

Das Nadelöhr – von der Forschung zur Entwicklung

Achim Aigner, Frank Czubayko, Gerhard Klebe und Milton Stubbs

- 2.1 Vom Zufall zum Konzept: Das wachsame Auge entdeckt neue Arzneimitteltherapien – 54**
 - 2.1.1 Ein prominentes Beispiel: Entdeckung und Entwicklung der β -Lactamantibiotika – 54
 - 2.1.2 Die molekularen Grundlagen einer Arzneimittelwirkung – 56
 - 2.1.3 Von der Biochemie geprägt: hin zu einer Target-orientierten Arzneistofftherapie – 64
 - 2.1.4 Die Suche nach neuen Leitstrukturen: Von Vorlagen aus der Natur bis zu Verbindungsbibliotheken aus der kombinatorischen Chemie – 71
 - 2.1.5 Neue Leitstrukturen aus dem Computer – 74
 - 2.1.6 Aus dem Reagenzglas in den Organismus: Was eine Leitstruktur noch alles braucht, um zu einem Arzneimittel zu werden – 80
- 2.2 Entwicklung – Was gehört dazu? – 83**
 - 2.2.1 Vorklinische Arzneimittelprüfung – Experimentelle Pharmakologie – 83
 - 2.2.2 Vorklinische Arzneimittelprüfung – Toxikologie – 94
 - 2.2.3 Statistik und Biometrie – 101
 - 2.2.4 Klinische Arzneimittelprüfung vor der Zulassung – Phasen I–III – 105
 - 2.2.5 Phase IV: Therapeutische Anwendung nach der Zulassung – 113
- Literatur – 114**

2.1 Vom Zufall zum Konzept: Das wachsame Auge entdeckt neue Arzneimitteltherapien

Die Wurzeln der Arzneimittelforschung reichen zurück bis in die Anfänge der Menschheitsgeschichte. Von jeher war es der Traum, auf gezieltem Weg zu Therapeutika zu kommen. Schon für die ersten Hochkulturen ist der Einsatz pflanzlicher, mineralischer oder tierischer Drogen belegt. Im Mittelalter suchten die Alchimisten nach dem Lebenselixier, das alle Krankheiten zu heilen vermag – leider vergebens. Bis zum Anfang des 19. Jahrhunderts beschränkte sich die Arzneimitteltherapie indessen auf Naturstoffe und anorganische Chemikalien. Viele der damals verfolgten Konzepte entspringen der traditionellen **Volksmedizin**, sei es die narkotische Wirkung des Mohns, der Einsatz der Herbstzeitlose gegen Gicht oder die Meerzwiebel bei Herzinsuffizienz (Wassersucht). Im Altertum beschrieb Theriak eine aus ursprünglich 54 Materialien zusammengesetzte Mischung, die als Antidot bei Vergiftungen aller Art Abhilfe schaffen sollte. Über zerriebene Perlen eingebrachtes Calciumcarbonat könnte durchaus das aktive Prinzip bei der Behandlung von Sodbrennen verstehen lassen. Die Chinesen blicken ebenfalls auf eine lange Tradition der Volksmedizin zurück. In den 52 Büchern des Li Shizhen, die bereits 1590 veröffentlicht wurden, werden die medizinischen Prinzipien aus Pflanzen, Insekten, Tieren und Mineralien in vielen tausend Zubereitungsformen beschrieben. Praktisch bis zu Beginn des 19. Jahrhunderts waren alle therapeutischen Prinzipien ursächlich auf Pflanzenextrakte, tierische Inhaltsstoffe oder Mineralien zurückzuführen.

Dies änderte sich grundlegend mit dem Aufkommen der organischen Chemie. Jetzt begann der organische Reinstoff als Wirksubstanz an Bedeutung zu gewinnen. Ausgehend von den vornehmlich aus Pflanzen isolierten Alkaloiden und anderen Inhaltsstoffen begann man, Arzneistoffe gezielt herzustellen. Umso mehr muss man zurückblickend feststellen, dass sich in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts Farbstoffe und Arzneimittel gleichermaßen befruchteten. So manches als **Wirkstoffsynthese** geplantes Herstellungsverfahren führte zu einem hervorragenden Farbstoff,

beispielsweise die von Perkin geplante Synthese des Chinins, einem potenten Malariawirkstoff, die bei dem Seidenfarbstoff Mauvein endete. Umgekehrt wurden synthetische Farbstoffe parallel auch auf ihre pharmakologische Wirkung geprüft. So fand schon Robert Koch zahlreiche antibakterielle und antiparasitäre Farbstoffe und das von Paul Ehrlich entdeckte Syphilismittel Salvarsan wurde, wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, in der Farbenforschung der Farbwerke Hoechst entwickelt.

Obwohl die chemische Synthese von Wirkstoffmolekülen auf der Grundlage von rationalen Konzepten erfolgte, erwies sich immer wieder der Zufall als belebendes Element in der Arzneimittelforschung. So ist die Arzneimittelforschung bis zum heutigen Tag geprägt vom glücklichen Zufall. Schon 1886 beschrieben Cahn und Hepp im *Centralblatt für Klinische Medizin* die fiebersenkenden Eigenschaften von Acetanilid – damals fälschlicherweise als Naphthalin angenommen – mit den Worten: »Ein glücklicher Zufall hat uns ein Präparat in die Hand gespielt.«

War es zunächst die weitgehende Unkenntnis der biologischen Vorgänge, in die ein Arzneimittel eingreift, die eigentlich nur der Zufallsentdeckung eine Chance gab, so war es später der vorbereitete Geist des exakten, weitblickenden und kritisch beobachtenden Wissenschaftlers, der die Zufallsentdeckung über viele Jahre fast schon zum Konzept der Arzneimittelforschung werden ließ. Mit der Verbesserung der Arbeitshypothesen hat der Zufall heute an Bedeutung verloren und die Forschung sucht den geradlinigen Weg zum Wirkprinzip. Doch auch bei der Entdeckung des *lifestyle drug* Viagra hat die Zufallsentdeckung erst kürzlich wieder die Pate gestanden.

2.1.1 Ein prominentes Beispiel: Entdeckung und Entwicklung der β -Lactamantibiotika

Das vielleicht bekannteste Beispiel für eine Zufallsentdeckung ist die **antibiotische Wirkung** von *Penicillium notatum* durch Alexander Fleming im Jahre 1928. Das wachsame Auge dieses Ausnahme-wissenschaftlers entdeckte auf einer verdorbenen Staphylokokkenkultur, dass sich auf dem Nährbo-

den einer Petrischale um eine Schimmelpilzinfektion ein Hof gebildet hatte, in dem keine Bakterien mehr wuchsen. Durch diese Beobachtung angeregt, konnte Fleming zeigen, dass dieser Pilz auch andere Bakterienkulturen hemmte. Fleming nannte die noch unbekannte Wirksubstanz Penicillin. Erst 1940 isolierten und charakterisierten Ernst Boris Chain und Howard Florey den Hemmstoff. Zum ersten therapeutischen Einsatz kam das Penicillin 1941 bei einem englischen Polizisten. Trotz vorübergehender Besserung und allen Versuchen, das Penicillin aus dem Urin des Patienten zurückzugewinnen, verstarb er nach einigen Tagen. Die zur Verfügung stehende Menge an Wirksubstanz war für die Behandlung nicht ausreichend gewesen.

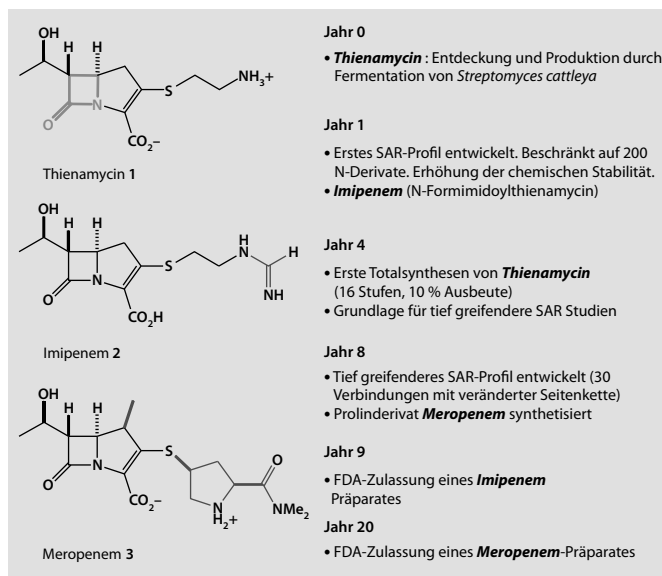
Später fand sich in einer angesammelten Melone von einem Markt im Bundesstaat Illinois der Pilz *Penicillium chrysogenum*, der zum einen deutlich mehr **Penicillin** produzierte, zum anderen dazu noch viel einfacher zu züchten war. Mutanten des Pilzes konnten später zu einer vervielfachten Produktion des Wirkstoffs herangezogen werden. Das anfänglich gewonnene Penicillin erwies sich als Gemisch aus hauptsächlich fünf verschiedenen Grundsubstanzen. Der mühsame Weg zur Strukturaufklärung des aus einem Thiazolidin- und β -Lactamrings aufgebauten Penicillins wurde von zahlreichen Wissenschaftlern in den 1950er Jahren geleistet. Die Raumstruktur des Wirkstoffes konnte 1945 von Dorothy Hodgkin mithilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, zur damaligen Zeit eine absolute Meisterleistung. Neben der Aufklärung der chemischen Struktur des Penicillins konzentrierten sich die Biologen auf dessen Wirkprinzip. Joshua Lederberg beobachtete 1957, dass Bakterien, die gewöhnlich penicillinempfindlich sind, in dessen Gegenwart zu kultivieren sind, wenn ein hypertonisches Nährmedium benutzt wird. Die auf diesem Weg erhaltenen Organismen (Protoplasten) besitzen keine Zellwände und lysieren, wenn sie in ein normales Medium überführt werden. Damit lag der Schluss nahe, dass Penicillin in die Zellwandbiosynthese eingreift. 1965 entdeckten James Park und Jack Strominger, dass Penicillin den letzten Schritt in der Zellwandbiosynthese der *Staphylococcus aureus*-Bakterien durch irreversible Blockade des Enzyms (D-Alanin-Transpeptidase) hemmt, der zur Quervernetzung der Glykansträn-

ge über eine Peptidbrücke führt. In diesem Schritt entsteht eine Bindung zwischen einem Glycin und einem D-Alanin, weiterhin wird ein D-Alanin freigesetzt. Penicillin hemmt das Enzym nun, indem es unter Ringöffnung des gespannten viergliedrigen Lactamrings kovalent an ein Serin im katalytischen Zentrum der Peptidase bindet. Es ahmt im aktiven Zentrum die Bindung des D-Ala-D-Ala-Substrats nach. Durch die kovalente Bindung, die das ringgeöffnete Penicillin mit dem Enzym eingeht, wird es irreversibel gehemmt.

Durch intensiven Einsatz der β -Lactamantibiotika ist es zu Resistenzentwicklungen gekommen. So haben die Bakterien selbst Enzyme, die **β -Lactamasen**, entwickelt, die die Antibiotika durch Öffnung des β -Lactamrings inaktivieren. Sie sind den eigentlichen Penicillin-bindenden Transpeptidasen sehr ähnlich. Als einziger Unterschied kann der nach Ringöffnung mit dem Enzym kovalent am Serin verknüpfte Arzneistoff wieder durch den nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls abgespalten werden. Der ringgeöffnete Arzneistoff ist dadurch für die Hemmung der Transpeptidase unbrauchbar geworden. Die β -Lactamase kann nun aber in einem weiteren Umsatzzyklus das nächste Penicillin-Molekül binden und deaktivieren.

Nun ist es wiederum gelungen, die Penicillin-Antibiotika so zu variieren, dass auch von den β -Lactamasen der intermediär kovalent verknüpfte Inhibitor nicht mehr abgespalten werden kann. Dazu hat man die Moleküle so verändert, dass sie die Position blockieren, an die das nucleophile Wassermolekül in den aktiven Lactamasen platziert werden muss. Durch Kombination eines Penicillins mit einem β -Lactamase-Inhibitor kann eine Addition der Wirkungsweisen erzielt werden und Resistenzen lassen sich umgehen.

Die angesprochene Klasse von Antibiotika soll auch als Beispiel dienen, um zu verdeutlichen, mit welchen Zeiträumen bei einer Arzneimittelentwicklung zu rechnen ist. Im Jahre 1976 wurde Thienamycin als Lactamase-unempfindliches Antibiotikum entdeckt (■ Abb. 2.1; Thienamycin). Es konnte durch Fermentation aus *Streptomyces cattleya* produziert werden. Ein Jahr später ließ sich durch Synthese von 200 Derivaten, die sich auf Veränderungen einer Seitenkette konzent-



■ **Abb. 2.1** Die Entwicklung potenter Carbapeneme als neue Antibiotika vom Penicillintyp mit einem β -Lactamring (fett) zog sich über 20 Jahre hin. Ausgehend von Thienamycin (1) konnte durch Strukturoptimierung zunächst Imipenem (2) entwickelt und vermarktet werden. Nach weiterer Optimierung stand Meropenem (3) zu Verfügung, das 20 Jahre nach der Entdeckung von Thienamycin auf den Markt kam.

rierten, Imipenem als Wirkstoff mit verbesserter chemischer Stabilität entwickeln (■ Abb. 2.1; Imipenem). Acht Jahre später erhielt dieser Wirkstoff als erstes Carbapenem die Zulassung. Die Totalsynthese des Thienamycins über 16 Stufen mit 10 % Ausbeute verschlang drei Jahre. Allerdings war diese Synthese Voraussetzung, um auch **Struktur-Wirkungsbeziehungen (structure activity relationship, SAR)** auf den zentralen Ringbaustein auszudehnen. Nach weiteren vier Jahren Strukturoptimierung stand dann das Prolinderivat Meropenem bereit (■ Abb. 2.1; Meropenem). Dieser neue Wirkstoff konnte anschließend, mittlerweile 20 Jahre nach der Entdeckung des Thienamycins, als Arzneimittel zugelassen werden.

2.1.2 Die molekularen Grundlagen einer Arzneimittelwirkung

Dem gezielten Entwurf eines Arzneimittels muss die Frage nach dem **molekularen Mechanismus** seiner Wirkung vorausgestellt werden. Wie wirkt ein Arzneimittel? Zunächst war es Emil Fischer,

der ein erstes Konzept über die Auslösung einer Wirkung vor mehr als 100 Jahren aufgestellt hat. Er verglich die genaue Passform eines Substratmoleküls für das Katalysezentrum eines Enzyms mit dem Bild eines Schlüssels und eines Schlosses. Knapp 20 Jahre später formulierte Paul Ehrlich die Hypothese, dass ohne Bindung keine Wirkung möglich sei, wobei er sich auf Arzneistoffe bezog, die Bakterien oder Parasiten abtöten sollten. Als Wirkungsvoraussetzung müssen diese zunächst gebunden werden. Über 100 Jahre später vermögen wir die Korrektheit dieser innovativen Aussagen einzuschätzen, da uns die Kristallstrukturanalysen von Protein-Ligand-Komplexen genau dieses Bild vermitteln. Ein Arzneimittel muss an seinen Wirkort transportiert werden, wo es durch spezifische und hochaffine Bindung an ein Makromolekül seine Wirkung entfaltet. Viele Arzneimittel wirken als Inhibitoren (Hemmstoffe) von Enzymen bzw. als Agonisten (Aktivatoren) oder Antagonisten (Hemmstoffe) von Rezeptoren. Enzyminhibitoren bzw. Rezeptorantagonisten besetzen eine Bindestelle und verhindern so kompetitiv die Anlagerung eines Substrats oder eines endogenen Rezeptorli-

ganden. Auf diesem Weg wird die ursprüngliche Funktion des Makromoleküls ausgeschaltet. Agonisten können dagegen Folgeprozesse initialisieren, sie besitzen eine sog. intrinsische Wirkung.

Enzyminhibitoren

Enzyme vermitteln Stoffwechselvorgänge und Biosynthesepfade bzw. regulieren wichtige physiologische Prozesse. Durch Absenken der Aktivierungsbarrieren chemischer Reaktionen können diese im wässrigen Medium normalerweise bei Körpertemperatur und Normaldruck mit erstaunlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten ablaufen. Im Verlaufe der Evolution haben sich Enzymfamilien mit analogem räumlichen Aufbau (Faltungsmuster) und strukturell konservierten katalytischen Zentren entwickelt. Allerdings treten kleine Unterschiede in der Zusammensetzung der Bindestellen auf, die deutlichen Einfluss auf die erzielten Substratspezifitäten nehmen.

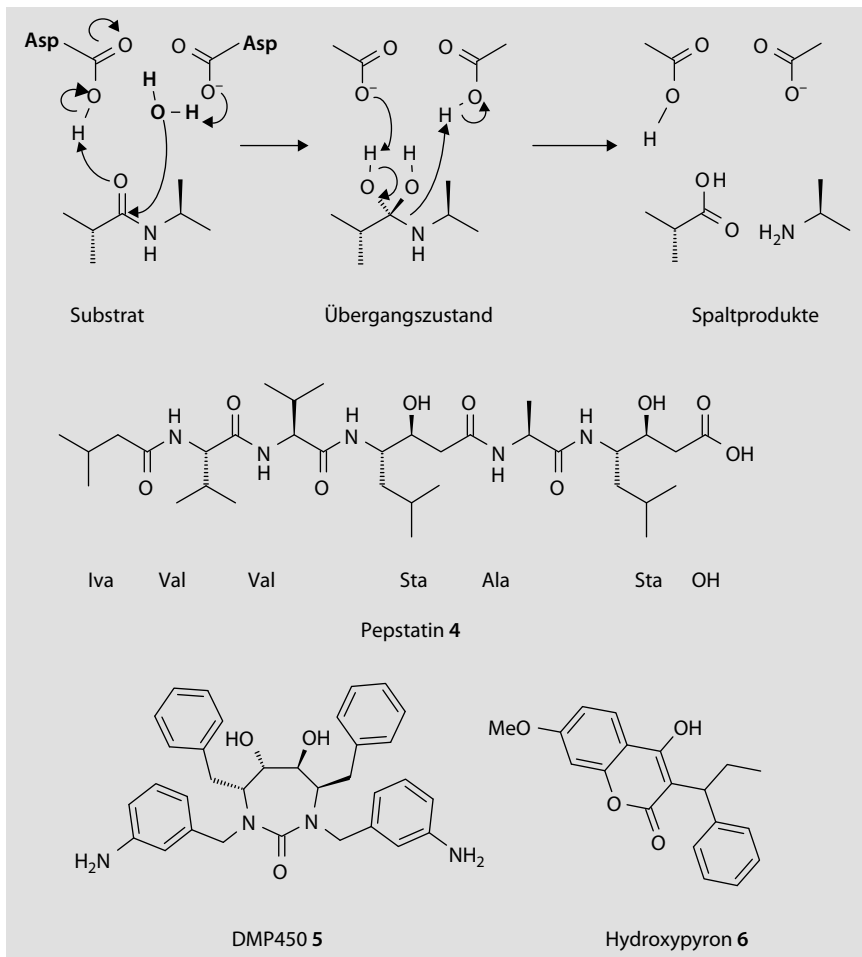
Als wesentlichen Faktor für ihre **katalytische Wirkung** binden Enzyme weder ihre Substrate noch Produkte sehr fest, dagegen wird der Übergangszustand der zu katalysierenden Reaktion optimal gebunden. Dazu kann es sein, dass das Enzym sein Substrat in eine für den Übergangszustand der Reaktion erforderliche Geometrie überführt und die an der Reaktion beteiligten Gruppen so polarisiert, dass sie ebenfalls die elektronischen Verhältnisse auf den Übergangszustand vorbereiten. Über die starke Wechselwirkung mit dem Übergangszustand der Reaktion erreicht das Enzym eine Absenkung der Aktivierungsbarriere. Nach Ablösen der Produkte steht das Enzym für die Umsetzung des nächsten Substratmoleküls bereit. Häufig stellen Enzyme Bausteine von komplexen Multidomänenproteinen dar, die an einem Substrat mehrere aufeinander folgende Reaktionsschritte ausführen. Sie können auch an Stoffwechsel- oder Signalkaskaden beteiligt sein, die ganze Enzyme oder kleinere peptidartige Liganden aus einer inaktiven Vorstufe in die Wirkform überführen. So durchläuft die Blutgerinnungskaskade eine sukzessive Aktivierung von Enzymen, die, beginnend mit zwei unabhängigen Wegen, in einen gemeinsamen Pfad einmünden und beim Thrombin enden. Es gelingt, einen schwachen auslösenden Effekt schnell und sicher zu einem deutlich verstärkten Signal zu führen.

Inhibitoren können die katalytische Funktion eines Enzyms durch Besetzen der Bindestelle blockieren, die dem Substrat normalerweise zur Verfügung steht. Deshalb nennt man diese Inhibitoren kompetitive Hemmstoffe. Daneben gibt es auch allosterische Inhibitoren, teilweise auch als Effektoren bezeichnet, die an eine andere Stelle des Enzyms binden und dessen Raumstruktur verändern. Diese konformativen Umlagerungen können dazu führen, dass das Enzym seiner katalytischen Funktion nicht mehr nachkommen kann.

Je nachdem, ob der gebundene Inhibitor eine kovalente Verknüpfung mit dem Enzym eingeht oder die bindenden Kontakte auf nicht kovalenter Bindung beruhen, unterscheidet man **reversible bzw. irreversible Inhibitoren**. Die reversiblen Hemmstoffe müssen durch geeignete, nicht kovalente Wechselwirkungen eine so hohe Affinität zu dem Enzym aufweisen, dass die Bindung des natürlichen Substrats nahezu vollständig unterdrückt wird. Ein reversibler Inhibitor kann aber wieder vom Protein abdissoziieren, ohne dass er dort bleibende Veränderungen hinterlässt. Es gibt auch kovalent bindende Inhibitoren, die über eine chemisch labile Verknüpfung, z. B. als Thioacetal, binden. Auch hier kann der Inhibitor nach geraumer Zeit wieder abgelöst werden. Ist die zwischen Protein und Inhibitor entstehende Bindung allerdings so stark, dass für die Verweilzeit des Enzyms im Organismus keine rückläufige Abspaltung erfolgt, spricht man von irreversibler Hemmung.

Die Entwicklung eines Enzyminhibitors beginnt in aller Regel mit der Struktur des Substrats. Häufig wird auch versucht, die Geometrie des angenommenen Übergangszustandes der Enzymreaktion durch chemisch ähnliche Gruppen zu imitieren. Wichtig ist dabei aber, dass diese Gruppen den üblichen Ablauf der **Enzymreaktion** nicht ermöglichen. Im verbleibenden Teil der Molekülstruktur können die substratähnlichen Inhibitoren viele Strukturelemente des natürlichen Substrats aufweisen.

Zur Erläuterung sollen Inhibitoren der **Aspartylprotease** des HIV-Virus betrachtet werden. In Aspartylproteasen wird die Spaltung einer Peptidbindung durch Angriff eines polarisierten Wassermoleküls als Nucleophil auf das Carbonsäurekohlenstoffatom der Amidbindung eingeleitet



■ **Abb. 2.2** Aspartylproteasen weisen zwei direkt benachbarte Aspartatreste im katalytischen Zentrum auf, die zu Beginn der Peptidspaltungsreaktion (oben links) in unterschiedlichen Protonierungszuständen vorliegen. Die deprotonierte Aminosäure polarisiert ein angreifendes Wassermolekül, das andere Aspartat bildet eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidbindung. Dadurch wird die C=O-Bindung für die nucleophile Addition polarisiert und der Angriff des Wassermoleküls auf den Kohlenstoff erleichtert. Der intermediär gebildete Übergangszustand (oben Mitte) zerfällt in die Spaltprodukte (oben rechts). Die ersten HIV-Proteaseinhibitoren stellten substratanaloge Derivate dar, z. B. das Pepstatin (4), das die nicht-natürliche Aminosäure Statin enthält. Mit dessen Hydroxyethylen-Einheit bindet dieser Ligand, analog dem Übergangszustand der Spaltungsreaktion, an die katalytischen Aspartate. Später gelang es durch Computerdesign zyklische Harnstoffe (z. B. DMP450, 5) bzw. durch experimentelles Screening Hydroxyppyron (6) als potente Leitstrukturen zu entdecken.

(■ Abb. 2.2). Die Reaktion verläuft dann weiter über einen tetraedrischen Übergangszustand, in dem zwei geminale Hydroxygruppen an den ursprünglichen Carbonylkohlenstoff gebunden sind. Das entstandene Diol zerfällt unter Spaltung der C-N-Bindung und Rückbildung der trigonalen Koordination am Kohlenstoff. Angeregt durch die Geometrie des beschriebenen Übergangszustandes

stellten Hydroxyverbindungen einen ersten Ansatz zum Entwurf von Inhibitoren dar. Zusätzlich hatte man Pepstatin (■ Abb. 2.2, 4), einen potenten Inhibitor für eine ganze Reihe Aspartylproteasen, aus Kulturfiltraten von Streptomyces-Arten isoliert. In dieser peptidischen Leitstruktur kommt Statin, eine nicht natürliche Aminosäure mit einer Hydroxyethylen-Einheit vor. Das Statin ersetzt als Dipep-

tid-Isoster die Leu-Val Einheit, zwischen der die Peptidspaltung erfolgt.

Inhibitoren mit weitgehend peptidischem Grundgerüst besitzen in aller Regel den Nachteil, dass sie bei oraler Gabe im Verdauungstrakt sehr schnell abgebaut werden. Daher hat man in einem umfangreichen Forschungsprogramm versucht, die Reste links und rechts der Spaltstelle zu optimieren. Gleichzeitig fand man noch eine ganze Palette anderer Gruppierungen, die als Strukturanaloga für den Übergangszustand dienen. Die Inhibitoren, die aus diesem Arbeitsprogramm entwickelt werden konnten, stellen die erste Generation Substrat-analoger Protease-Inhibitoren dar.

Inzwischen konnten für die **HIV-Protease** auch Molekülgerüste entdeckt werden, die strukturell kaum noch eine ablesbare Verwandtschaft mit den peptidischen Substraten aufweisen. In der HIV-Protease befindet sich in Komplexen mit den Substrat-analogen Inhibitoren stets ein gebundenes Wassermolekül, das Wechselwirkungen zwischen Protein und Inhibitor vermittelt. Bei Dupont-Merck durchkämmte man mithilfe des Computers Moleküldatenbanken (► Abschnitt 2.1.4), um auf diesem Wege Molekülgerüste zu finden, die einerseits dieses Wassermolekül verdrängen, andererseits aber ebenfalls gut in das aktive Zentrum binden können. Nach einigen Optimierungsschritten aus Computerdesign, chemischer Synthese und Bestimmung der Bindungsaffinität gelang die Entwicklung ganz neuer Inhibitoren. Sie besitzen als zentralen nicht-peptidischen Baustein einen zyklischen Harnstoff (► Abb. 2.2, 5).

Die Forscher bei Parke-Davis hatten auf einem anderen Weg Erfolg. Im experimentellen Hochdurchsatz-Screening (► Abschnitt 2.1.3) entdeckten sie ein Hydroxypyron als neue Leitstruktur (► Abb. 2.2, 6). Dieser Strukturtyp verdrängt, ganz analog zu den zyklischen Harnstoffen, das erwähnte Wassermolekül aus dem aktiven Zentrum und geht Wechselwirkungen zu den katalytischen Aspartaten ein.

Rezeptoragonisten und Antagonisten

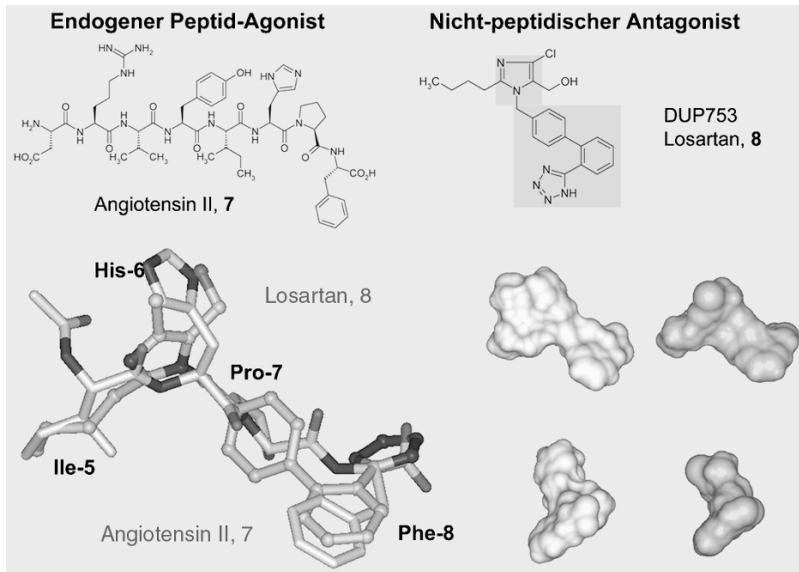
Eine zweite große Gruppe von Zielproteinen, für die ein reicher Schatz an Arzneistoffen entwickelt werden konnte, sind Rezeptoren, die den Informationsaustausch zwischen Zellen vermitteln.

Die größte Gruppe stellen membranständige Rezeptoren dar, die mit sieben Helices die Membran durchspannen. Die Bindung eines extrazellulären Agonisten führt, vermittelt durch eine konformative Änderung des Rezeptors, über die Membran hinweg zur Aktivierung des aus drei Untereinheiten aufgebauten G-Proteinkomplexes. Seine α -Untereinheit trennt sich vom Komplex und aktiviert ein Effektorprotein, das in der Zelle einen zweiten Botenstoff freisetzt. Dieser kann dann Prozesse wie die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Enzymen anstoßen oder Ionenkanäle steuern. Die Auslösung der Rezeptorantwort verläuft somit trotz völlig verschiedener extrazellulärer Bindestellen über identische Drehscheiben in den Zellen. Dies stellt ein äußerst ökonomisches Prinzip der Natur dar.

Therapeutisch sind die **G-Protein-gekoppelten Rezeptoren** (GPCR) von herausragender Bedeutung. Sie greifen in die neuronale Signalübertragung ein, wie die Regelung des Blutdrucks, das Schmerz- und Lustempfinden oder die Geruchs- und Farbwahrnehmung. Ausgelöst wird diese Signalkaskade durch Liganden, die von der extrazellulären Seite an den Rezeptor binden. Diese Liganden können so klein sein wie einfache Kationen, aber über kleine biogene Monoamin-Neurotransmitter und Oligopeptide bis hin zu Proteinen kennt man auch sehr große Liganden, die GPCRs ansteuern können.

Aus der Sicht der Pharmaindustrie stellen die GPCR die größte Gruppe an validierten Arzneimitteltargets dar. Ein 1995 erhobener Überblick zeigte, dass 22 % der hundert am häufigsten verschriebenen Arzneimittel ihre Wirkung an einem dieser Rezeptoren entfaltet. Nimmt man alle zugelassenen Arzneimittel als Basis, so sind es sogar mehr als 50 %. Dies machte im Jahr 1995 immerhin einen Weltumsatz von 84 Mrd. US-Dollar aus.

Als ein Beispiel mag die Entwicklung von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten dienen, die für die Behandlung des Bluthochdrucks eingesetzt werden. Durch Einwirkung der Enzyme Renin und Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) entsteht aus der inaktiven Vorform Angiotensinogen, das gefäßverengend wirkende Oktapeptid Angiotensin II (■ Abb. 2.3; Angiotensin II). Die Blockade dieses Systems führt zur Blutdrucksenkung. Dies



■ **Abb. 2.3** Das gefäßverengend wirkende Oktapeptid Angiotensin II (7) diente als Leitstruktur eines peptidischen Agonisten zur Entwicklung nicht-peptidischer Antagonisten. Zunächst wurden mögliche Antagonisten mit der Referenz überlagert (unten links, Angiotensin hellgrau, Losartan dunkelgrau), wobei das inzwischen auf dem Markt befindliche Losartan (8) entwickelt werden konnte. Auf der rechten Seite sind beide Moleküle mit einer Oberfläche in zwei unterschiedlichen Orientierungen gezeigt, die die strukturelle Ähnlichkeit im Raum demonstrieren. Später stellte sich heraus, dass die rationalen Überlegungen einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen peptidischem Agonisten und nicht-peptidischem Antagonisten von falschen Voraussetzungen ausgingen.

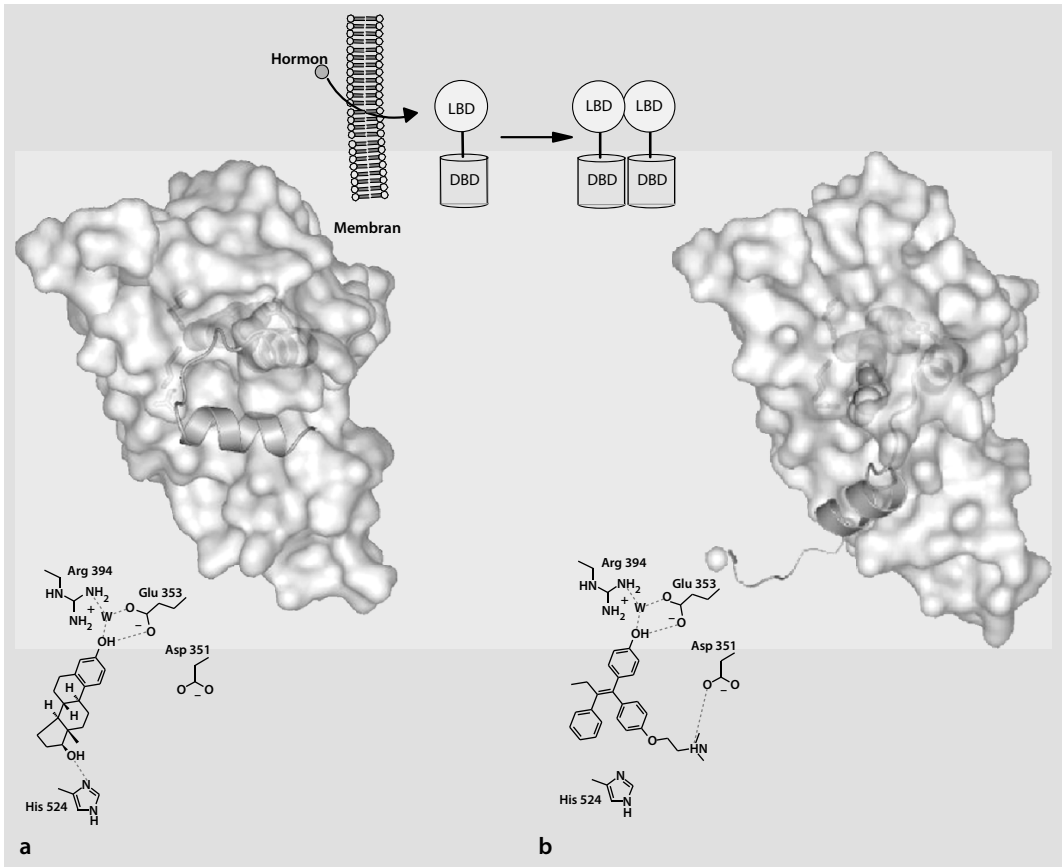
kann entweder durch Hemmen der Enzyme Renin und ACE erreicht werden oder – auf unterster Ebene – durch Antagonisieren des **Angiotensin-II-Rezeptors**. Dieser Rezeptor gehört zu der Klasse der GPCR. Anfang der 1980er Jahre wurden durch die Firma Takeda zwei Patente zu Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten offengelegt. Dankbar griff die Konkurrenz die beschriebenen Verbindungen auf und verglich sie, wie man zunächst glaubte, durch rationale Überlegungen mit der angenommenen rezeptorgebundenen Konformation des Angiotensins. Überlagerungen mit dieser Referenz führten zu weiteren Optimierungen, die in deutlich wirksameren Antagonisten resultierten. Nach Steigerung der Bioverfügbarkeit stand Mitte der 90er Jahre als erste Verbindung Losartan zur Zulassung bereit (■ Abb. 2.3; Losartan).

Spätere Arbeiten zeigten dann, dass die im Prinzip erfolgreich verwendete Hypothese einer strukturellen Verwandtschaft zwischen peptidischem Agonisten und nicht-peptidischem Antagonisten falsch war. Man ging davon aus, dass beide

Moleküle an der gleichen Bindestelle angreifen würden. Durch **Mutationsstudien** konnte aber gezeigt werden, dass peptidischer Agonist und nicht-peptidischer Antagonisten in unterschiedlichen Arealen des Rezeptors angreifen. Zusätzlich gelang es, den Angiotensin-Rezeptor des Frosches, *Xenopus laevis*, der auf das Peptid anspricht, aber von Losartan unbeeinflusst bleibt, so zu mutieren, dass nunmehr ein Antagonisieren mit Losartan gelingt. Dazu wurden 13 Reste, die sich im humanen Rezeptor als wichtig für die Bindung erwiesen hatten, auf den Rezeptor des Frosches übertragen. Die Bindung des peptidischen Agonisten bleibt von diesen Mutationen unbeeinflusst. Das Beispiel zeigt, dass in der Pharmaforschung durchaus falsche Konzepte und falsche Schlüsse zu erfolgreichen Wirkstoffentwicklungen führen können.

Lösliche Rezeptoren

Neben den membranständigen Rezeptoren kennt man viele Hormonrezeptoren, die sich in gelöster Form im Inneren einer Zelle befinden. Nach Bin-



■ **Abb. 2.4** Ein Hormonmolekül diffundiert durch die Membran in die Zelle und bindet an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Steroid-Rezeptors (oben). Der Rezeptor dimerisiert und wandert anschließend in den Zellkern, um dort mit seinen DNA-bindenden Domänen (DBD) an die DNA zu binden und die Proteinbiosynthese anzustoßen. Ein Agonist wie das Estrogen (a, links) bindet in eine tief vergrabene Bindetasche der Ligandenbindungsdomäne. Nach der Bindung legt sich die sog. Erkennungshelix (dunkelgrau) auf die Rezeptoroberfläche und schließt die Bindetasche ab. Diese Platzierung der Helix führt zu einer Dimerisierung der DNA-bindenden Domänen, dadurch kann die Bindung an einen Koaktivator eingeleitet werden. Antagonisiert man diesen Prozess durch Bindung eines Antihormons, z. B. 4-Hydroxy-Tamoxifen (b, rechts), so muss die Helix einen anderen Platz einnehmen. Dies gelingt den Antagonisten mithilfe einer nur bei ihnen vorkommenden Seitenkette, die in den Eintrittskanal zur Bindetasche orientiert wird. Bei den Agonisten bleibt dieser Kanal aber unbesetzt. Somit kann bei den Antagonisten die Helix nicht mehr korrekt platziert werden. Damit unterbleibt die Dimerisierung der DBD, die molekulare Erkennung mit dem Koaktivator findet nicht statt und die gesamte Kaskade ist blockiert.

dung eines in die Zelle eingedrungenen Agonisten dimerisiert der Rezeptor unterstützt durch Koaktivatoren und wandert in den Zellkern ein. Dort bindet er an Signalsequenzen der DNA, die sog. Operator- und Repressorgene, und induziert entweder die Neusynthese von Proteinen oder unterdrückt deren Darstellung. Die **cytosolischen Hormonrezeptoren** bestehen aus einer Ligandenbindungsdomäne und einer DNA-Bindestelle. Die Strukturen

einiger Ligandenbindungsdomänen sind inzwischen aufgeklärt worden, darunter die Steroidrezeptoren des Estrogens und Progesterons. An diesem Beispiel konnte erstmals auf der molekularen Ebene gezeigt werden, was einen Agonisten von einem Antagonisten unterscheidet (■ Abb. 2.4).

Neben den cytosolischen Hormonrezeptoren kennt man noch membranständige Rezeptoren, die durch Dimerisierung aktiviert werden. Die Dime-

risierung wird infolge der Bindung eines Liganden an die extrazellulären Domänen ausgelöst. Dadurch werden intrazellulär Kinasen aktiviert, die Teil des Rezeptorproteins sind. Zu dieser Gruppe gehören der Rezeptor des menschlichen Wachstumshormons oder der Insulinrezeptor. Weiterhin kennt man Rezeptoren, bei denen mehr als zwei Komponenten zu einem Komplex vereint werden müssen, damit eine **Rezeptorantwort** ausgelöst wird. Hierzu gehören eine Reihe immunologisch bedeutsame Rezeptoren wie der des Tumornekrosefaktors. Der Faktor selbst ist ein Homotrimer und bildet mit drei Bindungsdomänen des Rezeptors einen Komplex aus. Gerade diese Rezeptoren werden in jüngster Zeit intensiv beforscht und man versucht ihre Funktion durch Liganden, die einmal zu neuen Arzneistoffen entwickelt werden könnten, zu verändern.

Ionenkanäle und Transporter

Ionenkanäle sind in die Zellmembran eingebettet und lassen im geöffneten Zustand Ionen entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle ein- oder ausströmen. Das Öffnen bzw. Schließen des Kanals kann spannungs- oder ligand- bzw. rezeptorgesteuert erfolgen. Im Ruhezustand liegt die intrazelluläre Konzentration an Calciumionen deutlich niedriger als in dem umgebenden Medium. Im Moment der Erregung einer Zelle werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle durch ein elektrisches Signal kurz geöffnet. Dies führt zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle und beispielsweise bei Herz- und Muskelzellen werden Kontraktionen ausgelöst. Anschließend werden die Ionen gegen einen **Konzentrationsgradienten** aus der Zelle gepumpt, die Zelle geht wieder in den Ruhezustand über. Calciumkanalblocker wie Nifedipin oder Verapamil greifen an solchen spannungsabhängigen Calciumkanälen an. Sie hemmen den Ca^{2+} -Einstrom, wodurch die Erregbarkeit, z. B. der Herzzellen reduziert wird. Insgesamt wird weniger Energie verbraucht, sodass die Herzzellen ökonomischer arbeiten.

Neben den Calciumkanälen kennt man noch spezifische Kanäle für Natrium- und Kaliumionen. An den Natriumkanälen greifen beispielsweise die Lokalanästhetika und davon abgeleitete Antiarrhythmika an. Sie setzen die Erregbarkeit von Nerven herab. Ähnliche Funktion können Blocker des

Kaliumkanals erreichen. Stabilisieren sie die offene Form des Kanals, wirken sie gefäßerweiternd und blutdrucksenkend. Verbindungen, die blockierend auf die Kaliumkanäle der insulinproduzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse wirken, besitzen antidiabetische Wirkung.

Auch Kanäle für Anionen, wie beispielsweise der Chloridkanal, sind Angriffspunkt vieler Arzneistoffe. Tranquilizer vom Benzodiazepintyp verstärken die Bindung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). Sie bewirken damit eine längere Öffnung des Kanals. Der erhöhte Einstrom von Chloridionen in die Zellen bedingt ein verlagertes Reaktionsverhalten der Nervenzellen. Auch die Barbiturate und einige Inhalationsnarkotika greifen an den Rezeptoren an, allerdings an einer anderen Untereinheit als die Benzodiazepine.

Gegen einen Konzentrationsgradienten können Moleküle und Ionen nur durch Transporter in Zellen hinein- oder heraus geschleust werden. Dazu muss der Vorgang an einen energieliefernden Prozess gekoppelt werden. Für viele Neurotransmitter, Aminosäuren, Zucker und Nucleoside, d. h. polare Moleküle, die die Zelle braucht und die selbst nicht membrangängig sind, konnten inzwischen Aminosäuresequenzen spezifischer Transporter entdeckt werden.

Schon heute kennt man viele Wirkstoffe, die an **Transportern** angreifen und den natürlichen Liganden verdrängen. So geht die euphorisierende Wirkung von Kokain auf die Bindung an den Dopamin-Transporter zurück, der für den aktiven Transport und somit die Wiederaufnahme von Dopamin in die Nervenzelle verantwortlich ist. Einige Antidepressiva sind Liganden der Transporter für Noradrenalin und Serotonin. Bestimmte Gichtmittel binden an den Harnsäuretransporter und verdrängen die Harnsäure. Dadurch wird dessen Resorption aus dem Primärharn gehemmt und es erfolgt eine beschleunigte Ausscheidung über den Urin.

Auch für Ionen gibt es spezifische Transporter, die Ionen unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten pumpen. Herzwirksame Glykoside können die Na^+/K^+ -ATPase hemmen, eine Pumpe, die den Austausch von Natrium gegen Kaliumionen bewirkt. Im Magen ist für die Einstellung des sauren Milieus eine H^+/K^+ -ATPase

verantwortlich. An dieser Protonenpumpe greifen bekannte Säurehemmer wie Omeprazol an und blockieren die Pumpe durch irreversible Bindung.

Trojanische Pferde, Antimetabolite und falsche Substrate

Die Liste an denkbaren Wirkprinzipien und relevanten Arzneistofftargets ist lang und vielfältig. Bedingt durch die Aufklärung des humanen Genoms, aber auch der Genome von Bakterien und Parasiten wächst diese Liste zurzeit stetig weiter. Bei der Therapie viraler, parasitärer und bakterieller Erkrankungen versucht man ganz spezifisch den Erreger auszuschalten. Dazu nutzt man Mechanismen, v. a. Biosynthesewege, die beim Menschen in identischer Form nicht vorkommen oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Ein solcher Weg führt über Antimetabolite. Sulfanilamid, ein Spaltprodukt des Sulfonamids Sulfachrysoidin, ähnelt stark der p-Aminobenzoesäure, die ein Ausgangsstoff für die Biosynthese von Folsäure darstellt. Nur Bakterien nehmen davon Schaden, da Sulfanilamid statt p-Aminobenzoesäure erkannt wird. Die höheren Lebewesen sind nicht auf die Folsäure-Biosynthese angewiesen, sie nehmen dieses Vitamin mit der Nahrung auf.

Einige Virustatika und tumorhemmende Wirkstoffe sind Nucleosid-Antimetabolite. Sie beeinflussen die DNA und RNA-Synthese. Wie **trojanische Pferde** werden sie als inaktive Formen in die Zellen eingeschleust und entfalten ihr Wirkpotenzial erst dort. Das Anti-Herpesmittel Aciclovir wird nur in den virusinfizierten Zellen durch eine virusspezifische Thymidinkinase zur Wirkform phosphoryliert. Als sog. »falsches Substrat« blockiert es auf späterer Stufe die Funktion der DNA-Polymerase und bedingt einen Abbruch der DNA-Polymerisation. Die Ausbreitung des Influenzavirus lässt sich stören, wenn das Oberflächenenzym Neuraminidase gehemmt wird, das einen Sialinsäurerest von Glykolipiden und Glykoproteinen abspaltet. Dieses Hüllprotein ist an der Freisetzung aus infizierten Zellen und, zusammen mit Hämagglutinin, der zellulären Adsorption der Viren beteiligt.

Die bereits oben beschriebenen Penicilline und Cephalosporine hemmen die Zellwandbiosynthese in Bakterien. Nur sie verfügen über eine solche Zellwand. Vor einiger Zeit konnte ein Biosynthe-

sepfad, der nicht über Mevalonat verläuft, zur Bereitstellung von Isoprenoid-Einheiten als essenziell in zahlreichen Bakterien und Parasiten entdeckt werden. Da dieser Pfad im Menschen nicht vorkommt, stellen die Enzyme entlang seiner Abfolge ideale Arzneistofftargets dar. Tetracycline, Streptomycine und Chloramphenicol greifen in die ribosomale Proteinbiosynthese ein. Einen weiteren Weg zur Unterdrückung der Proteinbiosynthese eröffnen Antisense-Oligonucleotide, die das Ablesen der richtigen Information bei der Transkription stören. Das richtige Verpacken der DNA in der Bakterienzelle lässt sich durch Gyrasehemmer z. B. vom Chinolontyp blockieren. Das Verhindern des richtigen Verdrillens der DNA führt dazu, dass das Erbmaterial keinen Platz mehr in der Zelle findet. Die DNA ist ein häufiger Angriffspunkt für Antitumortheraeutika. Durch Alkylierung der DNA-Basen werden Lese- und Schreibfehler induziert. Interkalierende oder in die Furchen bindende Agenzien stören die intakte DNA-Struktur und führen zu Fehlern bei der Zellteilung. Verbindungen wie Taxol greifen in die Synthese der röhrenförmigen Mikrotubuli ein, ihre intakte Funktion ist Voraussetzung für die Zellteilung.

Sicher lassen sich noch viele weitere Wirkmechanismen für eine erfolgreiche **Arzneistofftherapie** aufzählen. Durch das aufgeklärte Genom werden wir auf immer neue Zielstrukturen aufmerksam gemacht. Bei der Suche nach potenten Wirkstoffen, die in die Funktion dieser Systeme eingreifen, wird man zunehmend auf Prinzipien bauen, die die strukturellen Verwandtschaften zwischen den Proteinen ausnutzen. So entdeckt man zunehmend, dass bestimmte Strukturtypen, beispielsweise Proteasen, immer wieder mit dem gleichen Baumuster an ganz unterschiedlichen Funktionen des Organismus beteiligt werden. Ihre Hemmung bedeutet biochemisch immer das gleiche Ergebnis, für das Krankheitsgeschehen ergeben sich aber Wirkstoffe mit völlig anderem Wirkprofil. Durch Übertragung des Familiengedankens von Proteinklassen auf die Wirkstoffgruppen wird in Zukunft viel schneller eine Optimierung zu potenten und spezifischen Wirkstoffen privilegierter Leitstrukturen für bestimmte Proteinfamilien gelingen.

2.1.3 Von der Biochemie geprägt: hin zu einer Target-orientierten Arzneistofftherapie

Von ‚Hits‘, ‚Leads‘ und ‚Drugs‘

Letztendliches Ziel der Pharmaforschung ist es, einen neuen Wirkstoff auf den Markt zu bringen. Der Weg dahin ist zäh und beschwerlich, es kann bis zu zwei Jahrzehnten dauern, dieses Ziel zu erreichen. Selbst wenn eine riesige Zahl von Testsubstanzen aus Naturstoffen oder Synthetika zur Verfügung steht, ist es nicht einfach, aus dieser Menge die aktiven Moleküle herauszufiltern und ihren Wert für eine bestimmte Indikation zu entdecken. Es erfordert ein zeitaufwändiges und kostenintensives Durchmustern riesiger Substanzbestände (sog. **Screening**). Dieser Suchprozess kann in drei Phasen aufgeteilt werden. Zunächst erfolgt das Eingangsscreening der gesamten Substanzbank. Dabei werden erste »Hits« als wechselwirkende Substanzen ermittelt. Danach erfolgt ein vertieftes Screening, bei dem bereits um die aufgefundenen Treffer herum der chemische Strukturraum abgesucht wird. Ziel ist es dabei, einfache Struktur/Wirkungsbeziehungen aufzustellen und somit die pharmakologischen und physikochemischen Eigenschaften zu verbessern. Auf diesem Weg werden Leitstrukturen (»Leads«) entdeckt. Danach erfolgt in der letzten Phase die Optimierung einer Leitstruktur durch vertiefte biologische Testung hin zu einem Arzneistoffkandidaten (»Drug«), der in eine klinische Prüfung überführt werden kann. Wie entdeckt man nun aus so genannten Testkandidaten Treffer, die das Potenzial zur Entwicklung zu Wirkstoffkandidaten besitzen? Diese Frage wird durch das Screening auf biologische Wirkung beantwortet.

Die biologische Wirkung eines Arzneistoffs sichtbar gemacht

Wir können uns heute nur schwer vorstellen, wie unsere Vorfahren die Wirkung einer Substanz auf den Organismus beobachtet haben. Vermutlich haben der Zufall und das wachsame Auge erkannt, ob bestimmte Pflanzen- oder Tierextrakte eine biologische Wirkung erzielen. Durch Mundpropaganda wurden dann solche Erfahrungen weitergereicht, oft im Erfahrungsschatz so genannter Mediziner oder Quacksalber. Ein überliefertes Bei-

spiel ist die Entdeckung der Wirkung von *Digitalis* im 18. Jahrhundert. Der in England arbeitende schottische Arzt William Withering wurde 1773 von einem Patienten aufgesucht, der an massiver Herzschwäche litt. Nachdem der Arzt ihm keine Hilfe anbieten konnte, besuchte der kranke Mann eine Zigeunerin, die ihm eine Kräutertherapie verschrieb. In kurzer Zeit erholte sich der Patient von seinen Herzbeschwerden. Beeindruckt von diesem Erfolg suchte Dr. Withering die Zigeunerin auf und bat sie um die Rezeptur. Nach Zahlung eines netten Sömmchens gab sie ihr Geheimnis preis: Einer der Inhaltsstoffe stammte aus dem (giftigen) roten **Fingerhut *Digitalis purpurea***. Der Arzt untersuchte die Wirksamkeit unterschiedlicher Aufbereitungen der Pflanze, indem er sie an 163 Patienten verabreichte. Auf diesem Wege fand er heraus, dass die beste Formulierung in den getrockneten, pulverisierten Blättern bestand. Nach der Beobachtung, dass eine toxische Dosis schnell erreicht wird, empfahl er die Einnahme einer verdünnten Präparation in wiederholten Dosen, bis der gewünschte therapeutische Effekt eintrat.

Obwohl auch heute noch die Inhaltsstoffe aus *Digitalis* zu den besten Wirkstoffen gegen Herzinsuffizienz zählen, würde wohl niemand den von Dr. Withering eingeschlagenen Weg für die Bestimmung des therapeutischen Potenzials eines Wirkstoffs empfehlen. Dieses Vorgehen ist weder ethisch zu vertreten noch sehr praktikabel. Heute machen wir uns das Verständnis physiologischer Prozesse auf der molekularen Ebene zunutze. Zusammen mit dem ganzen Methodenarsenal der modernen Biochemie wird versucht, Kandidaten für eine Wirkstoffentwicklung durch Testung im Reagenzglas (sog. *in vitro*-Testung) zu entdecken. V. a. hat die Molekularbiologie, mit der reine Proteine auf rekombinantem Wege in großen Mengen für die direkte Testung produziert werden können, die Vorgehensweise revolutioniert. Man versteht heute Zellen und Organismen umzuprogrammieren, um so die Funktion von einzelnen Genen zu studieren. Der besondere Trick bei diesen Testverfahren ist es nun, einen bestimmten Effekt auf molekularer Ebene in ein makroskopisch beobachtbares Signal umzumünzen. Beispielsweise bestimmt man das Potenzial einer neuen Verbindung als Antithrombotikum in einem Gerinnungstest. Dabei wird die

Koagulationsgeschwindigkeit des Blutes in Abhängigkeit von der zugegebenen Verbindung untersucht.

Doch heute gelingt es, mit unserem Wissen um biochemische Netzwerke, noch einen Schritt weiter zu physiologisch relevanteren Tests zu gehen. Um bei dem Beispiel der Blutgerinnung zu bleiben: Die jahrzehntelange Forschung auf diesem Gebiet hat ergeben, dass die Bildung eines Blutpfropfs durch eine enzymatische Kaskade ausgelöst und gesteuert wird. Daher können die einzelnen Enzyme entlang dieser Kaskade sukzessive untersucht werden. Es hat sich herausgestellt, dass einige der Enzyme **Proteasen** sind, d. h. sie spalten Proteine und Peptide. Wie kann deren enzymatische Aktivität sichtbar gemacht werden? Man stellt sich synthetische Substrate her, die den natürlichen Substraten sehr ähnlich sehen, allerdings über eine Peptidbindung verknüpft einen para-Nitroanilinrest tragen. Wenn das Enzym nun dieses Substrat spaltet, wird para-Nitrophenolat freigesetzt, das sich durch veränderte Absorptionseigenschaften als gelber Farbstoff bemerkbar macht. Dies lässt sich einfach spektroskopisch beobachten. Wenn nun beim Screening eine Verbindung als Inhibitor des Enzyms auffällt, so wird sie die Spaltung des synthetischen Substrats mehr oder weniger stark unterdrücken und so die Gelbfärbung der Lösung vermindern. Auf diesem Wege lässt sich quantitativ die Hemmstärke einer Testsubstanz bestimmen.

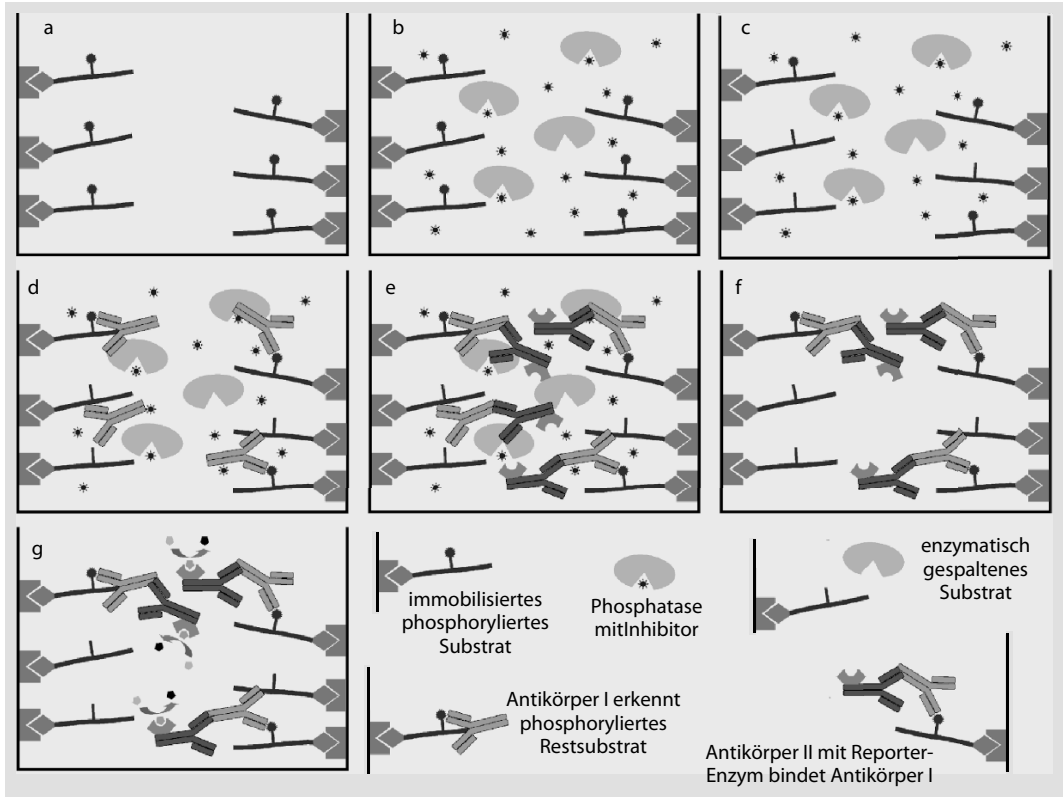
Es konnte eine breite Palette von farbgebenden Reaktionen entwickelt werden, die zur Charakterisierung enzymatischer Aktivität geeignet sind. Viele Enzyme, z. B. Glutamat-Dehydrogenasen benötigen als natürlichen Cofaktor NAD(P)H, das zu NAD(P)⁺ oxidiert wird. Da das Edukt NAD(P)H im Gegensatz zum Produkt bei 340 nm absorbiert, kann das Fortschreiten der Enzymreaktion über Beobachtung der Absorption bei dieser Wellenlänge verfolgt werden. Als eine Variante kann man auch, wenn das Substrat, das für eine spektroskopische Verfolgung der Enzymreaktion geeignet ist, erst durch die vorgelagerte Enzymreaktion gebildet wird, zwei Enzymreaktionen miteinander koppeln. Dann wird beispielsweise nicht die Reaktion im eigentlich interessierenden Enzym beobachtet, sondern dessen Aktivität wird durch die Umsetzung des aus dieser vorgelagerten Reaktion

hervorgehenden Produkts in einer nachfolgenden Enzymreaktion registriert.

Obwohl spektroskopische Assays aus technischen Gründen vorzuziehen sind, spielen Tests, die auf der Umsetzung radioaktiv markierter Verbindungen beruhen, noch immer eine wichtige Rolle. Die Aktivität von Kinasen wird z. B. über Phosphor-32-markiertes Adenosin-Triphosphat verfolgt. Das an der endständigen Phosphatgruppe markierte Substrat wird auf das durch die Kinase zu phosphorylierende Protein übertragen. Die Einbaurate dient als Maß für die Aktivität der Kinase. Für Rezeptorbindungsstudien wird ein bekannter Ligand radioaktiv markiert. Im Assay wird nun untersucht, inwieweit Testverbindungen den radioaktiv markierten Liganden von der Rezeptorbindestelle verdrängen können. Ein solcher Test stellt noch nicht zwingend einen Funktions-Assay dar. Agonistische und antagonistische Bindung müssen noch unterschieden werden.

Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der Assay-Entwicklung. Die hohe Spezifität einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung lässt sich als hoch sensitives System ausnutzen. Als Beobachtungsgröße verwendet man in den klassischen Immun-Assays entweder die Freisetzung von radioaktiv markierten Verbindung (Radioimmuno-Assay, RIA) oder das Auslösen einer enzymatischen Umsetzung (ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ■ Abb. 2.5). Das letztere Verfahren erfreut sich eines deutlich größeren Einsatzbereichs, v. a. weil versucht wird, die Radioaktivität als Beobachtungsgröße zu vermeiden. Die Immun-Assays sind nicht nur hoch spezifisch, weil sie nur eine molekulare Spezies erkennen, sie sind auch extrem vielseitig einsetzbar.

In der jüngsten Zeit wurden die Screeningverfahren im Hinblick auf Automatisierung und Miniaturisierung optimiert. Ziel hinter diesen Bestrebungen war die dramatische Steigerung des Durchsatzes hin zum **Hochdurchsatz-Screening** (englisch: *high throughput screening* oder HTS). Heute werden die meisten Hochdurchsatz-Verfahren in 96er (8×12) oder 384er (16×24) Mikrotiterplatten durchgeführt. In den Vertiefungen dieser Platten umfassen die Reaktionsvolumina ca. 100 µl. Aber die Miniaturisierung schreitet fort, inzwischen versucht man mit 1 µl in 1536er (32×48) Platten aus-

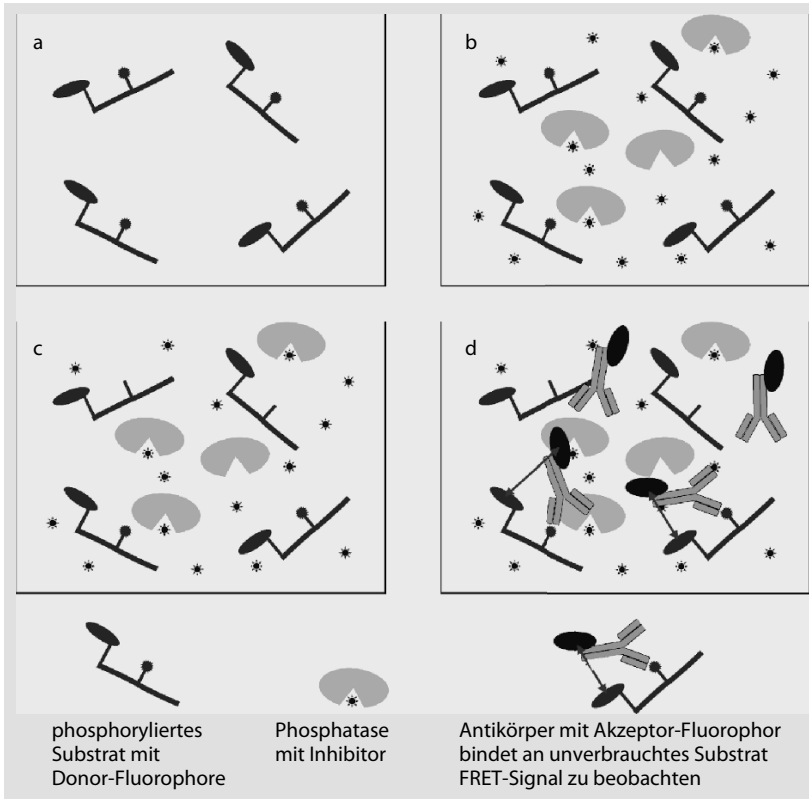


■ **Abb. 2.5** Beispiel für einen ELISA-Assay zur Bestimmung der Beeinflussung der Aktivität einer Phosphatase durch einen möglichen Treffer (*). a) Das Substrat, ein phosphoryliertes Peptid (mittelgrau), wird auf die Wand des Reaktionsgefäßes aufgezogen (meist unter Verwendung des Biotin/Streptavidin-Systems). b) Die Phosphatase (grau) und ein möglicher Inhibitor (*) werden in das Reaktionsgefäß gegeben. c) Abhängig von der Bindungsaffinität des getesteten Inhibitors für die Phosphatase können die verbliebenen nichtgehemmten Enzymmoleküle Phosphatgruppen vom Substrat abspalten. d) Ein Antikörper (grau), der das phosphorylierte Substrat erkennt, wird zugegeben, gefolgt (e) von einem zweiten Antikörper, der an die konstante Domäne (Fc) des ersten Antikörpers bindet. Dieser zweite Antikörper ist kovalent mit einem Reporterenzym verknüpft (z. B. eine Meerrettichperoxidase). f) Überschüssige Antikörperkomplexe werden durch Waschen entfernt. (g) Das Substrat des Reporterenzym wird zugegeben und das erzeugte Signal (üblicherweise eine Farbreaktion) ist proportional zu der Menge an verbliebenem, phosphoryliertem Substrat an der Gefäßwand. Es ist somit umgekehrt proportional zu der Aktivität der getesteten Verbindung. Alleine durch Auswechseln des immobilisierten Substrats und des ersten substraterkennenden Antikörpers kann der verbleibende Teil des Testsystems unverändert auf andere Testsysteme übertragen werden. Dies stellt natürlich eine sehr kostengünstige Variante dar.

zukommen. Mit ausgeklügelten Robotersystemen werden bis zu 100.000 Assays pro Tag ausgeführt. Dies führt natürlich zu einer enormen Datenflut, die weiter verarbeitet werden muss. Die reduzierten Testvolumina haben den Vorteil einer deutlichen Einschränkung der benötigten Probenvolumina und Reagenzien. Außerdem lassen sich die Messungen in kürzerer Zeit durchführen. Gleichzeitig wird aber die Handhabung der Proben immer schwieriger. Man denke nur an die Verdunstung

aus so kleinen Probenmengen, die enorm ansteigende Logistik, so viele Daten parallel zu erfassen, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die notwendige Empfindlichkeit, das schwache Messsignal gesichert zu bestimmen.

Um gerade diesen letzten Aspekt zu verbessern, ist man auf immer empfindlichere Nachweisverfahren übergegangen. Besonders empfindlich sind **Fluoreszenzmessverfahren**. Im einfachsten Fall verwendet man ein fluoreszierendes Substrat



■ **Abb. 2.6** Die Verwendung der FRET-Technik wird für die in Abb. 2.5 gezeigte Reaktion erläutert. (a) Das phosphorylierte Peptidsubstrat trägt einen kovalent verknüpften Donorfluorophor (graue Ellipse). (b) Analog wie in Abb. 2.5 werden die Phosphatase (hellgrau) und die Testverbindung (I) zugegeben, (c) die Phosphatase spaltet nach verbliebener Restaktivität Substrat. (d) Der Antikörper, der das phosphorylierte Substrat erkennt, ist mit einem Akzeptorfluorophor (dunkelgrau) verknüpft, dessen Absorptionsmaximum mit dem im Emissionsspektrum des Donorfluorophors überlappt. Wenn viel des phosphorylierten Substrats verblieben ist (was für einen potenten Testinhibitor spricht), wird die räumliche Nähe zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor zu einem starken Resonanzenergie-Transfer führen

wie Cumarin, das beispielsweise in einem Protease-Assay anstelle des para-Nitroanilins eingebaut wird. Die Protein-Ligand-Bindung kann auch über Fluoreszenzanisotropie (oder Polarisation) beobachtet werden. Ein bekannter Ligand wird mit einem Fluorophor verknüpft und mit polarisiertem Licht angeregt. Die abgestrahlte Fluoreszenz ist in diesem Fall ebenfalls polarisiert. Mit der Zeit, in der das angeregte Molekül in Lösung frei diffundieren kann, wird die vorgegebene Polarisation abnehmen. Da ein kleines Molekül viel schneller diffundiert als ein großes, wird die Fluoreszenz des ungebundenen Liganden viel schneller abfallen als wenn er an ein Protein gebunden ist. Dort werden

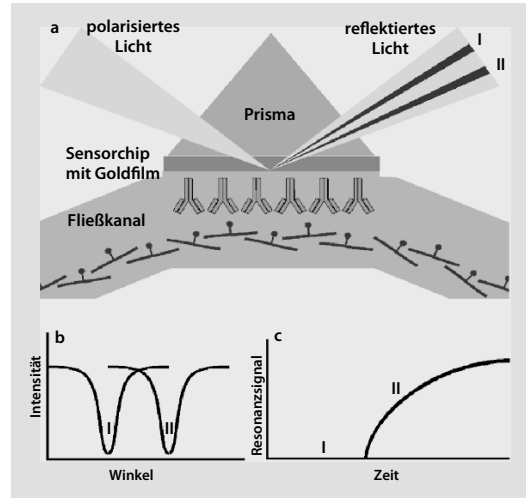
dann die Diffusionseigenschaften durch das große Protein bestimmt.

Noch größere Empfindlichkeit erreichen sog. **FRET-Messverfahren** (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer). Ein Resonanzenergie transfer erfolgt zwischen einem Donor- und Akzeptorfluorophor ähnlicher Absorption, wenn beide nicht mehr als ca. 50 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$) voneinander entfernt sind. Um nochmals den Phosphatase-Assay als Beispiel zu verwenden, hieße dies, das phosphorylierte Peptid mit einem Donorfluorophor zu versehen (■ Abb. 2.6). An den Antikörper müsste dann der Akzeptor angefügt werden. Wenn viel unverbrauchtes phosphoryliertes Substrat vorhanden ist, kann viel Antikörper bin-

den und es resultiert ein starkes FRET-Signal. Hat die Phosphatase dagegen viel Substrat umgesetzt, so ist kaum ein FRET-Signal zu registrieren. Im Gegensatz zum ELISA-Test (■ Abb. 2.5) ist kein Waschen der Probe mehr notwendig (d. h. wir haben es jetzt mit einem sog. homogenen Assay zu tun). Der Test ist damit deutlich vereinfacht, eine wichtige Voraussetzung für seine Automatisierbarkeit. Daher sind die Bestrebungen zu verstehen, ELISA-Tests auf die neue FRET-Technik umzustellen.

Erschwerend macht sich bei den **Fluoreszenzuntersuchungen** das Hintergrundrauschen bemerkbar. Eine Möglichkeit, dies zu unterdrücken liegt in der Anwendung von zeitaufgelösten FRET-Techniken. Dazu verwendet man einen Chelatkomplex mit einem Seltene-Erde-Metallion als Donor, weil diese Fluoreszenzsonden sehr lange Halbwertszeiten besitzen. Als Akzeptor wird eine typische Sonde wie Fluorescein eingesetzt. Die Hintergrundfluoreszenz wird nun deutlich reduziert, wenn man zwischen Anregung und Detektion eine Zeit von mehr als 50 μ sec verstreichen lässt. Zusätzlich ergibt sich dann noch der Vorteil gegenüber den üblichen FRET-Techniken, dass Fluoreszenz-Transfer über größere Distanzen (ca. 90 Å), wie sie typischerweise bei Protein-Protein-Wechselwirkungen auftreten, beobachtbar werden. Eine andere Alternative sind die radiometrischen Techniken der *scintillation proximity assays*. Dazu wird das interessierende Zielprotein auf einem Träger immobilisiert, der einen Farbstoff enthält, der zur Szintillation angeregt werden kann. Bindet ein radioaktiv-markiertes Molekül, so regt dies den Szintillationsfarbstoff zum Leuchten an. Ungebundene Moleküle verbleiben in einer Distanz zu dem Farbstoff, der keine Anregung erlaubt. Ein Problem dieser Methode sind derzeit noch die zu langen Messzeiten.

Fortschritte bei der Miniaturisierung der Assays erlauben inzwischen die Beobachtung einzelner Moleküle. Dies gelingt mit der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS). Ein konfokales Lasermikroskop durchstrahlt etwa einen Femtoliter Messlösung. Wenn ein einzelner Fluorophor durch das Beobachtungsvolumen diffundiert, erzeugt er eine zeitliche Fluktuation des Fluoreszenzsignals. Analysiert man die Autokorrelation dieser Fluktua-



■ **Abb. 2.7** Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR). Die Methode registriert Änderungen im Brechungsindex an der Oberfläche eines Sensorchips. Das Ausmaß der Massenänderung auf der Oberfläche, die durch Rezeptorbindung eines Substratmoleküls bedingt wird, führt zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels des reflektierten Lichts (I und II). Dadurch wird nicht nur die Bindungsaffinität vermessen, es gelingt auch, kinetische Parameter der Assoziation und Dissoziation zu ermitteln.

tionen, so erhält man wichtige Informationen über Konzentration und Diffusionskonstante. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird wiederum davon abhängen, ob die mit einem Fluoreszenzmarker versehene Substanz an ein Protein gebunden ist oder nicht. Verwendet man zwei verschiedene Marker, sowohl an dem Protein wie an einem Liganden, so kann deren Assoziation und Dissoziation sehr genau verfolgt werden.

Das **Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Verfahren** wird in der Pharmaforschung zunehmend zur Validierung von Treffern und zur Optimierung der Messbedingungen im Fluoreszenz-Assay eingesetzt. Dazu wird das Zielmolekül auf der goldbeschichteten Oberfläche eines Sensorchips verankert. Anschließend strahlt man von der Unterseite eines Glasträgers Licht ein (■ Abb. 2.7). Änderungen im Brechungsindex, die sich über eine Verschiebung des Winkels der internen Totalreflexion verfolgen lassen, sind ein Maß für Massenänderungen auf der Sensoroberfläche. Wenn nun eine Verbindung mit einer Masse von mehr als 100 D bindet, kann die verursachte Massenänderung auf

der Goldoberfläche registriert werden. Da das Verfahren schnell arbeitet und einen zeitlichen Verlauf beobachten kann, werden neben der Stöchiometrie kinetische Parameter der Assoziation bzw. Dissoziation verfügbar. Ein Problem, das ein Screening in Mikrotiterplatten mit sich bringt, besteht in der enormen Zeit, die benötigt wird, die Verbindungen auf der Platte abzulegen. Ein Weg, dieses Problem zu umgehen besteht darin, ganze Verbindungsbibliotheken auf dem Sensorchip mit Sprayverfahren in Mikroarray-Format aufzubringen. Gibt man nun das zu testende Rezeptorprotein zu einem solchen Chip, so tritt dort, wo der Rezeptor bindet, eine große Massendifferenz auf. Aufgrund der orts aufgelösten Belegung des Chips mit Testverbindungen lässt sich einfach feststellen, welche Bibliotheksmoleküle mit dem Testrezeptor in Wechselwirkung getreten sind.

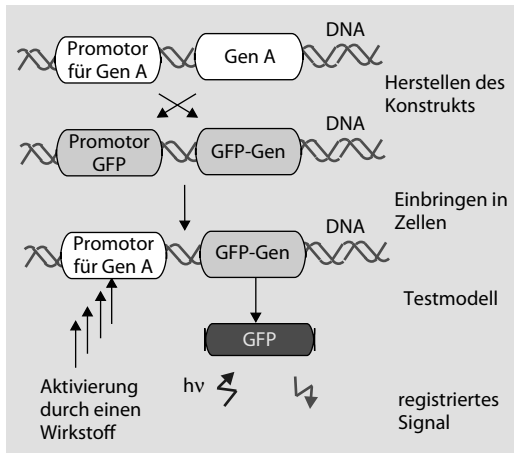
Von der Bindung zur Funktion: Tests an ganzen Zellen

Wie bereits erwähnt, sagt die Bindung eines Liganden an ein Protein noch nichts über die damit einhergehende Funktion bzw. ausgelöste Funktionsänderung. Bei einem Enzym-Assay ist es oft einfach, die beobachtete Hemmung mit einer Funktion in Beziehung zu setzen. Bei Rezeptoren und Ionenkanälen liegt diese Korrelation weniger offensichtlich auf der Hand. Betrachtet man die biochemischen Pfade und Regelkreise in einer Zelle, so werden auch die Überlegungen zur Funktionszuordnung für Enzyme komplizierter. Diese Zusammenhänge lassen sich nicht einfach im Reagenzglas nachstellen. Daher müssen zum Studium der Funktion ebenfalls Assays entwickelt werden, die das Verhalten ganzer Zellen bei der Bindung eines Liganden beobachten. Für viele Gewebe lassen sich Zellkulturen züchten, die dann das Studium gewebsspezifischer Rezeptoren ermöglichen.

Üblicherweise wurde das Verhalten von Ionenkanälen über Bindungstests oder radioaktive Durchfluss-Assays untersucht. Um den Einfluss eines Entwicklungskandidaten für einen Arzneistoff besser zu charakterisieren, sind die sog. **patch-clamp-Techniken** entwickelt worden. Eine Elektrode wird an die Oberfläche einer Zelle geführt und eine Spannung bzw. ein Strom angelegt. Auf diesem Weg kann das Öffnen bzw. Schließen

einzelner Kanäle registriert werden, v. a. wenn bei diesen Messungen Testmoleküle zugegeben werden. Dieses Verfahren dringt sicher nicht in die Dimensionen der Hochdurchsatztechniken vor. Es dient eher dazu, die Treffer aus einem ersten Vor-screening genauer auf ihre Funktion zu beleuchten. Für diesen ersten Schritt werden wiederum gerne Fluoreszenzmethoden eingesetzt. Beispielsweise kann man bei Ca^{2+} -Kanälen den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration über einen Farbstoff beobachten, der sensitiv bei dem Auftreten von Calciumionen fluoresziert. Da dieser Test sehr empfindlich ist, wurde er auch auf Natriumkanäle ausgedehnt. Dies gelingt durch Koppeln an die Depolarisation des Calciumsignals. Man kann auch den negativ geladenen Fluorophor Oxonol verwenden, der sich mit der äußeren Lamelle der Plasmamembran von Zellen assoziiert, die negatives cytosolisches Potenzial aufweisen. Erfolgt eine Depolarisation über die Membran, so wandert das Oxonol ins Innere der Doppelmembran, wodurch eine Fluoreszenz der Zelle ausgelöst wird. Dieses Verfahren wurde auch auf einen in seiner Empfindlichkeit gesteigerten FRET-Assay übertragen. Dabei dient Oxonol als Akzeptor und ein Donormolekül wird an die Phospholipid-Kopfgruppen der Außenseite der Plasmamembran geheftet. Damit besteht ein FRET-Signal so lange, wie das Cytoplasma der Zelle negativ geladen ist. Verändert sich dieser Ladungszustand, beispielsweise durch das Öffnen eines Ionenkanals, so wandert Oxonol in die Zellmembran und das FRET-Signal verliert an Intensität.

Das beschriebene calciumabhängige Fluoreszenz-Detektionsverfahren kann auch auf viele Rezeptor-Assays übertragen werden. Der intrazelluläre Calciumspiegel steigt, ausgelöst über eine rezeptorvermittelte Kaskade, in der z. B. Inositoltriphosphat das Signal weitergibt. Andere Tests verwenden die Kopplung an Reportergene. Die Stimulation eines Rezeptors löst eine Signalkaskade aus, die für einige der Rezeptoren letztlich zu der Transkription der Genprodukte führt und durch entsprechende Promotoren gesteuert wird (■ Abb. 2.8). Ersetzt man nun die Sequenz des angesteuerten Gens durch die eines Reporters wie β -Galactosidase, Luciferase oder das grünfluoreszierende Protein (GFP), so resultiert ein einfach zu beobachtendes



■ **Abb. 2.8** Gene werden durch Promotoren gesteuert. Eine durch den Promotor initiierte Aktivierung des Gens führt zur Biosynthese des entsprechenden Proteins. Mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) kann man nun einen einfach zu beobachtenden Test aufbauen. Dazu wird der Promotor des Gens, der durch Bindung eines Agonisten aktiviert wird, mit dem Gen für das GF-Protein verknüpft. Die Aktivierung des Promotors liefert folglich nicht mehr das ursprüngliche Genprodukt, sondern es führt zur Synthese des GF-Proteins. Die Gegenwart des GF-Proteins lässt sich leicht über eine Fluoreszenz, stimuliert durch ultraviolettes Licht, beobachten.

Signal. Die produzierte β -Galactosidase spaltet X-gal und setzt einen blauen Farbstoff frei, Luciferase entwickelt ATP-abhängig eine Chemilumineszenz und das grünfluoreszierende Protein fällt durch seine intrinsische Fluoreszenz auf.

Von Mäusen, Menschen und Würmern

Genauso wie Assays in Reagenzgläsern die Verhältnisse in Zellen nicht vollständig wiedergeben können, können auch Zellen nicht das Verhalten eines ganzen Organismus korrekt simulieren. Daher lässt sich die Testung an Tieren nicht vermeiden. In der Vergangenheit dienten Ratten, Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und Affen für die Primärtestung von Verbindungen. Begrüßenswerterweise hat sich die ethische Einstellung gegenüber dieser Testung verändert. Zusätzlich haben die Kosten und die nur sehr limitierte Aussagekraft von Ganztierversuchen diese Tests auf eine späte Phase der präklinischen Entwicklung verschoben. Heute sind spezielle Tests für die frühe Erfassung von **ADMET-Parametern** (Absorption, Distribution,

Metabolismus, Exkretion und Toxizität) entwickelt worden und werden bereits in einer sehr frühen Phase der Leitstruktursuche eingesetzt. Dennoch, viele der pharmakokinetischen Parameter können nicht durch biochemische, *in vitro* oder zelluläre Assays erfasst werden.

Daher bedient man sich eines sehr einfachen Vielzelllers, des Wurms *Caenorhabditis elegans* für Ganztierversuche. An diese Nematoden werden nicht die gleichen ethischen Standards wie an Säuger angelegt. Doch als Testorganismus für die Wirkstoffprüfung hat *C. elegans* einige Vorteile: Viele der essenziellen Gene kommen auch in diesem Wurm ähnlich wie bei uns vor, sein Genom ist aufgeklärt und kann genetisch modifiziert werden, um eingebrachte Krankheitsbilder zu studieren. Er zeigt eine komplexe Differenzierung in über 100 Zelltypen, aber insgesamt umfasst er weniger als 1000 einzelne Zellen. Sein Lebenszyklus ist kurz, sodass sein Phänotyp ausreichend schnell charakterisiert werden kann. Zusätzlich ist er transparent und kann in Mikrotiterplatten gezüchtet werden. Beispielsweise besteht ein Krankheitsmodell für die Amyloid-Plaquerablagerung in diesem Wurm, sodass ein Modell zum Screening von denkbaren Therapeutika gegen die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit bereitsteht.

Trotzdem muss auch heute noch auf höher entwickelte Tiere für eine vertiefte Prüfung zurückgegriffen werden. Dafür wurden genetisch veränderte »Knockout«-Mäuse entwickelt, in denen das Gen zur Produktion eines Genproduktes entfernt wurde. Weiterhin kennt man transgene Tiere, denen zusätzliche fremde Gene eingesetzt werden. Die Harvard-Onkomaus, die erste patentierte transgene Maus, produziert das Onkogen *c-myc*, das sie besonders anfällig gegen Krebs macht. Eine große Zahl von Erbkrankheiten und einige multifaktorielle Krankheitsbilder konnten in transgene Mäuse eingebracht werden, sodass eine breite Palette von neuen relevanten Tiermodellen für die Testung von Leitstrukturen bereitstehen.

Herausforderungen und Chancen der Post-Genom-Ära: Entdeckung und Validierung neuer Targets

Zurzeit beschränkt sich die Pharmaforschung auf vielleicht 500 Targets für eine Arzneistoffentwick-

lung, wovon die meisten Proteine sind. Die Sequenzierung des humanen Genoms hat insgesamt ungefähr 35.000 Gene zutage gefördert, die für Proteine codieren. Daher kann man annehmen, dass eine erheblich größere Zahl von Genprodukten als Angriffspunkte für die Arzneimitteltherapie infrage kommt. Die Herausforderung liegt nun in der Abbildung der Genominformation auf Krankheiten. Gene werden unterschiedlich reguliert, abhängig vom Entwicklungszustand und von gewebsspezifischen Faktoren eines Organismus. Man stellt sich nun vor, dass viele pathogene Vorgänge mit Veränderungen oder Unterbrechungen dieser Expressionsmuster einhergehen. Daher ist es entscheidend, die Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellen zu unterschiedlichen Zeiten zu bestimmen. Mit diesen Fragen setzen sich die neuen Disziplinen Transkriptomik und Proteomik auseinander.

Die **Transkriptomik** bestimmt die vorliegenden Konzentrationen an Boten-RNA (mRNA) in einer Zelle. Dazu wurden Hunderte von Oligonucleotidsträngen bekannter Sequenzen auf Mikroarray-Chips verankert. Die RNA einer Zelle wird beispielsweise mit Biotin für eine spätere Detektion markiert und auf den Chip gegeben. Wertet man nun aus, wo auf dem zweidimensionalen Chip RNA gebunden wurde, so bekommt man eine Art Fingerabdruck der zellulären mRNA. Vergleicht man dieses Muster aus Zellen eines gesunden bzw. kranken Gewebes, so kann man auf Genprodukte aufmerksam gemacht werden, die im Krankheitsgeschehen eine Rolle spielen. Zusätzlich können solche Chips auch dafür verwendet werden, um die Hoch- bzw. Herunterregulation von Genen bei der Zugabe von Testmolekülen zu beobachten. Einzige Einschränkung dieser Suchmethode nach neuen Targets ist die zu Beginn auf dem Chip verankerte Vielfalt von Oligonucleotiden.

Bedingt durch die deutlich größere strukturelle Komplexität von Proteinen im Vergleich zu Oligonucleotiden stellt sich der Proteomik eine schwierigere Aufgabe. Dennoch erscheint dieser Ansatz genereller, da nicht nur die entstehenden Genprodukte erfasst, sondern auch deren posttranslationale Veränderungen registrierbar werden. Im Zentrum der Proteomforschung steht die 2D-Gelelektrophorese, die eine gleichzeitige Trennung von Tausenden von Proteinen auf der Basis ihrer Ladung und

ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten erzielt. Die einzelnen Proteine werden dann auf den Gelen kartiert und anhand einer massenspektrometrischen Sequenzierung charakterisiert. Auch hier wird die quantitative Proteinzusammensetzung einer Zelle im gesunden und im pathogenen Zustand untersucht. Veränderungen geben wichtige Hinweise auf die molekularen Akteure in einem Krankheitsgeschehen.

Mit Sicherheit wird die moderne Genomforschung einen massiven Einfluss auf die Entdeckung neuer Targets für die Arzneimitteltherapie nehmen. Neueste Ansätze versuchen sogar, die Prozesskette über die Identifizierung von Zielproteinen mit anschließendem Screening über eine Vielzahl von Testverbindungen auf den Kopf zu stellen. Stattdessen werden interessante Wirkstoffkandidaten in zellbasierten Assays vorgegeben, um über die von ihnen ausgelösten pharmakologischen Effekte in den Zellen neue, für die Therapie relevante Zielproteine zu entdecken. Weiterhin ist zu erwarten, dass in der Zukunft Verfahren zum Screening auf multifaktorielle Krankheiten entwickelt werden. Die Genomforschung wird auch ermöglichen, die Reaktion eines einzelnen Patienten aufgrund seines speziellen Genoms auf einen bestimmten Wirkstoff zu verstehen. Doch all diese Techniken werden kaum von Nutzen sein, wenn keine neuen Leitstrukturen entdeckt werden.

2.1.4 Die Suche nach neuen Leitstrukturen: Von Vorlagen aus der Natur bis zu Verbindungsbibliotheken aus der kombinatorischen Chemie

Ausgangspunkt für die Suche nach einem neuen Arzneimittel ist immer eine **Leitstruktur**. Eine solche Verbindung entwickelt bereits an dem betrachteten Zielprotein die gewünschte biologische Wirkung, für den therapeutischen Einsatz als Arzneimittel am Menschen fehlen aber noch wichtige Eigenschaften. Entscheidend für eine gute Leitstruktur ist auch, dass sie gezielt synthetisiert bzw. einfach abgewandelt werden kann, um ihre Wirkstärke, Selektivität, biologische Verfügbarkeit, Toxizität und Abbaubarkeit zu optimieren.

In Abschnitt 2.1.3 wurden ausführlich die verschiedensten Methoden beschrieben, die uns helfen, Verbindungen mit den gewünschten biologischen Eigenschaften zu entdecken. Teilweise erreichen diese Verfahren enorme Testkapazitäten. Daher stellt sich die Frage, was eigentlich getestet werden soll. Wo macht es am meisten Sinn, nach neuen Leitstrukturen zu suchen?

Das Universum denkbarer chemischer Verbindungen ist gewaltig groß – selbst wenn man eine molare Masse von weniger als 500 Dalton betrachtet, was der typischen Größe eines Arzneistoffs entspricht. Zahlen von bis zu 10^{200} Molekülen wurden vorgeschlagen. Alle Atome des Universums würden nicht ausreichen, diese zu synthetisieren. In Anbetracht dessen erscheint die Zahl der bis heute synthetisch hergestellten Verbindungen von etwa 20 Millionen verschwindend klein. Ist der Raum denkbarer chemischer Verbindungen daher heute auch nur annähernd ausgeleuchtet und könnten überall in diesen Raum brauchbare Pharmamoleküle gefunden werden?

Abgekupfert von der Natur: Naturprodukte als Leitstrukturen

Hält man sich die Komplexität der belebten Natur vor Augen, fällt auf, dass viele Wirksubstanzen in sehr unterschiedliche biologische Abläufe eingreifen. Sie verändern die Funktionen von Rezeptoren, Enzymen, Kanälen oder Transportern. Gerade in Pflanzen wurden eine Vielzahl sehr wertvoller therapeutischer Wirkprinzipien entdeckt, die sich bei höheren Lebewesen anwenden lassen. Pflanzen setzen sich mit ihrer Umgebung auseinander, beispielsweise mit Fraßfeinden, vor denen sie nicht einfach weglaufen können. So haben sie z. B. in Form der Alkaloide eine breite Palette von Wirksubstanzen entwickelt. Angefangen von Bitterstoffen bis hin zu hochgradigen Giften entfalten sie an unterschiedlichen Rezeptoren oder Enzymen ihrer Feinde eine Wirkung. Wenn nicht letal, reicht diese, meist sehr unangenehme Wirkung in aller Regel aus, einen Lerneffekt beim Gegner zu bewirken. Aber auch Pflanzen haben einen effizienten Schutz gegen Mikroorganismen, z. B. den Pilzbefall, entwickelt. Man denke nur an das oben beschriebene Beispiel der Penicilline. Schlangen, Frösche, Fische oder Spinnen können Gifte einsetzen, mit denen

sie ihre Gegner zu paralysieren verstehen. Es sei an den berühmten Fugu-Fisch erinnert, dessen Zubereitung in Japan eine legendäre Kunst darstellt. Die Wirksubstanz Tetrodotoxin blockiert bereits in geringsten Dosen die Natriumkanäle des Opfers und hemmt so die Erregbarkeit der Nerven bei der Reizleitung. Für uns geben die Wirkprinzipien solcher Substanzen wichtige Leitstrukturen im Herz-Kreislaufgeschehen ab. So darf es uns nicht verwundern, dass der größte Teil unseres Arzneischatzes direkt oder indirekt von **Naturstoffen** abstammt. Nahezu die Hälfte der sich heute am besten verkaufenden Arzneimittel entstammen dieser Gruppe.

Warum sucht man dann nicht gezielt in diesem Schatz von Naturprodukten nach neuen Leitstrukturen? Naturstoffe, z. B. die genannten Pflanzeninhaltsstoffe, wurden an biologisch relevanten Proteinen selektioniert. Sie sind im Verlauf der Evolution mit vielen Bindestellen von Rezeptoren und Enzymen in Kontakt gekommen. Somit erscheint die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sie auch an Proteine des Menschen binden, v. a., wenn man sich die enge Verwandtschaft der Genome aller Organismen vor Augen hält. Zusätzlich weisen Naturprodukte häufig bereits gute pharmakokinetische Eigenschaften auf. Sie wurden in einer biologischen Umgebung von Systemen synthetisiert, die Ähnlichkeiten mit den Rezeptoren besitzen, an denen die Naturprodukte anschließend ihre Funktion ausüben sollen. Obwohl Naturprodukte als ideale Leitstrukturen erscheinen, sind nur ganz wenige von ihnen selbst Arzneimittel geworden (z. B. Morphin, Codein, Digoxin, Ephedrin, Cyclosporin, Aprotinin). In aller Regel besitzen sie noch nicht die optimalen Eigenschaften, z. B. im Hinblick auf Metabolismus, Transport und Verweilzeit, sodass eine Strukturoptimierung durch synthetische Abwandlung erforderlich wird. Doch da beginnen die Probleme. In aller Regel sind Naturstoffe, mal abgesehen von ihrer teilweise nur schwierigen Isolierung und Reinigung, sehr komplexe chemische Strukturen. Übersät mit einer Vielzahl stereogener Zentren, aufgebaut aus zahlreichen komplexen Ringstrukturen, stellen sie höchste Anforderungen an den synthetisierenden Naturstoffchemiker. Ohne immensen Zeit- und Kostenaufwand lassen sich Total-synthesen nicht realisieren. Es dauert entsprechend lange, bis durch synthetische Abwandlungen einer

Leitstruktur aussagekräftige Struktur-Wirkungsbeziehungen erstellt werden können.

Dennoch, Naturprodukte sind aus Bausteinen aufgebaut, die heute jeder medizinische Chemiker in seinem Repertoire zur Konzeption eines neuen Wirkstoffs verwendet. Morphin zum Beispiel enthält einen basischen Stickstoff, eine phenolische Hydroxygruppe, eine Etherbrücke und hydrophobe aliphatische und aromatische Baugruppen. Benzodiazepine können als ein Mimetikum für eine β -Schleife eines Tetrapeptidstrangs aufgefasst werden. Alle vier Seitenketten des Tetrapeptids können auf das Benzodiazepintemplat übertragen werden. Somit ist es nicht verwunderlich, dass gerade dieser Strukturbaustein sehr häufig in Leitstrukturen für teilweise sehr verschiedene Zielrezeptoren aufzufinden ist (z. B. Benzodiazepin-Rezeptor, Cholecystokinin-Rezeptor, Fibrinogen-Rezeptor). Gerade dieses Konzept, privilegierte Strukturmuster aus Naturstoffen in Verbindungen einzubauen, erlangt in jüngster Zeit zunehmendes Interesse.

Screening von synthetischen Verbindungen

Die letzten 25 Jahre Leitstruktursuche waren v. a. vom Durchmustern sehr großer Datenbestände an synthetisch-organischen Verbindungen geprägt. Riesige Substanzdatenbanken wurden und werden in automatisierten **in vitro-Test-Assays** auf Bindung an einen Zielrezeptor geprüft. Leider sind die erzielten Trefferraten ernüchternd niedrig.

Die Verbindungen für das Primärscreening entstammen praktisch allen verfügbaren Quellen. Es sind z. B. die Substanzbestände, die über die Jahre in großen Firmen angehäuft werden konnten oder Verbindungen, die weltweit für die Pharmatestung angeboten werden, die die Testroboter im Hochdurchsatz-Screening heute bedienen. Doch die enorme Testkapazität benötigt mehr Substanzen, v. a. solche, die sich nicht leicht und billig herstellen lassen. So hat sich in den vergangenen 15 Jahren eine neue Chemie, die kombinatorische Chemie entwickelt.

Kombinatorische Chemie: Synthesekapazität ohne Grenzen?

Die Natur erzeugt mit 20 Aminosäuren eine ungeheure Vielfalt an Peptidsequenzen. An ein ge-

meinsames Rückgrat aus Peptidbindungen werden an jedem dritten Atom entlang der Polymerkette unterschiedliche Seitenketten angefügt. In der kombinatorischen Vielfalt dieser Seitenketten liegt das Konzept zum Erzeugen einer riesigen Diversität von Molekülen. Ganz analoge Prinzipien galt es, auf eine breite Palette von Molekülgerüsten zu übertragen. Ist es bei Peptiden ausschließlich die Reaktion zur Bildung einer Amidbindung, so verwendet die kombinatorische Chemie eine stetig wachsende Bandbreite chemischer Umsetzungen. Ziel dieser Reaktionen ist es, entweder in Mischungen oder, wie es heute vermehrt durchgeführt wird, in Parallelsynthesen Moleküle mit gleichem Grundkörper aufzubauen, die aber mit einer Vielzahl unterschiedlicher Seitenketten dekoriert werden. Neben der klassischen Reaktion in Lösung ist es v. a. die **Synthese am polymeren Trägermaterial**, die den parallelen Aufbau großer Substanzbibliotheken zugänglich macht. Schon in den 1960er Jahren entwickelte Merrifield die Festphasensynthese von Peptiden an funktionalisierten Polystyrolharzen. Zunächst wird eine Aminosäure über seine Säurefunktion an das Harz gekoppelt, wobei dessen Aminoterminus chemisch geschützt eingesetzt wird. Nach Entschützen der Aminogruppe lässt sich die nächste Aminosäure über ihre Säurefunktion unter Bildung einer Amidbindung anfügen. Diese Reaktion wird nun schrittweise mit einer Aminosäure nach der anderen durchgeführt. So wächst auf dem Polymerträger die gewünschte Peptidsequenz heran und kann am Ende über eine spezielle Spaltreaktion unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgetrennt werden.

Gegenüber einer in Lösung durchgeführten Synthesestrategie bringt die Reaktion an der festen Phase eine Reihe Vorteile. Große Überschüsse an Reagenzien bewirken schnelle und nahezu vollständige Umsetzungen. Ausgangsmaterialien lassen sich einfach durch Waschen des Festkörperträgers entfernen. Mit dem *split-and-combine*-Verfahren lassen sich in wenigen Arbeitsschritten Verbindungsbibliotheken aufbauen. Die Synthese läuft auf der Oberfläche einer Menge von Harzkügelchen ab. Die Strategie wird nun so geführt, dass auf jedem Kügelchen eine gezielte Peptidsequenz entsteht. Am Ende der Reaktionssequenz liegen die Kügelchen, die zwischendurch getrennt und wieder

gemischt wurden, zwar als Gemenge vor, sie lassen sich aber wegen ihrer Größe mechanisch trennen. In den letzten Jahren ist es gelungen, neben der genannten Amidbildung eine Vielzahl chemischer Reaktionen auf das Harz zu übertragen.

Hat denn nun die kombinatorische Chemie die chemische Diversität der zu testenden Verbindungen in dem Sinne zu steigern vermocht, dass heute in den aus der Kombinatorik hervorgehenden Substanzdatenbanken deutlich mehr Leitstrukturen gefunden werden? Das Ergebnis ist leider ernüchternd. Die Trefferraten sind nicht angewachsen. Zwar konnte der Heuhaufen, in dem nach neuen Nadeln gesucht wird, verdoppelt oder gar verzehnfacht werden, doch leider konnte dabei die Zahl der versteckten Nadeln nicht gesteigert werden. Offensichtlich hat man über die so konzipierten Bibliotheken zwar einen Zugriff auf deutlich mehr Testverbindungen, aber es gelang nicht, die Substanzbibliotheken mit biologisch relevanten Molekülen anzureichern.

Und in Zukunft: Datenbanken mit der richtigen Chemie?

Das *high throughput-screening* hat v. a. dann erfreuliche Trefferraten erzielt, wenn ein biologisches System untersucht wurde, das aus einer Proteinfamilie stammte, an der eine Firma schon seit längerem arbeitete. Ein solches Beispiel ist die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die durch biogene Amine angesteuert werden. Waren diese Rezeptoren Forschungsthema über eine geraume Zeit, sind die Regale einer Firma voll mit Substanzen, die ein Molekülgerüst aufweisen, das privilegiert an diese Klasse von Proteinen zu binden vermag. Man versucht heute vermehrt die Konzepte dieser Verwandtschaft auf der Ebene der Proteine auszunutzen, um Verbindungsbibliotheken, v. a. aus der kombinatorischen Chemie gezielt für eine Proteinfamilie bereitzustellen. Durch geeignete Dekoration einer privilegierten Gerüststruktur versucht man dann, die einzelnen Mitglieder der Proteinfamilie gezielt und mit hoher Selektivität zu adressieren. Kandidaten für ein Primärscreening werden zunehmend unter dem Aspekt einer Entwicklungsfähigkeit einer Leitstruktur zu einem potenten Wirkstoffmolekül vorselektiert. Typische Strukturelemente aus Naturstoffen werden in Form

geeigneter Baugruppen in den Aufbau kombinatorischer Bibliotheken eingebracht. Es bleibt zu hoffen, dass die nach solchen Kriterien bestückten Substanzdatenbanken in der Zukunft ergiebiger Trefferraten erzielen werden. Ganz entscheidend für dieses, mehr auf die Eigenschaften des biologischen Zielmoleküls ausgerichtete Bibliothekdesign ist die zunehmende Kenntnis der Raumstrukturen der Proteine. Hier werden die *structural genomics* in der näheren Zukunft entscheidende Beiträge leisten. Die Raumstrukturen sind auch die entscheidende Voraussetzung, dass die im nächsten Abschnitt beschriebenen rationalen Methoden der Leitstruktursuche mit zunehmendem Erfolg eingesetzt werden können.

2.1.5 Neue Leitstrukturen aus dem Computer

Es sind bereits verschiedene experimentelle Methoden zum Durchkämmen riesiger Substanzdatenbanken vorgestellt worden, die auf neue Leitstrukturen aufmerksam machen können. Die Ingenieurwissenschaften haben dazu beigetragen, dass inzwischen eine ausgefeilte Technologie für automatische Testsysteme bereitsteht. Mit ihnen können innerhalb weniger Wochen mehrere Millionen Verbindungen durchgemustert werden. Am Ende verbleibt eine vergleichsweise kleine Menge an Treffern. Erst jetzt kommen rationale Überlegungen zum Einsatz. Wirkstoffforscher beginnen, die entdeckten Substanzen untereinander auf ihre Struktur und ihr mögliches Bindevverhalten zu vergleichen. Hier stehen Vorstellungen im Vordergrund, dass ein pharmakologischer Effekt, wie Enzymhemmung oder Rezeptorbindung, ein räumlich vergleichbares Besetzen einer Bindetasche verlangt. Gleichzeitig soll der geübte Blick des medizinischen Chemikers entscheiden, ob manche der aufgefallenen Treffer als »falsch positive Hits« einen Effekt nur vortäuschen.

Die Protein-Raumstruktur als Voraussetzung für rationale Ansätze der Leitstruktursuche

Wie bereits beschrieben, gelingt es zunehmend, v. a. durch Erfolge der Röntgenstrukturanalyse und

der NMR-Spektroskopie, die **Raumstrukturen der Proteine** aufzuklären, die Zielsysteme im pharmakologischen Geschehen eines Krankheitsbildes darstellen. Somit drängt sich die Frage auf, ob man nicht, komplementär oder in Ergänzung zu dem experimentellen Screening, die Proteinstruktur direkt verwenden kann, um nach passenden Liganden zu suchen. In manchen Fällen mag es sogar ausreichend sein, einen natürlichen Liganden für das Zielprotein zu kennen. Wenn dieser Ligand eine weitgehend starre Struktur aufweist, ist es möglich, die in der Bindetasche des unbekannten Proteins angenommene Geometrie abzuschätzen. Für die Leitstruktursuche stellt sich nun, im Gegensatz zum ersten Fall, wo passende Schlüssel für ein gegebenes Schloss gesucht wurden, die Aufgabe, zu einem vorgegebenen Schlüssel ähnliche Nachschlüssel zu finden.

Infolge der **Strukturaufklärung** von immer mehr neuen Proteinen ergibt sich zunehmend häufiger die Situation, dass die Struktur eines mit dem interessierenden unbekannten Protein verwandten Vertreters aufgeklärt wurde. In einer solchen Situation lässt sich anhand der Raumkoordinaten des bereits charakterisierten Biopolymers ein Modell des unbekannten Proteins konstruieren. Um schnell einen Überblick über die Datenlage an sequenziell oder strukturell aufgeklärten Proteinen zu erlangen, sind zahlreiche Datenbanksysteme entwickelt worden. Viele dieser Systeme sind einfach über das Internet verfügbar. Besonders in Hinblick auf Protein-Ligand-Komplexe und die Eigenschaften von Bindetaschen konnte die Datenbank Relibase entwickelt werden. Sie erlaubt schnelle Suchen nach Ligand- und Proteineigenschaften und ermöglicht die Überlagerung verwandter Proteinbindetaschen. So werden Wechselwirkungsmuster, die typischerweise zwischen funktionellen Gruppen von Liganden und den Aminosäuren der Bindetasche ausgebildet werden, transparent. Die Rolle von Wassermolekülen als Brückengliedern bei der Ligandenbindung werden veranschaulicht. Genauso lässt sich analysieren, welche Teile des Proteins bei der Ligandenbindung starr, welche sich flexibel verhalten. Der direkte Vergleich von Bindungsgeometrien unterschiedlicher Liganden macht darauf aufmerksam, welche Molekülbausteine in einem

Ligandengerüst gegeneinander, wie man sagt bioisoster, ausgetauscht werden können.

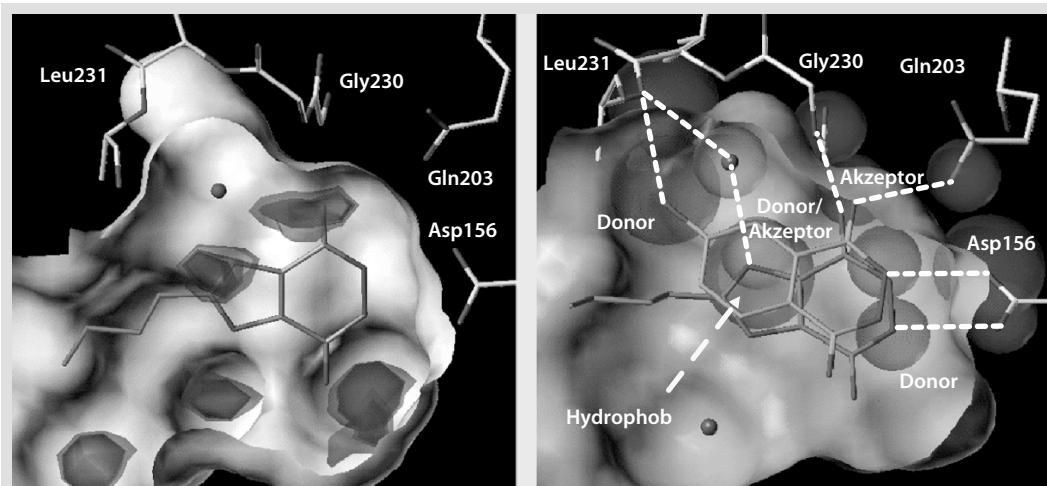
Unter Kenntnis all dieser Kriterien, die offensichtlich die Bindung eines kleinen organischen Moleküls an ein Protein bestimmen, fragt es sich, ob man nicht mithilfe von Computermethoden neue Liganden entwickeln bzw. gezielt nach ihnen suchen kann.

Am Anfang steht die Analyse der Proteinbindetasche

Um erfolgreich an ein Protein binden zu können, muss ein Ligand eine ganze Reihe von Kriterien erfüllen. Zunächst muss er eine Gestalt annehmen können, die komplementär zu der der Bindetasche ist. Moleküle sind flexibel, durch energetisch kaum aufwendige Drehungen um Einfachbindungen können sie zahlreiche Geometrien annehmen. Doch die Passform alleine reicht nicht. Gleichzeitig müssen die Eigenschaften der funktionellen Gruppen eines Liganden komplementär zu denen der funktionellen Gruppen des Proteins in der Bindetasche sein. Wasserstoffbrücken können zwischen Ligand und Protein ausgebildet werden und den Liganden in der Tasche verankern. Dies gelingt aber nur, wenn in den Bindungspartnern eine Donorgruppe einer Akzeptorgruppe gegenüber stehen. Ähnliches gilt für hydrophobe Gruppen. Insgesamt müssen die energetischen Verhältnisse bei der Ligandenbindung so ausgelegt sein, dass die Komplexbildung energetisch begünstigt wird. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der Bindungsvorgang in wässriger Lösung abläuft, d. h. sowohl Ligand wie Protein sind vor der Bindung von Wassermolekülen solvatisiert. Diese lokale Umgebung von Wassermolekülen ändert sich bei der Bindung und dies geht ganz entscheidend in die Energiebilanz ein.

Um die Kriterien genauer fassen zu können, die ein geeigneter Ligand mitbringen muss, lohnt es sich, die Bindetasche eines Proteins genau zu analysieren. Wo befinden sich die Bereiche in einer Tasche, in die unbedingt bestimmte funktionelle Gruppen des Liganden platziert werden müssen?

Mehrere Verfahren konnten entwickelt werden, die es erlauben, die für eine Bindung essenziellen Bereiche hervorzuheben. Für einen bestimmten Atomtyp, beispielsweise einen Wasserstoffbrü-



■ **Abb. 2.9** Links) Mit einem Sondenatom für einen Wasserstoffbrückenakzeptor wurde die Bindetasche des Enzyms tRNA-Guanin-Transglykosylase abgetastet. Die Regionen, die besonders günstig für eine solche wechselwirkende Gruppe sind, können auf der Computergrafik hervorgehoben werden. Ganz analog kann auch mit anderen Wechselwirkungs sonden die Bindetasche ausgeleuchtet werden. Rechts) Fasst man die Schwerpunkte der so ermittelten Bereiche zusammen, ergibt sich ein räumliches Muster der Eigenschaften, die ein denkbarer Ligand unbedingt besitzen sollte. Dieses Muster nennt man **Pharmakophor** und es dient als Randbedingung, um Datenbanksuchen zu definieren.

cken-Donor bzw. Akzeptor oder eine hydrophobe Gruppe tastet man systematisch die Bindetasche ab. Anschließend zeigt man sich mithilfe der Computergrafik an, in welchen Regionen eine Platzierung dieses Atomtyps in einem Liganden besonders günstig ist (■ Abb. 2.9). Fasst man die Schwerpunkte dieser so ermittelten Bereiche zusammen, bekommt man ein räumliches Muster der Eigenschaften, die ein Ligand unbedingt aufweisen muss, um an das Protein zu binden. Ein solches Muster nennt man **Pharmakophor**. Weil dieser unter Verwendung der Eigenschaften des Proteins entwickelt wurde, spricht man von einem **proteinbasierten Pharmakophor**. Diesen abstrakten Pharmakophor gilt es nun, in konkrete Molekülgeometrien zu übertragen.

Vom Pharmakophormuster zum Liganden: *de novo*-Design und virtuelles Screening

Das Pharmakophormuster legt in abstrakter, generischer Weise die in einem Liganden erforderlichen Eigenschaften fest. Ansätze des *de novo*-Designs versuchen, diese Eigenschaften in Moleküle zu übertragen. Dazu wird zunächst

eine brauchbare Ankergruppe in die Bindetasche platziert. Ausgehend von deren Bindungsmodus werden dann, unter Verwendung von Regeln über die Verknüpfung chemischer Bindungen, weitere Atome und Fragmente an die ursprüngliche Ankergruppe angehängt. In jedem Schritt wird die erzielte Platzierung auf die zu erwartende Bindungsaffinität überprüft. Auf diesem Weg wächst ein neues Molekül in die Bindetasche. An vielen Stellen des Aufbaus ergeben sich mehrere Möglichkeiten, entweder ein bestimmtes Fragment zu platzieren oder andere verwandte Bausteine zu verwenden. Ein Computeralgorithmus versucht die verschiedenen Varianten parallel zu verfolgen und kommt als Ergebnis eines kombinatorischen Ansatzes zu zahlreichen Lösungen. Wiederum ist es sehr wichtig, dass die einzelnen auf dem Computer entwickelten Leitstrukturen in ihrer angenommenen Bindungsgeometrie bewertet werden. Das letztendlich zählende Kriterium ist dabei die abgeschätzte Bindungsaffinität. Wichtig für diesen Ansatz ist weiterhin, dass die entwickelten Moleküle chemisch einfach darstellbar sind. Zunächst existieren sie nur als Vorschläge im Computer. Im nachfolgenden Schritt müssen sie natürlich im

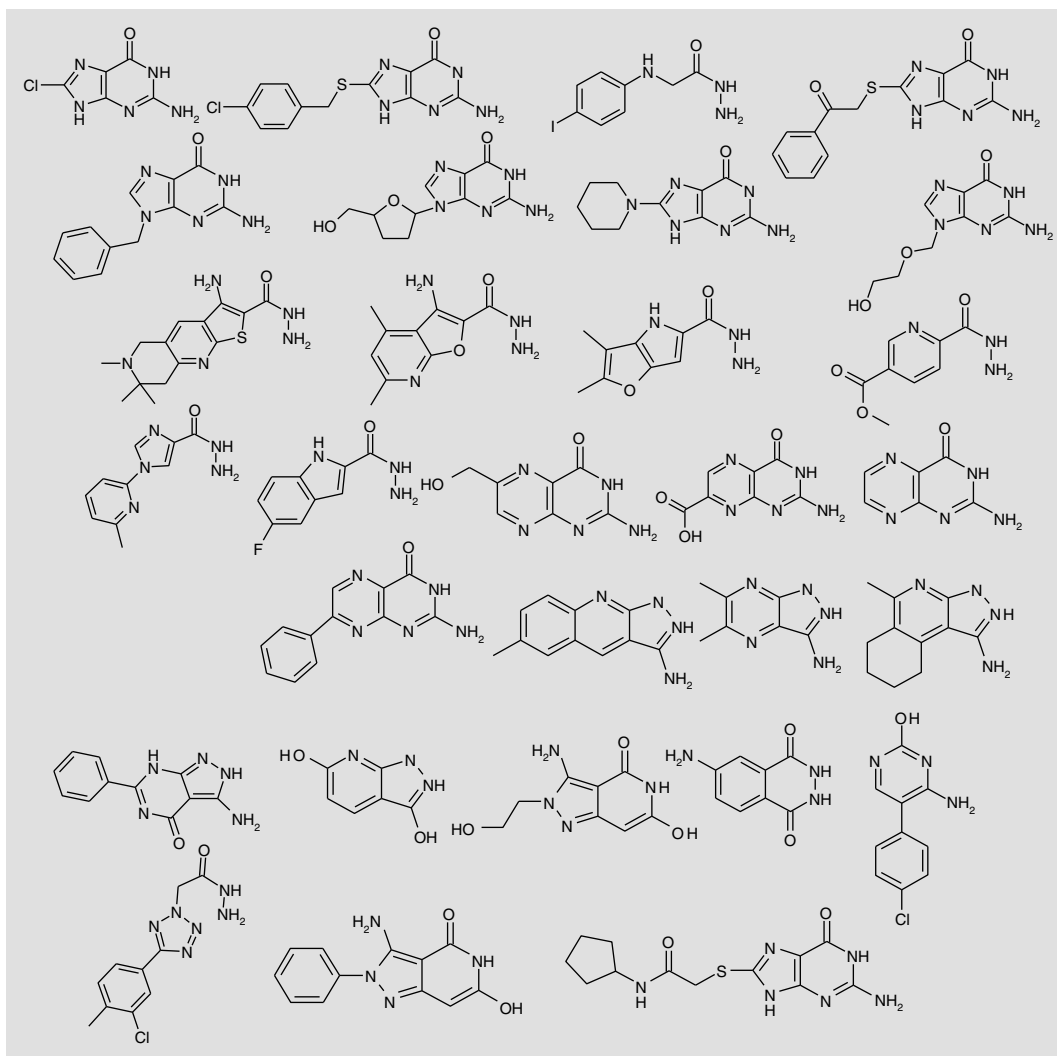
Syntheselabor dargestellt und experimentell auf ihre tatsächlichen Bindungseigenschaften validiert werden.

Ein alternativer Ansatz versucht pragmatischer vorzugehen. Kann man nicht zunächst in den Datenbeständen bereits synthetisierter Verbindungen nach möglichen Bindern für ein vorgegebenes Protein suchen? Dieses Vorgehen ähnelt damit dem des experimentellen Durchmusterens großer Substanzdatenbanken. Aus diesem Grunde wird es auch als Computerscreening oder **virtuelles Screening** bezeichnet. Für eine solche Strategie ist es natürlich erforderlich, einen schnellen Computeralgorithmus zu haben, der Moleküle flexibel in eine Bindetasche einpassen kann. Zahlreiche Programme konnten inzwischen entwickelt werden, die diesen Vorgang des Dockings schnell und zuverlässig ausführen. Will man dieses Abprüfen von Strukturen mit einem **Dockingverfahren** im Rahmen des virtuellen Screenings durchführen, so muss zunächst für jeden Eintrag einer Datenbank, die die in einer Firma oder bei einem kommerziellen Anbieter verfügbaren Substanzen registriert, eine Raumstruktur erzeugt werden. Dann wird mit sehr groben Verfahren geprüft, ob die gespeicherten Moleküle prinzipiell das aus einer Proteinstruktur abgeleitete Pharmakophormuster widerspiegeln. Sukzessive wird in verschiedenen Filterschritten die Menge der potenziell interessanten Verbindungen eingekreist. Zuletzt werden die Moleküle in die Bindetasche mit einem Dockingprogramm eingepasst und die erzeugte Bindungsgeometrie wird in Hinblick auf die erwartete Bindungsaffinität bewertet. Dieser Schritt ist natürlich der entscheidende, leider aber auch der schwierigste. Es ist keinesfalls trivial aus einer vorgegebenen Bindungsgeometrie die Bindungsaffinität eines Liganden zu einem Protein abzuschätzen. Dies hängt damit zusammen, dass für eine Bindung nicht nur die von der Komplexgeometrie ablesbaren Wechselwirkungskontakte entscheidend sind, sondern ebenfalls Ordnungsphänomene eine Rolle spielen. Diese beziehen sich v. a. auf Änderungen in der Wasserstruktur bei der Bindung und auf Beweglichkeiten und Schwingungsmöglichkeiten der beiden Bindungspartner, die sich zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand deutlich unterscheiden.

Das virtuelle Screening wird derzeit intensiv entwickelt. Es lassen sich damit erfolgreich neue Leitstrukturen einer großen chemischen Vielfalt entdecken. Für das in ■ Abb. 2.9 gezeigte Protein gelang es unter Verwendung des dargestellten Pharmakophors, die in ■ Abb. 2.10 aufgeführten Leitstrukturen zu entdecken. Viele dieser Liganden erwiesen sich bei der experimentellen Validierung als mikromolare Hemmstoffe.

Computerdesign von fokussierten Bibliotheken für die kombinatorische Chemie

Das virtuelle Screening lässt sich auch auf Substanzen ausdehnen, die noch nicht synthetisch vorliegen. Ein solcher Ansatz ist v. a. in Hinblick auf Substanzbibliotheken aus der kombinatorischen Chemie interessant. Kann man auf diesem Wege Konzepte des *de novo*-Designs mit denen des virtuellen Screenings vereinen? Die Bindetasche des Zielproteins definiert die Kriterien, die die einzelnen Kandidaten einer kombinatorischen Substanzbibliothek zu erfüllen haben. Unter Verwendung der für eine solche Bibliothek geeigneten Chemie kann eine riesige Menge von Mitgliedern einer solchen kombinatorischen Bibliothek im Computer erzeugt werden. Anschließend muss mithilfe der Strategien des virtuellen Screenings die ursprüngliche Datenbank auf deutlich weniger Einträge fokussiert werden. Der Computer dient also zum Vorselektieren der vermutlich besten Treffer. Dies bestimmt anschließend bei der tatsächlichen Synthese der Bibliothek die Auswahl der einzusetzenden Reagenzien. Damit wird die prinzipiell denkbare kombinatorische Vielfalt auf eine für das untersuchte Protein zugeschnittene Bibliothek eingegrenzt. Die nähere Zukunft wird erweisen, ob durch diesen integrierten Ansatz, für das Screening Erfolg versprechendere Substanzdatenbanken bereitstehen. Gleichzeitig kann ein solcher Ansatz die Erkenntnisse über die Eigenschaften von Naturstoffen und privilegierten Molekülgerüsten berücksichtigen.

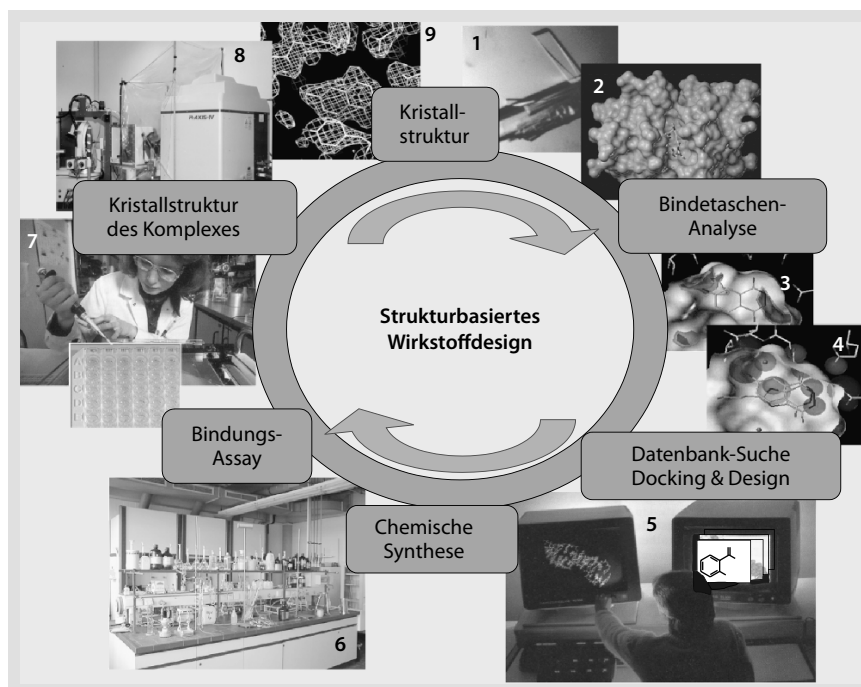


■ **Abb. 2.10** Mit dem in Abb. 2.9b definierten Pharmakophormuster konnten die gezeigten Leitstrukturen mithilfe des Computers entdeckt werden. Viele der gezeigten Strukturen besitzen mikromolare Affinität gegen das Zielenzym und können als Leitstruktur für die weitere Arzneistoffentwicklung dienen.

Notwendig, aber nicht ausreichend: optimale und komplementäre Passform für die Bindetasche

Eine im experimentellen Screening oder im Computer entdeckte Leitstruktur muss im Weiteren auf ihre Bindungsstärke an das Zielprotein optimiert werden. Liegt die Struktur dieses Zielrezeptors vor, gelingt die Optimierung in aller Regel durch einen iterativen Designprozess (■ Abb. 2.11). Ausgangspunkt ist die Raumstruktur des Proteins mit der entdeckten Leitstruktur, am besten aus einer Rönt-

genstrukturbestimmung. Durch genaue Analyse des Bindungsmodus und den Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand wird versucht, die Komplementarität zu verbessern. Wasserstoffbrücken tragen besonders zur Affinität bei, wenn sie durch Ladungen auf dem Liganden oder Protein verstärkt werden. Es darf nicht vergessen werden, dass hier der Beitrag einer H-Brücke relativ zu seiner Stärke in einer wässrigen Umgebung zu sehen ist. Nur wenn sie sich in der Proteinumgebung als stärker als in Wasser erweist, trägt sie zur Bin-



■ **Abb. 2.11** Das interaktive Wirkstoffdesign beginnt mit der Strukturaufklärung des interessierenden Zielproteins (1). Nach Analyse der Bindetasche (2) wird ein Pharmakophormuster (3, 4) erstellt, das als Suchanfrage zum Durchmustern von Datenbanken dient. Durch Docking und Computerdesign (5) werden neue, verbesserte Synthesevorschläge für mögliche Liganden erarbeitet. Nach der chemischen Synthese (6) und biologischen Testung (7) erfolgt die Kristallisation der neuen Leitstruktur mit dem Protein. Dessen Strukturbestimmung dient nun zum Starten eines weiteren Designzyklus. Ziel ist es, durch Zusammentragen weiterer Informationen eine gezielte Optimierung der ursprünglichen Leitstruktur zu einem Wirkstoffkandidaten zu erreichen.

dungsaffinität bei. Für einige Beispiele wurden anhand von Struktur-Wirkungsbeziehungen belegt, dass der Übergang von einer neutralen Spezies zu einem geladenen Molekül mit einem deutlichen Sprung in der Wirkstärke einhergeht. Eine normale Wasserstoffbrücke wurde durch einen ladungsunterstützten Kontakt ersetzt. Manchmal lässt sich dies recht einfach gezielt erreichen, z. B. durch ein geeignetes Substitutionsmuster an einem Heterozyklus kann dieser durch pKa-Verschiebung von der Neutralform in die geladene Form übergehen. Weiterhin ist es ein wichtiges Konzept der Wirkstoffoptimierung, hydrophobe Taschen im Rezeptor optimal durch gleichartige aber strukturell komplementäre Gruppen des Liganden auszufüllen. Unbesetzte Hohlräume in Protein-Ligand-Komplexen erweisen sich als abträglich für eine hochaffine Bindung. Die günstigen Affinitätsbeiträge durch Füllen hydrophober Bindungsbereiche erklärt sich aus

Einflüssen, die die Änderung der Wasserstruktur betreffen. Es werden Wassermoleküle aus der Bindetasche freigesetzt. Sie erhalten zusätzliche Bewegungsfreiheitsgrade und tragen zur Erhöhung der entropischen Bindungsbeiträge bei. In einem sehr einfachen Modell kann man diese entropischen Beiträge an der Zahl der Freiheitsgrade festmachen, die zur Unordnung eines Systems beitragen. Ähnliches gilt für die Überführung eines Liganden aus der Wasserumgebung in die Proteinbindetasche. Durch die Fixierung des Liganden im Protein verliert er interne Freiheitsgrade. Dies ist abträglich für die Entropiebilanz des Systems. Daher besitzt ein starrer Ligand, vorausgesetzt er friert die korrekte Bindungsgeometrie im Protein ein, eine höhere Bindungsaffinität. Er kann bei der Bindung einfach nicht so viele konformative Freiheitsgrade verlieren wie ein flexibleres Molekül. Daher kann eine gezielte Rigidisierung einer Leitstruktur eine

Strategie zu ihrer Optimierung darstellen. Es bleibt aber im Einzelfall zu prüfen, welches Konzept für welches System anzuwenden ist.

Bei der Optimierung der Passform eines Liganden auf das Protein wird parallel berücksichtigt, dass das erhaltene Molekül später einmal günstig in einem großtechnischen Verfahren hergestellt werden muss. So versucht man, stereogene Zentren auf ein Minimum zu reduzieren und komplizierte Ringsynthesen zu vermeiden. Die Erfahrung des Synthesechemikers, der für die technische Entwicklung verantwortlich ist, wird frühzeitig zu Rate gezogen. Allerdings bedeutet die Überführung der ursprünglichen Laborsynthese auf ein technisch durchführbares Syntheseverfahren eines Entwicklungskandidaten die völlig neue Konzeption der Herstellungsvorschrift. Meist verlangt diese Umstellung den Einsatz eines ganzen Entwicklungsteams über mehrere Jahre.

2.1.6 Aus dem Reagenzglas in den Organismus: Was eine Leitstruktur noch alles braucht, um zu einem Arzneimittel zu werden

Eine hoffnungsvolle Leitstruktur ist noch lange kein Wirkstoff, der den Weg zum Marktprodukt schafft. Dazu sind neben der Wirkung am eigentlichen Zielort noch die Eigenschaften zu optimieren, die den Weg zum Wirkort, aber auch die Prozesse zum Ausschleusen einer Verbindung aus dem Organismus betreffen. Neben Wirkstärke betrifft dies v. a. Spezifität und Wirkdauer, aber auch die Nebenwirkungen, die Aufnahme, den Transport, die Toxizität, den Metabolismus und die Ausscheidung einer Substanz. Viele hoffnungsvolle Leitstrukturentwicklungen scheiterten in einer viel zu späten und damit sehr teuren Phase, weil sich eine dieser Eigenschaften als nicht optimal erwies. Gerade in den letzten fünf Jahren der Pharmaforschung wurde diesen **pharmakodynamischen Eigenschaften** vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Man versucht heute schon in einer frühen Phase der Wirkstoffentwicklung Leitstrukturkandidaten auf ihre ADME-Tauglichkeit zu prüfen. Keine Synthese wird mehr ins Auge gefasst, ohne dass die

Verbindungen anhand Lipinskis »Rule-of-Five« vorgemustert werden. Empirischen Überlegungen zufolge sollte die molare Masse 500 D nicht überschreiten, die Struktur nicht mehr als 5 H-Brückendonor- und 10 ($= 2 \times 5$) Akzeptorgruppen aufweisen, die Lipophilie in ein Fenster fallen, das einem Verteilungskoeffizienten von $\log P < 5$ entspricht.

Hier optimal, an anderer Stelle fatal: Optimierung der Selektivität

Bei körpereigenen Wirkstoffen leistet sich die Natur oft den Luxus, relativ einfache und an mehreren Stellen passende Liganden zu verwenden. Dennoch wird eine hohe Spezifität der Wirkung erzielt und zwar durch eine sehr ausgeprägte Kompartimentierung. Die Neurotransmitter werden beispielsweise streng lokalisiert eingesetzt, wirken ganz in der Nähe ihrer Freisetzung und werden nach Erfüllen ihrer Funktion gleich wieder entfernt. So kennen wir auf Rezeptorebene eine Fülle unterschiedlicher Subtypen, die alle durch den gleichen Liganden angesteuert werden. Sie erfüllen alle verschiedenen Funktionen im lokalen pharmakologischen Geschehen. Das Umcodieren einer Aminosäuresequenz eines bestimmten Rezeptorsubtyps ist auf Genebene einfach zu realisieren. Dagegen wäre es für einen Organismus deutlich aufwendiger, den komplexen Biosyntheseweg eines nicht peptidischen Liganden durch kleine strukturelle Abwandlungen auf eine vergleichbare Vielfalt zu bringen.

Auf der Ebene der Enzyme entdecken wir immer mehr Vertreter der gleichen Proteinfamilie, die in ganz unterschiedlichen biologischen Prozessen – biochemisch gesehen – sehr ähnliche Schritte katalysieren. Durch die in aller Regel gegebene Kompartimentierung dieser Enzyme in ganz anderen Bereichen des Organismus besteht keinerlei Gefahr einer Fehlfunktion. Für die Arzneistofftherapie stellt sich nun das große Problem, dass eine gezielte Adressierung nur eines dieser Rezeptorsysteme bzw. Enzyme in einem bestimmten Kompartiment erwünscht ist. Die Substanz wird dem Organismus fast immer oral oder intravenös zugeführt. Über alle Barrieren der Kompartimentierung hinweg soll sie gezielt und spezifisch den Wirkort finden und beeinflussen. Dabei lässt sich so einfach kein Rezept definieren, wie spezifisch sie wirklich sein soll. Neuroleptika und viele Antidepressiva greifen an

Neurorezeptoren im Gehirn an. Teilweise wirken sie, therapeutisch sogar gewünscht, an mehreren Subtypen mit unterschiedlicher Stärke. Sie erzielen dabei z. B. eine gewünschte neuroleptische und antidepressive Wirkung. Wegen dieses vielfältigen Angriffs auf mehrere unterschiedliche Rezeptoren werden solche Arzneistoffe auch als *dirty drugs* bezeichnet. Ihre optimale Wirkung mag dabei gerade in diesem ausgewogenen Angriff auf mehrere Rezeptoren beruhen und optimal für eine Therapie sein. Diese Kriterien lassen sich aber leider erst sehr spät in der Entwicklung bei der klinischen Prüfung und Erfahrung beim breiten Einsatz am Patienten ermitteln.

Eine andere Erkenntnis der jüngsten Genom- und Proteomforschung verweist auf eine weitere Komplikation der strukturbezogenen Selektivität. Die Proteine gleicher Funktion der Spezies Mensch sind nicht zwingend in allen Individuen identisch aufgebaut. Es gibt einzelne Aminosäureaustausche (bedingt durch Varianten auf Genebene), die häufig keine veränderte Proteinfunktion zum Ergebnis haben. Diese Polymorphismen können sich aber bei der Wechselwirkung mit Arzneimitteln bemerkbar machen, da diese Substanzen durchaus auch andere Bereiche der Bindetasche als die körpereigenen Liganden adressieren. Infolge reagieren Patienten unterschiedlich auf die Wirksubstanzen. In einzelnen Fällen wissen wir heute, dass mutierte Proteine Ursache für eine Krankheit bedeuten können. Solche Erbkrankheiten lassen sich nur heilen, wenn der entsprechende Defekt auf Genebene korrigiert wird.

Im Rahmen der Wirkstoffoptimierung konzentriert man sich in aller Regel zunächst auf eine Steigerung der Spezifität und Selektivität. Mit rationalen Konzepten kann diese Frage angegangen werden, wenn die Raumstrukturen der verschiedenen Subtypen, Isoenzyme oder Proteine einer Familie bekannt sind. Man geht dazu ganz ähnlich wie bei der Bestimmung der für eine Proteinbindung entscheidenden Wechselwirkungen in der Bindetasche vor. Mit verschiedenen Wechselwirkungs-sonden werden von allen Spezies der Proteinfamilie die Bindetaschen ausgeleuchtet. Es werden dann die Unterschiede in diesen so herauskristallisierten Eigenschaften aufgespürt. Sie können zusätzlich mit den Affinitätsdifferenzen bekannter Liganden gewichtet werden. So lassen sich, bezogen auf die

Raumstrukturen, Kriterien herausfiltern, wie Liganden eine erhöhte Selektivität gegen das eine oder andere Mitglied der Proteinfamilie erzielen. Anhand dieser Konzepte bringen die Synthesechemiker anschließend eine erhöhte Selektivität in seine Wirkstoffkandidaten ein.

Viele Hürden auf dem Weg zum Wirkort: Freisetzung, Löslichkeit, Verteilung, Transport, Verweildauer, Metabolismus und Toxizität

Was hilft die affinste Verbindung für ein bestimmtes Zielprotein, wenn sie aufgrund unbefriedigender Freisetzung aus der applizierten Arzneiform, mangelnder Löslichkeit, schlechter Verteilung, ungenügendem Transport oder viel zu kurzer Verweildauer im Organismus diesen Wirkort nie erreicht? Nach oraler Gabe eines Arzneistoffs muss er zunächst freigesetzt werden. Hochentwickelte Darreichungsformen können gesteuert auf die Geschwindigkeit und räumlich lokalisierte Freisetzung (z. B. pH-Millieu) eines Wirkstoffs Einfluss nehmen. Anschließend ist der Arzneistoff für den Abbau durch Enzyme freigegeben. Ester- und Amidbindungen können durch Esterasen, Lipasen oder Proteasen gespalten werden. Diese Fähigkeit der ubiquitär im Organismus vorkommenden Enzyme kann man sich allerdings auch gezielt zunutze machen. Ist z. B. eine freie Säure wegen zu hoher Polarität nicht ausreichend membrangängig und bioverfügbar, mag dies für ihren Ester nicht gelten. Nach erfolgreichem Transport des Esters besteht die Chance, dass er an erforderlicher Stelle gespalten und der Wirkstoff aus der *pro-drug*-Form freigesetzt wird. Nach Eintritt in die Blutbahn aus dem Magen bzw. dem Darm werden zunächst alle Wirkstoffe mit dem Blut durch die Leber transportiert. Wegen ihres reichen Spektrums an spaltenden, oxidierenden, reduzierenden und konjugierenden Enzymen ist die Leber vornehmlich der Ort des Abbaus von Arzneimitteln. Viele xenobiotische Verbindungen überstehen die Leberpassage nicht. Sie werden in wasserlösliche Metaboliten überführt, die über die Niere ausgeschieden werden, teilweise auch als sog. Konjugate, die mit körpereigenen polaren Substanzen verknüpft werden. Oxidative Angriffe auf Wirkstoffe nehmen die Klasse der Cytochrom-P450-Enzyme vor. Es handelt sich hier

um eine Klasse untereinander verschiedener Isoenzyme, die ein etwas unterschiedliches Substratspektrum zu verarbeiten verstehen. Neben dem zur Ausscheidung führenden Metabolismus können diese Enzyme Wirkstoffe aber auch so verändern, dass Metabolite entstehen, die entweder erst die eigentliche Wirkform darstellen oder aber zu unterschiedlichen Nebenwirkungen führen. Diese können toxische, mutagene oder kanzerogene Wirkungen umfassen. Man kann sich natürlich fragen, warum unser Organismus nicht mit einem effizienteren, ja nahezu perfekten System ausgestattet wurde, das das Entstehen solcher toxischen Zwischenprodukte vermeidet. Dies war in der evolutionären Entwicklung bislang noch nicht erforderlich, zumal für den evolutiven Prozess nur der vergleichbare kurze Lebensabschnitt bis zur Fortpflanzungsfähigkeit entscheidend ist. Viele mutagene und kanzerogene Wirkungen erlebt der Mensch erst im erhöhten Alter, das wir inzwischen allerdings durch den erhöhten Gesundheitsstandard vermehrt erreichen dürfen. Dazu kommt, dass, wie inzwischen festgestellt werden konnte, nicht jeder Mensch über den qualitativ wie quantitativ gleichen Satz an metabolisierenden Enzymen verfügt. So ist schon aufgrund dieser Differenzen mit einer abweichenden Wirkung und Verträglichkeit von Arzneimitteln zu rechnen. Die Ermittlung des genomischen Fingerabdrucks jedes einzelnen Menschen birgt an dieser Stelle die Chance, einen Patienten aufgrund seines individuellen Metabolisierungsprofils optimal auf eine Arzneimitteltherapie einzustellen.

Im Rahmen der Wirkstoffoptimierung setzt der erfahrene medizinische Chemiker häufig auf bekannte **Bioisosterieprinzipien**, um unerwünschte Metabolisierungspfade oder den Abbau zu unerwünschten Metaboliten zu vermeiden. Die Kenntnis des Bindungsmodus eines Wirkstoffs an sein Zielprotein zeigt weiterhin auf, an welchen Stellen ein Ligand mit Seitenketten dekoriert werden kann, ohne dass dabei die Rezeptorbindung signifikant verändert wird. Dies können Bereiche sein, in denen sich Teile des Liganden zum ungebundenen Lösungsmittel hin orientieren. An solchen Stellen können Gruppen angebracht werden, die die Lipophilie oder Löslichkeit erhöhen oder die einen metabolischen Angriff unterbinden.

Vor die größten Probleme einer rationalen Wirkstoffoptimierung setzt uns heute sicherlich noch immer das Abschätzen der Toxizität von Verbindungen. **Toxizität** kann an unterschiedlichsten Stellen des Organismus durch Nebenwirkungen entstehen, wobei dies nicht auf die Wirksubstanz selbst beschränkt bleiben muss. Ebenfalls deren Abbauprodukte können dafür verantwortlich sein. Abschätzen der Humantoxizität aus Daten, die an anderen Spezies gewonnen wurden, ist nicht unproblematisch. Heute ist es Routine, die akute Toxizität an mehreren Tierarten zu bestimmen. Die chronische Toxizität wird an mindestens zwei Tierarten vor Beginn der klinischen Phase I durchgeführt. Es wird versucht, Tierarten zu wählen, die bei einer bestimmten therapeutischen Anwendung in ihrer Pharmakokinetik und ihrem Metabolismus dem Menschen am nächsten stehen. Hamster und Meerschweinchen, zwei miteinander relativ nahe verwandte Spezies, weisen bezüglich des für den Menschen gefährlichen Tetrachlordibenzodioxins einen Toxizitätsunterschied von etwa drei Zehnerpotenzen auf. Dies mag die Schwierigkeit einer solchen Abschätzung unterstreichen.

Das sicherlich beste und v. a. durch langjährige Erfahrung geprägte Konzept einer Wirkstoffoptimierung berücksichtigt, neben fein abgestimmter Pharmakodynamik und Pharmakokinetik, auch den Einbau chemisch begründeter Sollbruchstellen und Konjugationsstellen, die einen einfachen Metabolismus ohne nur schwer planbare oxidative Angriffe zulassen. Je besser diese Voraussetzungen in einen Wirkstoff eingebracht werden, umso geringer ist das Risiko einzuschätzen, dass chronische Toxizität entwickelt wird.

Abschließend muss aber bemerkt werden, dass auch die umfangreichsten Untersuchungen in der präklinischen Phase nicht das Risiko eliminieren können, das erst bei einer breiten therapeutischen Anwendung erkannt werden kann. Gravierende Nebenwirkungen können am Menschen in sehr seltenen Fällen auftreten. Eine Nebenwirkungsquote von 1:10000 bleibt in dieser Phase der klinischen Prüfung in aller Regel unentdeckt. Auch der chronische Arzneimittelmisbrauch durch lebenslange Einnahme großer Dosen einer Substanz kann zu toxischen Nebenwirkungen führen. So musste das Jahrzehnte in der Therapie verwendete Schmerz-

mittel Phenacetin nach vielen Jahren des teilweise unreflektierten Einsatzes wegen Nierenschädigungen vom Markt genommen werden.

Das »Nadelöhr« von der Forschung zur Entwicklung, der Weg vom entdeckten Zielprotein zum Entwicklungskandidaten, ist langwierig und beschwerlich. Die letzten Jahre der Wirkstoffforschung haben stark dazu beigetragen, dass wir inzwischen besser verstehen, warum dieser Weg so komplex ist. In diesem besseren Verstehen liegt aber auch die Chance, dass in Zukunft dieser Weg zunehmend durch rationale Konzepte beschleunigt werden kann.

2.2 Entwicklung – Was gehört dazu?

Hat die Wirkstoffsuche zur Auswahl eines erfolgversprechenden Wirkstoffkandidaten geführt, wird bereits in frühen Phasen der Entwicklung mit einem umfangreichen pharmakologischen und toxikologischen Testprogramm begonnen, dem pharmakokinetische (Konzentrationsveränderungen von Pharmaka in Abhängigkeit von der Zeit), pharmakodynamische (Lehre von den Pharmawirkungen am Wirkort) und toxikologische (Lehre von den schädlichen Eigenschaften chemischer Substanzen) Erkenntnisse als Basis für die klinischen Untersuchungen zugrunde liegen. Dieser Prozess ist ein **interdisziplinärer Ansatz**, der verbunden mit den enormen organisatorischen und finanziellen Anstrengungen heute fast nur noch von großen Pharmafirmen erbracht werden kann. Zum Entwicklungsteam gehören u. a. Wissenschaftler aus den Gebieten der analytischen und präparativen Chemie, der Molekularbiologie und Biochemie, der Pharmazie, der Pharmakologie und Toxikologie, der medizinischen Biometrie und der klinischen Pharmakologie.

Die Aufgaben der Pharmakologie und Toxikologie fallen im Sinne eines wissenschaftlichen Querschnittfachs zu unterschiedlichen Zeiten des Entwicklungsplans an (■ Abb. 2.12).

Nach der Definition einer viel versprechenden neuen chemischen Entität (engl. *New Drug Entity*, NDE) werden zunächst die **Hauptwirkungen** dieser neuen Substanz beschrieben. Falls vorhanden, orientiert man sich hier u. a. an den bereits für die

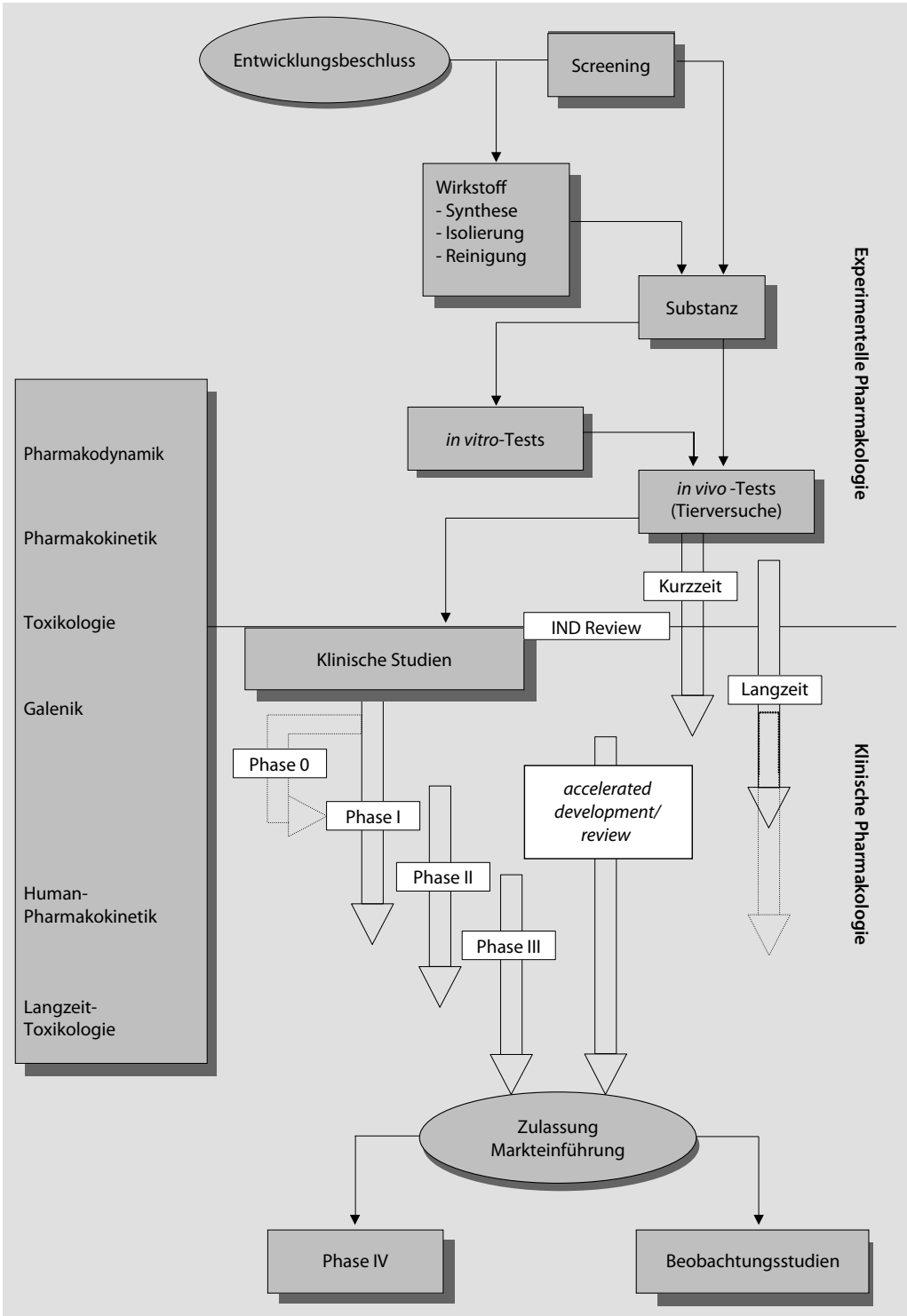
vorgesehene Indikation zur Verfügung stehenden Medikamenten. Im Anschluss an die *in vitro*-Testverfahren, die in Zusammenarbeit mit dem Pharmakologen ausgewählt werden, folgen die ersten *in vivo*-Untersuchungen im Tierversuch. Besonders für die Erstbeurteilung vorbildfreier neuer Wirkstoffe ist die Auswahl geeigneter Tiermodelle eine Herausforderung. Die Bedeutung des Tierversuchs, insbesondere unter Berücksichtigung intelligenter transgener Tiermodelle, wird trotz oder vielleicht gerade wegen der rasanten Erkenntnisse der molekularbiologischen Forschung wieder stärker wahrgenommen.

Nach Absicherung dieser ersten pharmakologischen Daten kann in enger Absprache mit dem Chemiker die Verfeinerung der Strukturplanung erfolgen, um die Eigenschaften des Wirkstoffs zu verbessern und unter Umständen frühzeitig die Patentierbarkeit abzusichern. Es erfolgt eine vertiefte pharmakologische Untersuchung der neuen Substanz, die die genaue Beschreibung des Wirkmechanismus sowie der Haupt- und Nebenwirkungen zum Ziel hat. Parallel werden in Zusammenarbeit mit dem Toxikologen die vorklinischen toxikologischen Untersuchungen geplant. Ebenfalls parallel und sehr früh im Entwicklungsplan erfolgt in Abstimmung mit dem Pharmazeuten die experimentelle Beurteilung der geplanten galenischen Zubereitung des Wirkstoffs (sowie seiner Nebensubstanzen) hinsichtlich Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit. Hierbei ist es von großer Bedeutung, dass die Galenik (Lehre von der Zubereitung und Herstellung von Arzneimitteln) und die Art der Applikation dem späteren therapeutischen Einsatz möglichst nahe kommen, damit der Einfluss der dadurch bedingten Störfaktoren möglichst früh eingeschätzt werden kann.

2.2.1 Vorklinische Arzneimittelpfprüfung – Experimentelle Pharmakologie

Die therapeutische Zielsetzung

Ausgangspunkt für die Planung der pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen ist die Definition der therapeutischen Zielsetzung. Dabei sind neben der molekularen Beschreibung



■ **Abb. 2.12** Übersicht: Stationen der Entwicklung eines Therapeutikums – Die Bedeutung von Pharmakologie, Toxikologie und klinischer Prüfung.

der Zielstruktur auch Überlegungen zu Marktgröße und Entwicklungschancen sowie die Patentstrategie, die Analyse der bereits für diese Indikation zugelassenen Wirkstoffe und eventuelle therapeutische Lücken eines Indikationsgebiets von grundlegender Bedeutung. So muss beim Vergleich mit bereits zugelassenen Wirkstoffen geklärt werden, ob die Erkenntnisse zum Wirkmechanismus sowie zur Wirkstärke und Spezifität der neuen Substanz eine echte Chance auf eine Verbesserung der bisherigen therapeutischen Situation bieten. Unabhängig davon, ob es sich hierbei um neue kausale Therapieansätze oder die Optimierung einer symptomatischen Therapie handelt, muss in jedem Fall der neue Wirkstoff für den Patienten und/oder den behandelnden Arzt nachhaltige Vorteile bieten.

Die rasante Geschwindigkeit, mit der sich heute unser Wissen über die molekularen Grundlagen bisher nicht verstandener Krankheitsprozesse erweitert, ist bei der langen Entwicklungszeit eines neuen Medikaments ein schwer einzuschätzender Risikofaktor. So werden während des Entwicklungsprozesses beinahe mit Sicherheit neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der für die geplante Indikation in Frage kommenden Krankheit gewonnen werden. Die Bedeutung des Wirkmechanismus der neuen Substanz kann dadurch weiter steigen, aber auch generell infrage gestellt werden, was häufig zum Abbruch der Entwicklung führt. Auf der anderen Seite ist die zunehmende Hinwendung der akademischen und klinischen Medizin zu den Prinzipien der sog. *evidence based medicine* (EBM) eine für die Arzneimittelentwicklung sehr zu begrüßende Tendenz. Der Nachweis der Effizienz einer neuen Substanz in klinischen Studien im Sinne der EBM erhält dadurch einen so großen Stellenwert, dass ein Wettbewerbsvorteil auch gegenüber neuen Zielstrukturen mit theoretisch überlegenen Eigenschaften so lange bestehen bleibt, bis diese im Sinne der EBM erwiesen sind.

Der formale Ablauf einer Arzneimittelentwicklung

Die Hauptwirkungen von neuen Substanzen können heute in aller Regel durch geeignete *in vitro*-Testverfahren frühzeitig und schnell beurteilt werden. Mittels z. B. der kombinatorischen Che-

mie unter Zuhilfenahme des *molecular modelling* (falls gute Strukturdaten der Zielstruktur verfügbar sind) gelingt es ebenfalls, in kurzer Zeit neue Substanzen herzustellen, die verbesserte Eigenschaften bzgl. der Wirkstärke, der Spezifität und meist auch der Patentierbarkeit aufweisen. Allerdings soll an dieser Stelle vor einem häufig zu beobachtenden unkritischen Optimismus bzgl. der Beurteilung der Spezifität gewarnt werden. Beispielsweise werden bei der Entwicklung eines neuen Tyrosin-Kinase-Inhibitors zur Ermittlung der Spezifität der Hemmung eine Vielzahl bekannter und verfügbarer Kinasen (ca. 10–100) als Kontrollen verwendet. Bei der geschätzten Zahl von ca. 2.000 verschiedenen Kinasen, die von einer Zelle hergestellt werden können, wird jedoch sofort die eingeschränkte Aussagekraft bzgl. der Spezifität offensichtlich. Hieraus ergibt sich die unvermindert große Bedeutung des Tierversuchs sowie der klinischen Studien zur Beurteilung des gesamten Wirkprofils einer neuen Substanz bzgl. der erwünschten und unerwünschten Wirkungen, der Toxizität und der pharmakokinetischen Daten. Andererseits rechtfertigt sich diese vertiefte und aufwändige pharmakologische Untersuchung nur, wenn die neue Substanz bzgl. Wirkmechanismus, Wirkstärke, Spezifität, Pharmakokinetik und therapeutischer Breite alle Anforderungen des im Rahmen der therapeutischen Zielsetzung definierten Wirkprofils zufriedenstellend erfüllen kann. Parallel zur vertieften pharmakologischen Untersuchung erfolgt dann in mindestens zwei Tierspezies die vorklinische toxikologische Prüfung.

Die pharmakologische Untersuchung ist auch mit der erfolgreichen Erstanwendung am Menschen meistens noch nicht abgeschlossen. Indikationsausweitungen, Markt- und patentorientierte Überlegungen, unerwartete erwünschte und unerwünschte Wirkungen sowie Arzneimittelwechselwirkungen sind häufig der Anlass für erneute experimentelle pharmakologische Untersuchungen.

Die Auswahl geeigneter pharmakologischer Modelle

Unabhängig von der Quelle der zu testenden Substanzen (Zufallsbefund, gezielte Veränderung bekannter Strukturen, zielstrukturbasierte Synthesen, etc.) muss in der sog. **pharmakologischen**

■ Tab. 2.1 *In vitro*- und *in vivo*-Modelle für pharmakologische und toxikologische Untersuchungen

Modell	Vorteile	Nachteile
Mikroorganismen	Einfache Testdurchführung rasches Ergebnis hohe n-Zahl	Nur zum Test auf bestimmte Parameter (z. B. Mutagenität) geeignet
kultivierte Säugerzellen	relativ einfache und rasche Durchführung viele pharmakodynamische Parameter vergleichbar mit Mensch	meist Verwendung stabiler Zelllinien erforderlich nicht alle pharmakologischen Parameter können untersucht werden
isolierte Organe	Untersuchung der intrinsischen Aktivität ohne Beeinflussung durch die Pharmakokinetik Einsparung von Tierversuchen vergleichsweise geringer technischer Aufwand vergleichsweise geringer Substanzbedarf	höherer Aufwand als Zellkultur Optimierung der chemischen Struktur allein auf der Grundlage isolierter Organe nicht möglich
Tiere	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen in gewissem Rahmen gewährleistet	teilweise nicht vernachlässigbare Speziesdifferenzen (Tier/Tier bzw. Tier/Mensch)
Maus/Ratte	gute Beurteilung von Effekten auf endokrine Organe und auf das ZNS sowie (Ratte) auf Gastrointestinaltrakt und renales System	Relativ hoher Aufwand, langer Testverlauf bestimmte geschlechts- und stammspezifische Unterschiede (Ratte)
Hund/Katze etc.	Notwendigkeit u. a. zur Beurteilung bestimmter Kreislauffeffekte	bestimmte Stoffwechselreaktionen zur Entgiftung können fehlen

Erstbeurteilung (*drug screen*) mit möglichst geringem materiellem und v. a. zeitlichem Aufwand die Aktivität und Spezifität vergleichend untersucht werden. Aus diesen Untersuchungen soll ein breites pharmakologisches Wirkprofil erstellt werden, aus dem sich dann gute Vorhersagen über die vermutlichen Haupt- und Nebenwirkungen machen lassen. Hierzu dienen geeignete biologische Tests auf der molekularen, zellulären, Organ- und Tierversuchsebene (s. ■ Tab. 2.1). Obwohl der Aufwand entlang dieser Aufzählung stark zunimmt, benötigt man trotz aller Fortschritte der *in vitro*-Testverfahren weiterhin alle Ebenen zur Erstbeurteilung. Die Bedeutung des Tierversuchs wird auch dadurch unterstrichen, dass v. a. für die Erkrankungen, für die aussagekräftige Tiermodelle zur Verfügung stehen (z. B. Hypertonie und thromboembolische Erkrankungen), wirksame Medikamente entwickelt wurden. Dabei ist es relativ unerheblich, ob die molekularen Grundlagen der Pathogenese der Erkrankungen aufgeklärt sind. Der Umkehrschluss

gilt meist auch, wenn solche Tiermodelle fehlen (z. B. Morbus Alzheimer).

Die Art und Anzahl der initialen Testverfahren hängt zunächst entscheidend von der definierten therapeutischen Zielsetzung ab. So wird ein neues Antibiotikum zuerst auf seine Wirksamkeit gegen verschiedene Mikroorganismen hin untersucht werden, während bei einem neuen Antidiabetikum zunächst die Potenz der Blutzuckersenkung im Vordergrund steht. Schon bei dieser Erstbeurteilung können sich Nebenfunde ergeben, die zu einer völlig anderen therapeutischen Entwicklung der Substanz führen. So wurde z. B. der Wirkstoff Praziquantel zunächst von der Firma Merck als potenzielles Psychopharmakon untersucht und nicht weiter entwickelt. Die Beobachtung, dass Praziquantel eine gute Hemmwirkung auf den Erreger der menschlichen Wurmerkrankung Bilharziose (weltweit leiden v. a. in den Entwicklungsländern ca. 200 Mill. Menschen an Bilharziose) hat, wurde von der Firma Bayer weiter verfolgt und führte zur Zulassung von Praziquantel für diese Indikation.

Die **Auswahl der Testverfahren** soll beispielhaft anhand einer fiktiven neuen Substanz, die als Antagonist an vaskulären α_1 -Adrenozeptoren zur Therapie der arteriellen Hypertonie entwickelt werden soll, dargestellt werden. So würde auf der molekularen Ebene zunächst die Bindungsaffinität der Testsubstanz an heterolog-überexprimierten α_1 -Adrenoceptor-Subtypen auf Zelloberflächen (z. B. von *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Säugerzellen) bestimmt werden. Nach der Ermittlung der Spezifität und Affinität der Rezeptorbindung würde man mittels funktioneller Tests (z. B. Aktivierung von α_1 -Adrenoceptor-spezifischen Signaltransduktionskaskaden) auf der zellulären Ebene untersuchen, ob die Substanz als voller Agonist, partieller Agonist oder Antagonist an α_1 -Adrenozeptoren wirkt. Parallel dazu würde man an Leberzellpräparationen untersuchen, ob die neue Substanz ein Substrat von cytosolischen Cytochrom-P450-Isoenzymen ist und eventuell zu deren Hemmung bzw. Induktion führt. Weitere *in vitro*-Gewebeuntersuchungen, z. B. an isolierten glatten Muskelpräparaten aus den Gefäßen, des Gastrointestinaltrakts oder des Bronchialsystems würden sich anschließen, um die Effektivität im Vergleich zu Referenzsubstanzen zu untersuchen. Bei jedem *in vitro*-Verfahren würde anhand vorher festgelegter Leistungskriterien überprüft, ob weitere Untersuchungen folgen sollen oder die Entwicklung der Substanz eingestellt wird. Tierversuche würden sich anschließen, um die blutdrucksenkende Wirkung und die Verträglichkeit in geeigneten *in vivo*-Krankheitsmodellen zu demonstrieren (z. B. in spontan-hypertensiven Ratten). Man würde z. B. die Effizienz nach oraler und parenteraler Gabe prüfen und die Dauer und Stärke des blutdrucksenkenden Effekts im Vergleich zu Referenzsubstanzen bestimmen. Bei vielversprechenden Ergebnissen würden sich weitere Untersuchungen zur Analyse der zu erwartenden unerwünschten Wirkungen an wichtigen Organsystemen wie z. B. ZNS, Gastrointestinaltrakt, Lunge und endokrinen Organen, anschließen. Diese Untersuchungen könnten dazu führen, dass gezielte chemische Modifikationen an der Substanz durchgeführt werden müssen, um Stoffe mit optimierten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu erhalten. Wenn sich z. B. eine schlechte

orale Resorption oder eine zu kurze Halbwertszeit durch rasche hepatische Metabolisierung, d. h. in der Leber, zeigen, müsste durch gezielte chemische Veränderungen die Bioverfügbarkeit verbessert werden. Für Medikamente, die in der geplanten therapeutischen Situation am Menschen (z. B. in der Therapie der arteriellen Hypertonie) dauerhaft eingenommen werden, müssten Untersuchungen zur Toleranzentwicklung und Langzeitverträglichkeit durchgeführt werden. Das Ergebnis dieses Vorgehens, das u. U. mehrere Male mit modifizierten Substanzen durchlaufen werden muss, wäre die Definition einer sog. **Leitsubstanz** (*lead compound*) für die weitere klinische und toxikologische Prüfung. Diese Leitsubstanz muss zu diesem Zeitpunkt gegenüber Referenzsubstanzen verbesserte Eigenschaften in der vertieften pharmakologischen Untersuchung demonstrieren und auch bzgl. der zu erwartenden unerwünschten Wirkungen die Anforderungen der Sicherheitspharmakologie erfüllt haben.

Zusammenfassend ist es also die **Hauptaufgabe der Pharmakologie**, die im Folgenden näher beschriebenen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Schlüsselparameter (s. ■ Tab. 2.2) verbindlich zu definieren, um die weitere Fortsetzung der toxikologischen und klinischen Prüfung zu rechtfertigen.

Wirkmechanismus und Wirkspezifität

Das heute allgemein akzeptierte Arbeitsmodell ist, dass die therapeutischen und toxischen Wirkungen eines Arzneimittels auf seinen Wechselwirkungen mit speziellen Molekülen im Organismus beruhen. Hierbei unterscheidet man generell die **rezeptorvermittelten von den nicht-rezeptorvermittelten Arzneimittelwirkungen**, wobei Erstere überwiegen. Unter einem Rezeptor, einem Begriff, der vor mehr als 100 Jahren v. a. von Paul Ehrlich und John Langley geprägt wurde, wird dabei ganz allgemein eine Komponente einer Zelle oder eines Organismus verstanden, die mit einer Substanz durch Bindung interagiert und dadurch eine charakteristische Reihenfolge biochemischer Ereignisse auslöst, die für die Effekte des Arzneimittels typisch sind. Streng genommen wird der Begriff Rezeptor eingeschränkt auf zellmembranständige und lösliche Strukturen, die den Informationsaustausch

■ Tab. 2.2 Vorklinische Arzneimittelprüfung – pharmakologische Parameter

Pharmakodynamik	Pharmakokinetik
Rezeptoraffinität Rezeptorspezifität Wirkungsstärke Intrinsische Aktivität Wirkungsmechanismus Wirkungsspezifität Therapeutische Breite Therapeutischer Index Wechselwirkungen	Resorption Verteilungsräume Verteilungsvolumen Plasmahalbwertszeit Plasmaeiweißbindung Speicherung Biotransformation/ Metabolisierung Bioverfügbarkeit First pass-Effekt Clearance Eliminationskinetik

zwischen Zellen vermitteln, verwendet. Unter Arzneimittelrezeptoren werden im weitesten pharmakologischen Sinne Enzyme, Hormon-, Neurotransmitter- und Cytokinrezeptoren, Ionenkanäle, Transporter, Strukturproteine, Lipide und Nucleinsäuren zusammengefasst.

Lange Zeit wurde die **Existenz der Rezeptoren** nur aufgrund der Analyse von pharmakologischen Wirkungen postuliert, ohne dass sie direkt nachgewiesen werden konnten. Man sprach deshalb auch nicht von dem Wirkmechanismus, sondern nur von der Wirkweise eines Arzneimittels. Heute hingegen lassen sich Rezeptoren auf der Gen- und Proteinebene biochemisch und molekularbiologisch charakterisieren und es sollte eigentlich für jedes neue Arzneimittel gefordert werden, dass der Wirkmechanismus eines Medikaments auf der Rezeptorebene aufgeklärt ist, bevor eine weitere Arzneimittelentwicklung beginnen kann. Aus dem modernen Rezeptorkonzept können im Wesentlichen drei wichtige Voraussagen abgeleitet werden:

1. Rezeptoren bestimmen die quantitativen Beziehungen zwischen der Dosis (bzw. der Konzentration) eines Medikaments und seinem pharmakologischen Effekt. Die Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Rezeptor-Liganden-Bindung bestimmen die Konzentration des Liganden, die benötigt wird, damit sich die notwendige Anzahl von Rezeptor-Liganden-Komplexen ausbilden, um einen Effekt auszulösen.
2. Rezeptoren sind verantwortlich für die Selektivität der Arzneimittelwirkung. V. a. Größe, dreidimensionale Struktur und elektrische La-

dung eines Wirkstoffs definieren, ob und mit welcher Avidität, also welcher Gesamtheit aller Affinitäten, er im Kontext der großen Vielfalt verschiedener Bindungsstellen innerhalb einer Zelle, eines Organismus oder eines Patienten an einen bestimmten Rezeptor bindet. Daraus folgt, dass Veränderungen in der chemischen Struktur einer Substanz die Bindungsaffinität eines neuen Wirkstoffs für verschiedene Rezeptorklassen dramatisch verändern können, mit dem Resultat eines veränderten pharmakologischen und toxikologischen Wirkprofils.

3. Rezeptoren vermitteln auch die Wirkung pharmakologischer Antagonisten. Viele Medikamente und endogene Substanzen (z. B. Neurotransmitter und Hormone) wirken am Rezeptor als Agonisten, d. h. sie lösen eine spezifische intrinsische Aktivität aus. Reine pharmakologische Antagonisten hingegen binden an Rezeptoren, ohne diese intrinsische Aktivität hervorzurufen. Der Effekt eines Antagonisten beruht daher ausschließlich auf seiner Fähigkeit, die Bindung endogener oder exogener Agonisten zu verhindern und damit die Aktivierung des spezifischen Rezeptoreffekts zu blockieren. Eine Vielzahl der am häufigsten eingesetzten Medikamente wirken als **pharmakologische Antagonisten**. Sonderfälle sind in diesem Zusammenhang partielle sowie inverse Agonisten. Theoretische Überlegungen der Rezeptor-Pharmakologie gehen davon aus, dass es mindestens zwei Konformationen eines Rezeptors (aktive und inaktive Konformation)

geben muss, um die Wirkung eines partiellen bzw. inversen Agonisten zu erklären.

Von **rezeptorunabhängigen Arzneimittelwirkungen** spricht man in der Pharmakologie, wenn Medikamente mit anderen Molekülen oder Einheiten im Organismus in Wechselwirkung treten. Dazu gehört z. B. die große Gruppe der Antibiotika, die zur Behandlung von Infektionskrankheiten verwendet werden. Im Prinzip wirken diese Stoffe zwar auch auf makromolekulare Bestandteile, allerdings nicht im Wirtsorganismus, sondern auf bakterielle und andere mikrobielle Systeme. Andere Arzneimittel wirken auf relativ kleine Moleküle im Körper über einfache chemische Reaktionen (z. B. Antazida oder Chelatbildner). Ein weiteres Beispiel sind Wirkstoffe, die sich aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit in den Lipidschichten von Zellmembranen anreichern und zu einer unspezifischen Membranstabilisierung führen (z. B. Inhalationsnarkotika).

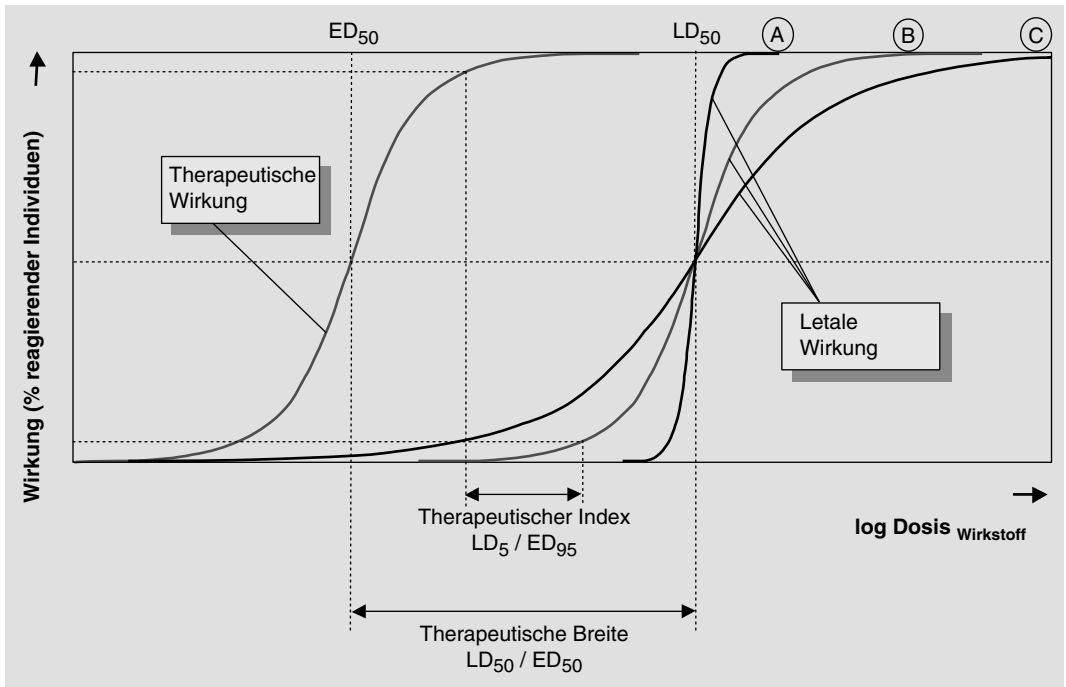
Die klassische Unterscheidung der Arzneimittelwirkungen in rezeptorvermittelt und nicht-rezeptorvermittelt lässt sich bei neueren Medikamenten häufig nicht mehr ohne weiteres anwenden. So lassen sich etwa Virustatika, Ribozyme oder humanisierte Antikörper nur schwer einer der beiden Kategorien zuordnen, da diese Substanzen nach Aufnahme in den Organismus zwar an spezifische Makromoleküle binden, aber dadurch im Gegensatz zum klassischen Modell der rezeptorvermittelten Arzneimittelwirkung keine direkte Wirkung ausgelöst wird.

Generell gilt in den meisten Fällen, dass sich spezifische Wirkstoffe wesentlich leichter entwickeln lassen, wenn rezeptorvermittelte Prozesse der Wirkung zugrunde liegen. Eine Erhöhung der Strukturselektivität von Substanzen an Rezeptoren lässt sich neben der gezielten chemischen Modifikation auch durch Trennung von stereoisomeren Verbindungen, insbesondere von optischen Isomeren (Enantiomeren) erzielen. So wird z. B. Methadon ausschließlich in der Form des (–)-Isomeren Levomethadon eingesetzt, das ca. 58-fach wirksamer als das (+)-Isomere ist. Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität von Arzneimitteln zu erhöhen, ist die Art der Applikation. Dieser Weg wird schon seit langem z. B. in der Asthmatherapie angewandt, bei der β_2 -Sympathomimetika wie z. B. Salbutamol,

aber auch Glucocorticoide wie Budesonid primär als Dosieraerosole zur Inhalation eingesetzt werden. Diese lokale Applikation erlaubt hohe Wirkstoffspiegel an der Zielzelle bei vergleichsweise niedriger systemischer Konzentration mit entsprechend gering ausgeprägten unerwünschten Wirkungen.

Wirkstärke und therapeutische Breite

Der Bestimmung der Wirkstärke einer neuen Substanz im Vergleich zu bekannten Wirkstoffen kommt besondere Bedeutung zu. Letztlich müssen auf der Grundlage dieser Daten (zusammen mit den pharmakokinetischen Kenngrößen) begründete Dosisvorschläge für die Erstanwendung am Menschen formuliert werden. Der deutsche Ausdruck Wirkstärke umfasst zwei verschiedene englische Begriffe: die dosisbezogene Wirkstärke (*potency*) und die effektbezogene Wirkstärke (*efficacy*). Ein Maß für die dosisbezogene Wirkstärke eines Arzneimittels ist die Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt erzielt wird. Diese Dosis wird effektive Dosis 50 % (ED₅₀) oder bei der Verwendung von Konzentrationen unter *in vitro*-Bedingungen effektive Konzentration 50 % (EC₅₀) genannt. Diese Werte sind gut geeignet, um verschiedene Arzneimittel, die mit dem gleichen Rezeptor interagieren, bzgl. ihrer wirksamen Konzentrationen bzw. Dosierungen zu vergleichen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine gröÙere konzentrationsbezogene Wirkstärke noch kein Beweis für eine therapeutische Überlegenheit darstellt. So macht es bei gleichem Maximaleffekt und einer unveränderten therapeutischen Breite keinen Unterschied, ob man von einem Arzneimittel 100 mg oder 1 mg einnehmen muss. Beispielsweise wirken bei gleichem Wirkmechanismus 40 mg des Schleifendiuretikums Furosemid genauso stark wie 1 mg Bumetanid. Falsch ist die daraus oft abgeleitete Behauptung, dass Furosemid 40fach stärker wirksam sei als Bumetanid, denn der einzige Unterschied besteht darin, dass Bumetanid in 40fach geringerer Dosis gleich wirksam ist. Eine geringere Dosis ist jedoch allein kein therapeutischer Vorteil, solange nicht weitere Eigenschaften, wie z. B. ein günstigeres Nebenwirkungsspektrum, eine größere therapeutische Breite oder eine vorteilhafte Pharmakokinetik, hinzukommen.



■ Abb. 2.13 Therapeutische Breite/therapeutischer Index: Fallunterscheidung verschiedener Dosis-Wirkungskurven eines Pharmakons.

Der Begriff des **Maximaleffekts** (effektbezogene Wirkstärke) entspricht dem Ausdruck *intrinsic activity* oder der häufiger gebrauchten englischen Bezeichnung *efficacy*. Ein Arzneimittel hat seinen Maximaleffekt erreicht, wenn seine Wirkung durch weitere Dosiserhöhungen nicht mehr gesteigert werden kann (Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die maximal wirksame Konzentration eines Arzneimittels liegt unter *in vitro*-Bedingungen etwa 100-fach höher als die halbmaximal wirksame Konzentration, wenn sich eine reine bimolekulare Reaktion zwischen Arzneimittel und Rezeptor ohne zusätzliche Einflüsse auf die Wechselwirkung der Rezeptoren untereinander (Kooperativität) abspielt. Unter den praktischen Bedingungen der Arzneytherapie werden jedoch so starke Dosissteigerungen selten möglich sein, so dass der theoretisch mögliche Maximaleffekt *in vivo* nur sehr selten erreicht wird. Trotz dieser Einschränkung ist der Maximaleffekt ein wichtiger Parameter, denn auch *in vivo* erreicht beispielsweise die maximale diuretische Wirkung von Furosemid ein Ausmaß am Patienten, das durch die schwächeren Benzot-

hiazid-Diuretika selbst mit höchsten Dosen nicht erzielbar ist. Unterschiede in der maximalen Wirkstärke von Arzneimitteln für die gleiche Indikation beruhen immer auf den Unterschieden der beteiligten Wirkmechanismen und/oder der beeinflussten funktionellen Systeme. Die vergleichende Bestimmung der relativen Wirksamkeit und der maximalen Wirkstärke zweier Medikamente ist *in vitro* im Falle parallel verlaufender Dosis-Wirkungs-Kurven meist relativ schnell und einfach möglich.

Als Maß für den Sicherheitsabstand zwischen toxischen und therapeutischen Dosen wird für ein Arzneimittel die sog. *therapeutische Breite* angegeben. Hierbei wird aus Tierversuchen der Quotient aus der Letaldosis 50 % (LD₅₀) der Letalitätskurve und der Effektivdosis 50 % (ED₅₀) der Dosis-Wirkungskurve für die erwünschte Hauptwirkung gebildet (■ Abb. 2.13). Ein großer Nachteil dieser Definition ist, dass sie parallel verlaufende Letalitäts- und Effektivitäts-Dosis-Wirkungs-Kurven voraussetzt. Bei unterschiedlicher Steilheit der Kurvenverläufe (s. Kurven A und C in ■ Abb. 2.13) besitzen die Medikamente trotz rechnerisch glei-

cher therapeutischer Breite eine grundlegend unterschiedliche therapeutische Sicherheit. Aus diesem Grund ist der Begriff »therapeutischer Index« (LD₅₀/ED₉₅) eingeführt worden, der den flach verlaufenden Anfangsteil der Letalitätsskurve mit dem Endteil der Effektivitätskurve in Verbindung setzt und damit eine größere Sicherheit gibt als die therapeutische Breite.

Die Beurteilung der therapeutischen Sicherheit allein auf der Basis von am Tier beobachteten akuten Toxizitätswerten ist für eine sichere Anwendung beim Menschen nicht ausreichend. In der Regel wirkt sich nicht die akute Toxizität dosislimitierend aus, sondern typische Nebenwirkungen, die sich erst bei längerer Anwendung an Patienten beobachten lassen. Ein Quotient aus der Dosis, die in der Praxis eine gravierende unerwünschte Wirkung auslöst, und der Dosis für die erwünschte Wirkung bietet einen besseren Anhaltspunkt zur Beurteilung der therapeutischen Sicherheit am Menschen.

Pharmakokinetische Untersuchungen

Eine ähnlich große Bedeutung wie das pharmakodynamische Profil eines Stoffes mit Art und Ort der Wirkung, Wirkstärke und Wirkmechanismus besitzt das **pharmakokinetische Profil**, da ohne Kenntnisse zur Pharmakokinetik einer zu prüfenden Substanz selbst nur die Abschätzung der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Befunde auf die Situation am Menschen wegen der bekannten Speziesdifferenzen nicht möglich ist. Das gewünschte pharmakokinetische Profil wird im Rahmen der therapeutischen Zielsetzung definiert, und der ständige Abgleich der erhobenen experimentellen Befunde mit diesem Wunschprofil ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Arzneimittelprüfung.

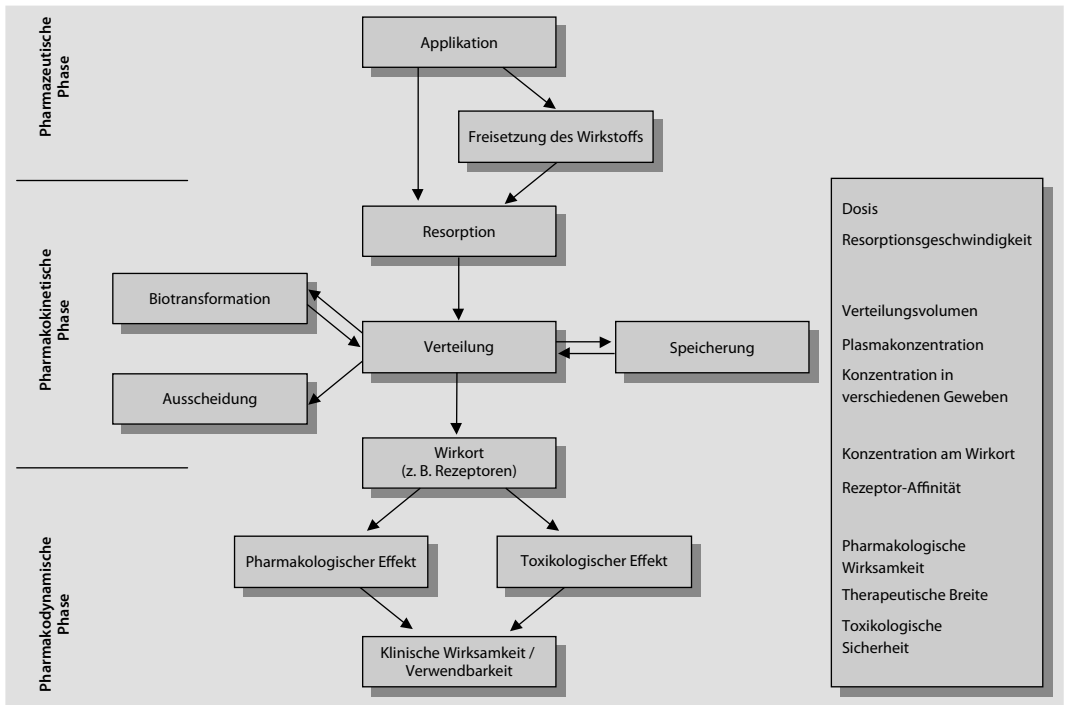
Für die Beurteilung der pharmakokinetischen Parameter eines neuen Wirkstoffs und seiner Metaboliten stehen heute zahlreiche empfindliche und spezifische analytische Verfahren zur Verfügung. Damit werden die verschiedenen Phasen der Pharmakokinetik (Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung; im Englischen ADME = *absorption, distribution, metabolism, excretion*; vgl. ■ Abb. 2.14) quantitativ erfassbar.

Die Stärke eines Wirkstoffs hängt von der Konzentration am Wirkort ab, wobei der Stoff aber nur

in Ausnahmefällen direkt dort appliziert wird und in der Regel vielmehr erst nach der Verteilungsphase an den Ort der gewünschten Wirkung gelangt. Häufig ist am Wirkort eine Messung des Verlaufs der Wirkstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit nicht möglich und in solchen Fällen eine indirekte Beurteilung über pharmakodynamische Messgrößen notwendig. Unterschiede zwischen direkt und indirekt gewonnenen Aussagen zur Pharmakokinetik sind gelegentlich bereits dadurch zu erklären, dass die Nachweisgrenzen für den biologischen Effekt wesentlich enger sind als die der analytischen Bestimmungsmethoden.

Die für die Praxis wichtigsten Parameter zur Beschreibung der pharmakokinetischen Vorgänge sind u. a. Bioverfügbarkeit, Verteilungsvolumen, Clearance und Halbwertszeit (s. ■ Tab. 2.2). Grundsätzlich ist dabei zu berücksichtigen, dass diese Größen nicht nur von den Eigenschaften eines Pharmakons abhängen; so können sie bereits bei Gesunden erheblichen Schwankungen unterworfen sein und durch eine Vielzahl von Faktoren wie z. B. Lebensalter, Krankheiten oder Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka beeinflusst werden.

Unter der **Bioverfügbarkeit** versteht man die Verfügbarkeit eines Wirkstoffs für systemische Wirkungen. Nach dieser Definition ist ein Wirkstoff theoretisch bei intravenöser Gabe zu 100 % bioverfügbar. Zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit bestimmt man daher für eine Substanz im Serum die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve* = AUC) nach oraler und intravenöser Gabe und bildet den Quotienten. Ebenso kann verfahren werden, um die relative Bioverfügbarkeit zweier Arzneimittelzubereitungen zu bestimmen, wenn keine intravenös applizierbare Arzneiform zur Verfügung steht und als Vergleich ein Standardarzneimittel herangezogen wird. Neben der Resorption im Magen-Darm-Trakt hängt die Bioverfügbarkeit stark vom sog. hepatischen **first-pass-Effekt** ab. Bei Pharmaka mit einem ausgeprägten *first-pass*-Effekt, die also bereits bei der ersten Leberpassage in erheblichem Ausmaß aus dem Pfortaderblut extrahiert werden, führen bereits kleine Veränderungen der Extraktion (z. B. bei Lebererkrankungen oder im Alter) zu markanten Änderungen der Bioverfügbarkeit.



■ **Abb. 2.14** Die pharmazeutische, die pharmakokinetische und die pharmakodynamische Phase: Einflussgrößen auf die Wirkung von Pharmaka im Körper.

Nach seiner Definition ist das **Verteilungsvolumen** ein Proportionalitätsfaktor zwischen der im Organismus vorhandenen Menge eines Wirkstoffs und seiner Plasmakonzentration. Bei Kenntnis des Verteilungsvolumens kann man berechnen, welche Dosis eines Pharmakons nötig ist, um eine bestimmte therapeutisch wirksame Plasmakonzentration zu erzielen. Es ist zu berücksichtigen, dass das Verteilungsvolumen nicht nur von der Größe der realen Verteilungsräume eines Wirkstoffs abhängt, sondern auch vom Ausmaß der Bindung eines Pharmakons an Plasmaproteine, Zellen und Gewebe bestimmt wird. Man bezeichnet daher dieses errechnete pharmakologische Verteilungsvolumen auch als scheinbares oder apparentes Verteilungsvolumen, weil ihm oft kein realer Raum entspricht.

Die **Clearance** ist ein Maß für die Fähigkeit des Organismus, ein Pharmakon zu eliminieren, und wird als Kenngröße schon seit langem in der Nierenphysiologie verwendet. Die totale Clearance eines Wirkstoffs ist die Summe aus renaler und extrarenaler Clearance, wobei die extrarenale Clea-

rance alle nicht-renalen Eliminationsvorgänge (z. B. pulmonale, hepatische) umfasst und die metabolische Elimination in der Leber dabei am wichtigsten ist. Die Clearance stellt somit ein Maß für die Eliminationsgeschwindigkeit dar und gestattet es, die Eliminationshalbwertszeit eines Wirkstoffs zu berechnen.

Die **Halbwertszeit** ist der sicherlich populärste pharmakokinetische Parameter, obwohl es immer wieder zu Missverständnissen bei der Interpretation kommt. So hängt die Größe der Halbwertszeit nämlich nicht nur von der Eliminationsleistung des Organismus, sondern auch von der Verteilung des Wirkstoffs ab. Die Halbwertszeit ist also umso länger, je größer das Verteilungsvolumen ist, und umso kürzer, je größer die Clearance ist. Weiterhin ist es wichtig, die Begriffe der Serumhalbwertszeit im eigentlichen Sinn von der biologischen oder Wirkhalbwertszeit sauber zu unterscheiden. Nach der Definition ist die Halbwertszeit diejenige Zeitspanne, in der die Konzentration eines Wirkstoffs um die Hälfte abgenommen hat. Nach etwa 4–5 Halbwertszeiten ist die Elimination eines Wirk-

stoffs weitgehend abgeschlossen. Die Halbwertszeit erlaubt also, die Verweildauer eines Wirkstoffs im Organismus abzuschätzen, sie gestattet aber keine Aussagen zur Wirkdauer.

Probleme der Übertragbarkeit tierexperimenteller Befunde auf den Menschen

■ Speziesdifferenzen

Die Übertragbarkeit pharmakologischer Befunde von einer Tierart auf die andere oder vom Tier auf den Menschen wird durch die genetisch bedingten physiologischen und biochemischen Differenzen zwischen den Spezies limitiert. Der größte Teil der Speziesdifferenzen in Bezug auf Arzneimittelwirkungen ist durch qualitative und quantitative Unterschiede in der Biotransformation bedingt. Betroffen sind hiervon sowohl Phase-I- (oxidative, reduktive und hydrolytische Transformationen) als auch Phase II-Reaktionen (z. B. Konjugation von Metaboliten an körpereigene Substanzen). Ein typisches Beispiel für die Variation von Enzymaktivitäten ist der Abbau von Hexobarbital: Die Maus zeigt eine etwa 16mal höhere Enzymaktivität als z. B. der Hund. Entsprechend verhalten sich die Schlafzeiten nach einer Standarddosis und die biologischen Halbwertszeiten.

Neben der unterschiedlichen Biotransformation gibt es auch Speziesdifferenzen, die durch die Physiologie begründet sind. Der Hund reagiert auf β_2 -Mimetika und andere peripher angreifende blutdrucksenkende Stoffe besonders empfindlich und beantwortet das Absinken des peripheren Blutdrucks mit einer starken reflektorischen Herzfrequenzerhöhung, die zur Ursache für eine an anderen Tierarten nicht nachweisbaren Kardiotoxizität werden kann. Auch die endokrine und immunologische Situation ist bei den verschiedenen Säugern häufig sehr unterschiedlich.

■ **Variabilität bei Tieren des gleichen Stammes**
Gelegentlich werden bei Ratten deutliche Unterschiede der pharmakologischen Wirkung bzw. der Toxizität in Abhängigkeit vom Geschlecht gefunden. Weibliche Ratten schlafen nach der gleichen Hexobarbital-Dosis länger als Männchen. Die Reproduzierbarkeit pharmakologischer

Daten ist auch bei Tieren gleichen Stammes und gleichen Geschlechts häufig nur innerhalb gewisser Alters- und Gewichtsklassen möglich. Da sich der Fütterungszustand der Versuchstiere auf die enterale Resorption von Wirkstoffen und auf die Biotransformation auswirken kann, haben sich heute allgemein bestimmte Standarddiäten als Futter für Versuchstiere durchgesetzt. Ein guter Gesundheitszustand der Versuchstiere ist heute durch die modernen Tierzuchtanlagen gewährleistet. Problematisch ist es allerdings, wenn spezifisch-pathogenfrei (SPF) gezüchtete Tiere in einem völlig offenen System subakuten Toxizitätsversuchen, die mit einer durch die Wirkstoffbelastung bedingten Resistenzminderung einhergehen, unterworfen werden.

■ Abhängigkeit von Umweltfaktoren

Der Einfluss der Umgebungstemperatur ist v. a. bei Versuchstieren mit einer besonders großen relativen Oberfläche (z. B. Mäuse) deutlich ausgeprägt. Da zahlreiche Schritte von der Aufnahme des Wirkstoffs bis hin zum Wirkeintritt temperaturkontrolliert sind (z. B. Bindung an Rezeptoren, Enzymaktivitäten), ist es verständlich, dass die Geschwindigkeit des Eintretens eines Effekts sowie dessen Maximum stark von der Körpertemperatur abhängen können. Ein weiterer Einflussfaktor ist die ebenfalls von der Temperatur beeinflusste relative Luftfeuchtigkeit. Eine zu hohe Luftfeuchtigkeit kann z. B. einen Wärmestau beim Versuchstier auslösen und dadurch dessen Belastbarkeit gegenüber toxischen Dosen eines Wirkstoffes vermindern.

■ Grenzen der Übertragbarkeit

Obwohl sich in den letzten Jahren das Spektrum der pharmakologischen *in vitro*-Testverfahren enorm vergrößert hat, reichen sie bei weitem nicht aus, um ein umfassendes Wirkungsprofil einer neuen Substanz zu erstellen, geschweige denn allein über die Eignung einer Substanz als Arzneimittel zu befinden. Jeder unter *in vitro*-Bedingungen beobachtete Effekt, der nicht wenigstens zum Teil auch nachgewiesen werden kann, muss mit größter Vorsicht interpretiert werden.

Der Einsatz **isolierter Organpräparationen** ist bei der pharmakologischen Erstbeurteilung neuer Wirkstoffe u. a. zur Aufklärung von Wirkungsme-

chanismen auch heute noch unentbehrlich. Andererseits garantiert selbst das *in vivo*-Tierexperiment noch keine Übertragbarkeit der Erkenntnisse. Die Einschränkung der Übertragbarkeit im Tierversuch erhobener Befunde auf die Verhältnisse am Patienten ist v. a. dadurch begründet, dass im pharmakologischen Experiment die experimentell erzeugten Krankheitszustände bestenfalls Ähnlichkeit mit der Symptomatik des Patienten aufweisen und somit kein echtes Krankheitsmodell darstellen.

In dem Bemühen, den Aufwand möglichst klein zu halten, bevorzugt der Pharmakologe in der Regel akute Versuche oder Modelle mit einer relativ kurzen Laufzeit, selbst wenn es beim Menschen darum geht, chronische Krankheitszustände zu bessern. Ein weiterer Fehler wird häufig dadurch begangen, dass aus Gründen der Versuchstechnik keine kurativen Effekte am Tier beurteilt werden.

Weitgehend unbefriedigend ist auch die Situation in der experimentellen Tumorforschung. Die molekularen Grundlagen der Tumorentstehung sind zwischen den verschiedenen Tierspezies und dem Menschen in aller Regel so unterschiedlich, dass durch einfache Tumormodelle nur sehr beschränkte Aussagen möglich sind. Ein Beispiel liefert hier die Entwicklung des humanisierten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), der u.a. bei der Behandlung des fortgeschrittenen Brustkarzinoms eingesetzt wird. Der Antikörper bindet an den v. a. auf Tumorzellen überexprimierten HER-2-Rezeptor und interferiert mit der zellulären Signaltransduktion, wodurch die gesteigerte Proliferation der Tumorzellen verringert wird. Diese spezifische Antikörper-vermittelten Effekte haben sich in Zellkulturen und in *in-vivo* Untersuchungen in immundefizienten SCID-Mäusen nachweisen lassen. SCID-Mäuse werden eingesetzt, da hier aufgrund einer gestörten Immunabwehr xenotransplantierte menschliche Tumorzellen subkutane solide Tumore ausbilden. Bei der Anwendung in Tumorpatientinnen zeigten sich aber zusätzliche immunologisch vermittelte Effekte, sodass man die Untersuchungen zum Wirkmechanismus in immunkompetenten Mäusen wiederholte. Hier wurde nun deutlich, dass der antitumorigene Effekt im Wesentlichen durch Immunzellen im Sinne der Induktion einer Antikörper-abhängigen zellulären Toxizität ausgelöst wurde.

2.2.2 Vorklinische Arzneimittelprüfung – Toxikologie

Ziele und rechtliche Grundlagen

Neben der pharmazeutischen Qualität sind Wirksamkeit und Unbedenklichkeit die Säulen der Arzneimittelzulassung. Zur Beurteilung der Unbedenklichkeit (*safety*) eines Arzneimittels muss das Risiko des Auftretens **unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW)** bestimmt werden, die während oder in zeitlicher Beziehung zu der Arzneimittelaufnahme vorkommen. Der Gesetzgeber schreibt vor, dass die Unbedenklichkeit bereits während der klinischen Entwicklungsphase nachzuweisen ist. Toxikologische Basisdaten aus präklinischen *in vitro*-Untersuchungen und Tierversuchen liefern wichtige Informationen zur Vorhersage von potenziellen UAWs beim Menschen. Ohne diese toxikologischen Basisdaten kann die klinische Prüfung nicht begonnen werden. Nach dem Start der klinischen Entwicklungsphase gewonnene Erkenntnisse können zur Modifikation des weiteren Verlaufs der klinischen Prüfung führen oder sogar zum Abbruch der Entwicklung zwingen bzw. die Versagung der Zulassung herbeiführen.

Das Hauptziel der **toxikologischen Verträglichkeitsprüfung** ist das Erkennen, Beschreiben und Quantifizieren toxischer Effekte, die potenzielle UAWs beim Menschen hervorrufen könnten. Dabei sind einmalige, kurzfristig wiederholte und wiederholte dauerhafte Wirkstoffapplikationen zu berücksichtigen. Aus der kritischen Analyse dieser Ergebnisse wird in Analogie zum pharmakologischen Wirkprofil ein toxikologisches Risikoprofil erstellt, das Voraussagen über die Gefährdung behandelter Patienten und Probanden ermöglicht und zur Risiko/Nutzen-Abwägung bei der Definition von Therapiestrategien beiträgt. Ein weiteres Teilziel der toxikologischen Prüfung stellt die Aufstellung einer Strategie zur Therapie akuter und chronischer Arzneimittelvergiftungen dar. Ebenso wie die Pharmakologie versteht sich die Toxikologie als Querschnittswissenschaft, die über den gesamten Entwicklungsprozess eines neuen Medikaments sowie für die Zeit nach der Zulassung die anderen Disziplinen beratend unterstützt. Werden z. B. erst nach langjähriger Anwendung am Menschen un-

erwartete toxische Effekte aufgedeckt, beteiligt sich die Toxikologie erneut an der Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen. Die große Erfahrung des Toxikologen mit verschiedenen Tierspezies erlaubt ihm dabei die Wahl methodischer Zugänge, die dem klinischen Untersucher aus praktischen und ethischen Überlegungen versagt sind.

Bis 1977 wurden in Deutschland neue Arzneimittel lediglich bei der zuständigen Bundesbehörde registriert, und eine systematische Überprüfung fand nur im Hinblick auf die pharmazeutische Qualität, die dem Arzneibuch zu entsprechen hatte, statt. Ausgelöst v. a. durch die Thalidomid-Katastrophe (Contergan) wurde nach langem Anlauf ein neues **Arzneimittelgesetz (AMG)** verabschiedet, das seit dem 1.1.1978 in Kraft ist und mit seinen Novellierungen und Ergänzungen u. a. die nationale Zulassung von Medikamenten regelt sowie die europäische pharmazeutische Gesetzgebung in deutsches Recht umsetzt. Erst nachdem die zuständige Zulassungsbehörde (damals das Bundesgesundheitsamt (BGA), heute das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) sowie das Paul-Ehrlich-Institut (PEI)) nach genau definierten Kriterien zu einer positiven Beurteilung der Wirksamkeit und Verträglichkeit kommt, darf ein neues Arzneimittel in den Handel gebracht werden. In Analogie zum AMG wird die Zulassung von Medizinprodukten (z. B. Prothesen, Katheter, Herzschrittmacher, etc.) durch das Medizinproduktegesetz (MPG) geregelt. In der 4. MPG-Novelle, die am 21.03.2010 in Kraft trat, wurden die Anforderungen zur Zulassung von Medizinprodukten zum Teil deutlich verschärft. So müssen nun zur Zulassung zwangsläufig klinische Daten zur Effizienz und Sicherheit vorgelegt werden, die nur durch ähnlich aufwändige klinische Studien wie bereits für Arzneimittel gewonnen werden können. Diese Verschärfungen werden naturgemäß nicht nur positiv aufgenommen und könnten evtl. zur Verlangsamung bei der Einführung innovativer Medizinprodukte führen. Auf der anderen Seite gab es in den letzten Jahrzehnten so viele Unzulänglichkeiten und Rückrufe nach der Einführung neuer Medizinprodukte (z. B. bei Hüftprothesen), dass ein Eingreifen der Behörden in Europa (Richtlinie 2007/47/EG) und in Deutschland dringend geboten war.

Im AMG ist auch geregelt, was zu den natürlichen bzw. pflanzlichen Arzneimitteln gerechnet wird. Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel, Heilkräutertees und sogenannte Rezepturarzneimittel (z. B. chinesische, ayurvedische und homöopathische Mittel) gehören z. B. nicht dazu. Da es im Gegensatz zu Deutschland europaweit kaum Richtlinien für die Zulassung pflanzlicher Arzneimittel gibt, wurde 2004 die THMPD (Traditional Herbal Medical Product Directive; 2004/24/EG)-Richtlinie verabschiedet, die v. a. die EU-Verhältnisse beim Handel mit traditionellen pflanzlichen Arzneimitteln harmonisieren soll. Die Umsetzung dieser Richtlinie im April 2011 führte in Deutschland zu großen Verunsicherungen bei einem Teil der Verbraucher, die Einschränkungen beim Handel befürchteten. Dass diese Befürchtungen nicht zutreffen und es zu keinen Einschränkungen kommen wird, wurde inzwischen durch verschiedene offizielle Stellen glaubhaft versichert, z. B. durch die Arzneimittelkommission der deutschen Heilpraktiker.

Der zunehmenden Globalisierung des Arzneimittelmarkts wurde v. a. im Rahmen der *International Conference on Harmonisation* (ICH) Rechnung getragen. Es ist heute immer das Ziel, eine Arzneimittelentwicklung von Beginn an so zu planen, dass sie allen Anforderungen der nationalen Zulassungsbehörden genügt. Die internationalen Leitlinien für *Good Clinical Practice* (GCP) und ICH-GCP kommen diesem Ziel schon recht nahe und die dort sehr detailliert festgelegten Anforderungen, nach denen Arzneimittelstudien durchzuführen sind, gehen in einigen Teilen über die Anforderungen des deutschen AMG hinaus. Durch striktes, ohne große Interpretationsschwierigkeiten mögliches Befolgen der ICH-GCP Richtlinien werden somit die nationalen Vorschriften mit abgedeckt.

Der gesetzlich geforderte Nachweis der Unbedenklichkeit wird im Wesentlichen durch toxikologische Untersuchungen erbracht, wobei die Gesetze nur einen groben Rahmen mit der Beschreibung von Zielvorgaben ausführen. Formal bedient sich das AMG bei Neuzulassungen des wissenschaftlichen Gutachtens zur Ausweisung der Unbedenklichkeit. Es ist darin u. a. die gesamte Versuchsplanung exakt zu dokumentieren, nach welchen Kri-

■ Tab. 2.3 Vorklinische Arzneimittelprüfung – toxikologische Parameter

Testparameter	Definition, Beschreibung und Zielsetzung	Art und Umfang
akute Toxizität	Dosis, die für 50 % der Versuchstiere letal ist. Ermittlung der maximal tolerierbaren Dosis und Vergleich mit der therapeutischen Dosis	Tierversuch, ca. 2 Spezies
subakute Toxizität	Identifizierung von toxikologisch relevanten Zielorganen, d. h. Nachweis, welche Organe anfällig sind für evtl. toxikologische Wirkungen. Parameter und Methoden: Physiologische Veränderungen, makroskopische sowie licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, hämatologische Studien, Beobachtung anderer klinischer Parameter	Tierversuch, ca. 2 Spezies
chronische Toxizität	Zeitdauer abhängig von der erwarteten Dauer der klinischen Anwendung. Erforderlich, wenn das Therapeutikum über einen längeren Zeitraum verwendet werden soll. Zeitraum ca. 1–2 Jahre, meist parallel zu klinischen Studien. Parameter und Methoden: s. subakute Toxizität	wie subakute Toxizität
Mutagenität	Untersuchung von Gen- und Chromosomenmutationen/ Effekt auf genetische Stabilität in pro- und eukaryotischen Zellen. Methoden u. a. Ames-, HG-PRT- und Mikronukleus-Test, DNA-Reparaturtest, Schwesterchromatidenaustausch	Bakterien- und Säugerzellen, <i>in vitro</i> -Methoden (z. B. DNA-Adduktbildung), Tierversuch
Karzinogenität	Untersuchung des karzinogenen Potenzials v. a. erforderlich, wenn das Therapeutikum über einen längeren Zeitraum verwendet werden soll. Zeitraum ca. 2 Jahre. Analyse über Hämatologie, Autopsie und Histologie.	Tierversuch, ca. 2 Spezies
Teratogenität/Effekte auf Fruchtbarkeit	Untersuchung von Paarungs- und Reproduktionsaktivität, Gebärfähigkeit, Stillen sowie Frucht- und Embryonaldefekten	Tierversuch
Sicherheits-Pharmakologie	Untersuchung von möglichen unerwünschten pharmakodynamischen Effekten auf zentrale vitale Funktionen wie Zentrales Nervensystem, Herz-Kreislauf-System und Lunge	Zellkultur, Tierversuch
Immunotoxizität	Untersuchung des immunotoxischen Potentials im Hinblick auf unerwünschte Immunsuppression oder Aktivierung des Immunsystems	Tierversuch
toxikologische Forschung	Untersuchung des Mechanismus/Bestimmung der Ziel-moleküle eines beobachteten toxischen Effekts. Entwicklung neuer Methoden zur toxikologischen Evaluierung	<i>In vitro</i> -Tests, Zellkultur

terien z. B. bestimmte Versuche durchgeführt oder bewertet worden sind sowie welche Überlegungen etwa zur Auswahl einer Tierspezies geführt haben. Die toxikologischen Ergebnisse sind v. a. im Hinblick auf den vorgesehenen therapeutischen Einsatz, die Dosierung sowie die Häufigkeit und Dauer der Anwendung zu bewerten.

Grundschema des toxikologischen Prüfablaufes

Je nach den spezifischen Fragestellungen der jeweiligen Arzneimittelentwicklung unterscheidet man einzelne Stufen bzw. Testparameter der Toxizitätsprüfung, die in einem gewissen regelhaften, aber immer flexibel angepassten, zeitlichen Ablauf angeordnet sind (■ Tab. 2.3). Die akute Toxizitätsprü-

fung stellt in jedem Fall die Eingangsstufe dar, da daraus toxikologische Grundmuster sowie Dosierungen für die nachfolgenden und zeitaufwändigen Untersuchungen hergeleitet werden können. In zunehmendem Maße werden pharmakokinetische Untersuchungen frühzeitig eingesetzt, um Vorausagen z. B. über die Wirkstoffakkumulation bei chronischer Einnahme machen zu können. Bei der Planung des Versuchsablaufes ist generell zu beachten, dass das jeweilige Minimum an Erfordernissen für die Stufen der klinischen Arzneimittelentwicklung am Menschen zeitlich so erbracht wird, dass sich dadurch keine Verzögerungen der gesamten Entwicklungsstrategie ergeben.

Es gibt eine Vielzahl allgemeiner **Einfluss- bzw. Störgrößen**, die bei den Prüfplänen berücksichtigt werden müssen. Die Dosis, Applikationsart und galenische Zubereitung (Wirkstoff und Hilfsstoffe) der Prüfsubstanz sollten wann immer möglich die spätere geplante Therapiesituation imitieren. Die Gefahr einer zu großen interindividuellen Streuung kann durch den Einsatz von genetisch homogenen Inzuchtstämmen oder transgenen Tieren minimiert werden, wobei dieser reduktionistische Ansatz natürlich nicht das große Maß an genetischer Variabilität in menschlichen Kollektiven berücksichtigt. Die Auswahl der Haltungsbedingungen, der Ernährung sowie des Alters und Geschlechts der Tiere müssen hingegen immer individuell angepasst werden, wobei wenn möglich fest definierte Standardprotokolle (*Standard Operating Procedures*, SOP's) verwendet werden sollten.

Akute Toxizitätsprüfung

Die Ermittlung toxischer (einschließlich tödlicher) Effekte bei einmaliger Zufuhr des Wirkstoffs schließt die Feststellung der Zielzellen bzw. -organe, der Todesursache und der Dosisbereiche für das Auftreten der Schäden ein. Ziel der **akuten Toxizitätsprüfung** ist u. a. die Bestimmung der mittleren Dosis, die für 50 % der Versuchstiere letal ist (LD₅₀). Hierbei gilt, dass die LD₅₀ umso präziser bestimmt werden kann, je größer die Versuchsgruppe, je feiner abgestuft die eingesetzten Dosierungen und je steiler die Letalitäts-Dosis-Wirkungs-Kurve ist. Eine große Präzision täuscht allerdings darüber hinweg, dass die Reproduzierbarkeit in aller Regel trotz großer Tierzahlen nicht befriedigend ist. Zum

anderen sagt der LD₅₀-Wert selbst für den Fall der akuten, bedrohlichen Arzneimittelvergiftung nur sehr wenig über gesundheitliche Risiken aus. Einen größeren Stellenwert für die Risikobewertung haben daher u. a. die Möglichkeiten der Vergiftungsbehandlung, die Art der Zell- und Organschäden sowie das Auftreten von Spät- und Dauerschäden.

Mittlerweile sind zahlreiche Alternativkonzepte etabliert und von den regulatorischen Behörden anerkannt worden, um die für die LD₅₀-Bestimmungen hohen Tierzahlen (ca. 40-50 pro Substanz) deutlich einzuschränken. Methoden wie der *Acute Toxic Class-Test* (ATC) und die *Fixed Dose Procedure* (FDP) sehen keine absolute Bestimmung der LD₅₀ mehr vor, sondern nur noch eine Eingrenzung und möglichst genaue Abschätzung des Bereichs, in dem die LD₅₀ und die minimale tödliche Dosis liegen. Die Tierzahlen können dabei auf bis zu 10 Tiere reduziert werden. An diesen Tieren sollen zusätzlich toxische Organ- und Funktionsveränderungen untersucht werden, so dass eine Risikobeurteilung akuter Vergiftungen möglich wird.

Obwohl in der akuten Toxizitätsprüfung in der Regel eine Beobachtungszeit von lediglich 14 Tagen vorgeschrieben ist, ist es ratsam, zumindest einen Teil der überlebenden Tiere über längere Zeiträume (z. B. sechs Monate) zu beobachten und anschließend gründlich auf Spät- und Dauerschäden zu untersuchen.

Chronische Toxizitätsprüfung

Darunter wird die Prüfung toxischer Wirkungen bei wiederholter Applikation eines Wirkstoffs in verschiedenen Dosierungen über einen längeren Zeitraum (Tage bis Monate) verstanden. Die Dauer der Prüfung hängt dabei ganz wesentlich von den im Entwicklungsplan festgelegten klinischen Untersuchungen der Phasen I–III beim Menschen ab. Soll etwa der zu prüfende Wirkstoff nur für kurze Zeiträume (wenige Tage) beim Patienten eingesetzt werden (z. B. Diagnostika oder Medikamente der Notfall- bzw. Intensivmedizin), kann auch die Toxizitätsprüfung beim Versuchstier entsprechend kurz sein. Im Allgemeinen gilt, dass sie in etwa doppelt so lang sein sollte wie die Dauer der geplanten klinischen Prüfung.

Da schwerwiegende toxische Wirkungen häufig nicht von der applizierten Substanz selbst, sondern

von **reaktionsfähigeren Stoffwechselmetaboliten** erzeugt werden, sollte bei der Wahl der Tierarten berücksichtigt werden, dass sich die wesentlichen pharmakokinetischen Daten (insbesondere zum Metabolismus) möglichst wenig vom Menschen unterscheiden. Wegen des günstigen Preises und der umfangreichen Vorerfahrungen werden überwiegend Mäuse oder Ratten eingesetzt, was aber nicht immer der oben beschriebenen Idealsituation Rechnung trägt. Zusätzlich wird von den meisten Zulassungsorganen eine weitere Nicht-Nagetierart vorgeschrieben. Die Applikationsart und -häufigkeit sollte den therapeutischen Einsatz beim Menschen möglichst gut imitieren, wobei sich die häufigste Zufuhrart beim Menschen, die mehrmals tägliche orale Aufnahme in Form von z. B. Tabletten, bei kleinen Nagetieren nicht nachahmen lässt. Eine dem am nächsten kommende Sondierung des Magens kann wiederum bestenfalls einmal täglich durchgeführt werden und setzt die Tiere enormem Stress aus, während die Zufuhr mit dem Trinkwasser oder der Nahrung zwar einfach und stressfrei ist, aber ein sehr flaches und konstantes Wirkprofil erzeugt, das die Therapiesituation am Menschen nur sehr unvollkommen repräsentiert (mit der Ausnahme von Tabletten mit stark retardierter Wirkstofffreisetzung). Probleme ergeben sich somit v. a. dann, wenn die toxischen Wirkungen der Testsubstanz stärker von Spitzenkonzentrationen als von der Gesamtdosis abhängen.

Die Anzahl der Versuchsgruppen und der Dosierungen sollte so erfolgen, dass

- Todesfälle vermieden werden,
- im hohen Dosisbereich eindeutige toxische Wirkungen eintreten und
- eine niedrige Grenzdosis ermittelt werden kann, bei der keine bzw. nur sehr geringe Effekte zu beobachten sind.

Aus diesen Erwägungen werden mindestens drei Dosierungen sowie eine Negativ-Kontrolle für jedes Geschlecht ausgewählt (insgesamt acht Gruppen). Die minimale Gruppengröße sollte in den initialen Studien mindestens 10–20 Nagetiere und/oder 3–6 Nicht-Nagetiere pro Gruppe betragen, wobei die genaue Zahl individuell festgelegt werden muss. So ist es evtl. notwendig, die Tierzahl pro Gruppe zu vergrößern, wenn statistische Er-

wägungen dies verlangen oder wenn geplant ist, Tiere zu bestimmten Zeitintervallen vorzeitig aus dem Versuch zu entfernen und zu töten, um z. B. eine zeitliche Entwicklung toxischer Schäden zu dokumentieren.

Auch die Anzahl und Art der zu untersuchenden Parameter muss je nach Anforderungen individuell festgelegt werden. Einige der sehr generellen und im Allgemeinen üblichen Untersuchungen sind die wöchentliche Bestimmung des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme sowie die Analyse der wichtigsten hämatologischen und chemischen Blutlaborwerte. Nach Ende des Versuchs folgt eine komplette makroskopische und histologische Aufarbeitung der Organe. Bei Nagetieren kann man dies zunächst auf die Tiere der höchsten Dosisgruppe und der Negativ-Kontrolle beschränken. Um mögliche toxische Effekte mit realen Konzentrationen im Organismus oder Zielorgan korrelieren zu können, ist die Bestimmung der Serumwerte des Wirkstoffs zu verschiedenen Zeiten notwendig. Diese toxikokinetischen Untersuchungen, deren Durchführung z. B. in ICH-Richtlinien genau spezifiziert sind, stellen heute häufig die wichtigsten Parameter dar, um Aussagen über die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen im Sinne eines sog. *educated guess* machen zu können.

Reproduktionstoxizität

Der Schwerpunkt dieser Prüfungen, die nach der Thalidomid-Katastrophe zwingend vorgeschrieben wurden, liegt auf der Analyse der Teratogenität (Erzeugung von Missbildungen) und umfasst Untersuchungen zur Reifung und Funktion von Keimzellen, der Fertilität sowie zur Embryotoxizität und peri- und postnatalen Toxizität.

In der Durchführung unterscheidet man im Allgemeinen drei Phasen. In der **Phase A** nach ICH-Kriterien (früher Segment I) werden zumeist an Ratten und Kaninchen die Fertilität und die frühen Phasen der Embryoentwicklung bis kurz nach der Implantation untersucht. Die Arzneimittelgabe beginnt bei Männchen und Weibchen typischerweise ca. zwei Wochen vor der Kreuzung und endet bei den Weibchen sechs Tage nach der Befruchtung. In der **Phase B** (Segment II) werden in den gleichen Spezies die eigentlichen teratolo-

gischen Untersuchungen, im Sinne von Störungen der Organentwicklung, durchgeführt. Die **Phase C** (Segment III) untersucht Arzneimittelwirkungen während der Spät-Schwangerschaft, der Geburt und der Stillphase sowie Verhaltens- und neurologische Entwicklungsauffälligkeiten der Jungtiere. Freilich sind die hier nicht im Einzelnen erläuterten Probleme der eingeschränkten Vorhersagekraft dieser Untersuchungen bereits offensichtlich, wenn man sich nur die großen biologischen Unterschiede der Plazentation (z. B. Uterus bicornis mit mehr als 20 Feten) und der Organogenese (Tragezeit bei Ratten 22 Tage) zwischen Nagern und Menschen vor Augen führt.

Mutagenitätsprüfung

Der anfängliche, etwas naive Glaube, dass die Untersuchung der Mutagenität von Arzneimitteln, d. h. ihres Potenzials zur Schädigung genetischen Materials, die zeitaufwändigere Karzinogenitätsprüfung überflüssig machen würden, hat sich bisher nicht bestätigt. Die Mutagenitätsprüfung liefert jedoch trotz ihres vergleichsweise geringen Aufwands frühe Hinweise, ob sich Verdachtsmomente auf die Auslösung mutagener und/oder karzinogener Effekte für einen Wirkstoff ergeben. Die Zahl der Mutagenitätstests ist sehr groß und steigt ständig weiter. Während diese v. a. auf den enormen Fortschritten der Molekularbiologie und Genetik beruhende Tendenz wissenschaftlich zu begrüßen ist, erweist sie sich gleichzeitig für die statistische Verlässlichkeit der Tests bzgl. ihres prädiktiven Werts (Validierung) als eher hinderlich. Ausgewählte Testverfahren müssen deshalb einen guten Kompromiss zwischen der Berücksichtigung moderner wissenschaftlicher Erkenntnisse, der breiten Erfassung verschiedener Mutations-typen, der Praktikabilität und der Verlässlichkeit der Risikobeurteilung bieten. Positive Ergebnisse in einer Mutagenitätsuntersuchung bedeuten dabei nicht automatisch, dass ein entsprechendes Risiko für den Menschen existiert. So können mechanistische Untersuchungen z. B. ergeben, dass bestimmte Wirkungen in menschlichen Zellen gar nicht oder nur in einem beim Menschen nicht zu erwartenden Konzentrationsbereich auftreten können. Die Bewertung der Testergebnisse muss unter qualitativen und quantitativen Gesichts-

punkten erfolgen, wobei bzgl. der Vorhersage der karzinogenen Wirkung falsch-positive Ergebnisse insbesondere für den Arzneimittelentwickler und falsch-negative Resultate v. a. für die Zulassungsbehörde problematisch sind. Für einzelne quantitative Testergebnisse gilt generell, dass sie nicht unmittelbar zur rechnerischen Risikoabschätzung verwendet werden dürfen. Tatsächlich sind heute viele Medikamente im klinischen Einsatz, von denen zwar bekannt ist, dass sie unter bestimmten Bedingungen genetisches Material schädigen können (z. B. Chromosomenbrüche durch Aspirin), die aber dennoch als unbedenklich eingestuft wurden.

Karzinogenitätsprüfung

In Karzinogenitätsprüfungen wird üblicherweise in Nagetieren untersucht, ob die chronische Einnahme eines Wirkstoffs über lange Zeiträume (je nach Lebenserwartung z. B. 24 Monate bei Mäusen) Tumoren erzeugen (Tumorinitiation) bzw. das Tumorstadium beschleunigen kann (Tumorpromotion). Obwohl der wissenschaftliche Wert dieser Untersuchungen unter Berücksichtigung der Erkenntnisse der modernen Tumorbilogie anzuzweifeln ist, sind diese Studien bei allen Medikamenten, die für einen längeren, d. h. sechs Monate überschreitenden Einsatz am Menschen vorgesehen sind, weiterhin zwingend vorgeschrieben. Weiterhin müssen diese Untersuchungen durchgeführt werden, wenn sich verdächtige Befunde in den o.g. Voruntersuchungen zur Mutagenität ergeben haben, prä-neoplastische Gewebeveränderungen in Tierversuchen aufgetreten sind, oder wenn der Wirkstoff mechanistische oder strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten karzinogenen Substanzen aufweist. Bezüglich der Dosiswahl empfehlen ICH-Richtlinien eine Höchstdosis, die geeignet ist, eine 25fach höhere Plasma-AUC in Mäusen verglichen mit der AUC in Menschen zu erzeugen. Obwohl sich die Prüfprotokolle in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich geändert haben, werden heute doch zunehmend **transgene Tiermodelle** sowie Untersuchungen mit einer kürzeren Dauer zugelassen. Die Auswahl von besser geeigneten *in vitro*-Modellen sowie von transgenen Tiermodellen (z. B. p53-Modell für genotoxische Wirkstoffe) sollten zusammen mit metabolischen und pharmakokine-

tischen Daten aus den toxikokinetischen Untersuchungen, die eine dem Menschen besser angepasste Dosiswahl ermöglichen, die Vorhersagekraft dieser Studien in Zukunft verbessern.

Sicherheitspharmakologie (*safety pharmacology*)

Trotz aller Bemühungen durch die oben erwähnten präklinischen Untersuchungen bleibt immer ein Restrisiko vor der ersten Anwendung am Menschen bestehen. Man muss dabei bedenken, dass in der Regel Probanden für die Erstanwendung ausgewählt werden, die keinen direkten medizinischen Nutzen durch die Teilnahme an der Studie haben, sodass Sicherheitsaspekte hier absoluten Vorrang vor allen anderen Überlegungen haben müssen. Die Zulassungsbehörden haben deshalb Richtlinien, die die Standards der Sicherheitspharmakologie definieren, entwickelt. Die ersten Richtlinien von 1997 (ICH M3 und ICH S6 für biotechnologische Produkte) wurden 2001 durch die ICH S7a erweitert. In dieser Richtlinie wird der Minimalstandard der notwendigen präklinischen Untersuchungen vor der Erstanwendung im Menschen festgelegt. Selbstverständlich sind diese Untersuchungen im Kontext der übrigen präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zu sehen und sollten, um unnötige Redundanzen zu vermeiden, von vorne herein im Gesamtentwicklungsplan einer Substanz eingeplant werden. Die ICH S7a definiert eine Hierarchie der zu testenden Organsysteme, in der zuerst festgelegte Untersuchungen an den Vitalorganen (Zentrales Nervensystem, Herz-Kreislauf-System und Lunge) in der sog. *core battery* vorgeschrieben werden. Abhängig von der individuellen Testsubstanz werden dann Folgeuntersuchungen beschrieben, die sich an die *core battery* anschließen können (u.a. weitere Tests der Vitalorgane, der Niere, des Gastrointestinaltrakts, des Immunsystems und endokriner Organe).

Selbstverständlich werden nach der Anwendung im Menschen immer wieder neue unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) auftreten, die eine ständige Überprüfung und Anpassung der Sicherheitsrichtlinien erforderlich machen.

So fiel z. B. gehäuft auf, dass verschiedene Arzneimittelklassen (z. B. Antipsychotika, Antihistaminika und Fluorochinolone) Störungen der Repolarisa-

tionsdauer im menschlichen Herz verursachten (sog. QT-Zeit Verlängerungen im Elektrokardiogramm), die zu lebensbedrohlichen tachykarden Herzrhythmusstörungen (*torsades de pointes*) führen können. Diese gehäuften Vorfälle veranlassten die Behörden, in der ICH S7b-Richtlinie von 2005 die notwendigen präklinischen Untersuchungen zur Risikobeurteilung bezüglich des Auftretens dieser Repolarisationsstörungen festzulegen. Dies sind u.a. elektrophysiologische *in vitro*-Untersuchungen an heterolog exprimierten K⁺-Kanälen (z. B. hERG) in Zelllinien oder an nativ präparierten Kardiomyocyten. Diese *in vitro*-Untersuchungen müssen dann durch entsprechende *in vivo*-Untersuchungen in geeigneten Tiermodellen (Nager sind hier nicht geeignet) ergänzt werden.

Welche Auswirkungen eine solch spezifische und zwingende Richtlinie auf die technologische Entwicklung hat, lässt sich u.a. daran erkennen, dass seitdem versucht wird, die zeit- und kostenintensiven elektrophysiologischen Untersuchungen zu automatisieren, was aber bislang nur eingeschränkt möglich ist.

Die letzte Veränderung der ICH-Richtlinien zur Sicherheitspharmakologie wurde 2007 nach dem schweren Zwischenfall in der TeGenero TGN1412 Phase I-Studie implementiert. In dieser Studie wurde 2006 ein agonistischer Antikörper gegen CD28, der zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose und der rheumatoiden Arthritis sowie bestimmter Leukämien entwickelt worden war, erstmalig am Menschen getestet. Hierbei war es, trotz aller Sicherheitsvorkehrungen, bei sechs Probanden gleichzeitig zu einer massiven und lebensbedrohlichen Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Immunzellen gekommen. Dieser nicht vorhersehbare Zwischenfall hat erneut gezeigt, dass die Erstanwendung immer ein inhärentes Restrisiko innehaben wird.

In der neuen Richtlinie wurden im Wesentlichen die bisherigen Standards der Sicherheitspharmakologie überarbeitet und präzisiert. Ein besonderes Augenmerk muss nun auf die Beurteilung des primären und sekundären pharmakodynamischen Risikos gelegt werden. Dies gilt v. a. für neue Wirkstoffe, deren molekularer Wirkmechanismus ubiquitär in (fast) allen Körperzellen vorhanden ist und durch den eine Vielfalt physiologischer Funktionen ausgelöst bzw. moduliert werden kann.

Als weitere Konsequenz aus der TGN1412-Studie muss noch sorgfältiger als bisher die Festlegung der initialen Startdosis und der vorgesehenen Dosissteigerungen erfolgen. Weiterhin soll die Erstanwendung routinemäßig an einzelnen Probanden/Patienten erfolgen und nicht wie in der TGN1412 Studie gleichzeitig an einer Kohorte. Es wird noch einmal betont, dass an jedem Punkt der Studien hohe Qualitätsanforderungen an die Infrastruktur und das durchführende Personal gestellt werden müssen.

Immunotoxizität

Die Immunotoxizität umfasst zum einen das unerwünschte Potenzial einer Substanz, das Immunsystem zu unterdrücken, zum anderen, es zu aktivieren. Hypersensitivität, das allergische Potenzial sowie die Gefahr, Autoimmunerkrankungen auszulösen, fallen strenggenommen nicht unter den Begriff der Immunotoxizität nach ICH-Richtlinien, dürfen jedoch bei den präklinischen Untersuchungen nicht vernachlässigt werden. Um immunotoxischen Effekten auf die Spur zu kommen, wird nach Blutbildveränderungen, der Anfälligkeit und dem Auftreten von Infektionen, Tumorbildung sowie nach Veränderungen der Organe des Immunsystems wie Milz, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark im Tiermodell gesucht.

Spezielle Untersuchung und formale Aspekte

Es ist nicht selten, dass sich während der nicht-klinischen Entwicklungsphase Hinweise auf ungewöhnliche toxische Effekte ergeben, deren zugrunde liegender Mechanismus dann vertieft untersucht werden muss. Ein Beispiel sind unspezifische neurologische Auffälligkeiten (z. B. Tremor oder Krampfanfälle), die ausgedehnte Studien der neurotoxischen Wirkung auf das periphere und zentrale Nervensystem erfordern. Zum einen können sich dabei Hinweise auf neue, potenziell interessante Wirkmechanismen ergeben, und zum anderen kann sich zeigen, dass ein Arzneimittel-Metabolit, der nur beim Tier und nicht beim Menschen gebildet wird, für bestimmte Effekte verantwortlich ist.

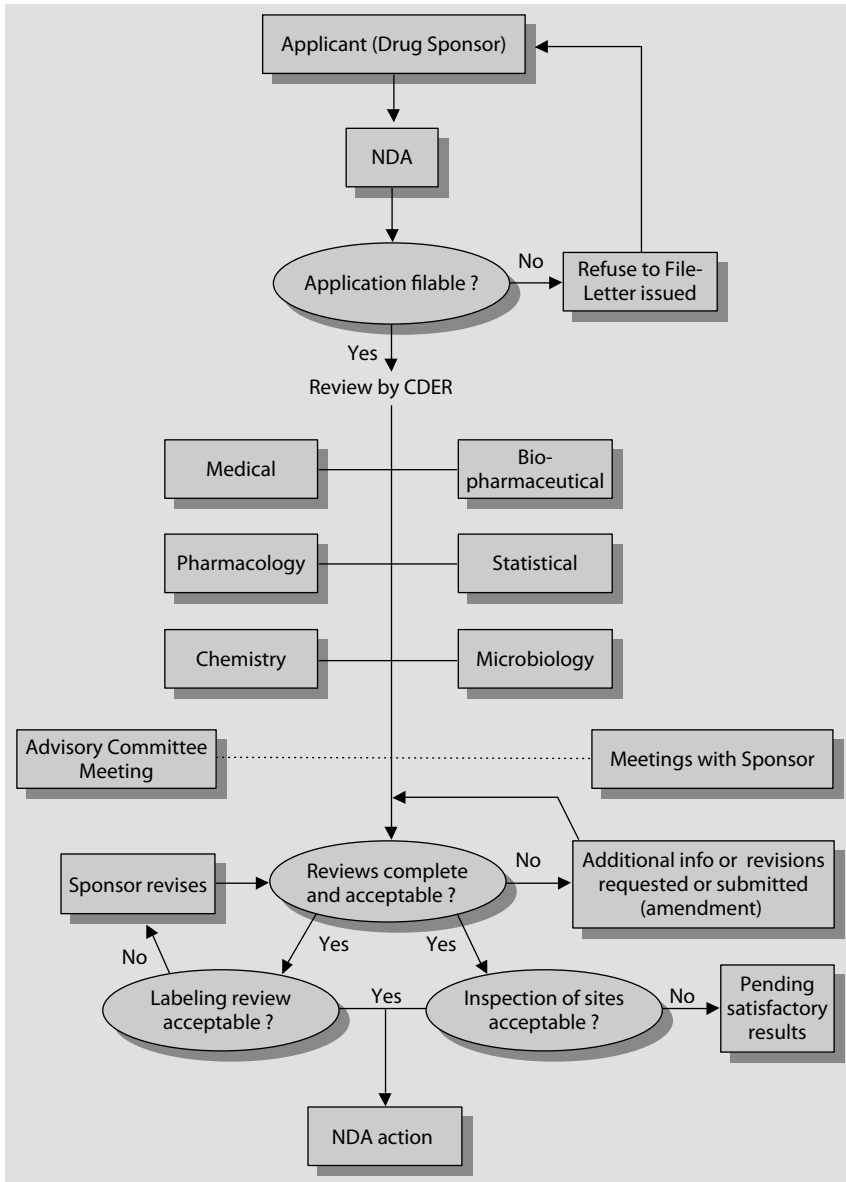
Die formalen Aspekte einer Arzneimittelzulassung sind in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA) in den Richtlinien des New

Drug Application (NDA) Prozesses in Inhalt und Form genau festgelegt. Der Ablauf ist im Fließdiagramm (■ Abb. 2.15) wiedergegeben. Ein Teil des zu erstellenden Berichts enthält die Zusammenfassung der pharmakologischen und toxikologischen nicht-klinischen Prüfungsergebnisse. Entscheidend ist u. a. die kritische Zusammenfassung, die die Ergebnisse im Hinblick auf ihre Bedeutung für die sichere Anwendung am Menschen beurteilt. Diese Bewertung der Übertragbarkeit der im Tierversuch beobachteten Effekte auf den Menschen muss in qualitativer und quantitativer (auf Körpergewicht und Oberfläche bezogen) Art und Weise erfolgen. In der EU muss zur Zulassung ein sog. Expertenbericht vorgelegt werden, der die gleichen Inhalte umfasst, aber in der Form nicht so exakt definiert ist wie in der NDA. Der oder die Experten werden hierbei nicht als Berichterstatter des Sponsors der Arzneimittelstudie, sondern als unabhängige Reviewer verstanden. Obwohl Experten unter bestimmten Bedingungen aus dem direkten Umkreis des Sponsors kommen können, erscheint es aus Gründen der Glaubwürdigkeit ratsam, etwaige Interessensüberschneidungen möglichst zu minimieren.

2.2.3 Statistik und Biometrie

Die Probleme, die der praktisch tätige Arzt mit statistischen Erkenntnissen hat, beruhen wohl v. a. auf der Tatsache, dass statistische Methoden Aussagen über das durchschnittliche Verhalten eines Prüfkollektivs, nicht aber über das Verhalten eines individuellen Patienten erlauben. Umgekehrt muss auch das häufig zu beobachtende Verhalten von Ärzten, aus ihren eigenen Einzelbeobachtungen vorschnell generell gültige Schlussfolgerungen abzuleiten, kritisiert werden. So kann das Nichtansprechen eines Patienten auf eine neue Therapie nicht sogleich einen generellen Zweifel an deren therapeutischer Wirksamkeit begründen; ebenso wenig darf die Beobachtung eines dramatischen Therapieerfolgs bei einzelnen Patienten zu einer unkritischen Befürwortung dieser Therapie führen.

Unter der vereinfachten Annahme, dass Messungen immer mit einem Messfehler behaftet sind und die biologische Variabilität die Kontrolle aller



■ **Abb. 2.15** Der New Drug Application (NDA) Review Process der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA, vgl. ► Kap. 4.1.5).

Einflussgrößen nahezu ausschließt, ist es prinzipiell unmöglich, sichere Aussagen für ein Individuum zu treffen. Nur unter Verwendung statistischer Methoden kann somit eine mittlere therapeutische Wirksamkeit an einer Versuchsgruppe nachgewiesen werden und dann als wesentliches Kriterium für eine Therapieentscheidung am einzelnen Patienten herangezogen werden.

Während der statistische Nachweis bei gut messbaren Funktionsveränderungen (z. B. Herzfrequenz oder Blutdruck) relativ einfach ist, erweist sich die Beurteilung einer generellen therapeutischen Wirksamkeit (z. B. die Überlebenszeit nach einem Herzinfarkt) meist als methodisch sehr aufwändig und zeitintensiv. Hier ist es oft sehr hilfreich, wenn der Wirkmechanismus des

Medikaments bekannt ist und ein kausaler Zusammenhang mit der Pathobiochemie und Pathophysiologie der Grunderkrankung besteht. Die Glaubwürdigkeit der aus dem reinen statistischen Nachweis der Wirksamkeit abgeleiteten therapeutischen Relevanz wird durch diesen Analogieschluss deutlich verstärkt. Auf der anderen Seite ist allein aus ethischer und rechtlicher Sicht die einwandfreie biometrische Planung einer Arzneimittelstudie nach nationalen und internationalen Kriterien Voraussetzung für die Erlaubnis zu deren Durchführung.

Studientypen und Prüfprotokolle

Als Standard für eine klinische Studie zum Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit einer Substanz gilt die prospektive, randomisierte, placebokontrollierte, doppel- (oder dreifach-) blinde Versuchsanordnung, die allerdings nicht für jede Fragestellung geeignet bzw. vertretbar ist. **Retrospektive Studien**, bei denen die Kontrolle von Störgrößen generell nicht möglich ist, können zwar bei der Aufstellung einer Hypothese helfen, sind jedoch zu deren Überprüfung weitgehend ungeeignet.

Bei der Beurteilung einer klinischen Studie ist es wichtig, ob sie als **exploratorische** (meist Phase II) oder **konfirmatorische** (meist Phase III) **Untersuchung** geplant war. Exploratorische Studien dienen oft als kleinere Pilotstudien vor der eigentlich beweisenden konfirmatorischen Studie, helfen bei Generierung der Prüfhypothese und der Definition von späteren Prüfparametern (z. B. Verfügbarkeit von Patienten, Standardabweichung der Zielkriterien, Abschätzung der Fallzahl) bzw. liefern Hinweise auf den Wirkmechanismus der Prüfsubstanz. Diese Studien sind deshalb auch wesentlich flexibler zu handhaben, die Fallzahl kann pragmatisch gewählt werden und die Statistik ist häufig nur deskriptiv.

Konfirmatorische Studien hingegen sollen eine vorher festgelegte Hypothese eindeutig beweisen oder widerlegen. Die Versuchsplanung muss hier sehr stringent erfolgen (u. a. eine korrekte Fallzahlabschätzung und eine Definition des Signifikanzniveaus) und es dürfen dann nur die vorher definierten Hypothesen und Zielkriterien untersucht werden.

Durchführung der Prüfung und Auswertungsmethoden

Nur durch eine randomisierte, d. h. zufallsweise Zuordnung der Patienten in Kontroll- bzw. Prüfgruppen lässt sich eine weitgehende Struktur- und Beobachtungsgleichheit der Behandlungsgruppen herstellen. Durch die sog. Schichtung oder Stratifizierung kann man die Patienten bzgl. der bekannten Störfaktoren (z. B. Alter, Alkoholkonsum, Vorerkrankungen) in Untergruppen einteilen (schichten). Diese Einteilung in Subgruppen, in denen dann wieder randomisiert werden kann, bewirkt eine Verringerung der Variabilität und somit eine erhöhte Präzision bereits bei kleineren Fallzahlen.

Ein weiterer, nicht unbedeutender und v. a. in offenen Studien auftretender Störfaktor ist der Suggestiveffekt, wenn behandelnder Arzt und/oder Patient über die Zuordnung in Kontroll- bzw. Prüfgruppen informiert sind. In einfachblinden Studien ist nur der Arzt informiert, in doppelblinden Studien keiner der beiden. Wenn immer möglich, sollten zusätzlich auch die an der Datenerhebung, und -auswertung beteiligten Personen verblindet sein (sog. dreifachblinde Studien). Die Einschaltung eines der wesentlichen Laborparameter erst zur Datenauswertung am Ende der Studie weitergebenden Zentrallabors sowie die Verwendung identisch aussehender Prüf- und Kontrollmedikamente (Verpackung und Tablette, sog. *double dummy design*) helfen bei der Verblindung, auch wenn diese in den meisten Fällen nicht vollständig erreicht werden kann. Wenn eine Verblindung hinsichtlich der Zuordnung zu den Therapiegruppen nicht möglich ist, sollte zumindest versucht werden, eine Verblindung hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit oder des entsprechenden Zielkriteriums zu erzielen (sog. PROBE-Design = *prospective, randomized, open, blinded endpoint*).

Die meisten prospektiven Studien werden im Parallel-Design durchgeführt, bei dem die therapeutische Wirksamkeit einer Prüfsubstanz mit mehreren parallelen Kontrollgruppen verglichen wird. Als Kontrollen dienen wirkstofffreie Scheinmedikamente (Placebos) oder bereits zugelassene Standardmedikamente. Nur die allerdings nicht immer vertretbare Placebokontrolle ermöglicht die exakte

Abgrenzung einer »echten« Arzneimittelwirkung von einem v. a. auf Suggestion beruhenden Effekts.

Eine Alternative ist das sog. *cross-over-design*, bei dem jeder Studienteilnehmer nacheinander Kontroll- und Prüfsubstanz in randomisierter Reihenfolge erhält und somit als seine eigene Kontrolle dient. Dieses Design ist aufgrund seiner geringeren Variabilität und somit der kleineren benötigten Fallzahlen v. a. für pharmakologische Untersuchungen der Phase I an gesunden Probanden geeignet.

Typische Auswertungsfehler

Einige der möglichen Fehlerquellen statistischer Tests sollen im folgenden Beispiel erläutert werden. Bei chirurgischen Eingriffen kommt es bei etwa 30 % der operierten Patienten zu einer Wundheilungsstörung. Es soll nun geprüft werden, ob eine Prophylaxe mittels einer intravenösen Antibiotikagabe unmittelbar vor dem Eingriff diese Komplikationsrate verringern kann. Die **Prüfhypothese** (Nullhypothese) lautet dann, dass kein Unterschied zwischen Placebo und Antibiotikum besteht, während die **Alternativhypothese** ist, dass es unter Antibiotikumgabe seltener zu Wundheilungsstörungen kommt. Einen Fehler der ersten Art begeht man, wenn man die Alternativhypothese annimmt, obwohl es tatsächlich keinen Unterschied zwischen Placebo und Antibiotikum gibt. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Fehler bezeichnet man als Signifikanzniveau α . Das minimale Signifikanzniveau, das erreicht werden muss, um statistische Signifikanz zu erreichen, wird nach allgemein üblicher Konvention mit 0,05 angenommen, d. h. man begeht einen Fehler der ersten Art mit weniger als 5 % Wahrscheinlichkeit. Einen Fehler zweiter Art begeht man, wenn man sich für die Annahme der Nullhypothese entscheidet, obwohl tatsächlich ein Unterschied zwischen Antibiotikum und Placebo besteht. Dieser Fehler wird mit β bezeichnet und $(1-\beta)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein tatsächlicher Wirkunterschied auch erkannt wird. Die notwendige Sensitivität oder Trennschärfe des Testverfahrens wird meist bei 90 % angesetzt, obwohl dies im Unterschied zum Signifikanzniveau kein fester Wert ist und u. a. vom tatsächlichen und nicht bekannten Wirkunterschied und der Inzidenz einer Wundheilungsstörung unter Placebo abhängt. Ohne die Festlegung auf einen anzuneh-

menden klinisch-relevanten Wirkunterschied kann der Stichprobenumfang, der nötig ist, um eine bestimmte Sensitivität zu erreichen, nicht festgelegt werden. Ist der tatsächliche Wirkunterschied jedoch deutlich größer als der angenommene, werden mehr Patienten als notwendig in die Studie aufgenommen. Um dies rechtzeitig zu erkennen (v. a. bei Langzeitstudien über mehrere Jahre), können Methoden wie z. B. Versuchspläne mit Zwischenauswertungen zu festgelegten Zeiträumen verwendet werden.

Weitere häufige Fehlerquellen sind unzureichende Fallzahlen bei ungenauer Schätzung der *drop-out-rate*, eine fehlende Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen und die Tendenz, Korrelation mit Kausalität gleichzusetzen. Neben diesen typischen Planungsfehlern gibt es auch eine Reihe häufig zu beobachtender Auswertungsfehler, die meistens auf einer nachträglichen und nicht-zulässigen Veränderung des Prüfprotokolls beruhen. Dazu gehören u. a. nicht-geplante Zwischenauswertungen und Stratifizierungen sowie eine künstliche Vergrößerung des Stichprobenumfangs. So werden z. B. häufig bei der Prüfung sog. »Venenmittel« die Beindurchmesser an beiden Beinen der Patienten bestimmt und in der Auswertung unzulässigerweise als unabhängige Messungen verwendet, wodurch der Stichprobenumfang ohne zusätzliche Information verdoppelt wird und eine geringere Schwankungsbreite erzielt wird.

Eine weitere Fehlerquelle ist die gezielte Suche nach signifikanten Ergebnissen. Definiert man nur genügend Zielkriterien, wird man irgendwann auch einen signifikanten Testparameter finden. Durch die nachträgliche und nicht-zufällige Einteilung in geeignete Untergruppen (z. B. *responder versus non-responder*) lassen sich unschwer Patientengruppen definieren, in denen doch noch eine signifikante therapeutische Wirksamkeit nachweisbar ist. Eine weitere Möglichkeit ist schließlich die allseits bekannte Tatsache, dass man nur lange genug testen muss, bis man den »geeigneten« statistischen Test für die Auswertung gefunden hat.

Bei der Bewertung einer klinischen Studie ist also auf jeden Fall auf die exakte prospektive Definition der Studienbedingungen und deren konsequente Einhaltung bzw. auf die Stichhaltigkeit der Begründungen für das Abweichen davon zu achten.

2.2.4 Klinische Arzneimittelprüfung vor der Zulassung – Phasen I–III

Allgemeine Aspekte der Zulassung von Arzneimitteln

Früher wurden Zulassung, Anwendung und kontinuierliche Überwachung von Arzneimitteln ausschließlich durch nationale Behörden geregelt (z. B. das BfArM). Seit 1995 ist für die Zulassung in der EU die European Medicines Agency (EMA) zuständig (vgl. das Kap. 4). Die Zulassung eines Arzneimittels ist dabei sowohl der formale Endpunkt der klinischen Prüfung als auch der Beginn der Markteinführung und der Überwachungsphase. Dazu gehören u. a. Herstellungskontrolle, Änderungen von Indikation und therapeutischer Anwendung, Erfassung von Nebenwirkungen und ein kontinuierliches Anpassen der Nutzen-Risiko-Bewertung an den Stand der wissenschaftlichen Kenntnis.

Aus Sicht der Toxikologen und Kliniker muss ein Antrag auf Zulassung alle notwendigen Daten zur pharmazeutischen Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit enthalten. Ein Hauptkriterium der Wirksamkeit ist die Reduktion von Mortalität oder Morbidität einer typischen, im vorgesehenen Indikationsbereich liegenden Krankheit. Der statistisch signifikante Nachweis der Wirksamkeit sowie die therapeutische Relevanz müssen in kontrollierten klinischen Studien erbracht sein. Ferner ist selbstverständlich bereits vor Beginn der Anwendung am Menschen in klinischen Studien u. a. durch die Erhebung der toxikologischen Basisdaten die Unbedenklichkeit zu zeigen. Hierbei muss die Wahrscheinlichkeit des Auftretens unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs) beim Patienten bestimmt werden, wobei wegen der relativ geringen Zahl der an den klinischen Prüfungen beteiligten Patienten nur die häufig vorkommenden UAWs sicher erfasst und seltene UAWs (Risiko des Auftretens $< 1:1.000$) meist erst durch die breite Anwendung und kontrollierte Anwendungsbeobachtungen nach der Zulassung erkannt werden. Aus den Erkenntnissen der präklinischen und klinischen Untersuchungen wird eine abschließende Nutzen-Risiko-Bilanz erstellt, in die zusätzliche Faktoren wie etwa die Verfügbarkeit anderer Behandlungsoptionen mit einfließen und die letztlich die Entscheidung über die Zulassungsfähigkeit be-

stimmt. Erfolgen müssen solche Nutzen-Risiko-Bilanzierungen jedoch auch bereits vor Aufnahme der ersten Anwendung am Menschen, vor jedem Eintreten in eine bestimmte Phase der klinischen Prüfung sowie nach der Zulassung, wenn Hinweise auf Veränderungen vorliegen (z. B. das Auftreten seltener UAWs).

Im Sinne einer erhöhten Transparenz ist es das erklärte Ziel, möglichst schnell frei zugängliche Datenbanken einzurichten, in denen alle europäischen Studien registriert sein sollen.

Klinische Prüfungen vor der Zulassung

Die klinische Prüfung im eigentlichen Sinn ist abzugrenzen von der individuellen Therapiebeobachtung bzw. der systematischen Anwendungsbeobachtung bereits zugelassener Medikamente. Letzteren ist gemeinsam, dass lediglich Daten gesammelt werden dürfen, die bei der therapeutischen Anwendung ohnehin anfallen würden. Um eine klinische Prüfung handelt es sich hingegen, wenn die Gabe eines Arzneimittels überwiegend zur Gewinnung wissenschaftlicher Erkenntnisse (pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkungen, UAWs) erfolgt und das individuelle Wohl des Patienten nachrangig betrachtet werden kann. Zu den Voraussetzungen, die die Durchführung einer klinischen Prüfung rechtfertigen, ohne dass sie als Körperverletzung anzusehen ist, gehören die begründeten Annahmen, dass das neue Medikament einen therapeutischen Fortschritt bedeuten könnte und die Anwendung aus ärztlicher Sicht unbedenklich erscheint. Die Prüfung kann dabei an gesunden Probanden (in der Regel Phase I) oder kranken Menschen (Phasen II–IV) durchgeführt werden. Spezielle Patientenpopulationen wie Frauen im gebärfähigen Alter oder Kinder werden aber auch heute noch aus Sicherheitsgründen oder primär rechtlichen Erwägungen wenn überhaupt erst zu einem späten Zeitpunkt der Entwicklungsphase in die Prüfungen eingeschlossen. Diese Umstände haben u. a. dazu geführt, dass in Deutschland ca. 70–80 % der Arzneimittelverordnungen bei Minderjährigen sogenannte »off-label«-Anwendungen sind, d. h., dass Kinder und Jugendliche ganz überwiegend mit Medikamenten behandelt werden, deren Wirksamkeit und Sicherheit an Minderjährigen nie geprüft wurde.

Da es inzwischen politischer Konsens ist, dass auch kranke Kinder ein Anrecht auf Medikamente haben, die nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen geprüft und zugelassen wurden, sind die Rahmenbedingungen für die Forschung mit Minderjährigen neu festgelegt worden (EU-Richtlinie 2001/20/EG; 12. Novelle des AMG vom 06.08.2004). Um ein gesamteuropäisches Konzept bei der Zulassung von Arzneimitteln mit pädiatrischer Anwendung zu erreichen, wurde am 01.06.2006 vom europäischen Parlament die »Regulation on medicinal products for paediatric use« beschlossen. Sie ist seit dem 26.07.2007 als die rechtsgültige Kinderarzneimittelverordnung anzusehen und wird durch die EMA umgesetzt und überwacht. Ähnlich wie in den USA sollen hierbei auch bestimmte Anreize (z. B. eine 6-monatige Verlängerung der Patentschutzlaufzeit) Hersteller, die klinische Studien mit Minderjährigen durchführen, belohnen (vgl. ► Kap. 12).

Ein weiteres Problem ist, dass v. a. finanzielle Überlegungen die Entwicklung von Medikamenten gegen seltene Erkrankungen (< 5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner; sog. *orphan drugs*) weitgehend verhindern. Ende 2000 ist deshalb in der EU eine Richtlinie verabschiedet worden, die durch finanzielle Anreize wie etwa die Gewährung zeitlich begrenzter Marktexklusivität die Entwicklung sonst unrentabler Medikamente fördern soll. Schließlich ist es problematisch, dass es gesetzlich nicht möglich ist, nicht zugelassene Präparate außerhalb klinischer Prüfungen anzuwenden. V. a. Patienten mit lebensbedrohlichen, sonst nicht therapierbaren Erkrankungen und/oder Patienten, die aufgrund von Ausschlusskriterien nicht an klinischen Prüfungen teilnehmen können, werden hierdurch potenzielle Therapieoptionen vorenthalten. Es werden deshalb vorwiegend nationale Modelle entwickelt, die es unter bestimmten Bedingungen erlauben, straffrei vom sonstigen ärztlichen und rechtlichen Standard abzuweichen (sog. *compassionate use*). In den USA besteht ferner die Möglichkeit des sog. *accelerated development/review* zur Beschleunigung der Entwicklung von Medikamenten, die einen herausragenden Vorteil gegenüber existierenden Therapieoptionen für schwerwiegende oder lebensbedrohliche Krankheiten versprechen oder überhaupt erstmals deren Therapie gestatten. Zu berücksichtigen ist hier, dass der Hersteller auch nach der

Zulassung zum Ausgleich für den beschleunigten Prozess umfangreiche Tests weiterführen muss, da die FDA andernfalls leichter als sonst die Zulassung widerrufen kann.

Auf die zunehmende Bedeutung der Durchführung klinischer Prüfungen nach den ICH-GCP-Richtlinien, die auf den ethischen Prinzipien der Deklaration des Weltärztebunds von Helsinki (1964; letzte Revision 1996) beruhen, wurde bereits hingewiesen. Diese Richtlinien beschreiben im Wesentlichen die Definition und die Pflichten des Sponsors, Monitors, leitenden Prüfarztes und der Ethik-Kommission. Weiterhin finden sich dort detaillierte Anleitungen zum Aufbau des Prüfplans sowie der korrekten Durchführung und Dokumentation der Studien.

Geregelt sind u. a. Aufklärung und Einverständniserklärung (engl. *informed consent*), die Durchführung des Monitorings und Audits mit Kontrolle der Ursprungs-(Quell-)Daten, die Meldung von UAWs, Anwendung von SOPs sowie die Archivierung von Daten und Prüfmaterialien. Der Sponsor (in der Regel eine Pharmafirma) beauftragt heute häufig sog. Contract Research Organisations (CROs) mit der Durchführung der Arzneimittelprüfungen, die dann an geeigneten Prüfzentren in Zusammenarbeit mit dem Leiter der klinischen Prüfung (LKP) durchgeführt werden. Zusätzlich gibt es in Deutschland Bestrebungen, etwa durch die Etablierung sog. Koordinierungszentren für Klinische Studien (KKS), die durch öffentliche Mittel (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und Landesmittel gefördert werden, die akademische Medizin wieder verstärkt zur Durchführung eigenständiger klinischer Arzneimittelstudien zu bewegen. Es existieren zurzeit bereits 14 KKS (Berlin, Dresden, Düsseldorf, Essen, Freiburg, Halle, Heidelberg, Köln, Leipzig, Mainz, Marburg, München, Münster, Tübingen/Ulm). Die KKS sind an den jeweiligen medizinischen Fakultäten bzw. Universitätskliniken angesiedelt und verstehen sich als Bindeglied zwischen der pharmazeutischen und medizintechnischen Industrie einerseits und der akademischen Medizin andererseits, mit dem Ziel der beschleunigten Umsetzung von Entwicklungen der medizinischen Grundlagenforschung in die klinische Praxis. Die initiale Förderung durch öffentliche Mittel wird

primär als Anschubfinanzierung verstanden, mit dem Ziel, dass sich die KKS in Zukunft v. a. durch die Übernahme von Forschungsaufträgen aus der Industrie selbst tragen können.

Vor Beginn einer klinischen Studie müssen gemeinsam vom Sponsor (Monitor) und LKP die notwendigen organisatorischen, administrativen und rechtlichen Voraussetzungen am Prüfzentrum geschaffen bzw. überprüft werden. Zu ersteren zählen u. a. die Patientenverfügbarkeit (z. B. durch Diagnosestatistiken bzw. Testläufe, *dummy runs*), quantitativ und qualitativ ausreichende personelle und technische Kapazitäten, die Organisation der Laboruntersuchungen (lokal oder zentral, Lagerung, Probenversand, etc.), die Sicherung der Durchführung des externen Monitorings (Akten-einsicht, Zeitplanung, etc.) sowie die Regelung der Honorar- (z. B. nach der Gebührenordnung für Ärzte) und Vertragssituation (Einverständnis der Krankenhausverwaltung bzw. des Dienstherrn). Zu den rechtlichen Anforderungen, die in der 12.–14. Novelle des AMG deutlich modifiziert wurden, gehören die Benennung eines LKP mit mindestens zwei Jahren Erfahrung in der Durchführung von Arzneimittelprüfungen, die Zustimmung der Ethik-Kommission des LKP sowie der lokalen Ethik-Kommission nach Dienst- oder Berufsrecht, der Abschluss einer Patienten-/Probandenversicherung, die Meldung bei der zuständigen regionalen Überwachungsbehörde, die Vorlage der Unterlagen beim BfArM bzw. PEI sowie ggf. weitere Genehmigungen beispielsweise nach der Röntgenverordnung, falls Strahlenbelastung aus Studiengründen vorliegt. Eine Aufstellung von Voraussetzungen zur Durchführung klinischer Arzneimittelprüfungen gibt ■ Tab. 2.4.

Elemente und Ablauf der klinischen Prüfung

Beim Ablauf der klinischen Prüfung wird weiterhin zwischen den Phasen I–IV unterschieden (■ Tab. 2.5; s. hierzu auch Abb. 2.12), obwohl diese starre Einteilung zu unflexibel ist und längst nicht mehr den Gegebenheiten der modernen Arzneimittelentwicklung genügt. So existiert die anachronistische Situation, dass diese geforderte Terminologie einerseits offiziell weiter beibehalten wird, während sie andererseits keiner der erfolg-

reichen Arzneimittelhersteller als Grundlage der Entwicklungspläne verwendet. Die wesentlichen Gründe dafür liegen v. a. in zeitlichen, finanziellen und regulatorischen Überlegungen, doch auch aus wissenschaftlichen und klinischen Erwägungen gibt es schon seit langem akzeptierte Situationen, die zur begründeten **Abweichung von der Phaseneinteilung** führen können. So wäre es z. B. nicht zu verantworten, die Pharmakokinetik eines sehr toxischen neuen Medikaments in geplanter therapeutischer Dosierung an gesunden Probanden zu prüfen (Phase I), weil UAWs nahezu mit Sicherheit erwartet werden müssen. Die ersten Studien am Menschen würden in diesem Fall an Patienten mit Erkrankungen, die wahrscheinlich auf die Prüfsubstanz positiv ansprechen, durchgeführt (Phase II). Cytotoxische und antivirale Medikamente sind hier typische Beispiele. Weiterhin wäre es nicht sinnvoll, die Verträglichkeit von Prüfsubstanzen zuerst an gesunden Probanden zu testen, wenn relevante pharmakodynamische Effekte bekanntermaßen nur an bestimmten Patienten zu erheben sind. Problematisch sind auch Erkrankungen, für die kein anerkanntes präklinisches Modell existiert oder bei denen die Erkrankung selbst die Pharmakokinetik der Substanzen signifikant ändern kann. Es existieren z. B. keine Tiermodelle für die klassische Migräne des Menschen, und an gesunden Probanden lässt sich kein antimigränöser Effekt nachweisen. Gleichzeitig kann aber erwartet werden, dass das häufig zu beobachtende Erbrechen und die Magen-Entleerungsstörung während des Migräneanfalls die Pharmakokinetik und Wirksamkeit der Prüfsubstanz wesentlich beeinflusst.

Phase I: Erstanwendung an gesunden Probanden (Humanpharmakologie)

Nach kritischer und positiver Beurteilung der Verträglichkeit der Prüfsubstanz im Tierversuch folgt im Rahmen der Phase I der klinischen Prüfung in der Regel die orientierende Bestimmung des pharmakokinetischen und pharmakologischen Wirkprofils am gesunden Probanden, die Beurteilung der Verträglichkeit der Prüfsubstanz sowie die Definition eines Dosisbereichs für die folgenden Phase-II-Studien. Da die Phase I-Studien im Allgemeinen nicht das Ziel des Nachweises einer therapeutischen Wirksamkeit haben, werden sie

■ **Tab. 2.4** Klinische Pharmakologie – Voraussetzungen für die Durchführung klinischer Arzneimittelprüfungen.

Modell	Erläuterung	
formale/rechtliche Grundlagen	Deutschland:	Arzneimittelgesetz
		Grundsätze zur Durchführung klinischer Prüfungen
		Good Clinical Practices (GCP)
	EU:	EU-Guidelines
	USA:	Good Clinical Practices (GCP)
	Weltärztebund:	Deklaration von Helsinki
weitere formale Schritte	Benennung eines Leiters der klinischen Prüfung (LKP) Positive Begutachtung durch unabhängige, zuständige Ethik-Kommission Anmeldung aller klinischen Prüfungen bei der zuständigen regionalen Überwachungsbehörde (Anzeige) Evtl. Vorlage beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) bzw. beim Paul-Ehrlich-Institut (PEI) Ggf. Genehmigung nach Röntgenverordnung Angemessene Ergebnissicherung gewährleistet	
Versuchspersonen	Angemessenes Risiko/Nutzen (Erkenntnisgewinn)-Verhältnis Schutz der Studienteilnehmer Körperliche Untersuchung Aufklärung Einverständniserklärung Rücktrittsrecht Probandenversicherung in ausreichender Höhe abgeschlossen	
Notfalleinrichtungen	Klinische Notfallausrüstung und Notfallmedikamente vorhanden	

im Regelfall an gesunden, bezahlten Probanden durchgeführt, deren Rekrutierung üblicherweise einfach und deren Bezahlung ethisch gerechtfertigt ist. Die Zahl der Phase I-Studien, an denen sich ein Proband pro Jahr beteiligen darf, sollte allerdings beschränkt werden (3–4/Jahr) und der finanzielle Anreiz darf auf keinen Fall so gestaltet sein, dass er den Probanden zur unkritischen Teilnahme veranlasst.

Der Frage der **Kinetik** und der Dosis-Wirkungs-Relation wird dabei besondere Aufmerksamkeit gegeben. Die Konzentration der Prüfsubstanz sowie eventueller Metabolite wird nach einfacher bzw. wiederholter Gabe in vorher festgelegten Zeiträumen im Blut und Urin bestimmt und daraus werden wichtige kinetische Parameter wie Serumhalbwertszeit, AUC, c_{\max} (maximale Plasmakonzentration), t_{\max} (Zeitpunkt, zu dem c_{\max} erreicht wird), Bioverfügbarkeit und renale Clearance berechnet.

■ **Tab. 2.5** Klinische Arzneimittelprüfung – Unterscheidung der Phasen I–III

Phase	Beschreibung	Zielsetzung	Große und Zusammensetzung der Stichprobe	Zeitraum und durchführende Personen
Phase I inkl. Phase 0	Erstanwendung an gesunden Probanden bzw. Patienten Untersuchung von pharmakologischen Wirkungen, Verträglichkeit und Arzneimittel-Stoffwechsel Stationäre Durchführung	Untersuchung u. a. von Pharmakokinetik, Wirksamkeit, Dosis/Zeit-Wirkungs-kurven, Nebenwirkungen (UAWs) Nachweis des Wirkmechanismus Erarbeitung von validierten Biomarkern (Surrogatparametern) Nutzen/Risiko-Analyse geeigneter Dosierung	ca. 10–50 gesunde Probanden bzw. Patienten	ca. 15–20 Monate (evtl. kürzer) Klinische Pharmakologie
Phase II		Ermittlung von Wirksamkeit Dosis/Wirkungsbeziehungen Klinischer Relevanz Kumulation bei Mehrfachgabe Interaktionen Toleranzentwicklungen Entwicklung verschiedener Darreichungsformen	ca. 100–500 Patienten, homogene Stichprobe	ca. 18–24 Monate Klin. Pharmakologen, Ärzte mit Erfahrung in der Arzneimittelprüfung
Phase III		Bestimmung u. a. von tox. Sicherheit klin. Wirksamkeit Gleichwertigkeit/Überlegenheit gegenüber Standardtherapie	meist > 1.000 Patienten, heterogene Stichprobe, multizentrisch	ca. 24–40 Monate In der Klinik tätige Ärzte

Pharmakodynamische Ziele sind der Nachweis von möglichst dosisabhängigen Wirkungen und deren Dauer, die Registrierung von UAWs sowie die Bestimmung der höchsten verträglichen und der kleinsten wirksamen Dosis.

Der Versuchsplan für die **pharmakodynamischen Untersuchungen** hängt vom erwarteten Wirkspektrum des Arzneimittels und von den ausgewählten Kriterien zur Überwachung wichtiger physiologischer Funktionen ab. Relativ leicht zu messende Parameter wie z. B. Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck, Elektrokardiogramm oder Körpergewicht sollten auf jeden Fall bestimmt werden. Diese pharmakodynamischen

Messungen sollten nach Einzeldosen mehrfach am Tag der Applikation durchgeführt werden. Bei wiederholter Anwendung und Dauer der Studie über mehrere Wochen sollten die Parameter routinemäßig mindestens einmal wöchentlich bestimmt werden. Zumindest orientierend sollten auch grobe Funktionsänderungen des kardiovaskulären, gastrointestinalen, pulmonalen sowie des peripheren und zentralen Nervensystems erfasst werden. Häufig lassen sich während Phase I-Studien an gesunden Probanden pharmakologische Wirkungen nur durch das Auftreten und Erfassen unerwünschter Arzneimittelwirkungen nachweisen. Um UAWs zu erfassen, können regelmäßige systematische

Befragungen und eine engmaschige Kontrolle der wichtigsten Laborparameter verwendet werden. Standardprogramme für Blutlaborwerte sind z. B. von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie oder von der Sektion Klinische Pharmakologie der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie aufgestellt worden.

Bei der Versuchsplanung sollte unter Beteiligung der Biometrie wann immer möglich ein randomisierter, **Placebo-kontrollierter-Doppel-blindversuch** angestrebt werden. Die erforderliche Anzahl der Probanden in Phase I-Studien liegt im Allgemeinen zwischen zehn und 50. In der Regel dient jeder Proband im Sinne eines Vorher-Nachher-Vergleichs der Wirkungen der Prüfsubstanz als seine eigene Kontrolle. Aufgrund der geringeren intra-individuellen Variabilität erhält man so im Zusammenhang mit einem sog. *cross-over*-Versuchsdesign (eine Gruppe erhält erst Placebo, dann die Prüfsubstanz und in einer zweiten Gruppe erfolgt die Gabe in umgekehrter Reihenfolge) eine geringere Schwankungsbreite bereits bei kleinen Versuchsgruppen. Man muss allerdings durch angemessen lange Pausen (sog. *washout*-Phasen) zwischen der Applikation des Wirkstoffs und des Placebos (bzw. umgekehrt) sicherstellen, dass die Gefahr eines sog. *carry-overs* von Effekten in die nächste Phase minimiert wird. Ist dieses Design und die damit verbundene Wiederholung von aufwändigen Untersuchungen am Individuum z. B. aus ethischen Gründen nicht vertretbar (z. B. mehrfache invasive Untersuchungen), muss mit einem Gruppenvergleich an zwei oder mehreren parallelen Kontroll- und Prüfgruppen mit entsprechend größerer Zahl von Probanden gearbeitet werden.

Phase 0 in der Phase I: Erstanwendung am Menschen

Die Errungenschaften der modernen biomedizinischen Forschung der letzten 10 Jahre haben eine große Vielzahl neuer potenzieller Zielmoleküle hervorgebracht. Dies bietet auf der einen Seite große Chancen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, schafft aber auf der anderen Seite neue logistische und finanzielle Probleme bei der Entwicklung und Zulassung neuer Wirkstoffe. Diese Problematik ist u.a. auch an der in den letzten Jahren abnehmen-

den Anzahl neuer zugelassener Medikamente zu erkennen. Es erreichen nur ca. 8 % der Wirkstoffe, die in die Phase I eingeschleust werden, später auch die Marktzulassung. Diese Zahl halbiert sich noch einmal bei den neu zugelassenen Medikamenten für die Anwendung in der Onkologie.

Die rationale präklinische Selektion aus der Vielzahl möglicher neuer Wirkstoffe besitzt somit zunehmend eine große Bedeutung. Die Selektion wird jedoch u.a. auch durch die geringe Vorhersagekraft der präklinischen toxikologischen, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Untersuchungen erschwert. Dieser Umstand verstärkt sich vermutlich noch weiter mit der Einführung neuer Substanzen mit einem sehr selektiven molekularen Wirkmechanismus, was sich am Beispiel der Zytostatika erläutern lässt. Herkömmliche Zytostatika sind durch eine sehr steile Konzentrations-Wirkungsbeziehung gekennzeichnet. Dadurch ergibt sich ein sehr enger Zusammenhang zwischen toxischen und erwünschten Effekten im Tiermodell mit der Konsequenz einer relativ guten Übertragbarkeit auf den Menschen. Neue Wirkstoffklassen, wie z. B. Tyrosin-Kinase-Inhibitoren oder Hemmstoffe der Blutgefäßbildung sind relativ untoxisch, was zum einen die chronische Applikation ermöglicht, auf der anderen Seite aber die Vorhersagekraft des Tiermodells für subakute unerwünschte Arzneimittelwirkungen stark herabsetzt. Ein weiteres Problem ist, dass zunehmend der Nachweis des spezifischen Wirkmechanismus einer neuen Substanz nicht nur präklinisch, sondern auch *in vivo* in der klinischen Untersuchung am Menschen gefordert wird. Die dafür notwendigen Analysemethoden sowie validierte Ersatzmarker (so genannte Surrogatparameter) fehlen in der Regel zu Beginn der präklinischen Untersuchungen und es ist ein hohes Risiko für ein Pharmaunternehmen, ohne solche validierten Verfahren in die teure klinische Prüfung einzusteigen.

Zur Lösung dieser Probleme müssen neue flexible Zulassungsverfahren entwickelt werden. Ein Lösungsansatz ist die Etablierung einer sogenannten Phase 0 der Arzneimittelprüfung am Menschen, die in der Frühphase der eigentlichen Phase I durchgeführt werden soll. Die Phase 0 hat keine therapeutischen oder diagnostischen Zielsetzungen, sondern soll v. a. erste Erkenntnisse im Men-

schen liefern, die bei der Selektion der Wirkstoffe helfen sollen, die dann tatsächlich in die komplette Phase I eingeschleust werden. Somit könnten Zeit und Kosten gespart werden und evtl. auch bessere Studienprotokolle für die nächsten Phasen ermöglicht werden. Generell sollen diese Studien kurz sein sowie mit einer sehr geringen Zahl von Patienten/Probanden (10–15) und Wirkstoffen in sehr geringer Dosierung und somit möglichst geringer Toxizitätsgefahr durchgeführt werden.

Die EMA hat bereits 2003 ein Positionspapier zu den sog. *microdose*-Studien und 2006 ein Konzeptpapier zu den präklinischen Voraussetzungen zur Durchführung von Phase o-Studien veröffentlicht. Die FDA verfolgt ähnliche Ziele und versucht dem v. a. durch eine geänderte Interpretation der bisherigen Verfahrensrichtlinien (sog. *exploratory IND*'s) Rechnung zu tragen.

Man kann die Ziele der Phase o-Studien grob in 2 Bereiche gliedern:

1. In den bereits erwähnten *microdose*-Studien werden pharmakokinetische Endpunkte wie z. B. Bioverteilung und Bioverfügbarkeit untersucht. Durch die Verwendung hoch-sensitiver Methoden (z. B. bildgebende Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomografie (PET)) können hier sehr niedrige Dosierungen zum Einsatz kommen. Übliche Startdosierungen sind etwa 1/100 der aus den Tierversuchen ermittelten effektiven Dosen (in jedem Fall aber $< 100 \mu\text{g}$ bzw. 30 nanomol bei Proteinderivaten). Diese niedrigen Dosierungen erlauben es den Behörden, die erforderlichen präklinischen toxikologischen Untersuchungen deutlich zu beschränken. Die FDA fordert im Gegensatz zur EMA z. B. keine routinemäßige Vorlage genotoxischer Untersuchungen.
2. Ferner sind Phase o-Studien geplant, die zum Ziel haben, die pharmakodynamisch gewünschten Effekte im Menschen nachzuweisen bzw. den etablierten Wirkmechanismus zu demonstrieren (z. B. Veränderung der Genexpression im Zielgewebe). Die Entwicklung aussagekräftiger, sensitiver und reproduzierbarer Testsysteme sowie validierter Biomarker ist hierbei eine zu leistende notwendige Voraussetzung. Wenn es gelingt, solche Testverfahren zu entwickeln, können diese direkt in die Opti-

mierung und Durchführung der späteren Testphasen einfließen und die Wahrscheinlichkeit einer schnelleren und erfolgreichen Markteinführung erhöhen. Die üblichen Startdosierungen sollten zwischen den Dosierungen in den *microdose*-Studien und herkömmlichen Phase I-Studien liegen. Ein Anhaltspunkt ist die Dosierung, bei der in 10 % der Versuchstiere (meist Nager) schwere toxische Effekte (*severely toxic doses*, STD's) auftreten. Man verwendet dann üblicherweise 1/10 dieser Dosis am Menschen (1/10 STD 10 mg/m²). Die für diese Studien geforderten toxikologischen Voruntersuchungen sind noch nicht genau festgelegt, aber werden sicherlich umfangreicher sein als für die *microdose*-Studien. Es handelt sich generell um akute Toxizitätsstudien (ca. 14 Tage Beobachtungszeit) an 1–2 Säugetierspezies in geeigneten Applikationsarten. Es empfiehlt sich, diese Untersuchungen so zu planen (GLP-Standards, biometrische Planung, etc.), dass die Ergebnisse auch direkt für die notwendigen Antragsunterlagen der folgenden kompletten Phase I verwendet werden können.

Es existieren bereits einige gelungene Beispiele für Phase o-Studien. So konnte z. B. die Firma Abbott 2007 in den USA in Zusammenarbeit mit dem National Cancer Institute eine Phase o-Studie zu einem neuen Inhibitor (ABT-888) der menschlichen poly-ADP Ribose Polymerase (PARP) in Krebspatienten durchführen und auf diesem Weg einen Enzymassay zum Nachweis des Wirkmechanismus für folgende klinische Studien etablieren.

Aufgrund der limitierten Erfahrung mit Phase o-Studien ergeben sich naturgemäß viele offene Fragen, darunter, wie hoch tatsächlich der prädiiktive Wert der pharmakokinetischen *microdose*-Studien ist. Man kann hier davon ausgehen, dass Untersuchungen zu Wirkstoffen mit einer linearen Pharmakokinetik und hohen Dissoziationskonstante vom Zielmolekül eine bessere Vorhersagekraft besitzen werden.

Sind Phase o-Studien wirklich effektiv in dem Sinne, dass sie Entwicklungszeit und Kosten sparen und somit zu einer höheren Anzahl jährlicher Neuzulassungen führen?

Da die Phase o-Studien keinen direkten Nutzen für den Patienten bringen werden – bei durch- aus vorhandenen Risiken und Belastungen –, ist es zumindest fraglich, ob es gelingen wird, genügend Patienten zu rekrutieren. Wenn eine sinnvolle Auf- klärung der möglichen Teilnehmer erfolgt, erschei- nen die ethischen Bedenken lösbar. Allerdings ist es ratsam, die zuständige Ethik-Kommission be- reits in der Planungsphase intensiv einzubeziehen. Weiterhin ist es unabdingbar, dass die an Phase- o-Studien teilnehmenden Patienten dadurch nicht von der Teilnahme an folgenden therapeutischen Studien ausgeschlossen bzw. behindert werden dürfen. Dies beinhaltet z. B., dass nur kurze Aus- waschphasen (maximal 2 Wochen) zwischen den Phase o-Studien und möglichen Folgestudien ge- fordert werden dürfen.

Schließlich bringt die gewünschte kleine Teil- nehmerzahl (10–15) und die kurze Studiendauer anspruchsvolle Herausforderungen an das biome- trische Studiendesign mit sich.

Phasen II und III: Therapeutisch exploratorische und konfirmatorische klinische Prüfungen

Die im Anschluss an die Phase I weiterführenden klinischen Arzneimittelprüfungen (vgl. ■ Tab. 2.5) dienen in der Phase II dem Nachweis der ther- apeutischen Wirksamkeit im Hinblick auf die für die Zulassung vorgesehenen Indikationen. Zudem soll hier an einer begrenzten, möglichst homo- genen Stichprobe von 50 bis 300 Patienten parallel die Unbedenklichkeit der Anwendung nachge- wiesen sowie der wirksame Dosisbereich und die endgültige Applikationsform festgelegt werden. In dieser frühen Phase werden häufig Surrogatmar- ker (s. o.) zum indirekten Nachweis der therapeu- tischen Wirksamkeit eingesetzt, weil die Zeitdauer der Studie dadurch entscheidend verkürzt werden kann. So kann z. B. zur Beurteilung der Wirksam- keit eines Zytostatikums statt der Verlängerung der tumorfreien Überlebenszeit die Reduktion der Tu- mormasse als Ersatzkriterium herangezogen wer- den. Im Sinne der *evidence-based medicine* kann dies allerdings nicht als einwandfreier Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit gelten und somit auch nicht für die endgültige Zulassung ausreichen. Ein typisches Vorgehen zur Definition des Dosisbe-

reichs mit dem günstigsten Nutzen-Risiko-Verhält- nis ist die sog. **Dosisescalation**. Man beginnt dabei mit der geringsten effektiven Dosis und steigert sie dann, bis die gewünschte maximale Wirksam- keit erreicht wird oder limitierende UAWs auftre- ten. Am Ende dieser Untersuchungen sollen somit neben der Festsetzung des optimalen Dosisbereichs auch besondere Empfehlungen und Vorsichtsmaß- nahmen für die klinische Anwendung gegeben werden können. So ist es beispielsweise wichtig zu wissen, ob eine Beeinträchtigung der Teilnahme am Straßenverkehr zu erwarten ist, die Alkoholto- leranz verändert wird oder relevante Arzneimittel- interaktionen auftreten können.

Um möglichst klare und von anderen Störfak- toren (z. B. Begleiterkrankungen) unbeeinflusste Daten zu erhalten, wird durch eine sehr enge De- finition der Ein- und Ausschlusskriterien im Prüf- plan eine möglichst homogene Patientengruppe angestrebt. Da jedoch eine zu homogene Gruppe der realen therapeutischen Situation nicht mehr entspricht, muss ein Kompromiss gefunden wer- den, der einerseits signifikante wissenschaftliche Aussagen ermöglicht und andererseits eine noch ausreichende Ähnlichkeit mit der wesentlich in- homogeneren Gruppe aller möglichen späteren Pa- tienten gewährleistet. Zudem kann ein zu homo- genes Prüfkollektiv die Zulassung gefährden, weil die Daten als nicht ausreichend repräsentativ beurteilt werden und somit keine hinreichende therapeuti- sche Sicherheit garantieren.

Am Ende der klinischen Arzneimittelstudien der Phase II muss die Datenlage ausreichen, um einen Eintritt in die zeitlich und finanziell wesent- lich aufwändigere Phase III zu rechtfertigen.

Phase III-Studien

In den konfirmatorischen Phase-III-Studien sol- len die Ergebnisse der Phase II bestätigt und der therapeutische Nutzen der Prüfsubstanz eindeutig nachgewiesen werden (vgl. ■ Tab. 2.5). Um ausrei- chend Daten für die Zulassung zu erheben, wird die Substanz jetzt meist in großen multizentri- schen Studien an mehreren hundert bis tausend Patienten über längere Zeiträume (je nach Indika- tion bis zu mehreren Jahren) geprüft. Es müssen hierbei auch Erfahrungen mit den für die Erkran- kung typischen Nebendiagnosen berücksichtigt

und darüber hinaus Interaktionen mit dabei häufig eingesetzten anderen Medikamenten untersucht werden. Wenn für die zu prüfende Indikation eine Standardtherapie existiert, wird diese als ein Kontrollarm der Studien ebenso mitgeführt wie, wenn immer möglich, eine Placebokontrolle. Diese Kontrollgruppen sind zwingend auch notwendig, um das zweite Ziel der Phase III, die möglichst genaue Beschreibung der Art und Häufigkeit von UAWs, wissenschaftlich einwandfrei zu erreichen. Da UAWs möglicherweise erst sehr lange nach dem Therapiebeginn beobachtet werden, muss die Studiendauer v. a. bei Medikamenten für den chronischen Einsatz ausreichend lang sein (im Einzelfall bis zu mehreren Jahren). Trotz des enormen Aufwands ist es methodisch bedingt, dass seltene UAWs (Risiko ca. $< 1:1000$) auch in Phase III und damit vor der Zulassung in der Regel nicht erfasst werden können.

Eine große Herausforderung bei der Planung dieser Langzeitstudien hat neben der Biometrie auch die Einschätzung von Störfaktoren und der potenziellen *drop-out-rate* der Patienten, was wiederum die Dimensionierung der Prüfgruppen beeinflusst. Die Prüfung der therapeutischen Wirksamkeit etwa bei der chronischen rheumatischen Polyarthritid dauert mehrere Jahre und erfordert häufig zusätzliche Arzneimittel, Medikamentenwechsel, Dosisänderungen oder weitere ambulante und stationäre Behandlungen; es gehen damit eine Vielzahl von Parametern ein, die vor Beginn der Studie mit berücksichtigt werden müssen.

Mit dem Ende der Phase-III-Studien werden die vorliegenden Ergebnisse in einem Zulassungsantrag nach klar definierten Regeln zusammengefasst. Die eingereichten Unterlagen müssen eine eindeutige Beurteilung des Wirkmechanismus, der pharmakodynamischen und -kinetischen Daten, der therapeutischen Wirksamkeit im Vergleich zu bisherigen Standardtherapien, des Dosisbereichs, der Applikationsarten sowie der Verträglichkeit und der zu erwartenden Art und Häufigkeit von UAWs gestatten.

2.2.5 Phase IV: Therapeutische Anwendung nach der Zulassung

Nachdem die Zulassung erteilt wurde, darf das Arzneimittel unter den im Zulassungsbescheid festgelegten Auflagen vertrieben werden. Für eine umfassendere Beurteilung des neuen Medikaments unter therapeutischen Bedingungen werden Phase IV-Studien durchgeführt, für die prinzipiell die gleichen Vorschriften wie für die Phasen II und III gelten. Dieser hohe formale Aufwand zusammen mit dem Verbot, bei Phase IV-Studien den Handelsnamen zu verwenden, soll u. a. verhindern, dass diese Studien lediglich Marketingzwecken dienen. Die Ziele der Phase IV-Studien sind u. a. die **Beurteilung der Langzeitverträglichkeit** einschließlich des Auftretens seltener UAWs (Risiko $< 1:1000$) sowie der Vergleich des Nutzen-Risiko-Verhältnisses mit den für die Indikation zugelassenen Standardmedikamenten. Zu den weiteren Zielkriterien gehört in zunehmendem Maße die Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit in Relation zu den dadurch verursachten Kosten für das Gesundheitssystem.

Im Gegensatz zum Arzneimittelhersteller darf der behandelnde Arzt im Rahmen der ärztlichen Therapiefreiheit neue Medikamente unter seiner Verantwortung auch für andere nicht zugelassene Indikationen einsetzen, so genannter *off-label use*. Werden solche Indikationsausweitungen in klinischen Studien überprüft, würde man per definitionem eigentlich wieder in die Phasen II und III eintreten müssen. Aufgrund des fortgeschrittenen Entwicklungsstands und der reduzierten formalen Anforderungen werden solche klinischen Prüfungen häufig als Phase V-Studien bezeichnet.

V. a. aus Sicherheitsgründen ist die **kontinuierliche Überwachung** (Pharmakovigilanz) von Arzneimitteln nach der Zulassung unabdingbar. Hierzu sind die gesetzlichen Vorschriften v. a. bezüglich der Vorlage von periodischen Unbedenklichkeitsberichten (*periodic safety update report*, PSURs) in der 14. Novelle des AMG festgelegt worden. Zur Aufdeckung von UAWs im Rahmen der Pharmakovigilanz dienen im Wesentlichen epidemiologische Methoden wie Einzelfallmeldungen, Kasuistiken, Kohorten-Studien und Fall-Kontrollstudien. Die ersten beiden Methoden liefern auf-

grund ihrer Zufälligkeit eher Verdachtsmomente auf seltene UAWs und sind, u. a. weil nur wenige Ärzte UAWs routinemäßig melden, für den gesicherten Nachweis in der Praxis eher ungeeignet. Kohorten-Studien und Fall-Kontrollstudien sind, v. a. wenn sie unter den oben beschriebenen strikten methodischen Maßgaben von kontrollierten klinischen Prüfungen durchgeführt werden, zur Erfassung unbekannter und seltener UAWs besser geeignet. In den Mitgliedsstaaten der EU gibt es sowohl auf nationaler Ebene (Zulassungsbehörden) als auch auf europäischer Ebene (EMA und CPMP) entsprechende Meldesysteme, in denen auch der Datenaustausch zwischen den Behörden entsprechend organisiert ist. Weltweit übernimmt das Collaborating Center for International Drug Monitoring der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit Sitz in Uppsala (Schweden) eine führende Rolle bei der internationalen Erfassung von schwerwiegenden UAWs und der Weitergabe der Informationen.

Literatur

- Balkenhohl F, Bussche-Hünefeld C vd., Lansky A, Zechel A (1996) Kombinatorische Synthese von kleinen organischen Molekülen. In: *Angew Chem* 108: 2436–2488
- Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C, Reader V, Sweetman G, Bauer A, Bouwmeester T, Hopf C, Kruse U, Neubauer G, Ramsden N, Rick J, Kuster B, Drewe G (2007) Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. In: *Nat Biotechnol* 25: 1035–1044
- Barr AJ, Ugochukwu E, Lee WH, King ONF, Filippakopoulos P, Alfano I et al (2009) Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. In: *Cell* 136, 352–363
- Bleicher KH, Böhm HJ, Müller K, Alanine AI (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. In: *Nat Rev Drug Discov* 2, 369–378
- Böhm HJ, Klebe G (1996) Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen? *Angew Chem*, 108, 2750–2778
- Breinbauer R, Vetter IR, Waldmann H (2002) Von Protein-domänen zu Wirkstoffkandidaten – Naturstoffe als Leitstrukturen für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken. In: *Angew Chem* 116, 3002–3015
- Brenk R, Naerum L, Grädler U, Gerber HD, Garcia GA, Reuter K, Stubbs MT, Klebe G (2003) Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. In: *J Med Chem* 46, 1133–1143
- Burbaum JJ (1998) Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon? In: *DDT* 3, 313–322
- Burger A (1991) Isosterism and bioisosterism in drug design. In: *Fortschr Arzneimittelforsch* 37, 287–371
- Buss AD, Waigh RD (1995) Natural Products as Leads for New Pharmaceuticals. In: Wolff M (Hrsg) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. John Wiley & Sons, S. 983–1033
- Cahn A, Hepp P (1886) Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel. In: *Centralblatt für Klinische Medizin* 7, 561–564
- Cooper MA (2002) Optical biosensors in drug discovery. In: *Nat Rev Drug Discov* 1, 515–528
- Dearden JC (1990) Molecular Structure and Drug Transport. In: Ramsden CA (Hrsg) *Quantitative Drug Design*, Band 4 von: Hansch P, Sammes G, Taylor JB (Hrsg) *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, S. 375–411
- Estler CJ (1997) Arzneimittel im Alter. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Folkers G (Hrsg, 1995) Lock and Key – A Hundred Years After. Emil Fischer Commemorate Symposium. In: *Pharmaceutica Acta Helvetica* 69, 175–269 (1995)
- Gohlke H, Klebe G (2002) Ansätze zur Vorhersage und Beschreibung der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren. In: *Angew Chem* 114, 2764–2798
- Goldstein DM, Gray NS, Zarrinkar PP (2008) High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery. In: *Nat Rev Drug Discov* 7, 391–397
- Gonzalez JE, Oades K, Leychikis Y, Harootunian A, Negulescu PA (1999) Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. In: *DDT* 4, 431–439
- Goodford PJ (1984) Drug design by the method of receptor fit. In: *J Med Chem* 27, 557–564
- Greer J, Erickson JW, Baldwin JJ, Varney MD (1994) Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. In: *J Med Chem* 37, 1035–1054
- Grüneberg S, Stubbs MT, Klebe G (2002) Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation. In: *J Med Chem* 45, 3588–3602
- Günther J, Bergner A, Hendlich M, Klebe G (2003) Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. In: *J Mol Biol* 326, 621–636
- Gurrath M (2001) Der humane AT1-Rezeptor. In: *Pharm unserer Zeit*, 4, 288–295 (2001)
- C. Hansch and A. Leo, Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, Band 1, American Chemical Society, Washington, 1995
- Hanson MA, Stevens RC (2009) Discovery of new GPCR biology: One receptor structure at a time. *Structure* 17:8–14

- 26 Hertzberg RP, Pope AJ (2000) High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr. Op. Chem. Biol.* 4:445–451
- 27 Hughes WH (1974) Fleming and Penicillin. Priority Press Ltd., Hove, Sussex
- 28 Hylands PJ, Nisbet LJ (1991) The search for molecular diversity (I): Natural Products. *Ann. Rep. Med. Chem.* 26:259–269
- 29 Jenwitheesuk E, Horst JA, Rivas KL, Van Voorhis WC, Samudrala R (2007) Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening. *Trends in Pharmacological Sciences* 29:62–71
- 30 Klebe G (2001) Wirkstoffdesign bei der Entwicklung substratähnlicher HIV-Protease-Hemmstoffe. *Pharm. i. u. Zeit* 3:194–201
- 31 Klebe G (2009) Wirkstoffdesign. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- 32 Kubinyi H (1995) Lock and key in the real world: concluding remarks. *Pharmac. Acta Helv.* 69:259–269
- 33 Kubinyi H (1994) Der Schlüssel zum Schloss. II. Hansch-Analyse, 3D-QSAR und De novo-Design. *Pharmazie i. u. Zeit* 23:281–290
- 34 Kubinyi H (1993) QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. VCH, Weinheim
- 35 Kuntz ID (1992) Structure-based strategies for drug design and discovery *Science* 257:1078–1082
- 36 Kutter E (1978) Arzneimittelentwicklung. Grundlagen - Strategien - Perspektiven. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 37 Lichtenthaler FW (1994) Hundert Jahre Schlüssel-Schloss-Prinzip: Was führte Emil Fischer zu dieser Analogie? *Angew. Chem.* 106:2456–2467
- 38 Lipinski CA (1986) Bioisosterism in drug design. *Ann. Rep. Med. Chem.* 21:283–291
- 39 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23:3–25
- 40 Lipnick RL (1990) Selectivity. In: Kennewell PD (Hrsg) General Principles, Bd 1 von: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB (Hrsg) Comprehensive Medicinal Chemistry. Pergamon Press, Oxford, S. 239–247
- 41 Mager PP (1987) Zur Entwicklung von bioaktiven Leitstrukturen. Versuch einer Systematik. *Pharmazie i. u. Zeit* 16:97–121
- 42 Müller G (2000) Toward 3D structures of G protein-coupled receptors: A multidisciplinary approach. *Curr. Med. Chem.* 7:83–95
- 43 Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralto E, Jahnke W, James TL, Homans SW, Kessler H, Luchinat C, Meyer B, Oschkinat H, Peng J, Schwalbe H, Siegal G (2008) Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:738–745
- 44 Prabhakar KJ, Francis PA, Woerner J, Chang CH, Garber SS, Anton ED, Bachelier LT (1997) Cyclic urea amides: HIV-1-protease inhibitors with low nanomolar potency against both wild type and protease inhibitor resistant mutants of HIV. *J. Med. Chem.* 40:181–191
- 45 Reinhardt CA (1994) (Hrsg), Alternatives to Animal Testing. VCH, Weinheim
- 46 Roberts RM (1989) Serendipity. Accidental Discoveries in Science., John Wiley & Sons, New York
- 47 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467–470
- 48 Schwalbe H, Wess G (2002) Dissecting G-protein-coupled receptors: structure, function, and ligand interactions. *ChemBioChem* 2:915–1016
- 49 Sneader W (1990) Chronology of Drug Introductions. In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB (Hrsg) Comprehensive Medicinal Chemistry. Pergamon Press, Oxford, S. 7–80
- 50 Spezial-Heft: Proteomics and Drug Development'. Biospektrum, September 2002
- 51 de Stevens G (1986) Serendipity and structured research in drug discovery. *Fortschr. Arzneimittelforsch.* 30:189–203
- 52 Stubbs MT (2006) Protein ligand interactions studied by X-ray. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- 53 Stryer L (2003) Biochemie. 5. Aufl. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2003, S. 236–238
- 54 Sundberg SA (2000) High-throughput and ultrahigh-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr. Op. Biotech.* 11:47–53
- 55 Tempesta MS, King SR (1994) Ethnobotany as a source for new drugs. *Ann. Rep. Med. Chem.* 29:325–330
- 56 Thornber CW (1979) Isosterism and molecular modification in drug design. *Chem. Soc. Rev.* 8:563–580
- 57 Todd MJ, Luque I, Velázquez-Campoy A, Freire E (2000) Thermodynamic basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: calorimetric analysis of the V82F/I84 V active site resistant mutant. *Biochemistry* 39:11876–11883
- 58 Turk B (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:785–799

Die Pharmaindustrie

Einblick - Durchblick - Perspektiven

Fischer, D.; Breitenbach, J. (Hrsg.)

2013, XIX, 360 S. 77 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-662-54655-0