

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Speziesauswahl in der Neurowissenschaft bei toxikologischen
Studien: Retrospektive Evaluierung der speziesspezifischen
Sensitivität für neurologische Symptome beim Nichtnager

von Kathrin Andrea Backes
aus Heilbronn

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt bei AbbVie Deutschland GmbH&Co.KG, Ludwigshafen am Rhein
Mentorin: Dr. med. vet. Katja Hempel

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferentin: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Literaturübersicht	5
1. Die Arzneimittelentwicklung.....	5
1.1 Forschung und Wirkstoffsuche	6
1.2 Präklinische Arzneimittelentwicklung.....	7
1.2.1 Pharmakokinetik.....	7
1.2.2 Toxikologie.....	8
1.3 Klinische Prüfung und Zulassung (Phasen I-IV)	12
1.4 Entwicklung von Tierarzneimitteln	14
1.5 Neurologische Indikationsgebiete der evaluierten Substanzen	16
2. Tiermodelle.....	20
2.1 Der Hund.....	20
2.1.1 Allgemeines.....	20
2.1.2 Vor- und Nachteile des Hundes als Versuchstier	25
2.1.3 Der Hund als Versuchstier in der Neurowissenschaft	26
2.2 Der Affe	27
2.2.1 Allgemeines.....	27
2.2.2 Vor- und Nachteile des Affen als Versuchstier	32
2.2.3 Der Affe als Versuchstier in der Neurowissenschaft	33
2.3 Das Minipig.....	34
2.3.1 Allgemeines.....	34
2.3.2 Vor- und Nachteile des Minipigs als Versuchstier	40
2.3.3 Das Minipig als Versuchstier in der Neurowissenschaft.....	43
2.4 Übersichtstabelle Nichtnagerspezies (Hund, Affe, Minipig) vergleichend.....	44
2.5 Weitere Tiermodelle	47
2.5.1 Das Kaninchen.....	47
2.5.2 Das Frettchen	50
3. Kriterien der Versuchstierauswahl	53
3.1 Gesetzliche Vorgaben.....	54
3.2 Ethische Aspekte.....	58
3.3 Wissenschaftliche Aspekte	60
3.4 Weitere Aspekte.....	64
3.5 Gegenwärtige Praxis der Versuchstierauswahl	65
3.6 Speziespezifische Sensitivität für neurologische Symptome beim Nichtnager.....	67
4. Prädiktivität von Tiermodellen für Toxizität im Menschen.....	68
4.1 Die Rolle des Nichtnagers	71
4.2 Der prädiktive Wert von Tierstudien für neurologische Symptome	73
III. Material und Methoden	76
1. Literaturrecherche	76
2. Retrospektive Datenauswertung.....	76
2.1 Studienbedingungen und Studientypen	77
2.2 Applikationswege	78
2.3 Evaluierte Parameter in toxikologischen Studien.....	78
2.4 Klinische Symptome in toxikologischen Studien.....	79
2.5 Erstellung der Datenbasis.....	80
2.6 Auswertung.....	80
2.7 Definition: Empfindlichere Spezies im Rahmen dieser Arbeit	81
3. Statistische Auswertungen.....	82
IV. Ergebnisse	83
1. Literaturrecherche	83
2. Retrospektive Datenauswertung.....	86
2.1 Datenlage	86

2.2 Neurologische Symptome	88
2.2.1 Neurologische Symptome bei allen Spezies (Nager und Nichtnager)	88
2.2.2 Neurologische Symptome beim Nichtnager	89
2.3 Substanz D	92
2.3.1 Neurologische Symptome beim Nichtnager (Substanz D)	92
2.3.2 Neurologische Symptome in Relation zum Blutplasmaspiegel.....	93
3. Plasmaproteinbindungsdaten	101
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	102
V. Diskussion.....	106
1. Speziesspezifische Prädisposition für neurologische Symptome	106
2. Der prädiktive Wert von Tierstudien für neurologische Symptome im Menschen .	109
3. Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen	111
4. Neurologische Symptome in Relation zum Blutplasmaspiegel und speziesspezifische Unterschiede.....	114
5. Versuchstierauswahl	117
6. Die Plasmaproteinbindung	119
7. Grenzen dieser Arbeit.....	119
8. Ausblick	121
VI. Zusammenfassung	124
VII. Summary.....	126
VIII. Tabellenverzeichnis	128
IX. Abbildungsverzeichnis	129
X. Literaturverzeichnis	130
XI. Danksagungen	143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung (en)
ABPI	<i>Association of the British Pharmacology Industry</i>
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
ADME	<i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion</i>
AMG	Arzneimittelgesetz
AUC	<i>area under the curve</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cynomolgus-Affe
ca.	circa
CD28	<i>cluster of differentiation 28</i>
C _{max}	<i>maximum plasma concentration</i>
CVM	<i>Center for Veterinary Medicine</i>
CYP	Cytochrom P
d.h.	das heißt
DDC	<i>drug development candidate</i>
DMPK	<i>drug metabolism and pharmacokinetics</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
e.g.	<i>for example</i> , zum Beispiel
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
et al.	et alii
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIH	<i>first in human</i>
fMRI	<i>functional magnetic resonance imaging</i>
fup	<i>fraction unbound in plasma</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> , Gamma-Amino-Buttersäure
ggf.	gegebenenfalls
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i>
GV-SOLAS	GV = Gesellschaft für Versuchstierkunde, SOLAS = <i>Society for Laboratory Animal Sciences</i>
ha	Hektar
HED	<i>human equivalent dose</i>
hr	<i>hour</i>
i.d.R.	in der Regel

IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
IARC	<i>International Agency for Research in Cancer</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFAH	<i>International Federation for Animal Health</i>
Inc.	<i>Incorporation</i>
inkl.	<i>inklusive</i>
IQ-consortium	<i>Innovation and Quality consortium</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
LOAEL	<i>lowest observed adverse effect level</i>
LOEL	<i>lowest observed effect level</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
M	<i>Marmoset-Affe</i>
m ²	<i>Quadratmeter</i>
mg	<i>Milligramm</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
miRNA	<i>micro ribonucleic acid, micro Ribonukleinsäure</i>
MRSD	<i>maximum recommend starting dose</i>
MTD	<i>maximum tolerated dose</i>
NADA	<i>new animal drug application</i>
NHP	<i>non-human primate</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
NOEL	<i>no observed effect level</i>
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug(s)</i>
o.ä.	<i>oder ähnlich</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
ONADE	<i>Office of New Animal Drug Evaluation</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PK	<i>Pharmakokinetik</i>
PMDA	<i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i>
PPB	<i>plasma protein binding</i>
3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
R	<i>Rhesus-Affe</i>
rel.	<i>relative</i>
SD	<i>standard deviation, Standardabweichung</i>
sog.	<i>sogenannt(e)</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
Std	<i>Stunde(n)</i>

T_{\max}	<i>time to maximum plasma concentration</i>
TierSchHuV	Tierschutz-Hundeverordnung
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung(en)
USA	<i>United States of America</i>
USDA	<i>U.S. Department of Agriculture's Animal Welfare</i>
V.	Vena
v.a.	vor allem
vEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. Einleitung

Im Bereich der Neurowissenschaften besteht für Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie oder Multiple Sklerose ein großer Bedarf an wirksamen Medikamenten. Für solche Krankheiten existieren bisher noch wenige bis keine geeigneten Behandlungsmöglichkeiten (Jiang et al., 2015); sie bedeuten eine hohe Belastung der Patienten und ihrer Umwelt in ihrem Alltag und führen zu erheblichen Einschränkungen der Betroffenen bis hin zum Tod (Emsley, 2009) (Heemskerk et al., 2012) (Coleman & Barrow, 2012) (Rubin, 2013). Neben der psychischen Belastung der Patienten und ihrer Angehörigen spielen auch der pflegerische Aufwand und damit volkswirtschaftliche Aspekte eine große Rolle. Durch die sich verändernde Altersstruktur in der Gesellschaft gewinnen diese Bereiche zunehmend an Bedeutung (Kanwar et al., 2012) (Coleman & Barrow, 2012) (Jiang et al., 2015). Während auf der einen Seite ein großer Bedarf an wirksamen Medikamenten für neurodegenerative Erkrankungen besteht, ist die Anzahl der pharmazeutischen Firmen, die in diesem Bereich Forschung betreiben, überschaubar (Coleman & Barrow, 2012). Die Entwicklung von Substanzen für neurologische Erkrankungen ist langwierig und der genaue Pathomechanismus vieler neurodegenerativer Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer oder Multiple Sklerose bisher ungeklärt (Schoepp, 2011) (Kanwar et al., 2012) (Coleman & Barrow, 2012) (Rubin, 2013) (Jiang et al., 2015). Auch fehlen teilweise adäquate Tiermodelle, die die pharmakologisch sichere Übertragbarkeit der Wirksamkeit von Substanzen vorhersagen können (LaFerla & Green, 2012). Eine Beurteilung der Wirksamkeit ist damit erst in den klinischen Studien am Mensch möglich, was die Entwicklung langwierig, teuer und risikoreich macht, im Gegensatz zu Tierarzneimitteln, wo Modelle mit großer prädiktiver Validität vorhanden sind, da direkt in der Zielspezies getestet werden kann (Lathers, 2003).

Wegen der schwierigen Vorhersagbarkeit der Wirksamkeit ist ein ausreichendes Sicherheitsprofil mit möglichst großer therapeutischer Breite notwendig, um eine risikoarme Testung im Menschen zu erlauben. Essentiell ist dafür eine genaue Charakterisierung des Nebenwirkungsprofils der Arzneimittelkandidaten im Tier.

In der Arzneimittelentwicklung ist daher für Wirkstoffe aus der Gruppe der niedermolekularen Verbindungen (sog. *small molecules*) gesetzlich vorgeschrieben neue

Wirkstoffkandidaten sowohl an einem Nager als auch an einem Nichtnager zu testen (ICH Guideline M3(R2), 2009), um in den darauffolgenden klinischen Studien und nach der Zulassung die Sicherheit für den Menschen zu gewährleisten. Um diesen Ansprüchen an die Sicherheit nachzukommen, fordern die Zulassungsbehörden die Verwendung der empfindlichsten Spezies in Bezug auf die Testsubstanz (*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (FDA, 2005)).

Neben der Ähnlichkeit im Stoffwechsel einer Substanz zwischen verschiedenen Spezies (einschließlich des Menschen) liegt im Bereich der Neurowissenschaften hierbei ein Schwerpunkt u.a. auf der Bewertung von neurologischen Symptomen in den toxikologischen Studien. Einer der Gründe dafür ist, dass hier Arzneimittelkandidaten getestet werden, die neurologische Symptome behandeln sollen und bei denen somit auch mit Nebenwirkungen neurologischer Art bei hohen Dosen zu rechnen ist. Auch von gesetzlicher Seite wird die Evaluierung toxischer Effekte auf das zentrale Nervensystem im Rahmen der sicherheitspharmakologischen Studien eindeutig gefordert (ICH Guideline S7A, 2000).

Die Auswahl einer geeigneten Nichtnagerspezies in toxikologischen Studien ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Von den üblicherweise verwendeten drei Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig sind Hunde (Beagle) und Affen (*Cynomolgus*) traditionell die am häufigsten genutzten Tierarten in toxikologischen Studien (Smith & Trennery, 2002) (Jacobs, 2006). Laut der 2013 veröffentlichten Statistik der Europäischen Kommission wurden im Jahre 2011 insgesamt 7488 Hunde und 3435 Affen (Alt- und Neuweltaffen) in der Toxikologie und Sicherheitspharmakologie eingesetzt¹. Aussagekräftige Daten, anhand derer die drei Nichtnagerspezies hinsichtlich ihrer speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome verglichen werden könnten, sind in der internationalen Literatur zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu finden. Lediglich für den Beagle wird eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft beschrieben (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011).

¹ Tabelle 2.1 'Number of animals used in experiments for selected purposes' des siebten Berichts über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere der Europäischen Kommission, 2013.

In diesem Zusammenhang ist auch der prädiktive Wert von Tierstudien für den Menschen ein kontrovers diskutiertes Thema in der Arzneimittelentwicklung (Owens, 1962) (Schein, 1970) (Zbinden, 1991) (Broadhead et al., 2000) (Greaves et al., 2004) (Jolivet & Ward, 2005) (Matthews, 2008) (van Meer et al., 2012) (Bailey et al., 2013). Einerseits hat sich der hohe prädiktive Wert von *in vivo* Studien im Nichtnager bezüglich der Sicherheit für den Menschen in praxi bewährt, ist gesetzlich anerkannt und gefordert, auf der anderen Seite besteht der ethische Anspruch im Sinne des Tierschutzes Tierversuche generell bzw. die Anzahl der Tiere in Versuchen zu minimieren. Nach der Meinung mancher Autoren besteht ein hoher prädiktiver Wert von Tierstudien für die Sicherheit des Menschen (Broadhead et al., 2000) (Greaves et al., 2004), andere Autoren sehen das nicht so (Zbinden, 1991) (Jolivet & Ward, 2005) (Matthews, 2008) (van Meer et al., 2012) (Bailey et al., 2013). Gezielt bezogen auf neurologische Effekte wird eine generelle nicht-spezifische (Igarashi et al., 1995), moderate (Owens, 1962) (Fletcher, 1978) bis adäquate (Schein, 1970) Korrelation neurologischer Symptome zwischen Tierdaten und dem Menschen angenommen. Hierbei hatten Daten vom Nichtnager einen höheren prädiktiven Wert als Nagerdaten (Olson et al., 2000)

Auch im Bereich der Veterinärmedizin ist die Anzahl der neurologischen Patienten, die in den Tierarztpraxen vorgestellt werden, steigend (Lin et al., 2015). Dabei können Tiere, insbesondere Hunde, und Menschen von ähnlichen Erkrankungen betroffen sein, wie z.B. Epilepsie oder Rückenmarkserkrankungen durch Bandscheibenvorfälle (Becker & Baumgärtner, 2014). Da die Symptome und die molekularen Ursachen bei Hund und Mensch in diesem Bereich vergleichbar sind, liegt es nahe, wissenschaftliche Erkenntnisse beim Hund auf den Mensch zu übertragen und umgekehrt (Becker & Baumgärtner, 2014).

Zu betonen ist zudem die herausragende Bedeutung der retrospektiven Analyse von bereits vorhandenen Daten aus tierexperimentellen Studien, vor allem im Sinne des Tierschutzes. Werden Tierversuche nicht optimal geplant, durchgeführt und analysiert, werden unnötig Tiere verwendet (Vries et al., 2014). Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang eine systematische Analyse der bereits durchgeführten Tierstudien, da diese helfen kann, die methodische Qualität von Tierexperimenten in Zukunft zu verbessern (Vries et al., 2014).

Fragestellung dieser Arbeit und Vorgehensweise

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im ersten Schritt die Literatur zum Thema Versuchstierauswahl von Nichtnagern mit speziellem Fokus auf die speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome analysiert. Dann wurden im nächsten Schritt firmeninterne Daten der Nichtnagerspezies Hund und Affe systematisch aufgearbeitet und ausgewertet. Das Minipig wurde in diesem Zusammenhang nicht weiter evaluiert, da zum Zeitpunkt des Dissertationsvorhabens noch keine firmeninternen Daten hierzu vorlagen.

Mit den neu erlangten Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit soll eine gezielte Aussage zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome von Hunden und Affen ermöglicht werden, um diesbezüglich fundierte Überlegungen zur Auswahl des Nichtnagers in toxikologischen Studien tätigen zu können. Dadurch könnte längerfristig evtl. die Anzahl an Tieren in Versuchen verringert und/oder unnötige Doppelversuche in zwei Tierarten in Zukunft vermieden werden und somit ein Beitrag zum aktiven Tierschutz (3R-Prinzip²) geleistet werden.

² Die drei R stehen für „*Replace, Reduce, Refine*“ (zu deutsch: Vermeiden, Verringern, Verbessern), bezeichnen Maßnahmen zur Reduzierung der Versuchstierzahlen und der Belastungen für Versuchstiere und wurde 1959 von William Russell und Rex Burch entwickelt.

II. Literaturübersicht

Im Bereich der Neurowissenschaften überwiegt in der Arzneimittelentwicklung der Anteil von Arzneimitteln aus dem Gebiet der niedermolekularen Verbindungen (sog. *small molecules*) im Vergleich zu den Biologika (sog. *biologics* oder *large molecules*). Dies ist vor allem der Fall, wenn es um die Entwicklung von Substanzen geht, die pathologische Prozesse im ZNS wie z.B. Alzheimer beeinflussen sollen. Das liegt unter anderem an der Blut-Hirn-Schranke, die für große Moleküle wie *biologics* kaum zu überwinden ist. Aus diesem Grund liegt bei der Darstellung der Literatur für diese Arbeit der Schwerpunkt auf Arzneimitteln aus dem Bereich der *small molecules*, die dazu im Gegensatz stehenden *biologics* werden nur dort erwähnt, wo sie für das jeweilige Thema relevant oder besondere Aspekte zu berücksichtigen sind.

1. Die Arzneimittelentwicklung

Der Prozess der Arzneimittelentwicklung von der Idee bis zum marktfähigen Produkt hat sich im Laufe der Jahrzehnte zu einem komplexen System aus unterschiedlichen, ineinander greifenden Aktivitäten entwickelt, die von heterogenen Berufsgruppen in gemeinsamen Teams und oftmals parallel durchgeführt werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Entwicklung von Arzneimitteln ist ein teurer, lange andauernder und risikoreicher Prozess von 10-15 Jahren oder mehr, der von dem Bedarf und der medizinischen Notwendigkeit für die Behandlung von Krankheiten, der Krankheitsprävalenz und der Erfolgswahrscheinlichkeit getrieben wird (Tamimi & Ellis, 2009).

Die einzelnen Stufen der Arzneimittelentwicklung lassen sich in folgende Bereiche der Forschung und Entwicklung einteilen (Fischer & Breitenbach, 2013):

- Forschung und Wirkstoffsuche
- Präklinische Entwicklung
- Klinische Entwicklung (Phase I-III)
- Zulassung, Markteinführung, klinische Entwicklung Phase IV

Diese Phasen sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

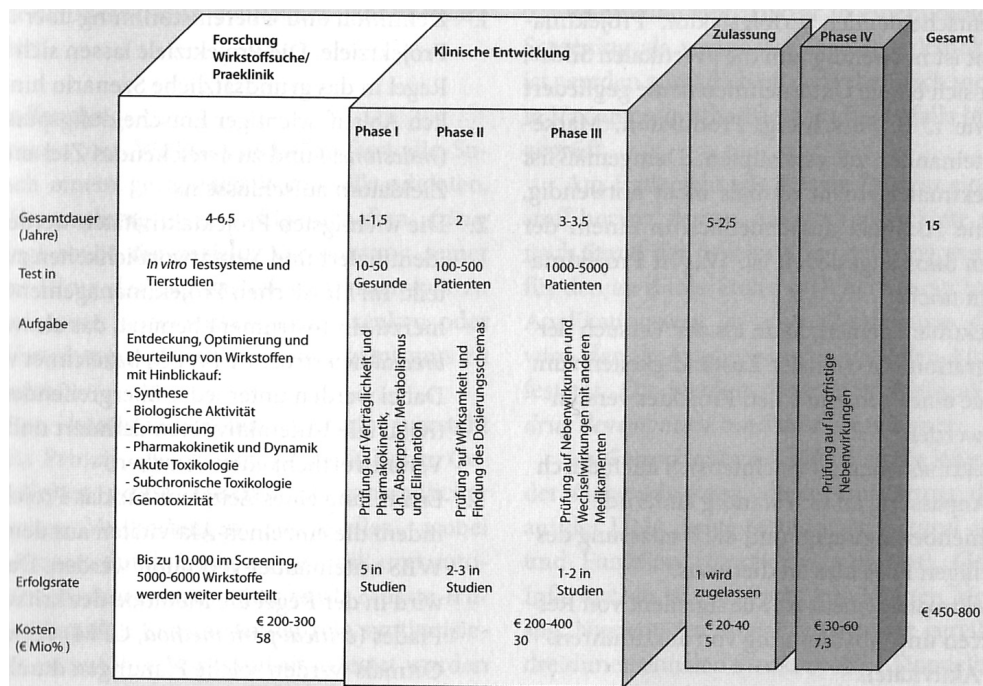


Abbildung 1: Entwicklung eines neuen Medikaments: Dauer, Aktivitäten, Kosten und Anzahl der Kandidaten in jeder Phase nach Fischer/Breitenbach (2013)
(mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jörg Breitenbach)

1.1 Forschung und Wirkstoffsuche

Die Auswahl eines Indikationsgebietes wird von der Krankheitsprävalenz und dem Bedarf an Behandlungsmöglichkeiten getrieben (Tamimi & Ellis, 2009). Ziel der Entwicklung neuer Arzneimittel ist es, bessere therapeutische Möglichkeiten zu schaffen (Mutschler et al., 2012). Der günstigste Fall ist dann gegeben, wenn durch das neue Medikament eine noch nicht mit Arzneimitteln behandelbare Erkrankung einer medikamentösen Therapie zugänglich wird, vielfach muss man sich aber damit begnügen, die Therapie bereits behandelbarer Erkrankungen zu vereinfachen oder zu verbessern (Mutschler et al., 2012). Dem gezielten Entwurf eines Arzneimittels wird die Frage nach dem molekularen Mechanismus seiner Wirkung vorausgestellt (Fischer & Breitenbach, 2013). Ausgangspunkt für die Suche nach einem neuen Arzneimittel ist immer eine Leitstruktur, welche an dem betrachteten Ziel(protein) die gewünschte biologische Wirkung entwickelt (Fischer & Breitenbach, 2013). Entscheidend für eine gute Leitstruktur ist auch, dass sie gezielt synthetisiert bzw. einfach abgewandelt werden kann, um Wirksamkeit, Selektivität, biologische Verfügbarkeit, Toxizität und Metabolisierung zu optimieren (Fischer & Breitenbach, 2013).

Früher unterlag die Entdeckung neuer Wirkstoffe meist dem Zufallsprinzip, heute dagegen liefert die kombinatorische Chemie eine Vielzahl an chemischen Verbindungen, die möglichst schnell und effektiv darauf getestet werden, ob sie sich für die Entwicklung von Wirkstoffen für die Arzneimittelentwicklung eignen (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Wirkstoffsuche umfasst sowohl die Suche nach einem geeigneten Wirkstoffkandidaten, der Untersuchung seiner Eigenschaften (*drug screening*) als auch die gezielte Veränderung seiner Struktur (*drug design*), um seine Wirksamkeit zu erhöhen, seine Nebenwirkungen zu senken oder seine Verteilungseigenschaften im Organismus zu verbessern (Fischer & Breitenbach, 2013).

Formulierungsentwicklung

Ist durch die Forschung und Wirkstoffsuche ein sog. *drug development candidate* (DDC) gefunden, erfolgt die Entwicklung der chemischen Synthese des Wirkstoffes und die erste Suche nach einer Formulierung, d.h. bereits in diesem frühen Stadium wird damit begonnen, eine geeignete Arzneiform zu entwickeln (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Zusammensetzung der Arzneiform wird dabei so lange optimiert, bis charakteristische Parameter (z.B. die Stabilität der Systeme, die Freigabepprofile des Wirkstoffes) die gewünschten Eigenschaften aufweisen (Fischer & Breitenbach, 2013). Oft stehen aus der Synthese des Wirkstoffs nur geringe Mengen, d.h. wenige Milligramm zur Verfügung, was insbesondere bei der Anzahl der durchzuführenden Versuche eine besondere Herausforderung darstellt (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Produktion der neuen Arzneiform, d.h. die Herstellung im Großmaßstab (*scale up*), ist der letzte Schritt in der Formulierungsentwicklung und findet meistens erst später parallel zu den klinischen Untersuchungen statt (Fischer & Breitenbach, 2013).

1.2 Präklinische Arzneimittelentwicklung

1.2.1 Pharmakokinetik

Eine ähnlich große Bedeutung wie das pharmakodynamische Profil eines Stoffes mit Art und Ort der Wirkung, Wirkstärke und Wirkmechanismus besitzen die pharmakokinetischen Eigenschaften (Fischer & Breitenbach, 2013). Kenntnisse zur Pharmakokinetik ermöglichen eine erste Abschätzung der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Befunde auf die Situation am Menschen über pharmakokinetische Modelle (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Pharmakokinetik analysiert den zeitlichen

Verlauf der Konzentration eines Arzneimittels im Organismus und bezieht ihre Aussagekraft aus der Tatsache, dass für die meisten Medikamente zwischen Konzentration am Wirkort (z.B. ZNS) und ihrer Wirkung eine Korrelation besteht (Fischer & Breitenbach, 2013). Da Messungen der Substanz am Wirkort vor allem beim Menschen in den meisten Fällen jedoch nicht möglich sind, basiert die pharmakokinetische Analyse auf Konzentrationsbestimmungen der Substanz im Blut und in den Körperausscheidungen (Fischer & Breitenbach, 2013). Im Rahmen der pharmakokinetischen Analyse einer Substanz wird außerdem die metabolische Stabilität *in vitro* in Leber-Mikrosomen und/oder Hepatozyten in verschiedenen Spezies untersucht (Bode et al., 2010).

Für die Beurteilung der pharmakokinetischen Parameter eines neuen Wirkstoffs und seiner Metaboliten stehen heute zahlreiche empfindliche und spezifische analytische Verfahren zur Verfügung (Fischer & Breitenbach, 2013). Damit werden die verschiedenen Phasen der Pharmakokinetik (Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung; im Englischen ADME = *absorption, distribution, metabolism, excretion*) quantitativ erfassbar (Fischer & Breitenbach, 2013).

Im Rahmen der Pharmakokinetik werden u.a. folgende wichtige Daten einer Substanz bestimmt:

- C_{\max} (*maximum concentration*): maximale Wirkstoffkonzentration im Blutplasma
- T_{\max} (*time to maximum plasma concentration*): Dauer bis zum Erreichen der maximalen Wirkstoffkonzentration im Blutplasma
- AUC (*area under the curve*): Fläche der Konzentrations-Zeit-Kurve eines Wirkstoffes im Blut
- $T_{1/2}$ (Halbwertszeit): die Zeitspanne, in der die Konzentration eines Wirkstoffes um die Hälfte abgenommen hat
- PPB (*plasma protein binding*): Grad der reversiblen Bindung von Wirkstoffen an die Plasmaproteine im Blut

1.2.2 Toxikologie

Die Aufgabe der Arzneimitteltoxikologie im engeren Sinne ist das Erkennen von toxischen Wirkungen inklusive der Reizwirkungen und allergischen Wirkungen (Fischer & Breitenbach, 2013). Die toxikologische Prüfung vor der Neuzulassung eines Arzneimittels trägt zur Arzneimittelsicherheit bei (Fischer & Breitenbach, 2013). Zur Beurteilung der

Unbedenklichkeit eines Wirkstoffes muss u.a. im Rahmen der Toxikologie das Risiko des Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) bestimmt werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Der Gesetzgeber schreibt vor, dass die Unbedenklichkeit bereits vor Beginn der klinischen Entwicklungsphase am Menschen nachzuweisen ist (ICH Guideline M3(R2), 2009). Hierbei liefern toxikologische Basisdaten aus präklinischen *in vitro* Untersuchungen und Tierversuchen wichtige Informationen zu Zielorgan und Nebenwirkungen, wodurch die Vorhersage von potenziellen UAW beim Menschen möglich wird (Fischer & Breitenbach, 2013). Dabei sind einmalige, kurzfristig wiederholte und wiederholte dauerhafte Wirkstoffapplikationen zu berücksichtigen (Fischer & Breitenbach, 2013).

Wichtige Kenngrößen im Bereich der Toxikologie sind:

- NOAEL (*no observed adverse effect level*): höchste Dosis eines verabreichten Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Schädigungen verursacht
- LOAEL (*lowest observed adverse effect level*): niedrigste Dosis eines verabreichten Stoffes, bei der noch Schädigungen verursacht werden
- MTD (*maximum tolerated dose*): Dosis, die zu einem akzeptablen Level an Toxizität führt bzw. deren Überschreitung ein unakzeptables Risiko für die Tiere oder Patienten bedeutet

Insgesamt können folgende verschiedene Toxizitätsprüfungen unterschieden werden, für die einzelnen Studien können hierbei unterschiedliche Studienbedingungen existieren (siehe hierzu auch „Material und Methoden“-Abschnitt). Es wird zwischen generellen toxikologischen Studien und Studien mit speziellen Endpunkten unterschieden:

○ Generelle toxikologische Studien:

- Toxizitätsprüfung nach einmaliger oder mehrmaliger eskalierender Dosis (sog. *single dose studies, escalating dose studies*):

Die Ermittlung toxischer (einschließlich tödlicher) Effekte bei einmaliger Zufuhr eines Wirkstoffes oder mittels eskalierender Dosierung schließt die Feststellung der Zielorgane bzw. -zellen, der Todesursache und den Dosisbereich für das Auftreten der Schäden ein (Fischer & Breitenbach, 2013).

- Subakute, subchronische und chronische Toxizitätsprüfung:

Darunter wird die Prüfung toxischer Wirkungen bei wiederholter Applikation eines Wirkstoffes in verschiedenen Dosierungen über einen längeren Zeitraum (im Fall von subakuten Studien bis zu 4 Wochen, subchronische Studien bis zu 3 Monate, für chronische Toxizitätsprüfungen bis zu 6 Monate und länger) verstanden (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Dauer der Prüfung ist von den Behörden in Leitlinien festgelegt, international harmonisiert und hängt von der Tierspezies (chronische Studien), aber auch ganz wesentlich von den geplanten klinischen Untersuchungen der Phasen I-III beim Menschen ab (i.d.R. mindestens so lang wie die Dauer der geplanten klinischen Prüfung (ICH Guideline M3(R2), 2009)). Da toxische Wirkungen nicht nur von der applizierten Substanz selbst, sondern von reaktionsfähigen Stoffwechselmetaboliten erzeugt werden können, sollte bei der Wahl der Tierarten berücksichtigt werden, dass sich die wesentlichen pharmakokinetischen Daten oder gebildeten Metaboliten möglichst wenig vom Mensch unterscheiden (Fischer & Breitenbach, 2013). Ziel der Toxizitätsprüfungen nach Mehrfachgaben ist die Evaluierung möglicher auftretender Symptome, das Bestimmen der Zielorgane, die Dosis-Wirkungsbeziehung durch die Bestimmung des NOAEL, LOAEL, evtl. der MTD und der Reversibilität der Befunde (Fischer & Breitenbach, 2013). Dies wird i.d.R. durch die Verwendung von drei verschiedenen Dosierungsgruppen (niedrig, mittel, hoch) und einer Kontrollgruppe erreicht (ICH Guideline M3(R2), 2009) (Sewell et al., 2014).

- Studien mit speziellen Endpunkten:

- Genotoxizität:

Die Genotoxizität liefert frühe Hinweise, ob sich Verdachtsmomente auf die Auslösung mutagener, klastogener und/oder karzinogener Effekte für einen Wirkstoff ergeben (Fischer & Breitenbach, 2013). Diese werden i.d.R. *in vitro* an Zell-/Bakteriensystemen überprüft und in *in vivo* Studien bestätigt (Fischer & Breitenbach, 2013) (ICH Guideline M3(R2), 2009) (ICH Guideline S6(R1), 2011).

- Reproduktionstoxizität:

Der Schwerpunkt dieser Prüfungen, liegt auf der Analyse der Fertilität und Entwicklungstoxizität und umfasst Untersuchungen zur Reifung und Funktion von Keimzellen, Embryotoxizität sowie peri- und postnatalen Toxizität in männlichen

und weiblichen Tieren (Fischer & Breitenbach, 2013) (ICH Guideline S5(R2), 2005) (ICH Guideline M3(R2), 2009) (ICH Guideline S6(R1), 2011).

- Kanzerogenitätsprüfung:

In Kanzerogenitätsprüfungen wird, üblicherweise in Nagetieren, untersucht, ob die chronische Einnahme eines Wirkstoffes über lange (möglichst lebenslange) Zeiträume (je nach Lebenserwartung z.B. 24 Monate bei Ratten) Tumore erzeugt (Fischer & Breitenbach, 2013) (ICH Guideline M3(R2), 2009) (ICH Guideline S6(R1), 2011).

- Sicherheitspharmakologie:

Von Gesetzesseite her definiert die ICH-Leitlinie S7A den Minimalstandard der notwendigen präklinischen Untersuchungen vor der Erstanwendung im Menschen und schreibt speziell zu testende Organsysteme, wie ZNS, Herz-Kreislauf-System und Atmungsapparat, vor (ICH Guideline S7A, 2000) (Fischer & Breitenbach, 2013). Abhängig von der Testsubstanz und Wirkung werden dann Folgeuntersuchungen beschrieben (u.a. weitere Tests der Vitalorgane, der Niere, des Gastrointestinaltrakts, des Immunsystems und endokriner Organe) (ICH Guideline S7A, 2000) (Fischer & Breitenbach, 2013).

- Immunotoxizität:

Untersuchungen zur Immunotoxizität umfassen Studien, um das immunsuppressive oder immunstimulierende Potenzial einer Substanz zu untersuchen (Fischer & Breitenbach, 2013). Hypersensitivität, allergisches Potenzial, sowie das Auslösen von Autoimmunerkrankungen fallen strenggenommen nicht unter den Begriff der Immunotoxizität nach ICH-Richtlinien, dürfen jedoch bei den präklinischen Untersuchungen nicht vernachlässigt werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Um immunotoxischen Effekten auf die Spur zu kommen, wird nach Blutbildveränderungen, der Anfälligkeit und dem Auftreten von Infektionen, Tumorbildung sowie nach Veränderung der Organe des Immunsystems, wie Milz, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark, im Tiermodell gesucht (ICH Guideline M3(R2), 2009) (ICH Guideline S6(R1), 2011) (Fischer & Breitenbach, 2013).

Es ist nicht selten, dass sich toxische Effekte in den Studien zeigen, deren zugrunde liegender Mechanismus dann vertieft untersucht werden muss, z.B. Organtoxizitäten der Schilddrüse oder unspezifische neurologische Auffälligkeiten (z.B. Tremor oder

Krampfanfälle), die ausgedehnte Studien der neurotoxischen Wirkung auf das periphere und zentrale Nervensystem erfordern (Fischer & Breitenbach, 2013).

Die Rolle der Nichtnagerspezies in der Toxikologie

In den generellen toxikologischen Studien werden in der Regel die Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig verwendet. Diese sind in den Leitlinien aufgeführt (OECD Guideline 409, 1998). Weitere Nichtnagerarten werden für spezielle Fragestellungen eingesetzt, wie z.B. Kaninchen im Bereich von Studien zur lokalen Toleranz und der Reproduktionstoxizität (ICH Guideline S5(R2), 2005) (Gad, 2007) oder Frettchen in Studien zur Erforschung von Erbrechen (Gad, 2000) (Jacobs, 2006) (Gad, 2007).

1.3 Klinische Prüfung und Zulassung (Phasen I-IV)

Beim Ablauf der klinischen Prüfung wird derzeit weiterhin zwischen den Phasen I-IV unterschieden, obwohl diese starre Einteilung nach Meinung von Fischer et al. (2013) zu unflexibel ist und längst nicht mehr den Gegebenheiten der modernen Arzneimittelentwicklung genügt (Fischer & Breitenbach, 2013).

In den klinischen Phase-I-Studien wird neben der Sicherheit und Tolerabilität des Wirkstoffes die Pharmakokinetik im Mensch geprüft (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Phase I hat im Allgemeinen nicht das Ziel des Nachweises einer therapeutischen Wirksamkeit. Vielmehr finden hierbei orientierende Bestimmungen des pharmakokinetischen und pharmakologischen Wirkprofils an ca. 10-50 gesunden, bezahlten Probanden statt (Fischer & Breitenbach, 2013). Dies ermöglicht die Beurteilung der Verträglichkeit der Prüfsubstanz sowie die Definition eines Dosisbereichs für die folgenden Phase-II-Studien (Fischer & Breitenbach, 2013). In Ausnahmefällen kann es jedoch aus ethischen oder wissenschaftlichen Gründen, z.B. bei der Prüfung von Zytostatika, erforderlich sein, schon diese ersten Untersuchungen an besonders ausgewählten Patienten durchzuführen (Tamimi & Ellis, 2009) (Mutschler et al., 2012).

Phase II dient dem Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit im Hinblick auf die für die Zulassung vorgesehenen Indikationen, d.h. hier wird der biologische *proof of concept* (die prinzipielle Durchführbarkeit des Vorhabens) geprüft (Tamimi & Ellis, 2009). Zudem soll hier an einer begrenzten, möglichst homogenen Stichprobenanzahl von 100-500 Patienten parallel die Unbedenklichkeit der Anwendung nachgewiesen sowie der wirksame

Dosisbereich und die endgültige Applikationsform festgelegt werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Der Übergang von Phase II zu Phase III ist hierbei oftmals fließend (Fischer & Breitenbach, 2013).

In den konfirmatorischen Phase-III-Studien sollen die Ergebnisse der Phase II hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit bestätigt und der therapeutische Nutzen der Prüfsubstanz eindeutig nachgewiesen werden (Tamimi & Ellis, 2009) (Fischer & Breitenbach, 2013). Um ausreichend Daten für die Zulassung zu erheben, wird die Substanz meist weltweit in großen multizentrischen Studien an mehreren hundert bis tausend Patienten über längere Zeiträume (je nach Indikation bis zu mehrere Jahre) geprüft (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Studien dauern im Schnitt 24-40 Monate und können 1.000 – 5.000 Patienten beinhalten (Fischer & Breitenbach, 2013). In Abhängigkeit von der angestrebten Zulassung und von der Zielpopulation müssen hierbei auch Erfahrungen mit den für die Erkrankung typischen Nebendiagnosen berücksichtigt werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Dies beinhaltet auch die Untersuchung von Wechselwirkungen mit dabei häufig eingesetzten anderen Medikamenten (Fischer & Breitenbach, 2013). Zweites Ziel der Phase III ist die möglichst genaue Beschreibung der Art und Häufigkeit der UAW (Fischer & Breitenbach, 2013). Mit dem Ende der Phase-III-Studien werden die vorliegenden Ergebnisse in einem Zulassungsantrag nach klar definierten Regeln zusammengefasst (Fischer & Breitenbach, 2013). 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 Applikationsart sowie der Verträglichkeit und der zu erwartenden Art und Häufigkeit von UAW gestatten (Fischer & Breitenbach, 2013).

Parallel zu den Phasen I-III werden die während der präklinischen Entwicklung begonnenen Untersuchungen zur Stabilität, Galenik und Toxizität fortgesetzt und – soweit möglich – zum Abschluss gebracht (Mutschler et al., 2012).

Die Zulassung von Arzneimitteln, d.h. die Erlaubnis, ein Arzneimittel in den Verkehr bringen zu können, wird von den zuständigen Zulassungsbehörden erteilt (FDA (*Food and Drug Administration*) für die Vereinigten Staaten von Amerika, die EMA (*European Medicines Agency*) für Europa und PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*) für Japan). Die Zulassungsanträge werden von der Behörde geprüft und die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des Arzneimittels bewertet (Fischer & Breitenbach,

2013). Die Zulassung wird ausgesprochen, wenn das Nutzen-Risiko-Verhältnis positiv ist, d.h. wenn der erwartete Nutzen die Risiken überwiegt (Fischer & Breitenbach, 2013).

Nachdem die Zulassung erteilt wurde, darf das Medikament unter den im Zulassungsbescheid festgelegten Auflagen vertrieben werden (Fischer & Breitenbach, 2013). Für eine umfassendere Beurteilung des neuen Arzneimittels unter therapeutischen Bedingungen werden sog. Phase-IV-Studien durchgeführt (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Ziele sind u.a. die Beurteilung der Langzeitverträglichkeit einschließlich des Auftretens seltener UAW, sowie der Vergleich des Nutzen-Risiko-Verhältnisses mit den für die Indikation zugelassenen Standardmedikamenten (Fischer & Breitenbach, 2013). Zu den weiteren Zielkriterien gehört in zunehmendem Maße auch die Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit in Relation zu den dadurch verursachten Kosten für das Gesundheitssystem (Fischer & Breitenbach, 2013). Die Phase-IV-Studien der klinischen Entwicklung sind somit sog. marktbegleitende Studien (Fischer & Breitenbach, 2013). Vor allem aus Sicherheitsgründen ist die kontinuierliche Überwachung (Pharmakovigilanz) von Arzneimitteln nach der Zulassung unabdingbar (Fischer & Breitenbach, 2013).

1.4 Entwicklung von Tierarzneimitteln

Die Nachfrage für Arzneimittel für Tiere als Familienmitglieder, insbesondere Hunde und Katzen, ist signifikant angestiegen (Lathers, 2003). Gründe hierfür sind zum Teil eine immer älter werdende Haustierpopulation und die steigende Bereitschaft der Tierbesitzer, für effektive Therapien zu bezahlen (Lathers, 2003).

Auch wenn die Entwicklung von Human- und Tierarzneimitteln einige Parallelen aufweisen, so existieren gleichzeitig auch wichtige Unterschiede (Lathers, 2003). Beispielsweise machen Tierarzneimittel derzeit nur ca. 3% des gesamten Arzneimittelmarktes aus (Humanarzneimittel 97%) (*International Federation for Animal Health* (IFAH, 2015)).

Ein eindeutiger Vorteil bei der Entwicklung von Tierarzneimitteln besteht darin, dass die Substanz von den ersten Stadien der Entwicklung an direkt in der Zielspezies getestet werden kann, was entscheidende Informationen über Wirksamkeit und Sicherheit bereitstellt (Lathers, 2003). Dies führt dazu, dass ein signifikant höherer Anteil an potentiellen Tierarzneimitteln, die für die Entwicklung ausgewählt wurden, die strenge Sicherheitsbewertung übersteht als dies bei Humantherapeutika der Fall ist (Lathers, 2003).

Der Anfang der Entwicklung eines Tierarzneimittels beginnt wie im Bereich der Humanarzneimittel mit einer Idee eines sog. *drug sponsor* zu einer neuen Substanz (FDA, 2015). In den USA ist das *Office of New Animal Drug Evaluation* (ONADE) innerhalb des *Center for Veterinary Medicine* (CVM) für die Bewertung der Sicherheit und Wirksamkeit eines neuen Tierarzneimittelkandidaten zuständig (Lathers, 2003). Oft sind Pilotstudien für eine bestimmte Indikation in der Zieltierart notwendig (FDA, 2015). Für den Fall, dass es sich bei der Substanz um ein (bereits zugelassenes oder auch in der Entwicklung gestopptes) Humanarzneimittel handelt, wurden viele Tierstudien zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, Sicherheit und Wirksamkeit jedoch bereits während der Entwicklung zum Humanarzneimittel durchgeführt (Lathers, 2003). Eine erneute Analyse der Studien und Studienergebnisse kann helfen sichere und wirksame Substanzen für den Einsatz an Tieren zu identifizieren und zu prüfen, ob potentielle neue Zulassungen für die Tiermedizin möglich sind, egal ob die Substanz für den Menschen zugelassen wurde oder nicht (Lathers, 2003). Von allen durchgeführten Studien muss der *drug sponsor* die Ergebnisse auswerten und anhand dessen entscheiden, ob die Sicherheit und Wirksamkeit des Tierarzneimittels ausreichend geprüft wurden und ob alle Anforderungen für die Zulassung vorliegen (FDA, 2015). Außerdem muss er eine geeignete Applikationsart und Dosierung entwickeln (FDA, 2015). Das Tierarzneimittel muss sowohl wirksam und sicher für die Zieltierart, als auch sicher im Hinblick auf die Produktion von Lebensmitteln tierischer Herkunft sein und hinsichtlich einer potentiellen Umweltgefährdung bewertet werden (FDA, 2015). Daraufhin reicht der *drug sponsor* einen Antrag (*New Animal Drug Application* (NADA)) beim CVM ein, der alle Informationen über das Tierarzneimittel und die beabsichtigte Kennzeichnung beinhaltet (FDA, 2015). Ein Expertenteam des CVM, bestehend aus Tierärzten, Wissenschaftlern, Biostatistikern, Chemikern, Mikrobiologen, Pharmakologen und Toxikologen überprüft den Zulassungsantrag und entscheidet über die Zulassung (FDA, 2015). Kommt das Team zu dem Schluss, dass das Tierarzneimittel wirksam und sicher entsprechend der Kennzeichnung ist, wird die Zulassung erteilt (FDA, 2015).

In Deutschland erfolgt die nationale Zulassung eines Tierarzneimittels auf der Grundlage des Arzneimittelgesetzes (AMG) (BVL, 2015).

1.5 Neurologische Indikationsgebiete der evaluierten Substanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit evaluierten Substanzen stammen aus dem Bereich der Forschung für Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose oder Schizophrenie, für die ein großer Bedarf an wirksamen Medikamenten besteht. Diese Erkrankungen führen zu erheblichen Einschränkungen und Belastungen der Betroffenen (Emsley, 2009) (Heemskerk et al., 2012) (Coleman & Barrow, 2012) (Rubin, 2013). Die psychische Belastung der Patienten und ihrer Angehörigen ist hoch, aber auch der pflegerische Aufwand ist groß. Durch die sich verändernde Altersstruktur in der Gesellschaft gewinnen diese Bereiche zunehmend an Bedeutung (Kanwar et al., 2012) (Coleman & Barrow, 2012) (Jiang et al., 2015). Während also ein großer Bedarf an wirksamen Medikamenten für neurodegenerative Erkrankungen besteht (Miyamoto et al., 2012), ziehen sich immer mehr pharmazeutische Firmen aus diesem Forschungsbereich zurück (Coleman & Barrow, 2012). Auch die durchschnittliche Erfolgsrate für neue Medikamente, die letztendlich die Zulassung erlangen, ist niedrig und beträgt im Bereich Neurowissenschaften 5-8% der Substanzen (11% für alle Indikationsgebiete), bezogen auf eine Analyse aller Substanzen in Phase I in einem Zeitraum von 10 Jahren (1991-2000) von 10 großen Unternehmen der pharmazeutischen Industrie in den USA und in Europa (Kola & Landis, 2004) (Tamimi & Ellis, 2009). Die Entwicklung von Substanzen für neurologische Erkrankungen ist langwierig und der genaue Pathomechanismus oft bisher ungeklärt (Schoepp, 2011) (Coleman & Barrow, 2012) (Kanwar et al., 2012) (Rubin, 2013) (Jiang et al., 2015). Während bei der Tierarzneimittelentwicklung in der Zielspezies getestet werden kann (Lathers, 2003), fehlen beispielsweise im Bereich der Alzheimerforschung adäquate Tiermodelle, die die pharmakologisch sichere Übertragbarkeit der Wirksamkeit von Substanzen vorhersagen können (LaFerla & Green, 2012).

Darüber hinaus muss beachtet werden, dass neurologische Erkrankungen die Verträglichkeit von Wirkstoffkandidaten wesentlich beeinflussen können. Momentan werden die Wirksamkeitsstudien zwar im Tiermodell für die Krankheit, die toxikologischen Studien zur Verträglichkeit aber i.d.R. in gesunden Tieren durchgeführt, somit ist die Übertragbarkeit von gesunden, naiven Tieren auf erkrankte Patienten oft nicht gegeben. Dabei sind z.B. erkrankungsbedingte Dysfunktionen der Blut-Hirn-Schranke ein kritischer Punkt in der Entwicklung und der Progression von neurologischen Erkrankungen (Hawkins & Davis, 2005) und auch für mögliche neurologische

Nebenwirkungen von Relevanz. Auch Komorbiditäten, die bei älteren Patienten, wie Alzheimer-Patienten, auftreten können, speziell Bluthochdruck und Diabetes spielen eine Rolle, da solche Krankheiten kleine Kapillaren beeinflussen können (Rosenberg, 2012).

Gründe hierfür sind erkrankungsassoziierte Einflüsse auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, z.B. Zielstrukturveränderungen, da fast alle neurologischen Erkrankungen zu einem Anstieg inflammatorischer Prozesse führen (z.B. Multiple Sklerose (Miller et al., 2003)), die u.a. Zusammensetzung, Splicevarianten, Phosphorylierung und Funktionszustand von Neuronen und Ionenkanälen beeinflussen.

Ein klassisches Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Penicillin. Hohe intravenöse Penicillindosen führen zu Neurotoxizität, meistens in Form von Krämpfen (Barrons et al., 1992). Hierbei gelangt Penicillin mittels Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke (Barrons et al., 1992), blockiert die synaptische Aktivität des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (*gamma-aminobutyric acid*, Gamma-Amino-Buttersäure) und senkt so die Krampfschwelle (Antoniadis et al., 1980). Als strukturelle Ursache hierfür wird der β -Lactam-Ring von Penicillinen und Cephalosporinen diskutiert (Nicholls, 1980) (Serdaru et al., 1982) (Hodgman et al., 1984). Verschiedene prädisponierende Faktoren begünstigen das Auftreten von Krämpfen nach der Verabreichung von Penicillin, z.B. können eine Niereninsuffizienz und eine daraus resultierende Azotämie und Urämie zu einer Schwächung der sog. *tight junctions* zwischen den Kapillaren und den Zellen des Chorioidplexus führen, was zu einem Anstieg der Penicillinkonzentration im Gehirn führt (Barrons et al., 1992). Auch infektiöse Prozesse wie Meningitis, bakterielle Endokarditis oder Septikämien können die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen und die aktive Sekretion von Penicillin aus dem Gehirn vermindern (Barrons et al., 1992).

Die Analyse firmeninterner Daten der vorliegenden Arbeit beinhaltete Substanzen aus folgenden Indikationsgebieten:

Morbus Alzheimer

Neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer (oder auch Parkinson) sind charakterisiert durch einen progressiven Verlust von Neuronen und einem anschließenden Rückgang kognitiver Fähigkeiten (Jiang et al., 2015). Bisher können diese Erkrankungen nur symptomatisch behandelt werden (Salomone et al., 2012) (Kanwar et al., 2012), da die exakte Ätiologie bis heute nicht geklärt ist (Jiang et al., 2015). Hierbei finden Substanzen

Verwendung, die den enzymatischen Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin verhindern (Cholinesterase-Hemmer) oder Glutamat-Antagonisten, die die Nervenzellen vor dem übermäßigen Einstrom von Glutamat schützen (Kurz & Grimmer, 2012). Weitere derzeit zugelassene Medikamente zur Behandlung von Alzheimer kommen aus dem Bereich der NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die vor allem der symptomatischen Behandlung dienen, ein Fortschreiten der Krankheit aber nicht verhindern (Salomone et al., 2012). In den letzten 10 Jahren wird zudem vermehrt an sogenannten „krankheitsmodulierenden Wirkstoffen“ (*disease modifying drugs*) geforscht, um der Krankheitsprogression entgegenzuwirken (Salomone et al., 2012).

Morbus Parkinson

Das Parkinson-Syndrom ist die häufigste Erkrankung der Basalganglien (Mutschler et al., 2012). Mit Ausnahme der durch Pharmaka ausgelösten Form liegt ihm vor allem die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra und dadurch bedingt die Verarmung des Striatums an Dopamin zugrunde (Mutschler et al., 2012). Den pathophysiologischen Veränderungen entsprechend ist eine medikamentöse Therapie des Parkinson-Syndroms möglich durch Gabe der Dopamin-Vorstufe Levodopa, Blockade der Decarboxylierung von Levodopa zu Dopamin (da bei alleiniger Gabe von Levodopa über 90% der applizierten Dosis nicht erst im ZNS, sondern bereits in der Peripherie decarboxyliert wird), Hemmung der Methylierung von Levodopa, Verhinderung des Dopamin-Abbaus mit Monoaminoxidase-Hemmern, Stimulation zentraler Dopamin-Rezeptoren mit direkten dopaminergen Agonisten, Blockade striataler Rezeptoren mit Amantadin oder durch Hemmung cholinergischer Rezeptoren mit zentral wirksamen Anticholinergika (Mutschler et al., 2012). Auch wenn Levodopa die derzeit effektivste Medikation zur Behandlung von Parkinson-Symptomen ist, sind unter bestimmten Umständen (z.B. nur milde Symptome, Tremor als einziges Symptom, Patienten unter 60 Jahren) die Verwendung von anderen Therapeutika wie Monoaminoxidasehemmer angebracht (Connolly & Lang, 2014). Morbus Parkinson gilt nach wie vor als unheilbar (Heisters, 2013) und die Therapie führt lediglich zu einer aufschiebenden Wirkung mit Verzögerung der Progression von Symptomen (Tanner, 2013).

Multiple Sklerose

Multiple Sklerose ist eine chronische progressive Krankheit, die durch akute Episoden von Demyelinisierung, Abwicklung von Axonen und fortschreitende Neurodegeneration des zentralen Nervensystems charakterisiert ist und zu langanhaltenden Behinderungen führt (Rubin, 2013). Während die Erforschung dieser Krankheit sich auf T-Zell-assoziierte autoimmune Entzündungsvorgänge fokussiert hat, ist der Pathomechanismus, vor allem der fortschreitenden Neurodegeneration, bis heute nicht vollständig geklärt (Rubin, 2013). Die Therapie der letzten 30 Jahre stützte sich auf Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid, Methotrexat und Mitoxantron (Fukaura, 2014). In der Therapie verwendete Interferone stabilisieren unter anderem die Blut-Hirn-Schranke gegenüber Entzündungszellen, die das ZNS erreichen (Rubin, 2013). Andere Wirkstoffe wie Glatiramer-Acetat sind keine Interferone sondern wirken über eine Kreuzreaktion mit dem Myelin-Basis-Protein und induzieren die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen (Rubin, 2013).

Schizophrenie

Als Schizophrenien wird eine Gruppe psychischer Erkrankungen bezeichnet, denen eine vielschichtige Persönlichkeitsstörung mit charakteristischen Veränderungen des Denkens, Fühlens und der Beziehung zur Umwelt zugrunde liegt (Mutschler et al., 2012). Pathophysiologisch diskutiert wird neben einer glutamatergen und serotonergen Erregungsübertragungsveränderung insbesondere eine überschießende Stimulation dopaminergere D2-Rezeptoren (Mutschler et al., 2012). Wirkstoffe zur Behandlung von Schizophrenie fallen in die Gruppe der Neuroleptika (Mutschler et al., 2012). Nach der chemischen Struktur und gleichzeitig den pharmakologischen Eigenschaften unterscheidet man tricyclische Neuroleptika (Phenothiazine und Phenothiazin-Analoga), Butyrophenone und Diphenylbutylpiperidine und sog. atypische Neuroleptika (Mutschler et al., 2012). Hierbei kann zwischen antipsychotischen Medikamenten der ersten Generation (D2-Rezeptor-Antagonisten) und Wirkstoffen der zweiten Generation mit einem breiteren Rezeptorbindungsprofil (z.B. 5-HT-Rezeptor-Antagonisten) differenziert werden (Mutschler et al., 2012). Derzeitige Versuche in der Arzneimittelforschung sind die Entwicklung von Wirkstoffen mit einem breiteren Wirkspektrum und einem vorteilhafteren Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil und die weitere Erforschung des therapeutischen Potentials bereits bekannter Wirkstoffe (Emsley, 2009).

Schmerz

Unter Analgetika versteht man Substanzen, die in therapeutischen Dosen die Schmerzempfindung verringern bzw. unterdrücken, ohne eine allgemein narkotische Wirkung zu besitzen (Mutschler et al., 2012). Aufgrund von Wirkungsstärke, Wirkungsmechanismus und Nebenwirkungen werden zwei Gruppen von Analgetika unterschieden: Opioid-Analgetika mit vorwiegend zentraler, daneben aber auch peripherer Wirkung und nicht-opioide Analgetika mit peripherer und zentraler Wirkung sowie gleichzeitig antipyretischen und vielfach auch antiphlogistischen sowie antirheumatischen Eigenschaften (Mutschler et al., 2012).

2. Tiermodelle

In diesem Abschnitt werden die drei für generelle toxikologische Studien verwendeten Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig sowie die beiden für spezielle Fragestellungen genutzten Tierarten Kaninchen und Frettchen näher betrachtet und verglichen. Berücksichtigung fanden hierbei Punkte wie der Einsatz als Versuchstier, Vor- und Nachteile, praktische und labortechnische Aspekte, sowie speziesspezifische Unterschiede mit Bedeutung für die Verwendung als Versuchstier und ihr Einsatz im Bereich der Neurowissenschaften und Toxikologie.

2.1 Der Hund

2.1.1 Allgemeines

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über Basisdaten des Hundes als Versuchstier. Siehe auch „Übersichtstabelle Nichtnagerspezies vergleichend“.

Spezies	Beagle (<i>Canis familiaris</i>) ^a
Natürliche Lebenserwartung	bis ca. 15 Jahre ^a
Gewicht	8-10 kg ^p , 10-13 kg ^q , 20-28 kg ^a
Geschlechtsreife	♂ 7-8 Monate ^a , ♀ 8-14 Monate ^a
Alter/Gewicht bei Erstnutzung für toxikologische Studien	ca. 5-10 Monate und ca. 6-12 kg ^a , bei juvenilen Studien je nach Fragestellung auch früher
Reproduktionsrate und Wurfgröße	Monoöstrisch, 5-7 Jungtiere (und mehr) ^a
Ernährung	carnivor (auch omnivor) ^a
Haltung	Paar- oder Gruppenhaltung, Zwinger mit Auslauf ^b , teilweise nationale

	Vorgaben (z.B. TierSchHuV)
Wohlfühltemperatur, relative Luftfeuchte	16-27°C, 30-70% rel. Luftfeuchte ^b
Sozialisation	Fähigkeit soziale Gruppen auszubilden, Kontakt zu Artgenossen und Menschen wichtig ^a
Verfügbarkeit	gut, Züchter in EU und USA ^{c,p,q}
Zoonosepotential	niedrig ^b
Gesundheitsstatus	konventionell ^a
Qualität/Umfang der vorhandenen Vergleichsdatenbasis	gut ^c
Akzeptanz der Zulassungsbehörden	gut ^{f,h}
Öffentliche ethische Bedenken	hoch, da Hund Status als Familienmitglied hat ⁱ

Tabelle 1: Basisdaten des Hundes als Versuchstierspezies

^a (Ellegaard et al., 2010), ^b (Gad, 2007), ^c (Smith & Trennery, 2001), ^f (OECD Guideline 409, 1998), ^h (Smith & Trennery, 2002), ⁱ (Webster et al., 2010), ^p (Marshall BioResource Reference Data Guide), ^q (Harlan Laboratories)

Allgemeine Aspekte des Hundes als Versuchstier

Hunde sind nach derzeitigem Kenntnisstand nach wie vor die am meisten verwendete Nichtnagerspezies in präklinischen Sicherheitsstudien der Arzneimittelentwicklung. Sie werden deshalb in diesem Zusammenhang oft als „standardmäßig verwendeter Nichtnager“ benannt (Broadhead et al., 2000) (Smith et al., 2002) (Hasiwa & Bailey, 2011) (Bailey et al., 2013). Im Jahr 2011 wurden laut der 2013 veröffentlichten Tabelle 2.1 „*Number of animals used in experiments for selected purposes*“ des Berichts der Europäischen Kommission 7488 von insgesamt 17896 Hunden (41,84%) in der Toxikologie und Arzneimittelsicherheit eingesetzt. Diese Rolle als „Standardspezies“ hat der Hund aufgrund des Vorhandenseins einer fundierten Datenbasis und Erfahrungen, der praktischen Anwendbarkeit, den gesetzlichen Anforderungen und der guten Verfügbarkeit (Smith et al., 2001). Gleichzeitig ist der Einsatz des Hundes als Nichtnagerspezies aber in der Öffentlichkeit umstritten und nicht zuletzt durch die Stellung des Hundes als Familienmitglied emotional belegt (Gad, 2007) (Webster et al., 2010). Auch in anderen Bereichen als der Arzneimittelentwicklung, wie z.B. bei der Entwicklung von Pestiziden, wird seit Jahren über die Notwendigkeit der Tests in Hunden diskutiert (Spielmann & Gerbracht, 2001) (Hasiwa & Bailey, 2011).

Eine Studie von sechs Anti-Krebs-Medikamenten unterstreicht den großen Wert von Hunden als Versuchstier (Lichtfield, 1961). Sie zeigte, dass die Effekte im Menschen vom

Hund besser vorausgesagt werden konnten als dies anhand vorliegender Daten aus Rattenstudien der Fall war (Lichtfield, 1961). Symptome, die hierbei in Hund und Mensch auftraten, waren verzögerte Reflexe, Hypotension, Ataxie, verminderte Aktivität und Tremor (Lichtfield, 1961). Auch Olson et al. (2000) konnten beweisen, dass der Hund einen deutlich höheren prädiktiven Wert für die Übertragbarkeit von Toxizität im Menschen hat als der Nager (Olson et al., 2000). Von Spielmann und Gerbracht (2001) konnte gezeigt werden, dass in toxikologischen Studien Hunde in 15% der Fälle empfindlicher waren als Ratten (Spielmann & Gerbracht, 2001). Anhand einer retrospektiven Datenanalyse wurden in 63% der Fälle anhand der Daten im Hund die Toxizität, die zuvor in Ratten untersucht wurde, bestätigt, in 37% der Fälle kamen neue Ergebnisse hinzu (Broadhead et al., 2000). 11% der Projekte wurden aufgrund der Ergebnisse im Hund beendet (Broadhead et al., 2000).

Diese Studien bestätigen, dass der Hund eine wichtige Rolle als Nichtnagerspezies in der Arzneimittelentwicklung, vor allem für die Testung der Verträglichkeit, spielt, die seinen Einsatz rechtfertigt (Broadhead et al., 2000). Auch die Tatsache, dass der Hund in verschiedenen Leitlinien als potenzielle Nichtnagerspezies aufgelistet ist, unterstreicht dies (OECD Guideline 409, 1998) (ICH S5(R2), 2005).

In der Literatur existieren auch Vorschläge, wie der Einsatz von Hunden als Nichtnagerspezies reduziert werden könnte. Eine retrospektive Analyse von Kobel et al. (2010) ergab, dass im Bereich der Pestizidentwicklung Langzeitstudien in Hunden über einen Zeitraum von 13 Wochen hinaus überflüssig seien, da Studien von 1 Jahr Dauer zu keinen zusätzlichen Erkenntnissen führten (Kobel et al., 2010). Die Autoren schlussfolgerten dies, da lediglich 7 von 141 Studien von über 13 Wochen Dauer im Vergleich zu Studien bis zu 13 Wochen zu neuen Erkenntnissen bezüglich relevanter toxikologischer Effekte führten (Kobel et al., 2010). Im Laufe der letzten 10 Jahre stieg auch das Interesse und die Akzeptanz andere Tierarten als Nichtnagerspezies, z.B. das Minipig, zu verwenden, was den Einsatz von Hunden reduzieren könnte (Hasiwa & Bailey, 2011).

Praktische und labortechnische Aspekte des Hundes als Versuchstier

Die meisten beim Mensch gebräuchlichen Applikationswege sind auch beim Hund praktikabel (Gad, 2007). Die orale Medikamentenverabreichung erfolgt überwiegend über eine Schlundsonde oder in einer Gelatine-Kapsel (Gad, 2007). Subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektionstechniken sowie die Applikation von

Substanzen mittels Inhalation stellen i.d.R. kein größeres Problem dar (Gad, 2007). Bei dermalen Applikation muss normalerweise rasiert werden (Gad, 2007). Auf rektalem oder vaginalem Weg können außerdem Substanzen als Emulsionen, Suspensionen, Gelatinekapseln oder als Cremes verabreicht werden (Gad, 2007).

Klinische Beobachtungen der Tiere finden i.d.R. vor und nach der Applikation von Wirkstoffen statt (Gad, 2007). Wichtig ist es hierbei, das Spektrum an klinischen Symptomen und Anzeichen zu kennen und erkennen, die in einer normalen Hundepopulation zu sehen sind (Gad, 2007). Dazu gehören sporadisch auftretendes Erbrechen, weiche Kotkonsistenz, schleimiger Kotabsatz, Diarrhoe, Nasenausfluss, injizierte Skleren, Haarausfall und blutiger Vaginalausfluss oder eine ödematisierte Vulva bei weiblichen Tieren (Gad, 2007). Speziellere neurologische Evaluierungen beinhalten sowohl Untersuchungen zum zentralen und peripheren Nervensystem, sowie der Sensitivität und Motorik (Gad, 2007). Durchgeführt werden sollen diese Tests von Tierärzten oder erfahrenem Laborpersonal (Gad, 2007). Beurteilt werden die Tiere sowohl in ihrem Zwinger, als auch außerhalb, z.B. zum Testen von Reflexen (Gad, 2007). Blutproben können am unsedierten Tier in ausreichender Menge durch Punktion der V. cephalica, V. jugularis, V. femoralis, V. brachialis oder V. saphena gewonnen werden (Gad, 2007). Die Maximalmenge für Blutprobenentnahmen beträgt in den USA nach den Richtlinien des IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*) unabhängig von der Spezies nicht mehr als 1,5% des Körpergewichts innerhalb von 2 Wochen bzw. bei Einzelprobenentnahmen nicht mehr als 1% des Körpergewichts (maximal 15% des Körpergewichts in einem Monat, 7,5% wöchentlich oder 10% jede zweite Woche). In Deutschland sind die Empfehlungen der GV-SOLAS³ zu beachten (bei einmaligen Blutentnahmen nicht mehr als 10%, bei täglichen nicht mehr als 1% des Körpergewichts) (Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS, 2009). Inhalationsstudien können mittels Maske oder in speziellen Inhalationskammern durchgeführt werden (Gad, 2007). Liquor und Knochenmark können unter Sedation entnommen werden und auch Speichel ist einfach zu gewinnen (Gad, 2007). Das Sammeln von Kot und/oder Urin erfolgt in Stoffwechselkäfigen (Gad, 2007). Urin kann auch mittels Blasenkatheter oder per Zystozentese gewonnen werden (Gad, 2007).

³ Gesellschaft für Versuchstierkunde - *Society for Laboratory Animal Sciences*

Tierartspezifische Besonderheiten des Hundes mit Bedeutung für die Verwendung als Versuchstier

Eine der bekanntesten relevanten Eigenschaften des Hundes ist die gegenüber anderen Tierarten erhöhte natürliche Tendenz zu erbrechen (Gad, 2007) (Ganderup et al., 2010) (Hasiwa & Bailey, 2011). Die Inzidenz für Vomitus in einer Kontrollgruppe (die Autoren Gad et al. (2007) unterscheiden hierbei nicht zwischen unbehandelten Tieren und Tieren, die nur die Trägersubstanz verabreicht bekamen) an einem Tag beträgt bis zu 40-50% (Gad, 2007). Diese Neigung zum Erbrechen stellt insofern ein Problem dar, da bei oraler Gabe von Substanzen ein Teil der Gesamtdosis verloren gehen kann (Gad, 2007) und man bei den klinischen Beobachtungen während einer Studie unter Umständen nicht zwischen spontanem und substanzinduziertem Erbrechen unterscheiden kann.

Weitere häufige Symptome sind verstärkter Haarverlust und Alopezie durch vermehrten Juckreiz, wobei beides oft saisonal (überwiegend im Frühjahr und Sommer) bedingt ist und häufiger bei weiblichen Tieren in Zusammenhang mit der Läufigkeit zu beobachten ist (Gad, 2007). Eine Neigung zu Haut- und Haarproblemen könnte unter Umständen die Ergebnisse der klinischen Beobachtung während eines Versuchs verfälschen.

Ein weiteres bekanntes Problem stellt die Polysorbat-induzierte Ausschüttung von Histamin dar (Gad, 2007) (Hasiwa & Bailey, 2011). Bei intravenöser Verabreichung z.B. von Cremophor, einem Lösungsvermittler für lipophile Arzneistoffe, kommt es zu einer verstärkten Histaminausschüttung, die sich beim Hund in lokalen Hautreaktionen, Juckreiz, Erbrechen, gestörtem Allgemeinbefinden, Hypotension und Kardiodepression bemerkbar macht (Gad, 2007). In Meerschweinchen, Ratten, Katzen, Kaninchen und beim Menschen ist eine solche Reaktion nicht zu beobachten (Smith & Trennery, 2002).

Den Einsatz des Hundes als Versuchstier begrenzen weitere Faktoren, wie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber organischen Säuren, da diese schlechter über die Niere verstoffwechselt werden als bei anderen Tierarten (Bode et al., 2010), das vermehrte Auftreten von Läsionen im Magen-Darm-Trakt nach Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika, Kardiotoxizität nach Gabe von Vasodilatoren und Antihypertensiva und die erhöhte Sensitivität gegenüber Östrogenen und Antiöstrogenen von weiblichen Tieren (Hasiwa & Bailey, 2011).

Auch eine erhöhte Krampfbereitschaft von Hunden (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011) und die

genetische Prädisposition des Beagles für die Ausprägung einer idiopathischen Epilepsie ist hier von Bedeutung (Gough & Thomas, 2010) (Fischer et al., 2013).

2.1.2 Vor- und Nachteile des Hundes als Versuchstier

Als Vorteile des Hundes werden in der Literatur zum einen seine mittlere Größe, die moderate Felllänge, sein ruhiges Temperament und sein freundlicher Charakter genannt (Gad, 2007). Außerdem sind Hunde unproblematisch im Umgang (z.B. zum Dosieren, Blutentnahmen, EKG, etc.) und haben eine hohe Anpassungsfähigkeit in Gruppen zu leben (Gad, 2007). Weitere Pluspunkte des Hundes sind außerdem seine Ähnlichkeit in Anatomie und Physiologie zum Menschen, eine gute Verfügbarkeit durch kommerzielle Züchter in der EU und den USA und eine fundierte vorhandene Hintergrunddatenbasis (Smith et al., 2001) (Ellegaard et al., 2010) (Hasiwa & Bailey, 2011).

Das Zoonosepotential ist eher als niedrig einzustufen. Nach Gad et al. (2007) sollte das Laborpersonal gegen Tollwut geimpft sein. Weitere Vorteile sind das Vorhandensein von erfahrener Laborpersonal im Umgang mit Hunden (Ellegaard et al., 2010) und in der Regel eine gute Akzeptanz des Hundes als Nichtnagerspezies in toxikologischen Studien durch die Zulassungsbehörden, da dieser seit Jahren als Versuchstier eingesetzt wird und teilweise in internationalen Richtlinien als Nichtnagerspezies explizit genannt wird (OECD Guideline 409, 1998).

Als Nachteile werden dagegen Aspekte wie die Variabilität in Körpergröße und -gewicht genannt, außerdem lautes und penetrantes Bellen, höhere Kosten in Beschaffung und Unterhalt, sowie größere Ansprüche an die Testsubstanz als kleinere Tiere (Gad, 2007). Zudem gelten Hunde als anspruchsvoll was die Haltung und Bewegungsfreiheit angeht (Gad, 2007). Der Hund hat nach dem Minipig das größte Körpergewicht, damit den größten Substanzbedarf (Ellegaard et al., 2010) und wird in der Öffentlichkeit eher wenig als Versuchstier akzeptiert, da Hunde als Familienmitglieder gelten (Webster et al., 2010).

Beim Beagle ist durch die rasche Metabolisierung vieler Wirkstoffe oft die Halbwertszeit besonders kurz (Gad, 2007), was ein Problem für subchronische oder chronische toxikologische Studien darstellen kann.

Weitere Nachteile sind, wie bereits erwähnt, tierartspezifische Besonderheiten wie eine erhöhte Krampfanfälligkeit, die natürliche Tendenz zu Erbrechen, das gehäufte Auftreten von gastrointestinalen Läsionen nach Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika,

kardiotoxische Wirkungen nach Gabe von Vasodilatoren und Antihypertensiva, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Östrogenen und Antiöstrogenen bei weiblichen Tieren und eine substanzspezifische überhöhte Histaminausschüttung (Hasiwa & Bailey, 2011). Neuere Veröffentlichungen sind zudem der Meinung, dass vor allem bei den Organsystemen Haut und Magen-Darm-Trakt große Unterschiede zum Mensch bestehen (Ganderup et al., 2010) was den Hund als Versuchstier bezüglich dieser Organsysteme eher in den Hintergrund oder im Gegenzug das Minipig in den Vordergrund rücken lässt.

2.1.3 Der Hund als Versuchstier in der Neurowissenschaft

Analog zu den anderen Nichtnagerspezies Schwein und Affe können ebenfalls viele Tests zu Verhalten, Lernen und Erinnerungsvermögen im Hund durchgeführt werden: Ein klassisches Beispiel ist die operante Konditionierung von Pawlow, der sich mit Reflexen beschäftigte, die die Absonderung von Speichel und Magensaft beim Hund beeinflussen (Bayrhuber & Kull, 1998). Eher nachteilig bei der Verwendung von Hunden als Nichtnagerspezies im Bereich der Neurowissenschaften wird die Tatsache bewertet, dass ein relativ hoher Anteil einer erhöhten spontanen Krampfneigung von 6% der Population für den Beagle besteht und dieser somit unter Umständen eine natürliche Tendenz zu substanzinduzierten Krämpfen hat (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011). In diesem Zusammenhang ist eine steigende „Inzucht“-Problematik bei Versuchstierzüchtern zu beachten, da die Krampfanfälligkeit bei Beaglen eine genetische Basis zu haben scheint (Bielfelt et al., 1971). Nach Meinung mancher Autoren sind jedoch durch seinen routinemäßigen Einsatz in standardtoxikologischen Studien und der Erfahrung des tierbetreuenden Personals Veränderungen neurologischer Art oft im Hund einfacher zu bewerten, was seinen Einsatz in Studien im Bereich der Neurowissenschaften auf der anderen Seite wertvoll macht (Greaves et al., 2004).

Weitere wichtige Aspekte sind Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Typen von Krampfanfällen und EEG-Veränderungen wie fokale Niedrigfrequenz-Muster ohne *spikes*, fokale epileptiforme Aktivität und generalisierte epileptiforme Aktivität, die in Hunden und Menschen zu beobachten sind (Berendt & Hogenhaven, 1999) (Berendt & Gram, 1999). Somit stellt der Hund beispielsweise eine geeignete Spezies für die Bewertung des prokonvulsiven Risikos beim Mensch dar (Dürmüller et al., 2007). Außerdem werden Hunde wegen ihrem Polymorphismus im D4-Rezeptor-Gen und ihrer Hyperaktivität

eingesetzt, was Beobachtungen im Vergleich zu ADHS-erkrankten Menschen zulässt (Hejjas et al., 2007).

2.2 Der Affe

2.2.1 Allgemeines

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über Basisdaten des Affen als Versuchstier. Siehe auch „Übersichtstabelle Nichtnagerspezies vergleichend“.

(C = Cynomolgus, M= Marmoset, R = Rhesus)

Spezies	Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>), Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>), Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) ^a
Natürliche Lebenserwartung	C: 15 - 25 Jahre, M: 10 - 16 Jahre, R: 20 - 30 Jahre ^a
Gewicht	C: ♂ 4,5–8,0 kg, ♀ 3,5–5,5 kg M: 0,35 – 0,5 kg R: ♂ 6–11 kg, ♀ 4–9 kg ^a
Geschlechtsreife	C: 36–48 Monate M: ♂ 16 Monate, ♀ 14 Monate R: ♂ 36–48 Monate, ♀ 24–36 Monate ^a
Alter/Gewicht bei Erstnutzung für toxikologische Studien	C/R: 16–24 Monate/2,5–4 kg M: 14–24 Monate/0,3–0,4 kg ^a
Reproduktionsrate und Wurfgröße	polyöstrisch, C/R: 1 Jungtier M: 1–2 Jungtiere (meistens Zwillinge) ^a
Ernährung	omnivor ^a
Haltung	Paar- oder Gruppenhaltung, Käfige oder Laufstall ^b
Temperatur, relative Luftfeuchte	18–29°C, 30–70% relative Luftfeuchte ^b
Sozialisation	Fähigkeit soziale Gruppen auszubilden ^a
Verfügbarkeit	ausreichend, (Anbieter in EU und USA, teilweise Importe aus Drittweltländern) ^a
Zoonosepotential	niedrig, aber grundsätzlich höher als bei anderen Nichtnagerspezies (Laborpersonal sollte Hepatitis-B-geimpft sein) ^b
Gesundheitsstatus	konventionell (nicht alle Kolonien sind Herpes-B-Virus-frei) ^a

Qualität/Umfang der vorhandenen Vergleichsdatenbasis	gut ^c
Akzeptanz der Zulassungsbehörden	gut ^{f, r}
Öffentliche ethische Bedenken	hoch, wegen Ähnlichkeit zum Menschen ^j

Tabelle 2: Basisdaten des Affen als Versuchstierspezies

^a (Ellegaard et al., 2010), ^b (Gad, 2007), ^c (Smith et al., 2001), ^j (EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010), ^f (OECD Guideline 409, 1998), ^r (ICH Guideline S5(R2), 2005) (wird in beiden Guidelines als optionale Nichtnagerspezies aufgelistet)

Allgemeine Aspekte des Affen als Versuchstier

Die physiologische und phylogenetische Ähnlichkeit des Affen zum Menschen und die vermehrte Testung von biotechnologischen Substanzen in der Entwicklung hat zu einer steigenden Nachfrage nach dieser Tierart als Versuchstierspezies in der präklinischen Arzneimittelentwicklung geführt (Gad, 2007). Hierzu geeignete Affenarten sind Altweltaffen (Cynomolgus-Affen, Rhesus-Affen, Paviane) und Neuweltaffen (Totenkopffäffchen, Marmosets) (Gad, 2007). Der Einsatz von zwei verschiedenen Affenarten ist weder geeignet noch notwendig, außer es besteht hierfür eine fundierte wissenschaftliche Rechtfertigung (Buckley et al., 2008). Die Verwendung von Schimpansen oder anderen Menschenaffen wird aus ethischen, wissenschaftlichen und logistischen Gesichtspunkten nicht empfohlen, ganz abgesehen von der Tatsache, dass es sich hierbei um bedrohte Tierarten handelt (Buckley et al., 2008).

Speziell im Entwicklungsprozess von monoklonalen Antikörpern ist die Speziesauswahl eine große Herausforderung und hier wird oft das Tiermodell Affe als einzige relevante Spezies angesehen (Chapman et al., 2009) (Buckley et al., 2011). Die steigende Anzahl von Medikamenten auf der Grundlage von monoklonalen Antikörpern oder anderen sog. *large molecules* führt somit auch zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an verwendeten Affen (Buckley et al., 2011). Jedoch sollte man nach der Meinung mancher Autoren nicht von vornherein annehmen, dass der Affe die am besten geeignete Spezies sei, ohne zuvor die pharmakologische Aktivität zwischen den einzelnen Spezies zu bewerten (Buckley et al., 2011).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Affen eine fundierte toxikologische Bewertung der untersuchten Testsubstanzen in vielen Fällen möglich war (Baldrick, 2011). Neuere Einsatzgebiete des Affen als Versuchstier sind vor allem im Bereich der Reproduktionsmedizin bei der Entwicklung von *biologics*, sofern Nager und/oder Kaninchen in Bezug auf das verfolgte Versuchsziel keine relevante Tierart

darstellen (Faqi, 2012). Betont wird in der Literatur aber immer wieder auch die Überlegung, dass nicht-menschliche Primaten nur als Versuchstierspezies eingesetzt werden sollten, wenn keine alternativen Methoden vorhanden oder die Versuche unentbehrlich und essentiell für die Risikobewertung der Testsubstanz im Entwicklungsprozess sind (Faqi, 2012).

In Zusammenhang mit dem Einsatz von Affen wird oft die Ähnlichkeit zum Menschen genannt. Manche Autoren sind der Ansicht, der Affe sei insofern klar den anderen Versuchstierspezies wie Hund, Minipig und Nagern überlegen, da er einen ähnlichen Stoffwechsel und eine ähnliche Enzymausstattung (z.B. P450-CYP) aufweist und somit vergleichbare pharmakokinetische Effekte wie der Mensch zeigt (Smith et al., 2001). In diesem Zusammenhang wird auch die phylogenetische enge Verwandtschaft von Mensch und Affe betont (Gad, 2007). Auf der anderen Seite stellt der Affe allerdings trotzdem keine für die Risikobewertung in der Arzneimittelentwicklung relevante Spezies dar, sofern er keine pharmakologische Aktivität der Testsubstanz aufweist oder der Zielrezeptor im normalen Gewebe nicht exprimiert wird (Chapman et al., 2009).

Auch Ähnlichkeiten bezüglich der Physiologie, Neuroanatomie, Reproduktion, Entwicklung, Lern- und Sozialverhalten zwischen Mensch und Affe spielen eine Rolle (Phillips et al., 2014). Ebenso sind viele Parallelen in der Lebensweise (tagaktiv, Erdbewohner, omnivore Ernährungsweise) und den sensorischen Fähigkeiten (Farbensehen, größere Relevanz des Sehens als des Riechens) und dem Benutzen von Händen und Daumen zu finden (Phillips et al., 2014).

Gleichzeitig impliziert die nahe Verwandtschaft des Affen zum Menschen nicht automatisch, dass er eine geeignete Spezies für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern ist. Als klassisches Beispiel aus der Vergangenheit sei hier exemplarisch das Molekül TGN1412 der Firma Tegenore Immuno Therapeutics genannt, das zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen in den klinischen Studien beim Mensch führte, wovon bei zuvor erfolgten Studien im Affen diesbezüglich nichts zu beobachten war (Chapman et al., 2009) (Chapman et al., 2010) (siehe auch „3.3 Wissenschaftliche Aspekte – Speziesspezifische Sensitivität“ im Literaturteil). In der Literatur wird auch erwähnt, dass neben den vielen Gemeinsamkeiten mit dem Mensch dennoch kleine, aber signifikante Unterschiede existieren (Phillips et al., 2014).

Ethische Überlegungen

Die Ähnlichkeit von Affe und Mensch hat jedoch nicht nur Vorteile. Gerade beim Einsatz von Affen als Versuchstiere spielen ethische Überlegungen eine wichtige Rolle. Um den notwendigen Einsatz von nicht-menschlichen Primaten in Zukunft noch effektiver und im Sinne des Tierschutzes zu gestalten, ermutigen manche Autoren die Wissenschaftler ihre Daten frühzeitig zu publizieren, um eine breitere Datenbasis zu erhalten, den Vergleich zwischen verschiedenen Versuchstierspezies zu verbessern und somit im Sinne des Tierschutzes unnötige Doppelversuche zu vermeiden (Smith et al., 2001). Hierbei sollten sowohl positive als auch negative gewonnene Erkenntnisse Berücksichtigung finden (Smith et al., 2001).

Die ethische Problematik wird auch in der EU-Verordnung 2010/63/EU erwähnt: „darüber hinaus hat die Öffentlichkeit die größten Bedenken in Bezug auf die Verwendung nicht-menschlicher Primaten“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 17). Die gesellschaftliche und politische Befürwortung des Einsatzes von Affen in toxikologischen Studien nimmt zunehmend ab (van der Laan et al., 2010). Expertengruppen sind der Meinung, dass der Einsatz von nicht-menschlichen Primaten auf Versuche beschränkt sein sollte, für die es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Alternativen gibt (Webster et al., 2010). Dies würde laut Webster et al. (2010) ihren Einsatz auf bestimmte Studien im Bereich der Neurowissenschaften und Gehirnfunktionen beschränken (Webster et al., 2010).

Viele Autoren sind sich einig, dass Affen in toxikologischen Studien nur eingesetzt werden sollen, sofern dies absolut nötig ist (Buckley et al., 2011). Manche Länder haben sogar zusätzliche Restriktionen erlassen, da dort ein erhöhtes Interesse besteht den Einsatz von Primaten zu reduzieren (Ganderup et al., 2010).

Phillips et al. (2014) beschreiben die Problematik als fundamentales ethisches Dilemma bezüglich der moralischen Rechtfertigung aufgrund des unbestrittenen Nutzens für die menschliche Gesundheit, der aber gleichzeitig Schmerzen, Leiden, Stress und Schäden für die Affen bedeutet (Phillips et al., 2014). In den letzten 50 Jahren sei jedoch eine starke Veränderung bezüglich der Forschung an nicht-menschlichen Primaten eingetreten (Phillips et al., 2014). Mittlerweile gibt es keine Versuche an Affen mehr ohne Nachweis eines entsprechenden Trainings und/oder Sachkundenachweis der an den Tierversuchen beteiligten Personen (Phillips et al., 2014). Zudem muss im Vorfeld eine Übersicht über sämtliche geplante Verfahren und Prozeduren, sowie eine wissenschaftliche Begründung

abgegeben werden, warum gerade diese Spezies verwendet werden soll (Phillips et al., 2014). Auch die wissenschaftliche Signifikanz der Daten, die generiert werden sollen, muss angegeben werden, außerdem ein Nachweis, dass es sich nicht um einen unnötigen Doppelversuch handelt (Phillips et al., 2014). Mittlerweile gehen mehr als 95% der Versuche in der Verhaltensforschung und der biomedizinischen Forschung an Affen ohne schmerzhaftes Eingriffe einher oder die Tiere werden gezielt mit Analgetika behandelt (Phillips et al., 2014).

Praktische und labortechnische Aspekte des Affen als Versuchstier

Die orale Medikamentenverabreichung kann beim Affen über eine Schlundsonde, Nasenschlundsonde oder über die orale Verabreichung einer Gelatine-Kapsel im Futter oder ebenfalls via Sonde erfolgen (Gad, 2007). Subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektionstechniken stellen ebenfalls kein größeres Problem dar (Gad, 2007). Die intranasale Applikation hat sich dagegen nicht immer als erfolgreich bewährt (Gad, 2007).

Geplante klinische Beobachtungen finden i.d.R. vor und nach dem Dosieren der Tiere statt (Gad, 2007). Von erheblicher Bedeutung sind hierbei eine große Erfahrung im Beobachten von Affen und den zu erwartenden Beobachtungen unter Laborbedingungen, da Primaten sehr individuelle Verhaltensweisen zeigen können (Gad, 2007). Speziellere neurologische Evaluierungen beinhalten sowohl Untersuchungen zum zentralen und peripheren Nervensystem, sowie zur Sensorik und Motorik (Gad, 2007). Durchgeführt werden sollten diese Tests von Tierärzten oder sehr erfahrenem Laborpersonal (Gad, 2007). Beurteilt werden die Tiere sowohl in ihrem Käfig, als auch außerhalb z.B. zum Testen von Reflexen (Gad, 2007). Analog zu den anderen Nichtnagerspezies Hund und Minipig können ebenfalls viele Tests zu Verhalten, Lernen und Erinnerungsvermögen im Affen durchgeführt werden, was ihr häufiger Einsatz im Bereich der Neurowissenschaften zeigt (Porsolt, 2012) (Vargas et al., 2013) (Phillips et al., 2014).

Die Gewinnung von Blutproben ist i.d.R. am unsedierten Tier möglich, vorausgesetzt das Personal verfügt über genügend Erfahrung (Gad, 2007). Bei größeren Blutvolumina kann evtl. eine Sedation notwendig werden (Gad, 2007). Als Punktionsstellen eignen sich die V. cephalica, V. femoralis oder V. saphena (Gad, 2007). Inhalationsstudien können analog zu den anderen Nichtnagerspezies Hund und Minipig mittels Maske oder in speziellen Inhalationskammern durchgeführt werden. Liquor und Knochenmark können unter

Sedation entnommen werden und auch Speichel ist einfach zu gewinnen (Gad, 2007). Beim Sammeln von Kot und/oder Urin ist zu beachten, dass dieser häufig kontaminiert ist, da Affen eine natürliche Tendenz dazu haben mit ihrem Futter und Wasser zu spielen (Gad, 2007). Hierzu eignen sich die üblichen Stoffwechselkäfige oder Gewinnung mittels Katheter (Gad, 2007).

2.2.2 Vor- und Nachteile des Affen als Versuchstier

Vorteile des Affen als Versuchstier sind die Existenz einer fundierten Hintergrunddatenbasis in der Literatur und die kleinere Größe im Vergleich zum Hund (Smith et al., 2001). Auch neuere Veröffentlichungen sehen einen Vorteil des Affen in seinem gegenüber den anderen Nichtnagerspezies geringen bis mittleren Körpergewicht und damit Substanzbedarf (Ellegaard et al., 2010). Manche Autoren sind der Ansicht, der Affe sei insofern klar den anderen Versuchstierspezies wie Hunden, Minipigs und Nagern überlegen, da er einen ähnlichen Stoffwechsel und eine ähnliche Enzymausstattung (z.B. P450-CYP) und somit vergleichbare pharmakokinetische Effekte wie der Mensch aufweist (Smith et al., 2001).

Dass bestimmte neurotoxische Effekte aufgrund der speziellen Anatomie und der Transmitterverteilung im Gehirn nur im Affenmodell zu sehen sind wird als Pluspunkt gewertet (Gad, 2007). Derzeit wird in den meisten Fällen für Studien mit monoklonalen Antikörpern der Affe als einzige relevante Spezies angesehen aufgrund der Ähnlichkeit des Immunsystems zum Menschen, die hohe Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktivität der Gewebe, die ähnliche Antikörperkinetik und den niedrigeren Risiken für die Ausbildung einer signifikanten Immunogenität und der Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen den menschlichen Antikörper (Chapman et al., 2007).

Eher neutral zu werten sind Aspekte der Verfügbarkeit, i.d.R. sind Affen als Versuchstiere durch kommerzielle Anbieter in der EU und den USA ausreichend verfügbar, gelegentlich werden sie aber durch Importe aus Drittländern ergänzt (Ellegaard et al., 2010). Die Akzeptanz der Zulassungsbehörden ist gut, da Affen ebenfalls seit Jahren erfolgreich als Versuchstier eingesetzt werden und die Behörden Erfahrungen im Umgang mit Affendaten haben (manche Leitlinien listen Affen als optionale Nichtnagerspezies auf (ICH Guideline S5(R2), 2005)). Auf der anderen Seite soll aber ihr Einsatz aufgrund steigender ethischer Bedenken in der Öffentlichkeit minimiert werden (Ganderup et al., 2010). Ein wachsendes

Problem könnte die Gewährleistung des Transports der Tiere werden, da beispielsweise nur noch wenige Fluggesellschaften bereit sind, Affen zu transportieren (Höflinger, 2012).

Gegen den Einsatz des Affen in Tierversuchen können mögliche Probleme bezüglich der Gruppenkompatibilität sprechen, da unter Affen eine strenge Hierarchie innerhalb der Geschlechter einer Gruppe herrscht (Gad, 2007). Vor allem spielen aber auch ethische Überlegungen (siehe oben ausführlich erläutert) und das Bedenken der Öffentlichkeit gegenüber dem Einsatz von Affen in Tierexperimenten eine Rolle (Lind et al., 2007).

Ein Nachteil des Affen ist das höhere Zoonosepotential im Vergleich zu den anderen Nichtnagerspezies (Gad, 2007), das Laborpersonal sollte u.a. gegen Hepatitis-B geimpft sein (Ellegaard et al., 2010). Problematisch können zudem die besonderen Ansprüche an die Haltungsbedingungen und der Umgang mit den Tieren sein (Ellegaard et al., 2010). Außerdem besteht ein Mangel an gleichbleibender Qualität der Tiere hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes und mikrobiologischen Status, da beispielsweise nicht alle Kolonien Hepatitis-B-frei sind (Ellegaard et al., 2010). Ebenfalls können Schwierigkeiten durch das Fehlen von erfahrenem Laborpersonal im Umgang mit Affen auftreten, oft sind hierzu zunächst spezielle Trainings des Personals nötig (Ellegaard et al., 2010).

Im Hinblick auf Studien zur Reproduktionstoxizität sind Nachteile des Affen die späte Geschlechtsreife und die lange Reproduktionsdauer (Gad, 2007). Auch die geringe Anzahl an Nachkommen stellt gegenüber anderen Spezies einen Nachteil dar, da so evtl. Effekte mit geringer Inzidenz übersehen werden und die Ergebnisse nicht statistisch aussagekräftig sind (Gad, 2007) (Buckley et al., 2011) (Faqi, 2012).

2.2.3 Der Affe als Versuchstier in der Neurowissenschaft

Der Einsatz von nicht-menschlichen Primaten ist bezüglich der Sicherheit des Menschen in der Risikobewertung bei der Arzneimittelentwicklung im Bereich der Neurowissenschaften besonders wertvoll. Porsolt (1995) beschreibt schon früh die Bedeutung des Einsatzes des Primaten in der Demenzforschung, am besten als Tiermodell mit alten Tieren (Porsolt et al., 1995). Klassische Antipsychotika, wie beispielsweise Haloperidol, führen zu Verhaltensweisen im Affen, die klare Homologien zu denen im Menschen aufzeigen und somit, im Gegensatz zum Nager, einen hohen translationalen Wert besitzen (Porsolt, 2012). Zudem existieren nach Meinung des Autors überzeugende wissenschaftliche Gründe für die Wahl von nicht-menschlichen Primaten im

Forschungsbereich des zentralen Nervensystems und anderen Bereichen der Risikobewertung in der Pharmakologie, wie z.B. die deutlich höhere Ähnlichkeit der Pharmakokinetik des Menschen und des Affen gegenüber dem Nager (Porsolt, 2012). Dies gilt auch für substanzinduzierte Verhaltenssymptome wie Sedation, Benommenheit, Erregungszustände, Aggressivität und motorische Inkoordination (Porsolt, 2012).

Der Affe ist die Spezies der Wahl für neurowissenschaftliche Studien, wenn andere Tierarten, z.B. der Nager, nicht den relevanten Rezeptor ausbilden oder das entsprechende Epitop exprimieren können (Vargas et al., 2013). Eine andere Möglichkeit wäre mit humanisierten Mäusen zu arbeiten. Spezielle Testmethoden, die eine detaillierte verhaltensneurologische Bewertung von substanzinduzierten Effekten erlauben, wurden im Cynomolgus-Affen entwickelt (Vargas et al., 2013).

Andere Autoren sehen die Vorteile der Affen zusätzlich in der Verhaltensforschung, da hier große Ähnlichkeiten bezüglich sozialer Wahrnehmung, Komplexität der Umwelt und Psychopathologie zum Mensch zu finden sind (Phillips et al., 2014). In Bezug auf Lernverhalten und Sprache macht das relativ große Gehirn Affen im Vergleich zu anderen Säugetieren wertvoll, um evolutionäre Modelle der menschlichen Entwicklung zu testen (Phillips et al., 2014). Das Gehirn des Affen ähnelt dem menschlichen Gehirn in mehreren wichtigen Punkten wie Enzephalisation, Anzahl und Dichte der kortikalen Neuronen, Größe des präfrontalen Kortex und dem hohen Grad an Myelinisierung (Phillips et al., 2014).

2.3 Das Minipig

2.3.1 Allgemeines

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über Basisdaten des Minipigs als Versuchstier. Siehe auch „Übersichtstabelle Nichtnagerspezies vergleichend“.

Spezies	Göttinger Minischwein (Schwein, <i>Sus scrofa</i>) ^a
Natürliche Lebenserwartung	bis zu 15 Jahre und mehr ^a
Gewicht	ca. 35 kg und mehr ^a
Geschlechtsreife	♂: 3-4 Monate, ♀: 4-5 Monate ^a
Alter/Gewicht bei Erstnutzung für toxikologische Studien	♂: 3-4 Monate/7-8 kg, ♀: 4-5 Monate/9-11kg ^a
Reproduktionsrate und Wurfgröße	polyöstrisch, 5-7 Jungtiere ^a
Ernährung, tägliche Futteraufnahme	omnivor, restriktive Fütterung: 4% des täglichen Körpergewichts ^{a, b}
Haltung	Gruppenhaltung, Laufstall ^b

Temperatur, relative Luftfeuchte	20-22°C, 45-90% relative Luftfeuchte ^b
Sozialisation	Fähigkeit soziale Gruppen auszubilden, Kontakt zu Menschen wichtig ^a
Verfügbarkeit	gut, (Züchter in EU und USA) ^a
Zoonosepotential	niedrig ^a
Gesundheitsstatus	Lieferung in „mikrobiologisch definiertem Status“ ^a
Qualität/Umfang der vorhandenen Vergleichsdatenbasis	gut ^d
Akzeptanz der Zulassungsbehörden	gut bis moderat ^{b, d, f, g} (insgesamt steigend)
Öffentliche ethische Bedenken	moderat, niedriger als bei Hunden oder Affen, da Status als landwirtschaftliches Nutztier ^{h, i}

Tabelle 3: Basisdaten des Minipigs als Versuchstierspezies

^a (Ellegaard et al., 2010), ^b (Gad, 2007), ^d (Harvey, 2014), ^f (OECD Guideline 409, 1998), ^g (van der Laan et al., 2010), ^h (Lind et al., 2007), ⁱ (Webster et al., 2010)

Für das Minipig existieren einige neuere Publikationen zur Nutzung als Versuchstier aus dem letzten Jahrzehnt. Angemerkt sollte hier werden, dass der Züchter und Anbieter der Minipigs (Ellegaard) Mitautor vieler dieser Veröffentlichungen ist.

Allgemeine Aspekte des Minipigs als Versuchstier

Die in Europa etablierte, meist genutzte und am besten charakterisierte Rasse ist das Göttinger Minipig. Diese Rasse stammt von einer Initiative der Universität Göttingen aus dem Jahre 1960 und wird nun kommerziell in Dänemark gezüchtet (Forster&Bode et al., 2010). Der Einsatz von Schweinen als Versuchstier war bis Mitte der neunziger Jahre auf Hautstudien limitiert, mittlerweile werden sie oft auch als Alternative zu den Nichtnagerspezies Hund, Affe oder auch Frettchen in pharmakologischen Studien eingesetzt (Gad, 2007). Seit vielen Jahren werden sie außerdem in der Forschung der Physiologie und Chirurgie, sowie zu ernährungstoxikologischen Untersuchungen verwendet (Clausing et al., 1986). In der Neurowissenschaft werden sie als Krankheitsmodell für diffuse Gehirnverletzungen mit Relevanz für die Alzheimerforschung oder für traumatische Hirnverletzungen eingesetzt, aber auch Effekte von Unterernährung und chronischem Alkoholmissbrauch wurden am Schwein erforscht (Lind et al., 2007). Eine Umfrage von Bode et al. (2010) zur Verwendung des Minipigs in der Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln von 23 Firmen ergab den überwiegenden Einsatz

des Minipigs in Bereichen der Sicherheitspharmakologie, in standardtoxikologischen Studien, in reproduktions- und immunotoxischen Experimenten unter der Verwendung von dermalen, oraler oder parenteraler Applikation von Substanzen (Bode et al., 2010). Einige verfügbare Krankheitsmodelle im Schwein sind Arteriosklerose, metabolische Syndrome, Magengeschwüre und Wundheilung (van der Laan et al., 2010). Auch für Versuche bezüglich der Wundheilung und Toxizitätsstudien bei juvenilen Individuen kann das Schwein verwendet werden (Ganderup et al., 2010). Normale Hausschweine werden auch in Spezialgebieten wie kardiovaskuläre Studien, Studien am Harntrakt, im Bereich Endokrinologie, in der ZNS-Pharmakologie, in Studien zur Rückstandsanalyse, bei veterinärmedizinischen Präparaten und zur Erforschung von Wundheilungsstörungen eingesetzt (Harvey, 2014).

Das Minipig wird als Tierart der Wahl angesehen, wenn die Pharmakokinetik und der Metabolismus beim Mensch dem des Schweins vergleichbarer oder ähnlicher ist als bei Hunden oder Affen (Lehmann, 1998). Da normale Hausschweine für ihre Verwendung als Labortier zu groß sind, wurden Spezialrassen wie das Göttinger Minischwein, das Troll-Minipig und das Yucatan-Micropig gezüchtet (Lehmann, 1998). Weitere geeignete Züchtungen sind das Yucatan-Minipig, Handford, Sinclair, Pitman-Moore und Hormel (Gad, 2000) oder auch die Rassen Czech Miniature, Mini-Lewe, Munich, Clawson, Ohmini, Panepinto (Ganderup et al., 2010). Fast alle eingesetzten Minipigs kommen von demselben Züchter (Ellegaard). Verschiedene wissenschaftliche, ökonomische und soziologische Gründe machen Minipigs zu einem guten und aussagekräftigen toxikologischen Modell (Gad, 2007). Bedeutung haben außerdem Aspekte der besseren öffentlichen Akzeptanz als Testspezies als dies beispielsweise bei Hunden der Fall ist (Gad, 2007).

Die Umfrage von Bode et al. (2010) ergab, dass nur 6 von 22 Firmen das Minipig ins Screening für die pharmakologische Aktivität aufnehmen, um die geeignete Nichtnagerspezies zu ermitteln (Bode et al., 2010). Laut dieser Umfrage wurde das Minipig dazu genutzt, Studienergebnisse im Menschen zu bestätigen, die zuvor im Affen nicht aufgetreten waren, das Abklären von Organtoxizitäten um eine eventuelle Speziespezifität festzustellen oder wenn die Testsubstanz im Hund nicht toleriert wurde (Bode et al., 2010). Weitere Gründe für die Verwendung des Minipigs waren die Untersuchung bestimmter Effekte, generelle Aspekte der Verträglichkeit, Unterschiede im Metabolismus, Überlegungen zu möglichen metabolischen Unterschieden, zu niedriger Exposition im Hund

aufgrund der erhöhten Tendenz von Hunden zu erbrechen, Toleranz für Hautprodukte oder Verträglichkeit bezüglich des Magen-Darm-Traktes (Bode et al., 2010).

Es existieren Hinweise in der wissenschaftlichen Literatur, dass das Minipig als Nichtnagerspezies eine gute prädiktive Aussagekraft für die Sicherheit des Menschen in klinischen Studien hat und somit mehr als nur ein gutes Modell für topische Studien ist (Ganderup et al., 2010). Bei 43 auf den Markt gebrachten Medikamenten aus 20 verschiedenen Indikationsgebieten mit insgesamt 6 verschiedenen Applikationsformen (dermal, intradermal, oral, intravenös, subkutan und intramuskulär) konnte für 63% ein guter prädiktiver Wert ermittelt werden (Ganderup et al., 2010). Der Anteil der dermalen im Vergleich zu anderen Applikationswegen wird hier nicht weiter spezifiziert. Der steigende Einsatz des Minipigs wird zum einen aus Gründen der Verbesserung der technischen Abläufe und der starken Weiterentwicklung verfügbarer Hintergrunddaten erklärt, aber auch durch die Tatsache, dass das Cytochrom-P450-Enzym-System beim Schwein mittlerweile bis ins Detail beschrieben ist, was von Bedeutung für die Auswahl der geeigneten Testspezies ist (Ganderup et al., 2010).

Das Interesse an der Verwendung des Minipigs in der Toxikologie nimmt aus verschiedenen Gründen weiter zu (Harvey, 2014). Zum einen spielt hier die anatomische und funktionale Ähnlichkeit zum Menschen eine Rolle, aber auch die Tatsache, dass Minipigs eine relevante Alternative zu Hunden und nicht-menschlichen Primaten darstellen, die Verfügbarkeit zweckgezüchteter SPF-Tiere (*specific pathogen free*), das wachsende ethische Bedenken der Öffentlichkeit gegenüber der Verwendung von Hunden oder Affen, und letztendlich die Zunahme an verfügbaren Hintergrunddaten von hoher Qualität (Harvey, 2014). Auch die steigende Akzeptanz der zuständigen Behörden in den USA, Europa und Japan sei hier erwähnt (Harvey, 2014). In der Guideline der OECD wird das Minipig explizit als potentielle Nichtnagerspezies für *repeat dose studies* aufgelistet (OECD Guideline 409, 1998). Durch kommerzielle Züchter in der EU und USA ist es gut verfügbar (Ellegaard et al., 2010).

In den letzten Jahren konnten viele Forschungserfolge mit Hilfe von Schweinen erreicht werden. Einige Diagnoseverfahren, gerade im Bereich der Neurowissenschaften, wurden in Schweinen mitentwickelt, zum Beispiel die PET (*positron emission tomography*), MRI (*magnetic resonance imaging*), fMRI (*functional magnetic resonance imaging*), Elektroenzephalographie und Elektrokardiographie (Lind et al., 2007). Auch die Entwicklung von Medikamenten in den Bereichen Parkinson, Alzheimer, Rheumatoide

Arthritis, Psoriasis, Atopische Dermatitis, Akne vulgaris und Nierenkarzinom wird genannt (Ganderup et al., 2010). Mittlerweile sind ebenfalls Alzheimer-Modelle im Minipig verfügbar (PIXIEGENE, Kopenhagen, Dänemark, www.pixiegene.com) (Kragh et al., 2009).

Praktische und labortechnische Aspekte des Minipigs als Versuchstier

Die orale Medikamentenverabreichung kann beim Minipig zum einen in der Nahrung erfolgen, was sich aber in der Praxis eher als schwierig erwiesen hat (Ellegaard et al., 2010). Die Substanzverabreichung über eine Schlundsonde oder mittels Kapsel über eine Sonde ist hierbei im Hinblick auf die gesamte Aufnahme der Testsubstanz sicherer, bedarf einer Fixation und regelmäßigem Training, um dem Stress bei den Tieren entgegenzuwirken (Ellegaard et al., 2010). Subkutane, intrakutane, intramuskuläre oder auch intraperitoneale Injektionstechniken stellen i.d.R., wie bei den anderen Versuchstierspezies, kein größeres Problem dar (Ellegaard et al., 2010). Zur intravenösen Applikation wird die Testsubstanz normalerweise in die Ohrvene oder andere Venen injiziert, was jedoch vor allem bei Ferkeln aufgrund der kleinen Körpergröße und generell wegen tiefliegender Venen schwierig sein kann (Ellegaard et al., 2010). Hier hat sich der Einsatz von flexiblen Kanülen bewährt (Ellegaard et al., 2010). Die intranasale Substanzapplikation gestaltet sich aufgrund eines starken Niesreflexes eher schwierig, da so nicht mit Sicherheit das komplette beabsichtigte Substanzvolumen dem Tier zugeführt werden kann (Ellegaard et al., 2010). Beschrieben sind auch intratracheale Applikationsarten unter Allgemeinanästhesie (Ellegaard et al., 2010). Bei topischen dermalen Studien können bis zu 10% der Körperoberfläche der Minipigs behandelt werden, bei Gruppenhaltung besteht allerdings das Problem des gegenseitigen Ableckens der Substanz (Ellegaard et al., 2010). Inhalationsstudien können mittels Maske oder in speziellen Inhalationskammern durchgeführt werden (Ellegaard et al., 2010). Relativ neu ist auch die Möglichkeit der Implantation osmotischer Pumpen oder programmierbarer Micro-Infusomaten, um mehrere Injektionen zu vermeiden (Ellegaard et al., 2010).

Klinische Beobachtungen finden wie bei den anderen Versuchstierspezies ebenfalls i.d.R. vor und nach dem Dosieren der Tiere statt (Gad, 2007). Für die Bewertung von neurologischen Symptomen existieren derzeit keine Standardprotokolle (Gad, 2007). Der Einsatz des Schweins im Bereich der Neurowissenschaften (Gad, 2007) (Lind et al., 2007) zeigt, dass analog zu Hund und Affe ebenfalls viele Tests zu Verhalten, Lernen und Erinnerungsvermögen im Schwein durchgeführt werden können. Für die

Blutprobenentnahme eignet sich die Ohrvene, die beim Minipig jedoch meistens sehr klein ist, so dass in vielen Fällen eine Sedation notwendig ist (Ellegaard et al., 2010). In der Literatur beschrieben (Ellegaard et al., 2010) wird zusätzlich die Blutentnahme aus der V. cava cranialis am unsedierten Tier, bei der ohne Sicht gestochen werden muss und die somit ein hohes Maß an Erfahrung des Laborpersonals erfordert (Ellegaard et al., 2010). Bewährt haben sich für mehrere Blutentnahmen zudem Venenverweilkatheter (Ellegaard et al., 2010). Das Sammeln von Kot und/oder Urin erfolgt in Stoffwechselkäfigen und stellt kein größeres Problem dar (Ellegaard et al., 2010). Liquor und Knochenmark können unter Sedation entnommen werden und auch Speichel ist einfach zu gewinnen (Ellegaard et al., 2010).

Ethische Überlegungen

Wenn man die emotionale Bindung zu Tieren beachtet, wird das Schwein eventuell im Bereich der Neurowissenschaften aus ethischen Gesichtspunkten eher akzeptiert als der Affe, aber weniger als Nager (Lind et al., 2007). Webster et al. (2010) beschäftigten sich intensiv mit ethischen Überlegungen zum Einsatz des Minipigs als Versuchstier (Webster et al., 2010). In diesem Zusammenhang wurden Fragen erörtert was die potentiellen Leiden und Schäden beim Minipig in Relation zu den Leiden und Schäden beim Hund oder Affe sind und ob diese beim Minipig eventuell einfacher zu reduzieren wären (Webster et al., 2010). Die Forschungsgruppe kam zu der Schlussfolgerung, dass man bezüglich ihrer Empfindlichkeit Schmerzen, Leiden oder Schäden zu empfinden, nicht zwischen Minipig, Hund oder Affe unterscheiden kann (Webster et al., 2010). Sicherlich kein Argument ist, dass Minipigs eher von der Öffentlichkeit als Versuchstiere akzeptiert werden, nur weil ihre Verwendung nicht so sehr das Interesse der Tierschutzorganisationen weckt wie dies beim Einsatz von Hunden oder Affen der Fall ist (Webster et al., 2010). Auch die Tatsache, dass sie eher als landwirtschaftliche Nutztiere angesehen werden, im Gegensatz zum Hund als Familienmitglied oder zum Affen als der Spezies, die dem Menschen am nächsten ist, macht sie nicht automatisch zu einem akzeptableren Versuchstier (Webster et al., 2010). Laut Webster et al. (2010) soll die Versuchstierauswahl eine Fall-zu-Fall-Entscheidung sein (Webster et al., 2010). Hierzu müssen die Vorteile abgewogen werden, ein hoher prädiktiver Wert vorhanden und die Entscheidung wissenschaftlich begründet sein (Webster et al., 2010).

Tierschutzrechtliche Überlegungen

Aus tierschutzrechtlicher Sicht existieren keine grundlegenden Beschränkungen für die Nutzung von Minipigs in toxikologischen Studien, die sich nur auf diese Spezies beschränken (Ellegaard et al., 2010). Es ist einfacher Minipigs unter Laborbedingungen gute Haltungsbedingungen hinsichtlich des Tierschutzes zu bieten, als dies für Hunde oder Affen möglich ist, da Minipigs nicht so einen starken Bewegungsdrang besitzen wie Hunde oder Affen (Ellegaard et al., 2010). Allerdings hat es sich als schwierig erwiesen den tatsächlichen Stresslevel bei Minipigs zu messen, da hierzu kein geeigneter messbarer Einzelparameter zur Verfügung steht, um dies zu evaluieren (Ellegaard et al., 2010). In dieser Hinsicht besteht noch Forschungsbedarf (Ellegaard et al., 2010).

Gesetzliche Akzeptanz

In den Richtlinien der FDA, EMA und ICH werden Minipigs als geeignete Tierart genannt, um die Rolle der Nichtnagerspezies in toxikologischen Studien einzunehmen (van der Laan et al., 2010). Es ist wichtig zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Rolle des Minipigs in diesem Zusammenhang zu diskutieren, da die politische und damit gesellschaftliche Unterstützung für den Einsatz von nicht-menschlichen Primaten in der Öffentlichkeit stetig abnimmt (van der Laan et al., 2010). In der Toxikologie ist das Minipig-Modell vor allem im Bereich Hautstudien etabliert und regulatorisch akzeptiert (van der Laan et al., 2010). Insgesamt ist die gesetzliche Akzeptanz nach Meinung von Harvey et al. (2014) steigend (Harvey, 2014).

2.3.2 Vor- und Nachteile des Minipigs als Versuchstier

Vorteile des Minipigs liegen nach Meinung älterer Veröffentlichungen in der Tatsache, dass Schweine einfach zu ernähren sind und dass sie bei kardiovaskulär wirksamen Substanzen nicht so empfindlich sind wie der Hund, was eher die Situation im Menschen widerspiegelt (Lehmann, 1998). Zudem existieren für das Minipig weniger detaillierte gesetzliche Tierschutz- und Haltungsbestimmungen wie für Hunde oder Affen (Gad, 2007), was es zwar einfacher macht die Tierhaltung zu realisieren, jedoch nicht in jeglicher Hinsicht als Vorteil zu werten ist, da es ohne entsprechende Richtlinien beispielsweise schwieriger ist einen ausreichenden und einheitlichen Tierschutz der Versuchstiere zu gewährleisten. Der Einsatz erregt weniger die Aufmerksamkeit von Tierschutzorganisationen als dies bei Hunden oder Affen der Fall ist (Lehmann, 1998). Tests im Minipig werden somit

möglicherweise von der Öffentlichkeit eher akzeptiert als bei Hunden und Affen (Forster & Bode et al., 2010). Weitere Vorteile sind, dass sie einfach zu züchten sind, eine große Wurfgröße haben, die Tragezeit (113-115 Tage) im Gegensatz zum Affen kürzer ist und Schweine leichter zu anästhesieren und zu trainieren sind (Lind et al., 2007).

Durch kommerzielle Züchtung ist das Minipig weitestgehend immer verfügbar, außerdem besteht ein großes speziesspezifisches Wissen in Dänemark und anderen schweineproduzierenden Ländern (Lind et al., 2007). Sie werden in der Gesellschaft weniger als der Hund als Familienmitglied angesehen, mehr als landwirtschaftliches Nutztier (Gad, 2007). Zudem sind sie aufgrund niedrigerer Kosten der Haltungsbedingungen ökonomischer als Affen (Lind et al., 2007).

Es besteht eine hohe Ähnlichkeit zum Menschen in Bezug auf die kardiovaskuläre Anatomie und Physiologie, die Haut, den Gastrointestinaltrakt und die Verdauungsphysiologie, den Harntrakt, das Immunsystem und die Cytochrom-P450-Enzymaktivität (Gad, 2007) (Bode et al., 2010). Das Immunsystem des Schweins ist besser charakterisiert als das des Hundes (Bode et al., 2010). Toxische Effekte von chemischen Substanzen und Medikamenten sind aufgrund der Ähnlichkeit zum Menschen (Herz-Kreislauf-System, Haut, Verdauungsapparat) den Eigenschaften im Menschen vergleichbarer als dies bei vielen anderen Labortieren der Fall ist (Forster & Bode et al., 2010). Betont wird in der Literatur außerdem die Vielseitigkeit des Minipigs in verschiedenen Studientypen eingesetzt zu werden (Bode et al., 2010).

Wie schon erwähnt ist es ein weiterer Vorteil hinsichtlich Aspekten des Tierschutzes, dass es einfacher ist Minipigs unter Laborbedingungen artgerechte Haltungsbedingungen zu bieten, als dies für Hunde oder Affen der Fall ist (Ellegaard et al., 2010). Außerdem hat das kommerzielle Interesse am Schwein als landwirtschaftliches Nutztier zu einem wissenschaftlichem Fortschritt geführt, es existiert kein vergleichbarer vorantreibender ökonomischer Faktor bei Hunden oder Affen (Forster & Ancian et al., 2010). Das Ergebnis ist, dass die verfügbaren Kenntnisse bezüglich Physiologie, Krankheiten, Genetik, Immunologie sehr umfassend sind und außerdem ein fundamentales genetisches Wissen und Phänotyp-Charakterisierung, sowie ein breites Basiswissen und gute technische Fähigkeiten bestehen (Forster & Ancian et al., 2010). Das Zoonosepotential bei der Verwendung von Schweinen wird in der Literatur nicht explizit erwähnt, ist aber eher als gering einzustufen, da Minipigs i.d.R. in einem „mikrobiologisch definierten Status“ geliefert werden (Ellegaard et al., 2010).

Das Göttinger Minipig hat sich auch für die Durchführung von toxikogenomischen Studien etabliert (Forster & Ancian, et al., 2010). Da eine enge Sequenzhomologie zwischen Mensch und Schwein besteht, könnte es für z.B. Tests von biotechnologischen Produkten nützlich sein (Forster & Ancian, et al., 2010). Zudem ist es das einzige Nichtnagermodell in der Toxikologie, bei dem transgene Tiere generiert werden können und reproduktionstechnologische Verfahren gut entwickelt sind (Forster & Ancian et al., 2010). Grundsätzlich scheint es so, als sei das Minipig ein besseres Nichtnagermodell für toxikologische Studien als der Hund, hierbei besteht allerdings noch Forschungsbedarf (Bode et al., 2010).

Die Stoffwechselaktivität beim Minipig ist 2-3fach höher als beim Menschen, was sie laut Ganderup et al. (2010) wertvoll für den Einsatz in ADME-Studien macht (Ganderup et al., 2010). Nur wenige und einfache Hilfsmittel werden benötigt, um toxikologische Studien am Schwein durchzuführen, zum Beispiel können Schweine in den gleichen Zwingern gehalten werden wie Hunde, so dass individuell von Studie zu Studie entschieden werden kann, welche Spezies verwendet wird (Lehmann, 1998) (Harvey, 2014).

Ein Vorteil gegenüber dem Hund ist die Tatsache, dass das Schwein wesentlich resistenter gegenüber gastrointestinalen Nebenwirkungen bei der Applikation von nicht-steroidalen Antiphlogistika ist (Lehmann, 1998) (Bode et al., 2010) (Harvey, 2014), wobei ältere Publikationen auch eine erhöhte Empfindlichkeit von Schweinen gegenüber bestimmten Substanzen (Carbaryl, Methylquecksilber) im Vergleich zum Hund angeben (Gad, 2007). Auch der Wirkstoff Proquazon aus dem Bereich der NSAIDs erzeugt im Schwein stärkere toxische Effekte als im Hund (van Ryzin & Trapold, 1980). Im Gegensatz dazu tolerieren Minipigs i.d.R. Sympathomimetika und Antihypertensiva besser (Kardiotoxizität beim Hund), entwickeln keine Arteriopathie bei Substanzen aus der Wirkstoffklasse der Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, haben zudem keine natürliche Tendenz zum Erbrechen, keine vermehrte Histaminausschüttung nach Gabe bestimmter Substanzen (wie z.B. Cremophor in Hunden) und sind nicht so empfindlich gegenüber Östrogenen und Antiöstrogenen wie der Hund, der dadurch eine aplastische Anämie entwickeln kann (Bode et al., 2010) (Harvey, 2014). Minipigs lernen schnell, haben die Fähigkeit das Laborpersonal zu erkennen, sind leicht zu trainieren und kooperieren nach entsprechendem Training gut während den studienspezifischen Abläufen (Harvey, 2014). Sollten Probleme bei der Gruppenhaltung auftreten, könnten diese so gelöst werden, dass

schon Tiere beim Züchter bestellt werden, die dort bereits zusammengelebt haben (Harvey, 2014).

Als großer Nachteil des Minipigs wird mehrfach in der Literatur sein großes Gewicht und der damit hohe Substanzbedarf genannt (Lehmann, 1998) (Smith et al., 2001) (Gad, 2007) (Ganderup et al., 2010) (Harvey, 2014). Weitere Autoren sehen zudem Nachteile bezüglich des umständlichen Handlings, der fehlenden Kooperation und der Tatsache, dass die Arbeit mit Schweinen eine größere Arbeitsbelastung für das Personal bedeutet, da Schweine beim Fangen und Fixieren oft sofort anfangen zu schreien (Lehmann, 1998). Auch ist das Bestimmen des Stresslevels im Tier schwierig (Ellegaard et al., 2010). Außerdem können Probleme bei der Entnahme von Blutproben auftreten, da die Vena jugularis sehr fragil ist und periphere Blutgefäße eine tiefere Lokalisation haben als bei anderen Tieren (Smith et al., 2001). Problematisch kann zudem ihr Einsatz bei kardiovaskulären Studien sein, da Schweine spontan Arteriosklerose entwickeln können (Smith et al., 2001).

Wie bereits erwähnt sind Schweine empfindlicher gegenüber bestimmten Substanzen (Carbaryl, Methylquecksilber) im Vergleich zum Hund (Gad, 2007), auch der Wirkstoff Proquazon (NSAID) erzeugt im Schwein stärkere toxische Effekte als im Hund (van Ryzin & Trapold, 1980). Grundsätzlich gestaltet es sich schwieriger, im Umgang mit Schweinen erfahrenes Laborpersonal zu finden, oft sind vorab spezielle Trainings nötig (Ellegaard et al., 2010). Das Personal muss gut geschult sein, um den Stress für die Tiere während der Blutentnahme möglichst gering zu halten (Ellegaard et al., 2010). Auch ist wegen Größe und Gewicht der Tiere mehr Personal notwendig.

Laut einer jüngeren Umfrage sehen 14 von 22 Firmen Hindernisse bezüglich der Größe und des Substanzbedarfs, Lücken in Erfahrungen in der Nutzung von Minipigs, Nachteilen in der Tierhaltung, schlechten Bedingungen bezüglich Angebot und Logistik, technischen Aspekten, Schulung des Personals und fehlender diagnostischer Ausstattung und Reagenzien (Bode et al., 2010).

2.3.3 Das Minipig als Versuchstier in der Neurowissenschaft

1966 wurden die ersten Schweine zur Erforschung von neurologischen Erkrankungen in der Pädiatrie eingesetzt (Lind et al., 2007). Der Einsatz des Schweins im Bereich der Neurowissenschaften hat insgesamt zugenommen, da die Menge an verfügbaren Hintergrunddaten bezüglich der Anatomie des Schweinegehirns und der Neurochemie in

den letzten Jahren ebenfalls gestiegen ist (Lind et al., 2007). Verschiedene Aspekte machen seinen Einsatz in den Neurowissenschaften wertvoll. Das Schweinegehirn ist relativ groß und besitzt Strukturen, die auch bei anderen Spezies zu finden sind (Lind et al., 2007). Außerdem weist es viele Ähnlichkeiten zum menschlichen Gehirn bezüglich Entwicklung, Topographie, Histologie und Gefäßanatomie auf (Gad, 2007) (Lind et al., 2007). Eine wichtige Rolle hat das Schwein in der Parkinson-Forschung, da im Göttinger Minipig typische Parkinsonsymptome wie Muskelrigidität, Hypokinesie und Beeinträchtigung der Koordination induziert werden können (Gad, 2007). Auch für die Alzheimer-Forschung stehen in der Zwischenzeit ebenfalls Modelle im Minipig zur Verfügung (PIXIEGENE, Kopenhagen, Dänemark, www.pixiegene.com) (Kragh et al., 2009).

Mittlerweile haben sich diverse spezifische Schweinemodelle von Gehirnerkrankungen etabliert (Lind et al., 2007). Außerdem sind sie ein Modell für transgene Manipulationen von neuronalen Genen (Lind et al., 2007). Schweine erfüllen somit viele der Voraussetzungen für eine gute Labortierspezies, um Gehirn- und Verhaltensprozesse zu erforschen und könnten nicht-menschliche Primaten für manche neuroanatomische und -chemische Studien ersetzen (Lind et al., 2007).

2.4 Übersichtstabelle Nichtnagerspezies (Hund, Affe, Minipig) vergleichend

In der folgenden Tabelle sind die für generelle toxikologische Studien verwendeten und zuvor abgehandelten Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig anhand verschiedener Gesichtspunkte wie Basisdaten, Reproduktionsdaten, züchterische Aspekte, Gruppenstrukturen, soziale Ansprüche, Ernährung, Haltungsbedingungen, Handling und weiteren bedeutsamen Aspekten hinsichtlich der Verwendung als Versuchstier vergleichend dargestellt.

(M = Marmoset, C = Cynomolgus, R = Rhesus)

	Hund	Affe	Minipig
Basisdaten			
Spezies	Beagle (<i>Canis familiaris</i>) ^a	Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>), Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>), Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) ^a	Göttinger Minischwein (<i>Sus scrofa</i>) ^a
Natürliche Lebenserwartung	15 Jahre und mehr ^a	C: 15-25 Jahre, M: 10-16 Jahre, R: 20-30 Jahre ^a	15 Jahre und mehr ^a
Körpergewicht	8-10 kg ^p , 10-13 kg ^q , 20-28 kg ^a	C: ♂ 4,5-8 kg, ♀ 3,5-5,5 kg, M: 0,35-0,5 kg, R: ♂ 6-11 kg, ♀ 4-9 kg ^a	35 kg ^a
Geburtsgewicht	250 g ^a	C: 330-350 g, M: 25-35 g,	300-550 g ^a

	Hund	Affe	Minipig
		R: 400-550 g ^a	
Geschlechtsreife	♂ 7-8 Monate, ♀ 8-14 Monate ^a	C: 36-48 Monate, M: ♂ 16 Monate, ♀ 14 Monate, R: ♂ 36-38 Monate, ♀ 24-36 Monate ^a	♂ 3-4 Monate, ♀ 4-5 Monate ^a
Alter/Gewicht bei Erstnutzung für toxikologische Studien	5-10 Monate/6-12 kg ^a	C/R: 18-24 Monate/2,5- 4 kg , M: 14-24 Monate/0,3-0,4 kg ^a	3-4 Monate/7-8 kg ^a
Reproduktion, züchterische Aspekte			
Reproduktionsrate	monoöstrisch (22 Tage) mit Intervallen von 7-8 Monaten ^a	C: polyöstrisch, Zyklus alle 30-32 Tage, M: polyöstrisch, Zyklus alle 14-28 Tage, R: polyöstrisch, Zyklus alle 28 Tage ^a	polyöstrisch mit kurzen Zyklen alle 19-21 Tage ^a
Tragezeit	59-67 Tage ^a	C: 153-179 Tage, M: 140-148 Tage, R: 146-180 Tage ^a	114 +/- 4 Tage ^a
Wurfgröße	5 bis 7 Jungtiere und mehr ^a	C/R: 1 Jungtier, M: 1 bis 2 Jungtiere ^a	5 bis 6,5 Jungtiere ^a
Würfe pro Jahr	1-2 ^a	1-2 ^a	2,1-2,3 ^a
Ø Nachkommen/Jahr/ ♀	9 ^a	C/R: 1, M: 2-3 ^a	14 ^a
Zuchtsystem	Haremsgruppen ^a	Familiengruppen/Haremsgruppen ^a	Haremsgruppen ^a
Absetzalter für Forschungszwecke	4-6 Wochen ^a	C/R: 24-56 Wochen, M: 24-32 Wochen ^a	4 Wochen ^a
Gruppenstrukturen und soziale Ansprüche			
Soziale Organisation	Wilde formlose Gruppen mit wechselnden Sozialgruppen von Männchen und Weibchen, beeinflusst durch Nahrungsangebot ^a	C/R: 10-50 Tiere pro Gruppe, manchmal über 100 Tiere, strenge Hierarchien innerhalb beider Geschlechter, M: Familiengruppen mit 3 bis 15 Tieren ^a	Kleine Gruppen von verwandten Weibchen mit ihren Nachkommen und einzelne Eber, manchmal reine Ebergruppen ^a
Typische Zusammensetzung der Gruppen unter Laborbedingungen	Gruppen von 2-10 Tieren ^a	C/R: Gruppen von 2-12 Tieren, M: Haltung paarweise ^a	Gruppen von 2-6 Tieren ^a
Soziale Ansprüche	Konflikte bis Rangordnung geklärt ^a	C/R: Konflikte bis Rangordnung geklärt (Kämpfe mit Todesfolge möglich), Tiere in Einzelhaltung zeigen oft abnormale Verhaltensweisen, M: Absetzen sehr stressig, geschlechtsreife Tiere feindlich eingestellt gegenüber Tieren gleichen Geschlechts, Geschwisterpärchen i.d.R. verträglicher ^a	Konflikte bis Rangordnung geklärt ^a
Aggressionspotential	Selten, wenn gute Haltungsbedingungen ^a	C/R: übliches Aggressionspotential, M: niedrig in Familiengruppen, aber sehr territorial und	Selten, wenn gute Haltungsbedingungen ^a

	Hund	Affe	Minipig
		aggressiv gegenüber Eindringlingen ^a	
Ernährung			
Futter	carnivor, aber frisst auch omnivore Diät ^a	omnivor ^a	omnivor ^a
Fütterungsregime	Restriktive Fütterung notwendig ^a	Fressen i.d.R. nur Erhaltungsbedarf, teilweise restriktive Fütterung notwendig ^a	Restriktive Fütterung notwendig ^a
Haltungsbedingungen			
Natürliche Lebensweise/-art	Terrestrisch, neugierig und aktiv ^a	Auf Bäumen lebend, neugierig und sehr aktiv ^a	Terrestrisch, neugierig ^a
Lebensraum	Flächen mit Wald und/oder Sträuchern in der Nähe von Menschen ^a	C/R: tropischer Regenwald, Laubwälder, Bambuswälder, Mangroven Sumpf, M: Regenwald ^a	Wald und Feld ^a
Größe des natürlich Lebensraumes	0,1 bis 50 ha ^a	C/R: 0,01 bis 400ha, M: 0,5 bis 6 ha ^a	> 100 ha ^a
Typische Haltungsbedingungen im Labor	Innenlaufställe mit Möglichkeit zur Bewegung, teilweise mit Auslauf ^a	Käfige oder individuelle Räume ^a	Innenlaufställe ^a
Handling			
Sozialisierung gegenüber dem Mensch	Wichtig, vor allem im Alter von 3-12 Wochen ^a	Vorteilhaft, steigert Wohlbefinden und reduziert abnormales Verhalten ^a	Wichtig ^a
Domestikation und Interesse an menschlichem Kontakt	Domestizierte Tierart, spezielle Beziehung zum Mensch, hohes Interesse an Kontakt zum Mensch ^a	Nicht-domestizierte Tierart, moderates Interesse am Kontakt zum Mensch ^a	Domestizierte Tierart, moderates Interesse am Kontakt zum Mensch ^a
Reaktion auf Zwangsmaßnahmen und Handling	Potentiell stressreich, besonders ohne Training ^a , gute Bereitschaft zur Mitarbeit nach entsprechendem Training ^b	Beutetier, mag es nicht gefangen, festgehalten oder behandelt zu werden ^a	mag es nicht gefangen, festgehalten oder behandelt zu werden ^a
Bedeutsame Aspekte der Verwendung als Labortier			
Zoonosepotential	niedrig (Personal sollte gegen Tollwut geimpft werden) ^b	moderat, aber höher als bei anderen Tierarten (Personal sollte gegen Hepatitis-B geimpft sein) ^b	niedrig, da Lieferung in „mikrobiologisch definiertem Status“ ^a
Verfügbarkeit, Herkunft der Tiere	Gute Verfügbarkeit, Züchter in der EU und den USA ^a	Ausreichende Verfügbarkeit, Züchter in der EU und den USA, teilweise Import aus Drittländern ^a	Gute Verfügbarkeit, Züchter in der EU und den USA ^a
Umfang/Qualität der vorhandenen vergleichbaren Datenbasis	Gut ^c	Gut ^c	Gut ^d
Gesundheitsstatus	herkömmlich ^a	C/R: herkömmlich (nicht alle Kolonien sind Herpes-B-Virus-frei), M: herkömmlich ^a	Lieferung in „mikrobiologisch definiertem Status“ ^a

	Hund	Affe	Minipig
Trainingstechniken	Positive Bestärkung ^a	Positive Bestärkung ^a	Positive Bestärkung ^a
Vorhandensein von erfahrenem Personal	Besser als bei den anderen Nichtnagerspezies, wegen Status des Hundes als Familienmitglied ^a	Schwierig zu finden, Notwendigkeit des Trainings ^a	Schwierig zu finden, Notwendigkeit des Trainings ^a
Akzeptanz der Zulassungsbehörden	gut ^{f, h}	gut ^{f, r}	gut bis moderat ^{b, d, f, g}
Ethische Bedenken der Öffentlichkeit	hoch ⁱ	hoch ^j	moderat ^{b, i}

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig

^a (Ellegaard et al., 2010), ^b (Gad, 2007), ^c (Smith et al., 2001), ^d (Harvey, 2014), ^f (OECD Guideline 409, 1998),

^g (van der Laan et al., 2010), ^h (Lind et al., 2007), ⁱ (Webster et al., 2010), ^j (EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010),

^p Marshall BioResource Reference Data Guide, ^q Harlan Laboratories, ^r (ICH Guideline S5(R2), 2005)

2.5 Weitere Tiermodelle

Andere Tierarten werden eher selten für generelle Toxizitätsstudien eingesetzt. Bestimmte Tierspezies finden jedoch für spezielle Fragestellungen Verwendung, wie z.B. das Kaninchen in reproduktionstoxikologischen Studien (ICH Guideline S5(R2), 2005) (Gad, 2007) oder das Frettchen in Untersuchungen zum Erbrechen (Gad, 2000) (Jacobs, 2006) (Gad, 2007) und werden daher hier kurz vorgestellt.

2.5.1 Das Kaninchen

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über Basisdaten des Kaninchens als Versuchstier.

Spezies	Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) ^b
Natürliche Lebenserwartung	5-8 Jahre ^b
Gewicht	♂ 4-5 kg, ♀ 4-6 kg ^b
Geschlechtsreife	♂ 6-10 Monate, ♀ 5-9 Monate ^b
Reproduktionsrate und Wurfgröße	polyöstrisch, 4-10 Jungtiere ^b
Ernährung	herbivor ^b
Haltung	Käfige, Gruppenhaltung ^b
Temperatur, relative Luftfeuchte	16-20°C, 40-60% rel. Luftfeuchte ^b
Sozialisation	Fähigkeit zur Ausbildung von sozialen Strukturen ^{b, k}
Verfügbarkeit	gut ^k
Gesundheitsstatus	Lieferung in „mikrobiologisch definiertem Gesundheitsstatus“ ^k
Qualität/Umfang der vorhandenen Vergleichsdatenbasis	gut ^b

Akzeptanz der Zulassungsbehörden	gut ^{l, p}
----------------------------------	---------------------

Tabelle 5: Basisdaten des Kaninchens als Versuchstierspezies

^b (Gad, 2007), ^k (Hubrecht & Kirkwood, 2010), ^l (ICH Guideline S6(R1), 2011), ^p (ICH Guideline S5(R2), 2005)

Allgemeine Aspekte des Kaninchens als Versuchstier

Kaninchen sind generell die Nichtnagerspezies der Wahl für Entwicklungstoxizitätsstudien, die potenzielle adverse Effekte auf die Reproduktion oder die Organentwicklung untersuchen (Gad, 2007). Ein Grund hierfür ist unter anderem der Thalidomid-Vorfall: Ein Beruhigungs- und Schlafmittel, das in den 1950ern unter anderem an schwangere Frauen verabreicht wurde und zu Missbildungen an den Extremitäten der Kinder führte (Shepard, 1998) (siehe auch „3.3 Wissenschaftliche Aspekte – Speziesspezifische Sensitivität“ im Literaturteil). Die Thalidomid-Katastrophe ist mit eine Ursache, warum Studien zur Entwicklungstoxizität auch heute noch sowohl an einem Nager als auch an einem Nichtnager (i.d.R. Kaninchen) stattfinden (Janer et al., 2008). Hurtt et al. (2003) konnten anhand einer Studie zeigen, dass bei 61% der untersuchten Wirkstoffe teratogene Effekte anhand von Daten in Maus, Ratte oder Kaninchen zu sehen waren (Hurtt et al., 2003). Wurden hierbei Ratten- und Kaninchendaten kombiniert, waren teratogene Effekte bei allen der 91 getesteten Substanzen (100%) zu beobachten (Ratte alleine 61%, Maus alleine 55%, Kaninchen alleine 58%, Ratte/Maus zusammen 80% , Maus/Kaninchen zusammen 80%) (Hurtt et al., 2003).

Außer im Bereich der Reproduktionstoxizität werden Kaninchen auch in Untersuchungen zur Reizwirkung an Haut oder Schleimhaut, zu toxikokinetischen Evaluierungen, für intrakutane Implantate, in Studien zur Neurotoxizität, Nephrotoxizität oder Immunotoxizität eingesetzt (Gad, 2007). Bei Studien zur lokalen Toleranz war lange Jahre das Kaninchen das Tier der Wahl, im momentanen Entwurf der Revision wurde das Minipig wegen seiner Ähnlichkeit der Haut zum Menschen neu aufgenommen (EMA-Guideline DRAFT: *Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products*, 2014).

Vor- und Nachteile des Kaninchens als Versuchstier

Vorteile des Kaninchens bestehen darin, dass sie relativ robust sind (Gad, 2007). Sie sind klein, aber groß genug, um Hautirritationen beurteilen zu können, relativ sauber und kosteneffektiv, einfach zu halten und unkompliziert im Umgang (Gad, 2007). Sie benötigen

nur moderate Mengen der Testsubstanz und sind sensitiv gegenüber Teratogenen (Gad, 2007). Es besteht eine einfache Handhabung zur Blutentnahme und es existieren ausreichend gute Hintergrunddaten in der Literatur (Gad, 2007). Weitere Vorteile sind, im Falle von Studien im Bereich Reproduktionstoxizität, die frühe Geschlechtsreife, eine große Zahl an Nachkommen (was von Bedeutung für die Inzidenz von Befunden ist), die gute Verfügbarkeit und das Vorhandensein von im Umgang mit Kaninchen erfahrenem Personal (Hubrecht & Kirkwood, 2010). Eine gute Akzeptanz durch die Zulassungsbehörden zeigt die schon jahrelange erfolgreiche Verwendung von Kaninchen in reproduktionstoxikologischen Studien und ihre explizite Nennung in den gesetzlichen Leitlinien (ICH Guideline S5(R2), 2005) (ICH Guideline S6(R1), 2011).

Nachteilig wirkt sich dagegen eher aus, dass Kaninchen von der zuständigen Behörde für generelle toxikologische Studien i.d.R. nur in Einzelfällen als geeignete Nichtnagerspezies akzeptiert werden, wenn gezeigt werden konnte, dass sie dem Menschen mehr ähneln als der Hund oder der Affe (Smith & Trennery, 2002). Weitere Nachteile sind das unterschiedliche metabolische Profil und signifikante Unterschiede in den Organsystemen Haut und Magen-Darm-Trakt im Vergleich zum Menschen (Ganderup et al., 2010).

Praktische und labortechnische Aspekte des Kaninchens als Versuchstier

Die orale Medikamentenverabreichung kann beim Kaninchen durch das Vermischen der Testsubstanz mit der Nahrung erfolgen, meistens nehmen die Tiere aber die Substanz so nicht freiwillig auf, deshalb hat sich auch hier die Applikation mittels Sonde bewährt (Gad, 2007). Subkutane, intrakutane, intramuskuläre oder auch intraperitoneale Injektionstechniken oder die Applikation von Substanzen mittels Inhalation stellen normalerweise kein größeres Problem dar (Gad, 2007). Intravenös kann die Testsubstanz in die Ohrvene appliziert werden (Gad, 2007). Für dermale Studien eignet sich die Rückenfläche nach vorherigem Scheren, bis zu 20% der Körperoberfläche kann hierbei behandelt werden (Gad, 2007). Okular können Substanzen als Pulver oder Granulat in den Konjunktivalsack eingebracht werden (Gad, 2007). Auf vaginalem Weg können außerdem Wirkstoffe als Emulsionen, Suspensionen, Gelatinekapseln oder als Cremes verabreicht werden (Gad, 2007).

Klinische Beobachtungen finden normalerweise, wie bei den anderen Tierarten auch, vor und nach dem Dosieren der Tiere statt (Gad, 2007). Für die Entnahme von Blutproben eignet sich die Ohrvene oder -arterie, evtl. kann ein flexibler Katheter eingebracht werden

(Gad, 2007). Das Sammeln von Kot und/oder Urin erfolgt in den üblich verwendeten Stoffwechselkäfigen. Ein Problem kann hierbei die bei Kaninchen übliche Koprophagie sein (Ebino et al., 1993). Zur Uringewinnung kommen außerdem Katheterisierung oder Zystozentese in Frage (Gad, 2007).

2.5.2 Das Frettchen

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über Basisdaten des Frettchens als Versuchstier.

Spezies	Frettchen (<i>Mustela putorius furo</i>) ^b
Natürliche Lebenserwartung	6-8 Jahre ^b
Gewicht	♂ 0,8-2 kg, ♀ 0,6-1 kg ^b
Geschlechtsreife	4-12 Monate ^b
Reproduktionsrate und Wurfgröße	monoöstrisch, 5-13 Jungtiere ^b
Ernährung	carnivor ^b
Haltung	Käfighaltung, Einzel- oder Gruppenhaltung ^b
Temperatur, relative Luftfeuchte	5-15°C, 30-70% rel. Luftfeuchte ^b
Sozialisation	besitzt Fähigkeit soziale Gruppen auszubilden ^m
Verfügbarkeit	moderat (wenig kommerzielle Züchter) ^m
Gesundheitsstatus	herkömmlich, nicht immer virus-frei ^m
Qualität/Umfang der vorhandenen Vergleichsdatenbasis	moderat ^{o, p}
Akzeptanz der Zulassungsbehörden	moderat ⁿ
Öffentliche ethische Bedenken	moderat ^o

Tabelle 6: Basisdaten des Frettchens als Versuchstierspezies

^b (Gad, 2007), ^m (Thornto et al., 1979), ⁿ auch wenn die ICH-Guideline S5(R2) Frettchen als optionale Nichtnagerspezies für Reproduktionstoxizität auflistet, wurden Frettchen in den letzten Jahren weniger als Labortier eingesetzt als andere Tierarten, (siehe auch Bericht der Europäischen Kommission), ^o (Gad, 2000), ^p (ICH Guideline S5(R2), 2005)

Allgemeine Aspekte des Frettchens als Versuchstier

Das Interesse am Frettchen als Labortier stieg in den 80er und 90er Jahren einerseits wegen wachsender Bedenken der Öffentlichkeit gegenüber der Verwendung von domestizierten Tieren in der wissenschaftlichen Forschung und zum anderen aufgrund der Notwendigkeit einer kleineren Nichtnagerspezies, um den Substanzverbrauch zu minimieren (Gad, 2000). Tierversuche an Frettchen fielen zum damaligen Zeitpunkt in zwei Kategorien: 1. Steigern des Basiswissens der Gesundheit für den Menschen und 2. Gewährleistung der Sicherheit für Mensch und Umwelt (Gad, 2000). Im Einzelnen wurden

Frettchen damals in kardiologischen, ophthalmologischen, virologischen, bakteriologischen und standardtoxikologischen Studien eingesetzt, aber auch zur Erforschung von Lungenphysiologie und -pathologie und zu reproduktionsmedizinisch-toxikologischen Zwecken (Gad, 2000). In der Virologie wurden sie im einzelnen bisher speziell für Studien zu Staupe, Influenza, Poliomyelitis und Masern verwendet (Thornton et al., 1979).

Die meisten Arten der üblichen Medikamentenapplikation sind beim Frettchen unproblematisch (Gad, 2007). Für orale Studien wird oft eine Schlundsonde verwendet (Gad, 2007). Allerdings haben Frettchen, wie auch Hunde, einen natürlichen Würgereflex und die Fähigkeit zu erbrechen, was auf der einen Seite die orale Wirkstoffapplikation erschweren kann, sie andererseits aber auch zu einem alternativen und geeigneten Tiermodell für Studien zur Physiologie und Pathologie des Erbrechens macht (Gad, 2007). Hier ist das Frettchen fast immer das Modell der Wahl (Jacobs, 2006). Die intravenöse Medikamentenapplikation gestaltet sich beim Frettchen dagegen sehr schwierig, es sei denn es wird zu Studienbeginn ein Venenverweilkatheter unter Sedation gelegt (Gad, 2000). Bei Substanzverabreichungen mittels Inhalation haben Frettchen den Vorteil, dass sie eine drüsenreichere Submukosa in den Bronchien und mehr terminale Bronchiolen besitzen als andere Tierarten, was ihre Lunge dem Mensch ähnlicher macht als beispielsweise die des Hundes (Gad, 2000). Außerdem besitzen sie, relativ zum Körpergewicht gesehen, eine große Lungenoberfläche, die sie für Studien zur Aufnahme, Clearance und Ausscheidung von Aerosolen sowie Untersuchungen zu Lungenblutfluss und -diffusion wertvoll macht (Gad, 2000).

Tierartspezifische Besonderheiten des Frettchens für die Verwendung als Versuchstier

Speziesspezifische Besonderheiten bestehen laut älteren Publikationen beim Frettchen im Vorhandensein einer höheren spontanen Pathologie als bei Hunden oder Affen, dies lässt sich aber vermutlich durch die limitierten Gesundheitskontrollen des Zulieferers erklären und nicht durch eine generelle angeborene höhere Krankheitsanfälligkeit (Thornton et al., 1979) (Beach, 1982) (Hart, 1986). Eine dem Frettchen eigene Eigenschaft war das Auftreten von Lymphozyteninfiltraten in Leber und Lunge, welche die histologische Bewertung von substanzinduzierten Läsionen erschweren oder behindern können. Die betroffenen Tiere konnten allerdings durch vor der Studie stattfindende Bluttests (Globulinkonzentration, Anzahl der Lymphozyten, Level des Totalproteins) mit einer Erfolgsrate von 90% aussortiert werden (Smith et al., 2001).

Vor- und Nachteile des Frettchens als Versuchstier

Vorteile bestehen hinsichtlich der Kosteneffektivität, der geringen Körpergröße und dem somit niedrigen benötigten Substanzbedarf und der einfachen Haltung (Gad, 2000). Frettchen besitzen eine gute Fähigkeit, sich an die meisten vorhandenen Einrichtungen und das Laborequipment anzupassen (Gad, 2000). Zum Zeitpunkt der Publikation existieren kaum öffentliche Bedenken bezüglich ihres Einsatzes als Versuchstier (Gad, 2000). Es besteht eine große morphologische und histologische Ähnlichkeit des Gastrointestinaltrakts von Frettchen, Affe und Mensch (Pfeiffer, 1970b) (Pfeiffer, 1970a) (Poddar & Murgatroyd, 1976). Frettchen sind laut Meinung mancher Autoren aufgrund ihrer Lungenmorphologie und -physiologie zudem gut geeignet für Inhalationsstudien (Gad, 2000). Außerdem bestehen offenbar weitere physiologische und/oder biochemische Ähnlichkeiten zum Menschen (Gad, 2000). Sie besitzen praktische und ökonomische Vorteile gegenüber dem Affen, v.a. für reproduktionsmedizinische Studien, da sie früher geschlechtsreif werden (4-12 Monate), eine größere Wurfgröße (5-13 Jungtiere) und eine kurze Tragezeit haben (39-46 Tage), allerdings zählen sie zu den sog. *saisonal breedern*, was eher als Nachteil zu werten ist (Smith et al., 2001).

Probleme können bei der intravenösen Applikation von Medikamenten, sowie, wie bereits erwähnt, durch das in älteren Publikationen erwähnte erhöhte Auftreten von Lymphozyteninfiltraten in Leber und Lunge und eine erhöhte spontane Pathologie auftreten (Thornton et al., 1979) (Beach, 1982) (Hart, 1986) (Smith et al., 2001). Weitere Nachteile bestehen hinsichtlich der relativ großen Heterogenität innerhalb einer Population und dem Fehlen von qualitativ guten Hintergrunddaten in der Literatur (Gad, 2000). Die Verfügbarkeit ist laut Gad et al. (2000) limitiert, da nur eine kleine Anzahl an Verkäufern existiert, zudem besteht ein Mangel an „virus-freien“ Tieren (um welches Virus es sich dabei handelt, wird in der Publikation von Gad (2000) nicht näher spezifiziert) (Gad, 2000). Es gibt wenige Labore, die Erfahrungen im Umgang mit Frettchen haben und erfahrenes Personal ist eher schwierig zu finden, vorab ist ein spezielles Training erforderlich (Gad, 2000).

Praktische und labortechnische Aspekte des Frettchens als Versuchstier

Auch beim Frettchen hat sich für die orale Medikamentenverabreichung die Applikation mittels Sonde bewährt (Gad, 2007). Erschwerend kommen hier der bei Frettchen natürlicherweise vorhandene Würgereflex und die Tendenz zu Erbrechen hinzu (Gad,

2007). Subkutane, intrakutane, intramuskuläre oder auch intraperitoneale Injektionstechniken und die topische Anwendungen von dermalen Substanzen stellen i.d.R. wie bei den anderen Versuchstierspezies kein größeres Problem dar (Gad, 2007). Die intravenöse Verabreichung von Substanzen ist dagegen aufgrund mangelnder Bereitschaft der Tiere zur Mitarbeit schwierig, beschrieben werden in diesem Zusammenhang unter anderem das Legen eines Venenverweilkatheters unter Sedation oder Narkose (Gad, 2007). Die Verabreichung von Substanzen mittels Inhalation ist i.d.R. kein Problem (Gad, 2007). Klinische Beobachtungen finden normalerweise vor und nach dem Dosieren der Tiere statt (Gad, 2007). Für die Entnahme von Blutproben hat sich die Punktion der V. jugularis, V. saphena oder Schwanzvene und -arterie bewährt, eventuell ist eine Sedation notwendig (Gad, 2007). Das Sammeln von Kot und/oder Urin erfolgt in den üblich verwendeten Stoffwechselkäfigen oder im Falle der Uringewinnung durch Katheterisierung oder mittels Zystozentese (Gad, 2007).

3. Kriterien der Versuchstierauswahl

Nager (Maus und Ratte) stellen laut der 2013 veröffentlichten Tabelle 2.1 „*Number of animals used in experiments for selected purposes*“ für das Jahr 2011 der Europäischen Kommission mit 73,4% den Großteil der in der Toxikologie und Sicherheitspharmakologie verwendeten Tierarten dar. Im Rahmen der toxikologischen Studien ist neben dem Nager jedoch auch die Verwendung einer Nichtnagerspezies gesetzlich vorgeschrieben (ICH Guideline M3(R2), 2009). Im Jahr 2011 wurden laut der oben genannten Tabelle 7488 Hunde (0,75% aller für die Toxikologie/Sicherheitspharmakologie verwendeten Tiere), 3435 Affen (0,34%) und 3537 Schweine (0,35%) in toxikologischen und sicherheitspharmakologischen Studien eingesetzt.

Dabei ist die Wahl des Nichtnagers ein schon lang diskutiertes Thema zwischen pharmazeutischer Industrie, Zulassungsbehörden und den Tierschutzgremien (Smith & Trennery, 2002). 2002 fand diesbezüglich in Großbritannien ein Diskussionstreffen statt (Smith & Trennery, 2002). Die Diskussionsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass die Auswahl der geeigneten Nichtnagerspezies auf vielen verschiedenen Faktoren wie beispielsweise gesetzlichen Voraussetzungen, ethischen Aspekten, wissenschaftlichen Anforderungen, Überlegungen zur Tierhaltung und technischen Aspekten beruht, die im Einzelfall betrachtet werden müssen (Smith & Trennery, 2002) und die im Folgenden näher erläutert werden.

3.1 Gesetzliche Vorgaben

Maßgeblich für die gesetzlichen Vorschriften bei der Entwicklung von Arzneimitteln sind international die drei großen Behörden FDA (*Food and Drug Administration*) für die Vereinigten Staaten von Amerika, die EMA (*European Medicines Agency*) für Europa und die PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*) für Japan. Zusammenschluss finden diese Organisationen in der ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), deren Ziel die Harmonisierung der Beurteilungskriterien von Human-Arzneimitteln als Basis der Arzneimittelzulassung in Europa, den USA und Japan ist. Die ICH erarbeitet Leitlinien zur Arzneimittelentwicklung mit Gesetzescharakter.

Gemäß den Leitlinien der ICH müssen in der Arzneimittelentwicklung neue Entwicklungssubstanzen in der präklinischen Phase sowohl an Nagetieren als auch an Nichtnagetieren getestet werden, um in den klinischen Phasen der Entwicklung die Sicherheit für den Menschen zu gewährleisten (ICH Guideline M3(R2), 2009). Diese Vorgaben existieren um eine bestmögliche Voraussage von potentiellen Nebenwirkungen im Menschen zu erreichen. Die Leitlinie grenzt allerdings nicht näher ein, welche Nichtnagerspezies hierbei verwendet werden soll, um eine gewisse Flexibilität in der Wahl des Tiermodells zu gewährleisten (Ganderup et al., 2010).

Im Bereich der Tierarzneimittelentwicklung besteht gegenüber der Entwicklung von Humanarzneimitteln der Vorteil, dass direkt in der Tierspezies getestet werden kann und somit Modelle mit großer prädiktiver Validität existieren (Lathers, 2003). In USA ist das ONADE (*Office of New Animal Drug Evaluation*) als Teil des CVM (*Center for Veterinary Medicine*) für die Zulassung von Tierarzneimitteln zuständig, in Deutschland liegt die Zuständigkeit auf der Grundlage des Arzneimittelgesetzes (AMG) beim BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (siehe auch „1.4 Entwicklung von Tierarzneimitteln“ im Literaturteil der vorliegenden Arbeit).

Richtlinien der ICH und speziesspezifische Angaben

Exemplarisch sind einige Richtlinien aufgeführt, in denen die Forderung nach der Nichtnagerspezies und deren Auswahl diskutiert wird.

Die Richtlinie „*ICH Guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals step 5*“ ist das maßgebliche

Dokument, das grundlegend die Verwendung von einer Nager- und Nichtnagerspezies gesetzlich vorschreibt (ICH Guideline M3(R2), 2009).

In der ICH-Richtlinie „*S4 Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing)*“ befinden sich grundsätzliche Vorschriften zur Dauer der einzelnen Versuche. Bereits im Titel ist die Unterscheidung zwischen zwei Versuchstierspezies zu erkennen (ICH Guideline S4, 1998).

Die ICH-Richtlinie „*S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals*“ unterstreicht die Bedeutung von gründlichen Überlegungen zur Versuchstierauswahl. Außerdem besagt sie, dass die „Tierart entsprechend so ausgesucht werden soll, dass wissenschaftlich valide Ergebnisse zu erwarten sind“ (ICH Guideline S7A, 2000). Weitere genannte Auswahlkriterien sind die pharmakologische Ansprechbarkeit des Tiermodells, das pharmakokinetische Profil, die Anfälligkeit, die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testsystems und verfügbare Hintergrunddaten der Testsubstanz (ICH Guideline S7A, 2000). Außerdem hebt sie die Bedeutung der Neurowissenschaften mit der Aussage, dass das zentrale Nervensystem eines der wichtigsten Organe sei, die es bei toxikologischen Studien zu beachten gelte, besonders hervor (ICH Guideline S7A, 2000).

Die Leitlinie „*S9 Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals*“ beschreibt gezielt für den Bereich der niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*) bei Tumorindikationen die Vorgaben für toxikologische Studien unter der Verwendung von einem Nager und einem Nichtnager (ICH Guideline S9, 2009). In Ausnahmefällen könne allerdings auf die Versuche im Nichtnager verzichtet werden, vorausgesetzt der Nager stellt eine relevante Spezies dar (ICH Guideline S9, 2009).

Im Zusammenhang mit der Auswahl einer geeigneten Tierart für den Bereich der Biologika (*biologics*) ist die ICH-Guideline „*S6(R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*“ von Bedeutung. Sie betont die grundsätzliche Notwendigkeit gründlicher Überlegungen zur Auswahl der Nichtnagerspezies und beinhaltet detaillierte Angaben zur Verwendung des Nagers und des Nichtnagers (ICH Guideline S6(R1), 2011). Unter einer geeigneten Spezies ist laut der Richtlinie eine Tierart zu verstehen, in der die Testsubstanz aufgrund der Expression eines entsprechenden Rezeptors im Zielorganismus pharmakologisch aktiv ist, was speziell für Wirkstoffe aus dem Bereich der *biologics* von Bedeutung ist (ICH Guideline S6(R1), 2011). Die Verwendung von nur einer Spezies für alle toxikologischen Studien für *biologics* ist gerechtfertigt, wenn die Testsubstanz nur in einer Spezies pharmakologisch aktiv ist (ICH Guideline S6(R1), 2011). Studien in zwei

verschiedenen Nichtnagerspezies sind laut Guideline nicht angebracht (ICH Guideline S6(R1), 2011).

Weitere gesetzliche Vorgaben mit Hinweisen zur Speziesrelevanz

Die Leitlinie der FDA „*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*“, zu deutsch „Leitlinie für die Industrie: Abschätzen der maximalen sicheren Startdosis für die Anfangsstudien von Therapeutika für erwachsene gesunde Probanden“ besagt, dass die HED (*human equivalent dose*, d.h. die Substanzmenge, die bei der Verabreichung an die Probanden den gleichen Effekt wie im Tiermodell bei einer niedrigeren Dosis erzeugt) anhand der am besten geeigneten Spezies ausgewählt werden sollte. Bezüglich Speziesrelevanz ist die am besten geeignete Tierart, um die MRSD (*maximum recommend starting dose*, d.h. die höchste empfohlene Startdosis) abzuleiten, die empfindlichste Spezies. Faktoren, welche hierbei die Auswahl der Tierart beeinflussen, sind Unterschiede im ADME-Profil (Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung; im Englischen ADME = *absorption, distribution, metabolism, excretion*) der Substanz in den einzelnen Tierarten sowie Erfahrungen mit der entsprechenden Substanzklasse, die gezeigt haben, dass ein bestimmtes Tiermodell einen höheren prädiktiven Wert für humane Toxizität besitzt als ein anderes (*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (FDA, 2005)).

Für die Versuchstierauswahl relevante Richtlinien existieren auch von Seiten der europäischen Arzneimittelagentur EMA (*European Medicines Agency*). Sowohl in der „*Guideline on repeated dose toxicity*“ als auch in der „*Guideline on strategies to identify and mitigate risk for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products*“ wird als wichtigstes Kriterium der Versuchstierauswahl die Ähnlichkeit zum Menschen unter besonderer Berücksichtigung des pharmakokinetischen Profils genannt (EMA Guideline 1042:99, 2010) (EMA Guideline 28367/07, 2007).

EU-Richtlinie 2010/63/EU

Die Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere formuliert allgemeingültige Regeln für die Verwendung von Tieren in wissenschaftlichen Experimenten (EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010). Hier findet sich zunächst die generelle

Grundlage von Tierversuchen für die Arzneimittelentwicklung überhaupt: „Um die Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier sowie für die Umwelt zu bewältigen, ist im Unionsrecht vorgesehen, dass Stoffe und Produkte erst in Verkehr gebracht werden dürfen, nachdem angemessene Angaben zur Unbedenklichkeit und Wirksamkeit vorgelegt wurden. Einige dieser Anforderungen können nur mit Hilfe von Tierversuchen erfüllt werden“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 42). Des Weiteren benennt sie die Notwendigkeit einer gut durchdachten und sorgfältigen Auswahl der Versuchstierspezies: „Darüber hinaus ist es sowohl aus moralischen als auch aus wissenschaftlichen Gründen von großer Bedeutung, zu gewährleisten, dass jede Verwendung von Tieren sorgfältig hinsichtlich der wissenschaftlichen oder bildungsrelevanten Gültigkeit, Zweckmäßigkeit und Relevanz des erwarteten Ergebnisses dieser Verwendung bewertet wird“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 39). Grundsätzlich sollte „bei den ausgewählten Methoden die geringste Anzahl von Tieren verwendet werden, die zu zuverlässigen Ergebnissen führen würde, und es müssen die Arten ausgewählt werden, die die geringste Fähigkeit zum Empfinden von Schmerzen, Leiden oder Ängsten haben oder die geringsten dauerhaften Schäden erleiden und bei denen die besten Möglichkeit der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Zielarten besteht“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 13). Trotz dem Bestreben geeignete Alternativmethoden zu Tierversuchen zu entwickeln und zu verwenden wird die Notwendigkeit des Einsatzes von lebenden Tieren gerechtfertigt: „Obwohl es erstrebenswert ist, den Einsatz lebender Tiere in Verfahren möglichst durch andere Methoden zu ersetzen, bei denen keine lebenden Tiere verwendet werden, ist der Einsatz lebender Tiere weiterhin notwendig, um die Gesundheit von Mensch und Tier sowie die Umwelt zu schützen“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 10). Die Richtlinie geht insofern sogar einen Schritt weiter, indem sie mit der Formulierung „in Anbetracht des derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstandes ist die Verwendung nichtmenschlicher Primaten in wissenschaftlichen Verfahren in der biomedizinischen Forschung weiterhin notwendig“ klar die Notwendigkeit des Einsatzes von nicht-menschlichen Primaten betont ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 17). Allerdings sollte „ihre Verwendung (...) im Zusammenhang mit potenziell lebensbedrohlichen Zuständen beim Menschen oder im Zusammenhang mit Fällen durchgeführt werden, die erhebliche Auswirkungen auf das alltägliche Leben von Menschen haben, d.h. zur Entkräftung führende Zustände“ und ihre Verwendung in Verfahren sollte auf Bereiche beschränkt werden, die letztendlich einen Nutzen für die Gesundheit von Mensch und Tier oder für die Umwelt nach sich ziehen

können“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 12 und 17). Speziell die Problematik der Verwendung von nichtmenschlichen Primaten wird hier erwähnt: „Darüber hinaus hat die Öffentlichkeit die größten Bedenken in Bezug auf die Verwendung nichtmenschlicher Primaten“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) Artikel 17).

Nationales Tierschutzgesetz (Deutschland)

Das Tierschutzgesetz beinhaltet einen eigenen Abschnitt zum Thema Tierversuche, in welchem verschiedene allgemeine, aber auch speziellere Vorschriften beispielsweise zur Definition von Tierversuchen, unerlässliche Zwecke zum Durchführen von Tierversuchen, Ablauf des Genehmigungsverfahrens, Aufgaben des Tierschutzbeauftragten, Fachkenntnis des Personals u.v.m. zu finden sind (Tierschutzgesetz, 2010). Zur Versuchstierauswahl finden sich hier nur Empfehlungen allgemeiner Natur wie „Versuche an sinnesphysiologisch höher entwickelten Tieren, insbesondere warmblütigen Tieren, dürfen nur durchgeführt werden, soweit Versuche an sinnesphysiologisch niedriger entwickelten Tieren für den verfolgten Zweck nicht ausreichen“ (Tierschutzgesetz, 2010).

3.2 Ethische Aspekte

Auch ethische Aspekte spielen bei der Auswahl einer geeigneten Tierart für toxikologische Studien eine entscheidende und wichtige Rolle. Wichtig ist hierbei im Sinne des Tierschutzes die retrospektive Analyse von bereits vorhandenen Daten aus tierexperimentellen Studien, da unnötigerweise Tiere „verbraucht“ werden, wenn Tierversuche nicht optimal geplant, durchgeführt und analysiert werden (Vries et al., 2014).

Die englischen Wissenschaftler David Smith und Paul Trennery gehen in ihrem 2002 veröffentlichten Dokument „*Non-Rodent Selection in Pharmaceutical Toxicology – a ‘Points to Consider’ document*“ (2002) auf verschiedene ethische Überlegungen zur Auswahl der zweiten Versuchstierspezies ein (Smith & Trennery, 2002). Nach Meinung der Autoren kommt man beispielsweise in vielen Fällen schneller ans Ziel und benötigt weniger Tiere, wenn man eine gut bekannte Versuchstierart mit breiter vorhandener Datenbasis nutzt als Tierarten, bei denen weniger Erfahrungen bezüglich ihrer Verwendung in Tierversuchen vorliegen (Smith & Trennery, 2002). Gleichzeitig geben sie aber zu bedenken, dass man mit diesem Argument immer den momentanen status quo unterstützt (Smith & Trennery, 2002). In Bezug auf die Neurowissenschaften äußern sich die Autoren außerdem zu der

Problematik des Begriffs der „neurophysiologischen Sensitivität“, dieser sei „unklar und widersprüchlich“, da man nicht sagen könne, ob der „Hund diesbezüglich empfindlicher ist als beispielsweise das Minipig“ (Smith & Trennery, 2002). Ein weiterer Punkt ist, dass „die Industrie anerkennt, dass die Auffassung der Öffentlichkeit zur Verwendung von bestimmten Tierarten zu Versuchszwecken, beispielsweise dem Hund, einen Einfluss auf den Druck von Seiten der Zulassungsbehörde hat“ (Smith & Trennery, 2002). Die Autoren betonen außerdem, dass „in den frühen Stadien eines Arzneimittelentwicklungsprozesses oft nur eine geringe Menge an Substanz vorhanden ist. Wenn durch diesen Mangel an Substanz der Entwicklungsprozess direkt verzögert wird und in diesem Zusammenhang Arzneimittelforschungsprojekte betroffen sind, die sich mit schweren Krankheitsbildern befassen, bei denen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine geeigneten Therapien zur Verfügung stehen, spielen auf einmal Größe und Gewicht, und damit die benötigte Substanzmenge der Tiere eine große Rolle (Smith & Trennery, 2002). Ein Beispiel, das von den Autoren für die sich dann ändernde ethische Beurteilung genannt wird, ist die Verwendung eines Affen (Marmoset) mit 400 g statt eines Hundes mit 15 kg Körpergewicht“ (Smith & Trennery, 2002).

Spätere Veröffentlichungen sagen, dass generelle Regeln, welche Nichtnagerspezies vom ethischen Standpunkt her gesehen verwendet werden sollte, nicht existieren (Webster et al., 2010). Die Versuchstierauswahl sollte nach Meinung der Autoren nicht auf der Basis von Konservatismus geschehen: Der Einsatz von Hunden und Affen als Nichtnagerspezies wird oft mit den Argumenten gerechtfertigt, dass diese Tierarten bereits in der Vergangenheit viel verwendet wurden, eine fundierte Datenbasis vorliegt und die Entscheidung für diese Tierarten von den zuständigen Behörden gut akzeptiert wird (Webster et al., 2010). Außerdem beschreiben die Autoren im Zusammenhang mit ethischen Überlegungen zur Versuchstierauswahl, dass die Fähigkeit einer Tierart, Schmerzen und Leiden zu empfinden, im Sinne seines eigenen Empfindungsvermögens definiert werden muss und nicht anhand seines Status als Nutz- oder Haustier in der menschlichen Gesellschaft (Webster et al., 2010).

Auf europäischer Gesetzesebene nimmt die EU-Richtlinie 2010/63/EU Stellung zu den ethischen Anforderungen an die Versuchstierauswahl: „Auch bestehen seitens der Öffentlichkeit ethische Bedenken hinsichtlich der Verwendung von Tieren in Verfahren. Aus diesem Grund sollten Tiere stets als fühlende Wesen behandelt werden und ihre Verwendung in Verfahren sollte auf Bereiche beschränkt werden, die letztendlich einen

Nutzen für die Gesundheit von Mensch und Tier oder für die Umwelt nach sich ziehen können“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010), Artikel 12). Des Weiteren beschreibt sie „die umfassende Projektbewertung, bei der ethische Überlegungen im Zusammenhang mit der Verwendung von Tieren berücksichtigt werden, bildet den Kern der Projektgenehmigung“ ((EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010), Artikel 38).

Auch neueste Veröffentlichungen äußern sich zur ethischen Problematik. Die Fähigkeit von Tieren, Schmerzen und Stress zu empfinden, bedeutet nach Meinung von Phillips et al. (2014), dass Wissenschaftler und Forscher eine moralische Verpflichtung haben die Versuche in einer Art und Weise durchzuführen, die negative Effekte reduziert und nicht unnötigerweise zu Stress oder Leiden führt (Phillips et al., 2014). So lange wir glauben, dass ein menschliches Leben mehr wert ist als das eines Fisches, einer Fliege, einer Maus oder eines Primaten werden Experimente an Tieren durchgeführt, bevor die entsprechenden Substanzen im Mensch getestet werden (Phillips et al., 2014).

3.3 Wissenschaftliche Aspekte

Eine fundierte wissenschaftliche Datenanalyse vor Beginn der Studien wird nicht nur von gesetzlicher Seite gefordert, sondern sollte die Basis aller wissenschaftlichen Arbeit sein. Dies beinhaltet sowohl Evaluierungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen *in vitro* als auch *in vivo*. Dazu gehört laut Smith und Trennery (2002), dass alle wissenschaftlichen Überlegungen zur Versuchstierauswahl auf wissenschaftlich fundierten Experimenten basieren, die gut geplant, korrekt durchgeführt und geeignet ausgewertet wurden.

Für neue Substanzen mit neueren Wirkmechanismen besteht die zeitliche Problematik, dass i.d.R. in den frühen toxikologischen Screening-Studien, zum Zeitpunkt der Auswahl der Spezies viele Endpunkte unbekannt sind (Smith et al., 2001). Erst nach den Studien sind Zielorgane und das pharmakokinetische Profil bei höheren Dosen bekannt (Smith et al., 2001). Erst dann kann auch eine mögliche Wirkung im Menschen abgeschätzt werden (Smith et al., 2001). Das macht es schwierig, die Auswahl der Tierart aufgrund von vorangegangenen *in vitro* Versuchen oder anhand von Literaturdaten zu treffen (Smith et al., 2001). Daher müssen alle neu erworbenen Informationen zu Entwicklungskandidaten immer wieder neu in die Bewertung einfließen.

Wichtige Schlüsselpunkte für die Versuchstierauswahl im Allgemeinen, nicht speziell auf den Nictitnager bezogen, waren schon 1990 bei Gad et al. (1990) zum einen eine klare

Identifikation der Ziele der beabsichtigten Studie und zum anderen die Nutzung aller zur Verfügung stehenden Informationen zu den Tiermodellen, dem Wirkmechanismus und toxikokinetischen Daten der Substanz (Gad, 1990).

Im Kontext von wissenschaftlichen Anforderungen an die Versuchstierauswahl wird oft die Ähnlichkeit zum Menschen erwähnt. Schon frühe Veröffentlichungen besagen, da keine Tierart existiert, die dem Mensch in allen Aspekten ähnelt, muss die Auswahl unter Einbeziehung von allen teilweise miteinander in Konflikt stehenden Faktoren getroffen werden (Gad, 1990). Während in der Veterinärmedizin auch in der Zielspezies getestet werden kann (Lathers, 2003), sollte der Toxikologe für die Humanarzneimittelentwicklung die Spezies auswählen, die den Menschen in den meisten Gesichtspunkten repräsentieren kann (Smith et al., 2001). Die Ähnlichkeiten beziehen sich beispielsweise auf Anatomie und Physiologie, auf wichtige stoffwechselspezifische oder biochemische Prozesse (z.B. CYP-450-Enzymstruktur und -aktivität), können auf vorherigen Erfahrungen, Informationen und erlangten Erkenntnissen aus anderen Studien im Tier oder im Mensch basieren, aber auch auf Daten von verwandten Substanzklassen/Wirkmechanismen oder einem ähnlichen pharmakokinetischen Profil (Smith et al., 2002). Die Autoren beschreiben auch klar die Diskrepanz zwischen der Tatsache einerseits, dass man das pharmakologische Verhalten der Testsubstanz im menschlichen Organismus kennen muss, um die Tierart auszuwählen, die dem Mensch am ähnlichsten ist, andererseits benötigt man aber vorher Tierdaten, um die Reaktion im Mensch abzuschätzen (Smith et al., 2002). Des Weiteren sollte die Tierart so ausgewählt werden, dass die höchste Wahrscheinlichkeit besteht adverse toxikologische Effekte der Testsubstanz beim Mensch voraussagen zu können (Chapman et al., 2007) bzw. dass die Tierart die grundsätzliche Fähigkeit haben sollte, die Situation auf den Menschen übertragen zu können (Porsolt, 2012).

Auch substanzspezifische wissenschaftliche Aspekte spielen bei der Auswahl einer geeigneten Versuchstierspezies eine Rolle. Hierbei wird sowohl in der Literatur als auch in den gesetzlichen Leitlinien mehrfach betont, dass eines der wichtigsten Auswahlkriterien die pharmakologische Aktivität der Testsubstanz in der entsprechenden Spezies ist, d.h. die Tierart muss einen entsprechenden Rezeptor ausbilden bzw. im Falle von monoklonalen Antikörpern das entsprechende Epitop exprimieren (EMA Guideline 28367/07, 2007) (Chapman et al., 2007) (EMA Guideline 1042:99, 2010) (ICH Guideline S6(R1), 2011). Aus diesem Grund kämen, zumindest für die Gruppe der Biotherapeutika und monoklonalen Antikörper, häufig nur nicht-menschliche Primaten in Frage, da die Testsubstanzen meist

nur dort pharmakologisch aktiv sind (Bussiere, 2008) (Chapman et al., 2010). Zusätzlich zur pharmakologischen Aktivität sollte nach Meinung einer früheren Veröffentlichung zusätzlich auch noch eine ausreichende pharmakologische Antwort im Zielorganismus vorhanden sein (Smith & Trennery, 2002).

Im Falle einer fehlenden Ausbildung des Rezeptors bzw. Epitops kann eine Tierart dennoch relevant sein, sofern eine Kreuzreaktivität mit Geweben des Menschen vorliegt (ICH Guideline S6(R1), 2011). Andere Autoren sind dagegen der Meinung, dass Kreuzreaktivität zwischen zwei Spezies alleine nicht ausreicht, um die Aussage treffen zu können, dass dies eine relevante Spezies ist (Chapman et al., 2007) (Faqi, 2012).

Wichtig ist laut Literatur bei biotechnologischen Produkten außerdem die Abwesenheit einer Immunantwort der Tierart auf die Testsubstanz (Smith & Trennery, 2002) (Bussiere, 2008) (Chapman et al., 2010). Ebenso sollte eine geeignete Tierart die Fähigkeit haben, eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Blut zu entwickeln (Smith & Trennery, 2002).

Speziesspezifische Sensitivität

Im Hinblick auf wissenschaftliche Anforderungen an die Versuchstierauswahl haben auch speziesspezifische Wirkungen eine große Bedeutung, wie einige klassische Beispiele aus der Literatur zeigen.

Schon 1972 konnten Alcock et al. in einer Studie mit dem Wirkstoff Fenclozic aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) zeigen, dass die Testsubstanz bis auf Magen-Darm-Ulzerationen in Ratten, Hunden und Mäusen bei hohen Dosierungen keine adversen Effekte in den untersuchten Tiermodellen Maus, Ratte, Hund, Rhesus-Affe, Patas-Affe, Kaninchen, Meerschweinchen, Frettchen, Katze, Schwein, Rind und Pferd induzierte (Alcock, 1971). Beim Mensch hatte der Wirkstoff jedoch starke hepatotoxische Nebenwirkungen wie akute Cholestase mit Ikterus (Alcock, 1971). Da diese Hepatotoxizität auch anhand später durchgeführter Versuche in keiner anderen Spezies reproduziert werden konnte, wurde hier von einer offensichtlichen human-spezifischen Nebenwirkung gesprochen. Grund hierfür scheint eine unterschiedliche Phase-I-Bioaktivierung mit Bildung eines reaktiven Stoffwechselmetaboliten der Substanz im Menschen zu sein (Rodrigues & Rollison, 2013).

Speziesspezifische Unterschiede mit Relevanz für die Übertragbarkeit auf den Menschen zeigt auch der Wirkstoff Phenobarbital. In vielen Studien zum tumor erzeugenden Potenzial

wurde die Bildung von Lebertumoren und Schilddrüsentumoren bei Nagern nach Behandlung mit Phenobarbital beobachtet (Whysner et al., 1996) (IARC (*International Agency for Research in Cancer*), 2001). Beim Hund kann Phenobarbital eine Leberhypertrophie verursachen, eine Tumorinduktion wird nicht beschrieben (Ennulat et al., 2010) (Fischer et al., 2013). Der Mensch entwickelt dagegen auch nach jahrelanger Einnahme von Phenobarbital keine Tumore. Mögliche Gründe für diese Unterschiede sind unterschiedliche Enzymaktivitäten (Marquardt & Schäfer, 2013) (Yamada et al., 2014).

Im Zusammenhang mit speziesspezifischer Sensitivität steht auch der Thalidomid-Vorfall: ein Beruhigungs- und Schlafmittel, das in den 1950ern unter anderem wegen seiner guten Wirkung gegen Schwangerschaftsübelkeit an schwangere Frauen verabreicht wurde und zu Missbildungen an den Extremitäten der Kinder führte (Shepard, 1998). In zuvor stattgefundenen Rattenstudien wurde keine Entwicklungstoxizität festgestellt (Shepard, 1998). Anhand späterer Versuche im Kaninchen konnten allerdings vergleichbare Entwicklungsstörungen der Nachkommen wie beim Mensch gezeigt werden (Shepard, 1998). Heute weiß man, dass die teratogenen Effekte durch eine Inhibition der Blutgefäßneubildung zu erklären sind (D'Amato et al., 1994). Thalidomid besitzt eine hemmende Wirkung auf Wachstumsfaktoren wie vEGF (*vascular endothelial growth factor*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (D'Amato et al., 1994). Ratten sind tragischerweise nahezu die einzige Tierart, die nicht auf die teratogenen Effekte von Thalidomid ansprechen (Loosli, 1964).

Auch aus der jüngeren Vergangenheit existieren Beispiele zur speziesspezifischen Sensitivität. Am 13. März 2006 begann in London am Northwick Park Hospital eine *First-In-Human* (FIH)-Studie mit dem gegen das T-Zell-Epitop CD28 gerichteten Antikörper TGN1412 der TeGenero AG (Würzburg, Deutschland) (Horvath & Milton, 2009). Es kam bei den Probanden zu einem akuten und lebensbedrohlichen Zytokinsturm, der ein Multiorganversagen zur Folge hatte und eine intensivmedizinische Betreuung der sechs Studienteilnehmer erforderlich machte, die nur knapp überlebten und bis heute mit den Langzeitauswirkungen des Experiments zu kämpfen haben (Horvath & Milton, 2009). Zuvor wurden viele Studien in Ratten und Affen durchgeführt, bei denen der Antikörper zwar die gewünschten Immunzellen hemmte, aber keine auffälligen Nebenwirkungen auslöste (Beyersdorf et al., 2005). Vermutliche Ursache für diesen Unterschied ist eine verstärkte Adhäsionsfähigkeit der Immunzellen bei den Affen (Müller et al., 2008). Die Immunzellen produzierten zwar ebenfalls Zytokine, blieben aber aufgrund der

Adhäsionsfähigkeit in den Organen, wurden somit nicht ins Blut freigesetzt und erzeugten keinen Zytokinsturm im Tier (Müller et al., 2008).

Einige wenige Beispiele für speziesspezifische Unterschiede existieren auch im Bereich der Neurowissenschaften. Für den Hund wird in der Literatur eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft beschrieben (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011). Außerdem konnte anhand einer Analyse von publizierten Daten gezeigt werden, dass Hunde empfindlicher für Erbrechen sind im Vergleich zu beispielsweise Katzen oder Affen (King, 1990). Auch andere Autoren attestieren Hunden eine erhöhte natürliche Tendenz zu erbrechen (Gad, 2007) (Ganderup et al., 2010) (Hasiwa & Bailey, 2011). Die höchste publizierte Inzidenz für Erbrechen in einer Kontrollgruppe (es wird nicht näher spezifiziert ob diese Hunde unbehandelt waren oder das Vehikel bekamen) an einem Tag beträgt bis zu 40-50% (Gad, 2007).

3.4 Weitere Aspekte

In den Überlegungen zur Auswahl einer geeigneten Versuchstierspezies spielen neben den bereits erläuterten Kriterien noch weitere wie z.B. technische, wirtschaftliche und auch praktische Faktoren eine Rolle (siehe auch „Übersichtstabelle Nichtnagerspezies (Hund, Affe, Minipig) vergleichend“).

Ältere Veröffentlichungen nennen Punkte wie die Einfachheit der Züchtung der Tiere, ein niedriges Zoonosepotenzial, den phylogenetischen Status der einzelnen Tierarten und das Vorhandensein von geeigneten Hintergrunddaten, um zwischen substanzkorrelierten und spontan auftretenden Ereignissen während einer Versuchsreihe zu unterscheiden (Gad, 1990). Bezüglich Anforderungen an die Größe sollten die Tiere groß genug sein, um Blutentnahmen in ausreichender Menge und Anzahl durchführen zu können (Gad, 1990). Gleichzeitig sollen sie aber auch klein genug sein, um den Substanzbedarf möglichst gering zu halten (Smith & Trennery, 2002).

Weitere eher allgemeine Aspekte sind der Grad der Domestikation, die Gewöhnung der Tiere an ein Leben in Gefangenschaft, die Verfügbarkeit, die Flexibilität des Angebots an Tieren (Größe, Alter, Geschlecht, Anzahl), die Einfachheit der Haltungsbedingungen und der korrekten Fütterung, die Gewöhnung an den Menschen und an den Umgang mit den Tieren, die unproblematische Applikation von Medikamenten und eine möglichst unkomplizierte Probenentnahme (Smith & Trennery, 2002). Entscheidungshilfen bieten auch Erfahrungen mit der entsprechenden Tierart in toxikologischen Studien, das

Vorliegen von pathologischen Vergleichsdaten und der Gesundheitsstatus (Smith & Trennery, 2002).

Im Rahmen eines Treffens der Arbeitsgruppe „t⁴“ (*the transatlantic think tank for toxicology, a collaboration of the toxicological oriented chairs in Baltimore, Konstanz and Utrecht*) im Juni 2011 in Budapest (Ungarn), das stattfand, um den Einsatz von Hunden als Versuchstier kritisch zu hinterfragen (Thema: „*Critical evaluation of the use of dogs in biomedical research and testing in europe*“), wurden ebenfalls Überlegungen allgemeiner Art zur Auswahl der Nichtnagerversuchstierspezies benannt (Hasiwa & Bailey, 2011). Grundsätzlich spielten hier Faktoren wie der prädiktive Wert des Tiermodells für die beabsichtigten Zwecke eine Rolle (Hasiwa & Bailey, 2011). Außerdem sollten alle verfügbaren Informationen, wie *in vitro* Daten und der aktuelle Stand der Literatur in die Entscheidungsfindung mit einbezogen werden (Hasiwa & Bailey, 2011). Die Arbeitsgruppe kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Versuchstierauswahl oft eine Entscheidung von Fall zu Fall ist, unter Berücksichtigung von wissenschaftlichen Überlegungen, ethischer und gesetzlicher Akzeptanz, technischen Faktoren, Vorliegen einer pharmakologischen Aktivität und der Existenz pharmakokinetischer Daten in ausreichendem Umfang und der Ähnlichkeit zum Menschen (Hasiwa & Bailey, 2011). Außerdem sollte stets das am besten geeignete Tiermodell verwendet werden und nicht das, welches am einfachsten verfügbar wäre (Hasiwa & Bailey, 2011).

3.5 Gegenwärtige Praxis der Versuchstierauswahl

In der Literatur finden sich wenige Angaben zur gegenwärtigen Praxis der Versuchstierauswahl.

Eine 2002 publizierte Veröffentlichung beschreibt die zu diesem Zeitpunkt übliche Vorgehensweise bei der Auswahl der Nichtnagerspezies in England (Smith & Trennery, 2002). Dort wird die Versuchstierauswahl anhand der Beurteilung der aktuellsten Datenlage getroffen (Smith & Trennery, 2002). Für die Sicherheitsbewertung werden frühe *in vitro* und *in vivo* DMPK-Studien genutzt, die möglichst *in vivo* Daten in mehreren Spezies beinhalten sollten, um vergleichbare Informationen zu bieten (Smith & Trennery, 2002). In den meisten Fällen ist der Hund aufgrund seiner fundierten vorhandenen Hintergrunddatenbasis, Praktikabilität, Erfahrungen, gesetzlichen Anforderungen und guter Verfügbarkeit die standardmäßig verwendete Spezies (Smith & Trennery, 2002). Für die Fälle, für die der Hund nicht geeignet ist, werden Primaten oder auch das Minipig

eingesetzt (Smith & Trennery, 2002). Die Nichtnager werden eher selten für Screening-Studien genutzt, es sei denn, es liegen Erfahrungen vor, wie beispielsweise, dass der Rezeptor nur in einer speziellen Spezies vorhanden ist oder wenn frühe Experimente gezeigt haben, dass der Nager keinen prädiktiven Wert für eine spezielle Toxizität innerhalb einer Substanzklasse besitzt (Smith & Trennery, 2002). Derzeit besteht nur eine kleine Anzahl an Projekten, bei denen zwischen zwei Nichtnagerspezies während des Entwicklungsprozesses gewechselt wird (Smith & Trennery, 2002). Allerdings wird gelegentlich eine zweite Nichtnagerspezies zusätzlich verwendet, um bestimmte Ergebnisse zu verifizieren, besonders im Zusammenhang mit klinischen Studien im Menschen (Smith & Trennery, 2002).

Bode et al. (2010) beschreiben eine retrospektive Datenauswertung eines nicht namentlich genannten Unternehmen der pharmazeutischen Industrie bezüglich der gängigen Praxis zur Auswahl der Nichtnagerspezies mit Daten von 57 Projekten aus einem Zeitraum von 10 Jahren (Bode et al., 2010). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Versuchstierauswahl auf folgenden Überlegungen beruht: Erfahrungen und Daten von Versuchen aus dem früheren Entwicklungsprozess, speziesspezifische Unverträglichkeiten (z.B. kardiovaskuläre Effekte, Emesis, Histaminausschüttung beim Hund), pharmakokinetische Daten und Substanzmetabolismus im Tier (Erreichen eines ausreichenden Blutplasmaspiegels, Vorhandensein der erwarteten menschlichen Hauptmetaboliten), technische Überlegungen und sofern irgendwie möglich aus ethischen Gründen die Vermeidung des Einsatzes von nicht-menschlichen Primaten (Bode et al., 2010). Für die Fälle, für die Hunde und Minipigs gleich gut geeignet waren, spielten auch Aspekte der Verfügbarkeit eine Rolle (Bode et al., 2010).

Basierend auf Ergebnissen dieser Analyse sollten nach Meinung der Autoren für die Auswahl der Nichtnagerspezies vor dem Start des ersten Experiments im Nichtnager idealerweise folgende Informationen zur Verfügung stehen (Bode et al., 2010):

- Pharmakodynamische Aktivität in den verschiedenen Nichtnagerspezies
- Informatorisch-toxikologische Daten im Nager
- Kardiovaskuläre Daten nach niedrigen Einzeldosen in den verschiedenen Nichtnagerspezies

- Informationen von sogenannten „*front runner compounds*“⁴ (falls verfügbar)
- *In vitro* metabolische Stabilität in Hepatozyten und/oder Leber-Mikrosomen von Ratte, Hund, Minipig, Affe und Mensch
- Plasmaprofil der aktiven Substanz nach *in vivo* Gabe intravenös und oral in Ratte und Hund und/oder Affe und Minipig

3.6 Speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome beim Nichtnager

Wenn weder pharmakodynamische noch pharmakokinetische Daten eine Nichtnagerspezies in der Speziesauswahl als besonders vergleichbar zum Menschen identifizieren, wäre es für Substanzen mit erwarteten neurologischen Symptomen gut, einen Vergleich zur neurologischen Sensitivität der einzelnen Spezies zu kennen. Ideal wären in diesem Zusammenhang außerdem Hinweise, ob dies auf den Menschen übertragbar ist. In der Literatur existieren derzeit keine Veröffentlichungen anhand derer die Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig bezüglich ihrer speziesspezifischen Empfindlichkeit für neurologische Symptome verglichen werden können. Nur für den Hund gibt es wenige ältere Publikationen, nach deren Meinung für den Beagle eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft besteht (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011).

Dabei wird zum Teil ein generelles gehäuftes Auftreten von spontanen Krampfanfällen beim Beagle beschrieben oder genannt, aber nicht näher spezifiziert (Redman & Weir, 1969). Auch weitere ältere Veröffentlichungen zur erhöhten spontanen Krampfbereitschaft beim Hund enthalten nur allgemeine Informationen, aber keine gezielten Analysen (Edmonds et al., 1979). Im Bericht einer Arbeitstagung aus 2011 zur kritischen Evaluierung des Nutzens von Hunden in der biomedizinischen Forschung in Europa befinden sich einige Beispiele für die Grenzen der Verwendung von Hunden in den pharmakologischen Sicherheitsstudien (Hasiwa & Bailey, 2011). Dort wird in diesem Zusammenhang u.a. eine erhöhte Krampfbereitschaft genannt, aber nicht näher differenziert (Hasiwa & Bailey, 2011).

Bielfelt et al. (1971) untersuchten gezielter anhand einer definierten Beagle-Population von 293 Tieren das Auftreten von spontanen Krampfanfällen und zeichneten diese systematisch auf (Bielfelt et al., 1971). Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass das Auftreten

⁴ Wirkstoffkandidaten, die sich im Entwicklungsprozess vorerst als am vielversprechendsten herauskristallisiert haben, danach kommen die sog. „*back up compounds*“

solcher Krampfanfälle in der Beagle-Kolonie eine genetische Basis hatte (Bielfelt et al., 1971). Außerdem bestand mit 11,9% betroffenen männlichen und 2,6% betroffenen weiblichen Tieren eine Geschlechtsprädisposition für Rüden (Bielfelt et al., 1971).

In diesem Zusammenhang sind auch nach Erfahrungen von Easter et al. (2009) Hunde besonders empfindlich für substanzinduzierte Krämpfe (unpublizierte Beobachtungen von zahlreichen Projekten bei AstraZeneca) (Easter et al., 2009). Weitere Informationen zur Krampfanfälligkeit anderer Tierarten oder der Hund im Vergleich zum Nager werden in der Publikation nicht genannt (Easter et al., 2009). Begründet wird diese Empfindlichkeit der Hunde mit den, in den zuvor genannten Veröffentlichungen beschriebenen, reduzierten Krampfschwellen für den Beagle (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971).

Betrachtet man den genetischen Hintergrund von Hundepopulationen genauer, sind Linienzucht und Inzucht bei Hunden schon lange gängige Praxis, um die teilweise sehr spezifischen Rassestandards zu erreichen (Ekenstedt et al., 2011). Diese Vorgehensweise, die einheitlichere Nachkommen erzeugen soll, kann jedoch auch durch die Konzentration von rezessiven Genmutationen zu einem gehäuften Auftreten von schwerwiegenden Krankheiten, u.a. wie hier zu Krampfanfällen führen (Ekenstedt et al., 2011). Auch das Minipig (hier das Göttinger Minipig) wird hinsichtlich seiner genetischen Basis in der Literatur eher als kleine Population mit wenig aktiven Züchtern angegeben (Simianer & Köhn, 2010), was eine enge Verwandtschaft vermuten lässt. Für den Affen wird ein breiter genetischer Hintergrund in der Literatur angenommen, da viele der zu Versuchszwecken verwendeten Affenarten ursprünglich geographisch weit verteilt waren (Haus et al., 2014). Trotzdem sind auch genetisch bedingte Anfälle z.B. beim Pavian beschrieben (Killam et al., 1967) (Killam, 1979) (Szabó et al., 2005).

4. Prädiktivität von Tiermodellen für Toxizität im Menschen

Die Testung im Tiermodell soll ein möglichst hohes Maß an Sicherheit für die klinischen Probanden und Patienten gewährleisten. Auf Gesetzesebene wird die Verwendung der empfindlichsten Spezies in Bezug auf die Testsubstanz gefordert (*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (FDA, 2005)). Dabei ist der prädiktive Wert von Tierstudien für Wirksamkeit und Sicherheitsbewertung für den Menschen eines der am meisten kontrovers diskutierten Themen in der Öffentlichkeit und in der Literatur (Schein, 1970) (Zbinden, 1991)

(Broadhead et al., 2000) (Greaves et al., 2004), (Jolivet & Ward, 2005) (Matthews, 2008) (van Meer et al., 2012) (Bailey et al., 2013).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben dazu. In älteren Publikationen bestand eine gute Korrelation für die Organsysteme Knochenmark, Niere, Leber und Magen-Darm-Trakt (Owens, 1962). Tierzahlen werden nicht genannt (Owens, 1962). Eine 1970 veröffentlichte Studie von Schein et al. (1970) ergab außer für die Bereiche Haut und ZNS für alle übrigen Organsysteme einen guten prädiktiven Wert und deckt sich somit mit den Ergebnissen von Owens et al. (1962) (Schein, 1970). Eine Analyse aus dem Jahr 2000 zeigte eine positive Übereinstimmung für die Voraussage humaner Toxizität von 70%, wenn Nager- und Nichtnagerdaten zusammen ausgewertet wurden (Nichtnager alleine 63%, Nager alleine 43%) (Broadhead et al., 2000).

In einer 2004 publizierten Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass 90% der toxikologischen Effekte im Menschen in Studien bis zur Dauer von einem Monat im Tiermodell (die Autoren unterscheiden hierbei nicht zwischen Nager und Nichtnager) zu sehen waren (Greaves et al., 2004). Des Weiteren bestand eine signifikant niedrigere oder höhere Voraussagekraft von Tierstudien, die je nach Organen oder Organsystemen variierte (Greaves et al., 2004).

Laut anderen Veröffentlichungen ist der prädiktive Wert von Tierstudien für adverse Effekte im Mensch eher als gering einzuschätzen. Eine bereits oben genannte und ältere Untersuchung von 21 Substanzen aus dem Bereich Onkologie zeigte beispielweise nur eine moderate Korrelation zwischen neurotoxischen Effekten bei Mensch und Tier (Owens, 1962). Zbinden spricht in seiner 1991 veröffentlichten Publikation in diesem Zusammenhang verschiedene kritische Punkte an, z.B. dass Daten von jungen, gesunden Tieren mit täglichen Dosierungen und große Tierzahlen mit einzelnen individuellen Patienten (von neugeboren bis gealtert) und unterschiedlichen Dosierungsregimen verglichen werden (Zbinden, 1991). Eine 2012 durchgeführte Analyse untersuchte im Rahmen der Pharmakovigilanz 43 niedermolekulare Wirkstoffe, größtenteils aus den Bereichen der Neurowissenschaften und der Antiinfektiva, bei denen insgesamt 93 ernsthafte adverse Effekte im Menschen auftraten (van Meer et al., 2012). Die Studie ergab, dass 63% der beim Menschen aufgetretenen Symptome zuvor keinen entsprechenden Effekt im Tiermodell gezeigt hatten und nur 19% der Symptome ausreichend korrelierten (van Meer et al., 2012). Die Publikation beschränkt sich hierbei auf die Veröffentlichung der richtig-positiven und falsch-negativen Symptome (van Meer et al., 2012). Richtig-

positive Effekte waren hierbei periphere Neuropathie, Perforation und Ulzeration der Cornea, gastrointestinale Läsionen und Blutungen und Fibrose der Niere (van Meer et al., 2012). Falsch-negative Symptome waren dagegen Toxizität im hämatopoetischen System (Aplasie der Erythrozyten) und ein steigendes Risiko für das Auftreten von Depressionen (van Meer et al., 2012). Somit hatten Tierdaten nach Meinung der Autoren zumindest für die Pharmakovigilanz nur einen begrenzten Wert (van Meer et al., 2012).

Auch im Bereich der Pharmakokinetik gibt es Studien, die sich mit der Prädiktivität der einzelnen Spezies befassen, denn hier werden die entsprechenden Daten im Menschen vor Beginn der klinischen Studien anhand von präklinischen *in vivo* generierten Tierdaten in Modellen errechnet (Jolivet & Ward, 2005). In der Publikation von Jolivet und Ward (2005) wird erwähnt, dass einige Daten darauf hindeuten, dass das Hochrechnen anhand pharmakokinetischer Daten vom Affen die akkurateste Methode für die Voraussage der Daten im Menschen ist. Allerdings ergab sich in der von den Autoren durchgeführten genaueren Analyse von 103 Substanzen mit Daten von Ratte, Hund oder Affe unter Einbeziehung weiterer Parameter wie Clearance oder Verteilungsvolumen, dass noch weitere Verbesserungen der Modelle nötig sind. Das könnte ermöglichen, das geeignete Tiermodell für die Voraussage am Menschen zu finden, da retrospektiv substanzspezifisch unterschiedliche Tierarten das beste Ergebnis lieferten (Jolivet & Ward, 2005).

Andere Autoren sind sogar der Meinung, dass wenn man die korrekten Definitionen von Sensitivität, Spezifität und Wahrscheinlichkeit beachtet, die Daten keinen statistisch glaubhaften Beweis liefern, dass die Tiermodelle Hund und Affe irgendeinen prädiktiven Wert haben, weder jedes für sich, noch gemeinsam (Matthews, 2008). Gegen einen ausreichenden prädiktiven Wert von Hundedaten für den Menschen spricht auch eine neuere Publikation von Bailey et al. aus 2013, in der 2.366 Substanzen mit Daten von Hunden und Menschen statistisch ausgewertet wurden (Bailey et al., 2013). Diese zeigt, dass die Abwesenheit von toxikologischen Ereignissen beim Hund nicht automatisch impliziert, dass ebenso keine adversen Effekte (klassifiziert nach dem *Medical Dictionary for Regulatory Activities*, einzelne Symptome werden in der Publikation nicht genannt) beim Mensch auftreten (Bailey et al., 2013). Hierbei ist anzumerken, dass der Autor Mitglied der Tierschutzorganisation *British Union for the Abolition of Vivisection* ist (Bailey et al., 2013). Wirkstoffkonzentrationen wurden nicht gezielt miteinander verglichen, da die Analyse auf publizierte und öffentlich zugängliche Daten limitiert war (Bailey et al., 2013). Kritiker dieser Veröffentlichung sprechen unter anderem einen Schwachpunkt an, indem

sie sagen, dass Überlegungen zur Dosis bzw. Exposition fundamental wichtig für die Risikobewertung von pharmazeutischen Produkten sind (Booker, 2014). Nach Meinung der Autoren ist der Grund für eine fehlende Übertragbarkeit von toxikologischen Wirkungen im Hund auf den Menschen, dass die toxische Exposition im Mensch nicht erreicht wurde (Booker, 2014).

Im Zusammenhang mit dem prädiktiven Wert von Tierstudien für den Menschen könnten Testungen im Erkrankungsmodell hilfreich sein. Gerade bei neurologischen Erkrankungen ändert sich durch die komplexen Veränderungen auf molekularer und/oder zellulärer Ebene oft die Empfindlichkeit gegenüber neurologischen Nebenwirkungen. Hierbei spielen auch erkrankungsbedingte Veränderungen der Blut-Hirn-Schranken-Funktion eine Rolle, da Dysfunktionen der Blut-Hirn-Schranke ein kritischer Punkt in der Entwicklung und der Progression von neurologischen Erkrankungen darstellen (Hawkins & Davis, 2005). Beispielsweise bei Multipler Sklerose reißen die Verbindungen der Blut-Hirn-Schranke auseinander, bei gleichzeitiger Exudation von Fibrin, was eine inflammatorische Reaktion mit Demyelinisation zur Folge hat (Miller et al., 2003). Morbus Alzheimer bedingt eine Akkumulation von Amyloid-Plaques in den Blutgefäßen, was die Neurotoxizität steigert (Rosenberg, 2012) und auch einen abnehmenden cerebralen Blutfluss zur Folge hat (Bell & Zlokovic, 2009).

4.1 Die Rolle des Nichtnagers

Der Nichtnager dient dazu bei der Testung neuer Wirkstoffkandidaten ausreichend Daten bereitzustellen, um Effekte zu zeigen, die im Nager nicht zu sehen sind (Hasiwa & Bailey, 2011). Bereits ältere Untersuchungen betonen den zusätzlichen Wert des Einsatzes von Nichtnagern als Versuchstiere in toxikologischen Studien für die Sicherheit des Menschen (Lichtfield, 1961): Eine Studie von sechs Anti-Krebs-Medikamenten konnte zeigen, dass die Effekte im Menschen vom Hund besser vorausgesagt werden konnten als anhand vorliegender Daten aus Rattenstudien (Lichtfield, 1961). Symptome, die hierbei in Hund und Mensch auftraten, waren verzögerte Reflexe, Hypotension, Ataxie, verminderte Aktivität und Tremor (Lichtfield, 1961).

In einer weiteren Analyse hatten adverse Effekte in zwei verschiedenen Tiermodellen eine deutlich höhere prädiktive Aussagekraft bezüglich der tatsächlichen Substanzkonzentration im Menschen als dies für nur ein Tiermodell alleine der Fall war (Litchfield & River, 1962) (Plaa, 1976).

Olson et al. (2000) konnten im Jahre 2000 ebenfalls zeigen, dass man deutlich bessere Testsensitivitäten erhielt, wenn Versuchsdaten von zwei Spezies kombiniert wurden (z.B. Hund und Ratte) (Olson et al., 2000).

Die bereits genannte Analyse von Broadhead et al. (2000) zeigte eine positive Übereinstimmung für die Voraussage humaner Toxizität von 70%, wenn Nager- und Nichtnagerdaten zusammen ausgewertet wurden (Nichtnager alleine 63%, Nager alleine 43%) (Broadhead et al., 2000) und unterstreicht somit ebenfalls die Bedeutung des Nichtnagers und den Mehrwert einer Kombination von Nager- und Nichtnagerstudien.

Für das Minipig als Nichtnagerspezies existiert bisher wenig Literatur bezüglich der prädiktiven Aussagekraft. Laut einer neueren Analyse gibt es jedoch Hinweise, dass es einen ausreichenden prädiktiven Wert für die Sicherheit des Menschen in klinischen Studien hat (Ganderup et al., 2010). Bei 43 auf den Markt gebrachten Medikamenten aus 20 verschiedenen Indikationsgebieten mit insgesamt 6 verschiedenen Applikationsformen (dermal, intradermal, oral, intravenös, subkutan und intramuskulär) konnte für 63% ein guter prädiktiver Wert ermittelt werden (Ganderup et al., 2010).

Eine Studie von Horner et al. (2013) untersuchte 77 Testsubstanzen von AstraZeneca unter anderem bezüglich ihrer Zielorgantoxizität (Horner et al., 2013). Im Nichtnager wurden bei 43 von 75 Substanzen neue Organtoxizitäten (u.a. zentrales Nervensystem) identifiziert, die eine hohe Relevanz für die Risikobewertung beim Menschen hatten (Horner et al., 2013). Die Arbeitsgruppe erklärt die Speziesunterschiede in der Toxikologie anhand mehrerer Faktoren wie Unterschiede in der Absorption, des Metabolismus, der Verteilung, der Ausscheidung und der Organexposition der Testsubstanz in den einzelnen Tiermodellen (Horner et al., 2013). Auch das Ergebnis dieser Analyse demonstrierte klar den Vorteil der Verwendung von zwei verschiedenen Tierspezies für die Sicherheitsbewertung im Menschen (Horner et al., 2013).

Auch jüngste Veröffentlichungen betonen nach wie vor die Bedeutung von Nichtnagerdaten, wie eine retrospektive Datenanalyse von 53 Projekten aus einem Zeitraum von 13 Jahren (1999-2012) aus dem Forschungsbereich Onkologie bei AstraZeneca zeigt (unveröffentlichte Daten) (Deavall et al., 2014). Hierbei wurden 12 Projekte (23%) vor der klinischen Phase gestoppt, davon waren in 7 Projekten (13% aller Projekte) Nichtnagerdaten der ausschlaggebende Grund (Deavall et al., 2014). Eins dieser 7 Projekte wurde aufgrund von neurologischen Nebenwirkungen im Hund nicht weiterentwickelt (Deavall et al., 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in vielen

Fällen die Nichtnagerdaten der primäre Anlass waren, um in klinischen Studien zusätzlich Monitoring einzusetzen, um so die Sicherheit für den Menschen zu erhöhen (Deavall et al., 2014).

4.2 Der prädiktive Wert von Tierstudien für neurologische Symptome

Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde speziell der prädiktive Wert von Tierstudien für neurologische Symptome im Menschen in der Literatur untersucht.

Eine ältere retrospektive Evaluation (Owens, 1962) von 21 Anti-Krebs-Medikamenten, von denen 7 Wirkstoffe zu neurologischen Nebenwirkungen beim Mensch führten, zeigte nur eine moderate Korrelation zwischen neurotoxischen Effekten in Mensch und Tier (Hund und Affe zeigten jeweils bei 2 der 7 Substanzen neurologische Symptome, die Nager nur bei 1-2 Substanzen), so dass der prädiktive Wert bezüglich neurologischer Symptome als „fragwürdig“ bezeichnet wurde (Owens, 1962). Hierbei war der prädiktive Wert der Nichtnagerspezies Hund und Affe etwas besser als der der Nager (Owens, 1962). Eine gute Korrelation bestand dagegen für die Organsysteme Knochenmark, Niere, Leber und Magen-Darm-Trakt und keinerlei für das Organsystem Haut (Owens, 1962). Tierzahlen werden nicht genannt (Owens, 1962).

In einer 1970 veröffentlichten Studie von Schein et al. (1970) wurde retrospektiv für 25 Anti-Krebs-Medikamente der Nutzen von Hunden und Affen im Hinblick auf ihren prädiktiven Wert zur Voraussage adverser Effekte im Menschen (u.a. neurologischer Art) untersucht (Schein, 1970). Außer für die Bereiche Haut und ZNS ergab die Analyse für alle übrigen Organsysteme einen guten prädiktiven Wert und deckt sich somit mit den Ergebnissen von Owens et al. (1962). Trotz allem existierte eine adäquate Übereinstimmung von fast 40% der neuromuskulären und neurotoxischen Effekte zwischen Affe, Hund und Mensch (Schein, 1970). Berücksichtigt wurden dabei folgende Symptome: Lethargie, reduziertes Sensorium, Unruhe, Ataxie, Tremor und Krampfanfälle (Schein, 1970). Hierbei zeigten Hunde und Affen einen ähnlichen prädiktiven Wert und hohe Dosen der Testsubstanzen waren nötig, um die beste Korrelation zu erreichen (Schein, 1970). Analysiert wurden Daten von 383 Hunden und 152 Affen (Schein, 1970).

1978 wurden 45 unterschiedliche Wirkstoffe (davon 6 aus dem Bereich Neurowissenschaften) von Fletcher et al. (1978) hinsichtlich ihres prädiktiven Wertes zur Voraussage neurologischer Effekte im Menschen anhand von Tierdaten untersucht (Fletcher, 1978). Bei den Versuchstieren wurde hierbei jedoch nicht zwischen einzelnen

Spezies oder Nagern und Nichtnagern unterschieden (Fletcher, 1978). Die Analyse ergab, dass Symptome nach hohen Dosierungen wie Ataxie und Krämpfe im Tiermodell, aber nicht im Mensch auftraten (Fletcher, 1978). Die Höhe der verabreichten Dosen bei Mensch und Tier und ob diese vergleichbar waren wird nicht genannt (Fletcher, 1978). Subjektive Effekte wie Schwindel, Kopfweg, trockenes Mundgefühl und Schwitzen waren dagegen beim Menschen, aber nicht in den Tiermodellen zu sehen (Fletcher, 1978). Eine bessere Korrelation bestand dagegen für andere ZNS-Effekte wie Tremor (Fletcher, 1978). Generell waren im Tiermodell mehr verschiedene neurologische Symptome zu sehen als beim Menschen auftraten (Fletcher, 1978). Ein gezielter Vergleich von Expositionen fehlt in der Publikation (Fletcher, 1978). Hierbei ist zu beachten, dass differenziert betrachtet werden muss, ob es sich hierbei um tatsächliche Speziesunterschiede handelt oder ob dies möglicherweise an der Methodik der damaligen Zeit und dem Fokus der Versuche liegt, dass bestimmte Symptome zwischen Mensch und Tier nicht korrelierten bzw. manche Symptome nur beim Menschen auftraten (z.B. Schwindel, Kopfweg, trockenes Mundgefühl und Schwitzen). Es wird in der Publikation (Fletcher, 1978) nicht näher erläutert, wie diese Symptome beim Tier evaluiert wurden. Beispielsweise Schwindel beim Menschen wurde beim Tier nicht spezifischer untersucht, wäre jedoch z.B. anhand von Augenbewegungen zu evaluieren. Auch trockenes Mundgefühl wurde beim Tier nicht analysiert, wäre aber möglicherweise durch einen Backenschleimhautabstrich erfassbar. Auch wurden, bezogen auf das Symptom „Kopfweg“, die Tiere nicht mit sog. *pain scores* analysiert wie sie für Ratte (Sotocinal et al., 2011) und Maus (Miller & Leach, 2015), aber auch für Nichtnager wie z.B. Kaninchen (Keating et al., 2012) oder auch das Pferd (Dalla Costa et al., 2014) existieren. Für eine Gruppe von 84 verschiedenen Wirkstoffen in Japan bestand eine generelle nicht-spezifische Korrelation neurologischer Symptome zwischen Tieren und dem Menschen (Igarashi et al., 1995). Beispielsweise korrelierten Beeinträchtigungen der Fortbewegungsfähigkeit (spontane motorische Koordinationsstörungen) bei Mäusen mit Schwindel beim Menschen (Igarashi et al., 1995).

Ein Trend in der Literatur ist nach Meinung von Greaves et al. (2004), dass der Hund generell einen höheren prädiktiven Wert für humane adverse Effekte besitzt als Nager oder Affen (Greaves et al., 2004). Dies ist nach Meinung der Autoren dadurch zu erklären, dass u.a. neurologische Symptome im Hund durch seinen routinemäßigen Einsatz in standardtoxikologischen Studien und der Erfahrung des tierbetreuenden Personals einfacher zu bewerten sind, als im Nager oder Affen (Greaves et al., 2004). Betont wird in

diesem Zusammenhang auch die hohe Relevanz des bisherigen Vorgehens einer guten klinischen Beobachtung innerhalb der Studien um u.a. neurologische Symptome zu erkennen (Greaves et al., 2004).

Die große Bedeutung des ZNS als Zielorgan für die Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln in toxikologischen Studien zeigt auch eine weitere 2013 veröffentlichte Studie (Horner et al., 2013). Horner et al. (AstraZeneca, 2013) untersuchten retrospektiv 77 Substanzen unterschiedlicher Indikationsgebiete hinsichtlich ihrer Zielorgantoxizität und den Gründen für das Beenden der Weiterentwicklung (Horner et al., 2013). Insgesamt wurden 18 der 77 Substanzen (23%) nicht weiterentwickelt (Horner et al., 2013). Von den 26 Substanzen aus dem Bereich der Neurowissenschaften mit den Indikationsgebieten Schizophrenie, Angstzustände, Depressionen, Multiple Sklerose und Alzheimer wurde bei 7 Substanzen (26,9%) aufgrund des Auftretens von neurologischen Symptomen sowohl im Nager als auch im Nichtnager die weitere Entwicklung vor den klinischen Studien im Menschen gestoppt (Horner et al., 2013). Die Zielorgantoxizität im zentralen Nervensystem war somit der häufigste Grund für das Beenden der Weiterentwicklung (Horner et al., 2013). Diese Studie zeigt die große Bedeutung der Bewertung von neurologischen Symptomen im Entwicklungsprozess von Arzneimitteln, auf die auch der Fokus dieser Arbeit gerichtet war.

III. Material und Methoden

1. Literaturrecherche

Die Literaturrecherche wurde mit Hilfe der Programme und Datenbanken PubMed®, Pharmapendium®, go3R®, Google Scholar®, HireWire Press® und ProQuestDialog® durchgeführt. Die erste umfassende Recherche der Hauptschlüsselwörter „second species selection for toxicology“, „preclinical safety“ und „clinical phases studies“ fand im April 2013 zu Beginn des Projektes statt. Ab diesem Zeitpunkt wurde während der Projektarbeit immer wieder vereinzelt nach weiteren Stichpunkten wie „species-specific sensitivity“, „neurological symptoms“, „seizure dogs“, sowie „non-human primate“, „dog“, „minipig“, „rabbit“, „ferret“ im Zusammenhang mit „safety testing“ gesucht, wie es für das Fortschreiten der Arbeit notwendig war.

2. Retrospektive Datenauswertung

Die retrospektive firmeninterne Datenanalyse umfasste Daten aus insgesamt 174 toxikologischen Studien aus einem Zeitraum von 19 Jahren (1995 bis 2013), wobei größtenteils neuere Studien aus den letzten zehn Jahren (83,90%) ausgewertet wurden. Insgesamt wurden Daten von 1308 Mäusen, 7201 Ratten, 868 Hunden und 758 Affen berücksichtigt.

Die Daten stammen von 15 verschiedenen Substanzen (Substanzen A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) aus den Bereichen Neurowissenschaften und Schmerz mit 7 verschiedenen Wirkmechanismen (Wirkmechanismen I, II, III, IV, V, VI, VII). Ausgewählt wurden diese Wirkstoffe mit Hilfe einer firmeninternen Arbeitsgruppe (*AbbVie Seizure Working Group*), die sich mit dem Auftreten von Krampfanfällen im Arzneimittelentwicklungsprozess beschäftigt. Für alle diese Substanzen waren bereits neurologische Nebenwirkungen im Tier aufgetreten. Alle Substanzen waren auch in klinischen Studien am Menschen. Acht der 15 Substanzen erreichten Phase I der klinischen Entwicklung und 7 Substanzen Phase II.

Die evaluierten Substanzen waren Entwicklungskandidaten für folgende Indikationsgebiete: Kognitive Störungen, Verhaltensstörungen bezüglich Aufmerksamkeit und Lernverhalten (ADHS), Schizophrenie, neurodegenerative Krankheitsbilder (Morbus Alzheimer), Multiple Sklerose und chronisch nozizeptiver Schmerz.

Bei der Auswahl der Substanzen wurden für den Bereich Neurowissenschaften inklusive Schmerz gezielt Kandidaten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen wie Histamin-H3-Rezeptor-Antagonisten, Modulatoren am cholinergen Kanal, neuronale Nikotin-Rezeptor-Agonisten, Dopamin-D3-Rezeptor-Antagonisten, T-Typ-Calciumkanal-Blocker, 5HT6-Rezeptor-Antagonisten und Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Agonisten ausgesucht. Eine Übersicht ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Substanz	Wirkmechanismus	Indikationsgebiet
Substanz A, B, D, H, J, M, N	I, III, VI	Kognitive Störungen
Substanz C, F	II, V	Schmerz
Substanz E, G, K, L	III, IV	Schizophrenie
Substanz I	III	ADHS
Substanz O	VII	Multiple Sklerose

Tabelle 7: Übersicht über die 15 Substanzen der retrospektiven Datenanalyse mit ihren Wirkmechanismen und Indikationsgebieten: Die Substanzen hatten insgesamt 7 verschiedene Wirkmechanismen und 5 verschiedene Indikationsgebiete.

Für die Fragestellung dieser Arbeit waren die Nichtnagerdaten von speziellem Interesse, daher wurden Substanzen ausgewählt, die neurologische Symptome im Nager und auch im Nichtnager zeigten. In 14 der 15 evaluierten Substanzen traten neurologische Symptome sowohl beim Nager (Maus und/oder Ratte) als auch beim Nichtnager (Hund und/oder Affe) auf. Es gab eine Substanz, bei der nur die Nager neurologische Symptome hatten (Substanz O).

2.1 Studienbedingungen und Studientypen

Die analysierten Studien fanden teilweise intern aber auch extern, sowie in den USA und in Europa statt. Folgende Studientypen fanden hierbei Berücksichtigung:

- Kurzzeitstudien (*single dose studies*) im Nager und Nichtnager mit einzelnen eskalierenden Dosierungen
- Erste exploratorische Studien mit mehrfachen Applikationen (*repeat dose studies*) von ca. 5-7 Tagen Dauer (Ratte 2-3 Tiere/Geschlecht/Gruppe, Nichtnager 1-2 Tiere/Geschlecht/Gruppe)
- Studien von 2-wöchiger Dauer (*dose range finder*) mit größeren Tierzahlen (i.d.R. 5 Tiere/Geschlecht/Gruppe plus 3 Satelliten-Tiere beim Nager bzw. 2-3 Tiere/Geschlecht/Gruppe beim Nichtnager)

- GLP⁵-Studien von 4 oder 13 Wochen Dauer⁶ mit 10 Tieren/Geschlecht/Gruppe (Nager) oder 3-5 Tiere/Geschlecht/Gruppe (Nichtnager)
- Langzeit-GLP-Studien von 6 Monaten im Nager und 9 Monaten im Nichtnager

Die Studien fanden teilweise mit oder ohne Erholungsphase (*recovery*) nach der eigentlichen Dosierungsphase statt, in der ein Teil der Tiere keine Substanz mehr erhielt, die Tiere aber noch beobachtet wurden, um die Reversibilität aufgetretener Befunde zu evaluieren.

2.2 Applikationswege

Die Substanzen wurden fast überwiegend oral (Kapsel oder Schlundsonde) appliziert. In einzelnen Studien am Nager wurde die intravenöse Applikation für Kurzzeitstudien (*single dose studies*) verwendet.

2.3 Evaluierte Parameter in toxikologischen Studien

Das Datenpaket, das in den Studien evaluiert wurde und das damit für eine retrospektive Analyse zur Verfügung stand, beinhaltete im Einzelnen: Wirkstoffkonzentrationen im Blut, d. h. C_{\max} total ($\mu\text{g/ml}$), T_{\max} , Halbwertszeit und AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$) zu unterschiedlichen festgelegten Zeitpunkten je nach Studiendauer. Hierbei wurden sowohl i.d.R. die Werte der Einzeltiere sowie der Mittelwert der verschiedenen Dosierungsgruppen dokumentiert. Außerdem wurden Veränderungen im Körpergewicht, die Menge der Nahrungsaufnahme, die klinischen Symptome, Hämatologie, Serumchemie, Blutgerinnungsparameter, Urinalysen, EKG und teilweise, je nach Fragestellung, auch eine ophthalmologische Untersuchung dokumentiert, wobei nicht alle Parameter in allen Studien evaluiert wurden. Falls es sich um einen Versuch mit Sektion handelte wurden außerdem Organe makroskopisch und histologisch, sowie die Organgewichte untersucht. Aus den genannten Endpunkten wurde ein NOAEL (*no observed adverse effect level*) oder eine MTD (*maximum*

⁵ GLP = Gute Laborpraxis (*Good Laboratory Practice*) hat den Hauptfokus auf der Aufzeichnung und Berichterstattung der einzelnen Prüfungen und legt den organisatorischen Ablauf und die Bedingungen, unter denen Laborprüfungen geplant, durchgeführt und überwacht werden fest. GLP gibt einen formalen Rahmen für die Durchführung von Sicherheitsprüfungen an chemischen Produkten vor und ist in vielen Ländern gesetzlich vorgeschrieben.

⁶ Die Dauer der GLP-Studien im Tier richten sich nach den in der klinischen Phase folgenden FIH(*first in human*)-Studien im Menschen (ICH Guideline M3(R2), 2009).

tolerated dose) abgeleitet. Außerdem wurden in den Fällen, bei denen pathologische Untersuchungen stattfanden, die Zielorgane bestimmt.

Bei der Bestimmung der Studienparameter ist zu beachten, dass sich die Darstellung in der vorliegenden Arbeit auf toxikologische Studien beschränkt. Spezifische Tests oder *scores* zur Evaluierung von neurologischen Symptomen wie beispielsweise der Irwin-Test (Roux et al., 2005) sind Bestandteil der Sicherheitspharmakologie und waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Der Irwin-Test wird nur im Nager und i.d.R. nur nach Einzeldosierungen (*single dose*) durchgeführt, so dass Effekte nach wiederholter Dosierung nicht evaluiert werden. Dazu kommt, dass verhaltensbiologische Tests zur Wirksamkeit immer in viel niedrigeren Dosisbereichen stattfinden und eine effektive Dosis-Wirkungsbeziehung zeigen sollen, d.h. erwünschte neurologische Symptome, wie z.B. kognitive Verbesserungen im sog. *T-maze* (Verhaltenstest für Nager (Deacon & Rawlins, 2006)). Im Dosisbereich, bei dem Nebenwirkungen auftreten, wird dabei nicht getestet.

2.4 Klinische Symptome in toxikologischen Studien

Eventuell auftretende Symptome werden durch qualifiziertes und geschultes Fachpersonal mittels Adspektion oder spezieller Untersuchung der Tiere (z.B. Testen von Reflexen) zu unterschiedlichen festgelegten Studientagen innerhalb einer Studie beobachtet. Dies findet i.d.R. zum einen direkt nach der Dosierung und zusätzlich an einem später gewählten Zeitpunkt, z.B. beim Erreichen von T_{\max} , nach der Dosierung statt. Die Anzahl der Evaluierungen von klinischen Beobachtungen hängt hierbei von der Studiendauer, dem Studientyp und den aufgetretenen Symptomen ab.

Alle Beobachtungen werden entsprechend dokumentiert, genau wie weitere ursprünglich nicht geplante klinische Beobachtungen, die außerhalb der festgelegten Zeitpunkte stattfinden. Bei der Benennung der einzelnen Symptome ist zu beachten, dass hierbei teilweise das Vokabular durch das verwendete Dokumentations-Programm (hier z.B. PRISTIMA®) vorgegeben ist, aus denen die Studiendurchführer die passenden Begriffe auswählen.

Beim Übersetzen der Bezeichnungen einiger einzelner Symptome besteht die Problematik, dass die Übersetzung nicht 100% genau ist. Beispielsweise die im Englischen als „*jerks*“ und „*twitching*“ bezeichneten Symptome werden im Deutschen oft beide mit „Zuckungen“ übersetzt. Mit „*twitching*“ sind hierbei Zuckungen gemeint, „*jerks*“ entsprechen dagegen

stärkeren reflexartigen Zuckungen. Hierbei sei auch darauf hingewiesen, dass in den Studienprotokollen auch Freitext möglich ist und dass die Studien in unterschiedlichen Laboren mit verschiedenen Systemen stattfanden.

2.5 Erstellung der Datenbasis

Anhand der zur Verfügung stehenden Studiendaten wurde mit Hilfe des Programms Microsoft Excel® eine umfassende Tabelle erstellt. Diese Tabelle beinhaltet im Einzelnen Informationen zu Studientyp, Spezies, Studiendauer, Dosierungslevel, Tierzahlen, NOAEL, LOAEL, MTD, C_{\max} total, AUC, Plasmaproteinbindung und C_{\max} free. Die pharmakokinetischen Parameter wurden hierbei sowohl jeweils nach Geschlechtern getrennt als auch als Mittelwerte für beide Geschlechter aufgelistet. Im Folgenden schließen sich die einzelnen beobachteten Symptome sortiert nach Schweregrad von schwer (z.B. Krämpfe) bis leicht (z.B. Vokalisation) an. Ebenso wurde die Mortalität mit in die Tabelle aufgenommen. Wichtige einzelne Symptome wie z.B. Krämpfe wurden weiter spezifiziert wie beispielsweise in tonisch, klonisch und tonisch-klonisch. Die Symptome wurden jeweils nach Geschlechtern getrennt aufgelistet, außerdem wurde sowohl die Anzahl der Tiere, die dieses Symptom zeigten (relative Häufigkeit) als auch die Anzahl des Auftretens des entsprechenden Symptoms (z.B. zehn männliche Hunde hatten insgesamt 20 Krampfanfälle), sowie der Schweregrad der Symptome berücksichtigt. Die Tabelle enthält zusätzlich Informationen zu sonstigen aufgetretenen Symptomen, die Dauer einer evtl. Erholungsphase mit Beobachtung der Tiere (*recovery*), sowie die Symptome am Ende der Erholungsphase und eine Spalte für Kommentare.

2.6 Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel® und Tibco Spotfire® analysiert, statistisch ausgewertet und dargestellt. Die neurologischen Symptome wurden in ihrer Gesamtheit betrachtet oder teilweise zu Symptomgruppen zusammengefasst (z.B. „schwere neurologische Symptome“). Wichtige relevante Symptome (z.B. Krämpfe, Tremor) wurden zusätzlich einzeln analysiert. Es wurde die relative Häufigkeit für das Auftreten von einzelnen Symptomen bei Hunden und Affen errechnet sowie einzelne Symptome (z.B. Krämpfe) auf eine mögliche Geschlechtsspezifität hin untersucht.

Ein Sonderfall stellt die Auswertung des Symptoms „Mortalität“ dar, weil für die Mortalität innerhalb einer Studie unterschiedliche Ursachen möglich sind und z.B. organbedingte

Ursachen in der retrospektiven Analyse nicht separat untersucht wurden. Daher wurde es aus dem speziellen Vergleich exkludiert. Das Symptom „Mydriasis“ wurde zwar gezählt, aber für die weitere Auswertung ebenfalls nicht näher analysiert, da es aufgrund des größeren Platzangebotes der Hunde (und somit einem größeren Abstand zum Beobachter) gegenüber den Affen bei den Hunden evtl. nicht immer gesehen wurde, was die Inzidenz verfälschen würde und somit keinen geeigneten Parameter für einen direkten Vergleich darstellte. Auch „Miosis“ (nur beim Affen aufgetreten) wurde aus den gleichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter evaluiert (siehe auch Diskussionsteil). Außerdem findet im Rahmen der toxikologischen Studien zum Teil eine gezielte ophthalmologische Untersuchung der Versuchstiere statt, die diese Symptome genauer adressiert.

Alle aufgetretenen Symptome wurden in Relation zur Plasmakonzentration der Substanzen evaluiert. Zudem wurden Symptome zwischen den Nichtnagerspezies verglichen. Teilweise konnten Einzeltierdaten berücksichtigt werden. Trat bei mehreren Tieren das gleiche Symptom auf, wurden auch Mittelwerte der Blutplasmakonzentrationen errechnet.

Um die speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome bei Hunden und Affen genauer zu untersuchen, wurden die aufgetretenen Symptome mit den maximalen Blutplasmaspiegeln der Substanz in Beziehung gesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden für diesen Vergleich C_{\max} und AUC verwendet. Da C_{\max} als ein guter Parameter für den Vergleich von neurologischen Symptomen angesehen wurde und die Betrachtung der AUC für die Fragestellung keine anderen Ergebnisse lieferte, wurde in der Darstellung der Ergebnisse immer C_{\max} berücksichtigt.

Bei der Analyse von C_{\max} existieren grundsätzlich zwei verschiedene Betrachtungsweisen, die beide im Rahmen dieser Arbeit evaluiert wurden:

1. die totale maximale Blutplasmakonzentration der Substanz (C_{\max} total) und
2. die aus pharmakologischer Sicht relevante freie maximale Blutplasmakonzentration der Substanz (C_{\max} free), die mit Hilfe der unterschiedlichen Plasmaproteinbindung bei den einzelnen Tierarten nach folgender Formel errechnet werden kann:

$$C_{\max} \text{ free} = C_{\max} \text{ total} \times f_{up}$$

(f_{up} = *fraction unbound in plasma* (ungebundene Fraktion im Blutplasma)).

2.7 Definition: Empfindlichere Spezies im Rahmen dieser Arbeit

Für die Fragestellung, welche der beiden Nichtnagerspezies empfindlicher für neurologische Symptome ist, spielt der Zusammenhang des entsprechenden

Blutplasmaspiegels der Substanz während des Auftretens der Symptome eine entscheidende Rolle, da hiervon der Sicherheitsfaktor für die Probanden in den klinischen Studien abgeleitet wird (*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (FDA, 2005)).

Als empfindlichere Spezies wurde im Rahmen dieser Arbeit die Spezies definiert, bei der im Vergleich zur anderen Spezies bei einer niedrigeren Blutplasmakonzentration des Wirkstoffes bereits neurologische Symptome zu beobachten waren. Ein relevanter Unterschied zwischen den Blutplasmakonzentrationen bestand, wenn sich die Werte mindestens in einem intern definierten Faktor von 2 unterschieden.

Limitierend war die Tatsache, dass in den vorliegenden Datensätzen der toxikologischen Studien zwar i.d.R. für jedes Tier der entsprechende maximale Blutplasmaspiegel der Testsubstanz (C_{\max} total), der im Rahmen der Studie bei den Einzeltieren auftrat, dokumentiert ist, dies aber nicht immer dem tatsächlichen Blutspiegel entsprach, der genau zum Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms vorlag. Dies liegt daran, dass in toxikologischen Studien im Normalfall die Blutentnahmen zu festgelegten definierten Zeitpunkten stattfinden. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, wurde für die Einzeltiere deshalb immer der Wert für die Auswertung berücksichtigt, der zeitlich am nächsten am Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms lag.

3. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen für die retrospektive Datenauswertung fanden mit Hilfe der Statistikabteilungen der AbbVie Inc., Lake County, Illinois, USA und AbbVie Deutschland GmbH&Co.KG, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland, statt. Die Daten wurden in den einzelnen Spezies deskriptiv statistisch ausgewertet. Es wurden relative Häufigkeiten für das Auftreten von Ereignissen sowie Mittelwerte für die Konzentrationen errechnet. Die relative Häufigkeit gibt den Anteil der Elemente einer Menge wieder, bei denen eine bestimmte Merkmalsausprägung vorliegt. Sie wird berechnet, indem die absolute Häufigkeit eines Merkmals in einer zugrundeliegenden Menge durch die Anzahl der Objekte in dieser Menge geteilt wird. Verwendung fanden die Programme Microsoft Excel® und Tibco Spotfire®.

IV. Ergebnisse

1. Literaturrecherche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im ersten Schritt zunächst die Literatur zum Thema Versuchstierauswahl des Nichtnagers im Bereich der Neurowissenschaften unter besonderer Berücksichtigung der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome analysiert. Die besten Ergebnisse konnten mit Hilfe der firmeninternen Datenbank ProQuestDialog® anhand der drei Hauptschlüsselwörter „second species selection for toxicology“, „prelinical safety“ und „clinical phases studies“ erzielt werden. Die Suche ergab 28 Treffer, wobei nicht alle relevant waren. Die übrigen Programme und Datenbanken wie PubMed®, Pharmapendium®, go3R®, Google Scholar® und HireWire Press® lieferten anhand zusätzlicher Suchbegriffe ergänzende Literaturstellen. Als effektiv erwies sich außerdem die Vorgehensweise anhand der Literaturverzeichnisse wichtiger Publikationen weitere relevante Veröffentlichungen zum jeweiligen betreffenden Thema zu finden.

Als Ergebnis der Literaturrecherche kann festgehalten werden, dass für die einzelnen Nichtnagerspezies und ihre Verwendung als Versuchstiere Literaturdaten von unterschiedlichem Umfang und Qualität existieren. Für die Tierarten Hund, Affe und Minipig liegen deutlich mehr Veröffentlichungen vor als dies für Kaninchen oder Frettchen der Fall ist. Gerade für das Minipig hat vor allem in den letzten Jahren die verfügbare Datenbasis deutlich zugenommen. Die meisten Publikationen wurden unter Mitautorschaft des Züchters veröffentlicht, der die Verwendung des Minipigs stark unterstützt (Ellegaard, DK-4261 Dalmose, Dänemark).

Die Literaturrecherche ergab, dass in den Jahren 2002 und 2006 Hunde die meist verwendete Tierart als Nichtnagerspezies in toxikologischen Studien waren, gefolgt von Affe und Minipig (Smith & Trennery, 2002) (Jacobs, 2006). Laut der 2013 veröffentlichten Statistik der Europäischen Kommission wurden im Jahre 2011 insgesamt 7488 Hunde, 3435 Affen (Alt- und Neuweltaffen) und 3537 Schweine in der

Toxikologie und Sicherheitspharmakologie eingesetzt⁷. Frettchen und Kaninchen werden eher selten verwendet.

Anhand der vergleichenden Darstellung im Literaturteil konnte gezeigt werden, dass für jedes Tiermodell Stärken und Schwächen sowie speziesspezifische Unterschiede mit Bedeutung für die Verwendung als Versuchstier bestehen. Dabei werden Hund, Affe und Minipig für generelle Toxizitätsprüfungen, Tierarten wie Kaninchen und Frettchen größtenteils nur für spezielle Fragestellungen wie beispielsweise in der Entwicklungstoxizität (Kaninchen) (Gad, 2007) oder zu Studien zum Erbrechen (Frettchen) eingesetzt (Jacobs, 2006).

Der Vergleich der einzelnen Tierarten in der Literatur ergab, dass nicht allgemeingültig gesagt werden kann, welche Tierart am besten geeignet ist. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass die Auswahl der geeigneten Nichtnagerspezies auf vielen verschiedenen Faktoren wie beispielsweise auf gesetzlichen Voraussetzungen, ethischen Aspekten, wissenschaftlichen Anforderungen, Überlegungen zur Tierhaltung und technischen Aspekten beruht. Die endgültige Entscheidung muss im Einzelfall betrachtet werden (Smith & Trennery, 2002) und anhand aller miteinander in Konflikt stehenden Faktoren getroffen werden (Gad, 1990). Die Versuchstierauswahl ist eine Fall-zu-Fall-Entscheidung, hierzu müssen die Vorteile abgewogen werden, ein hoher prädiktiver Wert erwartet werden können und die Entscheidung wissenschaftlich begründet sein (Webster et al., 2010). Generelle Empfehlungen oder eine Art Leitlinie zur Auswahl einer geeigneten Nichtnagerspezies fehlen in der Literatur.

Ein weiteres Ergebnis der Literaturrecherche ist, dass bezogen auf die übliche Vorgehensweise der Nichtnagerauswahl nur wenige Veröffentlichungen existieren. Eine ältere Publikation trifft nur sehr allgemeine Aussagen (Gad, 1990), eine weitere beschreibt im Rahmen eines Diskusstreffens der ABPI (*Association of the British Pharmaceutical Industry*, ein Zusammenschluss von ca. 120 Unternehmen der pharmazeutischen Industrie) die gängige Vorgehensweise im Jahr 2002 in England (Smith & Trennery, 2002). Lediglich eine 2010 durchgeführte retrospektive Analyse einer nicht namentlich genannten pharmazeutischen Firma (Bode et al., 2010) enthält detaillierte Angaben, nach denen der Nichtnager aufgrund von pharmakokinetischen

⁷ Tabelle 2.1 'Number of animals used in experiments for selected purposes' des siebten Berichts über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere der Europäischen Kommission, 2013.

Daten und Metabolitenprofilen im Tier (Erreichen eines ausreichenden Blutplasmaspiegels, Vorhandensein des menschlichen Hauptmetaboliten), speziesspezifischen Unverträglichkeiten, Aspekten der Verfügbarkeit und technischen Überlegungen ausgewählt wird (Bode et al., 2010).

Zu den Aspekten der Übertragbarkeit und Prädiktivität von Tierversuchen ergab die Literaturrecherche gegensätzliche Meinungen. Der generelle prädiktive Wert von Tierstudien für den Menschen wird in der Literatur und in der Öffentlichkeit seit langem kontrovers diskutiert, hierbei besteht nach Meinung verschiedener Autoren ein guter prädiktiver Wert, teilweise limitiert auf bestimmte Organsysteme (Owens, 1962) (Schein, 1970) (Broadhead et al., 2000) (Greaves et al., 2004), andere Autoren sehen das nicht so (Zbinden, 1991) (Jolivet & Ward, 2005) (Matthews, 2008) (van Meer et al., 2012) (Bailey et al., 2013). Manche Autoren betonen hierbei speziell die hohe Relevanz der Verwendung von Daten in zwei verschiedenen Tierspezies und Nichtnagerdaten für die Sicherheitsbewertung der Probanden in den klinischen Studien (Lichtfield, 1961) (Lichtfield, 1962) (Plaa, 1976) (Olson et al., 2000) (Broadhead et al., 2000) (Ganderup et al., 2010) (Horner et al., 2013) (Deavall et al., 2014). Die große Bedeutung des ZNS als Zielorgan für die Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln ist jedoch laut Horner et al. (2013) trotz der kontroversen Diskussion unbestritten (Horner et al., 2013). Insgesamt wird bezogen auf neurologische Effekte eine generelle nicht-spezifische (Igarashi et al., 1995), moderate (Owens, 1962) (Fletcher, 1978) bis adäquate (Schein, 1970) Korrelation neurologischer Symptome zwischen Tierdaten und dem Mensch angenommen. Hierbei hatten Daten vom Nichtnager einen höheren prädiktiven Wert als Nagerdaten (Olson et al., 2000).

Die Literaturrecherche ergab außerdem, dass bezüglich der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome keine Publikationen existieren, anhand derer die am häufigsten genutzten Nichtnagerspezies Hund und Affe verglichen werden können. Einzig für den Beagle wird eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft beschrieben (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011), die auf einem engen genetischen Hintergrund zu basieren scheint (Ekenstedt et al., 2011).

2. Retrospektive Datenauswertung

Anhand der Literaturrecherche konnte gezeigt werden, dass sowohl allgemeingültige Empfehlungen zur Auswahl des Nichtnagers sowie publizierte Daten zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome in der Literatur fehlen. Daraufhin wurden im nächsten Schritt firmeninterne Daten systematisch retrospektiv aufgearbeitet und ausgewertet. In diesem Zusammenhang ist im Sinne des Tierschutzes die große Bedeutung der retrospektiven Analyse von bereits vorhandenen Daten aus tierexperimentellen Studien zu betonen, um unnötigen Tierverbrauch zu vermeiden (Vries et al., 2014).

2.1 Datenlage

Von den 15 retrospektiv untersuchten Substanzen waren 12 Substanzen in der Maus, 15 Substanzen in der Ratte, 11 Substanzen im Hund und 8 Substanzen im Affen getestet worden (siehe auch Tabelle 8). Es wurden insgesamt Daten von 1308 Mäusen, 7201 Ratten, 868 Hunden und 758 Affen berücksichtigt. Von speziellem Interesse für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit waren die Daten der Nichtnager.

Die analysierten Studien fanden teilweise in den firmeneigenen Laboren, aber auch extern, sowie in den USA als auch in Europa statt. Folgende Studientypen fanden hierbei Berücksichtigung: Studien nach Einmalgabe (*single dose studies*) im Nager und Nichtnager mit einzelnen eskalierenden Dosierungen, erste exploratorische Studien mit wiederholten Applikationen (*repeat dose studies*) von ca. 5-7 Tagen Dauer (Ratte 2-3 Tiere/Geschlecht, Nichtnager 2 Tiere/Geschlecht), Studien von 2-wöchiger Dauer (*dose range finder*) mit größeren Tierzahlen (i.d.R. 5 Tiere/Geschlecht/Gruppe plus 3 Satelliten-Tiere beim Nager bzw. 2-3 Tiere/Geschlecht/Gruppe beim Nichtnager), GLP-Studien von 4 Wochen oder 13 Wochen Dauer mit 10 Tieren/Geschlecht/Gruppe (Nager) oder 3-5 Tiere/Geschlecht/Gruppe (Nichtnager) und Langzeit-GLP-Studien von 6 Monaten im Nager und 9 Monaten im Nichtnager. Diese Studien fanden teilweise mit oder ohne Erholungsphase (*recovery*) nach der eigentlichen Dosierungsphase statt, in der ein Teil der Tiere keine Substanz mehr erhielt, die Tiere aber noch beobachtet wurden, um die Reversibilität aufgetretener Befunde zu evaluieren.

In allen retrospektiv ausgewerteten 15 Substanzen traten neurologische Symptome auf, wobei bei 14 Substanzen die Symptome sowohl im Nager (Maus und/oder Ratte) als

auch im Nichtnager (Hund und/oder Affe) zu beobachten waren. Von 12 getesteten Wirkstoffen in der Maus führten alle diese Substanzen (100%) in dieser Tierart zu neurologischen Effekten. Bei der Ratte waren es dagegen 14 von 15 Substanzen (93,33%), beim Hund 9 von 11 Substanzen (81,81%) und beim Affen 7 von 8 Substanzen (87,5%).

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht in welchen Tierarten die jeweiligen Substanzen getestet wurden und in welchen Fällen neurologische Symptome zu beobachten waren.

Substanz	Maus		Ratte		Hund		Affe	
	getestet	neurologische Symptome	getestet	neurologische Symptome	getestet	neurologische Symptome	getestet	neurologische Symptome
A	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--	Ja	Ja
B	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--	Ja	Ja
C	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--	Ja	Ja
D	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
E	Nein	--	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
F	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein	--
G	Nein	--	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
H	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
I	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
J	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
K	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
L	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
M	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--	Ja	Ja
N	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	--
O	Nein	--	ja	ja	Ja	Nein	Ja	Nein

Tabelle 8: Getestete Tierarten und Auftreten von neurologischen Symptomen bei den 15 analysierten Substanzen: 12 Substanzen wurden in der Maus getestet, 15 in der Ratte, 11 im Hund und 8 im Affe. Bei 12 Substanzen in der Maus, bei 14 Substanzen in der Ratte, bei 9 Substanzen im Hund und bei 7 Substanzen im Affen waren neurologische Symptome zu sehen.

Zwölf Wirkstoffe wurden in der Maus getestet und alle zeigten dort neurologische Symptome. Bei diesen 12 Wirkstoffen traten diese immer in beiden Nagerspezies auf (Mäuse und Ratten), außer bei der Substanz F, bei der die Ratten keine neurologischen Symptome zeigten. Dabei waren die Dosierungen vergleichbar (≥ 1000 mg/kg) und die Dauer der Studien bei den Ratten mit 2-13 Wochen länger als bei der Maus mit 1 Woche. Die höchste Exposition im Blutplasma (C_{\max} total) bei den Mäusen lag durchschnittlich bei 122,6 $\mu\text{g/ml}$ und bei den Ratten sogar höher bei durchschnittlich 294,5 $\mu\text{g/ml}$. Die freie Substanzmenge im Blutplasma (C_{\max} free) konnte nicht verglichen werden, da Daten zur Plasmaproteinbindung für die Maus für diese Substanz nicht vorlagen, so dass

die speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome bei Maus und Ratte nicht abschließend evaluiert werden konnte.

Von speziellem Interesse waren in dieser Arbeit die Nichtnagerdaten: 11 (73,33%) der 15 Substanzen wurden im Hundemodell getestet und 8 (53,33%) im Affenmodell, allerdings lagen nur für 4 (26,66%) der 15 Substanzen sowohl Hundedaten als auch Affendaten vor. Diese Substanzen eigneten sich grundsätzlich für einen direkten Vergleich der beiden Nichtnagerspezies Hund und Affe (siehe Tabelle 9).

Substanz	Anzahl Hunde	Anzahl Affen	Neurologische Symptome
Substanz D (Indikationsgebiet: Kognitive Störungen)	66	114	Auftreten von neurologischen Symptomen in beiden Spezies (22 von 66 Hunden (33,3%) und 64 von 114 (56,14%) Affen)
Substanz H (Indikationsgebiet: Kognitive Störungen)	40	120	Neurologische Symptome im Affen, aber nur ein Hund mit leichten neurologischen Symptomen (Zittern, gesteigerte Aktivität)
Substanz K (Indikationsgebiet: Schizophrenie, Alzheimer)	8	118	Keine Hunde mit neurologischen Symptomen
Substanz O (Indikationsgebiet: Multiple Sklerose)	16	96	Keine neurologischen Symptome in beiden Spezies

Tabelle 9: Auftreten von neurologischen Symptomen bei den Substanzen, für die sowohl Hunde- als auch Affendaten vorlagen: Lediglich für eine Testsubstanz (Substanz D) waren ausreichend Daten zu neurologischen Symptomen in beiden Nichtnagerspezies vorhanden.

Wie in der obigen Tabelle zu erkennen ist, war aber das Auftreten von neurologischen Symptomen nicht bei allen Substanzen in beiden Spezies gleich stark. Lediglich für eine Testsubstanz (Substanz D) waren ausreichend neurologische Symptome in beiden Nichtnagerspezies aufgetreten. Dieser Wirkstoff war für eine retrospektive Analyse und für einen direkten Vergleich der beiden Spezies im Hinblick auf neurologische Symptome daher besonders geeignet und wurde aus diesem Grund separat evaluiert (siehe Ergebnisteil „2.3 Substanz D“).

2.2 Neurologische Symptome

2.2.1 Neurologische Symptome bei allen Spezies (Nager und Nichtnager)

Bei Betrachtung der Gesamtheit der analysierten Studien traten bei den Mäusen, Ratten, Hunden und Affen insgesamt folgende 35 neurologische Symptome auf:

Mortalität⁸, Krämpfe, Ataxie, Tremor, Zuckungen⁹, stärkere reflexartige Zuckungen¹⁰, Kreislaufen, Kriechen, sensorische Ausfallserscheinungen, Sedation, Somnolenz, Koma, Lethargie, reduzierte Reaktivität, reduzierter Muskeltonus, Mydriasis, Miosis, verzögerter/fehlender Aufrichtreflex, Aggressivität, dissoziatives Verhalten, repetitives Verhalten, stereotype Kopfbewegungen, kompulsives Verhalten, Selbsttraumatisierung, gesteigerte Geräuschempfindlichkeit, gesteigerte Berührungsempfindlichkeit, Müdigkeit, Desorientierung, Koordinationsschwierigkeiten, veränderte Körperhaltung (z.B. ausgestreckte Gliedmaßen), Bewegungseinschränkungen der Gliedmaßen, Springanfälle, gesteigerte Aktivität, verminderte Aktivität und Vokalisation.

Sieben Symptome, die hierbei beim Nager, aber nicht beim Nichtnager beobachtet wurden, waren: Somnolenz, Koma, reduzierter Muskeltonus, verzögerter/fehlender Aufrichtreflex, kompulsives Verhalten, gesteigerte Berührungsempfindlichkeit und Springanfälle. Folgende 11 Symptome waren dagegen beim Nichtnager, jedoch nicht beim Nager zu sehen: Zuckungen, sensorische Ausfallserscheinungen, Lethargie, reduzierte Reaktivität, Miosis, Selbsttraumatisierung, dissoziatives Verhalten, repetitives Verhalten, stereotype Kopfbewegungen, Desorientierung und Koordinationsschwierigkeiten.

2.2.2 Neurologische Symptome beim Nichtnager

Insgesamt konnten bei den Nichtnagerspezies Hund und Affe in den Studien der 15 analysierten Substanzen die untenstehenden 28 neurologischen Symptome beobachtet werden. Von diesen 28 Symptomen traten 24 beim Hund und 16 beim Affen auf, 12 Symptome wurden in beiden Tierarten beobachtet.

Die relative Häufigkeit der entsprechenden Symptome bei den einzelnen Tierarten ist in Abhängigkeit von der Höhe der Dosierung zu sehen, da mit steigender Dosierung die

⁸ Ein Sonderfall stellt die Auswertung des Symptoms „Mortalität“ dar. Die Mortalität wurde zunächst mit in die Tabelle aufgenommen, später aber aus dem speziellen Vergleich exkludiert, weil für die Mortalität innerhalb einer Studie unterschiedliche Ursachen möglich sind und z.B. organbedingte Ursachen in der retrospektiven Analyse nicht separat untersucht wurden.

⁹ Beim Übersetzen der Bezeichnungen einiger einzelner Symptome besteht die Problematik, dass die Übersetzung nicht 100% genau ist. Beispielsweise die im Englischen als „jerks“ und „twitching“ bezeichneten Symptome werden im Deutschen jeweils mit „Zuckungen“ übersetzt. Mit „twitching“ sind hierbei Zuckungen gemeint.

¹⁰ „Jerks“ entsprechen stärkeren reflexartigen Zuckungen.

Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von neurologischen Symptomen ebenfalls steigt. Die Verteilung der Tiere auf unterschiedliche Dosisgruppen konnte bei dieser Auswertung nicht weiter analysiert werden, da vor allem bei eskalierenden Studien oft nur 1-2 Tiere verwendet wurden und eine statistische Auswertung wegen der geringen Tierzahlen nicht möglich war.

Symptom	Hund (%)	Affe (%)
Mortalität	4,95	1,99
Krämpfe	5,30	3,56
Ataxie	14,63	1,72
Tremor	16,24	13,72
Mydriasis	1,27	10,29
Repetitives Verhalten	1,61	1,06
Stereotype Kopfbewegungen	0,23	0,14
Müdigkeit	0,69	0,14
Gesteigerte Aktivität	19,35	6,86
Vokalisation	4,49	0,14
Sedation	1,73	0,26
Verminderte Aktivität	4,61	9,76
Gesteigerte Geräuschempfindlichkeit	2,07	--
Reduzierte Reaktivität	1,99	--
Stärkere reflexartige Zuckungen	1,27	--
Kreislaufen	1,50	
Aggressivität	1,04	--
Nervöse Zuckungen	0,92	
Dissoziatives Verhalten	0,23	--
Sensorische Ausfallserscheinungen	0,12	--
Kriechen	0,12	--
Beeinträchtigte Gliedmaßenfunktion	0,12	--
Veränderte Körperhaltung (ausgestreckte Gliedmaßen)	0,12	--
Desorientierung	0,12	--
Miosis	--	0,79
Lethargie	--	0,40
Koordinationsschwierigkeiten	--	0,40
Selbsttraumatisierung	--	0,26

Tabelle 10: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der 15 analysierten Substanzen (n (Hunde) = 868, n (Affen) = 758): Von den 28 Symptomen traten 24 beim Hund und 16 beim Affe auf, 12 Symptome waren in beiden Tierarten beobachtet worden. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Spezies waren teilweise ähnlich (z.B. Tremor, Krämpfe, repetitives Verhalten, stereotype Kopfbewegungen) und teils unterschiedlich (z.B. Ataxie, gesteigerte Aktivität, Vokalisation).

Beim Hund waren deutlich mehr neurologische Symptome zu sehen als beim Affen. Die Symptome, die in beiden Tierarten zu sehen waren, traten in unterschiedlichen Häufigkeiten auf wie z.B. Ataxie (Hund 14,63%, Affe 1,72%), gesteigerte Aktivität (Hund 19,35%, Affe 6,86%) oder Vokalisation (Hund 4,49%, Affe 0,14%). Andere Symptome waren hingegen ähnlich häufig zu sehen wie z.B. Tremor (Hund 16,24%, Affe 13,72%), repetitives Verhalten (Hund 1,61%, Affe 1,06%) oder stereotype Kopfbewegungen (Hund 0,23%, Affe 0,14%).

Das Symptom Krämpfe wurde beim Hund außerdem hinsichtlich einer möglichen Geschlechtsprädisposition betrachtet, da in der Literatur für männliche Tiere eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krampfanfällen beschrieben wird. Bei der vorliegenden Analyse zeigten 23 (5,17%) der 445 männlichen und 23 (5,44%) der 423 weiblichen Tiere Krampfanfälle, somit bestand also kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei substanzinduzierten Krampfanfällen. Auch bei den Affen traten bei 9 (2,37%) der 379 männlichen und bei 11 (2,90%) der 379 weiblichen Tiere Krämpfe auf. Bei den Affen gab es somit ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für das Auftreten von Krämpfen. Keinerlei spontane nicht substanzinduzierte Krämpfe wurden in den ausgewerteten Studien in den Kontrolltieren berichtet.

Die separate Auswertung der 3 Substanzen D, H und K, bei denen Hunde- und Affendaten mit neurologischen Symptomen vorlagen (siehe auch Tabelle 9), ergab, dass insgesamt bei diesen 3 Substanzen die untenstehenden 19 Symptome beobachtet wurden. Von diesen 19 Symptomen traten 14 beim Hund und 11 beim Affen auf. Sechs Symptome waren in beiden Tierarten zu sehen. Hierbei trat wie in der obigen Analyse aller Substanzen „Tremor“ ähnlich häufig auf (Hund 15,54%, Affe 21,02%). Annähernd gleich war in dieser Analyse auch „verminderte Aktivität“ (Hund 4,39%, Affe 6,25%) zu sehen.

Symptom	Hund (%)	Affe (%)
Mortalität	5,26	1,70
Krämpfe	7,89	0,85
Tremor	15,54	21,02
Verminderte Aktivität	4,39	6,25
Mydriasis	5,26	13,35
Vokalisation	0,88	0,28
Gesteigerte Geräuschempfindlichkeit	12,28	--
Aggressivität	6,14	--

Gesteigerte Aktivität	5,26	--
Müdigkeit	4,39	--
Ataxie	2,63	--
Dissoziatives Verhalten	0,88	--
Desorientierung	0,88	--
Stärkere reflexartige Zuckungen	0,88	--
Repetitives Verhalten	--	2,27
Miosis	--	1,70
Lethargie	--	0,85
Koordinationsschwierigkeiten	--	0,85
Selbsttraumatisierung	--	0,57

Tabelle 11: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der Substanzen D, H und K (n (Hunde) =114, n (Affen) = 352): Von den 19 Symptomen traten 14 beim Hund und 11 beim Affen auf, 6 Symptome waren in beiden Tierarten beobachtet worden. Die relativen Häufigkeiten in den einzelnen Spezies waren teilweise ähnlich (z.B. Tremor, verminderte Aktivität) und teils unterschiedlich (z.B. Krämpfe).

2.3 Substanz D

Für eine der retrospektiv analysierten Substanzen (Substanz D) aus dem Indikationsgebiet „kognitive Störungen“ lagen besonders viele Daten zu neurologischen Effekten in beiden Tierarten sowie pharmakokinetische Daten für einen direkten Vergleich der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome von Hunden und Affen vor. Zweiundzwanzig der 66 Hunde (33,3%) und 64 der 114 Affen (56,14%) zeigten Symptome nach Behandlung mit Substanz D.

2.3.1 Neurologische Symptome beim Nichtnager (Substanz D)

Insgesamt konnten bei der Substanz D die untenstehenden 17 Symptome beobachtet werden. Von diesen 17 Symptomen traten 14 beim Hund und 9 beim Affen auf. Sechs Symptome waren in beiden Tierarten zu sehen.

Symptom	Hund (%)	Affe (%)
Mortalität	9,09	1,75
Krämpfe	12,12	1,75
Tremor	19,70	18,42
Verminderte Aktivität	6,06	3,51
Mydriasis	9,09	18,42
Vokalisation	1,52	0,88
Gesteigerte Geräuschempfindlichkeit	21,21	--
Aggressivität	10,61	--
Gesteigerte Aktivität	9,09	--
Müdigkeit	7,58	--
Ataxie	4,55	--
Dissoziatives Verhalten	1,52	--

Desorientierung	1,52	--
Stärkere reflexartige Zuckungen	1,52	--
Repetitives Verhalten	--	3,51
Koordinationsschwierigkeiten	--	2,63
Selbsttraumatisierung	--	1,75

Tabelle 12: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der Substanz D (n (Hunde) = 66, n (Affen) = 114): Von den 17 Symptomen traten 14 beim Hund und 9 beim Affen auf, 6 Symptome waren in beiden Tierarten beobachtet worden. Die relativen Häufigkeiten in den einzelnen Spezies waren teilweise ähnlich (z.B. Tremor) und teils unterschiedlich (z.B. Krämpfe).

Auch hier war Tremor auffallend ähnlich häufig im Vergleich der beiden Spezies aufgetreten (Hund 19,70%, Affe 18,42%).

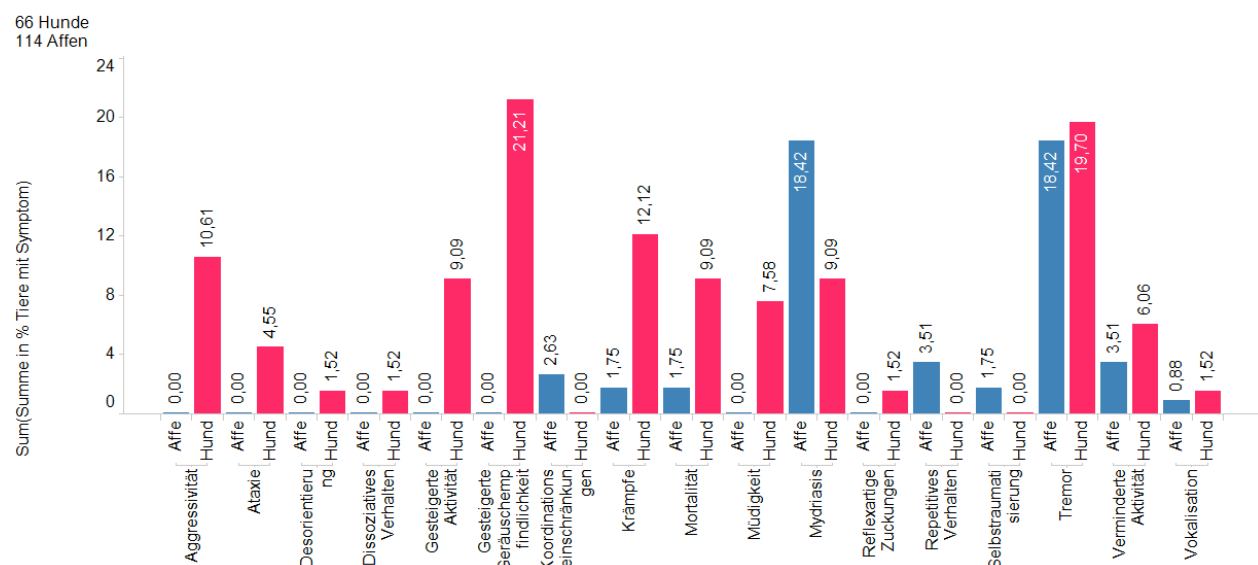


Abbildung 2: Übersicht über die relative Häufigkeit des Auftretens von neurologischen Symptomen bei den Nichtnagerspezies Hund und Affe für die Substanz D: Von den 17 Symptomen traten 14 beim Hund und 9 beim Affen auf, 6 Symptome waren in beiden Tierarten beobachtet worden. Deutlich zeigt sich bei „Tremor“ die ähnliche relative Häufigkeit in beiden Spezies.

2.3.2 Neurologische Symptome in Relation zum Blutplasmaspiegel

Um die speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome zu evaluieren wurden gezielt die Blutplasmaspiegel der Substanzen bei den Tierarten verglichen. Die Gehirngängigkeit der Wirkstoffe konnte bei dieser Analyse nicht weiter berücksichtigt werden, da Daten hierzu meistens im Nager bestimmt werden und daher belastbare Werte für eine Analyse im Nichtnager nicht vorlagen.

Wie im „Material und Methoden“-Abschnitt beschrieben gestaltete sich die Tatsache schwierig, dass in den vorliegenden Datensätzen der toxikologischen Studien zwar i.d.R. für jedes Tier der entsprechend maximale Blutplasmaspiegel der Testsubstanz (C_{\max}

total), der im Rahmen der Studie bei diesem Tier auftrat, dokumentiert ist, dies aber nicht immer dem tatsächlichen Blutspiegel entsprach, der genau zum Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms vorlag. Dies liegt daran, dass in toxikologischen Studien die Blutproben für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter zu festgelegten Zeitpunkten genommen werden. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, wurde für die Einzeltiere deshalb immer der Wert (C_{\max} total und AUC) in der Auswertung berücksichtigt, der zeitlich am nächsten am Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms lag.

Als empfindlichere Spezies wurde im Rahmen dieser Arbeit die Spezies definiert, bei der im Vergleich zur anderen Spezies bei einer niedrigeren Blutplasmakonzentration des Wirkstoffes bereits neurologische Symptome zu beobachten waren. Ein relevanter Unterschied zwischen den Blutplasmakonzentrationen bestand, wenn sich die Werte mindestens in einem intern definierten Faktor von 2 unterschieden.

Die genaue Analyse der Substanz D umfasste folgende Schritte: Zunächst wurden alle aufgetretenen neurologischen Symptome berücksichtigt, im weiteren Verlauf wurden gezielt jeweils die Symptome Krämpfe und Tremor und die entsprechenden Blutplasmaspiegel der beiden Tierarten verglichen.

*Die Wirkstoffkonzentration in Relation zu **allen** aufgetretenen neurologischen Symptomen*

Der errechnete durchschnittliche Median für den totalen maximal aufgetretenen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) aller Tiere mit neurologischen Symptomen war bei den Affen mit einem Wert von 0,538 µg/ml leicht höher als bei den Hunden mit 0,440 µg/ml. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindungsfähigkeit (Hund 37,8% und Affe 21% freie Fraktion) betrug die freie Wirkstoffkonzentration im Blutplasma (C_{\max} free) der Affen 0,113 µg/ml und die der Hunde 0,166 µg/ml (siehe Abbildung 3), war also mit einer Differenz von 0,053 µg/ml leicht niedriger im Affen als im Hund. Insgesamt sind die Unterschiede gering zwischen den beiden Spezies.

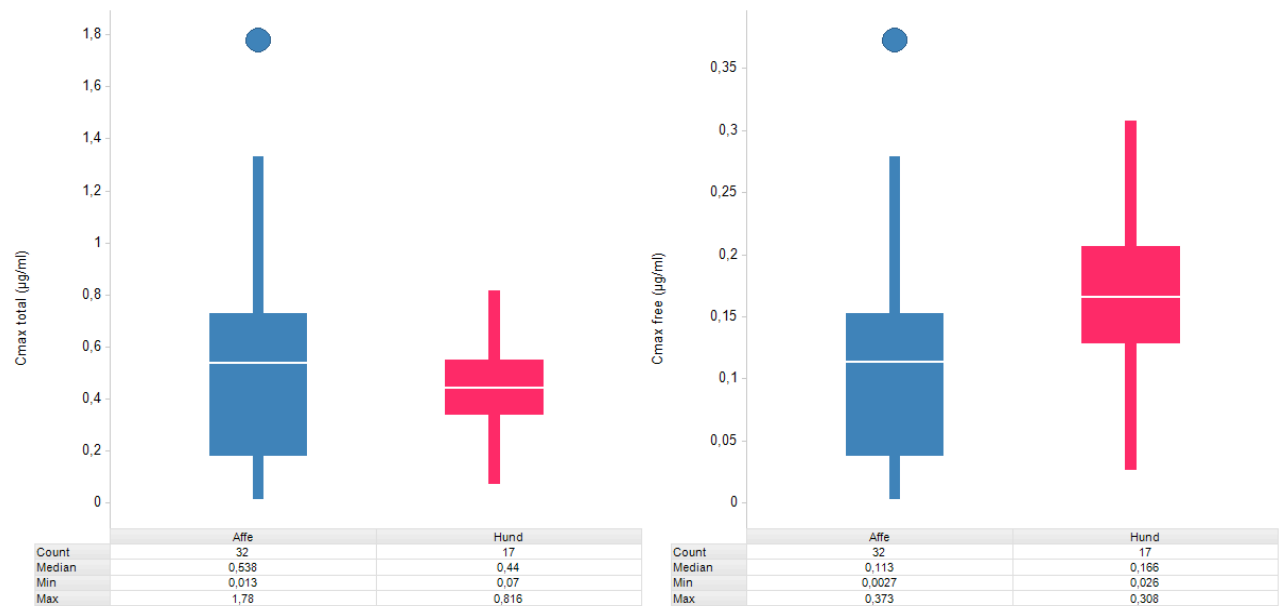


Abbildung 3: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit neurologischen Symptomen für die Substanz D (n (Hunde) = 17, n (Affen) = 32): Im Fall von C_{\max} total war der Wert der Hunde geringgradig niedriger als der der Affen. Bei der Betrachtung von C_{\max} free war dies umgekehrt. Bei den Affen konnte ein Ausreißer mit einem deutlich höheren Wert identifiziert werden.

Aus Gründen einer besseren Übersicht und dem gezielten Vergleich einzelner neurologischer Symptome der Hunde und Affen und deren Blutplasmaspiegel wurden diese im Spiderplot dargestellt, einmal für C_{\max} total und einmal für C_{\max} free (siehe Abb. 4 und 5).

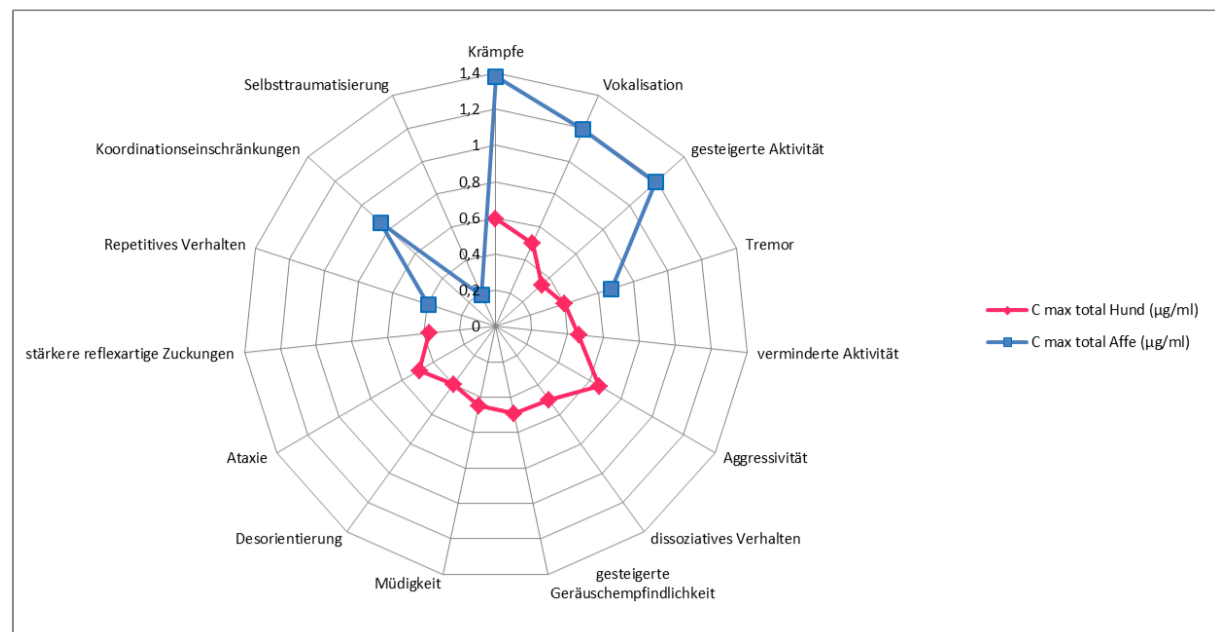


Abbildung 4: Vergleich der aufgetretenen neurologischen Symptome bei Hunden und Affen in Relation zum totalen maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) für die Substanz D im Spiderplot: Die Werte der Hunde waren in der Größenordnung von 0,22 bis 0,79 $\mu\text{g/ml}$ niedriger als die Werte der Affen, dadurch schien der Hund zunächst empfindlicher zu sein, bis auf das Symptom „Selbsttraumatisierung“, welches das neurologische Symptom war, das bei der niedrigsten erreichten Blutplasmakonzentration von beiden Tierarten nur beim Affen auftrat.

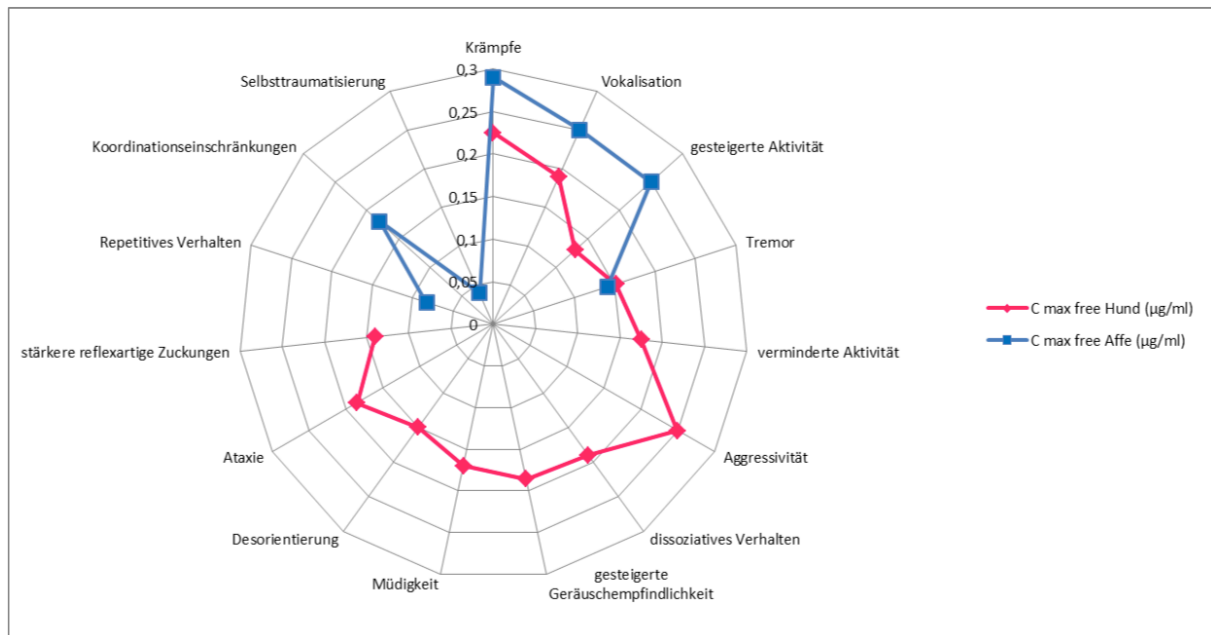


Abbildung 5: Vergleich der aufgetretenen neurologischen Symptome bei Hunden und Affen in Relation zum freien maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} free) für die Substanz D im Spiderplot: Die Differenzen der Blutplasmaspiegel der beiden Tierarten sind nur noch in der Größenordnung von bis zu 0,12 µg/ml. Hunde und Affen zeigen eine ähnliche Empfindlichkeit, bis auf das Symptom „Selbsttraumatisierung“, welches das neurologische Symptom war, das bei der niedrigsten erreichten Blutplasmakonzentration von beiden Tierarten nur beim Affen auftrat.

Bei der Darstellung der Symptome¹¹ „Krämpfe“, „Vokalisation“, „verminderte Aktivität“ und „Tremor“ der Substanz D im Spiderplot (siehe Abbildung 4) scheinen bei Betrachtung des totalen maximalen Blutplasmaspiegels (C_{\max} total) die Hunde mit Unterschieden in der Größenordnung von 0,22 bis 0,79 µg/ml gegenüber den Werten der Affen empfindlicher zu sein. Die Werte der Hunde variierten hierbei von 0,344 bis 0,595 µg/ml und die der Affen von 0,672 bis 1,381 µg/ml, außer das Symptom „Selbsttraumatisierung“ beim Affen, das bei einem Wert von 0,19 µg/ml auftrat.

Bei Betrachtung der Symptome in Relation zur freien Konzentration im Blutplasma (C_{\max} free) (siehe Abbildung 5) dagegen liegen die Blutplasmaspiegel der beiden Tierarten jedoch weniger auseinander (maximale Differenz 0,12 µg/ml). Die Werte der Hunde

¹¹ Von den 6 Symptomen, die bei der Substanz D sowohl beim Hund als auch beim Affe auftraten (verminderte Aktivität, Krämpfe, Mortalität, Mydriasis, Tremor, Vokalisation) wurde das Symptom „Mortalität“ in der Darstellung nicht berücksichtigt, weil die Mortalität innerhalb einer Studie unterschiedliche Ursachen haben kann und Organtoxizitäten nicht mit berücksichtigt wurden.

Das Symptom „Mydriasis“ wurde zwar gezählt, aber für die weitere Auswertung ebenfalls nicht weiter analysiert, da es aufgrund des größeren Platzangebotes der Hunde (und somit einem größeren Abstand zum Beobachter) gegenüber den Affen bei den Hunden evtl. nicht immer gesehen wurde, was die Inzidenz verfälschen würde und somit kein geeigneter Parameter für einen direkten Vergleich darstellte und auch in ophthalmologischen Untersuchungen separat bewertet wird.

variieren hierbei von 0,152 bis 0,225 µg/ml und die der Affen von 0,141 bis 0,290 µg/ml. Im Falle des Symptoms „Tremor“ waren für diesen Fall die Werte sogar annähernd gleich (Hunde 0,152 µg/ml und Affen 0,141 µg/ml). Wie im Spiderplot klar zu erkennen ist, besteht im Falle von C_{\max} free somit kein großer Unterschied bezüglich der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome (Krämpfe, Tremor, gesteigerte Aktivität, Vokalisation, Ataxie/Koordinationsschwierigkeiten) zwischen den beiden Tierarten.

Die Wirkstoffkonzentration in Relation zum Symptom „Krämpfe“

Krämpfe stellen eins der stärksten neurologischen Symptome dar, die in toxikologischen Studien zu beobachten sind. Sie werden aus diesem Grund auch oft für die Definition von humanen Endpunkten, zur Bestimmung der maximal tolerierten Dosis (MTD) und zur Sicherheitsbewertung der einzelnen Testsubstanzen berücksichtigt, was die Betrachtung dieses Symptoms besonders wichtig macht. Außerdem sind substanz-induzierte Krämpfe eine schwerwiegende, potenziell lebensbedrohliche unerwünschte Arzneimittelwirkung, die dazu führen kann, dass Substanzen nicht weiterentwickelt oder vom Markt zurückgezogen werden (Easter et al., 2009).

In den Studien der Substanz D zeigten 8 der 66 Hunde (12,12%) und 2 der 114 Affen (1,75%) jeweils einen Krampfanfall. Errechnet man den durchschnittlichen Median für den maximal aufgetretenen totalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) der Tiere mit Krampfanfällen, so zeigten die Affen einen höheren Median von 1,31 µg/ml als die Hunde mit 0,487 µg/ml. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindung (Hund 37,8% und Affe 21% freie Fraktion) betrug die freie Konzentration im Blutplasma (C_{\max} free) der Affen mit Krämpfen durchschnittlich 0,275 µg/ml. Diese war damit immer noch geringgradig höher als der Wert der Hunde mit Krämpfen mit 0,184 µg/ml, jedoch war der Unterschied nicht mehr so groß.

Einzeltierdaten hierzu sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Der Median ist in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Ein direkter graphischer Vergleich der Einzeltiere und ihrer Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) ist in den Abbildungen 7 und 8 veranschaulicht. Im Fall von C_{\max} total schienen die Hunde deutlich empfindlicher als die Affen, alle Werte der Hunde liegen unter dem niedrigsten Wert der Affen. Bei der Betrachtung von C_{\max} free war der Unterschied nicht mehr so groß. Fünf der acht Werte der Hunde liegen in

etwa auf Höhe oder höher als der niedrigere Wert der Affen. Insgesamt bestand eine hohe Variabilität zwischen den Einzeltieren.



Abbildung 6: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit Krämpfen für die Substanz D (n (Hunde) = 8, n (Affen) = 2): Im Fall von C_{\max} total waren die Hunde deutlich empfindlicher als die Affen. Bei der Betrachtung von C_{\max} free war der Unterschied nicht mehr so groß.

Tier	C_{\max} total (µg/ml)	Plasmaproteinbindung (% fup)	C_{\max} free (µg/ml)	AUC (ml*hr/ml)
Hund 1	0,259	37,80	0,098	2,89
Hund 2	0,548	37,80	0,207	3,50
Hund 3	0,418	37,80	0,158	6,18
Hund 4	0,673	37,80	0,254	7,13
Hund 5	0,511	37,80	0,193	5,67
Hund 6	0,464	37,80	0,175	4,65
Hund 7	0,305	37,80	0,115	2,15
Hund 8	0,630	37,80	0,238	11,30
Affe 1	1,780	21,00	0,373	29,15
Affe 2	0,839	21,00	0,176	15,60

Tabelle 13: Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free), AUC und Plasmaproteinbindung der Einzeltiere mit Krämpfen für die Substanz D: Es bestand eine hohe individuelle Variabilität.

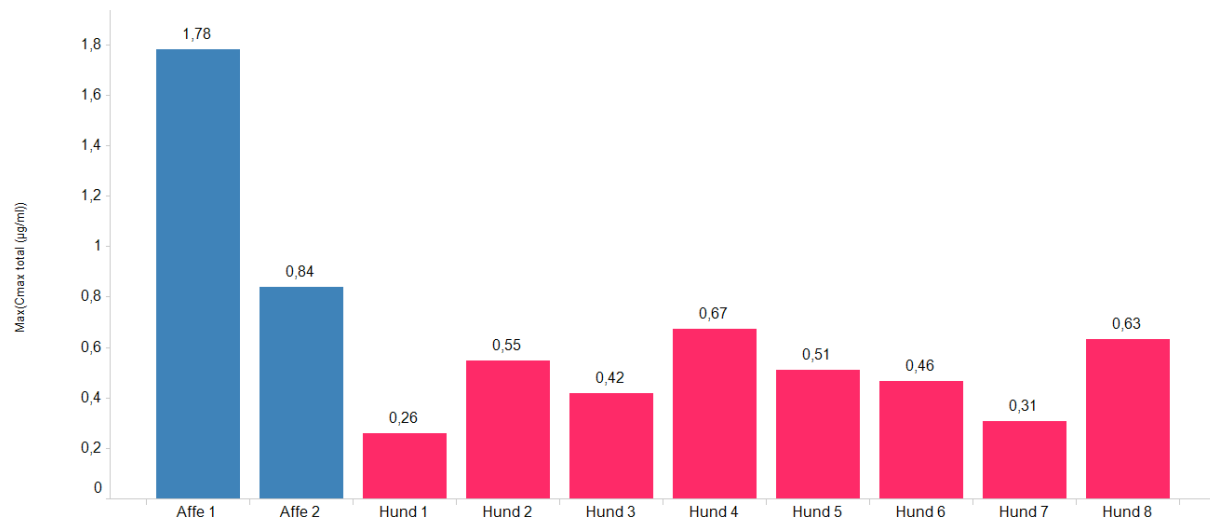


Abbildung 7: Vergleich der totalen maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) der Einzeltiere mit Krämpfen (Substanz D): Es bestand eine hohe individuelle Variabilität.

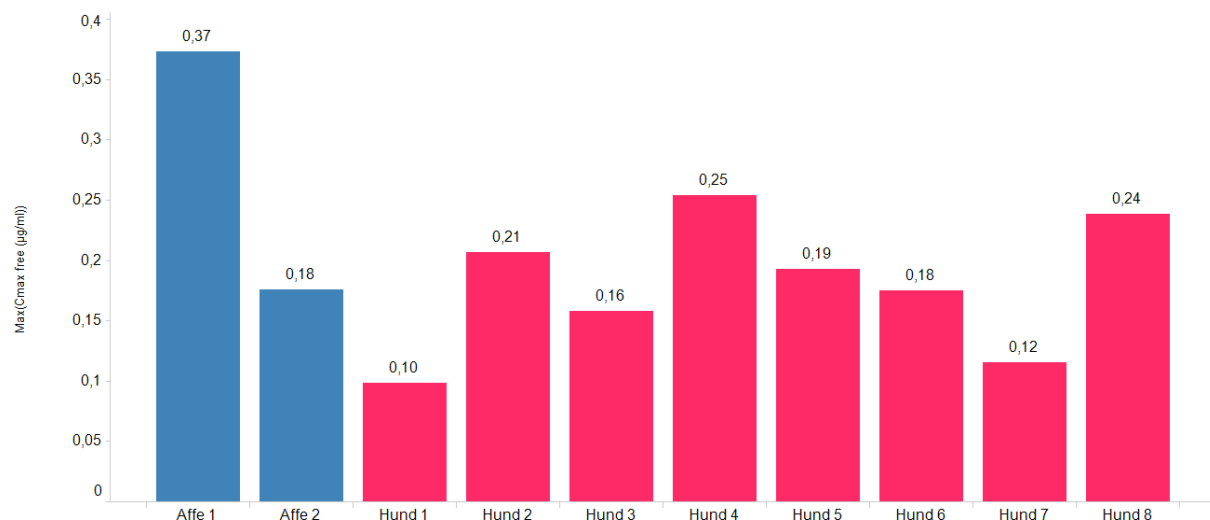


Abbildung 8: Vergleich der freien maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} free) der Einzeltiere mit Krämpfen (Substanz D): Es bestand eine hohe individuelle Variabilität.

Bei den Einzeltierdaten ist deutlich die individuelle Variabilität zu erkennen. Mögliche Gründe hierfür und Lösungsansätze werden in der Diskussion der Arbeit erläutert.

Die Wirkstoffkonzentration in Relation zum Symptom „Tremor“

Tremor stellt ein weiteres wichtiges und ebenfalls starkes neurologisches Symptom für die Bewertung von neurologischen Nebenwirkungen in der Arzneimittelentwicklung dar. Dieses Symptom ist wie im Fall von Krämpfen sowohl bei Affen als auch bei Hunden gut zu beobachten. Es trat in etwa gleichhäufig auf. In den Studien der Substanz D war Tremor in beiden Nichtnagerspezies mit 13 von 66 Hunden (19,70%) und 21 von 114

Affen (18,42%) außerdem eins der am häufigsten aufgetretenen neurologischen Symptome. Es ist somit gut für einen direkten Vergleich geeignet.

Beim Errechnen der durchschnittlichen Mediane des totalen maximal aufgetretenen Blutplasmaspiegels (C_{\max} total) aller Tiere mit Tremor zeigten die Affen mit $0,539 \mu\text{g/ml}$ keinen signifikanten Unterschied zu dem Wert der Hunde mit $0,418 \mu\text{g/ml}$. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindungsfähigkeit (Hund 37,8%, Affe 21% freie Fraktion) betrug die freie Substanzkonzentration im Blutplasma (C_{\max} free) der Affen mit Tremor durchschnittlich $0,113 \mu\text{g/ml}$ und war damit geringgradig niedriger als die der Hunde mit einem Wert von $0,158 \mu\text{g/ml}$, somit unterschieden sich auch in diesem Fall die Blutwerte nicht signifikant (siehe Abbildung 9 und Tabelle 14).

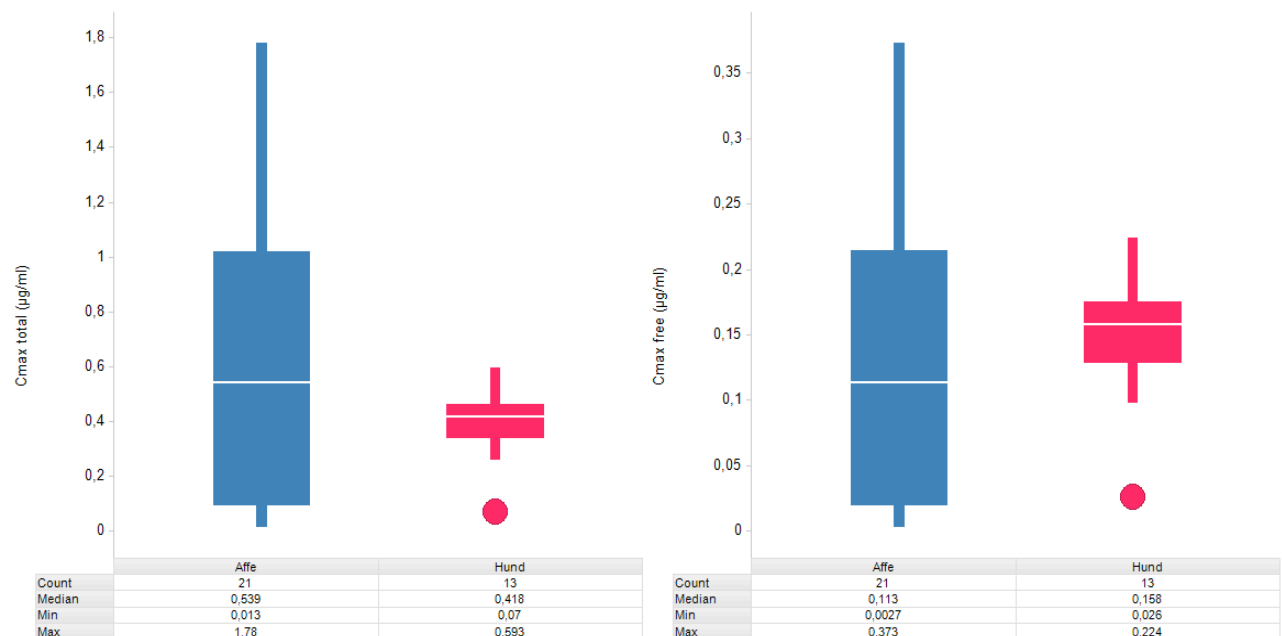


Abbildung 9: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit Tremor (Substanz D) (n (Hunde) = 13, n (Affen) = 21): Im Fall von C_{\max} total waren die Werte der Hunde geringgradig niedriger als die der Affen. Bei der Betrachtung von C_{\max} free war dies umgekehrt. Bei den Hunden konnte ein Ausreißer mit einem deutlich niedrigeren Wert identifiziert werden.

Tier	C_{\max} total ($\mu\text{g/ml}$)	Plasmaproteinbindung (% fup)	C_{\max} free ($\mu\text{g/ml}$)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$)
Hund 1	0,259	37,80	0,098	2,89
Hund 2	0,548	37,80	0,207	3,50
Hund 3	0,418	37,80	0,158	6,18
Hund 5	0,511	37,80	0,193	5,67
Hund 6	0,464	37,80	0,175	4,65
Hund 9	0,396	37,80	0,149	4,60
Hund 10	0,070	37,80	0,026	0,67
Hund 11	0,337	37,80	0,128	2,59
Hund 12	0,270	37,80	0,102	2,50
Hund 13	0,440	37,80	0,166	4,64

Hund 14	0,443	37,80	0,167	3,34
Hund 15	0,408	37,80	0,154	2,95
Hund 16	0,593	37,80	0,224	3,33
Affe 2	1,780	21,00	0,373	29,15
Affe 3	1,280	21,00	0,269	19,47
Affe 4	1,140	21,00	0,239	20,65
Affe 5	0,039	21,00	0,008	0,46
Affe 6	0,351	21,00	0,074	3,37
Affe 7	1,330	21,00	0,279	17,60
Affe 8	0,648	21,00	0,136	13,00
Affe 9	0,618	21,00	0,129	11,90
Affe 10	0,806	21,00	0,169	14,90
Affe 11	0,839	21,00	0,214	15,60
Affe 12	0,539	21,00	0,113	10,10
Affe 13	0,013	21,00	0,003	0,24
Affe 14	0,032	21,00	0,007	0,47
Affe 15	0,069	21,00	0,014	0,63
Affe 16	0,093	21,00	0,011	0,82
Affe 17	0,278	21,00	0,058	1,95
Affe 18	0,090	21,00	0,019	0,99
Affe 19	0,362	21,00	0,076	3,91
Affe 20	1,190	21,00	0,241	16,1
Affe 21	0,659	21,00	0,138	12,00
Affe 22	0,475	21,00	0,096	7,80

Tabelle 14: Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free), AUC und Plasmaproteinbindung der Einzeltiere mit Tremor für die Substanz D: Es bestand eine hohe individuelle Variabilität.

3. Plasmaproteinbindungsdaten

Im Laufe des Projekts kristallisierte sich klar die große Bedeutung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindungsfähigkeit bei den einzelnen Tierarten heraus, da die Berücksichtigung dieser im Hinblick auf die Interpretation zur Empfindlichkeit für neurologische Symptome deutliche Unterschiede bedingte.

Für die 15 untersuchten Substanzen lagen Plasmaproteinbindungsdaten für den Hund, den Affen und den Mensch in fast allen Fällen vor. Sie waren bei manchen Substanzen speziesübergreifend ähnlich (z.B. Substanz N) bei anderen Substanzen aber auch sehr unterschiedlich (z.B. Substanz E und J) (siehe Tabelle 15).

Substanz	Wirkmechanismus	Plasmaproteinbindung % fup		
		Hund	Affe	Mensch
Substanz A	I	67,30	59,80	53,00
Substanz B	I	88,00	87,00	86,00
Substanz C	II	36,00	---	13,00
Substanz D	III	37,80	21,00	35,50
Substanz E	IV	30,00	1,20	2,10
Substanz F	V	10,00	2,00	4,00

Substanz G	IV	30,00	5,00	8,00
Substanz H	I	26,50	33,90	33,00
Substanz I	III	85,80	---	77,20
Substanz J	III	33,30	37,30	3,23
Substanz K	III	44,70	43,30	36,80
Substanz L	IV	0,39	---	0,21
Substanz M	III	26,60	15,50	15,60
Substanz N	VII	51,60	40,84	52,60
Substanz O	IX	0,08	0,18	0,05

Tabelle 15: Wirkmechanismen und Plasmaproteinbindungsdaten der 15 analysierten Substanzen für Hund, Affe und Mensch: Die Plasmaproteinbindung war bei manchen Substanzen speziessübergreifend ähnlich (z.B. Substanz N) bei manchen Substanzen aber auch sehr unterschiedlich (z.B. Substanz E und J).

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Literaturrecherche

Der Vergleich der einzelnen Tierarten in der Literatur ergab, dass nicht allgemeingültig gesagt werden kann, welche Tierart am besten geeignet ist, sondern dass die Auswahl der geeigneten Nichtnagerspezies auf vielen verschiedenen Faktoren wie beispielsweise gesetzlichen Voraussetzungen, ethischen Aspekten, wissenschaftlichen Anforderungen, Überlegungen zur Tierhaltung und technischen Aspekten beruht, die im Einzelfall betrachtet werden müssen (Gad, 1990) (ICH Guideline S7A, 2000) (Smith et al., 2001) (Smith & Trennery, 2002) (Guidance for Industry, FDA, 2005) (Chapman et al., 2007) (EMA Guideline 28367/07, 2007) (Bussiére, 2008) (ICH Guideline M3(R2), 2009) (ICH Guideline S9, 2009) (EMA Guideline 1042:99, 2010) (Chapman et al., 2010) (EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010) (Tierschutzgesetz, 2010) (Webster et al., 2010) (ICH Guideline S6(R1), 2011) (Hasiwa & Bailey, 2011) (Porsolt, 2012) (Faqi, 2012) (Phillips et al., 2014).

Bezüglich der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome existieren keine Publikationen, anhand derer die am häufigsten genutzten Nichtnagerspezies Hund und Affe direkt verglichen werden können. Einzig für den Beagle wird eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft beschrieben (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011). Insgesamt wird bezogen auf neurologische Effekte eine generelle nicht-spezifische (Igarashi et al., 1995), moderate (Owens, 1962) (Fletcher, 1978) bis adäquate (Schein, 1970) Korrelation neurologischer Symptome zwischen Tierdaten und dem Mensch angenommen. Hierbei hatten Daten vom Nichtnager einen höheren prädiktiven Wert als Nagerdaten (Olson et al., 2000).

Datenlage

Fünfzehn Substanzen aus dem Bereich Neurowissenschaften mit neurologischen Symptomen in toxikologischen Studien in verschiedenen Spezies konnten ausgewertet werden. Damit wurde eine zugängliche Datenbasis geschaffen für eine gute retrospektive Analyse im Sinne des Tierschutzes. Die vorhandene Datenbasis erwies sich allerdings hinsichtlich der Fragestellung eines direkten Speziesvergleichs als eingeschränkt geeignet. Für nur eine Substanz standen ausreichend Daten für einen direkten Vergleich zwischen Hund und Affe zur Verfügung. Weitere kritische Punkte waren außerdem zum einen, dass die pharmakokinetischen Daten der Einzeltiere zum Teil erst zum Studienende bestimmt wurden und nicht zum Zeitpunkt des Auftretens der Symptome. Auch die Tatsache, dass die Beobachtung der Tiere in den toxikologischen Studien zu festgelegten Zeitpunkten und nicht kontinuierlich erfolgt, ist für die Beurteilung von Häufigkeit und Dauer von Symptomen kritisch zu betrachten. Für die retrospektiv analysierten Daten (orale Applikation) bestand zwischen den Einzeltieren eine hohe individuelle Variabilität der Blutplasmaspiegel bei den einzelnen Tieren.

Neurologische Symptome

Die retrospektive Analyse der neurologischen Symptome ergab, dass beim Hund deutlich mehr unterschiedliche neurologische Symptome in toxikologischen Studien zu sehen waren als beim Affen. Die Symptome, die in beiden Tierarten zu sehen waren, traten in unterschiedlichen Häufigkeiten wie z.B. Ataxie (Hund 14,63%, Affe 1,72%), gesteigerte Aktivität (Hund 19,35%, Affe 6,86%) oder Vokalisation (Hund 4,49%, Affe 0,14%) auf, manche konnten aber auch ähnlich häufig beobachtet werden wie z.B. Tremor (Hund 16,24%, Affe 13,72%), repetitives Verhalten (Hund 1,61%, Affe 1,06%) oder stereotype Kopfbewegungen (Hund 0,23%, Affe 0,14%). Für das Symptom „Krämpfe“ konnte in beiden Tierarten keine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zur Literatur, wo bei Hunden eine vermehrte Krampfanfälligkeit bei männlichen Tieren beschrieben wird (Bielfelt et al., 1971). In den Kontrolltieren traten während den Studien keine spontanen nicht-substanzabhängigen Krampfanfälle auf.

Empfindlichere Spezies

In der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Blutplasmakonzentrationen (C_{\max} total und C_{\max} free) und ihre Standardabweichung (SD) der Hunde und Affen bezogen auf die bei der Auswertung berücksichtigten Symptomgruppen oder Symptome der Substanz zusammengefasst, die die beste Datenlage für einen direkten Vergleich bot (Substanz D).

Substanz D	Durchschnittliche Blutplasmakonzentration			
	C_{\max} total ($\mu\text{g/ml}$)		C_{\max} free ($\mu\text{g/ml}$)	
	Hund	Affe	Hund	Affe
Alle neurologischen Symptome	0,440 (SD 0,18)	0,538 (SD 0,45)	0,166 (SD 0,07)	0,113 (SD 0,09)
Krampfanfälle	0,487 (SD 0,15)	1,310 (SD 0,67)	0,184 (SD 0,06)	0,275 (SD 0,14)
Tremor	0,418 (SD 0,14)	0,539 (SD 0,51)	0,158 (SD 0,05)	0,113 (SD 0,11)

Tabelle 16: Durchschnittliche Blutplasmakonzentration der Testsubstanz D bei Hunden und Affen bezogen auf verschiedene Symptomgruppen/Symptome: Bei Betrachtung von C_{\max} total waren in den meisten Fällen die Werte der Hunde niedriger als die der Affen, bei Betrachtung von C_{\max} free bestand zwischen beiden Tierarten kein großer Unterschied.

Die folgende Tabelle gibt zudem eine Übersicht in welchen Fällen welche Tierart (Hund oder Affe) die empfindlichere Spezies für neurologische Symptome darstellte und ob der Unterschied zur jeweils anderen Spezies deutlich ($> \text{Faktor } 2$) oder geringgradig ($< \text{Faktor } 2$) war. Hierzu wurde zuvor definiert, dass ein relevanter Unterschied zwischen den Blutplasmakonzentrationen bestand, wenn sich die Werte mindestens um einem intern festgelegten Faktor von 2 unterschieden. Als empfindlichere Spezies wurde die Spezies definiert, bei der im Vergleich zur anderen Spezies bei einer niedrigeren Blutplasmakonzentration des Wirkstoffes bereits neurologische Symptome zu beobachten waren.

Substanz D	Empfindlichere Spezies	
	C_{\max} total	C_{\max} free
Alle neurol. Symptome	Hund (geringgradig, <2)	Affe (geringgradig, <2)
Krampfanfälle	Hund (deutlich, >2)	Hund (geringgradig, <2)
Tremor	Hund (geringgradig, <2)	Affe (geringgradig, <2)

Tabelle 17: Übersicht über die jeweils empfindlichere Spezies für neurologische Symptome bei der Substanz D: Bei Betrachtung von C_{\max} total schien in den meisten Fällen der Hund empfindlicher zu sein, bei Betrachtung von C_{\max} free bestand zwischen beiden Tierarten kein großer Unterschied.

Zusammenfassend für die retrospektive Datenanalyse der Substanz D kann gesagt werden, dass bei Betrachtung des totalen maximalen Blutplasmaspiegels (C_{\max} total) die Hunde beim Auftreten der neurologischen Symptome/Symptomgruppen geringgradig bis deutlich niedrigere Blutplasmakonzentrationen der Substanz aufwiesen als die Affen. Somit schien der Hund zunächst empfindlicher zu sein. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindung und den damit errechneten Werten der freien Wirkstoffkonzentration (C_{\max} free) zeigten Hunde und Affen jedoch ähnliche Werte. Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist somit, dass unter den Bedingungen der analysierten Substanz bezogen auf die speziesspezifische Sensitivität für neurologische Symptome zwischen Hunden und Affen kein signifikanter Unterschied bestand.

Variabilität der Daten

Für die retrospektiv analysierten Daten bestand zwischen den Einzeltieren eine hohe individuelle Variabilität der Blutplasmaspiegel und damit ein großer Abstand zwischen minimalen und maximalen Werten. Dies liegt neben individuellen kinetischen Absorptionsgeschwindigkeiten auch daran, dass in toxikologischen Studien die Blutproben für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter zu festgelegten Zeitpunkten genommen werden und nicht genau zum Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms. Dies wird im Diskussionsteil der Arbeit näher ausgeführt. Um diesem Ergebnis der Arbeit in Zukunft besser Rechnung zu tragen, wurde daher in die Standardprüfpläne aufgenommen, dass beim Auftreten von Symptomen zusätzliche Blutproben genommen werden sollen.

Plasmaproteinbindung

Eine im Rahmen der Datenauswertung wichtige Erkenntnis ist außerdem, dass für einen möglichst realen Vergleich der Blutplasmaspiegel bei den Tieren während dem Auftreten neurologischer Symptome die Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindungsfähigkeit eine herausragende Bedeutung hat und somit die C_{\max} free der C_{\max} total überlegen ist.

V. Diskussion

Für neurologische und neurodegenerative Erkrankungen besteht ein ständig wachsender Bedarf an wirksamen Medikamenten, da für solche Krankheiten nur wenige geeignete Behandlungsmöglichkeiten existieren (Jiang et al., 2015) und beispielsweise Alzheimer immer noch als unheilbar gilt (Salomone et al., 2012). Gleichzeitig investieren jedoch immer weniger Firmen aufgrund der schwierigen und langwierigen Entwicklung in den Forschungsbereich der Neurowissenschaften (Coleman & Barrow, 2012).

Um im Rahmen der Arzneimittelentwicklung die Sicherheit der Probanden in den klinischen Studien zu gewährleisten, wird bei der Wahl des Nichtnagers gesetzlich die Verwendung der empfindlichsten Spezies gefordert (*Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (FDA, 2005)). Im Bereich der Neurowissenschaften liegt einer der Schwerpunkte speziell auf der Bewertung von neurologischen Symptomen, da hier Arzneimittel entwickelt werden, die neurologische Symptome (z.B. bei Alzheimer, Multiple Sklerose, Parkinson) behandeln sollen. Bei diesen ist auch mit Nebenwirkungen neurologischer Art bei Mensch und Tier zu rechnen.

Für den Beagle wird eine erhöhte spontane Krampfbereitschaft beschrieben (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011). Aus diesem Grund könnte man annehmen, dass der Hund die empfindlichste Spezies für neurologische Effekte ist. Publierte gezielte Analysen, systematische Aufarbeitung von firmeninternen toxikologischen Studien zum Erkennen, Bewerten und Vergleichen von neurologischen Symptomen bei den einzelnen Tierarten, speziell beim Nichtnager, fehlen allerdings bisher und sollten mit dieser Arbeit adressiert werden.

1. Speziespezifische Prädisposition für neurologische Symptome

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht speziespezifische Prädispositionen, wie die oben erwähnte Krampfneigung des Hundes (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011), in der Literatur für die einzelnen Tierspezies zu evaluieren. In Hinblick auf einen Vergleich und eine Bewertung der neu erlangten Erkenntnisse mit bereits existierenden Daten in der

Literatur konnte anhand der Literaturübersicht der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Veröffentlichungen zur neurologischen Sensitivität der einzelnen Tierarten keinen direkten Vergleich erlauben. Die meisten dieser Publikationen beschreiben ein generell höheres Auftreten von spontanen Krampfanfällen bei Beaglen, ohne dies genauer zu spezifizieren oder zu begründen (Redman & Weir, 1969) (Edmonds et al., 1979) (Hasiwa & Bailey, 2011). Auch genaue Parameter für einen Vergleich zu anderen Tierarten oder Rassen fehlen. Vermutet wird hier in einer älteren Studie von Bielfelt et al. (1971) für den Hund eine genetische Prädisposition für das Auftreten von spontanen Krampfanfällen (Bielfelt et al., 1971). Auch für den Affen wird beispielsweise für den Pavian eine genetische Komponente beim Auftreten einer Epilepsie vermutet (Killam et al., 1967) (Killam, 1979) (Szabó et al., 2005).

Betrachtet man in diesem Zusammenhang den genetischen Hintergrund von Hunden, Affen und Minipig genauer, wird in der Fachliteratur für Hunde ein genetisch enger Hintergrund bei bestimmten Rassen angenommen (Ekenstedt et al., 2011), wie auch für das Göttinger Minipig, da die kommerzielle Zucht noch jung ist und sich bisher auf wenige Züchter beschränkt (Simianer & Köhn, 2010). Für den Affen besteht ein breiter genetischer Hintergrund, da viele der zu Versuchszwecken verwendeten Affenarten ursprünglich geographisch weit verteilt waren (Haus et al., 2014). Linienzucht und Inzucht sind bei Hunden schon lange gängige Praxis, um die teilweise sehr spezifischen Rassestandards zu erreichen (Ekenstedt et al., 2011). Diese Vorgehensweise, die einheitlichere Nachkommen erzeugen soll, kann jedoch auch durch die Konzentration von rezessiven Genmutationen zu einem gehäufteten Auftreten von schwerwiegenden Krankheiten, u.a. wie hier zu Krampfanfällen, führen (Ekenstedt et al., 2011).

Die Abhängigkeit einer erhöhten Krampfbereitschaft von der genetischen Variabilität bei den einzelnen Nichtnagerspezies hat hierbei eine große Relevanz für die Übertragbarkeit auf den Menschen, bei dem ebenfalls eine genetische Basis für das Auftreten von Krampfanfällen beschrieben ist (Ekenstedt et al., 2012). Aus diesem speziesübergreifenden Vergleich könnte man unter Umständen schlussfolgern, dass der eher enge genetische Hintergrund beim Hund und Minipig und die genetisch engen Sequenzhomologien zwischen Mensch und Schwein (Forster & Ancian et al., 2010) diese beiden Tierarten zu besser geeigneten Modellen im Vergleich zum Affen zur Erforschung von Krampfanfällen beim Menschen machen. Auf der anderen Seite muss man aber bedenken, dass genetisch gesehen der Affe dem Menschen am ähnlichsten ist

(Dalgaard, 2014). Die genetische Zuchtauswahl spielt bei den Tierarten eine große Rolle, (Simianer & Köhn, 2010) (Marshall BioResources), da Versuchstiere frei von spontanen Krankheiten sein sollten. In den Kontrolltieren der analysierten Studien waren keine Krämpfe während den Studien berichtet worden.

Nach Bielfelt et al. (1971) bestand neben der genetischen Basis zudem eine Geschlechtsprädisposition (11,9% der männlichen und 2,6% der weiblichen Tiere zeigten Krämpfe) für das Auftreten von spontanen Krampfanfällen (Bielfelt et al., 1971). Hierbei fehlen in dieser Publikation (Bielfelt et al., 1971) Hinweise auf die Zucht, genauso wie Aussagen zur Dichte der genetischen Basis bei den männlichen Tieren (i.d.R. werden weniger männliche als weibliche Tiere in der Zucht verwendet). Die in der Literatur beschriebene Geschlechtsprädisposition (Bielfelt et al., 1971) konnte anhand der vorliegenden retrospektiven Analyse nicht bestätigt werden, da hier mit 5,17% der männlichen (n=445) und 5,44% der weiblichen Tiere (n=423) Krämpfe fast zu gleichen Anteilen auftraten. Die Vergleichbarkeit ist hierbei allerdings eingeschränkt, da sich die Literatur auf spontane (Bielfelt et al., 1971), die Analyse der vorliegenden Arbeit dagegen auf substanzinduzierte Krampfanfälle bezieht.

Eine 2009 veröffentlichte Publikation untersuchte die Vorgehensweise zur Bewertung des Krampftrisikos in der präklinischen Arzneimittelentwicklung. Diese kam zu dem Schluss, dass substanzinduzierte Krampfanfälle ein komplexes Phänomen darstellen, das bisher erst spät im Entwicklungsprozess von Arzneimitteln *in vivo* evaluiert wird (Easter et al., 2009). Bei den Unternehmen der pharmazeutischen Industrie besteht aber der Wunsch ein potenzielles Risiko für Krampfanfälle der Testsubstanzen möglichst früh im Entwicklungsprozess zu identifizieren und dies möglichst unter Nutzung von weniger Ressourcen als bisher mit den traditionellen *in vivo* Verfahren (Easter et al., 2009). Der potenzielle Nutzen der regulatorisch geforderten Studien im Nager und Nichtnager (ICH Guideline M3(R2), 2009) im Hinblick auf die Identifizierung einer potenziellen Krampfanfälligkeit wird von den Autoren positiv bewertet (Easter et al., 2009).

Bei der retrospektiven Analyse der vorliegenden Arbeit traten bei 5,30% der 868 Hunde und 3,56% der 758 Affen Krampfanfälle auf. Diese wurden in allen Fällen als substanzinduziert eingestuft. In den jeweiligen Kontrollgruppen waren keine Krämpfe zu beobachten. Geht man unter der eingeschränkten Vergleichbarkeit aufgrund spontaner und substanzinduzierter Krampfanfälligkeit davon aus, dass die

Empfindlichkeit für Krampfanfälle mit der Häufigkeit ihres Auftretens korreliert, deckt sich das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zunächst mit den Beobachtungen von Easter et al. (2009), die eine erhöhte Krampfbereitschaft für den Hund angeben (Easter et al., 2009). Allerdings bleibt bei dieser Sichtweise die Höhe der Wirkstoffkonzentration im Blut unberücksichtigt, die jedoch große Bedeutung hat, um die speziesspezifische Empfindlichkeit zu bewerten. Unter Berücksichtigung der freien Wirkstoffmenge im Blut (C_{\max} free) waren in der retrospektiven Analyse der vorliegenden Arbeit beide Tierarten ähnlich empfindlich für konvulsive Effekte einer Substanz, die aufgrund der Datenlage einen direkten Vergleich erlaubte. Somit kann die Aussage aus der Literatur, der Hund sei empfindlicher für Krampfanfälle (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011), anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für substanzinduzierte Krampfanfälle nicht bestätigt werden.

2. Der prädiktive Wert von Tierstudien für neurologische Symptome im Menschen

Die Sicherheit der gesunden Probanden oder Patienten in klinischen Studien durch Abschätzen des (Neben)wirkungsprofils einer Substanz aus Tierstudien abzuleiten ist in praxi ein bewährter Prozess, der von den Zulassungsbehörden gesetzlich gefordert ist. Ein Argument dafür, wie sehr sich dieser Prozess in der Praxis bewährt hat, ist die Tatsache, dass im Vergleich zur großen Anzahl der klinischen Studien nur wenige einzelne tragische klinische Studien existieren, wo ernsthaft Menschen in Gefahr gerieten (siehe auch Literaturübersicht, z.B. Thalidomid- und Tegenero-Vorfall). Auch eine Evaluation von 60 neuen Wirkstoffen aus dem Bereich Onkologie in den USA (Sridhara et al., 2010) zeigt, dass 5 Wirkstoffe die Zulassung nicht erlangten, jedoch aus Gründen der fehlenden Wirksamkeit und nicht aufgrund von Nebenwirkungen in den klinischen Studien im Menschen (Sridhara et al., 2010). Ein weiteres Beispiel ist eine Veröffentlichung aus Japan (Asada et al., 2013), die 272 zugelassene Substanzen untersuchte, von denen bei 43 Wirkstoffen während des Entwicklungsprozesses jedoch große Schwierigkeiten auftraten, da es „Probleme mit den klinischen Daten“ gab (Asada et al., 2013). Von diesen 43 Substanzen waren es jedoch nur 3 (7%), bei denen schwerwiegende Nebenwirkungen im Mensch auftraten (Asada et al., 2013).

In einer der älteren Studien (Schein, 1970) konnte eine Übereinstimmung von fast 40% der neuromuskulären und neurotoxischen Effekte zwischen Affe, Hund und Mensch

gezeigt werden. Hierbei zeigten Hunde und Affen einen ähnlichen prädiktiven Wert (Schein, 1970), was die Ergebnisse dieser Arbeit stützt.

Fasst man die Bedeutung der speziesspezifischen Empfindlichkeit für neurologische Symptome etwas weiter, wird in der Literatur eine generelle nicht-spezifische (Igarashi et al., 1995), moderate (Owens, 1962) (Fletcher, 1978) bis adäquate (Schein, 1970) Korrelation neurologischer Symptome zwischen Tierdaten und dem Mensch angenommen. Um im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings eine Aussage zur Prädiktivität für den Menschen treffen zu können, müssten zunächst die verfügbaren humanen Daten der 15 Substanzen aus den klinischen Studien ausgewertet werden (8 der Substanzen erreichten Phase I und 7 Substanzen Phase II). Die Daten zu den Wirkstoffkonzentrationen liegen vor und werden im Rahmen einer Zusammenarbeit in einem Konsortium näher betrachtet. Zu beachten ist allerdings, dass Daten im Menschen zu toxikologischen Effekten sehr rar sind, da die Dosierungen bei der Testung im Menschen immer möglichst im wirksamen aber nicht toxischen Bereich sein sollten und somit nicht so hoch sind wie bei den präklinischen tierexperimentellen Prüfungen.

Ein Symptom ist dabei besonders hervorzuheben: Laut Flechter et al. (1978) bestand bei den verschiedenen neurologischen Symptomen die beste Korrelation zwischen Tierdaten und dem Menschen für Tremor, alle übrigen Symptome neurologischer Art korrelierten nur schwach miteinander (Fletcher, 1978). Auch in einer älteren Studie (Lichtfield, 1961) in der die Symptome in Ratte, Hund und Mensch verglichen wurden, war Tremor das einzige neurologische Symptom, das in Hund und Mensch zu sehen war (Lichtfield, 1961). Tremor war in der vorliegenden Analyse der 15 Substanzen eins der am häufigsten und konstant aufgetretenen Symptome, das zudem bei Hunden und Affen ähnlich häufig auftrat (Hund 16,24%, Affe 13,72%). Außerdem ist es ein relativ objektiv zu beobachtendes Symptom im Tierversuch. Dies macht es zu einem wertvollen Vergleichsparameter bezüglich der neurologischen Sensitivität und dem prädiktiven Wert im Hinblick auf die Sicherheit für den Menschen in klinischen Studien.

Eine weitere der wenigen Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dem prädiktiven Wert besagt, Veränderungen neurologischer Art seien im Hund einfacher zu bewerten als im Nager oder Affen (Greaves et al., 2004). Diese Aussage deckt sich zum größten Teil mit der vorliegenden Arbeit, da wie unter „Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen“ näher erläutert, manche neurologische Symptome bei Hunden wegen der Haltungsbedingungen und der damit größeren Bewegungsfreiheit,

dem Grad der Domestikation und der Erfahrung des Personals bei Hunden besser zu sehen sind.

3. Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen

Die retrospektive Analyse der Symptome ergab, dass bei den Hunden eine deutlich größere Bandbreite an verschiedenen neurologischen Effekten berichtet wurde als bei den Affen. In Bezug auf das Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen in den einzelnen Tierarten für die analysierten Studien müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden.

Ein wichtiger Aspekt ist die mögliche Abhängigkeit bestimmter neurologischer Symptome wie beispielsweise „verminderte/gesteigerte Aktivität“, „Ataxie“, „Koordinationsschwierigkeiten“, „Lethargie“ und „Müdigkeit“ von der Bewegungsfreiheit und somit den Haltungsbedingungen. Unter den Standard-Versuchstierhaltungsbedingungen haben Hunde mehr Platz als Affen. Dies gilt sowohl für die Bedingungen in Europa, wo die Mindestfläche der Unterbringung beim Hund durch die EU-Richtlinie 2010/63/EU bzw. in Deutschland durch die Tierschutz-Hundeverordnung (TierSchHuV) 6m² und beim Affen 2 m² pro Tier (Makaken) beträgt (EU-Richtlinie 2010/63/EU, 2010). Auch in den USA haben Hunde ein größeres Platzangebot als Affen, wenn auch geringer als in Europa (*Animal Welfare Act* der USDA). Der mindestens vorgeschriebene Platz für Hunde kann anhand einer Formel des *Animal Welfare Act* errechnet werden¹². Aufgrund des höheren Platzangebots haben Hunde somit mehr Möglichkeiten die oben genannten Symptome zu zeigen. Die Wahrscheinlichkeit neurologische Symptome, für die eine Abhängigkeit von der Bewegungsfreiheit besteht, beim Hund zu beobachten, ist also aufgrund der Haltungsbedingungen größer als beim Affen. Um haltungsbedingten Unterschieden bei der Evaluierung von Symptomen entgegenzuwirken, wäre unter Umständen die Einführung eines *score* Systems hilfreich, wie sie beispielsweise in der Humanmedizin für die Bewertung einer Ataxie existieren (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) (Schmitz-Hübsch et al., 2006).

¹² „Each dog housed in a primary enclosure (including weaned puppies) must be provided a minimum amount of floor space, calculated as follows: Find the mathematical square of the sum of the length of the dog in inches (measured from the tip of its nose to the base of its tail) plus 6 inches; then divide the product by 144. The calculation is: (length of dog in inches + 6) × (length of dog in inches + 6) = required floor space in square inches. Required floor space in inches/144 = required floor space in square feet.“ *Animal Welfare Act der USDA*

Des Weiteren werden Affen i.d.R. während der Dosierung innerhalb einer Studie in einem speziellen Untersuchungsstuhl fixiert, die Hunde dagegen nicht. Das schränkt zwar die Bewegungsfreiheit ein, aber dadurch ist man bei der Beobachtung von Symptomen dem Affen in diesem Fall länger räumlich näher, was dazu führen könnte, dass Symptome wie „Mydriasis“ oder „Miosis“ in dieser Tierart einfacher und häufiger zu sehen sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies: „Mydriasis“ trat mit 10,29% bei den Affen deutlich häufiger auf als bei den Hunden (1,27%) und „Miosis“ war nur in den Affen (0,79%) zu sehen. Dies könnte aber evtl. auch auf Stressreaktionen der Tiere durch die Fixierung beruhen. Aus diesem Grund waren diese beiden Symptome für einen direkten Vergleich zwischen den beiden Tierarten ungeeignet und sollten besser aus den Daten der ophthalmologischen Untersuchung, die in Studien mit einer Dauer von ab 4 Wochen durchgeführt wird, beurteilt werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich z.B. bei dem Symptom „Tremor“, das recht einfach objektiv zu beobachten ist und zur Ausprägung keinen größeren Platzbedarf benötigt, dass dieses Symptom in der vorliegenden Arbeit auch ähnlich häufig in beiden Tierarten vorkam. In der Literatur wird beschrieben, dass „Tremor“ das neurologische Symptom ist, das am besten zwischen Tierdaten und dem Mensch korreliert (Lichtfield, 1961) (Fletcher, 1978), was sich eindeutig mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Auch im Spiderplot (siehe Abbildungen 4 und 5) war das Symptom „Tremor“ ein gutes Beispiel, da hier die Expositionen besonders ähnlich waren (Hund 0,153 µg/ml und Affe 0,141 µg/ml). Letztendlich bedürfte es einer gezielteren Analyse, um eine mögliche Abhängigkeit bestimmter Symptome von der Art der Haltungsbedingungen und anderen Faktoren zu evaluieren.

Ein weiterer Faktor ist der Grad an Erfahrung des tierbetreuenden Personals, neurologische Symptome in den einzelnen Tierarten zu erkennen und zu bewerten. Je vertrauter das Laborpersonal mit den einzelnen Tierarten ist, desto sicherer und zuverlässiger werden die entsprechenden Symptome beobachtet und bewertet. Hunde spielen auch als Familienmitglied eine große Rolle, so dass der Mensch seit vielen Jahrhunderten im Umgang mit Hunden vertraut ist. In Deutschland werden ca. 5 Millionen Hunde gehalten und die Zahl ist seit vielen Jahren konstant (Verband für das deutsche Hundewesen), in der EU sind es ca. 60 Millionen (2012) (*International Federation for Animal Health Europe*) und in den USA ca. 70 Millionen Hunde (2012) (*American Veterinary Medical Association*). Auch als Versuchstier ist der Hund die

häufigste Nichtnagerspezies (Hasiwa & Bailey, 2011), so dass in der Ausbildung das Personal i.d.R. mit dieser Spezies Erfahrungen gewinnt.

Auch verschiedene tierartspezifische Charakterzüge spielen eine Rolle. Hunde, speziell Beagle, sind grundsätzlich lebhaft, freundlich und besitzen eine hohe Bereitschaft für die Mitarbeit in studienspezifischen Abläufen. Als Haustier genießen sie die Gesellschaft von Menschen, also in diesem Fall des tierpflegenden Fachpersonals und üben somit eher natürliche Verhaltensweisen aus. Affen sind dagegen in der Anwesenheit von Menschen angespannt und zeigen unter Umständen vielleicht viele Symptome nicht, wenn sich Personal (v.a. wenn es sich um unbekanntes Personal wie z.B. den/die Tierarzt/Tierärztin oder den/die Prüfleiter/in handelt) im Raum befindet.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist die Tatsache, dass das Vokabular der Befundung der Symptome limitiert ist, da es durch das verwendete Programm zur Evaluierung der Symptome vorgegeben ist und die Studiendurchführer daraus passende Begriffe aussuchen. Beim Übersetzen der Bezeichnungen einiger einzelner Symptome besteht daher die Problematik, dass die Übersetzung nicht 100% genau ist. Beispielsweise die im Englischen als „jerks“ und „twitching“ bezeichneten Symptome werden im Deutschen jeweils mit „Zuckungen“ übersetzt. Mit „twitching“ sind hierbei Zuckungen gemeint, „jerks“ entsprechen dagegen stärkeren reflexartigen Zuckungen. Hierbei sei auch darauf hingewiesen, dass in den Studienprotokollen auch Freitext möglich ist und dass die Studien in unterschiedlichen Laboren mit verschiedenen Systemen stattfanden.

Hierbei passen auch manche Symptome besser für den Hund, andere sind eher für Affen geeignet und unter Umständen benennen verschiedene Untersucher das gleiche Symptom unterschiedlich. Symptome wie „Ataxie“ (*ataxia*) beim Hund und „Koordinationsschwierigkeiten“ (*poor coordination*) beim Affen werden zwar mit unterschiedlichen Begriffen bezeichnet, könnten evtl. aber das gleiche Symptom meinen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Auch die Symptome „Ataxie“ beim Hund und „Koordinationsschwierigkeiten“ beim Affen traten bei sehr ähnlichen Expositionen auf (Hund 0,185 µg/ml, Affe 0,180 µg/ml).

Insgesamt waren viele Symptome bei Berücksichtigung von C_{\max} free bei ähnlichen Expositionen zu sehen. Wie im Spiderplot deutlich zu erkennen ist (siehe Abbildungen 4 und 5), traten bei der Betrachtung von C_{\max} free die meisten Symptome (Krämpfe, Tremor, gesteigerte Aktivität, Vokalisation) bei beiden Tierarten bei fast gleichen Expositionen auf (maximale Differenz 0,12 µg/ml). Hinsichtlich speziesspezifischer

neurologischer Symptome sollte speziesübergreifend auch ein Blick auf die Symptome geworfen werden, die in der vorliegenden Arbeit beim Nager, aber nicht beim Nichtnager auftraten: Somnolenz, Koma, reduzierter Muskeltonus, verzögerter/fehlender Aufrichtreflex, kompulsives Verhalten, gesteigerte Berührungsempfindlichkeit und Springanfälle. Bei diesen Symptomen könnte eine mögliche Erklärung die oben bereits erwähnte unterschiedliche Benennung von Symptomen sein, da auch hier manche Symptome mit ihren in den toxikologischen Studien vorgegebenen Begriffen eher auf den Nager als auf den Nichtnager passen. „Somnolenz“ und „Koma“ im Nager wären beispielsweise vergleichbar mit „Müdigkeit“ beim Nichtnager. Zu beachten ist hierbei auch, dass Nager viel in den Studien schlafen, da sie nachtaktiv sind, die Studienaktivitäten jedoch tagsüber stattfinden. Dies bedeutet, dass etwas mehr „Müdigkeit“ schwer zu erkennen ist und erst bei deutlich reduzierter Aktivität vielleicht erkannt wird. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zwischen Hypoaktivität und Hypolokomotion zu unterscheiden, was in toxikologischen Studien jedoch nicht standardmäßig und genauer evaluiert wird. Dies wird i.d.R. in pharmakologischen oder sicherheitspharmakologischen Studien bei entweder niedrigeren Dosierungen und/oder Einmalgabe geprüft. Des Weiteren spielt die Art des Monitoring eine Rolle, da es sich auf die Beobachtung von Symptomen auswirken kann, ob die Symptome der Tiere in ihrem Käfig, also in ihrer gewohnten Umgebung (sog. *home-cage activity*) oder außerhalb des Käfigs evaluiert werden.

Zu beachten ist generell die Limitierung der regulären toxikologischen Studien für das Beobachten des Auftretens und der Häufigkeit von neurologischen Symptomen, da die Evaluierung von Symptomen i.d.R. nur zu festgelegten Zeitpunkten nach den Dosierungen erfolgt. Damit kann allein anhand der Tatsache, dass beim Hund eine größere Anzahl verschiedener Symptome zu beobachten war als beim Affen, nicht geschlossen werden, welche der beiden Spezies empfindlicher für neurologische Symptome ist.

4. Neurologische Symptome in Relation zum Blutplasmaspiegel und speziesspezifische Unterschiede

Neben der Häufigkeit von neurologischen Symptomen spielt die Wirkstoffkonzentration während des Auftretens der Symptome eine entscheidende Rolle, da diese in der Bewertung der Arzneimittelsicherheit als Maß und als möglicher Vergleichsparameter

zur Extrapolation zum Menschen herangezogen wird (FDA, 2005). Als „empfindlichere Spezies“ wurde im Rahmen der Arbeit die Spezies definiert, bei der im Vergleich zur jeweils anderen Spezies bereits bei einer geringeren Konzentration der Substanz im Blutplasma neurologische Symptome zu beobachten waren.

Zunächst gestaltete sich die Tatsache als schwierig, dass in den vorliegenden Datensätzen der toxikologischen Studien zwar i.d.R. für jedes Tier der entsprechend maximale Blutplasmaspiegel der Testsubstanz (C_{\max} total), der im Rahmen der Studie bei diesem Tier auftrat, dokumentiert ist, dass dies aber nicht immer dem tatsächlichen Blutspiegel entsprach, der genau zum Zeitpunkt des Auftretens des entsprechenden Symptoms vorlag. Dies liegt daran, dass in toxikologischen Studien die Blutentnahmen für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter zu festgelegten Zeitpunkten, häufig am Studienende, durchgeführt werden (ICH Guideline S3A, 1994). Dies kann auch eine Erklärung für die hohe Variabilität der Blutplasmaspiegel zwischen den Einzeltieren im Rahmen der retrospektiven Datenauswertung sein (siehe Abbildungen 7 und 8). Um dies in Zukunft besser bewerten zu können, wurde basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit daher in die Standardprüfpläne aufgenommen, dass gleich nach dem Auftreten von Symptomen zusätzliche Blutproben genommen werden sollen.

Beachtet werden muss außerdem, dass in den retrospektiven Daten der Hunde- und Affenstudien oral dosiert wurde, was ebenfalls zu einer höheren individuellen Variabilität führt, da unterschiedliche Absorptionsraten zu unterschiedlichen Blutplasmakonzentrationen der Substanzen führen können.

Insgesamt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Substanz, für die ausreichend Daten vorlagen, detailliert untersucht. Die ausreichende Anzahl von Tieren mit neurologischen Symptomen für diese Substanz (Substanz D) erlaubte eine relativ gesicherte Bewertung der Symptome.

Beim Vergleich aller neurologischen Symptome in Relation zu den maximalen Blutplasmaspiegeln der Substanz D schien der Hund bei Betrachtung der totalen maximalen Substanzmenge im Blut (C_{\max} total) für die analysierte Substanz zunächst geringgradig bis deutlich empfindlicher zu sein, da die Symptome bereits bei niedrigerem C_{\max} total beim Hund auftraten im Vergleich zum Affen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Plasmaproteinbindung und den damit errechneten Werten der freien verfügbaren Wirkstoffkonzentration im Blut (C_{\max} free) zeigten die Hunde und Affen jedoch ähnliche Werte. Allgemein anerkannt ist, dass nur

die ungebundene Substanzmenge im Blut einen Effekt am Zielorgan verursachen kann (Xingrong et al., 2014). Somit konnte gezeigt werden, dass die speziesspezifische Sensitivität über alle bei dieser Substanz aufgetretenen neurologischen Symptome hinweg zwischen Hunden und Affen ähnlich ist, wenn die freie Substanzmenge berücksichtigt wurde.

Wenn Symptome einzeln betrachtet wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei der Darstellung der Symptome „Krämpfe“, „Vokalisation“, „verminderte Aktivität“ und „Tremor“ der Substanz D im Spiderplot (siehe Abbildung 4) schienen bei Betrachtung des totalen maximalen Blutplasmaspiegels (C_{\max} total) die Hunde mit Unterschieden in der Größenordnung von 0,22 bis 0,79 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber den Werten der Affen empfindlicher zu sein. Die Werte der Hunde variierten hierbei von 0,344 bis 0,595 $\mu\text{g/ml}$ und die der Affen von 0,672 bis 1,381 $\mu\text{g/ml}$. Bei Betrachtung der Symptome in Relation zur freien Konzentration im Blutplasma (C_{\max} free) (siehe Abbildung 5) liegen die Blutplasmaspiegel der beiden Tierarten jedoch weniger weit auseinander (maximale Differenz 0,12 $\mu\text{g/ml}$). Die Werte der Hunde variierten hierbei von 0,152 bis 0,225 $\mu\text{g/ml}$ und die der Affen von 0,141 bis 0,29 $\mu\text{g/ml}$. Im Falle des Symptoms „Tremor“ waren für diesen Fall die Werte sogar annähernd gleich (Hunde 0,152 $\mu\text{g/ml}$ und Affen 0,141 $\mu\text{g/ml}$). Wie im Spiderplot klar zu erkennen ist, besteht im Falle von C_{\max} free somit kein großer Unterschied bezüglich der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome (Krämpfe, Tremor, gesteigerte Aktivität, Vokalisation, Ataxie/Koordinationsschwierigkeiten) zwischen den beiden Tierarten.

Sieht man sich bei dieser Darstellungsweise die Symptome, die nur in einer Tierart auftraten genauer an, so fällt auf, dass beispielsweise Symptome wie „Ataxie“ (*ataxia*) beim Hund und „Koordinationsschwierigkeiten“ (*poor coordination*) beim Affen zwar unterschiedlich benannt werden, evtl. aber das gleiche Symptom meinen können. Diese beiden Symptome traten bei fast gleichen Expositionen auf (Hund 0,185 $\mu\text{g/ml}$, Affe 0,180 $\mu\text{g/ml}$) (siehe auch „Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen“). Dies bestätigt die zuvor erlangten Erkenntnisse, dass für diese Substanz neurologische Symptome bei ähnlichen freien Wirkstoffkonzentrationen in beiden Spezies auftraten und somit beide Tierarten ähnlich empfindlich für die untersuchten neurologischen Symptome sind, wenn man die ungebundene Wirkstoffmenge im Blut heranzieht.

5. Versuchstierauswahl

Bisher wird die Wahl der Nichtnagerspezies in toxikologischen Studien im Rahmen der Arzneimittelentwicklung folgendermaßen getroffen: Nach Berücksichtigung historischer Daten aus der Toxikologie, sowie zusätzlichen Daten aus anderen Forschungsbereichen wie Erfahrungen mit Vorgängersubstanzen, Rezeptor- und Ionenkanalprofil, kardiovaskuläres Profil und verhaltenspharmakologische *in vivo* Studien, werden zur Charakterisierung von möglichen Entwicklungssubstanzen Screening-Studien durchgeführt. Zusätzlich schließen sich Untersuchungen zur metabolischen Stabilität in mehreren Spezies *in vitro* (Hepatozyten, Lebermikrosomen) an, sowie, ebenfalls in mehreren Spezies, Studien zur Pharmakokinetik *in vivo*. Typischerweise wird bei den *in vivo* Studien mit Untersuchungen am Nager begonnen und bei niedriger Dosierung auch die Pharmakokinetik der Substanz im Nichtnager untersucht. Außerdem wird die potentiell wirksame Dosis im Menschen extrapoliert (Jolivet & Ward, 2005) (siehe auch „Gegenwärtige Praxis der Versuchstierauswahl“ im Literaturteil der Arbeit).

Anhand der oben genannten Untersuchungen wird derzeit die pharmakologisch relevante und empfindlichste Nichtnagerspezies in Bezug auf die Testsubstanz bestimmt. Hierbei laufen viele Prozesse gleichzeitig ab. Die Entscheidung für eine bestimmte Nichtnagerspezies fällt also, wie auch in der Literatur beschrieben (Bode et al., 2010) häufig anhand von pharmakokinetischen Daten, d.h. den erreichbaren Blutplasmakonzentrationen und möglichen erwarteten Metaboliten im Mensch.

Die toxikologischen Endpunkte, wie z.B. Organtoxizitäten, sind bei neueren Kandidaten, vor allem wenn in unbekannten Substanzklassen geforscht wird, zu diesem Zeitpunkt der Speziesauswahl i.d.R. noch nicht bekannt. Daher ist es wichtig, dass sich die Evaluierung mit jeder neuen Information aus den oben genannten Studien ändert und entsprechend angepasst wird. Zusätzlich hängt der Ablauf ganz wesentlich von der untersuchten Substanz oder Substanzklasse ab.

Aus tierschutzethischen Gründen wird i.d.R. nur in einer Nichtnagerspezies getestet, wie die Datenanalyse der firmeninternen Substanzen deutlich gezeigt hat. Das führt dazu, dass für eine retrospektive Analyse die firmeninterne Datenlage nur eingeschränkt für einen direkten Vergleich zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome bei den Nichtnagerspezies Hund und Affe geeignet ist. In der vorliegenden Arbeit waren für eine Substanz ausreichend Daten in beiden Spezies vorhanden und konnten analysiert werden. Ein schwieriger Punkt für eine Analyse war, dass die

pharmakokinetischen Daten der Einzeltiere zum Teil erst zum Studienende bestimmt wurden und nicht zum Zeitpunkt des Auftretens der Symptome. Auch die Tatsache, dass die Beobachtung der Tiere in den toxikologischen Studien zu festgelegten Zeitpunkten und nicht kontinuierlich erfolgt, erschwert die Aussage zur Häufigkeit und Dauer von neurologischen Symptomen.

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben besondere Bedeutung für das Begründen der Wahl der Nichtnagerspezies und die Wahl des Sicherheitsfaktors gegenüber der zuständigen Behörde. Sollten neurologische Symptome in einer Tierspezies im Rahmen der Entwicklung auftreten, wäre es gut, ein Studiendesign zu haben, mit dem der direkte Vergleich mit minimalstem Tiereinsatz und mäßiger Belastung adressiert werden kann, ohne dass lange toxikologische Studien in einer zweiten Nichtnagerspezies wiederholt werden müssen, was aus Tierschutzgründen abzulehnen ist.

Dieses Studiendesign wurde basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit entwickelt und bereits mehrfach in der Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten eingesetzt. Das Studiendesign besteht aus einer kurzen Studie an 3 Tieren mit mäßiger Belastung, die intravenöse Substanzapplikation in eskalierender Dosis verwendet, um die individuelle Variabilität in der Absorption zu vermindern. Damit kann der Speziesvergleich gezielter adressiert werden, was eine Wiederholung von toxikologischen Studien von einer Dauer bis zu 3 Monaten und Tierzahlen von typischerweise 32 Tieren unnötig machen kann und somit zum aktiven Tierschutz beiträgt.

Dies bedeutet für die Versuchstierauswahl, dass Daten zur Bestimmung der speziesspezifischen Empfindlichkeit für neurologische Symptome nicht von vorneherein vorliegen, um allgemeingültige Empfehlungen zur Auswahl der Nichtnagerspezies formulieren zu können. Ein Beispiel lag vor und wurde systematisch aufgearbeitet (Substanz D). Für diese genauer analysierte Substanz konnte gezeigt werden, dass für die speziesspezifische Empfindlichkeit für neurologische Symptome zwischen den Nichtnagerspezies Hund und Affe kein signifikanter Unterschied bestand.

In diesem Zusammenhang ist die große Bedeutung des Publizierens und Teilen von Daten verschiedener pharmazeutischer Firmen zu betonen, wie es auch in der Literatur zum Beispiel für die Verwendung des Marmosets-Affen beschrieben wird (Smith et al., 2001). Die vorliegende Arbeit konnte für die eigene Firma zeigen, dass ein gutes Beispiel (Substanz D) existiert, um der Fragestellung nachzugehen. Geht man davon aus, dass

dies bei allen Firmen der Fall ist, könnten durch die Kooperationsarbeit von insgesamt 10 Firmen evtl. 10-20 weitere Beispiele analysiert werden, was eine fundierte Aussage erlauben würde. Ein Abfragen der Datenlage bei anderen pharmazeutischen Firmen wurde daher unter der Federführung von AbbVie bereits begonnen (siehe „Ausblick“).

6. Die Plasmaproteinbindung

Im Laufe des Projektes und während der Analyse der Daten stellte sich zunehmend die große Bedeutung der freien Blutplasmakonzentration der Wirkstoffe bei den einzelnen Tierarten heraus. Die freie Substanzmenge hat eine große pharmakologische Bedeutung, um die Toxizität der Substanzen am Zielorgan zu verstehen, da der an Plasmaproteine gebundene Anteil einer Substanz meist nicht pharmakologisch aktiv ist (Xingrong et al., 2014). Wurde die Plasmaproteinbindung und damit die freie Substanzmenge im Blut bei der Analyse der Daten nicht berücksichtigt, schien für fast alle Fälle der Hund empfindlicher für neurologische Symptome zu sein. Unter Beachtung der Plasmaproteinbindung bestand aber zwischen Hunden und Affen kein großer Unterschied mehr und führte somit zu anderen als den ursprünglichen Annahmen.

Dies ist umso wichtiger, je größer der Unterschied bei den einzelnen Tierarten ist. Bei der Substanz D mit Plasmaproteinbindungswerten von 37,8% freier Substanzmenge im Blut beim Hund und 21% beim Affe waren die Unterschiede der Ergebnisse bei Betrachtung der maximalen totalen Substanzmenge (C_{\max} total) und der maximalen freien Substanzmenge im Blut (C_{\max} free) nicht so deutlich wie dies beispielsweise bei dem extremen Beispiel der Substanz E mit Werten von 30% freie Fraktion beim Hund und 1,2% beim Affen der Fall wäre. Besonders auch im Hinblick auf die Sicherheit der humanen Probanden in den sich anschließenden klinischen Studien, ist die Berücksichtigung der Plasmaproteinbindungsdaten von besonderer Bedeutung, da beispielsweise im Fall der Substanz J der Wert für den Mensch mit 3,23% freier Fraktion sich deutlich von den Werten für Hund (33,3%) und Affe (37,3%) unterscheidet und unbedingt in die Bewertung der Arzneimittelsicherheit mit einfließen muss.

7. Grenzen dieser Arbeit

Neben den Grenzen, die sich aus dem toxikologischen Studiendesign ergeben und neben der Plasmaproteinbindung ist ein weiterer wichtiger Aspekt die Beachtung der

Gehirngängigkeit, da Neurone nur durch Pharmaka beeinflusst werden können, denen es möglich ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Frey & Löscher, 2007). Daten zur Gehirngängigkeit werden in der Regel nur im Nager in pharmakokinetischen Studien in niedriger Dosierung ermittelt und konnten daher im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens für Nichtnager nicht weiter berücksichtigt werden.

In der Regel geht man davon aus, dass die Bindung an Plasmaproteine die Verteilung von Wirkstoffen hemmt. Auf der anderen Seite wird von manchen Autoren (Pardridge & Landaw, 1984) (Pardridge, 1987) (Cornford & Hyman, 1999) eine Änderung der Konformation der Plasmaproteine in kleinen Gehirnkapillaren beschrieben, die zu einer verstärkten Dissoziation des Wirkstoffes vom Plasmaprotein und damit zu einer bevorzugten Abgabe in das Kapillarmilieu führt (Pardridge & Landaw, 1984) (Pardridge, 1987) (Cornford & Hyman, 1999). Tierartspezifische Unterschiede oder spezielle Informationen zum Nichtnager gibt diese Literatur nicht. Außerdem spielen aktive Transportprozesse für manche Wirkstoffe eine Rolle. Daher ist die Gehirngängigkeit basierend auf Lipophilie und Plasmaproteinbindung nicht einfach abzuschätzen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass es durch infektiöse Prozesse wie beispielsweise Meningitis zur Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke kommen kann, wobei vor allem Proteasen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung von Blutgefäßen im Subarachnoidalraum spielen (Rosenberg, 2012). Zudem können Entzündungsprozesse die aktive Sekretion von Wirkstoffen aus dem Gehirn vermindern (Barrons et al., 1992). Auch Hirntumore beeinflussen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Vinnitsky & Glinsky, 1987). Ebenso kann es durch nicht-neurologische Erkrankungen wie z.B. Niereninsuffizienz (Barrons et al., 1992), Hypertension oder Diabetes (Rosenberg, 2012) zu Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke kommen.

Erwähnt werden muss auch, dass die Daten der vorliegenden Arbeit unter der Voraussetzung der Hypothese analysiert wurden, dass schwere neurologische Symptome erst beim Auftreten eines bestimmten Konzentrationslevels (C_{\max}) im Blut zu sehen sind. Für die Evaluierung von neurologischen Symptomen erwies sich die Verwendung von C_{\max} als guter Parameter in dieser Arbeit. Eine mögliche Abhängigkeit des Auftretens von Symptomen von der Gesamtmenge eines Wirkstoffes im Organismus über einen längeren Zeitraum (AUC) wurde allerdings nur in einzelnen Fällen getestet und wäre noch gezielt zu untersuchen. Die Anzahl von Tieren mit neurologischen Symptomen, die erst später auftraten oder die genannten Probleme des Fehlens von

Blutproben zum Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen erlaubte hier keine weitere retrospektive Analyse.

Nicht untersucht wurde in dieser Arbeit die speziesspezifische Rezeptoraffinität. Meist werden auch diese Daten nur im Nagermodell (häufig Maus) und im Menschen erhoben und nicht im Nichtnager und lagen daher nicht vor. Analog wurde ebenfalls nicht untersucht inwieweit z.B. eine anfängliche Empfindlichkeit besteht, die aber durch längere Gaben einer Substanz reduziert werden kann. Auch mögliche speziesspezifische Unterschiede in der Generierung aktiver Metaboliten wurden nicht berücksichtigt.

Neben der Variabilität der retrospektiven ausgewerteten Daten muss auch beachtet werden, dass nur eine Substanz endgültig bewertet werden konnte, d.h. bisher nur eine kleine Fallzahl vorliegt. Im weiteren Verlauf des Projektes wäre es deshalb wichtig diese Ergebnisse nach Erweiterung der Datenbasis zu überprüfen.

8. Ausblick

Im Rahmen der Projektarbeit sind weitergehende Schritte angedacht und zum Teil schon begonnen worden, um die Datenlage zur Versuchstierauswahl, den Einsatz und die Belastung des Nichtnagers in toxikologischen Studien weiter zu verbessern.

Hierzu konnten geeignete Kandidaten für weiterführende Untersuchungen identifiziert werden. Ein entsprechender Tierversuchsantrag wurde bereits genehmigt, um neben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzklasse Aufschluss über andere Substanzklassen zu ermöglichen. Hierbei soll ein Studiendesign verwendet werden, mit dem der direkte Vergleich mit minimalstem Tiereinsatz und mäßiger Belastung adressiert werden kann, ohne dass lange toxikologische Studien in einer zweiten Nichtnagerspezies wiederholt werden müssen, was aus Tierschutzgründen abzulehnen ist. Ein Studiendesign wurde basierend auf Daten der Arbeit entworfen. Eine kurze Studie in wenigen Tieren (ca. 3 Tiere) mit mäßiger Belastung und intravenöser Substanzapplikation wurde geplant, um die Fragestellung gezielt adressieren zu können, die eine Wiederholung von toxikologischen Studien von einer Dauer bis zu 3 Monaten und Tierzahlen von typischerweise 32 Tieren unnötig machen kann. Dieses Design adressiert auch die Tatsache, dass in der retrospektiven Analyse eine hohe individuelle Variabilität der Blutplasmaspiegel der Substanz bei den einzelnen Tieren zu beobachten war, durch intravenöse Gabe, um so die Unterschiede in der Absorptionsrate bei oraler Dosierung zu vermeiden. Auch könnten dadurch schneller die zuvor berechneten

Blutplasmaspiegel erreicht werden, bei denen neurologische Symptome zu erwarten sind. Das ermöglicht, die Experimente aus Tierschutzgründen so kurz wie möglich zu halten. Da das neue Studiendesign äußerst vielversprechend und tierschonend für einen sehr guten Vergleich zwischen Hunden und Affen ist, wurde dieser Studientyp bereits firmenintern in ein neueres Projekt der Arzneimittelentwicklung integriert.

Weiterhin soll nach Biomarkern, die z.B. vor Krampfanfällen auftreten (sog. *premonitory signs*), gesucht werden, um die Belastung der Tiere in toxikologischen Studien zu minimieren (z.B. EEG, andere Biomarker wie beispielsweise miRNAs).

Gestartet wurde auch die weiterführende Analyse der 15 untersuchten Substanzen im Hinblick auf humane Daten, da die Übertragbarkeit auf den Mensch die letztendlich offene Frage ist. Bedeutsame zu adressierende Punkte sind hierbei die Evaluierung des Auftretens von neurologischen Effekten im Menschen, die in den klinischen Studien sehr rar sind, die entsprechenden Blutplasmaspiegel der Substanzen, ob diese mit den Werten bei Hunden und Affen in Beziehung stehen und ob eine Aussage zum prädiktiven Wert der einzelnen Tierarten bezüglich der Symptome im Menschen getroffen werden kann.

Um die Datenlage zu verbessern, sollen über ein IQ-Konsortium (Internationales Konsortium für Innovation und Qualität in der pharmazeutischen Entwicklung (www.iqconsortium.org)) mehrerer internationaler pharmazeutischer Unternehmen vorhandene Daten zusammengetragen und evaluiert werden. Hierbei haben sich 10 Firmen (inkl. AbbVie) unter der Federführung von AbbVie bereits zu einer Zusammenarbeit bereiterklärt. Die bisherige Nachfrage bei den einzelnen Pharmafirmen hat ergeben, dass, wie auch im Falle der vorliegenden Arbeit, bei den einzelnen Unternehmen ausreichend Datenmaterial für ca. 1-2 Substanzen bereits vorliegt. Die Zusammenarbeit der pharmazeutischen Unternehmen und das gemeinsame Nutzen dieser Daten ist vor allem im Hinblick auf den Tierschutz von entscheidender Bedeutung, da somit das Potenzial besteht die Datenbasis dahingehend zu erweitern, dass eine fundierte, vielleicht sogar statistisch signifikante Aussage zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome getroffen werden kann ohne zusätzliche Tierversuche durchführen zu müssen und die entsprechenden Daten zu publizieren. Eine entsprechende Tabelle zum Zusammentragen der Daten basierend auf der Datenanalyse dieser Arbeit wurde bereits erarbeitet und ist im Folgenden als Beispiel angefügt (siehe Tabelle 18).

Compound Code (company specific-confidential)	Mechanism Code (company specific-confidential)	Species	Explanation for other	Plasma protein binding (% free fraction)	Other PK Differences (specify, e.g. clearance)	Study type

Explanation for other	Duration in weeks	Animals per group	Convulsion type	Time of appearance (minutes after dosing)	Time of appearance (number of doses into study)	Total C_{max} (µg/ml) at study MTD

Total AUC (µg*hr/ml) at study MTD	Total C_{max} (µg/ml) at convulsive dose	Total AUC (µg*hr/ml) at convulsive dose	Free C_{max} (µg/ml) at study MTD	Free AUC (µg*hr/ml) at study MTD	Free C_{max} (µg/ml) at convulsive dose

Free AUC (µg*hr/ml) at convulsive dose	Premonitory signs	Explanation for other	Mortality	C_{max} related?	Comments

Tabelle 18: Mustertabelle für das Abfragen von Daten zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome (speziell Krampfanfälle) der einzelnen pharmazeutischen Unternehmen im Rahmen des IQ-Konsortiums.

VI. Zusammenfassung

Kathrin Andrea Backes: *Speziesauswahl in der Neurowissenschaft bei toxikologischen Studien: Retrospektive Evaluierung der speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome beim Nictuator*

Um in klinischen Studien die Sicherheit für den Menschen zu gewährleisten, ist es in der Arzneimittelentwicklung im Rahmen der toxikologischen Studien gesetzlich vorgeschrieben, neue Wirkstoffe sowohl am Nager als auch am Nictuator zu testen (ICH Guideline M3(R2), 2009). Die Zulassungsbehörden fordern die Verwendung der empfindlichsten Spezies (FDA, 2005) für eine gute Übertragbarkeit auf den Menschen. Im Bereich der Neurowissenschaften liegt einer der Schwerpunkte speziell auf der Bewertung von neurologischen Symptomen, da hier Arzneimittel entwickelt werden, die neurologische Symptome behandeln sollen und bei denen auch mit Nebenwirkungen neurologischer Art bei Mensch und Tier zu rechnen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Literatur zum Thema Versuchstierauswahl des Nictuators zusammengetragen und eine Übersicht für Hund, Affe, Minipig, Kaninchen und Frettchen erstellt. Hunde (Beagle) und Affen (*Cynomolgus*) sind bis heute die am häufigsten genutzten Nictatorspezies in toxikologischen Studien (Smith & Trennery, 2002) (Jacobs, 2006). Da in der Literatur jedoch keine aussagekräftigen Daten zu finden waren, die einen direkten Vergleich für neurologische Symptome erlaubt hätten, wurde retrospektiv eine interne Datenbasis erstellt. Diese Datenbasis sollte daraufhin evaluiert werden, ob toxikologische Studien retrospektiv den direkten Vergleich zwischen den Spezies ermöglichen. Es wurden 15 Substanzen (Indikationsgebiete Neurowissenschaften und Schmerz) mit 7 Wirkmechanismen und insgesamt 174 toxikologische Studien aus einem Zeitraum von 1995 bis 2013 analysiert. Insgesamt wurden Daten von 1308 Mäusen, 7201 Ratten, 868 Hunden und 758 Affen berücksichtigt.

Das Auftreten von neurologischen Symptomen war nicht bei allen Substanzen in beiden Nictatorspezies gleich stark, was eine Auswertung über alle Substanzen hinweg nicht gestattete. Für eine Substanz jedoch waren für einen Vergleich neurologische Symptome in beiden Nictatorspezies in ausreichender Inzidenz und bei robusten Tierzahlen vorhanden. Symptomgruppen, aber auch einzelne Symptome wie Krämpfe oder Tremor

wurden ausgewertet. Wenn sie in Relation zu den Wirkstoffkonzentrationen im Blut gesetzt wurden, schienen bei Betrachtung der totalen Wirkstoffmenge im Blut Hunde leicht empfindlicher. Interessanterweise waren bei Berücksichtigung der freien Wirkstoffmenge im Blut (C_{\max} free) beide Tierarten ähnlich empfindlich, z.B. für Krämpfe. Spontane Krämpfe bei Kontrolltieren traten weder bei den Hunden noch bei den Affen auf. Die Inzidenz für Krämpfe war bei Hunden und Affen in etwa gleich und eine Geschlechtsdisposition beim Hund wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet. Somit kann die Aussage aus der Literatur, der Hund sei empfindlicher für spontane Krampfanfälle (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011), anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für substanzinduzierte Krampfanfälle nicht bestätigt werden. Im Einklang mit der Literatur ist das Symptom Tremor besonders hervorzuheben (Lichtfield, 1961) (Fletcher, 1978). Tremor war in der vorliegenden Analyse eins der am häufigsten aufgetretenen Symptome (Hund 16,24%, Affe 13,72%), ist ein relativ objektiv zu beobachtendes Symptom im Tierversuch, war am vergleichbarsten zwischen den beiden Tierspezies aufgetreten und ist daher vermutlich ein wertvoller Vergleichsparameter mit hohem prädiktiven Wert im Hinblick auf den Menschen. Das Erkennen und Bewerten von neurologischen Symptomen in toxikologischen Studien wurde tierartspezifisch diskutiert, genauso wie Abhängigkeit bestimmter Symptome von den Haltungsbedingungen, dem Grad an Erfahrung des tierbetreuenden Personals und dem Vokabular des verwendeten Dokumentationsprogramms. Grenzen der retrospektiven Analyse ergaben sich vor allem durch das Studiendesign, wie z.B. die Evaluierung von Symptomen und Messung der Wirkstoffkonzentrationen in toxikologischen Studien, die nur zu festgelegten Zeitpunkten stattfinden. Wirkstoffmengen zum Zeitpunkt des Auftretens des Symptoms fehlten, werden jetzt als Ergebnis dieser Arbeit in den Studien aber zusätzlich entnommen.

Die größte Schwierigkeit ist der Mangel an geeigneten Daten für einen direkten Vergleich. In dieser Arbeit wurde für eine geeignete Substanz eine eingehende Analyse erarbeitet. Über ein IQ-Konsortium mehrerer internationaler pharmazeutischer Unternehmen sollen weitere Beispiele gesucht und in gleicher Weise aufgearbeitet werden, was vor allem im Hinblick auf den Tierschutz von entscheidender Bedeutung ist, da so im Sinne des 3R-Prinzips die Datenbasis und Aussagekraft erweitert werden kann ohne zusätzliche Tierversuche durchführen zu müssen.

VII. Summary

Kathrin Andrea Backes: *Species selection in toxicological studies in the field of neuroscience: retrospective evaluation of species-specific sensitivity for neurological symptoms in the non-rodent*

To ensure human safety in clinical trials in the drug development process it is required by the regulatory agencies to test new drug candidates both on rodents and on non-rodents (ICH Guideline M3 (R2), 2009) in toxicological studies. The regulatory authorities require the use of the most sensitive species (FDA, 2005) for a good translatability to humans. In the field of neuroscience the focus is specifically on the evaluation of neurological symptoms, since in this field drugs are developed to treat neurological symptoms and are therefore prone to show neurological side effects in humans and animals.

In this thesis the literature on non-rodent species selection was compiled and an overview for dog, monkey, minipig, rabbit and ferret was created. Dogs (Beagle), and monkeys (Cynomolgus) are up to now the most commonly used non-rodent species in toxicology studies (Smith & Trennery, 2002) (Jacobs, 2006). However, there was a lack of meaningful data in the literature hindering a direct comparison for neurological symptoms. Therefore an internal database was retrospectively generated. This data base was evaluated analyzing whether toxicological studies allow retrospective direct comparison between species. Fifteen compounds (indications neuroscience and pain) were analyzed with 7 modes of action and a total of 174 toxicological studies of a period from 1995 to 2013. Overall, data from 1308 mice, 7201 rats, 868 dogs and 758 monkeys have been considered.

The occurrence of neurological symptoms was not equally strong for both species with all compounds, which made it impossible to evaluate all compounds as a whole in the two non-rodent species. Fortunately, for one compound neurological symptoms were present in both non-rodent species with sufficient incidence and reasonable animal numbers for comparison. Symptom groups as well as individual symptoms such as convulsions or tremor were evaluated. When compared in relation to drug levels in blood, dogs appeared slightly more sensitive by looking at the total substance amount

(C_{\max} total). Interestingly, when considering the amount of free drug levels in the blood (C_{\max} free) both species were similarly sensitive, e.g. for convulsions. No spontaneous convulsions occurred in control animals neither in dogs or in monkeys. The incidence of convulsions was similar in dogs and monkeys and a gender disposition in the dog was not observed in this thesis. Thus, the literature reports of dogs being more sensitive to spontaneous seizures (Redman & Weir, 1969) (Bielfelt et al., 1971) (Edmonds et al., 1979) (Easter et al., 2009) (Hasiwa & Bailey, 2011), could not be confirmed by the results of this thesis for substance-induced seizures. Consistent with literature reports the findings suggest that the symptom tremor is of particular interest (Litchfield, 1961) (Fletcher, 1978). In the present analysis tremor was one of the most frequently occurring symptoms (dog 16.24%, monkey 13.72%). It is a relatively objectively observable symptom in animal studies occurring in a comparable manner between the two animal species, and it is therefore considered to be a highly valuable parameter for comparison with a most probably high predictive value for humans. The identification and assessment of neurological symptoms in toxicology studies were discussed species-specifically as well as the impact of housing conditions, the level of experience of animal care staff, and the vocabulary of the documentation program used. Limitations of the retrospective analysis were given by the study design such as the evaluation of symptoms and measurement of drug concentrations in toxicological studies, which was conducted only at predefined time points. Drug levels at the time of occurrence of the symptoms were missing, but are now taken in all studies as an outcome of this thesis.

The largest obstacle for direct comparison is the lack of data. In this thesis, a detailed analysis has been prepared for a suitable substance. Via an IQ consortium of several international pharmaceutical companies further examples will be sought and analyzed similarly. This is particularly important with regard to animal welfare, since this would allow to extend the data base without further animal testing in the spirit of 3Rs.

VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basisdaten des Hundes als Versuchstierspezies.....	21
Tabelle 2: Basisdaten des Affen als Versuchstierspezies	28
Tabelle 3: Basisdaten des Minipigs als Versuchstierspezies.....	35
Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Nichtnagerspezies Hund, Affe und Minipig	47
Tabelle 5: Basisdaten des Kaninchens als Versuchstierspezies	48
Tabelle 6: Basisdaten des Frettchens als Versuchstierspezies	50
Tabelle 7: Übersicht über die 15 Substanzen der retrospektiven Datenanalyse mit ihren Wirkmechanismen und Indikationsgebieten	77
Tabelle 8: Getestete Tierarten und Auftreten von neurologischen Symptomen bei den 15 analysierten Substanzen.....	87
Tabelle 9: Auftreten von neurologischen Symptomen bei den Substanzen, für die sowohl Hunde- als auch Affendaten vorlagen	88
Tabelle 10: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der 15 analysierten Substanzen	90
Tabelle 11: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der Substanzen D, H und K	92
Tabelle 12: Relative Häufigkeit der aufgetretenen Symptome beim Nichtnager in den Studien der Substanz D	93
Tabelle 13: Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free), AUC und Plasmaproteinbindung der Einzeltiere mit Krämpfen für die Substanz D	98
Tabelle 14: Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free), AUC und Plasmaproteinbindung der Einzeltiere mit Tremor für die Substanz D	101
Tabelle 15: Wirkmechanismen und Plasmaproteinbindungsdaten der 15 analysierten Substanzen für Hund, Affe und Mensch	102
Tabelle 16: Durchschnittliche Blutplasmakonzentration der Substanz D bei Hunden und Affen bezogen auf verschiedene Symptomgruppen/Symptome.....	104
Tabelle 17: Übersicht über die jeweils empfindlichere Spezies für neurologische Symptome bei der Substanz D	104
Tabelle 18: Mustertabelle für das Abfragen von Daten zur speziesspezifischen Sensitivität für neurologische Symptome (speziell Krampfanfälle) der einzelnen pharmazeutischen Unternehmen im Rahmen des IQ-Konsortiums	123

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung eines neuen Medikaments: Dauer, Aktivitäten, Kosten und Anzahl der Kandidaten in jeder Phase nach Fischer/Breitenbach (2013).....	6
Abbildung 2: Übersicht über die relative Häufigkeit des Auftretens von neurologischen Symptomen bei den Nichtnagerspezies Hund und Affe für die Substanz D	93
Abbildung 3: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit neurologischen Symptomen für die Substanz D	95
Abbildung 4: Vergleich der aufgetretenen neurologischen Symptome bei Hunden und Affen in Relation zum totalen maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) für die Substanz D im Spiderplot.....	95
Abbildung 5: Vergleich der aufgetretenen neurologischen Symptome bei Hunden und Affen in Relation zum freien maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} free) für die Substanz D im Spiderplot.....	96
Abbildung 6: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit Krämpfen für die Substanz D.....	98
Abbildung 7: Vergleich der totalen maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total) der Einzeltiere mit Krämpfen (Substanz D)	99
Abbildung 8: Vergleich der freien maximalen Blutplasmaspiegel (C_{\max} free) der Einzeltiere mit Krämpfen (Substanz D)	99
Abbildung 9: Vergleich der durchschnittlichen Blutplasmaspiegel (C_{\max} total/ C_{\max} free) von Hunden und Affen mit Tremor (Substanz D).....	100

X. Literaturverzeichnis

- Alcock, S. J. (1971). An anti-inflammatory compound: Non-toxic to animals, but with an adverse action in man. *Proc. Eur. Soc. Stud. Drug Tox*, 12, 184–190.
- Antoniadis, A., Müller, W. E., & Wollert, U. (1980). Benzodiazepine receptor interactions may be involved in the neurotoxicity of various penicillin derivatives. *Annals of Neurology*, 8, 71–73.
- Asada, R., Shimizu, S., Ono, S., Ito, T., Shimizu, A., & Yamaguchi, T. (2013). Analysis of new drugs whose clinical development and regulatory approval were hampered during their introduction in Japan. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 38(4), 309–13. doi:10.1111/jcpt.12064
- Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS. (2009). *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. Fachinformation. <http://www.gv-solas.de/index.php?id=39>
- Bailey, J., Thew, M., & Balls, M. (2013). An analysis of the use of dogs in predicting human toxicology and drug safety. *Alternatives to Laboratory Animals*, 41(5), 335–50.
- Baldrick, P. (2011). Safety evaluation of biological drugs: what are toxicology studies in primates telling us? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59(2), 227–36. doi:10.1016/j.yrtph.2010.10.005
- Barrons, R. W., Murray, K. M., & Richey, R. M. (1992). Populations at risk for penicillin-induced seizures. *The Annals of Pharmacotherapy*, 26, 26–29.
- Bayrhuber, H., & Kull, U. (1998). *Linder Biologie* (21. Auflage). Schroedel Verlag GmbH, Hannover.
- Beach, J. E. (1982). The ferret for non-rodent toxicity studies - a pathologists view. *Archives of Toxicology*, 5, 279–82.
- Becker, K., & Baumgärtner, W. (2014). Pressemitteilung 12.03.2014 der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, *University of Veterinary Medicine, Hannover, Foundation: Neurologische Erkrankungen in der Veterinärmedizin*.
- Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118, 103–113. doi:10.1007/s00401-009-0522-3
- Berendt, M., & Gram, L. (1999). Epilepsy and Seizure Classification in 63 Dogs: A Reappraisal of Veterinary Epilepsy Terminology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(1), 14–20.

- Berendt, M., Hogenhaven, H., & Flagstad, A. (1999). Electroencephalography in dogs with epilepsy: similarities between human and canine findings. *Acta Neurol Scand*, 99, 276–283.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., Schmidt, J., Toyka, K., Lin, C., Gold, R. (2005). Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 445–55. doi:10.1084/jem.20051060
- Bielfelt, S. W., Redmann, H. C., & McClellan, R. O. (1971). Sire- and Sex-Related Differences in Rates of Epileptiform Seizures in a Purebred Beagle Dog Colony. *Am. J. Vet*, 32(12), 2039–2048.
- Bode, G., Clausing, P., Gervais, F., Loegsted, J., Luft, J., Nogues, V., & Sims, J. (2010). The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 196–220. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.009
- Booker, P. (2014). The use of second species in toxicology testing. *ATLA*, 42, 147–149.
- Broadhead, C. L., Betton, G., Combes, R., Damment, S., Everett, D., Garner, C., Wilson, S. (2000). Prospects for reducing and refining the use of dogs in the regulatory toxicity testing of pharmaceuticals. *Human & Experimental Toxicology*, 19(8), 440–447. doi:10.1191/096032700682694242
- Buckley, L. A., Benson, K., Davis-Bruno, K., Dempster, M., Finch, G. L., Harlow, P., Tabrizi, M. (2008). Nonclinical aspects of biopharmaceutical development: discussion of case studies at a PhRMA-FDA workshop. *International Journal of Toxicology*, 27(4), 303–12. doi:10.1080/10915810802367016
- Buckley, L. A., Chapman, K., Burns-Naas, L., Todd, M. D., Martin, P. L., & Lansita, J. A. (2011). Considerations regarding nonhuman primate use in safety assessment of biopharmaceuticals. *International Journal of Toxicology*, 30(5), 583–90. doi:10.1177/1091581811415875
- Bussiere, J. (2008). Species selection considerations for preclinical toxicology studies for biotherapeutics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(7), 871–7. doi:10.1517/17425255.4.7.871
- BVL. (2015). Tierarzneimittel. http://www.bvl.bund.de/DE/05_Tierarzneimittel/01_Aufgaben/02_ZulassungTAM/tam_zulassung_node.html
- Chapman, K., Pullen, N., Andrews, L., & Ragan, I. (2010). The future of non-human primate use in mAb development. *Drug Discovery Today*, 15(5-6), 235–42. doi:10.1016/j.drudis.2010.01.002
- Chapman, K., Pullen, N., Coney, L., Dempster, M., Andrews, L., Bajramovic, J., Robinson, V. (2009). Preclinical development of monoclonal antibodies: Considerations for the use of non-human primates. *Landes Bioscience*, 1(5), 505–516.

- Chapman, K., Pullen, N., Graham, M., & Ragan, I. (2007). Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(2), 115–20. doi:10.1038/nrd2155
- Clausing, P., Beitz, H., Gericke, S., & Solecki, S. (1986). On the usefulness of minipigs in toxicology testing of pesticides. *Archives of Toxicology*, 9, 225–271.
- Coleman, P. J., & Barrow, J. C. (2012). Challenges and Opportunities in Neuroscience Research. *Chem Med Chem*, 7, 339–341. doi:10.1002/cmdc.201200075
- Connolly, B., & Lang, A. (2014). Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*, 311(16), 1670–1683. doi:10.1001/jama.2014.3654
- Cornford, E., & Hyman, S. (1999). Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 145–163.
- D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., & Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4082–4085. doi:10.1073/pnas.91.9.4082
- Dalgaard, L. (2014). Comparison of minipig, dog, monkey and human drug metabolism and disposition. *J Pharmacol Toxicol Methods*. doi:10.1016/j.vascn.2014.12.005
- Dalla Costa, E., Minero, M., Lebelt, D., Stucke, D., Canali, E., & Leach, M. C. (2014). Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. *PloS One*, 9(3), e92281. doi:10.1371/journal.pone.0092281
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7–12. doi:10.1038/nprot.2006.2
- Deavall, D., Roberts, R., & Knight, R. (2014). The impact of preclinical data from non-rodent species in the risk assessment of anticancer small molecules - oral presentation Eurotox 2014, Edinburgh, Scotland.
- Dürmüller, N., Guillaume, P., Lacroix, P., Porsolt, R., & Moser, P. (2007). The use of the dog electroencephalogram (EEG) in safety pharmacology to evaluate proconvulsant risk. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(2), 234–8. doi:10.1016/j.vascn.2007.03.006
- Easter, A., Bell, M., Damewood, J., Redfern, W., Valentin, J., Winter, M., Bialecki, R. (2009). Approaches to seizure risk assessment in preclinical drug discovery. *Drug Discovery Today*, 14(17-18), 876–84. doi:10.1016/j.drudis.2009.06.003
- Ebino, K., Shutoh, Y., & Takahashi, K. (1993). Coprophagy in rabbits: autodigestion of hard feces. *Jikken Dobutso*, 42(4), 611–3.

- Edmonds, H., Hegreberg, G. A., Vangelder, N., Sylvester, D., Clemmons, R., & Chatburn, C. (1979). Spontaneous convulsions in beagle - *from the symposium Genetic Animal Models of Epilepsy presented by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics at the 63rd Annual Meeting of the Federation of the American Societies for Experimental Biology*. Dallas, Texas.
- Ekenstedt, K., Patterson, E., & Mickelson, J. (2012). Canine epilepsy genetics. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 23(1-2), 28–39. doi:10.1007/s00335-011-9362-2
- Ekenstedt, K., Patterson, E., Minor, K., & Mickelson, J. (2011). Candidate genes for idiopathic epilepsy in four dog breeds. *BMC Genetics*, 12(1), 38. doi:10.1186/1471-2156-12-38
- Ellegaard, L., Cunningham, A., Edwards, S., Grand, N., Nevalainen, T., Prescott, M., & Schuurman, T. (2010). Welfare of the minipig with special reference to use in regulatory toxicology studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 167–83. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.006
- EMA Guideline 1042:99. (2010). Guideline on repeated dose toxicity.
- EMA Guideline 28367/07. (2007). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigation medicinal products.
- EMA-Guideline. (2014). DRAFT: Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products.
- Emsley, R. (2009). Drugs in development for the treatment of schizophrenia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18, 1103–1118. doi:10.1517/13543780903066756
- Ennulat, D., Walker, D., Clemo, F., Magid-Slav, M., Ledieu, D., Graham, M., Boone, L. (2010). Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man. *Toxicologic Pathology*, 38(5), 810–28. doi:10.1177/0192623310374332
- EU-Richtlinie 2010/63/EU (2010).
- Faqi, A. (2012). A critical evaluation of developmental and reproductive toxicology in nonhuman primates. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(1), 23–32. doi:10.3109/19396368.2011.648821
- FDA. (2005). Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.
- FDA. (2015). From an Idea to the Marketplace: The Journey of an Animal Drug through the Approval Process.
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ResourcesforYou/AnimalHealthLiteracy/ucm219207.htm>

- Fischer, A., Jurina, K., Potschka, H., Rentmeister, K., Tipold, A., Volk, H., & von Klopmann, T. (2013). *Die idiopathische Epilepsie des Hundes* (1. Auflage). Enke-Verlag.
- Fischer, D., & Breitenbach, J. (2013). *Die Pharmaindustrie - Einblick, Durchblick, Perspektiven* (4. Auflage). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fletcher, A. P. (1978). Drug safety tests and subsequent clinical experience. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 71, 693–696.
- Forster, R., Ancian, P., Fredholm, M., Simianer, H., & Whitelaw, B. (2010). The minipig as a platform for new technologies in toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 227–35. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.007
- Forster, R., Bode, G., Ellegaard, L., & van der Laan, J. (2010a). The RETHINK project on minipigs in the toxicity testing of new medicines and chemicals: conclusions and recommendations. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 236–42. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.008
- Forster, R., Bode, G., Ellegaard, L., & van der Laan, J. (2010b). The RETHINK project--minipigs as models for the toxicity testing of new medicines and chemicals: an impact assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 158–9. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.003
- Frey, H., & Löscher, W. (2007). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. (Sonderausgabe). Enke Verlag.
- Fukaura, H. (2014). Disease modifying therapies in multiple sclerosis. *Nihon Rinsho*, 72(11), 2015–22.
- Gad, S. (1990). Model Selection in Toxicology : Principles and Practice. *Journal of the American College of Toxicology*, 9(3), 291–302.
- Gad, S. (2000). Pigs and Ferrets as Models in Toxicology and Biological Safety Assessment. *International Journal of Toxicology*, 19(3), 149–168. doi:10.1080/10915810050074928
- Gad, S. (2007). *Animal models in toxicology - second edition*. Tylor&Francis.
- Ganderup, N., Harvey, W., Mortensen, J., & Harrouk, W. (2010). The minipig as nonrodent species in toxicology - where are we now? *International Journal of Toxicology*, 31(6), 507–28. doi:10.1177/1091581812462039
- Gough, A., & Thomas, A. (2010). *Breed Predisposition to Disease in Dogs and Cats* (Second Edition). Wiley-Blackwell.
- Greaves, P., Williams, A., & Eve, M. (2004). First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(3), 226–36. doi:10.1038/nrd1329

- Hart, J. E. (1986). The ferret as a replacement for the dog in toxicity studies. *Animal Technology*, 37, 201–5.
- Harvey, W. (2014). An Introduction to Minipigs: A Nonrodent Species in Non-Clinical Safety Assessment - a oral presentation on the Charles River 20th annual Biotech Symposium 2014, Sept 8-10, La Jolla, CA.
- Hasiwa, N., & Bailey, J. (2011). t 4 Workshop Report * Critical Evaluation of the Use of Dogs in Biomedical Research and Testing in Europe. *Alternatives to Animal Experimentation*, 28(4), 326-40.
- Haus, T., Ferguson, B., Rogers, J., Doxiadis, G., Certa, U., Rose, N., Roos, C. (2014). Genome typing of nonhuman primate models: implications for biomedical research. *Trends in Genetics*, 30(11), 482–487. doi:10.1016/j.tig.2014.05.004
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–185. doi:10.1124/pr.57.2.4.173
- Heemskerk, J., Farkas, R., & Kaufmann, P. (2012). Neuroscience Networking: Linking Discovery to Drugs. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 287–288. doi:10.1038/npp.2011.177
- Heisters, D. (2013). Parkinson's: symptoms, treatments and research. *British Journal of Nursing*, 20(9), 548–554. doi:10.12968/bjon.2011.20.9.548
- Hejjas, K., Vas, J., Topal, J., Szantai, E., Ronai, Z., Szekely, A., Miklosi, A. (2007). Association of polymorphisms in the dopamin D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics*, 38, 629–633.
- Hodgman, T., Dasta, J., & Armstrong, D. (1984). Ampicillin-Associated Seizures. *South Med J*, 77(10), 1323-5.
- Höflinger, L. (2012). Flugverbot für Primaten. *Der Spiegel*, 17/2012, www.spiegel.de.
- Horner, S., Ryan, D., Robinson, S., Callander, R., Stamp, K., & Roberts, R. (2013). Target organ toxicities in studies conducted to support first time in man dosing: An analysis across species and therapy areas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(3), 334-43.
- Horvath, C., & Milton, M. (2009). The TeGenero incident and the Duff Report conclusions: a series of unfortunate events or an avoidable event? *Toxicologic Pathology*, 37(3), 372–83. doi:10.1177/0192623309332986
- Hubrecht, R., & Kirkwood, J. (2010). *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and other Research Animals* (8th edition). Wiley-Blackwell.
- Hurt, M. E., Cappon, G. D., & Browning, A. (2003). Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 611–619.

- IARC. (2001). Some thyrotropic agents: phenobarbital and its sodium salt. *IARC (International Agency for Research in Cancer) Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 79, 161–288.
- ICH Guideline M3(R2). (2009). Guideline on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation pharmaceuticals.
- ICH Guideline S3A. (1994). Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies.
- ICH Guideline S4. (1998). Guideline of the duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing).
- ICH Guideline S5(R2). (2005). Detecion of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to male Fertility.
- ICH Guideline S7A. (2000). Guideline of safety pharmacology studies for human phamaceuticals.
- ICH Guideline S9. (2009). Guideline of nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals.
- ICH Guideline S6(R1). (2011). Guideline of preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.
- IFAH. (2015). We are similar, but we are not the same: veterinary medicines vs human medicines - Infographic of the International Federation for Animal health (IFAH), www.ifahsec.org.
- Igarashi, T., Nakane, S., & Kitagawa, T. (1995). Predictability of clinical adverse reactions of drugs by general pharmacology studies. *The Journal of Toxicological Sciences*, 20, 77–92.
- Jacobs, A. (2006). Use of nontraditional animals for evaluation of pharmaceutical products. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(3), 345–9. doi:10.1517/17425255.2.3.345
- Janer, G., Slob, W., Hakkert, B., Vermeire, T., & Piersma, A. (2008). A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(2), 206–17. doi:10.1016/j.yrtph.2007.11.007
- Jiang, B., Shen, R., Bi, J., Tian, X., Hinchliffe, T., & Xia, Y. (2015). Catalpol: A Potential Therapeutic for Neurodegenerative Diseases. *Curr Med Chem*, 22(10), 1278–91.
- Jolivet, L., & Ward, W. (2005). Extrapolation of human pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey data: Molecular properties associated with extrapolative success or failure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(7), 1467–83. doi:10.1002/jps.20373

- Kanwar, J. R., Sriramoju, B., & Kanwar, R. K. (2012). Neurological disorders and therapeutics targeted to surmount the blood-brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3259–3278. doi:10.2147/IJN.S30919
- Keating, S. C. J., Thomas, A. A., Flecknell, P. A., & Leach, M. C. (2012). Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *PLoS ONE*, 7(9), 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0044437
- Killam, E. (1979). Photomyoclonic seizures in the baboon *Papio papio*. *Federation Proc.*, 38, 2429–2433.
- Killam, E., Stark, L., & Killam, K. (1967). Photic stimulation in three species of baboons. *Life Sci*, 6, 1569–74.
- King, G. (1990). Animal models in the study of vomiting. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(2), 260–268. doi:10.1139/y90-040
- Kobel, W., Fegert, I., Billington, R., Lewis, R., Bentley, K., Bomann, W., Spielmann, H. (2010). A 1-year toxicity study in dogs is no longer a scientifically justifiable core data requirement for the safety assessment of pesticides. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(1), 1–15. doi:10.3109/10408440903300098
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 711–715. doi:10.1038/nrd1470
- Kragh, P., Nielsen, A., Li, J., & Du, Y. (2009). Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res.*, 18(4), 545–58. doi: 10.1007/s11248-009-9245-4
- Kurz, A., & Grimmer, T. (2012). Die medikamentöse Behandlung der Demenz - Informationsbroschüre der deutschen Alzheimer Gesellschaft. www.deutsche-Alzheimer.de.
- LaFerla, F., & Green, K. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 1–13. doi:10.1101/cshperspect.a006320
- Lathers, C. M. (2003). Challenges and opportunities in animal drug development: a regulatory perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 1–4.
- Lehmann, H. (1998). The minipig in general toxicology. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. Suppl.*, 25, 59–62.
- Lichtfield, J. T. (1961). Forecasting Drug Effects in Man from Studies in Laboratory Animals. *JAMA*, 177, 104–108.
- Lichtfield, J. T. (1962). Symposium on clinical drug evaluation and human pharmacology. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 3, 665–672.

- Lin, Y.-W., Volk, H. A., Penderis, J., Tipold, A., & Ehlers, J. P. (2015). Development of learning objectives for neurology in a veterinary curriculum: part I: undergraduates. *BMC Veterinary Research*, 11, 1–9. doi:10.1186/s12917-014-0315-3
- Lind, N., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., & Hansen, A. (2007). The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(5), 728–51. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.02.003
- Loosli, R. (1964). Missbildungen am Kaninchen mit Thalidomid. *Pathol. Microbiol.*, 27, 1003–1011.
- Marquardt, H., & Schäfer, S. G. (2013). *Lehrbuch der Toxikologie* (3. Auflage). Wissenschaftsverlag Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich.
- Matthews, R. (2008). Medical progress depends on animal models - doesn't it? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101(2), 95–8. doi:10.1258/jrsm.2007.070164
- Miller, A., & Leach, M. (2015). Using the mouse grimace scale to assess pain associated with routine ear notching and the effect of analgesia in laboratory mice. *Laboratory Animals*, 49(2), 117–20. doi: 10.1177/0023677214559084
- Miller, D., Khan, O., Sheremata, W., Blumhardt, L., Rice, G., Libonati, M., O'Connor, P. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 348, 15–23.
- Miyamoto, S., Miyake, N., Jarskog, L. F., Fleischhacker, W. W., & Lieberman, J. A. (2012). Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1206–1227. doi:10.1038/mp.2012.47
- Müller, N., Brandt, J., Odoardi, F., Tischner, D., Herath, J., Flügel, A., & Reichardt, H. (2008). A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1405–1416. doi:10.1172/JCI32698.cacy
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Menzel, S., & Ruth, P. (2012). *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Pharmakologie, klinische Pharmakologie, Toxikologie* (10. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Nicholls, P. (1980). Neurotoxicity of penicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6, 161–172. doi:10.1177/146642407309300601
- OECD Guideline 409. (1998). OECD Guideline for the testing of chemicals - repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(1), 56–67. doi:10.1006/rtp.2000.1399

- Owens, A.H. (1962). Predicting anticancer drug effects in man from laboratory animal studies. *Journal of Chronic Diseases*, 15(3), 223–228. doi:10.1016/0021-9681(62)90003-6
- Pardridge, W. (1987). The gatekeeper: how molecules are screened for admission to the brain. *The Science*, 27, 50–55.
- Pardridge, W., & Landaw, E. (1984). Tracer kinetic model of blood-brain barrier transport of protein-bound ligands. Empiric testing of the free hormone hypothesis. *J. Clin. Invest.*, 74, 745–752.
- Pfeiffer, C. (1970a). Gastric surface morphology in man, monkey and ferret: Evidence for in situ surface cell degeneration. *Exp. Mol. Pathol.*, (13), 319–328. doi:10.1007/SpringerReference_42151
- Pfeiffer, C. (1970b). Surface topology of the stomach in man and the laboratory ferret. *J. Ultrastruct. Res.*, (33), 252–262. doi:10.1007/SpringerReference_42151
- Phillips, K., Bales, K., Capitanio, J., Conley, A., Czoty, P., 't Hart, B., Voytko, M. (2014). Why primate models matter. *American Journal of Primatology*, 76(9), 801–27. doi:10.1002/ajp.22281
- Plaa, G. L. (1976). Animal models in the safety evaluation process. *Austr. J. Pharm. Sci. NSS*, 75–63.
- Poddar, S., & Murgatroyd, L. (1976). Morphological and histological study of the gastrointestinal tract of the ferret. *Acta Anat.*, 96, 321–334.
- Porsolt, R. (2012). The usefulness of non-human primates in central nervous system safety pharmacology - a oral presentation at the Safety Pharmacology Society Meeting in Phoenix (Arizona) in October 2012.
- Porsolt, R., Roux, S., & Wettstein, J. (1995). Animal models of dementia. *Drug Development Research*, 35(4), 214–229. doi:10.1002/ddr.430350403
- Redman, H. C., & Weir, J. E. (1969). Detection of naturally occurring neurologic disorders of beagle dogs by electroencephalography. *Am. J. Vet. Res.*, 30, 2075–2082.
- Rodrigues, A., & Rollison, H. (2013). In vitro exploration of potential mechanisms of toxicity of the human hepatotoxic drug fenclozic acid. *Archives of Toxicology*, 87(8), 1569–1579.
- Rosenberg, G. A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood – brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1139–1151. doi:10.1038/jcbfm.2011.197
- Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. D. (2005). Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna, Chapter 10, Unit 10.10*. doi:10.1002/0471141755.ph1010s27

- Rubin, S. M. (2013). Management of multiple sclerosis: An overview. *Disease-a-Month*, 59, 253–260. doi:10.1016/j.disamonth.2013.03.012
- Salomone, S., Caraci, F., Leggio, G. M., Fedotova, J., & Drago, F. (2012). New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: Focus on disease modifying drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 73, 504–517. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x
- Schein, P. S. (1970). The evaluation of anticancer drugs in dogs and monkeys for the prediction of qualitative toxicities in man. *Clin. Pharma*, 11, 3–40.
- Schmitz-Hübsch, T., Du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Klockgether, T. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia. *Neurology*, 66(1), 1717–1720. doi:10.1212/01.wnl.0000237953.63630.a6
- Schoepp, D. D. (2011). Where will new neuroscience therapies come from? *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 715–716. doi:10.1038/nrd3559
- Serdaru, M., Bernard, D., & Lhermitte, F. (1982). Generalized seizures and ampicillin. *Lancet*, 2, 617–8.
- Sewell, F., Chapman, K., Baldrick, P., Brewster, D., Broadmeadow, A., Brown, P., Hill, M. (2014). Recommendations from a global cross-company data sharing initiative on the incorporation of recovery phase animals in safety assessment studies to support first-in-human clinical trials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 70(1), 413–29. doi:10.1016/j.yrtph.2014.07.018
- Shepard, T. H. (1998). *Catalog of teratogenic agents* (9th edition). Johns Hopkins University Press, Baltimore (MD).
- Simianer, H., & Köhn, F. (2010). Genetic management of the Göttingen Minipig population. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62, 221–226. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.004
- Smith, D., Broadhead, C., Descotes, G., Fosse, R., Hack, R., Krauser, K., Jacobsen, S. D. (2002). Preclinical safety evaluation using nonrodent species: an industry/welfare project to minimize dog use. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 43, 39–42.
- Smith, D., & Trennery, P. (2002). Non-rodent selection in pharmaceutical toxicology - A 'Points to Consider' document, developed by the ABPI in conjunction with the UK Home Office.
- Smith, D., Trennery, P., Farningham, D., & Klapwijk, J. (2001). The selection of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) in pharmaceutical toxicology. *Laboratory Animals*, 35(2), 117–30.
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain

- in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, 7(1), 55.
doi:10.1186/1744-8069-7-55
- Spielmann, H., & Gerbracht, U. (2001). The use of dogs as second species in regulatory testing of pesticides. *Archives of Toxicology*, 75(1), 1–21.
doi:10.1007/s002040000195
- Sridhara, R., Johnson, J., Justice, R., Keegan, P., Chakravarty, A., & Pazdur, R. (2010). Review of oncology and hematology drug product approvals at the US Food and Drug Administration between July 2005 and December 2007. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(4), 230–43. doi:10.1093/jnci/djp515
- Szabó, C. Á., Leland, M. M., Knape, K., Elliott, J. J., Haines, V., & Williams, J. T. (2005). Clinical and EEG phenotypes of epilepsy in the baboon (*Papio hamadryas* spp.). *Epilepsy Research*, 65, 71–80. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.05.003
- Tamimi, N. M., & Ellis, P. (2009). Drug development: From concept to marketing! *Nephron - Clinical Practice*, 113, 125–131. doi:10.1159/000232592
- Tanner, C. M. (2013). A second honeymoon for Parkinson's disease? *The New England Journal of Medicine*, 368, 675–6. doi:10.1056/NEJMe1214913
- Thornton, P. C., Wright, P. A., Sacra, P. J., & Goodier, T. E. W. (1979). The ferret, *Mustela putorius furo*, as a new species in toxicology. *Laboratory Animals*, 13(2), 119–124. doi:10.1258/002367779780943422
- Tierschutzgesetz (2010).
- Van der Laan, J., Brightwell, J., McAnulty, P., Ratky, J., & Stark, C. (2010). Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62, 184–195.
- Van Meer, P., Kooijman, M., Gispen-de Wied, C., Moors, E., & Schellekens, H. (2012). The ability of animal studies to detect serious post marketing adverse events is limited. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 64, 345–349.
- Van Ryzin, R., & Trapold, J. (1980). The toxicology profile of the anti-inflammatory drug proquazone in animals. *Drug. Chem. Toxicol.*, 3(4), 361–79.
- Vargas, H., Amouzadeh, H., & Engwall, M. (2013). Nonclinical strategy considerations for safety pharmacology: evaluation of biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Safety*, 12(1), 91–102. doi:10.1517/14740338.2013.745851
- Vinnitsky, V. B., & Glinsky, G. V. (1987). Role of the binding of neuropeptides to blood plasma proteins in the control of their blood-brain barrier passage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 496, 278–291.

- Vries, R. B. M. De, Wever, K. E., Avey, M. T., Stephens, M. L., Sena, E. S., & Leenaars, M. (2014). The usefulness of systematic reviews of animal experiments for the design of preclinical and clinical studies. *ILAR Journal*, 55(3), 427–437. doi:10.1093/ilar/ilu043
- Webster, J., Bollen, P., Grimm, H., & Jennings, M. (2010). Ethical implications of using the minipig in regulatory toxicology studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), 160–6. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.002
- Whysner, J., Ross, P. M., & Williams, G. M. (1996). Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.*, 71, 153–191.
- Xingrong, L., Wright, M., & Hop, C. (2014). Rational Use of Plasma Protein and Tissue Binding Data in Drug Design. *J. Med. Chem.*, 57(20), 8238–48.
- Yamada, T., Okuda, Y., Kushida, M., Sumida, K., Takeuchi, H., Nagahori, H., Kawamura, S. (2014). Human Hepatocytes Support the Hypertrophic but not the Hyperplastic Response to the Murine Nongenotoxic Hepatocarcinogen Sodium Phenobarbital in an In Vivo Study Using a Chimeric Mouse with Humanized Liver. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 142(1), 137-57. doi:10.1093/toxsci/kfu173
- Zbinden, G. (1991). Predictive value of animal studies in toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 14, 167–177. doi:10.1016/0273-2300(91)90004-F

XI. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die auf verschiedene Weise direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Heidrun Potschka danke ich für ihre Bereitschaft mich als externe Doktorandin zu betreuen und für die Ermöglichung der Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Herzlichen Dank für die gute und wissenschaftliche Betreuung, die konstruktive Kritik, das Korrekturlesen und das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein größter Dank gilt Katja Hempel für die Bereitstellung des Themas, die außerordentlich gute Betreuung, die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und die Korrektur dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich für ihr Vertrauen, ihr persönliches Engagement und ihr offenes Ohr für wissenschaftliche und private Fragestellungen herzlich bedanken. Danke sagen möchte ich auch für ihre einmalige und besondere Gabe stets zu begeistern und die Förderung meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung.

Helga Lorenz danke ich für ihre fachliche Unterstützung, ihre wertvolle Hilfe, ihre geduldige Anleitung und die gute Zusammenarbeit.

Tom Hudzik, Loic Laplanche, Florian Hofmaier und Susanne Rensing möchte ich dafür danken, dass sie mir im Rahmen des Projektes bei auftauchenden Fragen hilfreich zur Seite standen.

Paul Germann, Loretta Gallenberg und Sherry Ralston danke ich für die Möglichkeit die Dissertation bei AbbVie anzufertigen, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die wissenschaftliche Begleitung und Unterstützung.

Martina Kron und Hyuna Yang danke ich für die geduldige statistische Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Ein unschätzbarer Dank gilt Karsten, meinen Eltern, meiner Familie im engeren und weiteren Sinne und meinen Freunden, die mich alle unentwegt und bedingungslos in allen Lebenslagen unterstützen und ermutigen und immer für mich da sind. Danke.