

1 Biopharmazie – Entwicklung und Begriffsbildung

Pharmakotherapie ist überwiegend Applikation von Arzneizubereitungen. Selten erhält der Patient einen reinen Arzneistoff ohne weitere Formulierung.

Historisches

Bis in die späten fünfziger Jahre wurde die Arzneimittelwirkung aus der Kombination der Effekte von Arzneistoff und Arzneistoffdosis erklärt. Nach dieser Theorie entfaltet der Arzneistoff im Organismus eine pharmakodynamische Wirkung, wenn er in hinreichender Dosis zugeführt wird. Die Arzneiform hingegen hat im Wesentlichen die Aufgabe, den Arzneistoff in dieser Dosierung applikationsfähig zu machen.

Arzneistoff und Arzneiform. Seither hat sich die Lehrmeinung über die Rolle, die die Arzneiform in diesem Zusammenhang spielt, gewandelt. Ausgelöst durch Therapieversager, die zunächst nicht erklärbar erschienen, entwickelten sich zwischen 1960 und 1970 erste Vorstellungen über den Einfluss der Arzneiformen und bestimmter Arzneistoffparameter auf die Arzneimittelwirkung.

Die Arzneimittelwirkung ist als eine Komponente der Arzneiform im Laufe der Zeit immer stärker in den Vordergrund getreten. Dies wurde zunächst deutlich bei nicht ausreichend wirksamen Prednison-Tabletten (1963), dann u. a. bei Chloramphenicolpalmittat-Suspensionen (1967), bei Tolbutamid-Tabletten (1968) und Oxytetracyclin-Kapseln (1969), schließlich unter dem Eindruck des „Phenytoin-Zwischenfalls“ (1970) (► Kap. 5.1).

Arzneiform und Bioverfügbarkeit. Geschwindigkeit und Ausmaß der Absorption des Arzneistoffs, d. h. seine Bioverfügbarkeit, sind wesentliche Wirkungsvoraussetzungen. Die Arzneiform kann über die Freisetzung des Arzneistoffs, d. h. seine Liberation, die Bioverfügbarkeit beeinflussen. Sie wirkt als Arzneistofffreigabesystem. Für diese Komponente der Arzneimittelwirkung hat sich der Begriff „biopharmazeutisch“ weitgehend durchgesetzt.

Biopharmazie. Eine Einführung in „Biopharmaceutics“ gaben erstmals 1958 Kurse an der University of California. Die Bezeichnung wird auf Levy zurückgeführt. Einer breiteren Öffentlichkeit wurde sie von Wagner in einem Übersichtsreferat „Biopharmaceutics: Absorption Aspects“ vorgestellt. Im deutschen Sprachraum setzte sich die daraus abgeleitete und nicht unumstrittene Übertragung „Biopharmazie“ durch. Analoge Wortbildungen gingen parallel dazu in andere Sprachen ein.

Die Entwicklung der Biopharmazie wurde in den letzten drei Jahrzehnten in erster Linie durch die stetig ausgeweitete Forschung gefördert, die bis heute eine kaum übersehbare Datenfülle bereitgestellt hat. Darüber hinaus haben Symposien, Konferenzen und Kongresse zur Fundierung der wissenschaftlichen Basis, zur Theorienbildung und zur Verbreitung der Ergebnisse des neuen Wissenschaftsgebiets beigetragen.

Von großer Bedeutung waren hier der 28. Internationale Kongress der F.I.P. in Montpellier (1967) und ein Symposium in Washington D.C. (1969). Für die Entwicklung der Biopharmazie im europäischen Raum waren die von Zathurecky angeregten „Symposien über Biopharmazie und Pharmakokinetik“ in Smolenice (1970, 1974), Bratislava (1978), Strbske Pleso (1982) und Piestany (1986) wichtig. Speziell die Entwicklung einer einheitlichen wissenschaftlichen Terminologie in der Biopharmazie wurde durch diese Tagungen gefördert.

Nach 1970 wurde die Entwicklung in speziellen Lehrbüchern oder in Kapiteln der Titel zur Pharmazeutischen Technologie und Arzneimittelkontrolle dargestellt. Als Folge einer zunehmenden wissenschaftlichen Fundierung und eines wachsenden Bedürfnisses der pharmazeutischen Praxis wurde die Biopharmazie in Deutschland nach 1970 in die pharmazeutische Hochschulausbildung integriert, teils als selbstständiges Fach, teils im Rahmen der Pharmazeutischen Technologie. Die erste Dozentur für Biopharmazie wurde 1967 errichtet (Jena), der erste Lehrstuhl 1976 (Greifswald).

Arzneiformenlehre. Man kann „Biopharmaceutics“ auch als „Biogalenik“ verstehen, wenn man „Pharmaceutics“ sinngemäß übersetzt. Damit wird die Biopharmazie zum integralen Bestandteil der Pharmazeutischen Technologie, eine Auffassung, die derzeit vor allem in Deutschland vertreten wird. Andererseits kann man Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie als „Arzneiformenlehre“, mit enger Beziehung zur Pharmakologie, begreifen. Dies leitet sich aus der Aufgabe der Biopharmazie ab, zum umfassenden Verständnis des Arzneimittelschicksals im Organismus humanbiologische, medizinische, physikalische und chemische Erkenntnisse mit pharmazeutischen, speziell pharmazeutisch-technologischen, zusammenzuführen.

Begriffsdefinitionen

Eine einheitliche Definition des Begriffs Biopharmazie konnte sich aufgrund von differierenden Auffassungen in den einzelnen Ländern bisher nicht durchsetzen, offenbar bedingt durch Nuancen in der Interpretation des Inhalts. Es sind jedoch zwei Grundauffassungen erkennbar, je nachdem, ob der systematisierende (1) oder der praxisorientierte Aspekt (2) in den Vordergrund rückt:

1. Die Biopharmazie beschäftigt sich mit der Abhängigkeit der Absorption, der Distribution, des Metabolismus, des Verweilens bzw. der Ausscheidung der Arzneistoffe im menschlichen oder tierischen Körper von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe und Arzneiformen. Es handelt sich im Wesentlichen um die optimale oder gewünschte „Zur-Verfügung-Stellung“ von Arzneistoffen (drug availability) aus der Arzneiform für das Erfolgsorgan, also um den Einfluss der Arzneiformung (Formulierung) auf die biologische Aktivität der Arzneistoffe (Ritschel 1968).
2. Die Biopharmazie beschäftigt sich mit dem Studium derjenigen Faktoren, die die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels bei Mensch oder Tier beeinflussen. Sie nutzt diese Information zur Optimierung der pharmakologischen oder therapeutischen Aktivität von Arzneimitteln in der klinischen Anwendung (Notari).

In Anlehnung an Ritschel kann Biopharmazie wie folgt definiert werden:

- **DEFINITION** Biopharmazie ist die Lehre von den Zusammenhängen zwischen den physikalischen, physikalisch-chemischen und chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe und Arzneiformen sowie den morphologisch-physiologischen Gegebenheiten des Organismus einerseits und der Liberation, Absorption, Distribution, Biotransformation und Exkretion andererseits.
- **MERKE** Durch die Charakterisierung und Interpretation der Zusammenhänge zwischen Arzneistoff/Arzneiform und Wirkungsstärke stellt die Wissenschaftsdisziplin Biopharmazie eine wesentliche Grundlage für die rationale Entwicklung und Optimierung neuer Arzneiformen dar.

2 Grundprinzipien des Stofftransports

Einführung... 4 | Biologische Barrieren... 5 | Diffusion... 9 | Filtration durch Poren... 20 | Osmose... 21 | Membranproteinvermittelte Transportprozesse... 23 | Endozytosen... 34

2.1 Einführung

Bei Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion von Pharmaka muss eine Vielzahl von physiologischen Kompartimenten und biologischen Barrieren überwunden werden. Diese Transportvorgänge werden durch zahlreiche Mechanismen und vielfältige Prozesse gewährleistet.

Im Organismus werden die großen Transportwege durch **Konvektion** vermittelt. Die wichtigsten Konvektionssysteme sind das Atem- und Herz-Kreislauf-System sowie der Verdauungskanal.

Für den Stofftransfer über kleine Strecken auf zellulärer und subzellulärer Ebene stehen Prozesse, wie **Diffusion**, **Filtration** und **membranproteinvermittelte Mechanismen**, im Vordergrund. Diese Transportvorgänge sind spezifisch und dienen der intra- und extrazellulären Verteilung von Wirkstoffen in bestimmten Kompartimenten, die durch Zellmembranen bzw. Epithelien begrenzt sind und dementsprechend überwunden werden müssen.

Bei molekularen Transportprozessen ist zu differenzieren zwischen

- der reinen Diffusion innerhalb **einer Phase**,
- Transportprozessen unter Verteilung zwischen **zwei Phasen** (Durchdringung einer Phasengrenze): Stoffübergang bzw. Penetration,
- Transportprozessen unter Verteilung zwischen **drei Phasen** (Beteiligung von zwei Phasengrenzen): Stoffdurchgang bzw. Permeation.

Unter anatomisch-physiologischen Gesichtspunkten lassen sich interzelluläre (parazelluläre) und transzelluläre Transportprozesse unterscheiden.

Beim **interzellulären Stoffaustausch** spielen folgende Mechanismen eine Rolle:

- Diffusion durch interzelluläre Poren bzw. Lücken,
- Filtration durch interzelluläre Poren.

Als eine weitere Möglichkeit des interzellulären Transports ist die **Persorption** (partikuläre Absorption) anzusehen, mit der die begrenzte enterale Absorption einiger Materialien im kolloiden bis feindispersen Größenbereich (z. B. Peptidhormone, Toxine, Stärkekörner, Asbestfasern, Viren) erklärt wird. Die Persorption soll durch Lücken im Epithel-

verband, die durch Zellabstoßung an den Spitzen der Darmzotten entstehen, ermöglicht werden. Der Abtransport der Materialien erfolgt mit dem Lymphstrom.

Unter den **transzellulären Prozessen** stehen solche, bei denen der Stoff die Zellmembran durchdringt (transmembranale Prozesse) im Vordergrund, unabhängig davon, ob daran ein molekularer Partner (Transportprotein) beteiligt ist oder nicht. Den Transport in die Zelle hinein bezeichnet man als **Influx**, den aus der Zelle heraus als **Efflux**. Zum transmembranären Arzneistofftransport gehören das

- Prinzip der Lipiddiffusion (Diffusion durch die Matrix der Membran) und
- membranproteinvermittelte Transportprozesse (aktiver Transport und erleichterte Diffusion).

Diese sind von den **Endozytosen** (Phagozytose, Pinozytose, Zytopenpesis) abzugrenzen, bei denen es zu einer Invagination der Zellmembran und zum Abschnüren von Vesikeln kommt.

- **MERKE** Unter energetischen Aspekten unterscheidet man passive und aktive Transportprozesse. Beim **passiven Transport** wird kein ATP verbraucht. Hierzu gehören Vorgänge wie Lipiddiffusion, Filtration, Osmose, kanalprotein- und carriervermittelte Transportprozesse. Der **aktive Transport** wird durch membranständige Transportproteine vermittelt. Er ist energieverbrauchend und verläuft gegen einen Konzentrationsgradienten.

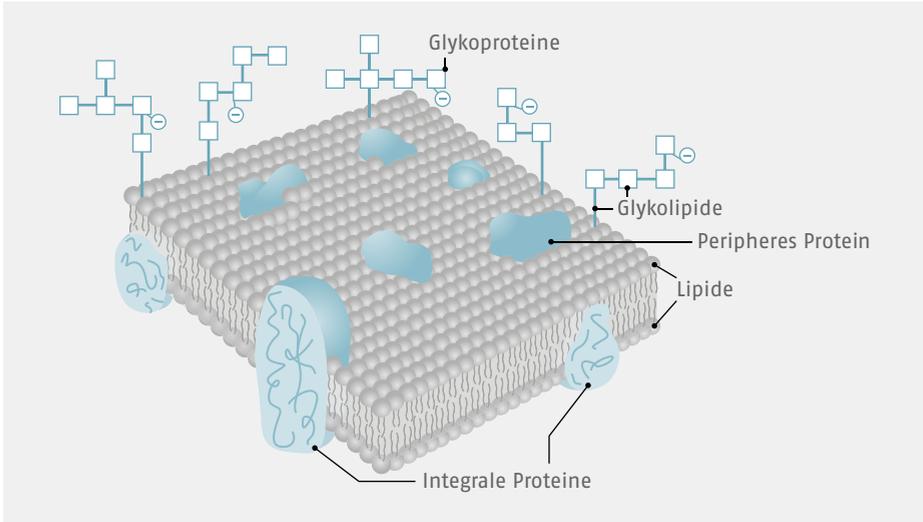
Die Energie wird bei den primär aktiven Transportprozessen direkt durch die Hydrolyse von ATP, vermittelt durch die ATPase-Aktivität der Transportproteine, bereitgestellt. Bei einem sekundär aktiven Transport ist die Energiebereitstellung an einen primär aktiven Transport gekoppelt. Dieser schafft beispielsweise einen elektrochemischen Gradienten, der dann den Antrieb für den Transportvorgang bildet.

2.2 Biologische Barrieren

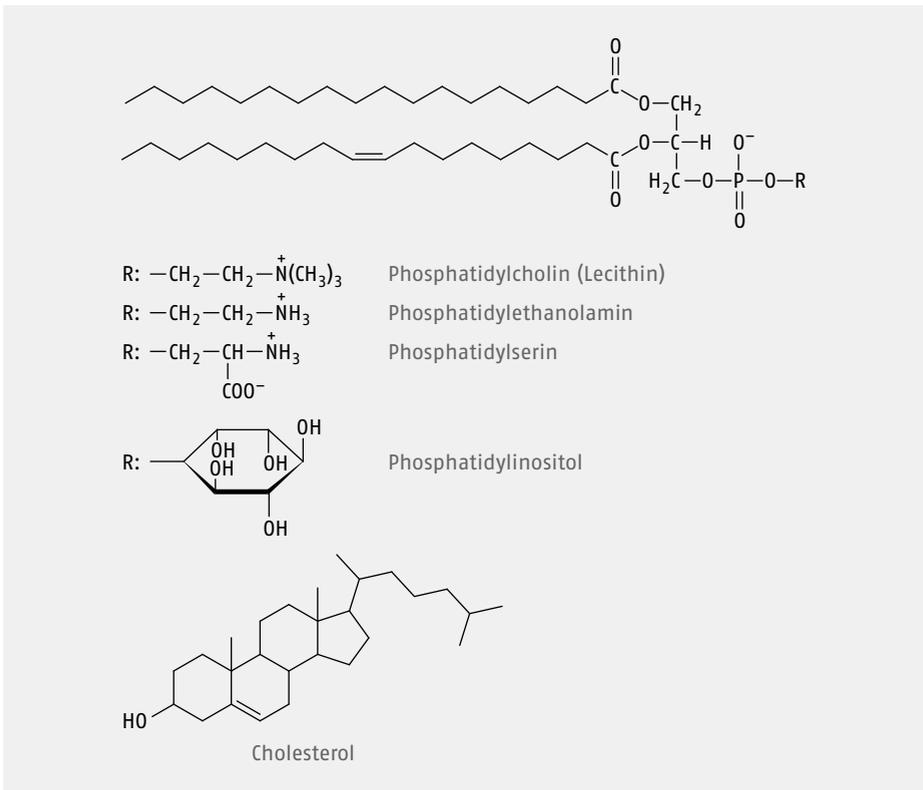
2.2.1 Biomembranen

Von einigen Ausnahmen (z. B. glomeruläre Filtration und Stoffaustausch im Bereich der Lebersinusoiden) abgesehen, sind interzelluläre Transportprozesse für die Absorption, Verteilung und Elimination der Pharmaka wegen des geringen Flächenanteils der interzellulären Poren bzw. Lücken allgemein von untergeordneter Bedeutung. Dementsprechend spielen biologische Membranen als Barrieren für Arzneistoffmoleküle eine wichtige Rolle.

Fluid-Mosaik-Modell. Nach diesem auf Singer und Nicolson (1972) zurückgehenden Modell bestehen Biomembranen aus einer Lipiddoppelschicht, in die mosaikartig Proteine eingelagert sind (● Abb. 2.1). Die Doppelschicht resultiert aus der Orientierung der aus polaren Kopfgruppen und apolaren Schwanzteilen bestehenden Lipide (● Abb. 2.2) im wässrigen Milieu durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die einzelnen Lipidmoleküle sind wegen der hohen Flexibilität der Kohlenwasserstoffketten (Schwanzteile) beweglich. Bewegungen mit einer wesentlichen Änderung der Kopf-Schwanz-Position sind allerdings eingeschränkt. Dementsprechend verhält sich die Lipiddoppelschicht wie eine zweidimensionale Flüssigkeit (fluid). In Abhängigkeit von der Temperatur können darin Übergänge vom flüssigkristallinen in den kristallinen Zustand auftreten.



• Abb. 2.1 Schema der Zellmembran. Nach Singer und Nicolson



• Abb. 2.2 Membranlipide

6.3 Biologische und biochemische Grundlagen

6.3.1 Enzyme

Mikrosomales Monooxygenasesystem

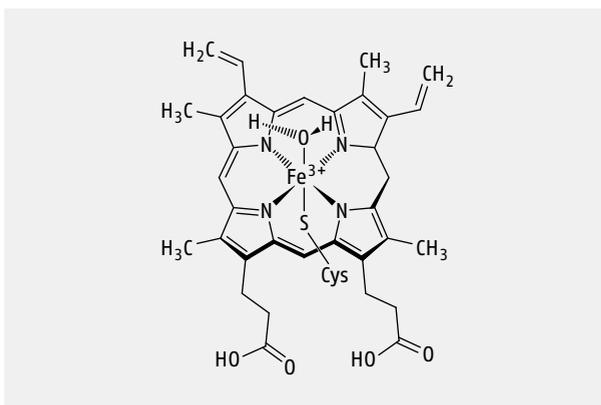
Wie bereits erwähnt (►Kap.6.2), stellt die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat eine der fundamentalen Biotransformationsreaktionen dar. Sie wird von mikrosomalen Monooxygenasen (der Begriff stammt von Hayaishi, 1955) realisiert.

Das 1958 von Klingenberg und Garfinkel entdeckte **Cytochrom P-450 (Cyt P-450)** bzw. dessen inzwischen nachgewiesenen Isoformen (s. u.) sind die terminalen Enzyme, die Sauerstoff binden, aktivieren und auf das Substrat übertragen.

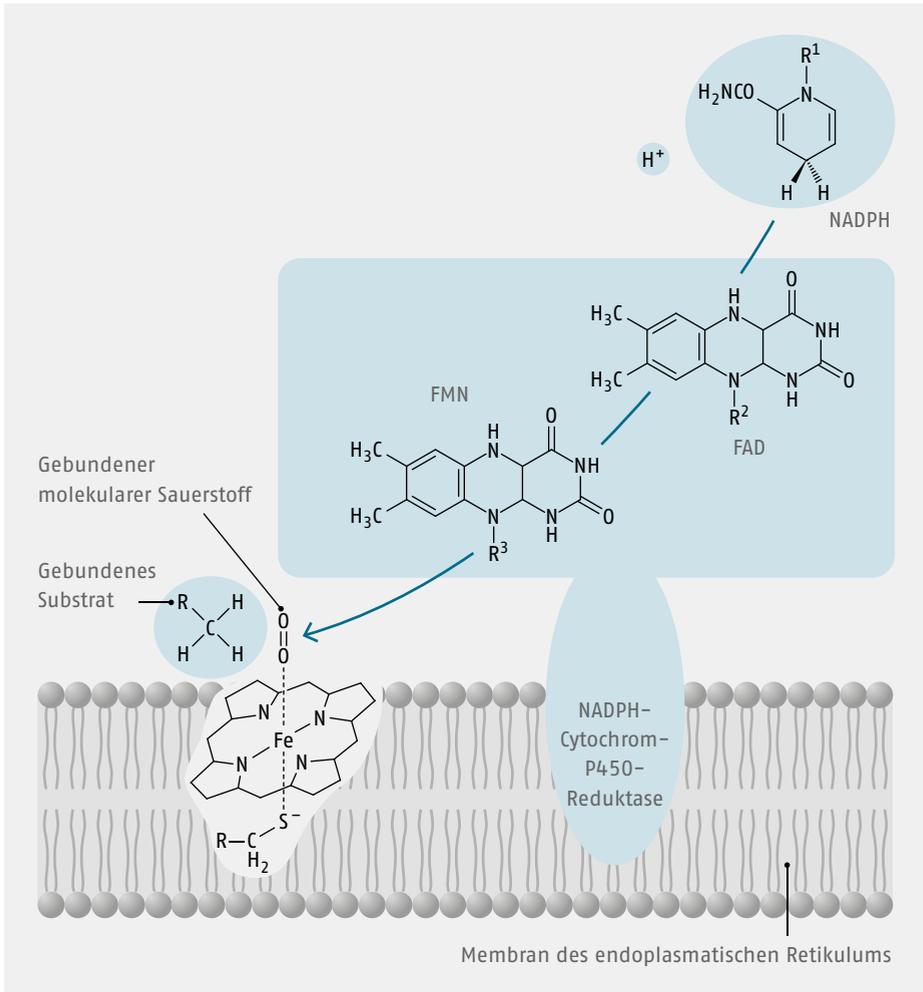
- **MERKE** Cytochrom P-450 ist das Schlüsselenzym der Biotransformation. Es ist bei den meisten fremdstoffmetabolischen Prozessen beteiligt und schafft strukturelle Voraussetzungen für sog. postoxidative Reaktionen.

Cyt P-450 ist ein Hämoprotein, das membranständig im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. Die prosthetische Gruppe von Cyt P-450, das Häm, ist durch hydrophobe Wechselwirkungen und durch eine koordinative Bindung an die Proteinkomponente gebunden. Im Ruhezustand, d. h. bei Substratabwesenheit, liegt das Hämeisenzentrum von Cyt P-450 als hexakoordinierter Fe(III)-Komplex im Low-spin-Zustand vor (◉Abb. 6.9).

Vier der sechs Liganden des Hämeisens im Cyt P-450 sind mit Pyrrol-Stickstoff des Porphyrinringsystems koordiniert. Als 5. Ligand ist ein Cysteinrest der Proteinkomponente über seinen Mercaptidschwefel mit dem Hämeisen verbunden. Die Elektronen-Donor-Eigenschaften des Mercaptidschwefels sind von Bedeutung für die Sauerstoffaktivierung, die ein sehr energieaufwendiger Prozess ist (502 kJ; 120 kcal). In Bezug auf den 5. Hämeisenliganden, der Einfluss auf die optischen und katalytischen Eigenschaften hat, unterscheidet sich Cyt P-450 von anderen Hämoproteinen, bei denen häufig der Imidazolstickstoff eines Histidinrestes der Proteinkomponente als 5. Hämeisenligand fungiert. Die 6. Koordinationsstelle des Hämeisens im Fe(III)-Low-spin-Zustand (s. u.) ist durch Wasser besetzt und wird beim reduzierten Cyt P-450 von einem Sauerstoffmolekül eingenommen.

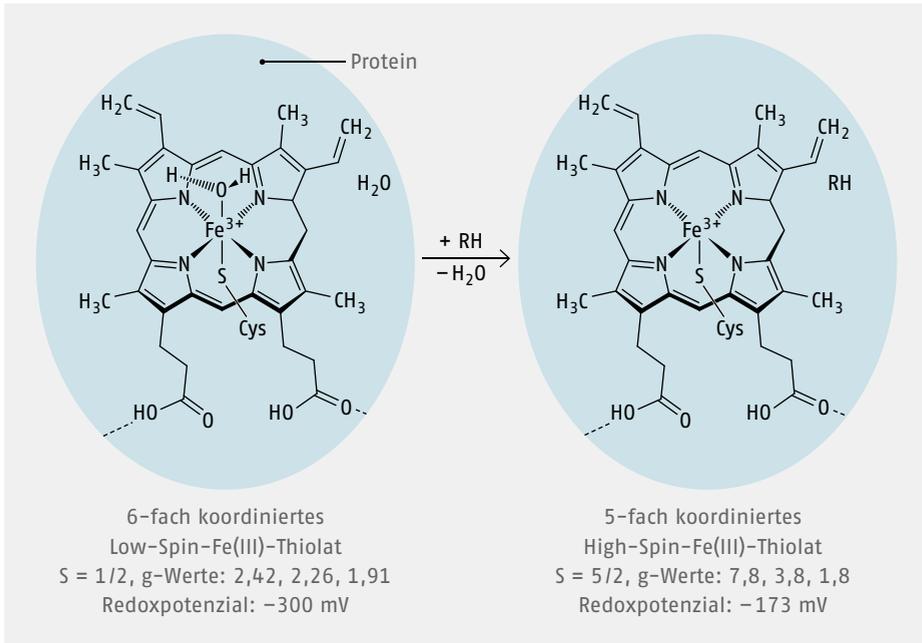


◉ **Abb. 6.9** Hämeisenzentrum von Cyt P-450 bei Substratabwesenheit (im Ruhezustand). Modif. nach Lippard und Berg



• **Abb. 6.10** Anordnung der Bestandteile des Cyt-P-450-abhängigen Monoxygenasesystems im endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach Ruckpaul

Die zweite enzymatische Komponente des Cyt-P-450-abhängigen Monoxygenase-Systems ist das Flavinenzym **NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase**. Diese ist benachbart zum Cyt P-450 in der ER-Membran angeordnet (• Abb. 6.10) und dient der Übertragung von zwei Elektronen vom NADPH + H⁺ auf das Cyt P-450-Häm-eisenzentrum in zwei distinkten Reduktionsschritten. Für den ungestörten Elektronentransfer ist die Ausbildung von Clusterstrukturen zwischen Cyt P-450 und der Reduktase in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) unter Beteiligung von Phospholipiden erforderlich. Bei In-vitro-Versuchen ließen sich verschiedene Cyt-P-450-Isoenzyme die aus verschiedenen Spezies isoliert wurden, mit NADPH-Cyt-P-450-Reduktasen rekonstituieren, wobei die Zugabe von Phosphatidylcholin für die Ausbildung der Clusterstrukturen essenziell war. Für die enzymatische Aktivität spielte die Herkunft der Reduktase jedoch eine untergeordnete Rolle.

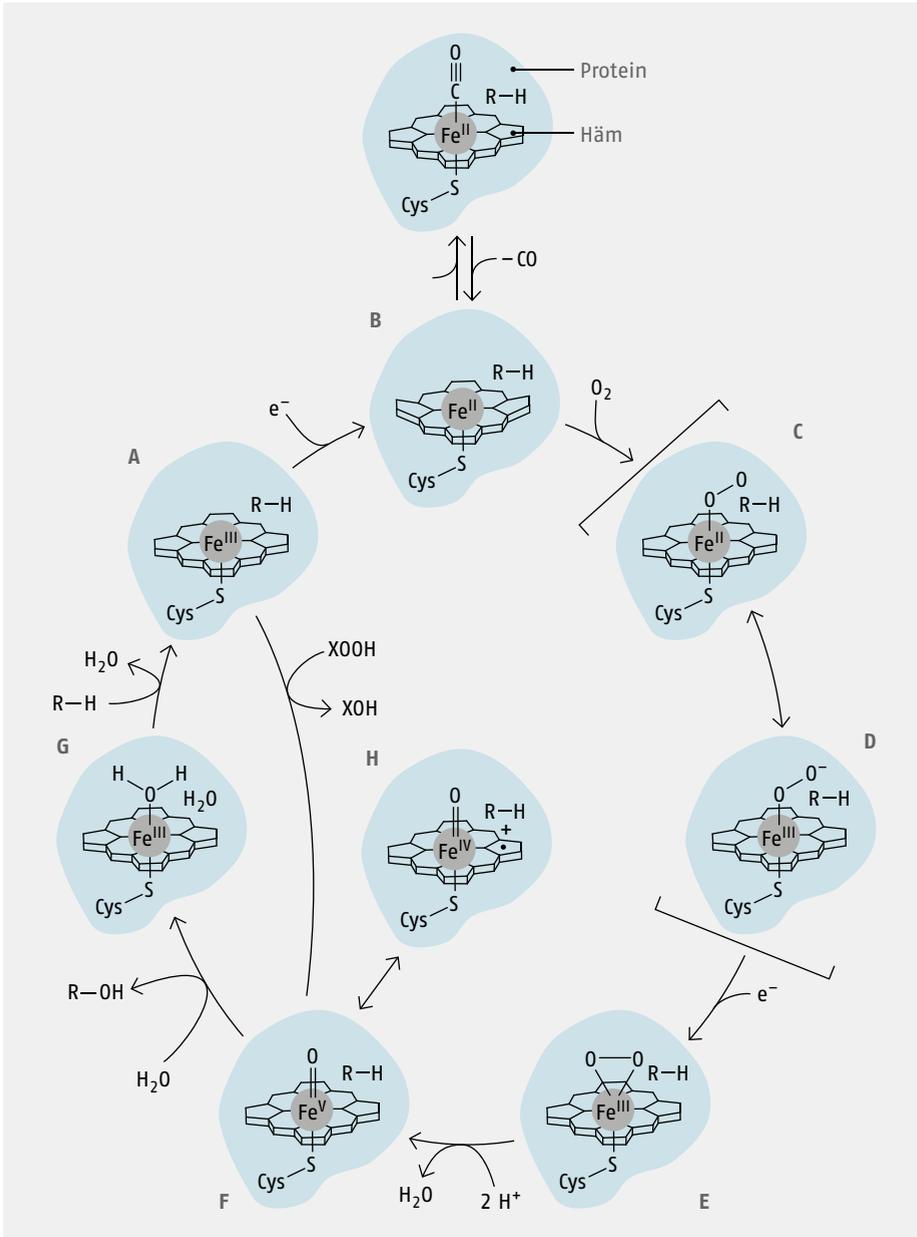


• **Abb. 6.11** Bindung des Substrats (RH) am Cyt-P-450 unter schneller Verschiebung des Spingleichgewichts. Modif. nach Lippard u. Berg

Die im Ruhezustand (bei Substratabwesenheit) vorwiegend vorliegende Low-Spin-Form des hexakoordinierten Fe(III)-Komplexes weist ein besonders stark negatives Fe(II)/Fe(III)-Redoxpotenzial auf. Dieses beträgt isoenzymabhängig -300 bis -400 mV. Dadurch wird bei Substratabwesenheit die Reduktion des Hämeisens und damit die Leerlaufreaktion verhindert, die in diesem Fall zu nicht benötigten und damit zelltoxikologisch bedenklichen reaktiven Sauerstoffspezies führen würde. In Gegenwart von Substratmolekülen, deren Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Substratbindungsstelle in der Proteinkomponente in der Nähe des Hämeisens erfolgt, kommt es zu einer Verdrängung von Wasser aus der Substratbindungstasche sowie von der 6. Koordinationsstelle am Hämeisen. Die Schwächung des Ligandenfeldes führt zu einer schnellen Verschiebung des Spingleichgewichts in Richtung High-Spin-Fe(III)-Form (• Abb. 6.11 u. • Abb. 6.12, A). Diese ist mit einer Erhöhung des Redoxpotenzials um 170 mV verbunden. Damit wird die Übertragung eines Elektrons von der Reduktase auf das Cyt P-450 wesentlich erleichtert und die Reduktion zum Fe(II)-High-Spin-Komplex ermöglicht. Dieser 1. Reduktionsschritt im Reaktionszyklus wird durch die NADPH-Cyt-P-450-Reduktase vermittelt. Deren prosthetische Gruppe besteht aus Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN) im Verhältnis 1:1, über die der Elektronentransfer vom NADPH auf das Cyt P-450 in zwei Schritten erfolgen kann.

Der nach Reduktion resultierende Cyt-P-450-Fe(II)-High-Spin-Komplex (• Abb. 6.12, B) ist aufgrund der spezifischen Ausrichtung seiner Elektronen wie andere zweiwertige Hämoproteine in der Lage, das biradikalische Sauerstoffmolekül zu binden, wobei zunächst eine Eisen(II)-Sauerstoff-Zwischenstufe resultiert (• Abb. 6.12, C).

Da CO eine höhere Affinität zum Cyt-P-450-Fe(II)-Komplex (• Abb. 6.12, B) besitzt als O₂ kann der Reaktionszyklus an dieser Stelle durch CO unterbrochen werden. Darauf

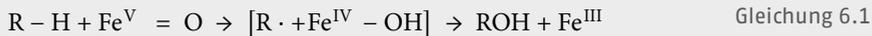


• **Abb. 6.12** Reaktionszyklus des Cyt-P-450-abhängigen Monooxygenasesystems. Modif. nach Lippard u. Berg

beruht die Hemmbarkeit von Cyt-P-450-abhängigen Reaktionen durch CO, die als Beweis für die Beteiligung von Cyt P-450 an einer Biotransformationsreaktion herangezogen wird. Das Absorptionsmaximum der Soret-Bande des Eisen(II)-CO-Komplexes von Cyt P-450 erscheint nicht wie bei den meisten Hämoproteinen bei 420 nm, sondern bei 450 nm. Dies veranlasste die Entdecker (Klingenberg u. Garfinkel 1958) das Enzym als

Cytochrom P-450 (P für Pigment) zu bezeichnen. Auf der Grundlage des von Omura und Sato bestimmten molaren Absorptionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 450 nm kann der Fe(II)-CO-Komplex für die Quantifizierung von Cyt P-450 dienen.

Ausgehend von der Eisen(II)-Sauerstoff-Zwischenstufe (● Abb. 6.12, C) kommt es nach der O_2 -Bindung durch intramolekulare Elektronenverschiebung zur Bildung eines Substrat-Cyt-P-450-Fe(III)-Superoxokomplexes (● Abb. 6.12, D). Dieser ternäre Komplex kann ein weiteres Elektron aufnehmen (2. Reduktionsschritt). Diese Reduktion kann auch durch das System NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase via Cytochrom b_5 im ER der Leberzelle realisiert werden. Der zweite Reduktionsschritt bewirkt durch Reduktion des Sauerstoffs im Ternärkomplex zur Peroxidstufe die Bildung des aktivierten Ternärkomplexes (● Abb. 6.12, E). Formal kann die kurzlebige Zwischenstufe als Eisen(III)-Peroxid-Komplex mit unbekanntem Protonierungszustand formuliert werden. Im weiteren Verlauf des Zyklus treten Zwischenprodukte und Reaktionsschritte auf, über die bislang wenig bekannt ist. Wichtig ist die heterolytische Spaltung der O–O-Bindung unter Bildung von Wasser nach Addition von Protonen. Es entsteht ein Ferryl-Sauerstoffkomplex (● Abb. 6.12, F), der das Substrat oxygeniert. Er wird als **Oxenoid** bezeichnet. Weiterhin kann das π -System des Porphyrinrings selbst zu einem Radikalkation oxidiert werden (● Abb. 6.12, H). Im Anschluss erfolgt die homolytische Spaltung der C-H-Bindung und die sehr schnelle Rekombination mit der Fe-OH-Einheit, wobei das monoxygenierte Produkt (ROH) entsteht:



Der letzte Schritt des Katalysezyklus ist das Abdissoziieren des Produkts. Es entsteht der Ausgangskomplex G. Vor seiner Freisetzung ist die hydroxylierte Verbindung vermutlich kurze Zeit an das Fe(III)-Porphyrin-Zentrum koordiniert.

Die Tatsache, dass nach Spaltung des Sauerstoffs ein Atom auf das Substrat übertragen wird (Monooxygenasereaktion) und das zweite zu Wasser reduziert wird (Oxidaserreaktion) führte für das Enzymsystem auch zu der Bezeichnung „Mischfunktionelle Oxidase“ (MFO, Masson 1955).

Bislang ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Cyt-P-450-abhängigen Katalysezyklus nicht genau bekannt. Wahrscheinlich ist es die Aufnahme des zweiten Elektrons oder eine der beiden darauffolgenden Reaktionen.

Wie in ● Abb. 6.12 dargestellt, können die Schritte der Reduktion und der O_2 -Bindung umgangen werden, wenn zum Cyt-P-450-Enzym mit gebundenem Substrat Peroxid (XOOH) hinzukommt. Dieser **Peroxid-Shunt** führt dann zur Oxenoid-Zwischenstufe und anschließenden Substratoxygenierung.

In den Nebenieren und in Mitochondrien der Säugerleber sowie bei Bakterien existieren Cyt-P-450-abhängige Monooxygenasesysteme, bei denen der Elektronentransfer von NADPH bzw. NADH auf das Cyt P-450 über ein FAD oder FMN enthaltendes Flavoprotein und zusätzlich über ein Nichthäm-Eisen-Schwefelprotein (z. B. Ferredoxin, Adrenodoxin, Hepatoredoxin bzw. Putidaredoxin) erfolgt, das im ER der Leber nicht benötigt wird.

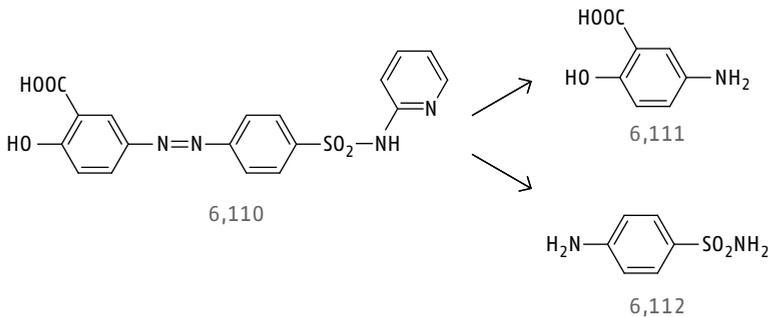
In den Lebermikrosomen findet man ein zweites Redoxsystem, dessen terminales Enzym **Cytochrom b_5** (Cyt b_5) ist. Es ist NADH-abhängig und wirkt mit einem Flavoprotein, der **NADH-Cyt- b_5 -Reduktase**, zusammen. Mit diesem System kann ebenfalls ein

boliten von Bedeutung für Missbildungen und Dysfunktionen sind, ist gegenwärtig weitgehend unbekannt.

6.3.4 Mikrobielle Biotransformation

Das Interesse an Biotransformationsleistungen von Mikroorganismen resultiert einerseits aus der Beteiligung der Darmbakterien am Fremdstoffmetabolismus des Säugers, andererseits aus der Möglichkeit, bestimmte Mikroorganismenstämme als Modelle für prädiiktive Biotransformationsuntersuchungen sowie für selektive biotechnologische Stoffwandlungen zu nutzen (► Kap. 6.5.2). Mit Darmbakterien sind zahlreiche Biotransformationsreaktionen nachgewiesen worden, darunter O- und N-Dealkylierungen (z. B. von Methylropa, Imipramin), Reduktionen (z. B. von Chloramphenicol, Salazosulfapyridin, Benzaldehyd, N-Oxide), Hydrolyse von Estern (z. B. von Glyceroltrinitrat), die Bildung von Glucuroniden (z. B. von Chloramphenicol) und Amidn (z. B. Phthalylsulfathiazol) sowie einige seltenere Wege.

Da die Biotransformationskapazität der Darmflora in den unteren besiedelten Abschnitten des Intestinaltrakts mitunter die gleiche Größenordnung wie die der Leber erreichen kann, ist ihre Bedeutung bei peroraler Anwendung von Pharmaka mit langsamer Absorption und bei Stoffen mit ausgeprägtem enterohepatischem Kreislauf nicht zu unterschätzen. So wurden beispielsweise nach Applikation von Salazosulfapyridin (6,110) von konventionell gehaltenen Ratten vorwiegend die Azoreduktionsprodukte 6,111 und 6,112 sowie deren Acetylderivate mit Urin und Kot ausgeschieden, während keimfrei gehaltene Ratten < 1,7% Metaboliten mit dem Urin und < 3,4% mit den Fäzes ausschieden.



Der Umfang der Biotransformation durch die Darmflora hängt stark von deren Zusammensetzung sowie von der Besiedlungsdichte ab, die ihrerseits spezies-, alters- und nahrungsbedingte Unterschiede aufweisen und von antibakteriellen Wirkstoffen (z. B. Ampicillin, Neomycin) verändert werden. Dies ist besonders dann zu berücksichtigen, wenn durch die Darmbakterien Wirkstoffe freigesetzt werden sollen (z. B. Phthalylsulfathiazol → Sulfathiazol).

6.3.5 Genetische Aspekte der Biotransformation

Interindividuelle Unterschiede bei der Reaktion auf Arzneimittel können durch exogene und endogene genetische Faktoren bedingt sein. Unter genetischer Kontrolle steht u. a. die Expression von Biotransformationsenzymen. Durch Bestimmung pharmakokinetischer Daten und durch quantitative Biotransformationsuntersuchungen an Populationen und insbesondere beim Vergleich eineiiger und zweieiiger Zwillinge können genetisch bedingte Unterschiede (als **genetische Polymorphismen** bezeichnet) erkannt werden.

- **DEFINITION** Ein genetischer Polymorphismus ist definiert als das Vorkommen eines monogen vererbten Merkmals in Form von mindestens zwei verschiedenen Phänotypen, von denen keiner eine Häufigkeit von unter 1 % zeigt.

Die wichtigsten molekularbiologischen Ursachen für genetische Polymorphismen sind:

- Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphisms, SNP),
- Polymorphismen durch Deletion oder Insertion von Nucleotiden,
- Genamplifikationen.

Die **Einzelnukleotid-Polymorphismen** sind die häufigsten Sequenzvariationen. Sie entstehen durch Variationen von einzelnen Basenpaaren im DNA-Molekül, was eine Aminosäuresequenzänderung zur Folge haben kann.

Deletion bzw. **Insertion** ist der Verlust bzw. Einbau von mindestens einem Nucleotid. Dadurch können Eigenschaften der Genprodukte verändert werden.

Unter **Genamplifikation** versteht man die Vervielfältigung einzelner Gene durch die Replikation begrenzter DNA-Abschnitte. Die erhöhte Anzahl an Genkopien (z. B. kann das CYP2D6-Gen in bis zu 13 Kopien vorliegen) ist mit einer vermehrten Bildung der entsprechenden Genprodukte verbunden (dies bedingt z. B. beim CYP2D6 den Phänotyp des ultraschnellen Metabolisierers). Die Genkopien können im Chromosom verbleiben oder extrachromosomal vorliegen. Genamplifikation tritt vor allem bei Differenzierungsprozessen in der Entwicklung eines Organismus auf. Die Genamplifikation wird auch für die Resistenz von Krebszellen gegen bestimmte Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (Überexpression von MDR1).

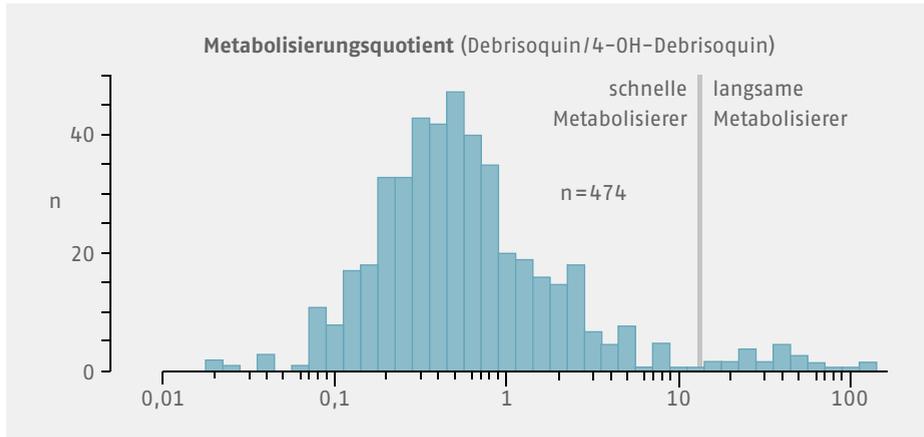
Genetische Polymorphismen des Arzneistoffmetabolismus können heute durch molekulargenetische Untersuchungen unter Berücksichtigung der Korrelation von Genotyp und Phänotyp erfasst werden.

- **MERKE** Genotypisierung und Phänotypisierung bilden die Grundlagen für eine stratifizierte, d. h. dem einzelnen Patienten angepasste Arzneitherapie.

Für die **Genotypisierung** werden DNA-Abschnitte identifiziert. Dazu dienen Techniken wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) und elektrophoretische Auswertung oder die DNA-Chiptechnologie. Bei der **Phänotypisierung** wird eine direkte Enzymaktivitätsbestimmung vorgenommen oder die Metabolitenmenge bestimmt. Sie greift z. B. auf die im Blutplasma bestimmten Metabolisierungsquotienten (◉ Abb. 6.24) oder auf die im Urin bestimmte metabolische Rate (MR) zurück. Die MR ist das Verhältnis der im Urin in 6–12 Stunden ausgeschiedenen Mengen an unverändertem Arzneistoff und dessen Metaboliten:

$$MR = \frac{\text{Arzneistoffmenge}}{\text{Metabolitenmenge}} \quad \text{Gleichung 6.3}$$

Grundsätzlich lassen sich monogenetisch und polygenetisch bedingte Merkmalsausprägungen (Phänotypen) unterscheiden. Monogenetische Anlagen werden durch singuläre Gene, polygenetische Anlagen durch multiple Gene vererbt. Innerhalb einer Population



• **Abb. 6.24** Phänotypisierung des Debrisoquin/Sparteïn-Polymorphismus durch den Metabolisierungsquotienten (bimodale Häufigkeitsverteilung). Nach Brockmüller

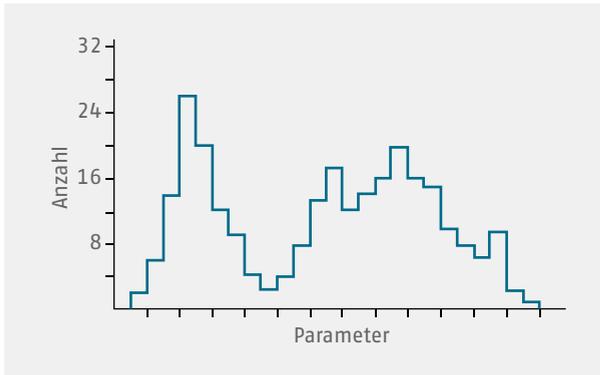
erhält man bei statistischer Auswertung im Falle der monogenetisch bedingten Merkmalsausprägungen mehrgipflige (multimodale) Häufigkeitsverteilungen, wobei die Anzahl der Gipfel der Zahl der unterscheidbaren Phänotypen innerhalb der Population entspricht. Polygenetisch bedingte Merkmalsausprägungen ergeben demgegenüber innerhalb einer Population eine eingipflige (unimodale) Verteilung (im Idealfall eine Normalverteilung). Die Erkennung genetischer Unterschiede ist in diesem Fall problematisch.

Bezüglich der Biotransformation wird zwischen **langsamen** (poor; PM), **intermediären** (intermediate; IM), **schnellen** (extensive; EM) und **ultraschnellen** (ultra rapid; UM) **Metabolisierern** unterschieden.

Ein **klinisch relevanter genetischer Polymorphismus** ist insbesondere bei folgenden Biotransformationsenzymen festgestellt worden:

CYP1A1 und CYP1A2 (in Bezug auf die Induzierbarkeit), CYP1B1 (mit Auswirkungen auf den Metabolismus von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit Relevanz für das Lungenkrebsrisiko), CYP2C8, (Metabolismus von Paclitaxel u. a.), CYP2C9 (s. u.), CYP2C18, CYP2C19 (s. u.), CYP2D6 (s. u.) CYP3A4, CYP3A5, UGT1A1 (auf 30% veringerte Aktivität bei Gilbert-Syndrom), UGT1A4, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A10, UGT2B7, Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT, s. u.), N-Acetyltransferase (NAT1 und NAT2), Pseudocholinesterase, Glutathion-S-Transferasen GSTM1 und GSTT1.

Der am längsten bekannte genetische Polymorphismus bei der Biotransformation betrifft den Metabolismus von Isoniazid. Der Hauptweg der Metabolisierung des Isoniazids (► Kap. 6.4.4) ist die Acetylierung durch **N-Acetyltransferase (NAT2)**, die sowohl bei Zwillingsuntersuchungen (Variabilität bei zweieiigen Zwillingen wesentlich größer als bei eineiigen) als auch in populationsgenetischen Studien als genetisch polymorph erkannt wurde. Das Merkmal schnelle Acetylierung, das eine kürzere Eliminationshalbwertszeit bedingt, verhält sich im Erbgang dominant, d. h. sowohl homozygote als auch heterozygote Träger dieses NAT2-Gens bilden den Phänotyp des **schnellen Acetylierers** aus, während bei **langsamen Acetylierern** das rezessive Gen stets homozygot vorliegt. Dementsprechend ergibt sich für den Acetylierungsstatus bei drei möglichen Genotypen eine



● **Abb. 6.25** Bimodale Häufigkeitsverteilung der *N*-Acetyltransferase NAT2

■ **Tab. 6.11** Prozentualer Anteil langsamer Acetylierer des Isoniazids. Nach Bornschein

Population	Langsame Acetylierer (%)
Buschmänner der Kalahari-Region	3
Kanadische Eskimos	5
Polynesier	7
Japaner, Koreaner	10–12
Thais	30
Volkstämme Südafrikas	40–42
Afroamerikaner	40–51
Volkstämme Ostafrikas	55
Europäer, Kanadier, Amerikaner europäischer Herkunft	58–62
Hindus	58–60
Sudanesen	65
Ägypter, Äthiopier	83

bimodale Verteilung (zwei Phänotypen) nach dem Muster in ● Abb. 6.25. ■ Tab. 6.11 zeigt den Anteil langsamer Acetylierer in verschiedenen ethnischen Gruppen.

Diese Ergebnisse zeigen im Übrigen, dass das rezessive Gen eine ungewöhnlich hohe Frequenz besitzt.

Der gleichen genetischen Kontrolle unterliegt die Acetylierung von Procainamid, Dapson, Sulfadiazin, Sulfadimidin und wahrscheinlich auch von weiteren Aminoverbindungen, aber nicht die von z. B. Sulfanilamid. Da andererseits keine Korrelation mit der Acetylierung von *p*-Aminobenzoesäure festzustellen war, wurde die Existenz eines weiteren Isoenzym der *N*-Acetyltransferase (NAT1) vermutet. Die NAT1 galt bis in die 1990er Jahre im Unterschied zur NAT2 als genetisch monomorph. In den 1990er Jahren wurde durch Genotypisierung und die Verwendung von isoenzymspezifischen Substraten im

▣ **Tab. 6.12** Genetischer Polymorphismus der NAT1. Nach Bruhn et al.

Genotyp	Phänotyp (Häufigkeit, %)
*3/*3, *3/*4, *3/*10, *4/*4, *4/*10, *10/*10	Hohe Aktivität (88,8)
*4/*11, *4/*14, *10/*11, *10/*14, *11/*11	Mittlere Aktivität (10,5)
*15/*15	Defizienz (0,7)

▣ **Tab. 6.13** Genetischer Polymorphismus von CYP2D6 (Debrisoquin/Sparteïn-Polymorphismus). Nach Brockmüller

Phänotyp (Genotyp)	Bezeichnung	Häufigkeit in Deutschland (%)
Langsame Metabolisierer, poor metabolizer (Null-Allel/Null-Allel)	PM	7
Intermediäre Metabolisierer, intermediate metabolizer (teilstfunktionelles Allel/Null-Allel)	IM	10
Schnelle Metabolisierer, extensive metabolizer (zwei Wildtyp-Allele oder Wildtyp-Allel/teilstfunktionelles Allel)	EM	80
Ultraschnelle Metabolisierer, ultrarapid metabolizer* (Genamplifikation eines funktionellen Allels)	UM	3

* Bis zu 13 Kopien des CYP2D6-Gen nachgewiesen

Rahmen der Phänotypisierung auch für die NAT1 ein genetischer Polymorphismus nachgewiesen (▣ Tab. 6.12).

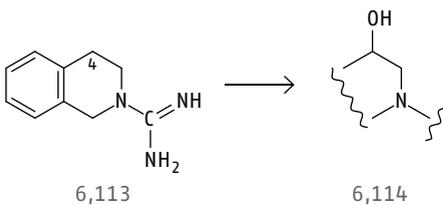
Genetisch kontrolliert sind auch Esterasen, die z. B. Paraoxon hydrolysieren (Paraoxonase), und die **Pseudocholinesterase** (Butyrylcholinesterase = BCHE), die in einer autosomal rezessiv vererbten atypischen Form vorliegen kann. Diese bedingt bei homozygoten Defekträgern eine erheblich verlängerte muskelrelaxierende Wirkung von Suxamethonium und Mevacurium. Es sind mehrere genetische Varianten der Pseudocholinesterase bekannt. Homozygote Personen für die atypische Variante des Enzyms (ca. 1 : 2000) hydrolysieren die genannten Muskelrelaxanzien nur langsam, und der Patient muss bis zum Abklingen der muskelrelaxierenden Wirkung beatmet werden (Nachbeatmung bei Nar-kose), da es andernfalls zu Komplikationen durch Atemlähmung kommen kann.

Der am längsten bekannte genetische Polymorphismus eines humanen Cyt-P-450-Isoenzyms ist der von CYP2D6, der zunächst nach den für die Phänotypisierung verwendeten Substraten als **Debrisoquin/Sparteïn-Polymorphismus** bezeichnet wurde. Nach den heute zum **CYP2D6-Polymorphismus** vorliegenden Ergebnissen sind dabei > 50 Mutationen im CYP2D6-Gen nachgewiesen worden, darunter 15 autosomal rezessive Null-Allele und mehrere teilstfunktionelle Allele mit Auswirkungen auf den Phänotyp. Diese können in Bezug auf die 4-Hydroxylierung von Debrisoquin (6,113 → 6,114) bzw. die N-Oxidation von Sparteïn zu vier unterscheidbaren Phänotypen führen (▣ Tab. 6.13).

▣ **Tab. 6.14** Klinische Relevanz des CYP2D6-Polymorphismus. Nach Brockmüller

Indikationsgebiet	Arzneimittel (Auswahl)
Kardiologie	
Klasse-I-Antiarrhythmika	Ajmalin, Encainid*, Flecainid, Mexiletin Prajmalin, Propafenon
Betablocker	Alprenolol, Carvedilol, Metoprolol, Timolol, Propranolol
Psychiatrie	
Antipsychotika	Haloperidol, Olanzapin, Perphenazin, Risperidon Sertindol, Thioridazin, Zuclophenthixol
Antidepressiva	Amitriptylin, Clomipramin, Desipramin, Imipramin Nortriptylin, Maprotilin, Mianserin Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin, Venlafaxin
Schmerztherapie	
Opiode	Codein*, Dihydrocodein*, Tramadol*

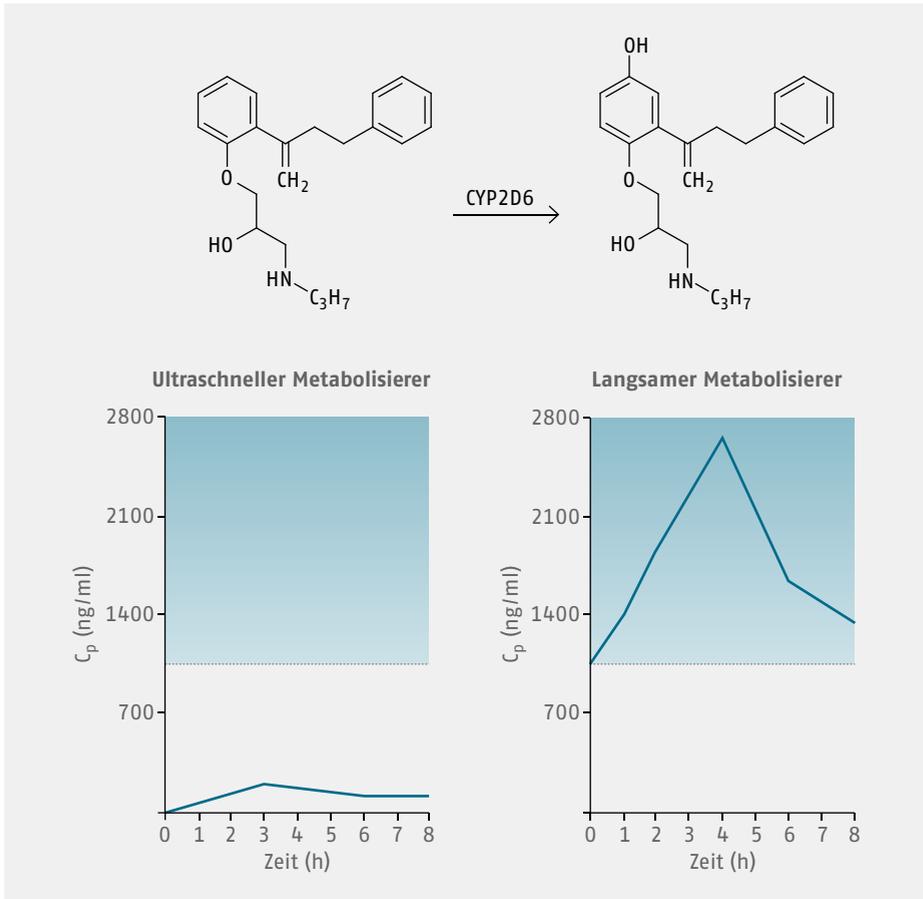
* Prodrug



Der PM-Phänotyp ist durch einen autosomal rezessiven Defekt der 4-Hydroxylierung von Debrisoquin und der N-Oxidation des Sparteins charakterisiert, die MR beträgt bei PM 12,3 bzw. 20. Die Häufigkeit von PM bei Europäern liegt bei durchschnittlich 7,4 %. Der Anteil PM in anderen ethnischen Gruppen ist z. T. niedriger, z. B. bei Ägyptern 1 %, Chinesen 1,4 %, Finnen 4 %, Japanern < 1 %.

Der CYP2D6-Polymorphismus spielt bei mehr als 30 Arzneistoffen eine Rolle. Die klinische Relevanz des CYP2D6-Polymorphismus zu einigen Indikationsgebieten ist in ▣ Tab. 6.14 aufgeführt.

Anhand des folgenden Beispiels werden die klinischen Konsequenzen des CYP2D6-Polymorphismus deutlich. Das Antiarrhythmikum Propafenon wird hauptsächlich in 5-Stellung hydroxyliert (60 % und mehr) und unterliegt bei der ersten Leberpassage einem hohen First-pass-Metabolismus (► Kap. 6.4.7), so dass die Bioverfügbarkeit bei EM eingeschränkt ist. PM bilden wegen des Defizits an CYP2D6 nur geringe Mengen des Metaboliten. Die dadurch verbesserte Bioverfügbarkeit führt zu mehrfach erhöhten Plasmaswerten (◉ Abb. 6.26). Diese höheren Konzentrationen bewirken u. a. eine verstärkte Inzidenz von ZNS-Nebenwirkungen bei PM (67 %) gegenüber EM (14 %). Dosiskorrekturen bei solchen Patienten sind dann erforderlich. Bei ultraschnellen Metabolisierern ist



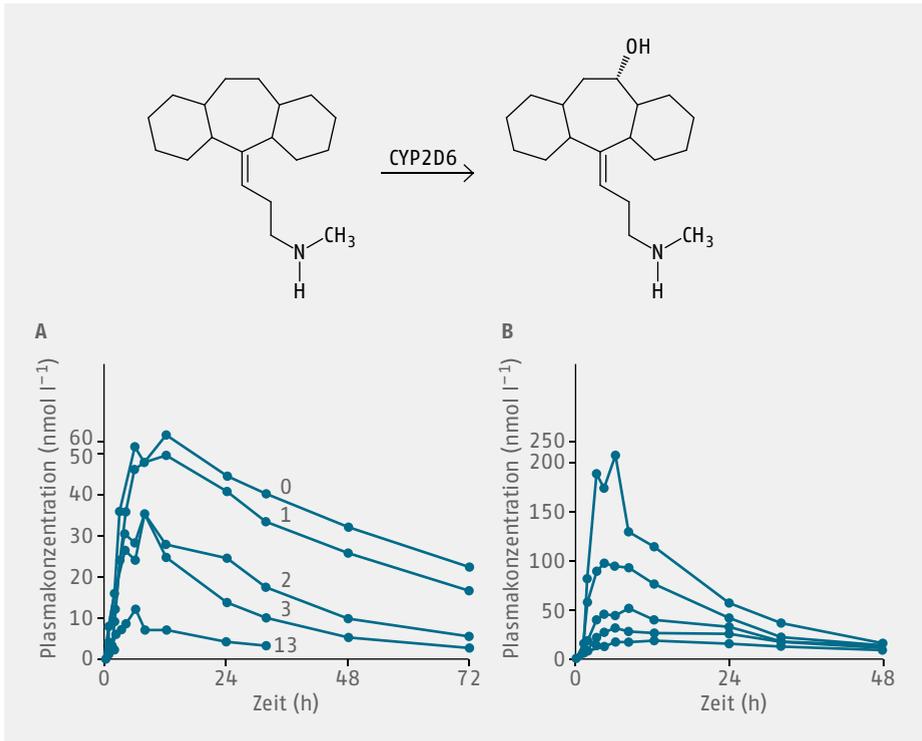
• **Abb. 6.26** Auswirkungen des genetischen Polymorphismus von CYP2D6 auf die Pharmakokinetik von Propafenon. Nach Krömer

dagegen die Bioverfügbarkeit so stark verringert, dass eine ganz erhebliche Dosiserhöhung notwendig wäre, um wirksame Plasmaspiegel zu erzielen. Besser als die Gabe von Megadosen ist in diesen Fällen allerdings die Wahl eines anderen Arzneistoffs, der nicht von CYP2D6 metabolisiert wird.

Die Auswirkungen der Genamplifikation des CYP2D6-Gens auf die erforderliche Dosis und auf die Pharmakokinetik von Nortriptylin sind in • Abb. 6.27 dargestellt.

Im Hinblick auf die Globalisierung ist die sehr unterschiedliche Häufigkeit der ultraschnellen Metabolisierer in verschiedenen ethnischen Gruppen besonders zu beachten (▣ Tab. 6.15). Als Ursache für die differenzierte regionale Häufigkeitsverteilung wurde wiederholt ein Selektionsvorteil von ultraschnellen Metabolisierern in Bezug auf die Entgiftung von pflanzlichen Alkaloiden im Verlauf der Evolution diskutiert.

CYP-Polymorphismen sind auch für andere Isoenzyme bekannt. Als molekulargenetische Ursachen für den **Polymorphismus von CYP2C9** (▣ Tab. 6.16) sind zwei Mutationen (SNP) im CYP2C9-Gen mit erheblichen Funktionsverlusten des exprimierten Enzyms erkannt worden. Die Konsequenzen sind verstärkte Haupt- und Nebenwirkungen bei homozygoten Defekttägern und erhöhte Risiken bei Arzneistoffen mit geringer thera-



● **Abb. 6.27** Pharmakinetik von A Nortriptylin und B 10-OH-Nortriptylin in Abhängigkeit von der Anzahl der aktiven CYP2D6-Gene. Nach Mellström

■ **Tab. 6.15** Häufigkeit ultraschneller Metabolisierer von CYP2D6-Substraten

Ethnische Herkunft	Häufigkeit (%)
Ostasien	0–1
Nord- und Mitteleuropa	1–3,5
Südeuropa und Türkei	10
Äthiopien und Saudi-Arabien	20–30

■ **Tab. 6.16** Genetischer Polymorphismus von CYP2C9. Nach Hess

Genotyp	Häufigkeit in Europa (%)
CYP2C9 *1/*1 (Wildtyp)	62
CYP2C9 *2/*2	1
CYP2C9 *3/*3	1
CYP2C9 *2/*3	1
CYP2C9 *1/*2	18
CYP2C9 *1/*3	17