

**VFA-Positionspapier
„Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum
Tierversuch in der chemisch-pharmazeutischen Forschung
und Entwicklung“**

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe werden in Abhängigkeit von der jeweiligen Entwicklungsstufe sowohl in vitro- (versuchstierfreie) (3) als auch in vivo- (Tierversuche) Methoden eingesetzt. Die erhobenen Daten müssen den Zulassungsbehörden vorgelegt werden, um den erforderlichen Nachweis der Wirksamkeit und Sicherheit zu erbringen.

Dabei sind Art und Umfang der den Behörden vorzulegenden Daten weitestgehend durch nationale und internationale Gesetze und Richtlinien geregelt (5, 6).

Seite 1/11

Ausgangslage

Wo immer möglich, wird der Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch entsprechend dem 3-R-Prinzip nach Russel und Burch (11) (**R**educe, **R**efine, **R**eplace) gefördert, um die Zahl der benötigten Versuchstiere sowie die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten (4,10).

Die Entwicklung von Arzneimitteln lässt sich in drei Stufen unterteilen:

1. Forschungsphase
2. Entwicklungsphase
3. Vermarktungsphase

In der Forschungsphase werden neue Wirksubstanzen/Wirkmechanismen gesucht, die in der zweiten Phase zu neuen Medikamenten entwickelt werden. Auch in der sich anschließenden Vermarktungsphase müssen weitere vorgeschriebene Untersuchungen, wie z. B. die Überprüfung von Impfstoffchargen, durchgeführt werden. In allen drei Phasen dieses Entwicklungszyklus kommen Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch zum Einsatz bzw. sind vom Gesetzgeber sogar vorgeschrieben (7).

1.) Forschungsphase

In dieser Phase der Entwicklung werden sowohl neue Wirksubstanzen als auch neue Wirkmechanismen gesucht. Dies beinhaltet i. d. R. den Test von mehreren Hunderttausenden von Substanzen in in vitro-Systemen mit Hilfe computergesteuerter Untersuchungsverfahren (High throughput screening). Dabei erfolgt die Testung fast ausschließlich versuchstierfrei auf subzellulärer oder zellulärer Ebene. Dies kann z. B. die Bindung an bestimmte Rezeptoren, die Aktivitätsmessung in einem Enzymtest, die Wirkung auf isolierte Ionenkanäle oder auch die Wirkung auf Mikroorganismen in einer

Nährlösung beinhalten. Die weiterführende qualitative Wirkstoffprüfung wird häufig durch den Einsatz von QSAR-Systemen (**Q**uantitative- **S**tructure-**A**ctivity-**R**elationship) unterstützt. Dabei handelt es sich um Computerprogramme (in silico), die eine neue chemische Struktur mit einer Vielzahl bekannter chemischer Strukturen und ihren biologischen Wirkungen vergleichen. Aufgrund dieses Vergleiches werden Aussagen zur pharmakologischen Wirksamkeit, Kinetik, Metabolismus und Toxizität getroffen. Auf absehbare Zeit wird jedoch kein validiertes QSAR-System zur Verfügung stehen, das in vivo-Sicherheitsprüfungen ersetzen kann.

Tierversuche zum pharmakologischen Wirknachweis werden erst dann durchgeführt, wenn sich erfolgversprechende Substanzen mit dem gesuchten Wirkprofil aus den in vitro/in silico-Untersuchungen herauskristallisiert haben. Bei der Etablierung innovativer Therapieprinzipien hat der enorme technische Fortschritt dazu beigetragen, dass Versuche zielgerichteter durchgeführt und damit insgesamt weniger Tiere eingesetzt werden. Genomics und Proteomics sind dabei neuere Technologien, die erhebliches Potenzial zur Einsparung von Tierversuchen haben, da man nun Mechanismen auf Genom- und Proteinebene zielgerichtet untersuchen kann. Ein weiteres Beispiel ist die Mikrodialyse, die gleichermaßen im Tier wie im Mensch zur Untersuchung von körpereigenen Botenstoffen eingesetzt wird und damit auch den direkten Vergleich von Substanzwirkungen ermöglicht. (Anhang 3).

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, dass durch den Einsatz neuester Technologien in der Wirkstofffindung der Einsatz von Tieren sowie deren Belastung reduziert werden kann. Da diese Methoden vielfach auch im Menschen Anwendung finden, sind sie in besonderem Maße geeignet, die Übertragbarkeit von Daten zwischen den Spezies zu prüfen und eine Aussage zur Relevanz der Daten zu geben (Tabelle 1).

Am Ende dieser Forschungsphase steht eine "Leitstruktur", deren Wirkungs- und Nebenwirkungseigenschaften im Rahmen der sich anschließenden Entwicklungsphase sehr genau untersucht werden.

2.) Entwicklungsphase

Neben der pharmakologischen Wirksamkeit muss zunächst auch die Sicherheit von neuen Wirkstoffen sehr genau untersucht werden. Testverfahren zur Überprüfung der Wirkung, Nebenwirkungen und möglicher toxischer Eigenschaften von Substanzen sind durch internationale Richtlinien festgelegt. Ebenso sind Art und Umfang der Testverfahren durch den Gesetzgeber bestimmt (6, 9). Eine Reduzierung von Tieren in bestimmten Sicherheitsprüfungen sowie Verminderung der Belastung des Einzeltieres wurden bereits durch die Einführung neuer Teststrategien erreicht (Tabelle 3), aber hier wird der chemisch-pharmazeutischen Industrie sehr wenig Spielraum vom Gesetzgeber gelassen. Versuchstierfreie Ersatzmethoden zum Nachweis der Arzneimittelsicherheit werden von den Zulassungsbehörden erst dann akzeptiert, wenn sie ein sehr aufwän-

diges, oft über mehrere Jahre dauerndes Validierungsverfahren durchlaufen haben (1,4). Bisher sind die validierten und von den Behörden anerkannten versuchstierfreien Verfahren, die zur Sicherheitstestung eingesetzt werden können, limitiert (Tabelle 2).

Seite 3/11

Treibende Kräfte, weitere Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu validieren, sind ZEBET (**Z**entralstelle für die **E**rfassung und **B**ewertung von **E**rsatz- und Ergänzungsmethoden zum **T**ierversuch) sowie ECVAM (**E**uropean **C**enter for the **V**alidation of **A**lternative **M**ethods). Die chemisch-pharmazeutische Industrie unterstützt diese Bemühungen in erheblichem Maße durch finanzielle Mittel sowie aktive Teilnahme an Validierungsversuchen.

Nach Abschluss dieser Sicherheits- und Wirksamkeitsprüfungen am Tier und anschließend am Menschen kann das Arzneimittel mit dem neuen Wirkstoff zur Zulassung bei Behörden eingereicht werden.

3.) Vermarktungsphase

Selbst nach der Zulassung eines Arzneimittels mit einem neuen Wirkstoff wird dessen Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum weiterhin sehr genau kontrolliert. Dazu sind z.B. für Impfstoffe - zur Qualitätskontrolle von Herstellungschargen - weiterhin Sicherheitsprüfungen durch Tierversuche vorgeschrieben. Der Test auf Pyrogenfreiheit ist dabei eine wichtige Untersuchung, um sicherzustellen, dass es beim Patienten nach der Anwendung von Substanzen nicht zu Fieberreaktionen kommt. Ferner müssen zur Chargenkontrolle von Hormonen (FSH, LH, EPO), Versuche zur Wirksamkeit durchgeführt werden. Die notwendigen Testverfahren - in vielen Fällen Tierversuche - sind in den entsprechenden Arzneibuchmonographien beschrieben. Für einige dieser Endpunkte stehen inzwischen in vitro-Methoden zur Verfügung.

VFA-Position

Die Anwendung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch in der chemisch-pharmazeutischen Forschung und Entwicklung hat in den letzten Jahren, unterstützt durch die erheblichen Fortschritte in der biomedizinischen Technologie, einen breiten Raum eingenommen. Diese Methoden bieten oft die Möglichkeit, definierte Endpunkte einer Wirkung oder Nebenwirkung spezifischer zu untersuchen als im Tierversuch. Daher tragen sie im erheblichen Maße dazu bei, das Verständnis für biologische Vorgänge zu erweitern und eröffnen die Möglichkeit, das Nebenwirkungspotenzial besser abzuschätzen. Im Sinne des Tierschutzes wird die Entwicklung weiterer Ersatz- und Ergänzungsmethoden aktiv von der chemisch-pharmazeutischen Industrie unterstützt.

Auf absehbare Zeit wird man jedoch bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen auf Tierversuche nicht vollständig verzichten können. Dies liegt darin begründet, dass es zurzeit noch keine wissenschaftliche Alternative gibt bzw. bestimmte Tierversuche, gerade

zur Sicherheitsprüfung, von den Zulassungsbehörden gefordert werden.

Seite 4/11

Tabellen

Tabelle 1

Techniken, die in der Wirkstofffindung als Standard eingesetzt werden und Tierversuche ersetzen/reduzieren/verbessern

| Testverfahren | in vivo | in vitro/ in silico | Ersetzt | Reduziert | Verbessert |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------|----------------|---------------|---------------|
| | | | Tierversuche | Tierversuche | Tierversuche |
| | | | <i>Replace</i> | <i>Reduce</i> | <i>Refine</i> |
| Datenbanken | - | + | + | + | + |
| QSAR | - | + | + | + | + |
| Subzelluläre Systeme (z. B. Rezeptorbindung, isolierte Ionenkanäle) | - | + | + | + | + |
| Zellkulturen | - | + | + | + | + |
| Isolierte Organe | - | + | + | + | + |
| Genomics | + | + | - | + | + |
| Proteomics | + | + | - | + | + |
| Metabonomics | + | + | - | + | + |
| Mikrodialyse | + | - | - | + | + |
| Transgene Tiere | + | - | - | + | + |

Tabelle 2

Seite 5/11

Endpunkte, die in der Sicherheitsprüfung ohne Tierversuch getestet werden können

| Endpunkt | In vitro |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutagenität/ Genotoxizität | Ames-Test, Maus-Lymphoma-Test, Chromosomen-aberrationstest, u.a. Anmerkung: Für die Arzneimittelzulassung fordert der Gesetzgeber mindestens einen zusätzlichen Tierversuch. |
| Phototoxizität | 3T3 Zelltest |
| Fieberreaktion | Limulustest (nur zum Endotoxinnachweis geeignet) Vollbluttest mittels Humanblut (in Erprobung) |
| Embryotoxizität (Screening) | Maus-Stammzelltest |
| Hautreizung (Screening) | Chorionallantois-Membrantest am bebrüteten Hühnerei (CAM) * |
| Hautverätzung | Biotechnologisch hergestellte menschliche Hautmodelle |

*von Behörden nicht generell akzeptiert

Tabelle 3

Testverfahren, die in der Sicherheitsprüfung den Einsatz von Tieren reduzieren und die Belastung für das Einzeltier vermindern

| Endpunkt | Methode |
|-----------------------------|------------------------------------------|
| Akute Toxizität | Fixed dose oder up-and -down Methode |
| Sensibilisierung | Lokaler Lymphknotentest in der Maus LLNA |
| Embryotoxizität (Screening) | Limb-bud oder whole embryo culture |

Anhänge

Anhang 1

Allgemeine Methoden

| Methode | Vorteile | Nachteile |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Datenbanken | <p>Schnelle Gesamtübersicht</p> <p>Leichte Zugänglichkeit</p> | <p>Ergebnisse nicht immer nachvollziehbar</p> <p>Widersprüchliche Datenlage</p> <p>Rohdaten stehen nicht zur Verfügung</p> <p>Keine validierten Daten</p> <p>Kritische Daten stehen nicht zur Verfügung</p> |
| QSAR | <p>Spezifische Endpunkte (Mutagenität, Reproduktionstoxizität, Kanzerogenität,) können selektiv überprüft werden</p> <p>Überprüfung zahlreicher Substanzen in kurzer Zeit</p> <p>Innerhalb einer Klasse</p> | <p>Bisher nicht als Ersatzmethode anerkannt</p> <p>Vorhersagekraft nur so gut wie zugrunde liegender Datensatz</p> <p>Bisher kein System mit einem allgemeingültigen Datensatz</p> <p>Aussagekraft zur Kinetik und Metabo-</p> |

| | | |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | von Substanzen ist ein Ranking möglich | lismus nicht oder nur eingeschränkt möglich Vielzahl unterschiedlicher Systeme erschwert Vergleichbarkeit der Daten |
| Subzelluläre Systeme | Ermöglicht Aufklärung des Wirkmechanismus Spezifische Endpunkte können untersucht werden Gute Verfügbarkeit der Systeme Geringe Kosten Untersuchungen sind standardisierbar | Übertragung der Ergebnisse auf zelluläre Ebene nicht immer möglich Auswirkungen auf Gesamtorganismus können nicht abgeschätzt werden Langzeiteffekte können nicht untersucht werden |
| Zellkulturen | Organspezifische Untersuchungen möglich Untersuchung von spezifischen Fragestellungen Verfügbarkeit der Systeme Geringe Kosten Hoher Durchsatz | Auswirkungen für ein Gesamtorgan nicht immer klar Übertragbarkeit auf Gesamtorganismus nicht immer gegeben Interaktion mehrerer Organsysteme kann nicht abgebildet werden Stabilität der Zellsysteme über einen längeren Zeitraum nicht immer gegeben Langzeiteffekte können nicht überprüft werden |
| Isolierte Organe | Organspezifische Untersuchungen möglich Funktionsprüfungen am Gesamtorgan möglich | Aussage über Effekte auf den Gesamtorganismus nicht möglich Langzeituntersuchungen sind nicht oder nur eingeschränkt möglich Nicht alle Organsysteme einsetzbar (ZNS) |

| | | |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Genomics, Proteomics und Metabonomics | Aufklärung molekularer Mechanismen auf Gen und Proteinebene Erkennung von Reaktionsmustern lässt Rückschlüsse auf Wirkungen/ Nebenwirkungen zu | Hohe technische Anforderungen, insbesondere an Informationsverarbeitung Zeit- und Dosisabhängigkeit von Veränderungen nur eingeschränkt vorhersagbar |
| Transgene Tiere | Direkte Untersuchung am relevanten Tiermodell Verbesserung der Vorhersage therapeutischer Ansätze Testung neuer Stoffe im relevanten Krankheitsmodell | Hoher Aufwand zur Etablierung neuer Modelle Belastung der Tiere kann erhöht sein |

Anhang 2

Spezielle Testverfahren

| Methode | Vorteile | Nachteile |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chorionallantois-Membran-Test am bebrüteten Hühnerrei | Einfache und schnelle Durchführung Ersetzt Tierversuch am Kaninchen) | Nicht geeignet für alle chemischen Substanzklassen Reversibilität kann nicht geprüft werden Kein generell akzeptiertes Prüfverfahren (in Deutschland akzeptiert) |
| Embryonaler-Stammzelltest (EST) | Einsatz von Zelllinien Identifikation embryotoxischer Substanzen | Rein teratogene Wirkungen können nicht detektiert werden Späte fetotoxische und maternale Endpunkte können nicht untersucht werden |

| | | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Limb-bud- Micromass Test | Parallele Testung von Substanzen anhand weniger Embryonen möglich Geeignet zum Scree- ning von Substanzen innerhalb einer Klas- se (z. B. Retinoide) | Keine validierte Methode Nicht alle teratogene Endpunkte werden erfasst Testung nur in ei- nem bestimmten Zeitabschnitt der Entwicklung möglich Keine Aussage über fetotoxische und maternal toxische Wirkung |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Anhang 3

Beschreibung der Mikrodialyse

In der Arzneimittelforschung stellt sich häufig die Frage, wie neue Substanzen die Konzentration von körpereigenen Stoffen wie zum Beispiel im ZNS aber auch in anderen Geweben wie Fettgewebe, Leber, Niere oder Muskeln beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wird in zunehmendem Maße die Mikrodialysemethode eingesetzt. Hierzu wird zunächst eine kleine Sonde mit einer semipermeablen Membran in das zu untersuchende Gewebe implantiert und diese dann mit einer in der Zusammensetzung des Gewebes angepassten Nährlösung perfundiert. Die Sonde ist wenige Millimeter lang und nur 0,25 bis 0,5 Millimeter dick. Sie kann daher in einer Vielzahl von Geweben und Organen implantiert werden, ohne große traumatische Veränderungen zu induzieren. Die Methode ist so wenig invasiv, dass sie schon routinemäßig am Menschen angewendet wird (8). Durch die Möglichkeit, von einem Tier in kurzen Zeitabständen Proben zu bekommen, ohne dass dazu Körperflüssigkeiten entnommen werden müssen und durch den Vergleich von vor und nach der Behandlung kann ein Tier als seine eigene Kontrolle dienen und auch damit notwendige Tierzahlen im Versuch reduzieren helfen.

Literaturverzeichnis

- 1.) Branton et al.; A Summary Report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test; Toxicology in vitro, 11 1997, 141 - 179
- 2.) Parsons et al.; In vitro micromass teratogen test: Interpreta-

tion of results from a blind trial of 25 compounds using three separate criteria; Toxicology in vitro, 4, 1990, 609-611

Seite 10/11

3.) JV Castell & MJ Gomes-Lechon; In Vitro Methods in Pharmaceutical Research; Academic Press, 1997, pages 1 - 53

4.) Committee for Proprietary Medicinal Products; Replacement of Animal Studies by in Vitro Models; CPMP/SWP/728/95

5.) Committee for Proprietary Medicinal Products; Note for Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95 - Mod. released November 2000)

6.) Bekanntmachung der Neufassung der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Arzneimittelprüfrichtlinien; Bundesanzeiger, Nr. 96 a, 1995

7.) Deutsches Tierschutzgesetz i.d.Fassung der Bekanntmachung v.25.Mai 1998 BGBl,I S.1105

8.) B. Stahl et al.; Human Microdialysis, Current Pharmaceutical Biotechnology 3, 165, 2003

9.) US FDA; Guidance for Industry, M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals, 1997 ; <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

10.) Tierschutzbericht 2003 BMVEL 321-0869-1/8

11.) W.M.S. Russell ,Burch,R.L.; The Principles of Human Experimental Techniques; In London, Methuen, 1959

Glossar

| | |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ECVAM | European Centre for the Validation of Alternative Methods; Europäisches Zentrum für die Validierung von Alternativer Methoden |
| In silico | Untersuchungen mit Hilfe von Computerprogrammen |
| Genomics, Proteomics, Metabonomics | Identifizierung von Genen, Proteinen sowie zellulären und metabolischen Veränderungen, die mit der Einwirkung einer Substanz in Verbindung stehen |
| Limulus-Test | Test zur Untersuchung von Proben (insbesondere injizierbare Arzneimittel) auf Verunreinigung mit Endotoxin. Dabei wird das Blut eines Pfeilschwanzkrebsses verwendet. Der Test ist hoch- |

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | spezifisch für Endotoxin, erkennt andere Pyrogene nicht. |
| Mikrodialyse | Gewinnung von Körperflüssigkeiten mit Hilfe kleiner Gewebesonden |
| Photo-Toxizität | Akute Hautreaktionen nach Lichtexposition |
| Pyrogen | Stoff, der Fieber auslösen kann |
| QSAR | Computergestützte Vorhersage von toxikologischen, pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Stoffen auf der Grundlage von Strukturwirkungsbeziehungen |
| Reduce | Die Zahl der Tiere pro Versuch und die Zahl der Tierversuche soll auf ein Minimum reduziert werden |
| Replace | Tierversuche sollen nach Möglichkeit durch alternative Methoden ersetzt werden |
| Refine | Die Methodik von Tierversuchen soll so verbessert werden, dass die Belastung des Einzeltieres nach Möglichkeit eliminiert oder verringert wird |
| Screening | Vor- oder Suchtest |
| Sensibilisierung | Auslösung einer Überempfindlichkeit (Allergie) gegenüber einem Stoff |
| Stammzellen | Zellen, die noch nicht zu einem speziellen Zelltypus ausdifferenziert und noch nicht auf spezielle Aufgaben festgelegt sind |
| Validierung | Nachweis, dass ein System oder Testverfahren vorher definierten Anforderungen entspricht |
| ZEBET | Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch |