

Thevis M, Schänzer W

Dopingbekämpfung aus der Sicht der Kontrollinstanz – Prävention durch vorausschauende Analytik

*The Anti-Doping Fight from the Controller's View –
Prevention by Means of Future-Oriented Analytics*

Deutsche Sporthochschule Köln, Zentrum für Präventive Dopingforschung/Institut für Biochemie

ZUSAMMENFASSUNG

Dopingprävention ist zu einem wesentlichen Bestandteil des Antidopingkampfes geworden und basiert auf vielen verschiedenen Aspekten. Einer der Schwerpunkte ist dabei die Dopinganalytik, welche sowohl bekannte als auch unbekannte und zukünftig verfügbare Medikamente und Dopingmittel nachweisen soll. Die häufigste Substanzklasse verbotener Wirkstoffe, die in Dopingkontrollproben seit mehr als 20 Jahren überwiegend festgestellt wird, ist die der anabolen Wirkstoffe. Bekannte steroidale und nicht-steroidale anabole Substanzen sowie unbekannte „Designer“-Analoge sind Gegenstand aktueller Forschungen, und Präventionsmaßnahmen beinhalten verbesserte Übersichtsanalysen und frühzeitige Methodenentwicklungen zur Bestimmung zukünftig zugelassener Medikamente, die sich in fortgeschrittenen klinischen Testphasen befinden. Zu solchen zählen unter anderem Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs), die ein besonders hohes Missbrauchspotential im Sport besitzen. Ebenso sind Peptidhormone wie z.B. synthetische Insuline von zentraler Bedeutung, da deren Missbrauch erst seit kurzem nachweisbar geworden ist und zahlreiche Hinweise auf einen umfangreichen illegalen Einsatz vorliegen.

Schlüsselwörter: Dopinganalytik, anabole Wirkstoffe, SARMs, Insulin

EINLEITUNG

Dopinganalytische Testverfahren sind in erster Linie ziel- bzw. analytischspezifische Methoden, die eine Kenntnis der zu bestimmenden Substanz oder deren Stoffwechselprodukten voraussetzen. Im Wesentlichen massenspektrometrische Verfahren werden in dieser Hinsicht zur gezielten Datenreduktion auf eine Auswahl von Verbindungen ausgelegt, um diese mit höchstmöglicher Sensitivität und Spezifität zu erfassen (17). Der Nachteil solcher Verfahren ist die Ausblendung unbekannter Analoga, die zu Dopingzwecken hergestellt werden und weder klinisch noch pharmakologisch getestet und somit nicht wissenschaftlich aktenkundig sind. Solche „Designer“-Substanzen sind in der Vergangenheit aufgetreten (4,10) und haben zu zahlreichen Sanktionierungen von Athleten geführt. Dopingprävention bedeutet daher aus der Sicht der Kontrollinstanzen und hier im Speziellen der biochemischen Analytik eine Ergänzung und Verbesserung der Bestimmungsmethoden, um unbekannte oder sehr neue Substanzen mit Missbrauchs- und Dopingpotential zu erfassen, um letztgenannte möglichst vor der Markteinführung bereits in bestehende Verfahren zu implementieren (16).

SUMMARY

Doping prevention has become a central aspect of the contemporary anti-doping fight and consists of numerous different approaches. One key factor is doping control analysis, which enables detection of known and unknown compounds as well as future drugs. Anabolic agents have been the most frequently determined substances for more than 20 years. Known steroidal and non-steroidal drugs and unknown “designer-“ analogues are subject of current research projects, and doping prevention measures include the development of more comprehensive drug testing assays and timely methods to include detection of new therapeutics, which are undergoing late clinical trials. Examples for such compounds are selective androgen receptor modulators (SARMs), for which the potential for misuse in sports is particularly high. Moreover, peptide hormones such as synthetic insulins are of great importance as their misuse has only recently become detectable, and numerous reports and findings indicate a widespread and illegal use.

Key words: Doping analysis, anabolic agents, SARMs, insulin

Anabole Wirkstoffe sind seit mehr als 20 Jahren die am häufigsten detektierten verbotenen Substanzen in Dopingkontrollproben. Die Auffindung eines missbräuchlichen Einsatzes von Testosteron war aufgrund der komplizierten Unterscheidung zwischen endogen produziertem und exogenem Testosteron eine schwierige Aufgabe, die jedoch in der jüngeren Vergangenheit durch die Einführung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (isotope ratio mass spectrometry, IRMS) gelöst wurde. Mit Hilfe dieser Technik konnten daraufhin zahlreiche Dopingvergehen mit Testosteron, Testosteron Prohormonen oder analogen endogenen Steroiden aufgedeckt werden. Zudem wurden verschiedene Designersteroid wie z.B. Tetrahydrogestrinon (THG), Norbolethon oder Madol (3,4,11), die ausschließlich zum Zwecke des Dopings hergestellt wurden, in der Vergangenheit beschrieben. Um weitere solcher Fälle frühzeitig zu erkennen und zu unterbinden sind komplementäre Prozeduren erstellt worden, welche konservierte Kernstrukturen typischer anaboler Steroide oder moderner selektiver Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) erfassen und so unbekannte Analoga bestimmen können. Zudem sind neue Verfahren entwickelt worden, die neben den niedermolekularen anabolen

Tabelle 1: Charakteristische Produkt-Ionen nach Elektrospray Ionisation und kollisions-induzierter Dissoziation typischer Steroid-Nuklei. Das Auftreten der strukturspezifischen Fragmente erlaubt eine Übersichtsanalytik, welche die Substanzklasse und weniger den individuellen Zielanalyten erfasst.

Substanzklasse	Produkt-Ionen (m/z)
Gestron und Analoga	241
Trenbolon und Analoga	227
1-Testosteron und Analoga	187
Testosteron/Nandrolon und Analoga	109
Testosteron und Analoga	97

Wirkstoffen auch einen Nachweis gering-konzentrierter Peptidhormone wie z.B. synthetische Insulinanaloga in Dopingkontroll-Urinproben erlauben (18). Auch hier ist durch neue Medikamente ein Missbrauchspotential durch den leistungssteigernden und Regeneration beschleunigenden Effekt des Insulins in bestimmten Sportarten gegeben.

NEUE KOMPLEMENTÄRE NACHWEISVERFAHREN FÜR ANABOLE WIRKSTOFFE

Designer Steroide

Anabole Steroide leiten sich im Allgemeinen vom Testosteron ab, welches an verschiedenen Positionen modifiziert wurde (Abb.1). Typische Analoga sind durch Oxidationen oder Reduktionen, Alkylierungen und Desmethylierungen entstanden, aus denen sich in erster Linie Nandrolon- und alkylierte Testosteron-Strukturen ergeben haben, welche bevorzugte anabole Wirkungsprofile zeigten. Massenspektrometrische Studien dieser Verbindungen nach Elektrospray Ionisation (ESI) und kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) erlauben die Zuordnung charakteristischer Fragment-Ionen in entsprechenden Produkt-Ionenspektren (12, 15).

Die geladenen Moleküle stoßen dabei unter definierten Beschleunigungsspannungen in der Gasphase mit Inertgasen wie z.B. Helium oder Stickstoff zusammen und fragmentieren zu diagnostischen Bruchstücken, welche den jeweiligen Steroidkern repräsentieren. So generieren steroidale Strukturen mit 3-keto-4,9,11-trien-Nukleus (z.B. Trenbolon), 3-keto-4-en-Nukleus mit und ohne 19-Methylgruppe (z.B. Methyltestosteron und Nandrolon) diagnostische Produkt-Ionen bei m/z 227 bzw. 109 und 97. Damit erlauben modere Triple-Quadrupol Massenspektrometer so genannte precursor ion scan Experimente, welche eine Analyse auf diese Steroidklassen bedeuten (Tab.1), da Kernstrukturen der Steroide und nicht die jeweilige individuelle Substanz bestimmt werden. Alle Steroide mit definierten Nuklei werden erfasst, unabhängig von jeweiligen Molekulargewichten, welche für gängige Zielanalysen unumgänglich sind.

Die Anwendung synthetischer Steroide beeinflusst nachweislich die endogene Steroidbiosynthese, in dem die körpereigenen Steroide wie Testosteron, dessen Hauptmetaboliten Androsteron und Etiocholanolon sowie Andostandiole supprimiert werden. Das resultierende Profil weicht dadurch von Norm- und Referenzwerten ab, welche einen Hinweis auf Doping bzw. Manipulation mit steroidalen Verbindungen geben (8). Sollten keine bekannten synthetischen Steroide detektiert werden, kann eine umfassende Analyse auf mögliche verwandte Verbindungen mit

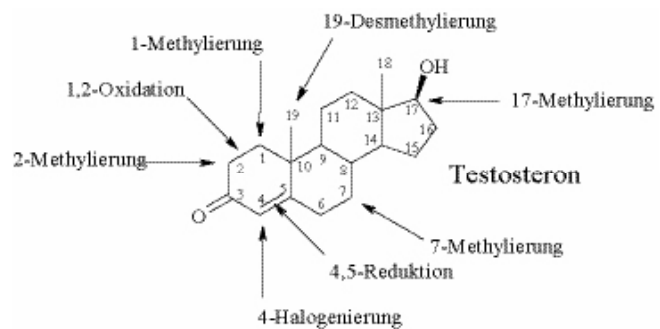


Abbildung 1: Generelle Strukturen des Testosterons und analoger Verbindungen

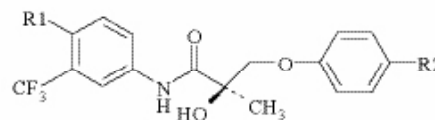


Abbildung 2: Generelle Struktur Arylpropionamid-basierter SARMs. Die Positionen R1 und R2 repräsentieren Modifikationen des Moleküls, die in Testreihen untersucht wurden.

Hilfe des precursor ion scan Screening erfolgen. Fallen in solchen Untersuchungen unnatürliche Verbindungen mit Steroidstruktur auf, müssen Folgeuntersuchungen deren Struktur beweisen, um einen Verstoß gegen die Antidoping Regeln zu belegen.

Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs)

Die zahlreichen unerwünschten Wirkungen anaboler Steroide in Steroidersatztherapien haben seit vielen Jahren zu umfangreichen Studien zur Herstellung gewebe selektiver anaboler Substanzen geführt. Eine erste Klasse so genannter SARMs wurde in Arylpropionamiden (Abb.2) gefunden, welche selektiv die Androgenrezeptoren der Muskel- und Knochengewebe stimulieren und gleichzeitig die der Prostata inhibieren (5,6,9). Erste Pilotstudien haben einen signifikanten Muskel- und Kraftzuwachs bei 120 Probanden gezeigt, wobei Nebenwirkungen die üblicherweise bei Steroidersatztherapien beobachtet werden, ausblieben. Dies ist zum einen auf die bereits angesprochene Gewebe selektivität zurückzuführen, zum anderen auf die Tatsache, dass eine metabolische Verstärkung der androgenen Wirkung nicht vorliegt.

Während Testosteron einen wesentlichen Teil seiner Androgenität nach Transformation in Dihydrotestosteron durch 5 α -Reduktasen vermittelt, können SARMs nicht auf gleichem Wege fungieren (2,7). Mindestens vier Substanzkategorien (Arylpropionamide, bicyclische Hydantoine, Chinoline und Tetrahydrochinoline) werden derzeit Erfolg versprechend klinisch geprüft, und zwei Verbindungen haben die Testphase IIb erreicht (Ostarine und Andarine, GTX, Inc.).

Aufgrund des enormen anabolen Potentials und gleichzeitig reduzierten Nebenwirkungsprofils werden SARMs als kritisch für den Sport angesehen und ab 2008 namentlich durch die Welt Anti-Doping Agentur (WADA) verboten (19). Obwohl noch nicht kommerziell erhältlich ist die Wahrscheinlichkeit, dass solche Medikamente bereits Einzug in den Dopinghandel genommen haben, gegeben. Daher zielt die präventive Dopingforschung auch hier auf eine frühzeitige Implementierung dieser Substanzen in analytische Methoden ab. Ebenso wie für anabole Steroide werden Zielanalysen und gleichzeitige Übersichtsscreenings mit

Hilfe der precursor ion scan Experimente durchgeführt (13,14). So können verabreichte Verbindungen sowie Metaboliten, die aufgrund der frühen Testphasen noch nicht vollständig aufgeklärt und veröffentlicht sind, erfasst werden und einen Missbrauch im Sport anzeigen.

NACHWEISVERFAHREN FÜR SYNTHETISCHE INSULINE

Der Missbrauch von Insulin im Kraft- und Ausdauersport ist mehrfach berichtet worden und aufgrund marginaler Testmöglichkeiten in der Vergangenheit kaum sanktioniert worden. Seit 1999 ist der Gebrauch von Insulin nur Athleten erlaubt, die an Insulin-pflichtigem diabetes mellitus leiden. Durch biotechnologische Modifikation sind zahlreiche synthetische Insulinanaloga hergestellt worden, die deutlich verbesserte Injektion-Wirkungsprofile aufweisen (1).

Sowohl schnell- als auch langwirksame Insuline wurden durch geringfügige Veränderungen der Primärstruktur des humanen Insulins erhalten und besitzen aufgrund ihrer verbesserten Kontrollierbarkeit ebenfalls ein höheres Missbrauchspotential als das humanidentische rekombinante Insulin. Mit Hilfe der Isolierung von intakten Insulinen sowie C-terminal trunkierter Metaboliten durch Immunoaffinitätschromatographie konnten massenspektrometrische Messverfahren etabliert werden, die eindeutig zwischen synthetischen und natürlichen Insulinen differenzieren können (18). Dabei werden sowohl das Molekulargewicht als auch charakteristische Aminosäureteilsequenzen bestimmt, um schlüssig die An- oder Abwesenheit künstlicher Insuline zu beweisen. Obwohl viele immunchemische Analysemethoden ohne Massenspektrometrie verfügbar sind, können diese in den seltensten Fällen modifizierte Formen von natürlichen trennen und einen Missbrauch belegen. Daher sind auch hier massenspektrometrische Verfahren unabdingbarer Bestandteil der modernen Dopinganalytik.

In den Jahren 2005 und 2006 wurden in 10 Fällen synthetische Insuline bei Athleten bestimmt, die jeweils eine therapeutische Ausnahme genehmigung besaßen. Dabei wurde in fünf Fällen Novolog Aspart, in einem Fall Humalog LisPro und in vier weiteren Fällen Glulisine Apidra identifiziert. Der Test hat inzwischen die offizielle Anerkennung durch die WADA erhalten und Routineproben werden bezüglich des Insulinmissbrauchs regelmäßig untersucht.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Neue oder modifizierte Medikamente stellen eine Herausforderung für die Dopingkontrollinstanzen dar, da deren Analytik besondere Schwierigkeiten birgt. Unbekannte Verbindungen sind für viele Nachweisverfahren unsichtbar und erst durch die Einführung von Messverfahren erkennbar, die auf konservierte Kernstrukturen ganzer Substanzklassen ausgerichtet sind und nicht auf individuelle Analyten. Neue Medikamente in fortgeschrittenen klinischen Testphasen sind möglicherweise bereits im Untergrundhandel erhältlich aber in den meisten Fällen noch nicht in aktuelle Antidoping-Programme aufgenommen. Durch ein Scouting in Bezug auf neue Entwicklungen des pharmazeutischen Markts sollen vorausschauend Methoden für neue Substanzen erstellt werden, deren Missbrauchspotential besonders

hoch ist und eine frühzeitige Implementierung in bestehende Dopinganalyseverfahren notwendig macht. Auf diese Weise kann der Vorsprung, den dopende Athleten bisher bei Markteinführung neuartiger Medikamente im Anwendungsfall hatten, minimiert werden.

Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: Keine.

LITERATUR

1. BARNETT AH, OWENS DR: Insulin analogues. *Lancet* 349 (1997) 47-51.
2. BHASIN S, CALOF OM, STORER TW, LEE ML, MAZER NA, JASUJA R, MONTORI VM, GAO W, DALTON JT: Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2 (2006) 146-159.
3. CATLIN DH, AHRENS BD, KUCHEROVA Y: Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16 (2002) 1273-1275.
4. CATLIN DH, SEKERA MH, AHRENS BD, STARCEVIC B, CHANG YC, HATTON CK: Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 1245-1249.
5. CHEN J, KIM J, DALTON JT: Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators. *Mol Interv* 5 (2005) 173-188.
6. DALTON JT, MUKHERJEE A, ZHU Z, KIRKOVSKY L, MILLER DD: Discovery of nonsteroidal androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 244 (1998) 1-4.
7. GAO W, DALTON JT: Ockham's razor and selective androgen receptor modulators (SARMs): are we overlooking the role of 5alpha-reductase? *Mol Interv* 7 (2007) 10-13.
8. GEYER H, SCHÄNZER W, MARECK U, DONIKE M: Factors influencing the steroid profile, in: Donike M, Geyer H, Gotzmann A, and Mareck U (Hrsg): *Recent Advances in Doping Analysis*. Sport und Buch Strauss, Cologne, 1996, 95-114.
9. MARHEFKA CA, GAO W, CHUNG K, KIM J, HE Y, YIN D, BOHL C, DALTON JT, MILLER DD: Design, synthesis, and biological characterization of metabolically stable selective androgen receptor modulators. *J Med Chem* 47 (2004) 993-998.
10. MÜLLER RK, GROSSE J, THIEME D, LANG R: Carphedon - Identifikation einer neuen Designerdroge. *Rechtsmedizin* 9 (1999) 215-217.
11. SEKERA MH, AHRENS BD, CHANG YC, STARCEVIC B, GEORGAKOPOULOS C, CATLIN DH: Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 781-784.
12. THEVIS M, GEYER H, MARECK U, SCHÄNZER W: Screening for unknown synthetic steroids in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 40 (2005) 955-962.
13. THEVIS M, KAMBER M, SCHÄNZER W: Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20 (2006) 870-876.
14. THEVIS M, KOHLER M, MAURER J, SCHLÖRER N, KAMBER M, SCHÄNZER W: Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21 (2007) 3477-3486.
15. THEVIS M, SCHÄNZER W: Mass Spectrometric Analysis of Androstan-17beta-ol-3-one and Androstadiene-17beta-ol-3-one Isomers. *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (2005) 1660-1669.
16. THEVIS M, SCHÄNZER W: Emerging Drugs - Potential for misuse in sport and doping control detection strategies. *Mini-Rev Med Chem* 7 (2007) 533-539.
17. THEVIS M, SCHÄNZER W: Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrom Rev* 26 (2007) 79-107.

18. **THEVIS M, THOMAS A, SCHÄNZER W:** Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spectrom Rev* 27 (2008) 35-50.
19. **WORLD ANTI-DOPING AGENCY:** The 2008 Prohibited List. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf (28-11-2007)

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Mario Thevis
Deutsche Sporthochschule Köln
Zentrum für Präventive Dopingforschung
Institut für Biochemie
Am Sportpark Müngersdorf 6
50933 Köln
E-Mail: thevis@dshs-koeln.de