), 69 (88).

[17]**6-{4-[5-Hydroxy-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-hexansäure****(OS-097; AZ 230229; ZK 308928)**

Analog zur Synthese von **6**, **8** und **15** wurden 1.21 g (2.51 mMol) **16** und 1.17 g (8.78 mMol) wasserfreies LiI in 30 ml trockenem 2,4,6-Collidin vorgelegt und unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt (Badtemperatur 185°C). Die zunächst trübe, hellgelbe Lösung wurde

rasch klar und färbte sich rötlich, ein klumpiger dunkelroter Niederschlag fiel aus. Nach 2 h wurde abgebrochen, nach Abkühlen mit EA verdünnt und auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung annähernd neutral gewaschen (pH 5-6), über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der braune Rückstand wurde in Hexan verrieben und nach Filtration und Trocknung 1.14 g (2.43 mMol) saubere **17** als brauner Feststoff erhalten (97 %). C₂₇H₃₂O₇. MW 468.54 g/mol. Smp: 164.9°C (Hexan). ¹H-NMR (d₆-Aceton, 300 MHz): δ 1.55 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.61 (s, 6H), 1.70 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 1.83 (quin, 2H, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz), 2.35 (t, 2H, $J=8$ Hz) 2.82 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 3.21 (d, 2H, $J=9$ Hz), 3.92 (s, 3H), 4.05 (t, 2H, $J=7$ Hz) 5.14 (t, 1H, $J=9$ Hz), 5.51 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.16 (s, 1H), 7.01 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.50 (d, 2H, $J=8$ Hz), 10.50 (s (br), 1H), 12.26 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 468 (M⁺, 100), 453 (30), 413 (30), 234 (32), 219 (77), 206 (40), 191 (43), 179 (76), 120 (54), 69 (43).

[18]**7-Benzoyloxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-chroman-4-on****(OS-105; AZ 231132; ZK 319336)**

6.0 g (22 mMol) Naringenin (Kaden Biochemicals) wurden in 55 ml trockenem Acetonitril suspendiert und 2.1 g (15.4 mMol) K₂CO₃ eingetragen. Nach Zugabe von 3.2 ml (27 mMol) Benzylbromid wurde für 1.5 h bei 100°C (Badtemperatur) gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde filtriert, das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in Aceton/Wasser (1:1) ausgerührt. Nach Filtration und Trocknung über Nacht bei 50°C wurden 4.91 g (13.5 mMol) sauberes, sandfarbenes **18** erhalten (62 %). C₂₂H₁₈O₅. MW 362.38 g/mol. Smp: 189°C (Aceton/Wasser). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 2.71 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.33 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.17 (s, 2H), 5.49 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.16 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.80 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.32 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.36-7.45 (m, 5H), 9.61 (s, 1H), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 362 (M⁺, 20), 381 (14), 243 (8), 123 (8), 120 (14), 107 (8), 91 (100), 65 (13).

[19]

[4-(7-Benzoyloxy-5-hydroxy-4-oxo-chroman-2-yl)-phenoxy]-essigsäuremethylester (OS-112, AZ 231135; ZK 319337)

2.98 g (8.22 mMol) **18** wurden mit 3.23 g (12.33 mMol) P(Ph)₃ und 1.02 ml (13.15 mMol) 2-Hydroxyessigsäuremethylester in 80 ml trockenem THF suspendiert und auf 40°C erwärmt. Unter Rühren wurden 2.4 ml (15.62 mMol) DEAD in 10 ml trockenem THF zuge tropft und für 2 h bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 1.83 g (4.21 mMol) **19** als gelber Schaum erhalten (51 %). C₂₅H₂₂O₇. MW 434.44 g/mol. Smp: n.a. ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 2.77 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.34 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.71 (s, 3H), 4.83 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.56 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.18 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 6.99 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.35-7.41 (m, 5H), 7.45 (d, 2H, *J*=8 Hz), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 434 (M⁺, 41), 343 (7), 269 (6), 192 (19), 179 (26), 133 (5), 91 (100), 65 (7).

[20]

[4-(5,7-Dihydroxy-4-oxo-chroman-2-yl)-phen-oxy]-essigsäuremethylester (OS-113, AZ 231136; ZK 319338)

1.81 g (4.17 mMol) **19** wurden in 20 ml Ethanol und 10 ml THF gelöst und nach Zugabe von 360 mg Palladium-Katalysator (Pd/C 10 % x 50 % Wasser) mit 110 ml (4.92 mMol) H₂ für 1.5 h unter Normaldruck bei RT hydriert. Nach Filtration und Entfernung des Lösemittel des Filtrats im Vakuum wurden 1.40 g (4.07 mMol) sauberer **20** als farblose Kristalle erhalten (98 %). C₁₈H₁₆O₇. MW 344.32 g/mol. Smp: 211°C (EtOH/THF). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 2.73 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.29 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.71 (s, 3H), 4.83 (s, 2H), 5.52 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 5.89 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 6.98 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.44 (d, 2H, *J*=8 Hz), 10.81 (s, 1H), 12.14 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 344 (M⁺, 26), 233 (56), 205 (21), 192 (19), 179 (24), 153 (27), 139 (100), 121 (16), 56 (24), 45 (32).

[21]

[4-(7-Acetoxy-5-hydroxy-4-oxo-chroman-2-yl)-phenoxy]-essigsäuremethylester (OS-114, AZ 231137; ZK 319339)

1.4 g (4.07 mMol) **20** wurden in 15 ml trockenem Pyridin gelöst und unter Rühren langsam

0.42 ml (4.48 mMol) Essigsäureanhydrid zuge tropft. Nach 2.5 h bei RT wurde auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen und mit EA extrahiert. Es wurde mit NaCl-Lösung neutral gewaschen und nach Trocknung über Na₂SO₄ das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 25 ml Methanol suspendiert und ausgekocht. Nach Abkühlen, Filtration und Trocknung wurden 1.17 g (3.05 mMol) **21** als feine farblose Kristalle erhalten (75 %). C₂₀H₁₈O₈. MW 386.35 g/mol. Smp: 146.4°C (MeOH). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 2.26 (s, 3H), 2.84 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.46 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.71 (s, 3H), 4.84 (s, 2H), 5.65 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.35 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.46 (d, 2H, *J*=8 Hz), 11.95 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 386 (M⁺, 70), 343 (32), 192 (97), 179 (100), 152 (21), 133 (17), 103 (15).

[22]

{4-[7-acetoxy-5-(3-methyl-but-2-enyloxy)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-essigsäuremethylester**(OS-115; AZ 231138; ZK 319340)**

1.15 g (2.98 mMol) **21** wurden mit 953 mg (3.64 mMol) P(Ph)₃ und 0.45 ml (4.44 mMol) 3-Methyl-2-buten-1-ol in 36 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 0.75 ml (4.8 mMol) DEAD in 10 ml trockenem THF zuge tropft und nach Erwärmen auf RT für 2 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der dunkle, ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 1:1). Es wurden 1.18 g (2.6 mMol) **22** als farbloser Kristalle erhalten (87 %). C₂₅H₂₆O₈. MW 454.47 g/mol. Smp: 88.9°C (Hexan/EA). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.70 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.65 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.17 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.70 (s, 3H), 4.55 (d, 2H, *J*=7 Hz), 4.83 (s, 2H), 5.42 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.54 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.43 (d, 1H, *J*=2 Hz), 6.52 (d, 1H, *J*=2 Hz), 6.97 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.44 (d, 2H, *J*=8 Hz). (EI⁺)-MS: *m/z* 454 (M⁺, 9), 411 (10), 386 (20), 343 (16), 219 (21), 205 (33), 192 (85), 179 (100), 103 (26), 69 (51).

[23]**{4-[7-acetoxy-5-hydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-essigsäuremethylester****(OS-116; AZ 231139; ZK 319341)**

1.15 g (2.53 mMol) **22** wurden in 50 ml trockenem Dekalin unter kräftigem Rühren für 24 h rückflusiert (Badtemperatur: 200°C). Nach Abkühlen wurde das Lösemittel im Vakuum (85°C, 32 mbar) entfernt und der dunkle, ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Nach Auskochen aus Methanol, Abkühlen, Filtration und Trocknung wurden 528 mg (1.16 mMol) **23** als farblose Kristalle erhalten (46 %). C₂₅H₂₆O₈. MW 454.47 g/mol. Smp: 105.8°C (MeOH). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.53 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.87 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.01 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.41 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.71 (s, 3H), 4.84 (s, 2H), 4.99 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.64 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.35 (s, 1H), 7.00 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.46 (d, 2H, *J*=8 Hz), 11.82 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 454 (M⁺, 100), 411 (84), 397 (22), 369 (22), 357 (34), 219 (80), 205 (74), 192 (82), 177 (50), 165 (57).

[24]**{4-[5,7-Dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-essigsäuremethylester****(OS-117; AZ 231142; ZK 319342)**

5.1 g (11.2 mMol) **23** wurden in 150 ml Methanol gelöst und 390 mg (2.8 mMol) K₂CO₃ eingetragen. Nach Zugabe von 8 ml Wasser wurde für 3 h bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der orange, ölige Rückstand in EA aufgenommen und mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der zähe Rückstand an Kieselgel chromatographiert (CH₂Cl₂/Aceton 9:1). Nach Ausrühren aus DEE, Filtration und Trocknung wurden 2.24 g (5.43 mMol) **24** als farbloser Feststoff erhalten (50 %). C₂₃H₂₄O₇. MW 412.44 g/mol. Smp: 144.2°C (DEE). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.55 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.76 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.09 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.22 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 3.71 (s, 3H), 4.83 (s, 2H), 5.09 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.50 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 5.98 (s, 1H), 6.98 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.44 (d, 2H, *J*=8 Hz), 10.77 (s, 1H), 12.10 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 412 (M⁺, 100), 397 (20), 369 (24), 357 (27), 233

(12), 220 (33), 205 (57), 192 (68), 177 (39), 165 (58).

[25]**{4-[5,7-Dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxo-chroman-2-yl]-phenoxy}-essigsäure**
(OS-118/OS-130; AZ 233155; ZK 319345)

2.14 g (5.18 mMol) **24** und 2.08 g (15.5 mMol) wasserfreies LiI wurden in 60 ml trockenem 2,4,6-Collidin vorgelegt und unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt (Badtemperatur 185°C). Die zunächst trübe, gelbe Lösung wurde rasch klar und orange, ein klumpiger Niederschlag fiel aus. Nach 2 h wurde abgebrochen, nach Abkühlen mit EA verdünnt und auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung annähernd neutral gewaschen (pH 5-6), über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Nach Ausrühren aus DEE, Filtration und Trocknung wurden 790 mg (1.92 mMol) verunreinigtes Produkt erhalten (38 %), das in Acetonitril/Wasser gelöst (30 mg/ml) und per HPLC getrennt wurde (02-139). Stationäre Phase Kromasil C18 10 µm; 250x50 mm. Fluss 100 ml/min. Isokratischer Eluent Hexan/EtOH 99+1 (0.1 % TFA). UV-Detektor PDA 254 nm. 534 mg (1.34 mMol) **25** als gelber Feststoff (76 %). Retentionszeit 3.8 min; Reinheit 98.8 %. Smp: 191.2°C (EA); C₂₂H₂₂O₇. MW 398.41 g/mol. ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.55 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.76 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.09 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.22 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 4.70 (s, 2H), 5.09 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.49 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 5.99 (s, 1H), 6.96 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.43 (d, 2H, *J*=8 Hz), 10.81 (s, 1H), 12.10 (s, 1H), 13.01 (s (br), 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 399 (M⁺, 100), 317 (4), 276 (5), 241 (4).

[26]**6-Bromo-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on**
(OS-128; AZ 233154; ZK 320995)

100 mg (0.294 mMol) **4** wurden in 3 ml trockenem THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wurden 52 mg (0.294 mMol) *N*-Bromsuccinimid in mehreren Portionen eingetragen und zunächst für 1 h bei 0°C, dann für 2 h bei RT. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden

72 mg (0.172 mMol) sauberes **26** als gelblicher Schaum erhalten (59 %). $C_{20}H_{19}BrO_5$. MW 419.27 g/mol. Smp: 191.7°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 1.53 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.79 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.20 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.31 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.06 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.80 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.31 (d, 2H, $J=8$ Hz), 9.59 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 12.84 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 420 (M⁺, 28), 418 (30), 285 (38), 283 (47), 257 (43), 255 (51), 245 (56), 243 (70), 120 (100).

[27]

6-Iodo-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on
(OS-129; AZ 233156; ZK 320994)

Analog zu **26** wurden 100 mg (0.294 mMol) **4** in 3 ml trockenem THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wurden 73 mg (0.323 mMol) *N*-Iodsuccinimid in mehreren Portionen eingetragen und nach Erwärmen auf RT für 30 min gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 7:3). Es wurden 101 mg (0.217 mMol) sauberes **27** als farbloser Schaum erhalten (74 %). $C_{20}H_{19}IO_5$. MW 466.27 g/mol. Smp: zersetzt bei 120-140°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 1.51 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 2.78 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.23 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.30 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.04 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.46 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.79 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7.31 (d, 2H, $J=8$ Hz), 9.59 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 13.02 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 466 (M⁺, 100), 464 (20), 411 (22), 340 (64), 291 (35), 165 (44), 120 (58), 91 (37).

[28]

2-Hydroxy-4,6-bis-methoxymethoxyacetophenon
(OS-156; AZ 233239; ZK 254853)

465 mg (2.5 mMol) 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Hydrat (Sigma-Aldrich) wurden in 30 ml trockenem Aceton gelöst und 2.45g (17.5 mMol) K_2CO_3 eingetragen. Nach Zugabe von 0.49 ml (6.25 mMol) MOMCl wurde für 1 h unter starkem Rühren rückflusiert, nach Abkühlen filtriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 7:3). Es wurden 330 mg (1.28 mMol) **28** als farbloses Öl erhalten, das über Nacht bei 4°C farblose Kristalle bildete (52 %). $C_{12}H_{16}O_6$. MW 256.67 g/mol. Smp: 47.8°C (Hexan/EA). 1H -

NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.65 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 6.24 (d, 1H, $J=2$ Hz), 6.26 (d, 1H, $J=2$ Hz), 13.72 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 256 (M⁺, 50), 182 (100), 152 (15), 69 (34).

[29]

3-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-4,6-bis-methoxymethoxy-phenyl)-propenon

(OS-167; AZ 233240; ZK 254638)

769 mg (3.0 mMol) **28** wurden zusammen mit 835 mg (3.0 mMol) 4-Hydroxy-3,5-dibromobenzaldehyd (Sigma-Aldrich) in 7.5 ml Ethanol und 2.5 ml THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Diese Lösung wurde bei 0°C langsam auf 3.37 g (60 mMol) KOH getropft. Nach Erwärmen auf RT wurde für 36 h gerührt, anschließend für weitere 4 h bei 40°C gerührt. Die viskose, intensiv dunkelrote Lösung wurde auf Eiswasser/Weinsäure (10 %) gegossen und mit EA extrahiert. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4, 5 % THF). Es wurden 1.19 g (2.31 mMol) **29** als intensiv gelbes Pulver erhalten (77 %). $C_{19}H_{18}Br_2O_7$. MW 518.16 g/mol. Smp: 206.5°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 3.39 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 7.46 (dd, 2H, $J=16$ Hz, $J=4$ Hz), 7.95 (s, 2H), 10.52 (s, 1H), 12.09 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 520 (M⁺, 3), 518 (5), 516 (3), 473 (4), 387 (2), 305 (17), 210 (100), 197 (21), 69 (27).

[30]

(E) 3-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-phenyl)-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-propenon
(OS-161; AZ 233241; ZK 254852)

490 mg (0.95 mMol) **29** wurden in 17 ml Methanol suspendiert und auf 40°C erwärmt. Es wurden unter Rühren 1.6 ml 6N HCl (9.6 mMol) zugetropft und nachfolgend für 1 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung wurde auf Wasser/NaCl-Lösung gegossen und mit EA extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung bis pH 5-6 gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der intensiv gelbe Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (CH_2Cl_2 / MeOH 95:5). Es wurden 142 mg (0.33 mMol) **30** als intensiv gelber Feststoff

erhalten (35 %). $C_{15}H_{10}Br_2O_5$. MW 430.05 g/mol. Smp: n.a. 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 5.84 (s, 2H), 7.55 (d, 1H, $J(E)=16$ Hz), 7.88 (s, 2H), 7.99 (d, 1H, $J(E)=16$ Hz), 10.48 (s (br), 2H), 12.46 (s, 2H). (EI⁺)-MS: m/z 432 (M⁺, 4), 430 (8), 428 (4), 278 (3), 179 (50), 166 (32), 153 (83), 124 (45), 96 (35), 89 (80), 69 (100), 63 (50).

[31]

2-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxychroman-4-on
(OS-171; AZ 233250; ZK 254642)

458 mg (1.0 mMol) **30** wurden mit 820 mg (10.0 mMol) wasserfreiem Natriumacetat in 50 ml Methanol gelöst und unter Rühren für 3 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wurde auf Eiswasser/HCl (1N) gegossen und mit EA extrahiert. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit NaCl-Lösung bis pH 5-6 gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der helle Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 1:1). Es wurden 295 mg (0.69 mMol) **31** als farbloses Pulver erhalten (69 %). $C_{15}H_{10}Br_2O_5$. MW 430.05 g/mol. Smp: 267.9°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 2.74 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.33 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.49 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 5.91 (d, 1H, $J=2$ Hz), 5.93 (d, 1H, $J=2$ Hz), 7.72 (s, 2H), 10.16 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 12.11 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 430 (M⁺, 22), 278 (15), 179 (65), 166 (46), 153 (100), 124 (54), 96 (24), 89 (48), 69 (26).

[32]

Essigsäure-2-(4-acetoxy-3,5-dibromophenyl)-5-hydroxy-4-oxochroman-7-yl-ester
(OS-172; AZ 234550; ZK 254639)

3.0 g (6.98 mMol) **31** wurden in 10 ml trockenem Pyridin gelöst, im Wasserbad auf RT gekühlt und langsam 1.5 ml (15.36 mMol) Essigsäureanhydrid zugetropft. Nach Zugabe wurde 1.5 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser-HCl (2N) gegossen, mit EA extrahiert, die organische Phase mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der dunkle, ölige Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 6:4). Es wurden 2.98 g (5.80 mMol) **32** als farbloser Schaum erhalten (83 %). $C_{19}H_{14}Br_2O_7$. MW 514.13 g/mol. Smp: 160.2°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 2.27 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.98

(dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.50 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.75 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.40 (d, 1H, $J=2$ Hz), 6.46 (d, 1H, $J=2$ Hz), 7.96 (s, 2H), 11.87 (s, 1H). (EI⁺)-MS: m/z 514 (M⁺, 19), 472 (35), 278 (18), 179 (86), 166 (62), 153 (100), 124 (32), 89 (37), 69 (57).

[33]

Essigsäure-2-(4-acetoxy-3,5-dibromophenyl)-5-(3-methyl-but-2-enyloxy)-4-oxochroman-7-yl-ester
(OS-173; AZ 234552; ZK 254641)

2.75 g (5.35 mMol) **32** wurden mit 1.71 g (6.53 mMol) $P(Ph)_3$ und 0.8 ml (7.92 mMol) 3-Methyl-2-buten-1-ol in 50 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 1.7 ml (8.61 mMol) DIAD in 10 ml trockenem THF zugetropft und nach Erwärmen auf RT für 2 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der dunkle, ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 1:1). Es wurden 1.75 g (3.01 mMol) **33** als farbloser Schaum erhalten (57 %). $C_{24}H_{22}Br_2O_7$. MW 582.25 g/mol. Smp: 67.0°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 1.71 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.77 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.21 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 4.57 (d, 2H, $J=7$ Hz), 5.43 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.65 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.53 (d, 1H, $J=2$ Hz), 6.57 (d, 1H, $J=2$ Hz), 7.94 (s, 2H). (EI⁺)-MS: m/z 582 (M⁺, 1), 514 (8), 472 (12), 430 (18), 278 (8), 219 (6), 205 (8), 192 (5), 179 (21), 153 (25), 123 (8), 89 (8), 69 (100).

[34]

Essigsäure-2-(4-acetoxy-3,5-dibromophenyl)-5-hydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxochroman-7-yl-ester
(OS-174; AZ 234554; ZK 254630)

1.7 g (2.92 mMol) **33** wurden mit 303 mg (0.29 mMol) $Eu[FOD]_3$ Katalysator in 2 ml trockenem $CHCl_3$ gelöst und unter Rühren für 20 h bei 60°C rückflussiert. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Hexan/EA 3:1). Es wurden 1.37 g (2.36 mMol) **34** als gelblicher Feststoff erhalten (81 %). $C_{24}H_{22}Br_2O_7$. MW 582.25 g/mol. Smp: 153.6°C (Hexan/EA). 1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): δ 1.57 (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.01 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=3$ Hz), 3.10 (d, 2H, $J=7$ Hz), 3.44 (dd, 1H, $J=17$ Hz, $J=13$ Hz), 5.01 (t, 1H, $J=7$ Hz), 5.74 (dd, 1H, $J=13$ Hz, $J=3$ Hz), 6.40 (s, 1H), 7.92 (s,

2H), 11.75 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 528 (M⁺, 6), 539 (41), 525 (10), 497 (6), 483 (9), 455 (5), 430 (6), 278 (7), 247 (8), 219 (100), 205 (88), 192 (42), 177 (93), 165 (71), 109 (14), 89 (24), 69 (70).

[35]

Essigsäure-2,6-dibromo-4-[5,7-dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-4-oxochroman-2-yl]-phenylester**(OS-176; AZ 234555; ZK 254632)**

1.2 g (2.06 mMol) **34** wurden in 35 ml Methanol gelöst und 55 mg (0.41 mMol) K₂CO₃ eingetragen. Nach Zugabe von 0.2 ml Wasser wurde für 3 h bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wurde auf Eiswasser/Weinsäure (10 %) gegossen, mit EA extrahiert und mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂/Hexan ausgerührt. Es wurden 1.1 g (2.04 mMol) **35** als farbloser Feststoff erhalten (98 %). C₂₂H₂₀Br₂O₆. MW 540.21 g/mol. Smp: 193.8°C (CH₂Cl₂/Hexan). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): δ 1.60 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.91 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.13 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.26 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 5.12 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.62 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.02 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 10.89 (s, 1H), 12.04 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 540 (M⁺, 25), 525 (11), 483 (10), 455 (6), 443 (7), 430 (8), 278 (11), 247 (9), 233 (11), 219 (40), 205 (100), 192 (48), 177 (95), 165 (92), 153 (7), 123 (10), 89 (18), 79 (18), 69 (68).

[36]

2-(3,5-Dibromo-4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on**(OS-177; AZ 234556; ZK 254633)**

1.05 g (1.94 mMol) **35** wurden in 30 ml Methanol gelöst und 300 mg (2.34 mMol) K₂CO₃ eingetragen. Nach Zugabe von 7 ml Wasser wurde für 18 h bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wurde auf Eiswasser/Weinsäure (10 %) gegossen, mit EA extrahiert und mit NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂/Hexan ausgerührt. Es wurden 805 mg (1.62 mMol) **36** als ockerfarbener Feststoff erhalten (84 %). C₂₀H₁₈Br₂O₅. MW 498.17 g/mol. Smp: 221.1°C (CH₂Cl₂/Hexan). ¹H-NMR (d₆-DMSO, 300 MHz): □ 1.58 (s, 3H),

1.63 (s, 3H), 2.79 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=3 Hz), 3.10 (d, 2H, *J*=7 Hz), 3.24 (dd, 1H, *J*=17 Hz, *J*=13 Hz), 5.10 (t, 1H, *J*=7 Hz), 5.48 (dd, 1H, *J*=13 Hz, *J*=3 Hz), 6.00 (s, 1H), 7.69 (s, 2H), 10.12 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 12.06 (s, 1H). (EI⁺)-MS: *m/z* 498 (M⁺, 26), 483 (15), 455 (8), 443 (11), 278 (8), 247 (7), 233 (10), 219 (28), 205 (100), 192 (50), 177 (81), 165 (83), 153 (7), 123 (8), 109 (9), 89 (39), 77 (18), 69 (62).

5.1.1 Isotopenchemie

[37]

2-(3,5-Ditritiyl-4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**rac. ³H-8-Prenylnaringenin****und**

[38]

2R(+) 2-(3,5-Ditritiyl-4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**2R(+) ³H-8-Prenylnaringenin****und**

[39]

2S(-) 2-(3,5-Ditritiyl-4-hydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on:**2S(-) ³H-8-Prenylnaringenin**

Die Markierung von 8-PN erfolgte durch die Abteilung für Isotopenchemie (Protokoll-Nr. IS2824-3) der Schering AG:

2.0 mg (4.01 μMol) **36** wurden mit 2 mg Palladium-Katalysator (Pd/C 10 %ig) in 500 μl EA gelöst. Nach Zusatz von 20 μl TEA wurde über Nacht mit 168 μl (7.50 μMol bzw. 15.97 GBq) Tritiumgas hydriert. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurden im Rückstand 2.96 GBq (1.39 μMol) gefunden. Der Rückstand wurde via HPLC gereinigt. Stationäre Phase Kromasil C₁₈ 5μm; 250x4.6 mm. Fluss 1 ml/min. Isokratischer Eluent Acetonitril/Essigsäure 6:4. UV-Detektor PDA

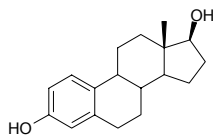
210 nm. Ausbeute 1.33 GBq **37** mit einer spezifischen Aktivität von 2218 MBq/mg. Die Stabilität der Markierung durch wiederholtes Anlösen und Eindampfen in MeOH ohne messbaren Aktivitätsverlust bestätigt.

Analyse: Kromasil C₁₈ 5µm; 250x4.6 mm. Fluss 1 ml/min. Isokratischer Eluent Acetonitril/Wasser 1:1 (0.2 % Essigsäure). Retentionszeit 12.3 min; Reinheit 99.6 %. C₂₀H₁₈T₂O₅; MW 344.36 g/mol.

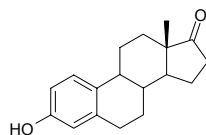
Die Trennung der Enantiomere **38** und **39** erfolgte analog zu **4a** und **4b**.

5.2 Chemische Strukturen

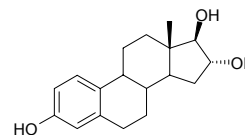
Natürliche Estrogene



17β-Estradiol (E₂)

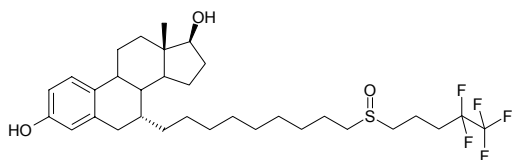


Estron

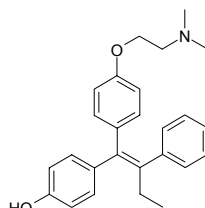


Estriol

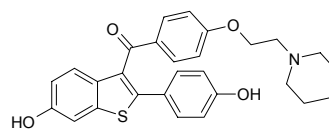
Synthetische Antiestrogene & SERMs



Faslodex (ICI 182,780)

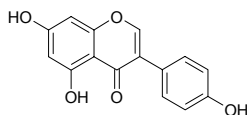


4-OH-Tamoxifen

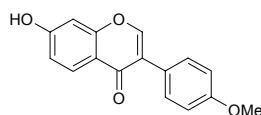


Raloxifen

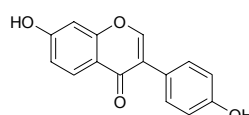
Phytoestrogene



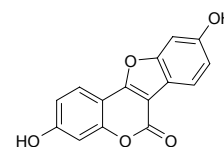
Genistein



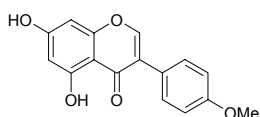
Formononetin



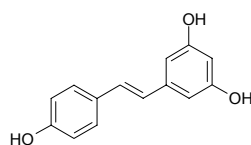
Daidzein



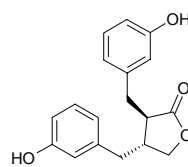
Coumestrol



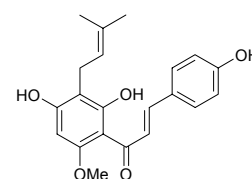
Biochanin A



trans-Resveratrol

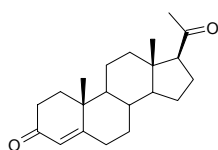


(±)-Enterolacton

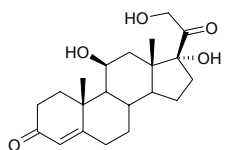


Xanthohumol

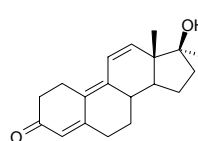
Steroid-Hormone und synthetische Liganden



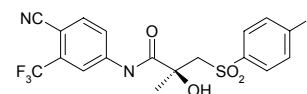
Progesteron



Cortisol

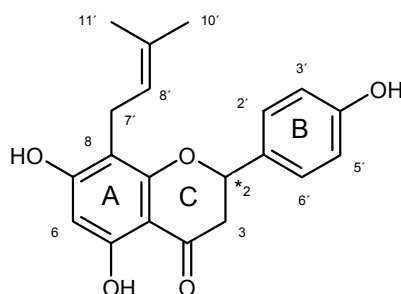


R1881



Casodex

5.3 Physikochemische Daten von 8-PN



8-Prenylnaringenin

IUPAC-Name:

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)-chroman-4-one

Summenformel:

$C_{20}H_{20}O_5$

Molekulargewicht:

340.37 g/mol

Schmelzpunkt:

190-194°C

Aussehen:

Schwach-gelbliches Pulver

Löslichkeit:

Gut in Aceton, Methanol, Ethylacetat sowie Ethanol (400 mg/ml);
Wasser: < 10 µg/ml

Kristallisation:

Aus CH_2Cl_2 oder $CHCl_3$

TLC-System:

R_f 0.19 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 20:1 v/v); R_f 0.52 ($CHCl_3/Aceton/NH_3$ 7:6:0.1 v/v/v);
Gibb's Test (1 % $FeCl_3$ in MeOH): (+),
dunkel violett

UV_{max} in MeOH:

210 nm, 225, 293.5 (E= 16.500), 338

MS-EI⁺:

340 (66 %) [M^+], 285 (18) , 247 (16),
165 (100)

CD_{MeOH}:

+13.21 (217 nm), +3.23 (237), +1.31 (253), -15.6 (292), +2.79 (314), +2.30 (331) für 2*S*(-)-8-PN

[α]_{20°C, Aceton}:

-26.1 ° (± 0.3) bei 589 nm für 2*S*(-)-8-PN

IR (KBr):

3317 cm^{-1} , 1640, 1603, 1519, 1442, 1378, 1344, 1267, 1229, 1171, 1074, 834

¹H-NMR (300 MHz; in D₆-Aceton):

δ 1.61 (6H, singluett; 11'-H/10'-H), 2.77 (1H, dd J=17Hz, 3Hz; 3β-H), 3.15 (1H, dd J= 17Hz, 13Hz; 3α-H), 3.23 (2H, d; J=7Hz; 7'-H), 5.20 (1H, t(br) J=7Hz; 8'-H), 5.46 (1H, dd; J=13Hz, 3Hz; 2-H), 6.04 (1H, s; 6-H), 6.92 (2H, d J=8Hz; 3'-H/5'-H), 7.42 (2H, d J=8Hz; 2'-H/6'-H)

H), 8.46 (1H, s(br); 4'-OH), 9.53 (1H, s(br); 7-OH), 12.15 (1H, s; 5-OH).

HPLC-Analyse:

C₁₈ Säule; Isokratischer Eluent: Hexan/EtOH 9+1; UV-DAD Detektion (210/280 nm)

Enantiomeren-Präparation:

Chiralpak AD 20µm (250 x 60 mm); 100 ml/min. Hexan/Ethanol 93+7;

2*R*(+) 8-PN: ca. 35 min.

2*S*(-) 8-PN: ca. 57 min

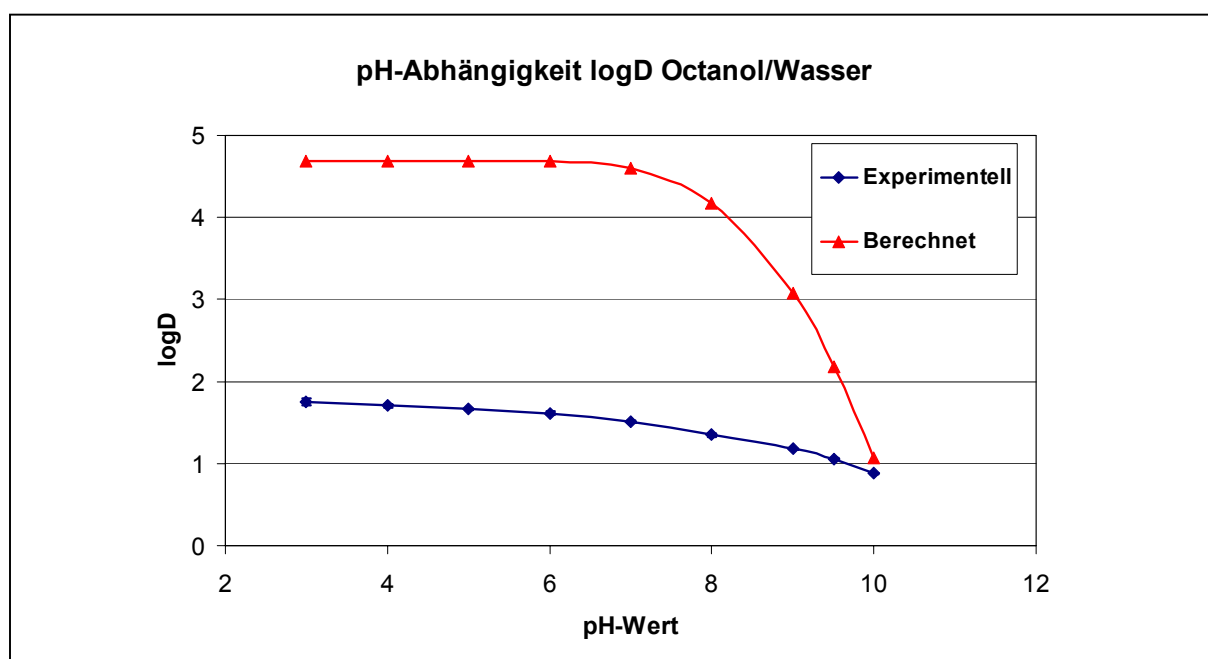


Abbildung 59: pH-Wert-Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten D von 8-PN im System Octanol/Wasser nach Berechnung und experimenteller Bestimmung (mittels ³H-Tracer).

6. LITERATUR

- Abe, T. 1999. Infantile leukemia and soybeans--a hypothesis. *Leukemia*. 13:317-20.
- Adams, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci*. 73:1509-15.
- Adlercreutz, H., C. Bannwart, K. Wahala, T. Makela, G. Brunow, T. Hase, P.J. Arosemena, J.T. Kellis, Jr., and L.E. Vickery. 1993. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 44:147-53.
- Adlercreutz, H., T. Fotsis, R. Heikkinen, J.T. Dwyer, M. Woods, B.R. Goldin, and S.L. Gorbach. 1982. Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer. *Lancet*. 2:1295-9.
- Adlercreutz, H., H. Honjo, A. Higashi, T. Fotsis, E. Hamalainen, T. Hasegawa, and H. Okada. 1991. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr*. 54:1093-100.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*. 262:5592-5.
- Albertazzi, P., F. Pansini, G. Bonaccorsi, L. Zanotti, E. Forini, and D. De Aloysio. 1998. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*. 91:6-11.
- Ashcroft, G.S., J. Dodsworth, E. van Boxtel, R.W. Tarnuzzer, M.A. Horan, G.S. Schultz, and M.W. Ferguson. 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med*. 3:1209-15.
- Aungst, B.J., J.A. Blake, and M.A. Hussain. 1990. Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption, and solvent permeation to the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines. *Pharm Res*. 7:712-8.
- Baird, D.D., D.M. Umbach, L. Lansdell, C.L. Hughes, K.D. Setchell, C.R. Weinberg, A.F. Haney, A.J. Wilcox, and J.A. McLachlan. 1995. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:1685-90.
- Bakhit, R.M., B.P. Klein, D. Essex-Sorlie, J.O. Ham, J.W. Erdman, Jr., and S.M. Potter. 1994. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr*. 124:213-22.
- Barret-Connor, G., D. Grady, A. Sashegyi, and P. Cox. 2002. Raloxifene and cardiovascular events in women with osteoporosis: 4 years results from the MORE trial. *JAMA*. 287:847-857.
- Barron, D., and R.K. Ibrahim. 1996. Isoprenylated flavonoids - a survey. *Phytochemistry*. 43:921-982.
- Bennetau-Pelissero, C., C. Le Houerou, V. Lamothe, F. Le Menn, P. Babin, and B. Bennetau. 2000. Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem*. 48:305-11.
- Bennetts, H.W., E.J. Underwood, and F.L. Shier. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 22:2-12.
- Bingham, S.A., C. Atkinson, J. Liggins, L. Bluck, and A. Coward. 1998. Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr*. 79:393-406.
- Bohlmann, F., M. Hümpel, P. Isaksson, O. Schaefer, and W.D. Schleuning. 2003. Use of 8-Prenylaringenin for hormone replacement therapy. In Schering AG, EU Patent Application, EU.
- Bohlmann, F., C. Zdero, R.M. King, and H. Robinson. 1979. New Prenylflavanoids from *Marshallia Grandiflora*. *Phytochemistry*. 18:1246-1247.
- Borriello, S.P., K.D. Setchell, M. Axelson, and A.M. Lawson. 1985. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J Appl Bacteriol*. 58:37-43.
- Brincat, M., E. Versi, C.F. Moniz, A. Magos, J. de Trafford, and J.W. Studd. 1987. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol*. 70:123-7.

- Brincat, M.P. 2000. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas*. 35:107-17.
- Chambliss, K.S., and P.W. Shaul. 2002. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in calveolae. *Steroids*. 67:413-419.
- Chen, D.B., and J.S. Davis. 2003. Epidermal growth factor induces c-fos and c-jun mRNA via Raf-1/MEK1/ERK-dependent and -independent pathways in bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 200:141-54.
- Ciana, P., G. Di Luccio, S. Belcredito, G. Pollio, E. Vegeto, L. Tatangelo, C. Tiveron, and A. Maggi. 2001. Engineering of a mouse for the in vivo profiling of estrogen receptor activity. *Mol Endocrinol*. 15:1104-13.
- Ciana, P., M. Raviscioni, P. Mussi, E. Vegeto, I. Que, M.G. Parker, C. Lowik, and A. Maggi. 2003. In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nat Med*. 9:82-6.
- Clifton-Bligh, P.B., R.J. Baber, G.R. Fulcher, M.L. Nery, and T. Moreton. 2001. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause*. 8:259-65.
- Cos, P., T. De Bruyne, S. Apers, D. Vanden Berghe, L. Pieters, and A.J. Vlietinck. 2003. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med*. 69:589-99.
- Cowley, S.M., and M.G. Parker. 1999. A comparison of transcriptional activation of ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69:165-175.
- Davis, S.R., F.S. Dalais, E.R. Simpson, and A.L. Murkies. 1999. Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res*. 54:185-210; discussion 210-1.
- Day, A.J., M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J. Rhodes, M.R. Morgan, and G. Williamson. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*. 436:71-5.
- Dechering, K., C. Boersma, and S. Mosselmann. 2000. Estrogen receptor alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem*. 7:561-576.
- Delmas, P.D. 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 359:2018-2026.
- Denis, L., M.S. Morton, and K. Griffiths. 1999. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol*. 35:377-87.
- Donovan, R.M., M.R. Green, M.C. Tasker, and P.R. Yates. 2002. Cosmetic method of treating skin. *In Unilever Plc, Patent WO 02/39960 A2*.
- Duan, R., W. Porter, and S. Safe. 1998. Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*. 139:1981-90.
- Duan, R., W. Xie, R.C. Burghardt, and S. Safe. 2001. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem*. 276:11590-8.
- Duan, R., W. Xie, X. Li, A. McDougal, and S. Safe. 2002. Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 294:384-94.
- Dykens, J.A., J.W. Simpkins, J. Wang, and K. Gordon. 2003. Polycyclic phenols, estrogens and neuroprotection: a proposed mitochondrial mechanism. *Exp Gerontol*. 38:101-7.
- EBCTCG. 1998. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 351:1451-67.
- Elias, P.M. 1981. Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int J Dermatol*. 20:1-19.
- Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889-95.
- Filardo, E.J. 2002. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80:231-8.
- Fotsis, T., M. Pepper, H. Adlercreutz, T. Hase, R. Montesano, and L. Schweigerer. 1995. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr*. 125:790S-797S.
- Fritzemeier, K.H., and C. Hegele-Hartung. 1999. In vitro and in vivo models to characterize estrogens and antiestrogens. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 135:3-94.

- Gester, S., P. Metz, O. Zierau, and G. Vollmer. 2001. An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement. *Tetrahedron*. 57:1015-1018.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.M. Bornert, P. Argos, and P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320:134-9.
- Greendale, G.A., B.A. Reboussin, and P. Hogan. 1998. Symptom relief and side effects of postmenopausal hormone results from the Post-Menopausal Estrogen/Progestin Intervention Trial. *Obstet Gynecol*. 92:982-988.
- Grimes, D.A., and R.A. Lobo. 2002. Perspectives on Women's Health Initiative trial of hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol*. 100:1344-1353.
- Hall, J.M., J.F. Couse, and K.S. Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 276:36869-72.
- Hall, J.M., and K.S. Korach. 2002. Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *J Biol Chem*. 277:44455-61.
- Hall, J.M., D.P. McDonnell, and K.S. Korach. 2002. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*. 16:469-86.
- Hasselquist, M.B., N. Goldberg, A. Schroeter, and T.C. Spelsberg. 1980. Isolation and characterization of the estrogen receptor in human skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 50:76-82.
- Henderson, M.C., C.L. Miranda, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, and D.R. Buhler. 2000. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*. 30:235-51.
- Herrington, D.M., and K.P. Klein. 2003. Randomized clinical trials of hormone replacement therapy for treatment and prevention of cardiovascular diseases: a review of the findings. *Atherosclerosis*. 166:203-212.
- Hextall, A. 2000. Estrogens and lower urinary tract function. *Maturitas*. 36:83-92.
- HFBC. 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 without breast cancer. *In Lancet*. Vol. 350. Collaborative group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1047-1059.
- Hsu, C.S., W.W. Shen, Y.M. Hsueh, and S.L. Yeh. 2001. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women: Effects on plasma lipids, antioxidant enzymes activities and bone density. *J Reprod Med*. 46:940.
- Hur, H.G., J.O. Lay, Jr., R.D. Beger, J.P. Freeman, and F. Rafii. 2000. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*. 174:422-8.
- Jacobson, J.S., A.B. Troxel, J. Evans, L. Klaus, L. Vahdat, D. Kinne, K.M. Lo, A. Moore, P.J. Rosenman, E.L. Kaufman, A.I. Neugut, and V.R. Grann. 2001. Randomized trial of black cohosh for the treatment of hot flashes among women with a history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 19:2739-45.
- Jang, D.S., M. Cuendet, M.E. Hawthorne, L.B. Kardono, K. Kawanishi, H.H. Fong, R.G. Mehta, J.M. Pezzuto, and A.D. Kinghorn. 2002. Prenyated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*. 61:867-72.
- Jarry, H., M. Metten, B. Spengler, V. Christoffel, and W. Wuttke. 2003. In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas*. 44 Suppl 1:S31-8.
- Jensen, E.V., and H.I. Jacobsen. 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res*. 18:387-414.
- Johnston, C.C., Jr., N.H. Bjarnason, F.J. Cohen, A. Shah, R. Lindsay, B.H. Mitlak, W. Huster, M.W. Draper, K.D. Harper, H. Heath, 3rd, C. Gennari, C. Christiansen, C.D. Arnaud, and P.D. Delmas. 2000. Long-term effects of raloxifene on bone mineral density, bone turnover, and serum lipid levels in early postmenopausal women: three-year data from 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*. 160:3444-50.
- Kadir, R., D. Stempler, Z. Liron, and S. Cohen. 1987. Delivery of theophylline into excised human skin from alkanolic acid solutions: a "push-pull" mechanism. *J Pharm Sci*. 76:774-9.

- Kao, J., and M.P. Carver. 1990. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 22:363-410.
- Katzenellenbogen, B.S., K.L. Kendra, M.J. Norman, and Y. Bertois. 1987. Proliferation, hormonal responsiveness and estrogen receptor content of MCF-7 breast cancer cells grown in the short- and long-term absence of estrogens. *Cancer Res.* 47:4355-4360.
- King, A., and G. Young. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc.* 99:213-8.
- Kitaoka, M., H. Kadokawa, M. Sugano, K. Ichikawa, M. Taki, S. Takaishi, Y. Iijima, S. Tsutsumi, M. Boriboon, and T. Akiyama. 1998. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.* 64:511-5.
- Klotz, D.M., S.C. Hewitt, P. Ciana, M. Raviscioni, J.K. Lindzey, J. Foley, A. Maggi, R.P. DiAugustine, and K.S. Korach. 2002. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem.* 277:8531-7.
- Krishnan, H.B., and S.G. Pueppke. 1993. Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. *Mol Plant Microbe Interact.* 6:107-13.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 138:863-70.
- Kuiper, G.G., E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:5925-30.
- Kumar, V., and P. Chambon. 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell.* 55:145-56.
- Lapcik, O., R. Hampl, N. al-Maharik, A. Salakka, K. Wahala, and H. Adlercreutz. 1997. A novel radioimmunoassay for daidzein. *Steroids.* 62:315-20.
- Lapcik, O., R. Hampl, M. Hill, K. Wahala, N.A. Maharik, and H. Adlercreutz. 1998. Radioimmunoassay of free genistein in human serum. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 64:261-8.
- Laycock, J.F., and P.H. Wise. 1996. Essential Endocrinology. Oxford University Press.
- Lee, H.P., L. Gourley, S.W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, and N.E. Day. 1991. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet.* 337:1197-200.
- Lee, S.T., T.K. Schoch, D.R. Gardner, and B.L. Stegelmeier. 2000. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for toxic larkspur (*Delphinium* spp.) alkaloids. *J Agric Food Chem.* 48:4520-8.
- Leung, L.K., and T.T. Wang. 2000. Bcl-2 is not reduced in the death of MCF-7 cells at low genistein concentration. *J Nutr.* 130:2922-6.
- Levin, E.R. 2002. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* 67:471-5.
- Linford, N., C. Wade, and D. Dorsa. 2000. The rapid effects of estrogen are implicated in estrogen-mediated neuroprotection. *J Neurocytol.* 29:367-74.
- Love, R.R., R.B. Mazess, H.S. Barden, S. Epstein, P.A. Newcomb, V.C. Jordan, P.P. Carbone, and D.L. DeMets. 1992. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med.* 326:852-6.
- Lucas, E.A., R.D. Wild, L.J. Hammond, D.A. Khalil, S. Juma, B.P. Daggy, B.J. Stoecker, and B.H. Arjmandi. 2002. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:1527-32.
- Lucas, P.C., and D.K. Granner. 1992. Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem.* 61:1131-73.
- Lüllmann, H., and K. Mohr. 2001. Taschenatlas der Pharmakologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Maggiolini, M., D. Bonofiglio, S. Marsico, M.L. Panno, B. Cenni, D. Picard, and S. Ando. 2001. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* 60:595-602.
- Malawski, G. 1997. Isolierung einer Substanz mit östrogenen Wirkung aus Hopfen. In Fachbereich Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie. TU, Berlin.

- Manni, A., R. Baker, B.M. Arafah, and O.H. Pearson. 1981. Uterine estrogen and progesterone receptors in the ovariectomized rat. *J Endocrinol.* 91:281-287.
- Markovits, J., C. Linassier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J.M. Saucier, J.B. Le Pecq, and A.K. Larsen. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 49:5111-7.
- Martini, P.G., and B.S. Katzenellenbogen. 2003. Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85:117-22.
- May, F.E., and B.R. Westley. 1995. Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 49:400-14.
- McDonnell, D.P. 1999. The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol Metab.* 10:301-311.
- Meseguer, A., C. Puche, and A. Cabero. 2002. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res.* 34:731-6.
- Metka, M. 2001. Phytoestrogene, Phytogestagene und Phytoandrogene. *J Menopause.* 4:12-19.
- Milligan, S.R., J.C. Kalita, A. Heyerick, H. Rong, L. De Cooman, and D. De Keukeleire. 1999. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2249-52.
- Milligan, S.R., J.C. Kalita, V. Pocock, V. Van De Kauter, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, H. Rong, and D. De Keukeleire. 2000. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:4912-5.
- Miranda, C.L., G.L. Aponso, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, and D.R. Buhler. 2000a. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett.* 149:21-9.
- Miranda, C.L., J.F. Stevens, A. Helmrich, M.C. Henderson, R.J. Rodriguez, Y.H. Yang, M.L. Deinzer, D.W. Barnes, and D.R. Buhler. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 37:271-85.
- Miranda, C.L., J.F. Stevens, V. Ivanov, M. McCall, B. Frei, M.L. Deinzer, and D.R. Buhler. 2000b. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem.* 48:3876-84.
- Miyamoto, M., Y. Matsushita, A. Kiyokawa, C. Fukuda, Y. Iijima, M. Sugano, and T. Akiyama. 1998. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Med.* 64:516-9.
- Morrissey, C., and R.W. Watson. 2003. Phytoestrogens and prostate cancer. *Curr Drug Targets.* 4:231-41.
- Mousavi, Y., and H. Adlercreutz. 1993. Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids.* 58:301-4.
- Mukerjee, S.K., and T.K. Seshadri. 1955. A new isomeric change in the flavonoids. *Chemistry and Industry:*271-275.
- MWS. 2003. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *In Lancet.* Vol. 362. Million Women Study Collaborators. 419-427.
- Nadal, A., A.B. Ropero, E. Fuentes, and B. Soria. 2001. The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci.* 22:597-9.
- Nenci, I., E. Marchetti, and P. Querzoli. 1988. Commentary on human mammary preneoplasia. The estrogen receptor-promotion hypothesis. *J Steroid Biochem.* 30:105-6.
- Nikolic, D., Y. Li, L.R. Chadwick, S. Grubjesic, P. Schwab, P. Metz, and R.B. van Breemen. 2004. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 32:272-9.
- O'Connell, D., J. Robertson, D. Hernry, and W. Gillespie. 1998. A systemic review of the skeletal effects of estrogen therapy in postmenopausal women. II: An assessment of treatment effects. *Climacteric.* 1:112-123.
- Okura, A., H. Arakawa, H. Oka, T. Yoshinari, and Y. Monden. 1988. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 157:183-9.

- Osborne, C.K., H. Zhao, and S.A. Fuqua. 2000. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol.* 18:3172-86.
- Pappas, T.C., B. Gametchu, and C.S. Watson. 1995. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J.* 9:404-10.
- Pepper, M. 2002. 8-Prenylnaringenin, a novel highly potent phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and alters the endothelial cell proteolytic repertoire. Schering AG, Berlin.
- Pepper, M.S., S.J. Hazel, M. Humpel, and W.D. Schleuning. 2004. 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 199:98-107.
- Po, L.S., T.T. Wang, Z.Y. Chen, and L.K. Leung. 2002. Genistein-induced apoptosis in MCF-7 cells involves changes in Bak and Bcl-x without evidence of anti-oestrogenic effects. *Br J Nutr.* 88:463-9.
- Potter, S.M., J.A. Baum, H. Teng, R.J. Stillman, N.F. Shay, and J.W. Erdman, Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 68:1375S-1379S.
- Prelevic, G.M., and H.S. Jacobs. 1997. New developments in postmenopausal hormone replacement therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 9.
- Punnonen, R. 1972. Effect of castration and peroral estrogen therapy on the skin. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 21:3-44.
- Razandi, M., A. Pedram, G.L. Greene, and E.R. Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.* 13:307-19.
- Reed, J.C., T. Miyashita, S. Takayama, H.G. Wang, S. Krajewski, C. Aime-Sempe, S. Bodrug, S. Kitada, and M. Hanada. 1996. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem.* 60:23-32.
- Reinli, K., and G. Block. 1996. Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr Cancer.* 26:123-48.
- Rong, H., T. Boterberg, J. Maubach, C. Stove, H. Depypere, S. Van Slambrouck, R. Serreyn, D. De Keukeleire, M. Mareel, and M. Bracke. 2001. 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells. *Eur J Cell Biol.* 80:580-5.
- Sadovsky, Y., and S. Adler. 1998. Selective modulation of estrogen receptor action. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:3-5.
- Sambrook, J., and D.W. Russel. 2000. Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanchez, E.R., L.E. Faber, W.J. Henzel, and W.B. Pratt. 1990. The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry.* 29:5145-52.
- Sato, T., M. Hanada, S. Bodrug, S. Irie, N. Iwama, L.H. Boise, C.B. Thompson, E. Golemis, L. Fong, H.G. Wang, and et al. 1994. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9238-42.
- Sauerbronn, A.V., A.M. Fonseca, V.R. Bagnoli, P.H. Saldiva, and J.A. Pinotti. 2000. The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet.* 68:35-41.
- Saunders, P.T.K., S.M. Maguire, J. Gaughan, and M.R. Millar. 1998. Expression of estrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. *J Endocrinol.* 154:R13-R16.
- Scambia, G., D. Mango, P.G. Signorile, R.A. Anselmi Angeli, C. Palena, D. Gallo, E. Bombardelli, P. Morazzoni, A. Riva, and S. Mancuso. 2000. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause.* 7:105-11.
- Schaefer, O., M. Humpel, K.H. Fritzemeier, R. Bohlmann, and W.D. Schleuning. 2003. 8-Prenyl naringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84:359-60.
- Seibel, M.M. 2003. Treating hot flushes with hormone replacement therapy. *J Fam Pract.* 52:291-296.
- Seo, H.S., and G. Leclercq. 2002. Evaluation of potential implication of membrane estrogen binding sites on ERE-dependent transcriptional activity and intracellular estrogen receptor-alpha regulation in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80:109-23.

- Sfakianos, J., L. Coward, M. Kirk, and S. Barnes. 1997. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr.* 127:1260-8.
- Shanafelt, T.D., D.L. Barton, A.A. Adjei, and C.L. Loprinzi. 2002. Pathophysiology and treatment of hot flashes. *Mayo Clin Proc.* 77:1207-1218.
- Shirataki, Y., N. Motohashi, S. Tani, H. Sakagami, K. Satoh, H. Nakashima, S.K. Mahapatra, K. Ganguly, S.G. Dastidar, and A.N. Chakrabarty. 2001. In vitro biological activity of prenylflavonoids. *Anticancer Res.* 21:275-80.
- Shupnik, M.A., M.S. Gordon, and W.W. Chin. 1989. Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNA. *Mol Endocrinol.* 6:660-665.
- Soleas, G.J., E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg. 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem.* 30:91-113.
- Steck, T. 2003. Hormontherapie im Klimakterium. *Ars Medici.* 13:657-660.
- Stevens, J.F., C.L. Miranda, D.R. Buhler, and M.L. Deinzer. 1998. Chemistry and biology of hop flavonoids. *J Am Soc Brew Chem.* 56:136-145.
- Stevens, J.F., A.W. Taylor, J.E. Clawson, and M.L. Deinzer. 1999a. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J Agric Food Chem.* 47:2421-8.
- Stevens, J.F., A.W. Taylor, and M.L. Deinzer. 1999b. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 832:97-107.
- Stevens, J.F., A.W. Taylor, G.B. Nickerson, M. Ivancic, J. Henning, A. Haunold, and M.L. Deinzer. 2000. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry.* 53:759-75.
- Tahara, S., Y. Katagiri, J. Ingham, and J. Mizutani. 1994. Prenylated flavanoids in the roots of yellow lupin. *Phytochemistry.* 36:1261-1271.
- Tataryn, I.V., D.R. Meldrum, K.H. Lu, A.M. Frumar, and H.L. Judd. 1979. LH, FSH and skin temperature during the menopausal hot flash. *J Clin Endocrinol Metab.* 49:152-154.
- Taylor, A.H., and F. Al-Azzawi. 2000. Immunolocalization of estrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 24:145-155.
- Tekel, J., D. De Keukeleire, H. Rong, E. Daeseleire, and C. Van Peteghem. 1999. Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 47:5059-63.
- Thornton, M.J. 2002. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol.* 11:487-502.
- Thornton, M.J., A.H. Taylor, K. Mulligan, F. Al-Azzawi, C.C. Lyon, J. O'Driscoll, and A.G. Messenger. 2003. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol.* 12:181-90.
- Toda, S., and Y. Shirataki. 2000. Inhibitory effects of sophoraflavanones B and H in *Sophora moorcroftiana* Beth ex Baker on copper-ion-induced protein oxidative modification of mice brain homogenate in vitro. *Biol Trace Elem Res.* 78:157-62.
- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, and P. Chambon. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* 59:477-87.
- Treloar, A.E. 1981. Menstrual cyclicality and the pre-menopause. *Maturitas.* 3:249-64.
- USPSTF. 2003. Postmenopausal hormone replacement therapy for the primary prevention of chronic condition: recommendations and rationale. In *Am Fam Physician*. Vol. 67. US Preventive Services Task Force. 358-364.
- Varila, E., I. Rantala, A. Oikarinen, J. Risteli, T. Reunala, H. Oksanen, and R. Punnonen. 1995. The effect of topical oestradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol.* 102:985-9.
- Wang, T.T., and J.M. Phang. 1995. Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.* 55:2487-9.
- Watanabe, S., M. Yamaguchi, T. Sobue, T. Takahashi, T. Miura, Y. Arai, W. Mazur, K. Wahala, and H. Adlercreutz. 1998. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr.* 128:1710-5.
- Welsh, J., J.A. Wietzke, G.M. Zinser, B. Byrne, K. Smith, and C.J. Narvaez. 2003. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr.* 133:2425S-2433S.

-
- Welsh, J., J.A. Wietzke, G.M. Zinser, S. Smyczek, S. Romu, E. Tribble, J.C. Welsh, B. Byrne, and C.J. Narvaez. 2002. Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83:85-92.
- WHI. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *In JAMA.* Vol. 288. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 321-333.
- WHO. 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal women. WHO Study Group, Geneva, Switzerland.
- WHO. 1996. Research on the Menopause in the 1990's. WHO Study Group, Geneva, Switzerland.
- Wietzke, J.A., and J. Welsh. 2003. Phytoestrogen regulation of a Vitamin D3 receptor promoter and 1,25-dihydroxyvitamin D3 actions in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84:149-57.
- Williams, A.C., and B.W. Barry. 1992. Skin absorption enhancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 9:305-53.
- Williams, A.C., and B.W. Barry. 2004. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:603-18.
- Yamamoto, H., M. Senda, and K. Inoue. 2000. Flavanone 8-dimethylallyltransferase in *Sophora flavescens* cell suspension cultures. *Phytochemistry.* 54:649-55.
- Yilmazer, M., J.F. Stevens, and D.R. Buhler. 2001a. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett.* 491:252-6.
- Yilmazer, M., J.F. Stevens, M.L. Deinzer, and D.R. Buhler. 2001b. In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 29:223-31.
- Youdim, K.A., J.P. Spencer, H. Schroeter, and C. Rice-Evans. 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.* 383:503-19.
- Yueh, T.L., and H.Y. Chu. 1977. The metabolic fate of daidzein. *Sci Sin.* 20:513-21.
- Zierau, O., C. Morrissey, R.W. Watson, P. Schwab, S. Kolba, P. Metz, and G. Vollmer. 2003. Anti-androgenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.* 69:856-8.

7. PUBLIKATIONEN

Journal paper:

Yang, E., M.A. Henriksen, **O. Schaefer**, N. Zakharova, and J.E. Darnell, Jr. 2002. Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem.* 277:13455-62.

Schaefer, O., M. Hümpel, K.H. Fritzemeier, R. Bohlmann, and W.D. Schleuning. 2003. 8-Prenyl naringenin is a potent ER α selective phytoestrogen present in hops and beer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84:359-60.

Patente:

Bohlmann, F., M. Hümpel, P. Isaksson, **O. Schaefer**, and W.D. Schleuning. 2003. Use of 8-Prenyl naringenin for hormone replacement therapy. Schering AG, EU Patent Application.

Poster:

Schaefer, O., M. Hümpel, K.H. Fritzemeier, R. Bohlmann, and W.D. Schleuning. 2003. 8-Prenyl naringenin is a potent ER α selective phytoestrogen present in hops and beer. *15th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Munich 2002

Manuskripte in Bearbeitung:

O. Schaefer, M. Hümpel, and W.D. Schleuning. 2004. Hapten Synthesis and Development of a radio-immuno-assays for quantification of 8-Prenyl naringenin in human fluids and biological samples.

P. Isaksson, M. Hümpel, **O. Schaefer**, A. Maggi, and W.D. Schleuning. 2004. Hop derived phytoestrogen 8-Prenyl naringenin is a bone specific ER-agonist in ovx-rats and transgenic mice.

8. LEBENS LAUF

Name Olaf H. Schaefer
Geboren 10. Januar 1975 in Osnabrück

Schulbildung

1988 - 1994 Ludwig-Windthorst-Gymnasium, Meppen

Universität

1994 - 1997 Studium der Biochemie an der Universität Hannover

1997 - 1998 Studium an der Rockefeller University New York, USA

1998 - 2000 Studium der Biochemie an der Universität Hannover

2000 Diplomarbeit; Titel: "*Generation and Characterization of Stat1 Mutants Affecting Stat1 Activation and Stat1 DNA-Binding*"
Department of Cell Biology, Rockefeller University, New York

Promotion

2001 - 2004 Titel: "*Untersuchungen zum Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin aus Hopfen für den Einsatz in der Hormon-Ersatz-Therapie*"
Universität Hannover in Kooperation mit Schering AG, Berlin

Sonstiges

1997 - 2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

2002 *Young Investigator Award* der TU München

9. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Schleuning (ehem. Schering AG) für die freundliche Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die gute Betreuung der Doktorarbeit und die sehr hilfreichen Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller (Universität Hannover) als Doktorvater danke ich für die Übernahme des 1. Gutachtens sowie den unkomplizierten und ausgesprochen hilfreichen Umgang während des gesamten Studiums.

Bei Herrn Dr. Michael Hümpel (F&E Sonderprojekte, Schering AG) möchte ich mich hiermit ganz besonders für seine hervorragende Betreuung sowie Korrektur der Arbeit, seinen persönlichen Einsatz und die professionelle Koordination des Projektes, die stets motivierende Ansprache und die in vielerlei Hinsicht sehr lehrreiche Zeit bedanken.

Herrn Dr. Karl-Heinrich Fritze (Female Health Care), Herrn Prof. Dr. Werner Skuballa (Medicinal Chemistry 5) und Frau Dr. Hille Gieschen (Preclinical Pharmacokinetics) möchte ich für die Bereitstellung von Laborkapazitäten in ihren Abteilungen danken, sowie Herrn Dr. Rolf Bohlmann, Herrn Dr. Clemens Günther, Frau Dr. Cornelia Klein und Herrn Dr. Joachim Höchel für die freundliche Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen.

Norbert Gallus danke ich für seine kostbare Erfahrung bei chemischen Synthesen und seine fortwährend gute Laune innerhalb und außerhalb des Labors.

Alexander Walter für die praktische Einweisung an diversen Geräten, die Versorgung mit Substanzen und anderen Materialien und die nette Atmosphäre im „office“.

Peter Esperling, Antonia Kohnke, Kirstin Steiner-Hahn, Christiane Gansau, Beatrix von Meier-Ince, Jan Schwarze, Sylvia Kubicka, Marlies Panzer, Susanne Dornbusch, Alexandra Neumann, Annette Zietz, Anja Zietz, Sabine Backhus, Mike Höppner, Daniela Wrobel, Hellmut Morack, Jürgen Skupsch und allen anderen für ihre nette Hilfe.

Ein herzliches Dankeschön und ein dickes Lob für die anregenden Diskussionen und die nette Zeit gilt meinen Mitdoktoranden/Kollegen: Uwe Niesner, Manja Friese-Hamim, Jörg Frauenschuh, Dr. Florian Pühler, Arn Tellmann, Michael Schneider, Alice Dittewig, Dr. Rudolph Beier und Dr. Christoph Geserick sowie der gesamten Abteilung Female Health Care.

Ich danke der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) für die Stipendien-Finanzierung meiner Promotion über zwei Jahre.

Meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern danke ich für ihre stete Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.