

Moderne Arzneimittelentwicklung mit molekular- und zellbiologischen Methoden

Johannes Döhmer

Technische Universität München und GenPharmTox BioTech AG, D-Martinsried

Zusammenfassung

V79-Zellen sind gentechnologisch verändert worden, um den Stoffwechsel des Menschen für Arzneimittel und Chemikalien untersuchen zu können. Alle V79-Konstrukte zusammen bilden die V79-Zellbatterie als Plattform-Technologie der GenPharmTox BioTech AG, Martinsried, Deutschland, mit der sich insbesondere während der präklinischen Entwicklungsphase von Arzneimitteln Daten gewinnen lassen, die von unmittelbarer Relevanz für die klinische Prüfungsphase sind und die so aus Tierversuchen nicht zu gewinnen wären. Insbesondere wird hiermit die Unsicherheit bei der Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf den Menschen umgangen.

Summary: Modern drug development by molecular and cellbiological methods

V79 cells have been genetically modified for metabolism functions of humans in drug metabolism and metabolic activation of chemicals. All V79 constructs together form the V79 Cell Battery by which GenPharmTox BioTech AG, Tutzing, Germany, is capable of checking drug metabolism early on during preclinical drug development with immediate relevance for the clinical testing of drugs. It is impossible to obtain those data from animal testing. Therefore, the intrinsic problems in extrapolating data generated from animal testing to humans has been circumvented.

Keywords: V79 cells, drug metabolism, animal testing

1 Beweggründe zur Gründung der GenPharmTox BioTech AG

Glück und Zufall waren in der Vergangenheit die bestimmenden Faktoren in der Entwicklung von Arzneimitteln und Chemikalien. Aspirin, Valium oder Valproinsäure sind Beispiele hierfür. Glück und Zufall waren daher die Grundlage für die nachhaltige Existenz und Entwicklung von pharmazeutischen und chemischen Unternehmen. So wurden von Chemikern und Pharmazeuten üblicherweise neue Substanzen hergestellt und am Hund getestet. Je nachdem ob der Hund dann ein Herzrasen bekam oder schläfrig wurde, hatte man eine sogenannte Lead-Substanz für ein Herzmittel oder ein Beruhigungsmittel gefunden. Die Art der pharmakologischen Wirkung und Wirksamkeit war aber immer reine Glücksache und entsprach vor allem nicht immer unbedingt der Wirkung beim Menschen. Trotzdem gingen aus diesem Prozess sehr potente Medikamente hervor, zum Teil aber mit erheblichen Nebenwirkungen. Das technische und strategische Szenario für die Entwicklung neuer Arzneimittel und Chemikalien hat sich aber mittlerweile aber auf der Basis rationaler Ansätze verändert und erlebt

derzeit eine stürmische und revolutionäre Entwicklung durch die technologischen Möglichkeiten aus der Molekularbiologie, der Gentechnologie, der synthetischen/analytischen Chemie und IT. GenPharmTox BioTech AG spielt bereits eine führende Rolle in dieser Entwicklung.

Die Mission der GenPharmTox BioTech AG ist es:

- Tierversuche aus ethischen, wissenschaftlichen und ökonomischen Gründen zu ersetzen;
- Entwicklungszeiten von Arzneimitteln und Chemikalien zu reduzieren;
- Klinische Prüfungen gezielter und kostengünstiger zu gestalten;
- Arzneimittel-/Chemikalien-Sicherheit zu erhöhen.

Die GenPharmTox BioTech AG bietet die Prüfung von Arzneimitteln und Chemikalien an, sowohl mit gentechnologisch konstruierten Zellkulturen (V79-Zellbatterie) mit besonderem prädikativem Wert für den Menschen in Kombination mit humanen Leberproben als auch einem bakteriellen Testsystem, dem sogenannten Ames-Test und seiner gentechnologischen Variante, dem Super-Ames-Test.

Die GenPharmTox BioTech AG ist eine Ausgründung der Technischen Universität München. Der Geschäftsplan wurde seit November 1999 im Rahmen des Münchener Businessplan Wettbewerbs entwickelt und auf allen 3 Stufen prämiert (www.mbpw.de). Die notarielle Gründung erfolgte im April 2000 mit anschließender Eintragung in des Handelsregister Amtsgericht München. Die Firma wird ab 1. Februar 2001 in Martinsried, Bayern, dem europäisch bedeutsamsten Ort für BioTech-Startups, tätig werden.

2 Das Problem der Pharmazeutischen und Chemischen Industrie

Die Entwicklungskosten mit bis zu 1 Mrd. DM pro vermarktetem Arzneimittel sind heute schon extrem hoch und werden in den nächsten sieben Jahren noch dramatisch ansteigen. Es wird zukünftig immer schwieriger werden, diese Kosten am Markt zu erlösen. Schnelligkeit und Effizienz bei der Entwicklung bis zur Zulassung sind die entscheidenden Wettbewerbsvorteile. Es ist daher das Gebot der Stunde, neue Wege zu gehen, um hunderte von Millionen DM an Entwicklungskosten einzusparen, die Entwicklungszei-

ten um Jahre drastisch zu reduzieren, gleichzeitig aber die Sicherheit für den Menschen zu erhöhen, um mit wirksamen und sicheren Arzneimitteln schneller als der Wettbewerber am Markt zu sein. Durch eine derartige Strategie erhöht sich die Chance für das Unternehmen mit einem sogenannten „Blockbuster“ die gewaltigen Entwicklungskosten zu erlösen und darüberhinaus den Gewinn zu erwirtschaften, der als Grundlage für die Investitionen neuer Entwicklungen erforderlich ist. Somit wird der rechtzeitige Einsatz rationaler Werkzeuge - wie das der V79-Zellbatterie - in der Arzneimittel-Entwicklung der entscheidende Faktor für die Überlebensfähigkeit eines jeden forschenden Pharma-Unternehmens in der Zukunft sein (Abb. 1).

3 Überlegenheit zu Tierversuchen

Tierversuche werden zwar häufig zur Aufklärung des Stoffwechsels eingesetzt, in Fachkreisen ist allerdings bekannt, dass die Übertragung auf den Menschen vielfach problematisch ist, weil sich Tier und Mensch in den Enzy-

men häufig unterscheiden (Seidel et al., 2000; Abb. 2). So ist die Maus weder ein kleiner Mensch noch ist der Mensch eine große Maus, trotz mehr als 90%iger genetischer Identität. Auch der Zebrafisch ist kein kleiner Mensch mit Flossen. Es wird auch weiterhin so bleiben, dass Ergebnisse aus Tierversuchen ohne klinische Prüfung auf den Menschen nicht übertragbar sind. Das Handicap der Übertragbarkeit bleibt trotz moderner gentechnologischer Möglichkeiten der Keimbahn-Veränderung, wie sie an Maus und Zebrafisch im großen Stil praktiziert wird. Der Ansatz ignoriert völlig die Konsequenz genetischer Unterschiede und findet seinen Ursprung in einem besonders in der Genetik weit verbreiteten Reduktionismus: „What is true for *E.coli* is true for the elephant“. Unternehmen, deren geschäftliche Basis ausschliesslich Tierversuche und Tiermodelle als Krankheitsmodelle sind, gehen daher ein gewaltiges Risiko ein. Siehe auch F.A.Z. vom 31. Mai 2000, Nr. 126, Seite N3: „Wirkstoff schädigt Leberzellen / Irreführung durch Tierversuche“.

Hingegen konnten wir durch die Verwendung von Genen des Menschen in der gentechnologischen Konstruktion und Anwendung der V79-Zellbatterie für den Stoffwechsel wiederholt zeigen, dass unsere Ergebnisse prädikativen Wert für den Menschen haben, z.B. für bereits am Markt befindliche Arzneimittel Tamoxifen, Bufuralol, Midozalam aber auch Entwicklungssubstanzen. Dabei ist entscheidend, dass sich diese für den Menschen relevanten Ergebnisse bereits erzielen lassen, lange bevor ein neu entwickeltes Arzneimittel in der Klinik am Menschen getestet und auf dem Markt ist. Dies gilt für Chemikalien in der Produktion von Kosmetika, Gebrauchs-, Nahrungs- und Genussmitteln genauso. Bei Entwicklungszeiten von 12 – 15 Jahren von der vorklinischen über die klinische Phase bis zur Vermarktung ist die Gefahr einer Fehlinvestition entsprechend groß, sollten sich erst in der klinischen Phase oder sogar erst am Markt die Nachteile einer Substanz für den Menschen herausstellen. Wegen dieser Fehlinvestitionen liegen die Entwicklungskosten pro Arzneimittel bei 1 Mrd. DM, mit steigender Tendenz. Aber auch Zeitverlust in der Entwicklung und Zulassung verursacht massive Probleme, da verspäteter Marktzugang zugleich verringerte Chance bedeutet, die Entwicklungskosten am Markt zu erlösen. Probleme beim Menschen, die erst in der Vermarktungsphase erkannt werden, führen zudem durch Produkt-Rückruf zu einem ersten Image-Schaden.

Der rechtzeitige Einsatz der V79-Zellbatterie wird einen entscheidenden Beitrag leisten, diesen Problemen zu begegnen, indem vielversprechende Entwicklungs-Kandidaten unter den Substanzen im Sinne eines *Drug Discovery Support* (DDS) richtig und frühzeitig ausgewählt werden. Darauf basierend können dann Tierversuche und Klinische Prüfungen am Menschen gezielter und somit zeit- und kostensparender angegangen werden. Die Vorteile aus diesem neuartigen strategischen Ansatz in der frühen Entwicklungsphase werden in der chemischen und pharmazeutischen Industrie immer mehr erkannt. Aber auch Zulassungsbehörden, wie die *Food and Drug Administration* (FDA) legen zunehmend Wert auf die Verwendung gentechnologisch konstruierter Zellen mit besonderem prädikativen Aussagewert für den Menschen, weil sich

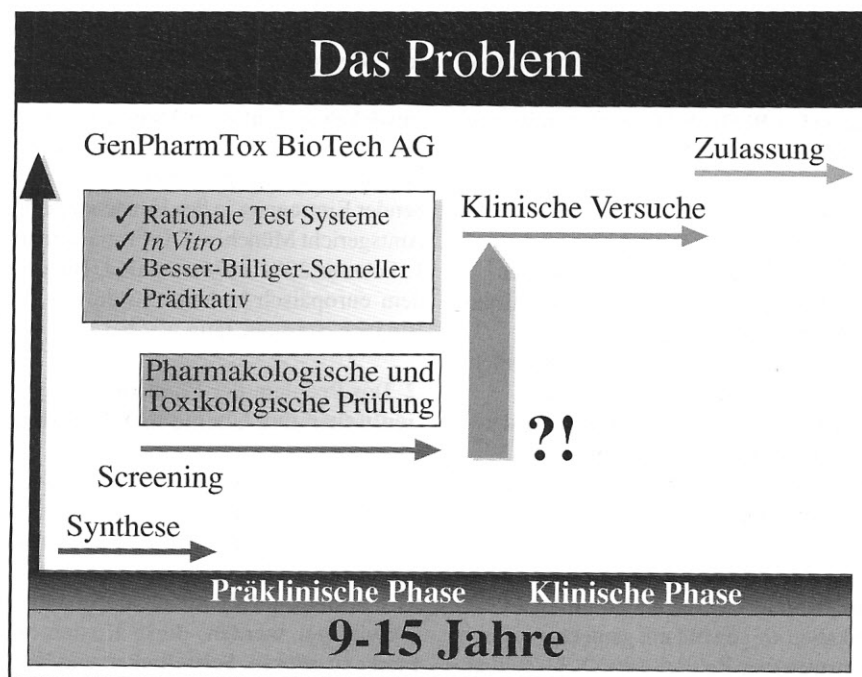


Abb. 1: Das derzeitige Szenario der Arzneimittel-Entwicklung mit besonderer Darstellung des Problems der Entwicklungskosten und -zeit und der Gefahr der falschen Auswahl einer Entwicklungssubstanz beim Übergang von der präklinischen in die klinische Prüfungsphase. Die besondere Aufgabe der GenPharmTox BioTech liegt darin, die Datenlage für diesen Übergang entscheidend zu verbessern.

hierdurch die Arzneimittel-Sicherheit verbessern läßt.

So sind die Anzahl der Tierversuche durch die Biotechnologie bereits drastisch zurückgegangen, besonders durch den zunehmenden Einsatz molekularbiologischer Methoden. Nach Auskunft des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) sank allein im Arzneimittelbereich die Zahl der Versuchstiere zwischen 1977 und 1997 von 4,3 Millionen auf 700.000. Entscheidenden Anteil an dieser Entwicklung hat die „Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ am BgVV (ZEBET). Der Start zur Konstruktion der V79-Zellbatterie mit humanen Genen für Cytochrome P450 war das bislang größte Projekt (1990-1993), das ZEBET je gefördert hat.

Vergleichbare Test-Systeme sind Kulturen von Leberzellen aus frisch präparierter Leber, gentechnologisch entwickelte Zellkulturen auf der Basis von humanen Lymphomzellen, beispielsweise AHH1-Zellen oder den sogenannten HepG2-Zellen, CHO-Zellen oder HeLa-Zellen. Jedes dieser Systeme hat erhebliche Nachteile gegenüber dem V79-System aus belegbaren Gründen:

- mangelnde Verfügbarkeit, insbesondere steht humane Leber bester Qualität in allererster Linie nur für Transplantationen zur Verfügung;
- geringe Stabilität und/oder große Variabilität in der Enzymausstattung von kultivierten Leberzellen und anderen Zellen – zum Teil sogar unbekannt -, somit keine Möglichkeit zur Standardisierung;
- kein oder extrem langsames Wachstum der Zellen begleitet von genetischer Instabilität, somit keine oder geringe Möglichkeit zu zytotoxischen, mutagenen, chromosomalen und gentoxischen Prüfungen;
- kein sauberer Cytochrom P450-freier Hintergrund, wie in V79-Zellen, somit keine Möglichkeit zur eindeutigen Zuordnung von Enzym, Stoffwechselprodukt und Wirkung.

Die Funktionalität und Stabilität der V79-Zellbatterie ist belegt durch eine Vielzahl von Veröffentlichungen aus eigenen Arbeiten, aus Kooperation mit anderen Forschungseinrichtungen und mit verschiedenen Unternehmen der pharmazeutischen und chemischen Industrie, so-

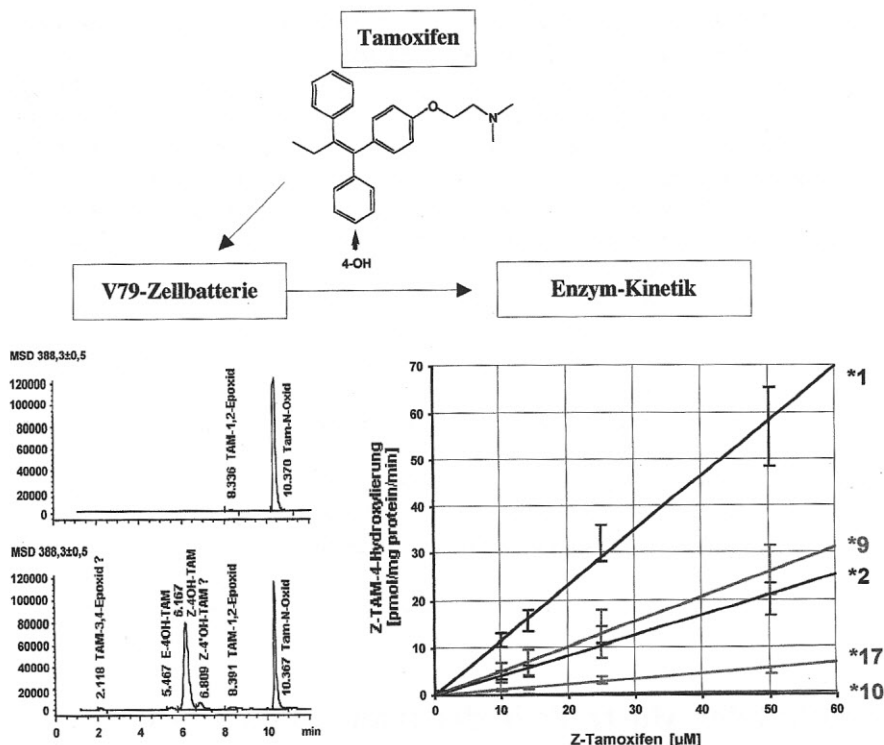


Abb. 2: Der Einfluß des genetischen Polymorphismus auf die metabolische Aktivierung des Brustkrebs-Therapeutikums Tamoxifen, ermittelt durch und dargestellt mit gentechnologisch konstruierten V79-Zellen zur Abbildung dieses genetischen Polymorphismus in der weltweiten Bevölkerung.

Mutagenität (HPRT-Test)

Substanz

Mutations Rate

x 1 Mio. V79-Zellen / (nmol/ml)

Db[a,l]p ohne Enzyme

0,38

Db[a,l]p mit Ratten-Enzyme

49

(-)-Db[a,l]p-11,12-diol mit Ratten-Enzyme

128

(-)-Db[a,l]p-11,12-diol mit Mensch
CYP1A1 in V79MZh1A1

97.300

(-)-Db[a,l]p-11,12-diol mit Mensch
CYP1B1 in V79MZh1B1

618.000

Abb. 3: Der Spezies-Unterschied zwischen Enzymen der Ratte und des Menschen in der metabolischen Aktivierung von Dibenzo[a,l]pyren, eines polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes in seiner Erbgut-verändernden Potenz.

wie durch Validierungsstudien auf nationaler und europäischer Ebene (Doehmer et al., 1999). Auf nationaler Ebene wurde die V79-Zellbatterie im Rahmen eines bis Februar 2001 durch das BMBF geförderten Verbundvorhabens „Die Nutzung hepatischer Funktionen für *in vitro* Verfahren zur Prüfung von Stoffen mit dem Ziel der Einsparung von Tierversuchen“, Teilprojekt 4, Förderkennzeichen 0311259 geprüft, dessen Phase III zur Zeit unter massgeblicher Beteiligung von Johannes Döhmer als einem der drei Koordinatoren vorbereitet wird. Auf europäischer Ebene erfolgte die Prüfung durch das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) am *Joint Research Centre* der EU in Ispira im Rah-

men eines Prävalidierungsabkommens „*Performance Evaluation of an In Vitro Cytochrome P450 mediated Toxicity Screening System in View of the Prevalidation Phase*“, Contract No. 13508-97-12-10, das erst kürzlich im Dezember 1999 erfolgreich beendet wurde. Die kooperative und strategische Verbindung zu ECVAM (Michael Balls und Sandra Coecke) bleibt nach außerordentlich positiver Erfahrung und Interesse an weiteren Entwicklungen bei beiden Partnern bestehen.

Literatur

Doehmer, J., Buters, J. T. M., Luch, A., Soballa, V., Baird, W. M., Morrisson, H., Stegeman, J. J., Townsend, A. J., Green-

lee, W. F., Glatt, H. R., Seidel, A., Jacob, J., and Greim, H. (1999). Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metabolism Reviews* 31, 423-435.

Seidel, A., Döhmer, J. und Jacob, J. (2000). Spezies-abhängiger Metabolismus von PAKs. *Bioforum* 23, 490-494.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Johannes Döhmer
GenPharmTox BioTech AG
Fraunhofer Str. 9
D-82152 Martinsried
Tel. +49-173-386 41 45
Fax: +49-89-89 52 18 18
E-mail: doehmer@lrz.tum.de



Poster

Einfluß der Mastzelle in der frühen Phase des Neurofibromwachstums

Bernd Algermissen, Sabine Hüske, Agnes Großewinkelmann, Basil Jamil, Uwe Müller und Hans-Peter Berlien

Abt. für Lasermedizin, Krankenhaus Neukölln, D-Berlin, lasermed@knk-berlin.de

Einleitung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) mit einer Prävalenz von 1:3500-1:4000 ist die häufigste hereditäre Systemerkrankung. Typisch ist die Entwicklung von bis zu mehreren tausend Neurofibromen (NF). Die Pathogenese der Neurofibromentstehung und das rasche Wachstum nach mechanischen Traumen oder Rezidiventwicklung nach incompletter chirurgischer Entfernung ist unbekannt. Neben Schwannzellen, Perizyten und Fibroblasten-ähnlichen Zellen findet sich im Neurofibrom eine deutliche Vermehrung von Gefäßen und Mastzellen, die eine wesentliche Rolle bei der Neurofibromentstehung spielen sollen. Gegenstand der Arbeit war, die frühen Veränderungen in traumatisierten NF aufzuzeichnen und die Befunde im HET-CAM Modell nachvollziehen.

Material und Methoden

I. 4 kutane Neurofibrome wurden alle am vierten Tag nach zufälliger, mechanischer Traumatisierung laserchirurgisch entfernt und formalinfixierte Gewebeschnitte der NF histologisch (HE/Giemsa) und immun-

histochemisch (ABC-System, DAKO) angefärbt.

II. Fragmente von Neurofibromen (n=20) wurden auf die Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnereiern (5. Bebrütungstag) transplantiert und die Veränderungen der CAM und des NF-Fragmentes zeitabhängig histologisch und immunhistologisch untersucht

Ergebnisse

Traumatisierte Neurofibrome:

Im Bereich der Traumatisierungen fanden sich eine Hyperämie, degranulierte Mastzellen sowie eine Induktion der Angiogenese bei ansonsten unauffälligem histologischem Befund.

NF/HET-CAM-Modell:

Bereits 6 Stunden nach Transplantation bestand eine starke Adhäsion der NF-Fragmente mit der CAM sowie degranulierte Mastzellen im Bereich der Kontaktstelle zwischen CAM und NF. Nach 24 Stunden bildete sich eine Hyperplasie des meso- und ektodermalen Anteils der CAM und eine deutliche Gefäßvermehrung innerhalb der CAM aus. Die Mastzellen sind im Bereich

der Kontaktstelle fast vollständig degranuliert. Am 3.-4. Tag infiltrieren CAM-Gefäße das Neurofibromfragment und erste zarte Gefäße sind makroskopisch erkennbar. Am 5.-6. Tag infiltrieren S100-pos. Zellen (Schwannzellen) die CAM und multiple, teils großvolumige Gefäße mit kernhaltigen Erythrozyten durchziehen das NF.

Diskussion/Zusammenfassung

Traumatisierte NF weisen eine erhöhte Proliferationstendenz auf. Der Mechanismus dieses plötzlichen Wachstums ist ungeklärt. Bereits Riccardi vermutete, daß die Mastzelle eine Rolle spielen könnte und untersuchte die Wirkung von Ketotifen als „Mastzellstabilisator“ auf das Wachstumsverhalten der NF, konnte aber in kontrollierten Studien außer typischen Nebenwirkungen eines Antihistaminikums keine signifikanten Effekte auf das Wachstum der NF belegen. Aufgrund fehlender Tiermodelle können andere Substanzen, wie z.B. die Cromoglicinsäure, bisher nur „am Patienten“ evaluiert werden. Das hier vorgestellte NF/HET-CAM Modell spiegelt nicht nur die analogen Veränderungen von traumatisierten NF wider, sondern ermöglicht einerseits die Analyse von Mechanismen und Mediatoren, die in der frühen Phase der Wachstumsinduktion eine Rolle spielen, und andererseits können die Effekte einer gezielten pharmakologischen Blockade von Mediatoren oder deren Freisetzung auf das Wachstumsverhalten von Neurofibromen getestet werden.