SICHERHEIT UND VERTRÄGLICHKEIT, PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK DES SELEKTIVEN ENDOTHELIN-A-REZEPTOR-ANTAGONISTEN SPP301 BEI ORALER MEHRFACHADMINISTRATION AN GESUNDE, MÄNNLICHE PROBANDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Wibke Graß
aus: Marburg

Erscheinungsjahr: 2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Kutz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Düsing

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2005

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie, AccelPharm, Hebelstrasse 15, CH-4056 Basel, Schweiz. Leitung: Prof. Dr. med. Klaus Kutz

Gewidmet

meinen Eltern

Hanne und Peter Graß

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 8

1.1 MOTIVATION 8

1.2 DAS ENDOTHELIN 8

1.2.1 Bildung und Vorkommen 8

1.2.2 Endothelin-Rezeptoren und Wirkung 9

1.3 PATHOPHYSIOLOGIE DES ENDOTHELIN-1 UND POTENTIELLE INDIKATIONEN FÜR ET-1-ANTAGONISTEN ... 14

1.3.1 Endothelin-1 bei arterieller Hypertonie und pulmonaler Hypertonie 14

1.3.2 Endothelin-1 bei Herzinsuffizienz und Herzinfarkt 16

1.3.3 Andere potentielle Indikationen 17

1.4 ENTWICKLUNG DER ENDOTHELIN-ANTAGONISTEN 18

1.5 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN VON ET-1-ANTAGONISTEN 19

1.6 SPP301 20

1.6.1 Chemische Zusammensetzung und Metabolismus von SPP301 20

1.6.2 Toxikologie von SPP301 21

1.6.3 Tolerabilität von SPP301 bei einmaliger, oraler Verabreichung an gesunde, männliche Probanden ... 22

1.6.4 Pharmakokinetik im Tier 23

1.6.5 Pharmakokinetik im gesunden Probanden nach Einmaladministration 23

2 METHODEN 23

2.1 EXPERIMENTELLES STUDIENDESIGN 23

2.2 AUSWAHL DER VERSUCHSPERSONEN 24

2.2.1 Einschlusskriterien 24

2.2.2 Ausschlusskriterien 25

2.3 RÜCKTRITTSKRITERIEN 25

2.4 ETHISCHE ASPEKTE 25

2.5 MEDIZINISCHE VORGESCHICHTE 25

2.6 KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG 26

2.7 VITALFUNKTIONEN 26

2.8 EKG 26

2.9 LABORTESTS 27

2.10 VERTRÄGLICHKEITSBEURTEILUNG 27

2.11 PHARMAKOKINETIK 28

2.12 PHARMAKODYNAMIK 28

2.13 PHARMAKOKINETISCHE UND STATISTISCHE METHODEN 28

2.14 HILFMITTEL 29

3 ERGEBNISSE ... 29

3.1 FESTLEGUNG DER DOSIERUNG UND PROTOKOLLABWEICHUNGEN ... 29
3.2 DEMOGRAPHISCHE UND ANDERE BASELINE-CHARAKTERISTIKA ... 31
3.3 SICHERHEITSAUSWERTUNG, NEBENWIRKUNGEN UND VERTRÄGLICHKEIT ... 31
3.3.1 Gesamtexposition in den einzelnen Gruppen ... 31
3.3.2 Nebenwirkungen ... 31
3.3.3 Tabellarischer Überblick über die Nebenwirkungen ... 33
3.3.4 Analyse der Nebenwirkungen ... 34
3.4 AUSWERTUNG DER LABORUNTERSUCHUNGEN ... 34
3.4.1 Entwicklung der Laborwerte über die Zeit ... 34
3.4.2 Veränderungen bei den einzelnen Probanden ... 35
3.4.3 Serum-Gallensäuren ... 36
3.5 VITALPARAMETER UND KÖRPERLICHE BEFUNDE BEZÜGLICH DER SICHERHEIT VON SPP301 ... 36
3.6 VERTRÄGLICHKEITSBEURTEILUNG ... 36
3.7 PHARMAKOKINETIK ... 36
3.7.1 Analytische Ausführung ... 36
3.7.2 Ergebnisse ... 37
3.7.3 Pharmakokinetik von SPP301 ... 37
3.7.4 Pharmakokinetik des Metaboliten Ro 68-5925 ... 39
3.8 PHARMAKODYNAMIK VON SPP301 ... 40
3.8.1 Endothelin-1 ... 40
3.8.2 Effekt von SPP301 auf Blutdruck und Herzfrequenz ... 42
3.9 PHARMAKOKINETISCHE UND PHARMAKODYNAMISCHE SCHLUSSFOLGERUNGEN ... 42

4 DISKUSSION ... 43

4.1 SICHERHEIT UND VERTRÄGLICHKEIT VON SPP301 ... 43
4.2 PHARMAKOKINETIK VON SPP301 UND SEINEM METABOLITEN RO 68-5925 ... 48
4.3 BEZIEHUNG ZWISCHEN DER SPP301-KONZENTRATION UND DEN ET-1-PLASMASPIEGELN ... 50

5 ZUSAMMENFASSUNG ... 53

6 ALPHABETISCHES LITERATURVERZEICHNIS ... 54

7 TABELLENANHANG ... 61

8 ABBILDUNGSANHANG ... 75

LISTE DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT	Angiotensin
AUC	Fläche unter der Kurve
BMI	Body Mass Index
Cmax	maximale Konzentration
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DAG	Diazylglycerol
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
ECE	Endothelin-Converting-Enzym
ET	Endothelin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HIV	Human Immunodeficiency Virus
i.v.	intravenös
IP_3	Inositoltriphosphat
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
SAB	Subarachnoidalblutung
SGOT	Serum Glutamat- Oxalacetat Transaminase
SGPT	Serum Glutamat-Pyruvat Transaminase
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
St.Abw.:	Standardabweichung
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Motivation

Die Zielsetzung dieser Studie war die Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit des ET-A-Antagonisten SPP301 unter Mehrfachverabreichung an gesunde Probanden. Die Verträglichkeit wurde bisher im Tierversuch und in einer Einzeldosis-Studie am Menschen getestet und erwies sich als sicher. Des weiteren sollte die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von SPP301 unter oraler Mehrfachdosierung untersucht werden und der Einfluss der Einnahme von SPP301 auf die Gallensäuren im Serum geklärt werden. Aus der Gruppe der Endothelin-Rezeptor-Antagonisten ist bisher Bosentan, ein dualer Antagonist, das einzige auf dem Markt zugelassene Medikament für die Indikation pulmonale Hypertonie.

1.2 Das Endothelin

Nach der Entdeckung des "endothelium-derived relaxing factor's", des von Endothelzellen sezernierten Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO), konnte auch ein vasokonstriktorisch wirkender Stoff aus dem Endothel der Aorta und der Lunge von Rindern isoliert werden (Lüscher et al., 2000). Die Substanz wurde 1985 entdeckt. Es handelt sich um ein Peptid, welches in Endothelzellen gebildet wird. Die Gensequenz wurde 1987 identifiziert, die Substanz erhielt den Namen Endothelin (ET) (Yanagisawa et al. 1988).

Bei den Endothelinen handelt es sich um eine Gruppe von drei 21-Aminosäure-Peptiden, ET-1, ET-2 und ET-3; für diese Isoformen existieren verschiedene Gene (Schmitz-Spanke und Schipke, 2000). Vor kurzer Zeit wurden auch Endotheline von 31-Aminosäurenlänge entdeckt (Lüscher et al., 2000). Endothelin-1 scheint für das kardiovaskuläre System das bedeutendste Peptid dieser Gruppe zu sein (Taddei et al., 2001).

1.2.1 Bildung und Vorkommen

Endothelin-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet. Die Biosynthese läuft über zwei Vorstufen ab. Präproendothelin-1-mRNA wird in Präpro-ET-1-Peptid translatiert; es besteht aus 203 Aminosäuren. Präpro-ET-1 wird von der Furinkonvertase gespalten, so dass Big-ET-1 entsteht, ein 38 Aminosäuren-Peptid (Lüscher et al., 2000). Big-ET-1 wird von verschiedenen Enzymen in ET-1(1-21) und ET-3 umgewandelt unteranderem von Endothelin-1-Converting-Enzyme ECE-1 und ECE-2. Die Endothelin-Converting-Enzyme gehören in die Gruppe der Metalloproteasen; man findet sie in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen und

Makrophagen. Diese Enzyme spalten nicht nur Big-ET-1, sondern auch Bradykinin, Substanz P und Insulin. Man fand heraus, dass in ECE-1-knockout-Mäusen der ET-1-Gewebespiegel nur um ein Drittel reduziert ist. Dies weist darauf hin, dass ein ECE-1 unabhängiger Bildungsweg existiert (Yanagisawa et al., 1998). Man konnte bereits zwei neue Endothelin-1-bildende Enzyme nachweisen: die Non-ECE-Metalloproteasen und die Chymasen der glatten Muskelzellen und Mastzellen. Die Mastzellchymase ist, über einen erst kürzlich entdeckten Weg, für die Bildung von 31-Aminosäure-ET mitverantwortlich (Lüscher et al., 2000).

Die Synthese von Endothelin-1 wird durch zahlreiche Mechanismen und Substanzen reguliert: durch die Änderung des pH-Wertes, Hypoxie, kardiovaskuläre Risikofaktoren wie erhöhtes LDL-Cholesterin, erhöhten Blutzucker, Östrogenmangel, Fettleibigkeit, Alter und Erhöhung prokoagulatorischer Stoffe, wie z.B. Thrombin, außerdem durch Zytokine, Adhäsionsmoleküle, andere Vasokonstriktoren und Wachstumsfaktoren, wird die Bildung von Endothelin-1 stimuliert. Physikochemische Einflüsse an den Gefäßen beeinflussen die Expression von ET-1-mRNA. Zu den Hemmstoffen der Endothelinsynthese gehören NO, Prostazyclin, atriales natriuretisches Peptid, Heparin und Östrogene (Boulanger et al. 1990; Cardillo et al., 2000; Yokokawa et al., 1993).

ET-1-Spiegel sind im Plasma messbar; der größte Anteil des ET-1 wird jedoch zur abluminalen Seite hin sezerniert, und die Plasmaspiegel sind im wesentlichen das Resultat aus variabler Ausschüttung in den Blutstrom und deshalb immer kritisch zu interpretieren (Cardillo et al.,1999). Bei Kindern findet man im Vergleich zu Erwachsenen (1-2 pg/ml) hohe ET-1 Plasmaspiegel. Außerdem existiert ein Unterschied zwischen verschiedenen ethnischen Gruppierungen, schwarze Männer haben nachweislich höhere ET-1-Plasmaspiegel als weiße Männer (Ergul A, 2000). Bei Arteriosklerose, Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, pulmonaler Hypertonie und Niereninsuffizienz sind ET-1-Gewebe- und Plasmaspiegel erhöht. Nach Ischämien oder mechanischen Irritationen, insbesondere nach Angioplastie, ist die Bildung von ET-1 gesteigert. Plasmaspiegel von ET-1 können aufgrund von gesteigerter Synthese, reduzierter Clearence oder verzögertem Metabolismus erhöht sein (Lüscher et al., 2000).

1.2.2 Endothelin-Rezeptoren und Wirkung

Endothelin-1 wirkt nach seiner Bildung und Freisetzung aus den Endothelzellen in auto-und parakriner Art und Weise. Der größte Teil wird in Richtung der angrenzenden glatten Gefäßmuskulatur sezerniert. Das Endothelin spielt auf vielen Gebieten eine wichtige modulatorische Rolle, so ist es mitverantwortlich für die Embryonalentwicklung (Yanagisawa et al., 1998) und das

postnatale Wachstum des Kindes; am kardiovaskulären System wirkt es inotropiesteigernd (Schmitz-Spanke und Schipke, 2001) und erhält den Blutdruck in komplexer Weise aufrecht. Endothelin wirkt wachstumsfördernd auf verschiedene Zellen.

Man entdeckte zunächst zwei Rezeptorsubtypen; die ET-A-Rezeptoren fand man hauptsächlich auf glatten Gefäßmuskelzellen und Herzmuskelzellen, die ET-B-Rezeptoren auf Endothelzellen und ebenfalls auf glatten Gefäßmuskelzellen. Die Existenz und Funktion eines ET-C-Rezeptors wird noch kontrovers diskutiert. Später konnte man eine Unterklassifikation in ET-A_1 und ET-A_2, sowie ET-B_1 und ET-B_2 vornehmen (Schmitz-Spanke und Schipke, 2000*)*. Die ET-B_1-Rezeptoren sind für die NO-Produktion und die vasodilatatorischen Effekte verantwortlich. Sie können mit Bosentan und RES-701-1 (ein selektiver ET-B_1-Antagonist) gehemmt werden. ET-1 wirkt an ET-B_2-Rezeptoren direkt vasokonstriktorisch, insbesondere an Venen. ET-1 und ET-3 haben eine gleichstarke Wirkung an den ET-B-Rezeptoren.

Über die ET-B-Rezeptoren wird die ET-1-Clearance in der Lunge stimuliert, die ET-1-Wiederaufnahme in die Endothelzelle gefördert und die Expression von ECE-1 gehemmt (Lüscher et al., 2000; Naomi et al., 1998).

ET-1 beschleunigt über ET-A-Rezeptoren den Ablauf des Zellzyklus, insbesondere von Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Etablierung kardiovaskulärer Erkrankungen (Lüscher et al., 2000).

1.2.2.1 ET-1 Wirkung am kardiovaskulären System

ET-1 trägt unter physiologischen Bedingungen zur Erhaltung und Regulation des basalen Gefäßtonus und Blutdrucks bei. Es besteht eine Art Gleichgewicht zwischen den, von unterschiedlichen Rezeptoren vermittelten, gegensätzlichen Effekten (Cardillo et al., 2000; Freed et al., 1999; Münter et al., 1999; Spratt et al., 2001). Endothelin und Angiotensin II spielen bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle als Gegenspieler zu Stickstoffmonoxid (NO) (Münter et al., 1999).

Die ET-A-Rezeptoren finden sich an Zellen glatter Muskulatur, dort vermitteln sie die folgenden Wirkungen des Endothelins: Kontraktion und Wachstumförderung (Cardillo et al., 2000). Die ET-B_2-Rezeptoren sind ebenfalls auf den glatten Muskelzellen lokalisiert und lösen Kontraktionen aus. Die beiden oben erwähnten Rezeptoren vermitteln die Kontraktion über die Kopplung an ein G-Protein, den Anstieg von Inositoltrisphosphat (IP_3) und die Erhöhung der intracellulären Ca^{2+}-Konzentration. Die Aktivierung der Phospholipase C durch Diazylglycerol (DAG) und

andere durch ET stimulierte Wege führt zum vermehrten Na^+-H^+-Austausch mit anschließend verstärktem Transport von Ca^{2+} in die Zelle im Austausch gegen Na^+ (Endoh et al. 1998). ET-B_1-Rezeptoren sind auf Endothelzellen lokalisiert, wo sie über die Produktion von "endothelium-derived relaxing factor" Stickstoffmonoxid (NO) eine Vasodilatation auslösen (Cardillo et al., 2000). NO hemmt den Ca^{2+}-Einstrom in die glatte Muskelzelle. Unter physiologischen Umständen bewirkt die Verabreichung von Endothelin-1 in niedriger Konzentration eine Vasodilatation, in hoher Konzentration hingegen eine Vasokonstriktion.(Cardillo et al.,1999; Montagnani et al., 2000; Schmitz-Spanke und Schipke, 2000; Taddei et al., 2001).

1.2.2.2 ET-1 Wirkung am Gehirn

Im ZNS konnten ET-1 und ET-3 nachgewiesen werden. Die Rezeptoren befinden sich interessanterweise nicht nur auf den cerebralen Gefäßen, sondern auch auf Neuronen und Gliazellen. Vorherrschend ist im Gehirn der ET-B-Rezeptor. Bei den Untersuchungen zur Pathophysiologie liegen die Schwerpunkte auf dem Zusammenhang des Endothelins mit der Entstehung der Vasospasmen nach Subarachnoidalblutungen (SAB) und der Rolle des Endothelins beim ischämischen Insult. Patienten mit SAB haben erhöhte ET-Spiegel im Plasma und im Liquor, ECE-Hemmer und ET-Antagonisten verhindern im Tiermodel effektiv das Auftreten von Vasospasmen. Es ist bekannt, dass ET zur Steigerung des Tonus der cerebralen Gefäße nach dem Verschluß eines Gefäßes beiträgt (Touzani und McCulloch, 2001). Frühzeitige Anwendung eines ET-A-Antagonisten bei Ratten mit induziertem Schlaganfall konnte die Entstehung eines Hirnödems verhindern (Blezer et al., 1999).

1.2.2.3 ET-1 Wirkung am Gastrointestinaltrakt

Die Erkenntnisse einiger Forschungsgruppen weisen daraufhin, dass der ET-3-ET-B-Pathway sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des myenterischen Nervenplexus im Darm zu spielen scheint (Henry und Goldie, 2001; Kurihara et al., 2001; Yanagisawa et al., 1998). ET-3 oder ET-B-knockout-Mäuse entwickelten ein aganglionäres Megakolon, das dem M. Hirschsprung des Menschen ähnelt (Masaki,1998). Es sind auch Mutationen des ET-3-Gens im Zusammenhang mit M. Hirschsprung bekannt (Henry und Goldie, 2001).

1.2.2.4 ET-1 Wirkung an der Lunge

An der Lunge wirkt Endothelin-1 broncho-und vasokonstriktorisch. Man fand heraus, dass die ET-B-Rezeptoren für die Bronchokonstriktion sowie die Freisetzung von Prostazyklinen verantwortlich sind. ET-A-Rezeptoren vermitteln eine Broncho- und Vasodilatation. Das Antwortmuster auf die ET-1-Gabe ist allerdings sehr komplex (Martin et al., 2000). Eine hohe Rezeptordichte findet man auf den glatten Muskelzellen der Atemwege. Man findet ET-A- und ET-B-Rezeptoren, wobei das Verhältnis zueinander stark speziesabhängig ist. Beim Menschen überwiegen die ET-B-Rezeptoren, was mit der Möglichkeit, einen Bronchospasmus auszulösen, im Einklang steht (Goldie und Henry, 2001).

1.2.2.5 ET-1 Wirkung an der Niere

ET-1 nimmt an der Regulation des Flüssigkeitshaushalts und des arteriellen Blutdrucks teil. ET-A-Rezeptoren sind hauptsächlich auf Gefäßen, ET-B-Rezeptoren auf den Tubuli lokalisiert.
ET-1 hat zwei Hauptwirkungen auf die Nierenfunktion. Einerseits die Vasokonstriktion über ET-A-Rezeptoren an der afferenten und efferenten Arteriole, was die Reduktion des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate (GFR), des Urinflusses und der Natriumausscheidung zur Folge hat (Pollock, 2001; Freed et al., 1999). Andererseits kann ET-1 die Natrium- und Wasserausscheidung direkt über tubuläre ET-B-Rezeptoren steigern. ET-1 hemmt auch die Wirkung des antidiuretischen Hormons (ADH) am Sammelrohr (Ergul et al., 2000). *In vivo* löst ET-1 in steigenden Dosen diuretische- und natriuretische Effekte vor einem vasokonstriktionsbedingten GFR-Abfall aus (Pollock, 2001). Bei Hunden konnte durch einen nichtselektiven ET-Antagonist die kontrastmittelinduzierte Vasokonstriktion aufgehoben werden, woraufhin eine Studie an Patienten mit Kreatininwerten über 2 mg/dl, die sich einer Angiographie unterziehen mussten, durchgeführt wurde. Anders als aufgrund der Tierexperimente erwartet, verschlechterte sich die renale Situation bei Kontrastmittelanwendung unter dem ET-Antagonisten. Das bedeutet, dass ET-Antagonisten bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nur mit extremer Vorsicht angewendet werden dürfen (Pollock, 2001).

1.2.2.6 ET-1 Wirkung an der Leber

Das Endothelinsystem trägt zur Regulation des intrahepatischen Widerstandes und des portalen Drucks bei. Man fand, dass ET-1 und ET-3 den portalen Druck erhöhen. Die Reaktion auf ET-1 ist umso stärker, je schwerer eine Leber geschädigt ist. Der nichtselektive ET-Antagonist Bosen-

tan ist in der Lage, den portalen Druck bei Tieren mit portaler Hypertension zu senken (Rockey DC und Weisinger RA, 1996).

1.2.2.7 Interaktion von ET-1 mit anderen vasoaktiven oder hämodynamisch-wirksamen Systemen

Es ist bekannt, dass vasoaktive Substanzen verschiedener Systeme sich gegenseitig bei ihrer Bildung stimulieren. Auch in ihrer Wirkung können sie sich gegenseitig potenzieren. Hierzu gehören z.B. Noradrenalin, Serotonin, Angiotensin II, Aldosteron und auch das Endothelin (Ergul A, 2000; Massart et al., 1998; Moreau P, 1998). Dies ist von großer Bedeutung für den therapeutischen Wert der ET-Antagonisten, da bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen eine deutliche neurohumorale Vasokonstriktorenaktivierung vorliegt, die durch Antagonisierung des Endothelins durchbrochen werden kann. Auch viele herkömmliche Antihypertensiva führen zu einer zusätzlichen Potenzierung der Vasokonstriktorenaktivierung. Unter Bosentan steigen weder die Noradrenalin-Plasmaspiegel noch die Plasmaaktivität von Renin (Krum et al.,1998a). ET-1-Antagonisten können die erhöhten Adrenalinspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz deutlich senken (Moe et al.,1998; Schalcher et al., 2001). ET hemmt die Wirkung von ADH an der Niere. Angiotensin II fördert die Produktion von Endothelin-1 bei renaler Hypertonie (Massart et al., 1998).

Münter et al. (1999) stellten fest, dass ET-A-Antagonisten und ACE-Hemmer oder AT-II-Rezeptorblocker eine synergistische Wirkung haben. Die Eicosanoide und Prostanoide sind wichtige Modulatoren der Endothelinwirkung. Ein Beispiel hierfür ist, dass das Prostazyklinanalogon Epoprostol bei der primären pulmonalen Hypertonie zur klinischen Besserung führt, weil es unter anderem die ET-1-Spiegel senkt (Stewart und Zhao, 2001).

ET-1 ist in der Lage, Rezeptoren zu aktivieren, die die Bildung von Cyclooxygenaseprodukten einleiten, die wiederum Kontraktionen in Mesenterialarterien und Vasodilatation im Lungenkreislauf auslösen (Montagnani et al., 2000).

1.3 Pathophysiologie des Endothelin-1 und potentielle Indikationen für ET-1-Antagonisten

1.3.1 Endothelin-1 bei arterieller Hypertonie und pulmonaler Hypertonie

Schon 1988 konnten Yanagisawa et al. nachweisen, dass intravenöse Applikation von ET-1 zu einem anhaltenden Blutdruckanstieg führt. Auch Patienten mit ET-1-produzierenden Hämangioendotheliomen entwickeln einen Bluthochdruck, der sich nach Entfernung des Tumors normalisiert (Lüscher et al., 2000; Yokokawa et al., 1991). Man geht davon aus, dass bei hypertensiven Patienten der Endothelin-1 Plasmaspiegel erhöht ist; was bislang oft nur auf eine gesteigerte Synthese zurückgeführt wurde. Haynes und Webb (1998) geben jedoch zu bedenken, dass bei Vorliegen einer Hypertonie meistens die renale Funktion und damit auch die ET-1-Clearance herabgesetzt ist, es also zu einem sekundären Anstieg der ET-1-Plasmakonzentrationen kommt. Die ET-1-Synthese ist in verschiedenen Tiermodellen erhöht, z.B. bei spontan hypertensiven Ratten (SHR), „desoxycorticosteronacetat“ (DOCA) - und salzempfindlichen-hypertensiven Ratten, und in Ratten nach AT-II-Infusion (Douglas und Ohlstein, 2001).

ET-1-Antagonisten senken den Blutdruck in zahlreichen Tiermodellen, z.B. bei "DOCA" - hypertensiven Ratten, Ratten unter NO-Blockade oder Ratten mit AT-II-induziertem Hypertonus und von Hunden mit renaler Hypertonie (Moreau P, 1998; Montagnani et al. 2000; Schmitz-Spanke und Schipke, 2000).

Cardillo et al. (1999) untersuchte die direkte, exogene Endothelinwirkung an Hypertonikern und einer gesunden Kontrollgruppe. Auf die Infusion von ET-1 reagierten beide Gruppen mit einer langsam einsetzenden, langanhaltenden Vasokonstriktion, die bei Patienten mit essentieller Hypertonie stärker ausgeprägt war. Bei diesem Ergebnis kann man davon ausgehen, dass die vasokonstriktorische Aktivität von ET-1 bei der essentiellen Hypertonie erhöht ist. Als Ursachen hierfür werden die erhöhte Sensitivität der glatten Muskelzelle (Hochregulation der Endothelin-Rezeptoren oder postrezeptorielle Sensibilisierung) und die Dysfunktion der ET-B-vermittelten Vasodilatation diskutiert. Außerdem differenzierte diese Forschungsgruppe die Wirkung des Endothelins an den verschiedenen Rezeptoren: Blockiert man die ET-A-Rezeptoren mit BQ-123, kam es bei hypertensiven Patienten, sowie in der Kontrollgruppe, zur Vasodilatation (Cardillo et al., 1999; Spratt et al., 2001).

Der ET-B-Antagonist BQ-788 ruft bei Gesunden eine Vasokonstriktion hervor, während es bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu einer kurzanhaltenden Vasodilatation kommt, die sich

durch den Antagonismus an den ET-B_2-Rezeptoren der glatten Muskelzellen erklären lässt. Offensichtlich ist die Funktion des über ET-B_1 vermittelten NO-Pathways bei Hypertonikern beeinträchtigt (Cardillo et al., 1999; Taddei et al., 1999).

Bei der arteriellen Hypertonie liegt ein Mangel an NO-vermittelter Vasodilatation vor, hier besteht die Querverbindung zum Endothelinsystem (Taddei et al., 1999). Der vasodilatative Effekt des ET-A/ET-B-Antagonisten verhält sich umgekehrt zur NO-Verfügbarkeit. Je niedriger die NO-Konzentration desto stärker ausgeprägt ist die Vasodilatation, die durch ET-Antagonisten erreicht werden kann. Bei Hypertonikern sind die Gegebenheiten ebendiese: Die klassische, direkte vasokonstriktorische Wirkung übersteigt in dem Fall die Wirkung der ET-B vermittelten endothelialen NO-Produktion (Taddei et al., 1999).

Blockierte man ET-A und ET-B-Rezeptoren zur gleichen Zeit, ergab dies bei den hypertensiven Patienten eine Vasodilatation, die sogar stärker war als die Vasodilatation bei selektiver ET-A-Blockade (Cardillo et al.,1999).

Bosentan, ein nichtselektiver ET-A/ET-B-Antagonist und die erste auf dem Markt zugelassene Substanz dieser Gruppe, senkt den Blutdruck hypertensiver Patienten signifikant gegenüber Placebo und vergleichbar mit dem durch Enalapril erreichten antihypertensiven Effekt. Die positiven Ergebnisse dieser Studie an 293 Patienten mit milder bis moderater essentieller Hypertonie legen die Beteiligung des Endothelinsystems an der Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes nahe (Krum et al., 1998a).

Zusammenfassend kann man an dieser Stelle festhalten, dass ET-1 bei Hypertonikern eine größere vasokonstriktive Aktivität besitzt als bei Gesunden. Bei Hypertonie ist die ET-1-vermittelte NO-Produktion herabgesetzt. Das Gleichgewicht zwischen dem vasokonstriktorischen System und dem NO-vermittelten vasodilatativen System - beide abhängig von ET-1 - ist gestört. Des weiteren ist bei Erklärungsversuchen die renale Wirkung, mit Natrium- und Wasserretention, nicht außer Acht zu lassen (Haynes und Webb, 1998).

In großen Multicenterstudien, wurden unter anderem Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses der genetischen Polymorphismen im ET-1-Gen auf das Vorkommen von Myokardinfarkt und Hypertonie durchgeführt. Nur in Verbindung mit einem erhöhten BMI zeigten gewisse Polymorphismen eine Korrelation mit erhöhten Blutdruckwerten (Tiret et al.,1999).

Auf der Suche nach Auslösern und Ursachen für den erhöhten Druck im Lungenkreislauf, z. B. bei der primären pulmonalen Hypertonie, fand man vor der Entdeckung des Endothelins ein Ungleichgewicht zwischen dem vasokonstriktorisch wirkenden Thromboxan A2 und dem vaso-

dilatatorisch wirkenden Prostazyclin (PGI2), woraufhin man begann PGI2-Analoga (Iloprost) therapeutisch einzusetzen. Heute ist das Endothelin der stärkste bekannte Vasokonstriktor im Lungenstromgebiet. Über seine Funktion als Wachstumsfaktor trägt es außerdem zu Umbauvorgängen an den Gefäßen bei. Es wurde gezeigt, dass der ET-1-Gradient über dem Lungenstromgebiet bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie geringer ist als bei Kontrollpersonen, was eine gestörte pulmonale ET-Clearance impliziert. Es liegen also auch bei diesem Krankheitsbild erhöhte ET-1-Spiegel vor. Mittels Gentransfer des ET-1-Gens in Lungenarterien von Mäusen konnte man eine Hypertrophie der Media auslösen, wie man sie auch bei der pulmonalen Hypertrophie findet. In diesem Zusammenhang wurden gute Ergebnisse mit der Verabreichung von BQ-123 und Bosentan erzielt. Bosentan hat im Lungenstromgebiet eine stärkere Wirkung als am systemischen Kreislauf, es erzielt bei oraler Langzeitanwendung eine deutliche Verbesserung der kardiopulmonalen Hämodynamik und der Belastungfähigkeit (Channick et al., 2001; Stewart und Zhao, 2001).

1.3.2 Endothelin-1 bei Herzinsuffizienz und Herzinfarkt

ET-1-Spiegel sind auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, korrelierend mit den NYHA-Stadien, erhöht (Schmitz-Spanke und Schipke, 2000). Anhand der Plasmaspiegel von Big-ET-1 lässt sich die 1-Jahres-Mortalität besser vorhersagen als mit etablierten Prädiktoren wie z.B. ANP-Spiegel, NYHA-Stadien oder echokardiographischen Parametern. Bei Ratten mit experimenteller Herzinsuffizienz kommt es zur vermehrten Expression von Präproendothelin-mRNA im ischämischen Myokard, ebenso nach einem akuten Myokardinfarkt. Es ist schwer zu sagen, ob ET-1 eine nützliche oder schädliche Wirkung innerhalb dieser beiden Erkrankungen zuzuschreiben ist. ET-1 ist durch seine teilungsfördernden, fibroblastenstimulierenden und zytokinfreisetzenden Eigenschaften am Heilungsprogramm beteiligt. Tatsache ist aber, dass unphysiologisch hohe ET-1-Plasmaspiegel nicht förderlich sind. Über ein ET-1-getriggertes genetisches Programm kommt es bei der chronischen Herzinsuffizienz zur exzessiven Hypertrophie des Myokards. Über den durch ET-1 ausgelösten Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes steigen Vor- und Nachlast. Am Herzen selber wird durch ET-1 über eine Vasokonstriktion an den Koronararterien die Sauerstoffversorgung des Myokards weiter gedrosselt. LU 135252 verbessert bei Hunden mit experimentell-induziertem Herzversagen die hämodynamischen Störungen und die Auswurfleistung des Herzens. Es milderte den Anstieg des pulmonalen und des systemischen Gefäßwiderstandes im Vergleich zu Placebo. Dabei ist der Einfluss auf die pulmonalen Gefäßen deutlich stärker (Moe et al., 1998).

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die bereits ACE-Hemmer erhalten, erreicht man eine unabhängige Besserung durch die Infusion von einem ECE-Hemmer und Hemmstoff der neutralen Endopeptidase und einem ET-A-Rezeptorantagonisten (Love et al., 1996). Eine Studie von Sutsch et al. (1998) zeigt, dass Bosentan bei Patienten mit manifester Herzinsuffizienz (NYHA III) zusätzlich zur konventionellen Dreifachtherapie mit Diuretikum, Digoxin und ACE-Hemmer nach zwei Wochen zu einer Erhöhung der kardialen Auswurfleistung und einem Abfall des systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstandes führt. Tezosentan konnte in einer placebokontrollierten Multicenterstudie an Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz den Herzindex verbessern was durch die Abnahme von Vor-und Nachlast bedingt war. Der klinische Allgemeinzustand der Patienten wurde subjektiv und objektiv als verbessert eingeschätzt (Torre-Amione et al., 2001). In den Auswertungen der aktuellsten multizentrischen Langzeitstudien zur Anwendung von ET-1 Antagonisten an Patienten mit Herzinsuffizienz, wie z.B. der EARTH-, REACH-1-, ENABLE- oder RITZ-Studie, konnten die primären Endpunkte oft nicht erreicht werden. Die Effizienz der Anwendung von ET-1-Antagonisten bei Herzinsuffizienz über einen längeren Zeitraum konnte gegenüber Placebo nicht bestätigt werden. Dies wirft zur Zeit einige Fragen auf, da die Ergebnisse über kurze Anwendungszeiträume am Menschen, sowie im Tier sehr vielversprechend waren. Es ist notwendig, die Definition der primären Endpunkte einiger Studien erneut zu überdenken. Was jedoch erkenntlich wurde ist, dass bei der Herzinsuffizienz und dem akuten Myokardinfarkt das zeitliche Intervall, in dem die ET-1-Antagonisten zum Einsatz kommen, für die erzielten Effekte essenziell ist (Ertl und Bauersachs, 2004).

1.3.3 Andere potentielle Indikationen

Intensive Forschung wird auch zum Einsatz der Endothelin-Antagonisten bei Prostata-Karzinom betrieben. Endothelin-1 zeigt *in vitro* mitogene Eigenschaften an Prostatazellen, zudem scheint es eine tragende Rolle bei der Tumorangiogenese zu spielen (Nelson JB, 2003; Kopetz et al., 2002). Das Prostata-Karzinom ist einzigartig in der Bildung osteoblastischer Knochenmetastasen und man nimmt an, dass die Osteoblastenfunktion durch einen endothelinabhängigen Mechanismus stimuliert wird. Die erhöhten Spiegel der Alkalischen Phosphase bei dieser osseären Metastasierung sind unter Einsatz von Endothelin-Antagonisten rückläufig (LeRoy et al., 2004). Auch der therapieresistente Schmerz in diesem Stadium der Erkrankung wird auf Veränderungen der Nozizeption durch Endothelin zurückgeführt. In Phase II und III Studien konnte mit einem ET-A-Antagonisten der Krankheitsprogress signifikant verzögert werden (Pecher et al., 2004).

Ein weiteres therapeutisches Zielgebiet von ET-1-Antagonisten könnte das Glaukom sein. Das ET-1 ist an der Pathogenese des Glaukoms und seiner Folgeerscheinungen, wie z. B. der Schädigung des Nervus Optikus, beteiligt. ET-1 senkt zwar den Augeninnendruck, vermindert aber die Durchblutung der Retina und des Sehnerven, wobei dieser durch chronische Ischämie geschädigt wird. Desweiteren führt ET-1 zur Proliferation von Astrozyten bei gleichzeitigem Untergang von Ganglienzellen. Kürzlich wurden vielversprechende Ergebnisse mit Unoprostone (Novartis, Basel, Schweiz) erreicht. Diese Substanz antagonisiert die vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 (Fernandez-Durango, 2003).

ET-1-Spiegel sind ebenfalls bei der akuten Exazerbation des Asthma bronchiale und der COPD erhöht, bei der schweren COPD sogar in Phasen der Rekompensation. Man nimmt an, dass dies mit der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie in Verbindung steht und das hier ein potentielles Einsatzgebiet für ET-1-Antagonisten sein könnte (Naeije und Barbera, 2001; Spiropoulos et al., 2003).

1.4 Entwicklung der Endothelin-Antagonisten

Am Anfang der Entwicklung der ET-1-Antagonisten (1989) stand die Synthese von nichtselektiven Antagonisten über die Veränderung des Endothelins am C-terminalen Ende des ET-1, welches für die Rezeptorerkennung ausschlaggebend ist. Es entstanden lineare Hexapeptide. Die ersten ET-A-Antagonisten leiten sich ebenfalls von der Struktur des Endothelins ab, sie wurden zunächst aus einem Fermentationsprodukt des Streptomyces misakienses gewonnen (Ihara et al., 1991). Ein häufig zu Studienzwecken verwendeter ET-A-Antagonist dieser Gruppe ist BQ-123. Man fand heraus, dass sich die drei Endotheline bezüglich ihrer gebundenen Reste an Position 14 des C-terminalen Endes gleichen. Diese Stelle ist ausschlaggebend für die Affinität zum ET-B-Rezeptor. Man ließ deshalb diese Region unverändert und erhielt ET-B-selektive Blocker. Der bekannteste ist BQ-788.

Ein großer Schritt auf der Suche nach klinisch verwendbaren ET-Antagonisten war - bei der Weiterentwicklung eines Antidiabetikums - die Entdeckung einer Substanz, die in der Lage ist, ET-Rezeptoren zu blockieren und die nicht auf die Grundstruktur eines Peptids zurückgeht, was ihr eine orale Bioverfügbarkeit verleiht. Es handelte sich zuerst um Substanzen auf Pyrimidinbasis. Die Bekannteste hiervon ist Bosentan, ein nichtselektiver ET-1-Antagonist, der heute schon klinisch angewandt wird.

Die ersten ET-A-selektiven Antagonisten ohne Peptidgrundgerüst fand man über Screening von Naturprodukten; einige wurden aus einer Streptomyceslinie isoliert, andere aus den Früchten des

Lorbeerbaums. Diese Naturstoffe haben sehr komplexe chemische Strukturen (Elliott und Xiang, 2001).

1.5 Unerwünschte Wirkungen von ET-1-Antagonisten

Ein Klasseneffekt der Endothelin-Antagonisten ist die Teratogenität, da das Endothelinsystem bekanntlich eine essentielle Rolle bei der Organogenese spielt. Die Teratogenität manifestiert sich in kraniofazialen Malformationen und Organmissbildungen. Mäuse mit Mangel an ET-1 hatten bei Geburt kraniofaziale Missbildungen und Herzfehler, sie starben kurz nach der Geburt am Versagen des Respirationstraktes (Masaki T, 1998). Aus diesen Gründen sind die ET-Antagonisten in der Schwangerschaft und bei Frauen im gebährfähigen Alter kontraindiziert. Während der klinischen Erprobung war die Verabreichung von Endothelin-Antagonisten gelegentlich mit einem Anstieg der Herzfrequenz, mit einer Flush-Symptomatik und/oder einem Ödem im Gesichtsbereich vergesellschaftet (Lüscher und Barton, 2000; Krum et al.,1998a). Es trat durchweg ein Nitrat-ähnlicher Kopfschmerz auf; diese Erscheinung war jedoch bei Gesunden stärker ausgeprägt als bei Patienten mit Hypertonie (Freed et al., 1999; Krum et al., 1998a; Lüscher und Barton, 2000; Torre-Amione et al., 2001). Teilweise kommt es zu gastrointestinalen Begleiterscheinungen, wie Übelkeit, Erbrechen und Obstipation. Einige Endothelin-Antagonisten, z.B. Bosentan, interagieren durch Induktion des Enzyms CYP 3A4 und CYP 2C9 mit oralen Antikoagulantien, insbesondere mit Warfarin (Weber et al., 1999). Bei gleichzeitiger Verabreichung von Endothelin-Antagonisten und ACE-Hemmern oder AT_1-Rezeptorblockern verstärkt sich der hypotensive Effekt (Massart et al., 1998; Münter et al., 1999). Als extrem selten auftretende Nebenwirkungen wurden Rückenschmerzen, Harnretention und ein Abfall der Hämoglobin- und Hämatokritwerte beschrieben (Schalcher et al., 2001; Torre-Amione et al., 2001).

Bei Anwendung von Endothelin-Antagonisten sollte man den Lebertransaminasen besondere Beachtung schenken; in einer Studie mit Bosentan kam es gehäuft zu einem deutlichen, dosisabhängigen, jedoch reversiblen und asymptomatischen Anstieg dieser Enzyme (Channick et al., 2001; Krum et al., 1998a).

In einer Zweitanalyse der Sicherheitsparameter aus dieser Studie ließ sich der hepatotoxische Effekt von Bosentan genauer charakterisieren: als Definition für einen Leberschaden wurde ein um mehr als das Dreifache angestiegener SGPT-Wert festgelegt, mit Hilfe des SGPT/Alkalische Phosphatase-Quotienten teilte man in cholestatische, hepatozelluläre und gemischte Leberschädigungen ein. Es zeigte sich, dass bei allen Patienten mit erhöhter SGPT auch der Cholestase-

marker Alkalische Phosphatase erhöht war, was eine Bosentan-induzierte cholestatische Leberschädigung nahelegt. Die Gallensalze im Serum waren gleichzeitig erhöht, das Bilirubin im Normbereich. Bosentan scheint mit dem Gallensäuresekretionssystem zu interferieren, wodurch sich Gallensäuren intrazellulär anhäufen, und es zum Gallensäure-induzierten Leberzellschaden kommt. Für Patienten unter Therapie mit Glibenclamid ist das Risiko für eine Bosentan-induzierte Leberschädigung höher. Es ist bekannt, dass Glibenclamid genauso wie Cyclosporin A und Rifampicin über die Hemmung der biliären, kanalikulären Gallensalz-Exportpumpe eine cholestatische Leberschädigung auslösen kann. Es bestätigte sich im Tiermodel und *in vitro*, dass dies bei Bosentan ebenso der Fall ist. Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz könnten, aufgrund ihrer krankheitsbedingten Vorbelastung der Leber, besonders zur Bosentan-induzierten Leberschädigung neigen (Fattinger et al., 2001). Durch gleichzeitige Einnahme von Glibenclamid, Fluvastatin und Losartan wird die Inzidenz des reversiblen Transaminasenanstiegs unter Bosentan erhöht (Speedel internes Dokument)

Bei Ratten fand man nach Anwendung eines ET-1-Antagonisten cerebrale Blutungen in den Basalganglien, eine spezifische Zerebrotoxizität kann somit nicht ausgeschlossen werden. In anderen Endorganen und bei niedrigeren Dosen kam es zu keinen ähnlichen Erscheinungen; die Bedeutung dieser Beobachtung für den therapeutischen Gebrauch von ET-A-Rezeptorblockern bei Hypertonie ist ungeklärt (Blezer et al., 1999).

1.6 SPP301

1.6.1 Chemische Zusammensetzung und Metabolismus von SPP301

SPP301 (Ro 67-0565) gehört in die Klasse der funktionalisierten Pyridylsulfonamidpyrimidine. Es ist stabil, hat keine Chiralitätszentren und ein Molekulargewicht von 479.52 Dalton. Der chemische Name ist 5-Methyl-pyridin-2-sulfon-Säure; [6-methoxy-5-(2-methoxy-phenoxy)-2-pyridin-4-yl-pyrimidin-4-yl]-amid; Formel: $C_{23}H_{21}N_5O_5S$. Die chemische Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt (Speedel internes Dokument).

In vitro fand man mittels radioaktiv markiertem SPP301 (Ro 67-0565), das mit einer Aufbereitung von Lebermikrosomen inkubiert wurde, heraus, dass die SPP301 sowohl in der menschlichen Leber, als auch bei Ratten, Meerschweinchen, Hunden und Affen einheitlich zu zwei Hauptmetaboliten abgebaut wird. Es handelt sich um Ro 68-5925 und Ro 68-9005, welcher sofort glucuronidiert wird und dann als Ro 69-3579 vorliegt (siehe Abbildung 2). Der Hydroxymethyl-Metabolit Ro 68-5925 ist pharmakologisch aktiv und blockiert *in vitro* und *in vivo* den

ET-A-Rezeptor. Über Ro 69-3579, den zweiten Metaboliten liegen bisher keine Daten vor. Man nimmt an, dass er nur eine geringe pharmakologische Aktivität besitzt, da er nicht als freie Katechol-Substruktur vorliegt, was essentiell ist für die Bindung an Endothelin-Rezeptoren. *In vivo* wird SPP301 (Ro 67-0565) bei männlichen Ratten vollständig metabolisiert und dann unabhängig von der Verabreichungsform zu 98% über die Galle und den Stuhl ausgeschieden. Nur 1-2% werden über den Urin ausgeschieden. Im Plasma wurde nach i.v.-Administration nur unverändertes SPP301 nachgewiesen, nach oraler Gabe erschien auch in geringen Mengen Ro 69-3579. SPP301 selbst wird nicht glucuronidiert.

Man kann somit von einem Phase I Metabolismus zu Ro 68-9005 und Ro-68-5925 und einem Phase II Metabolismus mit der Glucuronidierung zu Ro 69-3579 sprechen. Die Hauptmetabolite der Phase I sind Produkte von CYP450-katalysierten Reaktionen, beim Menschen der Isoformen 2C9 und 3A4. Ob SPP301 eine Hemmung der CYP450-Enzyme bewirkt, wurde an den fünf wichtigsten menschlichen Isoformen untersucht. Eine signifikante Hemmung zeigte sich lediglich für CYP 3A4, man nimmt einen kompetitiven Aktionsmechanismus an. Die Möglichkeit, aufgrund dieser Daten Rückschlüsse auf eine potenzielle Medikamenteninteraktion zu ziehen, ist begrenzt. Die Relevanz des Ergebnisses sollte in klinischen Studien überprüft werden.

Bei Ratten wurde eine Induktion der CYP450-Enzyme ausgeschlossen, während bei Hunden eine schwache Induktion stattzufinden scheint (Speedel internes Dokument).

1.6.2 Toxikologie von SPP301

In Pilotstudien zur Toxikologie an Ratten und Hunden wurde SPP301 in steigenden Dosen bis zu 2000 mg/kg sehr gut vertragen. In Toxikologiestudien an Ratten, mit den oraler Dosierungen bis 1000 mg/kg/Tag, wurden an weiblichen Ratten keine Nebenwirkungen gefunden. Bei männlichen Ratten fiel eine dosisabhängige Verminderung der Spermienbeweglichkeit- und anzahl, ein Anstieg des Hodengewichts und ein Trend zu einem höheren Herzgewicht auf. Histopathologisch offenbarte sich eine dosisabhängige Erweiterung der testikulären, kanalikulären Lumen. Die Veränderungen waren alle reversibel, bis auf die Spermienmotilität.

In einer Toxikologiestudie an Hunden stellte man einen mäßigen, dosisabhängigen Anstieg des Lebergewichts fest. Ein Hund zeigte eine minimale testikuläre, tubuläre Degeneration. Obwohl diese Veränderung wahrscheinlich spontan aufgetreten ist, kann ein möglicher Zusammenhang mit der Behandlung nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Während einer 12-wöchigen Pilot-Studie an männlichen Affen blieb das Körpergewicht, die Nahrungsaufnahme, die Spermienmotilität, das testikuläre Volumen, die Serum-

Testosteronkonzentration und die Histopathologie der Hoden, der Nebenhoden, der Samenbläschen und der Prostata unbeeinflusst. Der Einfluss auf die Nierenfunktion wurde an Ratten untersucht. Hierbei trat erst unter 200 mg/kg ein transienter Abfall der Kalzium- und Natriumausscheidung auf.
An isolierten Purkinjefasern von Kaninchen wurde ein pro-arrhythmisches Potenzial der Substanz SPP301 ausgeschlossen. Die kardiovaskuläre Sicherheit wurde in Beagle-Hunden geprüft. Der arterielle Mitteldruck wurde über 18h um 15-20 mmHg gesenkt, ohne dass sich Herzfrequenz, EKG und insbesondere das QT-Intervall veränderten. Die Gefahr der Genotoxizität wurde an Testsystemen mit bakteriellen Zellen und Säugetierzellen, sowie *in vivo* an Mäusen untersucht und ausgeschlossen. SPP301 erwies sich in einem Fibroblastentest unter UV-Bestrahlung als nicht phototoxisch. An Ratten wurde eine Studie zur Auswirkung von SPP301 auf die embryonale und fetale Entwicklung durchgeführt. Es bestätigte sich die Teratogenität in der niedrigsten Dosierungsstufe.

1.6.3 Tolerabilität von SPP301 bei einmaliger, oraler Verabreichung an gesunde, männliche Probanden

SPP301 wurde in einer Studie an gesunden, männlichen Probanden getestet; die Substanz wurde einmalig oral verabreicht. Es handelte sich um eine placebo-kontrollierte Tolerabilitätsstudie. Der Dosierungsbereich zwischen 5 mg und 200 mg SPP301 wurde getestet. Bei der 50 mg Dosierungsstufe wurde zusätzlich der Effekt der Nahrungsaufnahme auf die Pharmakokinetik untersucht. SPP301 war in Dosierungen bis zu 200 mg gut verträglich. Es kam weder zu Todesfällen, noch traten ernste oder klinisch relevante Nebenwirkungen auf. Die Inzidenz der Nebenwirkungen stieg mit der Dosis, bei den beiden niedrigsten Dosierungen (5mg und 20mg) gab es keinerlei Nebenwirkungen. Unter den höheren Dosierungen waren Kopfschmerz von milder bis mittelstarker Intensität die häufigste Nebenwirkung; diese begannen meist ca. 4-5 h nach der Medikamenteneinnahme. Extrem selten traten Übelkeit und Erbrechen, orthostatischer Hypotonie mit Schwindel und Bewusstseinsverlust auf, letzteres auch bei einer Person unter Placebo. Diese Nebenwirkungen hielten nur einige Minuten an und klangen spontan wieder ab.
Es wurden keine Veränderungen der Vitalfunktionen festgestellt, und es gab auch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosierungsgruppen. EKG-Parameter, sowie Blutbild, biochemische Parameter und die Körpertemperatur wurden durch das Studienmedikament nicht beeinflusst (Dieterle et al., 2004).

1.6.4 Pharmakokinetik im Tier

SPP301 hat bei Ratten und Hunden ein hohe orale Bioverfügbarkeit, die totale Blutclearance und das Verteilungsvolumen sind sehr niedrig. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei ungefähr 4h bei der Ratte und 3h beim Hund, nach oraler Gabe (Ratte, Hund) und intravenöser Verabreichung (Hund). Die absolute Bioverfügbarkeit lag beim Hund zwischen 75% (1 mg/kg) und 82% (4 mg/kg). Die Substanz hat eine hohe Plasmaeiweißbindung (>99%); sie bindet an Albumin. Eine kleine Menge dringt in die Erythrozyten ein. Das Blut/Plasma-Verhältnis liegt bei Ratten um 0.86 und bei Hunden um 0.71. In einer Untersuchung an Ratten wurde ausgeschlossen, dass SPP301 ins ZNS gelangt.

1.6.5 Pharmakokinetik im gesunden Probanden nach Einmaladministration

Es wurden bei allen Probanden die Plasmakonzentrationen von SPP301 (Ro 67-0565) und von Ro 68-5925 nach den unterschiedlichen Dosen gemessen. SPP301 erscheint unter nüchternen Bedingungen mittelmäßig schnell, Ro 68-5925 eher langsam im Plasma. Die maximalen Konzentrationen wurden für SPP301 nach 4.5h, für Ro 68-5925 nach 11h erreicht. Bis zu einer Dosisstufe von 100 mg stiegen C_{max} und AUC von unverändertem SPP301 und Metabolit linear mit der Dosis an. Bei 200 mg wurde kein weiterer Anstieg der C_{max} und nur eine geringe Vergrößerung der AUC festgestellt. Die Halbwertszeit war relativ konstant über den ganzen Dosierungsbereich und betrug für SPP301 im Durchschnitt zwischen 7.5h und 15.2h, für Ro 68-5925 zwischen 7.6h und 11.7h. Die gleichzeitige Nahrungsaufnahme bei 50 mg hatte im Grossen und Ganzen keine Auswirkung. Man kann somit bei einer Dosis bis zu 100 mg von einer linearen Pharmakokinetik von SPP301 und seinem Metaboliten ausgehen.

2 Methoden

2.1 Experimentelles Studiendesign

Das experimentelle Design dieser klinischen Studie ist monozentrisch, doppelblind, randomisiert, placebokontrolliert und mit wiederholt ansteigender Dosis in sequentiellen Gruppen gesunder, männlicher Versuchspersonen. Alle Probanden erhielten zuerst eine Einzeldosis. Nach einer Auswaschphase von 48h wurde dann einmal täglich die Studienmedikation über sieben Tage verabreicht. Darauf folgte eine Auswaschphase von 72h. Ursprünglich war die Untersuchung einer Dosisspanne von 20 mg bis 80 mg geplant; dieser Dosisbereich musste allerdings aufgrund von Nebenwirkungen 5 mg bis 60 mg korrigiert werden (siehe Kapitel 11.1 Protokoll-

abweichungen). Jeder Proband erhielt nur eine Dosisstufe. Die nächsthöheren Dosierungsgruppe wurde begonnen, nachdem die Verträglichkeit in der darunterliegenden Gruppe abgeschätzt werden konnte. Grundsätzlich wurde das Medikament nüchtern eingenommen. Zu den Zeitpunkten, an denen die Gallensäureexkretion untersucht wurde, wurde zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme eine fettreiche Mahlzeit verabreicht. Dies fand am Tag vor der allerersten Medikation (Tag 1) nach einer einzelnen Placeboeinnahme statt und am Tag 6 unter den wiederholten Dosierungen (Tag 9 der Studie).

2.2 Auswahl der Versuchspersonen

Insgesamt nahmen zweiunddreißig (32) Versuchspersonen an der Studie teil. Drei Wochen bis drei Tage vor Studienbeginn wurden sie untersucht und entsprechend den folgenden Kriterien ausgewählt. Vor der ersten Medikation und auch im Studienverlauf wurden diese Kriterien nochmals überprüft.

2.2.1 Einschlusskriterien

Bedingung für die Teilnahme an der Studie war kaukasischer Ursprung, männliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 45 Jahren, Körpergewicht zwischen 60 und 95 kg und BMI zwischen 18 und 28 kg/m^2. Vorraussetzungen waren außerdem regelrechte Entwicklung der Genitale, unauffällige medizinische Vorgeschichte und keine aktuellen körperlichen Befunde von klinischer Relevanz. Normaler Blutdruck und Puls (systolischer Wert: 100-140 mmHg, diastolischer Wert: 45-90 mmHg, Puls 45-90 bpm nach 5 Min Ruhe in Rückenlage) und klinisch normales 12-Kanal EKG (PR-Intervall: $\leq$ 200 ms, QRS-Dauer $\geq$ 120 ms, $QT_c \leq$ 440 ms) gehörten zu den Einschlusskriterien. Blutbild, klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes und Urinanalyse sollten im Normbereich für gesunde Männer liegen, bzw. nur leicht und ohne klinische Relevanz hiervon abweichen. Der Drogentest musste negativ sein, der Alkoholkonsum unter 30 g/d liegen und die Probanden sollten zur Abstinenz während der Hospitalisationsphase in der Lage sein. Nur Nichtraucher oder Versuchspersonen, die weniger als 10 Zigaretten täglich rauchen und dies während der Hospitalisation unterlassen konnten, wurden in die Studie aufgenommen. Es durfte kein exzessiver Konsum von koffeinhaltigen Getränken praktiziert werden, außerdem wurden normale Essgewohnheiten (keine Vegetarier usw.) vorausgesetzt.

Die Probanden sollten der Sprache des Untersuchers insoweit mächtig sein, als dass sie sich in dieser verständlich machen können. Die Probanden mussten über den Verlauf der Studie und deren Risiken aufgeklärt werden und eine Zustimmungserklärung unterzeichnen.

2.2.2 Ausschlusskriterien

Personen mit positiver Serologie für HIV, HBV, HCV, mit bekannter Überempfindlichkeit gegenüber Medikamenten oder bekannten behandlungsbedürftigen Allergien wurden nicht in die Studie aufgenommen. Die Versuchspersonen durften weder den Bedarf nach Medikamenten haben (einschließlich Antazida und Analgetika, usw.), noch innerhalb der vorangegangenen zwölf Wochen an einer anderen klinischen Medikamentenstudie teilgenommen haben (ausgenommen immunsuppressive oder immunmodulatorische Substanzen, hierbei betrug die Ausschlussperiode sechs Monate). Es durften in den vorangegangenen sechs Monaten keine enzyminduzierenden oder enzymhemmenden Medikamente eingenommen worden sein, auch nicht solche, die bekannterweise Organtoxizität aufweisen. Es durften im Zeitraum von sechs Monaten vorher keine Endothelin-Antagonisten eingenommen worden sein. Innerhalb von vier Wochen vor der Screeninguntersuchung durften keine klinisch relevanten Krankheiten aufgetreten sein, einschließlich bakterieller, viraler Infekte und Pilzinfektionen.

2.3 Rücktrittskriterien

Die Versuchspersonen hatten das Recht, jederzeit von der Studienbehandlung zurückzutreten. In diesem Fall war der Untersucher verpflichtet, die genauen Gründe für den Rücktritt zu dokumentieren.

2.4 Ethische Aspekte

Die Untersucher stellten sicher, dass die klinische Studie gemäss Studienprotokoll, der Deklaration von Helsinki (revidierte Version von Edinburg, 2000) und den Gesetzen und Richtlinien des Bundeslandes Bayern ablief. Man nahm das zur Richtlinie, was den größten Schutz des Individuums gewährleistete. *(Votum der Ethikkommission ist einzusehen beim Sponser der Studie (Speedel, Basel) und bei MDS Pharma Services in D-85631 Höhenkirchen-Siegertsbrunn, wo der klinische Teil der Studie unter der Leitung von Dr. med. Wolfgang Tetzloff durchgeführt wurde).* Die Versuchspersonen wurden aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einverständniserklärung.

2.5 Medizinische Vorgeschichte

In der Screeninguntersuchung wurde die medizinische Vorgeschichte des Probanden erfasst und dokumentiert. Hierbei wurde jede, innerhalb eines festgelegten Zeitraumes vorangegangene Medikation dokumentiert.

2.6 Körperliche Untersuchung

Die körperliche Untersuchung war mit einer allgemeinmedizinischen Check-up-Untersuchung identisch: Inspektion des ganzen Körpers sowie Palpation, Perkussion und Auskultation. Zudem erfolgte die Messung der Körpertemperatur, des Blutdrucks und des Pulses. Die körperliche Untersuchung fand zu folgenden Zeitpunkten statt: Screening (drei Wochen bis drei Tage vor der ersten Medikamentenverabreichung), am Tag vor der ersten Medikamentenverabreichung, 48h nach der letzten Einnahme der Studienmedikation und bei der Abschlussuntersuchung (fünf bis sieben Tage nach der letzten Medikation).

2.7 Vitalfunktionen

Der systolische und diastolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz wurden indirekt gemessen; dabei wurde ein automatisches Oszillometriegerät verwendet, welches die Daten automatisch dokumentiert (CARDIOCAP II DATEX oder NIPPON COLIN). Die Messung wurde immer am gleichen Arm durchgeführt, zuerst in Rückenlage nach fünf Minuten Ruhe, dann dreimal in stehender Position, sofort nach dem Aufstehen und nach einer und nach zwei Minuten.

Die Untersuchung der Vitalfunktionen fand zu folgenden Zeitpunkten statt: Screening (drei Wochen bis drei Tage vor der ersten Medikamentenverabreichung); am Tag vor der ersten Medikamentenverabreichung; am Tag 2 und 10 unmittelbar vor der Medikamentenverabreichung (0h) und 1h, 2h, 4h, 6h, 9h, 12h, 16h, 24h, 30h, 36h und 48h danach; am Tag 1, 4 und Tag 9 unmittelbar vor der Medikamentenverabreichung (0h) und 1h, 2h, 4h, 6h,9h,und 12h danach; und bei der Abschlussuntersuchung.

2.8 EKG

Es wurde ein 12-Kanal EKG abgeleitet: peripher I, II, III nach Einthoven, aVR, aVL, aVF nach Goldberger und präkordial V1-V6 nach Wilson; außerdem D2-kanal 50 mm/sec mit der Amplitude von 2 mV, Gerät: HEWLETT-PACKARD Pagewriter XLI Cardiograph, Papiergeschwindigkeit: 25mm/sec. Der Proband befand sich während der Untersuchung in Rückenlage, die Aufzeichnung begann nach fünf Minuten Ruhe.

Die folgenden Parameter wurden beurteilt: PR-Intervall (ms), QRS-Dauer (ms), QT-Intervall (ms), QT_c (ms) Beurteilung mit Hilfe der Bazett-Formel, Herzfrequenz (bpm), Rhythmus, QRS-Achse. Die EKG- Untersuchungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: Screening; am Tag vor der ersten Medikamentenverabreichung; am Tag 2 und 10 unmittelbar vor der Medikamen-

tenverabreichung und 2h, 12h, 24h, 48h danach; am Tag 7 unmittelbar vor der Medikamentenverabreichung und 12h danach; und bei der Abschlussuntersuchung.

2.9 Labortests

Die Blutproben wurden am liegenden Probanden aus den Kubital- oder Unterarmvenen entnommen, alle Bestimmungen wurden nach den Richtlinien für "Good Clinical Practice" durchgeführt. Zu folgenden Zeiten wurden Laborparameter bestimmt: Screening; am Tag vor der ersten Medikamentenverabreichung; am Tag 4, 6, 9 jeweils vor der morgendlichen Medikamentenverabreichung; am Tag 12 (48h nach der letzten Medikation); und bei der Abschlussuntersuchung.

Folgende Laborparameter wurden bestimmt:

Hämatologie: Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenzahl, Differenzialblutbild: Basophile, Eosinophile, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Andere,Prothrombinzeit (nur bei der Screeninguntersuchung)

Klinische Chemie: Natrium, Kalium, Glucose, Triglyceride, Cholesterol, Gesamteiweiß, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, SGOT, SGPT, Alkalische Phosphatase (AP), GGT, LDH, Gesamtbilirubin

Virusserologie (nur bei der Screeninguntersuchung): HBs-Ag, Anti-HCV-Antikörper, Anti-HIV1/Anti-HIV2-Antikörper

Qualitative Urinanalyse (Multistix): pH, Glucose, Ketonkörper, Protein, Nitrit,Erythrozyten, Leukozyten, Spezifisches Gewicht

Drogenscreening: (bei der Screeninguntersuchung und bei Aufnahme): Methadon, Benzodiazepine, Kokain, Amphetamine, Tetrahydrocannabiol, Opiate, Barbiturate, trizyklische Antidepressiva

Serum-Gallensäuren: am Tag 1 und 9: 2h nach Medikation (direkt vor der fettreichen Mahlzeit), dann 2.5h, 3.0h, 3.5h, 4.0h und 4.5h nach der Medikation;

2.10 Verträglichkeitsbeurteilung

Nebenwirkungen wurden registriert, wenn sie spontan auftraten.Sie wurden aber auch in 12 h-Intervallen und bei der Abschlussuntersuchung konkret erfragt. Es wurde eine Evaluationsskala mit fünf Graden verwendet: sehr gut, gut, befriedigend, unbefriedigend und schlecht.

Die Untersucher gaben ihre Beurteilung der Vertäglichkeit bei der Abschlussuntersuchung ab; es wurde ebenfalls eine Evaluationsskala mit fünf Graden verwendet: sehr gut, bei keinen Sym-

ptome und sonstigen Zeichen; gut, bei geringfügigen Symptomen oder sonstigen Zeichen; befriedigend, bei Kenntnisnahme von Symptomen, die aber alltägliche Aktivitäten nicht einschränken; unbefriedigend, bei Symptomen oder sonstige Zeichen, die die alltäglichen Aktivitäten stören; unbefriedigend, bei Symptomen oder sonstigen Zeichen, die die alltäglichen Aktivitäten stören, und schlecht, bei Unfähigkeit zu arbeiten oder alltäglichen Beschäftigungen nachzugehen, untolerierbar für den Probanden.

2.11 Pharmakokinetik

Zur Beurteilung der Pharmakokinetik wurden SPP301 und sein aktiver Hydroxymethyl-Metabolit Ro 68-5925 im Plasma bestimmt, hierzu wurde zu folgenden Zeiten Venenblut entnommen: Tag 2 und 10: unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (0h) und 0.33h (20 Min.), 0.67h (40 Min.), 1.0h, 1.5h, 2.0h, 3.0h, 4.5h, 6.0h, 9.0h, 12h, 16h, 24h, 30h, 36h und 48h danach; sowie an Tag 10 72h danach. Tag 5-9: unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (0h).

2.12 Pharmakodynamik

Zur Beurteilung der Pharmakodynamik wurde die Plasma-Endothelin-1-Konzentration bestimmt. Die Bestimmungen geschahen zu folgenden Zeitpunkten: Tag 2 und 10: unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (0h) und 0.33h (20 Min.), 0.67h (40 Min.), 1.0h, 1.5h, 2.0h, 3.0h, 4.5h, 6.0h, 9.0h, 12h, 16h, 24h, 30h, 36h und 48h danach; sowie an Tag 10 72h danach. Tag 5-9: unmittelbar vor der Medikamenteneinnahme (0h).

2.13 Pharmakokinetische und Statistische Methoden

Das Hauptziel dieser Studie war die Untersuchung der Sicherheit und Verträglichkeit von SPP301 in den Dosierungen von 5 mg, 20 mg, 40 mg und 60 mg. Dazu wurde ein Parallelgruppendesign gewählt, in dem jeweils 6 Probanden aktive Substanz und zwei Probanden Placebo erhielten. Diese geringe Fallzahl pro Gruppe schließt von vorn herein eine konfirmatorische Statistik im Sinne von Hypothesen testen aus. Deshalb wurden nur deskriptive statistische Parameter berechnet, wie Mittelwert, Standardabweichung, Median, Bereiche, etc. Für die statistische Auswertung wurden eher exploratorische Methoden eingesetzt, die zum einfacheren Vergleich die gemessenen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Profile parametrisieren. Folgende pharmakokinetischen und –dynamischen Parameter wurden aus den individuellen Konzentrationsprofilen extrahiert oder berechnet:

C_{max} maximale Konzentration nach Einmaldosis oder im Steady State

t_{max} Zeitpunkt, an dem die maximale Konzentration gemessen wurde

C_{min} minimale Konzentration nach Einmaldosis oder im Steady State

t_{min} Zeitpunkt, an dem die minimale Konzentration gemessen wurde

C_{trough} Konzentrationen unmittelbar vor der Medikamentenverabreichung

AUC_{0-t} Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt t, berechnet mittels der Trapez Regel:

$$AUC_{0-t} = \sum_i \frac{C(t_{i+1}) + C(t_i)}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

Bei einmaliger Dosierung wählt man t als den letzten Zeitpunkt, bei dem die Konzentration über der Nachweisgrenze liegt.

AUC_{τ} Fläche unter der Kurve eines Dosisintervals; in dieser Studie ist τ=24 Stunden.

AUC_{inf} oder AUC_{∞} Fläche unter der Kurve von 0 bis unendlich berechnet nach

$$AUC_{\inf} = AUC_{0-t} + C_t \frac{t_{1/2}}{\ln(2)}$$

C_t ist die gemessene Konzentration zum letzten Zeitpunkt.

Beim Vorliegen einer linearen Pharmakokinetik gilt:

$$AUC_{\inf,\ nach\ einmalige\ Gabe} = AUC_{\tau,\ im\ Steady\ State}$$

$t_{1/2}$ Eliminationshalbwertszeit. Sie wird bestimmt, indem man die Steigung der logarithmierten Konzentrationen in der Eliminationsphase bestimmt. Es müssen immer mindestens drei Konzentrationen berücksichtigt werden.

Cl/F „orale“ Clearance. Es handelt sich um die Clearance des Medikamentes unter Berücksichtigung des Anteils der Dosis F, die tatsächlich absorbiert und in die Zirkulation gelangt. Dieser Anteil kann nur bei intravenöser und oraler Verabreichung im selben Probanden bestimmen.

$$CL/F = \frac{AUC_{\inf}}{Dosis} = \frac{AUC_{\tau}}{Dosis}$$

Bei linearer Pharmakokinetik ist die orale Clearance unabhängig von der Dosis.

Ae_{0-48h} Prozentualer Anteil der Dosis, die im Urin ausgeschieden wird.

$$Ae_{0-48h} = \frac{C_{Urin} V_{Urin}}{Dosis} 100\%$$

V_{Urin} ist das Gesamtvolumen des über 48 Stunden gesammelten Urins, C_{Urin} ist die gemessene Konzentration von unverändertem SPP301 oder Metabolit im Urin

%AvB Prozentuale Abweichung von Baseline für pharmakodynamische Größen und Vitalparameter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$ET_{t,\%AvB} = \frac{ET_t - ET_{Baseline}}{ET_{Baseline}} 100\%$$

Es wurden deskriptive statistische Parameter von oben genannten Parametern berechnet, und zum Vergleich in Tabellen und in Graphiken zusammengestellt. Statistischen Tests wurden wegen der geringen Fallzahl nicht angewendet.

Alle Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2000 und Microsoft Access 2000 unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 2000 durchgeführt. Als Graphikpaket kam Microcal Origin Version 5.0 zum Einsatz.

2.14 Hilfmittel

Der Sponsor dieser Studie war die biopharmazeutische Firma Speedel mit Sitz in Basel. Der klinische Teil der Studie wurde bei MDS Pharma Services in D-85631 Höhenkirchen-Siegertsbrunn unter der Leitung von Dr. med. Wolfgang Tetzloff durchgeführt. Die bioanalytischen Messungen führte MDS Pharma Services in CH-8320 Fehraltorf aus. Studienplanung, Datenmanagement, kinetische/statistische Auswertung und Interpretation wurden von mir unter Anleitung von Prof. Dr. med. Klaus Kutz am Institut für Klinische Pharmakologie, Accel Pharm, CH-4056 Basel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Festlegung der Dosierung und Protokollabweichungen

Aufgrund bekannter Ergebnisse der Studie mit ansteigenden Einmalgaben von SPP301 an gesunde Probanden, gab es keine Vorbehalte, mit einer Dosis von 20 mg zu beginnen (Dieterle et al., 2004). Wegen des gehäuften Auftretens von Kopfschmerzen und Transaminasenanstiegen unter 60 mg wurde die Dosissteigerung abgebrochen und anstelle von 80 mg zusätzlich die 5 mg

Dosierung getestet. Es kam zu keinen groben Protokollabweichungen während des gesamten Studienablaufs.

3.2 Demographische und andere Baseline-Charakteristika

Zweiunddreißig junge, gesunde, männliche Probanden kaukasischen Ursprungs, welche die Einschlußkriterien erfüllt hatten und bei denen keine Ausschlußkriterien zutrafen, wurden in die Studie aufgenommen. **Tabelle 1** und **Tabelle 2** zeigen die demographischen Daten für die gesamte Studienpopulation, sowie getrennt für die Placebo- und die Verumgruppen. Alle Behandlungsgruppen waren bezüglich Alter, Gewicht, Größe und Body-Mass-Index vergleichbar. Die Probanden, die SPP301 erhielten, waren in ihren demographischen Eigenschaften vergleichbar mit der Placebogruppe. Entsprechend der Einschlußkriterien nahmen ausschließlich Männer kaukasischen Ursprungs teil.

Siebzehn der Probanden hatten klinische Befunde in der Vorgeschichte. Diese hatten jedoch keine Relevanz für die Teilnahme an der Studie. Rauch- und Trinkgewohnheiten lagen innerhalb der vorgegebenen Grenzen. Wie im Studienprotokoll gefordert, hatten alle Probanden bei der Screeninguntersuchung und am Tag der Aufnahme einen negativen Alkoholatemtest, ein negatives Drogenscreening und eine negative Serologie für Hepatitis und HIV.

3.3 Sicherheitsauswertung, Nebenwirkungen und Verträglichkeit

3.3.1 Gesamtexposition in den einzelnen Gruppen

Die Dosierungsgruppe mit 5 mg täglich erhielt eine Gesamtexposition von 40 mg SPP301, die 20 mg-Gruppe erhielt insgesamt 160 mg, die 40 mg-Gruppe erhielt insgesamt 320 mg und die 60 mg-Gruppe erhielt über den gesamten Studienzeitraum insgesamt 480 mg SPP301.

3.3.2 Nebenwirkungen

Die Daten der individuellen Nebenwirkungen bei den einzelnen Probanden, mit Beginn, Dauer und eventueller korrektiver Therapie, sind in **Tabelle 3** einzusehen. Dieses Kapitel soll zusammenfassend wichtige Trends hervorheben, und es wird genauer auf die Probanden eingegangen, bei denen typische klassenspezifische Nebenwirkungen wie Gesichtsödem oder schmerzhafte Augenrötung auftraten.

In **Tabelle 4** ist das Auftreten von Kopfschmerzen, der häufigsten Nebenwirkung unter SPP301, im zeitlichen Verlauf der Studie dargestellt. Es wird ersichtlich, dass es an Tag 2 und Tag 4, dem

Tag der Einzeldosierung und dem ersten Tag der Mehrfachdosierung, häufiger zu Kopfschmerzen kam als im übrigen Verlauf. Die Daten zeigen zusätzlich, dass die Kopfschmerzen gehäuft zwischen 3h bis 5h nach der Einnahme des Medikaments auftraten. Bei zwei Probanden kam es unter Placebo mehrmals zu Kopfschmerzen milder Intensität.

In der 5 mg-SPP301-Gruppe zeigten drei Probanden Nebenwirkungen; diese traten erst ab dem 4. Tag in der Phase der wiederholten Einnahme von SPP301 auf. Es handelte sich um Kopfschmerzen milder Intensität und bei einem Probanden um Halsschmerzen über 5 Tage; letztere wurden vom Untersucher nicht mit der Studienmedikation in Verbindung gebracht.

In der 20 mg-SPP301-Gruppe gaben insgesamt 4 Versuchpersonen eine Gesamtzahl von 11 Nebenwirkungen an, diese traten unter Placebo, Einzel- und Mehrfachdosierung auf. Es kam zum Auftreten von mehreren Episoden schwacher bis mittelstarker Kopfschmerzen. Ein Proband entwickelte an Tag 10 Fieber mit Temperaturen bis zu 38.7°C und eine Erkältung; er wurde über drei Tage mit 1 g Paracetamol behandelt. Nach Meinung des Untersuchers ist ein Zusammenhang dieser Beschwerden mit der Studienmedikation ist unwahrscheinlich.

In der 40 mg-SPP301-Gruppe wurden von allen 6 gesunden Probanden insgesamt 33 Nebenwirkungen angeben. Nach der Einzeldosis von 40 mg SPP301 an Tag 2 traten bei 5 Probanden Nebenwirkungen auf, wobei es sich um Kopfschmerzen schwacher bis mittlerer Intensität handelte und in einem Fall um Übelkeit und Erbrechen. Nach wiederholter Einnahme von 40 mg SPP301 zwischen dem 4. und 10. Tag gaben 6 Probanden Nebenwirkungen an; in den meisten Fällen wurden schwache bis mittelstarke Kopfschmerzen beobachtet, einmal kam es zu Übelkeit und Erbrechen. Bei einem Probanden trat eine Rhinitis auf, die wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Medikamenteneinnahme steht.

Besonders auffällig reagierte ein Proband unter 40 mg, der am Morgen des 6. Tages die Studie auf eigenen Wunsch abbrach. Dieser Proband beobachtete 6 Nebenwirkungen: an Tag 4, 5 und 6 berichtete er über zwei Episoden milder Kopfschmerzen und eine Episode starker Kopfschmerzen. Der Proband erhielt deshalb 1g Paracetamol. Er gab dann an Tag 6 ca. 24h nach der zuletzt eingenommenen Dosis (an Tag 5) drei weitere Nebenwirkungen an: er klagte über Unwohlsein, es war ein Gesichtsödem und eine konjunktivale Injektion zu beobachten, wobei die beiden letzteren ungefähr 3h anhielten. Diese unerwünschten Wirkungen verschwanden spontan und ohne Folgen.

Eine andere Versuchsperson dieser Gruppe gab 9 Nebenwirkungen an: an Tag 4 berichtete sie über 3 Nebenwirkungen: 4.5h nach Verabreichung des Medikaments kam es bei dem Probanden

zu schwachen Kopfschmerzen, 3.5h später zu schwacher Übelkeit, nach weiteren 15 min. zu einmaligem Erbrechen. Die Kopfschmerzen wurden mit 1 g Paracetamol behandelt. An Tag 6, 7, 8 und 9 hatte er 4 Episoden schwacher Kopfschmerzen. An Tag 10 kam es bei diesem Probanden zu Kopfschmerzen mittlerer Intensität zusammen mit mittelstarker Injektion der Konjunktiven.

Unter der 60 mg-SPP301-Gruppe gaben 6 gesunde Probanden eine Gesamtzahl von 40 Nebenwirkungen an. Nach der einmaligen oralen Einnahme von SPP301 an Tag 2 kam es bei allen 6 Probanden zu Kopfschmerzen eher mittlerer Intensität, bei zweien kam es zu Übelkeit und einer dieser beiden Probanden zeigte einmaliges Erbrechen.

Nach der wiederholten Einnahme von 60 mg SPP301 von Tag 4 bis Tag 10 zeigten alle 6 Probanden Nebenwirkungen. Alle erlebten 4-6 Episoden schwacher bis mittelstarker Kopfschmerzen, die teilweise mit Paracetamol behandelt wurden und alle folgenlos abklangen.

Bei einem Proband kam es neben den Kopfschmerzen, an Tag 5, 6 und 8 zu 3 Episoden mit Auftreten eines schwachen Gesichtsödems, die ungefähr 22h nach der Medikation begannen und zwischen 5 und 8.5h anhielten. An Tag 9 gab der Proband einen schwachen Tinnitus an, der 12.5h nach Medikamenteneinnahme begonnen hatte und für etwa 1.75h anhielt. Gesichtsödem und Tinnitus klangen spontan und wie alle Nebenwirkungen folgenlos ab.

Ein weiterer Proband gab 2 Nebenwirkungen an: am Tag 5 kam es zu einer schwachen Rhinitis mit Beginn etwa 23h nach Medikamenteneinnahme, die für 4.5h bestehen blieb. Der Proband entwickelte außerdem an Tag 7 ungefähr 23h nach der Medikation ein schwaches Gesichtsödem, welches über 4h zu beobachten war. Alle diese Nebenwirkungen klangen spontan und folgenlos ab.

Bis auf die Rhinitis sind alle Nebenwirkungen in Zusammenhang mit der Studienmedikation zu sehen.

3.3.3 Tabellarischer Überblick über die Nebenwirkungen

In **Tabelle 5** und **Tabelle 6** wird ein Überblick über die vorgekommenen Nebenwirkungen gegeben. Dabei erscheinen die unter einmaliger Gabe und unter mehrmaliger Gabe aufgetretenen Nebenwirkungen getrennt; es wird die Gesamtzahl angegeben und nach dem betroffenen Organsystem aufgelistet.

Die **Tabelle 7** und **Tabelle 8** geben einen Überblick über die Anzahl der Probanden mit Nebenwirkungen, geordnet nach deren Häufigkeit. Wieder werden erst die unter einmaliger Gabe,

dann die unter mehrmaliger Gabe von Placebo oder der Studienmedikation in ihren unterschiedlichen Dosierungen dargestellt.

3.3.4 Analyse der Nebenwirkungen

Unter den beiden niedrigsten Dosierungen, 5 mg und 20 mg SPP301, wurden unter einmaliger, sowie mehrmaliger Verabreichung nur wenige Nebenwirkungen angegeben. Unter 40 mg und 60 mg bei einmaliger, sowie mehrmaliger Verabreichung, war die vorherrschende Nebenwirkung Kopfschmerz. Das Auftreten eines Gesichtsödems kam einmal unter 40 mg und viermal unter einer Dosis von 60 mg vor. Dabei war in der 60 mg Gruppe dreimal derselbe Proband betroffen. Das Gesichtsödem trat frühestens ab Tag 5 auf und zuletzt an Tag 8; in allen Fällen durchschnittlich 22h nach der letzten Medikamenteneinnahme. Eine schmerzhafte Augenrötung zeigte sich bei zwei Probanden aus der 40 mg Gruppe an Tag 6 und Tag 10.
Die Nebenwirkungen Kopfschmerz, Gesichtsödem und schmerzhafte Augenrötung sind typisch für vasodilatatorische Substanzen und stimmen somit mit dem für SPP301 postuliertem Wirkmechanismus überein (D´Arcy et al., 1985; de la Sierra et al., 2004; Elliott 1996; Mehta et al., 1975; Miura et al., 1988; Woo und Pun, 1990).
Andere Nebenwirkungen waren seltener, hierzu gehörten Übelkeit, Erbrechen, Rhinitis, Unwohlsein, Tinnitus, Halsschmerzen, Fieber und Nasopharyngitis. Es traten weder schwere Nebenwirkungen noch Todesfälle auf.

3.4 Auswertung der Laboruntersuchungen

3.4.1 Entwicklung der Laborwerte über die Zeit

Der Überblick über die zusammenfassenden Statistiken lässt im Allgemeinen keinen Behandlungseffekt auf die hämatologischen oder klinisch-chemischen Parameter, sowie auf die im Urin gemessenen Parameter erkennen. Es fielen in allen Gruppen, inklusive der Placebogruppe, grenzwertige Abfälle des Hämoglobins, des Hämatokrits und der Erythrozytenzahl auf. Dies kann auf die mehrfachen Blutentnahmen zur Erhebung der Messwerte zur pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und zur Sicherheitsbeurteilung zurückgeführt werden und wird nicht als klinisch relevant erachtet.

3.4.2 Veränderungen bei den einzelnen Probanden

Hämatologie: Einige der Probanden hatten hämatologische Laborbefunde, die bei der Screeninguntersuchung und während des Studienzeitraums ausserhalb der Normbereiche lagen. All diese Veränderungen waren unbedeutend und nicht von klinischer Relevanz.

Klinische Chemie: Bei einigen Probanden kam es zum Anstieg der Transaminasen und in einigen Fällen war die Erhöhung der Werte klinisch relevant.

SGPT Aktivität: Unter Placebo kam es bei zwei Probanden zu einem Anstieg der SGPT (von 17 U/L an Tag 0 auf 33 U/L an Tag 6 und von 9 U/L an Tag 0 auf 29 U/L an Tag 9).

Nach Verabreichung von 40 mg SPP301 kam es bei zwei Probanden zu einem Anstieg der SGPT (von 12 U/L an Tag 0 auf 25 U/L an Tag 6 und von 18 U/L an Tag 0 auf 39 U/L an Tag 9).

In der 60 mg SPP301 Gruppe kam es bei fünf Probanden zu einem Anstieg der SGPT (von 16 U/L an Tag 0 auf 46 U/L an Tag 12; von 17 U/L an Tag 0 auf 52 U/L an Tag 12; von 12 U/L an Tag 0 auf 62 U/L an Tag 12; von 17 U/L an Tag 0 auf 28 U/L an Tag 12; von 20 U/L an Tag 0 auf 39 U/L an Tag 9)

SGOT Aktivität: Nach Verabreichung von 60 mg SPP301 kam es bei fünf Probanden zu einem Anstieg der SGOT (von 13 U/L an Tag 0 auf 24 U/L an Tag 12; von 11 U/L an Tag 0 auf 21 U/L an Tag 12; von 8 U/L an Tag 0 auf 25 U/L an Tag 12)

Die klinisch relevant erhöhten Leberwerte sind in **Tabelle 9** zusammengestellt. Alle sonstigen Leberwerte, die getestet wurden, befanden sich im Normbereich.

Bei der Abschlussuntersuchung der Studie hatten sich die Transaminasen entweder normalisiert oder waren signifikant abgefallen. Bei keinem der Probanden war ein weiterer Transaminasenanstieg zu beobachten. Keiner der angestiegenen Werte der Transaminasen erreichte das Dreifache der Obergrenze des Normbereichs; die Anstiege lagen zwischen dem 1.5- und 2.5-fachen des oberen Normbereichs. Es kam weder zum Anstieg der gamma-GT, noch der alkalischen Phosphatase oder des Bilirubins. Einige der Probanden hatten vor und während der Verabreichung des Studienmedikaments Laborwerte, die ausserhalb der Normbereiche lagen, insbesondere Cholesterolwerte und Triglyceride. In Einzelfällen wurden abnorme Werte für Kalium, Harnsäure und Gesamtbilirubin gemessen. All diese klinisch-chemischen Befunde waren unbedeutend und hatten keine klinische Relevanz.

Urinanalyse: Bei einigen Probanden fielen vor und nach der Einnahme des Studienmedikaments Werte ausserhalb der Referenzbereiche auf, keiner dieser Befunde war aber durchgehend oder fortbestehend ausserhalb des Normbereichs.

3.4.3 Serum-Gallensäuren

Die Parameter der Gallensäuren und deren beschreibende Statistik sind in **Tabelle 10** dargestellt, jeweils bei einmaliger und mehrmaliger Verabreichung des Studienmedikaments. **Abbildung 3** zeigt die individuellen Konzentrations-Zeit-Kurven der Gallensäuren im Plasma für jede der fünf Behandlungsgruppen. Die Daten zeigen vergleichbare Baseline-Konzentrationen für die Gallensäuren im Serum in allen Gruppen an Tag 1. Die wiederholte Einnahme von SPP301 führte nicht zu einem postprandialem Anstieg der Gallensäuren im Serum.

3.5 Vitalparameter und körperliche Befunde bezüglich der Sicherheit von SPP301

Die Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz im Liegen, direkt, eine und zwei Minuten nach dem Aufstehen ergaben Schwankungen innerhalb der normalen Variabilität im Tagesverlauf. Einige Probanden zeigten Anstiege oder Abfälle der Parameter über die Referenzbereiche hinaus. Auch innerhalb der Normbereiche spiegelte sich der Effekt des Medikaments wieder, worauf in Kapitel 3.9 genauer eingegangen wird. Die oral gemessene Körpertemperatur zeigte normale Werte. Alle im EKG erfassten Parameter lagen innerhalb der Normbereiche. Bei der körperlichen Untersuchung, die zu Beginn, während und bei Abschluss der Studie durchgeführt wurde, fielen keine klinisch relevanten Befunde oder Veränderungen durch die Medikamenteneinnahme auf.

3.6 Verträglichkeitsbeurteilung

Einzeldosen von bis zu 20 mg SPP301 wurden gut vertragen. Bei den höheren Dosierungen stieg die Anzahl der Nebenwirkungen. Bei 5 von 6 Probanden unter 60 mg, 3 von 6 Probanden unter 40 mg und einem Probanden unter Placebo, kam es zu Anstiegen der SGPT. Drei Probanden unter 60 mg zeigten zusätzlich SGOT-Anstiege. Die Transaminasenanstiege überschritten in keinem Fall das Dreifache der oberen Normgrenze; die Veränderungen waren transient und klangen spontan wieder ab. Die übrigen Laborparameter, sowie die Vitalzeichen und das EKG blieben von der Behandlung unbeeinflusst.

3.7 Pharmakokinetik

3.7.1 Analytische Ausführung

Die SPP301-Plasmakonzentration und die des Hydroxymethyl-Metaboliten, Ro 68-5925, wurden mittels einer spezifischen und sensitiven LC/MS/MS Methode bestimmt (Müller, 2002). Alle Konzentrationen von SPP301 und Ro 68-5925 sind in ng/mL angegeben. Die Exaktheit (pro-

zentuale Abweichung von der Zielkonzentration in den Qualitätskontrollproben) der Bestimmungsmethode von SPP301 und Ro 68.5925 in Plasma, die Präzision und untere Nachweisgrenze (LLQ) sind in **Tabelle 11** dargestellt.

3.7.2 Ergebnisse

Die deskriptive, beschreibende statistische Analyse der pharmakokinetischen Parameter wurde für alle Probanden unter SPP301 durchgeführt, bis auf den Proband Nr. 2.01, der die Studie an Tag 5, nach der zweiten Wiederholungsdosis von 40 mg SPP301, abbrach. Er wurde nur in der Einzeldosisanalyse eingeschlossen.

3.7.3 Pharmakokinetik von SPP301

Der zeitliche Verlauf der mittleren Plasmakonzentrationen von SPP301 nach ein- und mehrmaliger Verabreichung von vier ansteigenden Dosen (5 mg, 20 mg, 40 mg und 60 mg) ist in **Abbildung 4** dargestellt. Um die Grafik nicht zu überlasten, wurden keine Fehlerbalken eingezeichnet.

Gemäss Studienprotokoll wurde am Studientag 2 zum Zeitpunkt 0h die erste Dosis verabreicht, um über einen Zeitraum von 48 Stunden die Verteilung und Auswaschkinetik von SPP301 nach Einmaldosierung zu untersuchen. Ab Zeitpunkt 48 h wurden alle 24 Stunden insgesamt sieben orale Verabreichungen durchgeführt, bei denen immer ein Messwert unmittelbar vor der jeweiligen Gabe (trough level) genommen wurde. Der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentrationen wurde nach der siebten Gabe wieder als ganzes Profil bis in die Auswaschphase erfasst. Damit stehen zur pharmakokinetischen Auswertung jeweils ein Profil nach Einmalgabe und im Steady-State zur Verfügung. Wie aus der **Abbildung 4** schon qualitativ zu erkennen ist, werden nach höherer Dosierung größere Plasmaspiegel von SPP301gemessen und es kommt im Verlauf der Mehrfachgaben nicht zu einer nennenswerten Akkumulation von SPP301 im Plasma. Gleichmäßige Trough Levels stellen sich bereits nach der zweiten bis dritten Dosierung ein.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter (siehe **Tabelle 12** und **Abbildung 5**) erlaubt eine präzisere Beurteilung der pharmakokinetischen Profile. Nach einmaliger Gabe von SPP301 werden maximale Plasma Konzentrationen im Mittel zwischen 3.8 h und 4.8 h nach Administration erreicht. Es handelt sich um einen relativ langsamen Absorptionsprozess, wobei die Dauer bis zum t_{max} sich mit Steigerung der Dosis leicht verlängert. Die Maximalkonzentrationen von SPP301 steigen linear mit der Dosis mit mittleren Werten von 138.1 ± 20.4 ng/mL nach 5 mg und 1730 ± 413.5 ng/mL nach Gabe von 60 mg SPP301.

Nach dem Erreichen der Maximalkonzentration nimmt die Plasmakonzentration monoexponentiell mit einer mittleren Halbwertszeit zwischen 6.5 h und 10.4 ab, so dass zum Zeitpunkt 48 h fast das gesamte unveränderte SPP301 ausgewaschen ist. Die Eliminationshalbwertszeit ist stabil über alle Dosisstufen. Die Fläche unter der Plasmakonzentration - Zeit - Kurve ($AUC_{0-\infty}$) ist ein Maß für die Gesamtexposition der Substanz. Wie die **Abbildung 5** zeigt, wächst $AUC_{0-\infty}$ linear mit der Dosis. Nach 5 mg beträgt sie 1483.8 ± 130.7 h ng/mL und steigt bis auf Werte 22386.9 ± 5159.3 h ng/mL nach 60 mg SPP301. Die „orale“ Clearance (CL/f), die sich aus dem Verhältnis von $AUC_{0-\infty}$ zur Dosis berechnet, ist mit mittleren Werten von 2.8 – 3.4 L/h bemerkenswert konstant über den gesamten Dosisbereich. SPP301 wird nur in geringem Maße unverändert im Urin ausgeschieden. Der Anteil der verabreichten Dosis, der im gesammelten Urin nachgewiesen werden kann, ist kleiner als 0.011%.

Die pharmakokinetischen Parameter von SPP301 im Steady State sind in **Tabelle 12** im unteren Bereich aufgelistet. Die Maximalkonzentrationen werden im Mittel zwischen 3.1 h und 4.3 h erreicht und sind damit vergleichbar mit den t_{max} Werten nach einmaliger Gabe. Die gemessenen Maximalkonzentrationen im Steady State steigen linear mit der Dosisstufe und liegen im gleichen Bereich wie nach Einzeldosis; d.h. 136.0 ±17.7 ng/mL nach 5 mg und 1160.1 ± 337.5 ng/mL nach 60 mg SPP301. Wie aus der **Abbildung 5** zu erkennen ist, liegt die $AUC(\tau)$ - das ist die Fläche unter der Kurve über ein 24-stündiges Dosierungsinterval gemessen - systematisch unter der $AUC_{0-\infty}$ nach einmaliger Gabe. Es ist allerdings zu bemerken, dass sich die Fehlerbalken auf allen Dosisstufen überlappen und damit der Unterschied nicht bedeutend ist. Dies wird auch durch die relative Konstanz der „oralen“ Clearance Mittelwerte (CL/f) bestätigt, die sich im Bereich von 3.6 L/h und 4.4 L/h bewegen. Die min-max Bereiche der individuellen Clearance-Werte überdecken eine Spanne von 2.9 L/h bis 5.3 L/h, unabhängig von der Dosis. Die Eliminationshalbwertszeiten sind mit mittleren Werten zwischen 7.6 h und 9.7 h im gleichen Bereich mit denen nach einmaliger Gabe. Auch im Steady State wird nur extrem wenig unverändertes SPP301 im Urin ausgeschieden.

Wie die graphische Darstellung der pharmakokinetischen Parameter (**Abbildung 5**) zeigt, sind die Werte nach einmaliger Gabe von SPP301 und im Steady State unmittelbar vergleichbar. Das Absorptionsverhalten ist unverändert, und es kommt zu keiner Akkumulation von SPP301 nach mehrfachen Dosierungen. Außerdem ist die „orale“ Clearance unter beiden Bedingungen vergleichbar und sehr konstant. Die Eliminationshalbwertszeit ist ebenfalls unverändert. Aus alle-

dem kann man schließen, dass unverändertes SPP301 im getesteten Dosisbereich zwischen 5 mg und 60 mg einer linearen Pharmakokinetik folgt.

3.7.4 Pharmakokinetik des Metaboliten Ro 68-5925

Der zeitliche Verlauf der mittleren Plasmakonzentrationen von Ro 68-5925 nach ein- und mehrmaliger Verabreichung von vier ansteigenden Dosen von SPP301 (5 mg, 20 mg, 40 mg und 60 mg) ist in **Abbildung 6** dargestellt. Um die Grafik nicht zu überlasten, wurden keine Fehlerbalken eingezeichnet. Die pharmakokinetischen Parameter von Ro 68-5925 sind in **Tabelle 13** aufgelistet und in **Abbildung 7** graphisch dargestellt.

Nach einmaliger Gabe von SPP301 und im Steady State liegt die Zeit bis zum Erreichen der Maximalkonzentrationen zwischen 6.5 h und 9.4 h. und tritt damit um etwa 4 Stunden später als die Maximalkonzentrationen des unveränderten SPP301 auf. Die Maximalkonzentrationen steigen linear mit der Dosis und sind unter Einmalgabe und im Steady State fast identisch. Es werden C_{max} Werte von 5.4 ng/mL nach Einmalgabe von 5 mg und 69.1 ng/mL nach Einmalgabe von 60 mg erreicht, verglichen mit 6.3 ng/mL und 56.6 ng/mL im Steady State. Die Eliminationshalbwertszeit ist unabhängig von der Dosierung und liegt im Mittel zwischen 7.2 h und 9.7 h nach Einmalgabe und im Steady State. Die Fläche unter der Kurve steigt ebenfalls linear mit der Dosis, im gleichen Verhältnis nach Einmalgabe wie nach Mehrfachadministration. Der Metabolit Ro 68-5925 wird deutlich mehr über den Urin ausgeschieden als das unveränderte SPP301. Man findet im Mittel zwischen 1.4% und 3.9% der verabreichten Dosis von SPP301 als Metabolit im Urin. Diese Werte sind stabil über alle Dosisstufen und auch im Vergleich von Einzeldosis mit Steady State.

In **Abbildung 8** ist das Verhältnis der Konzentrationen Ro 68-5925 und SPP301 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Für die höheren Dosierungen 20 mg – 60 mg stellt sich nach 24 Stunden ein stabiles Verhältnis von Metabolit und unverändertem SPP301 ein, welches über eine zehntägige Verabreichungsdauer beibehalten wurde. Lediglich die 5 mg Dosierung zeigt einen langsamen Anstieg und nähert sich nach zehn Tagen asymptotisch dem konstanten Verhältnis, das bei den höheren Dosen gefunden wurde. Das stabile Verhältnis von Metabolit und unverändertem SPP301 belegt eindrücklich die Linearität der Pharmakokinetik von SPP301 und Ro 68-5925.

3.8 Pharmakodynamik von SPP301

3.8.1 Endothelin-1

Die ET-1-Plasmaspiegel wurden mittels eines spezifischen und sensitiven Chemilumineszens-Immunoassays bestimmt. Alle ET-1-Konzentrationen werden in pg/mL angegeben.

Abbildung 9 zeigt die mittlere Plasmakonzentration versus Zeit Kurven von Endothelin-1 für Placebo und die unterschiedlichen SPP301-Dosen unter den Bedingungen der einmaligen und mehrmaligen Einnahme. Nach Placebogabe fluktuieren die Endothelin-1 Konzentrationen im Bereich zwischen 0.5 pg/mL und 1.8 pg/mL. Die Konzentrationen zeigen kein zeitliches Muster, das in einem Zusammenhang mit der Verabreichung von Placebo steht. Deshalb kann man einen Placebo-Effekt ausschließen.

Die Endothelin-1 Konzentrationen nach Gabe von 5 mg SPP301bewegen sich im selben Bereich wie nach Placebo. Allerdings unterscheiden sich die Baseline-Konzentrationen (siehe ET-1 $_{t=0h}$ in **Tabelle 14**) der beiden Gruppen geringfügig. Die prozentuale Abweichung von Endothelin-1 von den jeweiligen Baseline-Konzentrationen berücksichtigt den Effekt von unterschiedlichen Baseline-Konzentrationen. Wie aus der **Abbildung 10** zu sehen ist, liegt der zeitliche Verlauf der Abweichung von Baseline nach 5 mg SPP301 systematisch höher als der nach Placebo, so dass man auf eine leichte Hemmung der Endothelin-1 Rezeptoren selbst schon nach 5 mg SPP301 schließen kann. Dies wird auch durch den Parameter ET-1 $AUC_{(0\text{-}24h)}$ bestätigt, der unter Placebo den Wert 23.3 ± 7.3 h·pg/mL annimmt und auf den Mittelwert von 26.2 ± 5.6 h·pg/mL nach 5 mg am Tag 10 ansteigt. Wie aus **Abbildung 10** zu entnehmen ist, betrug der Anstieg am Tag vor der letzten Verabreichung immerhin noch etwa 25% gegenüber Baseline.

Zu beachten ist, dass bei Proband Nr. 1.4 nach 5 mg SPP301 (Proben-Nr. 26; *nominale Zeit* 2h) eine Konzentration von 9.448 pg/mL angegeben wurde. Aufgrund der Beobachtungen während dieser speziellen Messung wurde der Messwert als “NICHT PLAUSIBEL” von den Analytikern eingeschätzt. Der Wert erscheint zwar in den individuellen Datenlisten, wurde aber nicht für die Auswertung der pharmakodynamischen Parameter verwendet.

Nach Verabreichung von ansteigenden Dosierungen 20 mg – 60 mg SPP301 über eine Dauer von zehn Tagen steigen die Endothelin-1 Konzentrationen, was besonders deutlich aus der Darstellung in **Abbildung 10** hervorgeht. Am Tag neun vor der letzten Verabreichung von 20mg, 40 mg und 60 mg SPP301 wurden Endothelin-1-Konzentrationen gemessen, die circa 50%, 100% und 150% über der jeweiligen Ausgangskonzentration lagen. Während die absoluten Konzentra-

tionen von Endothelin-1 darauf hinweisen, dass schon nach 20 mg eine Sättigung des pharmakodynamischen Effektes erreicht wurde, wird dies durch die Berechnungen von Abweichung von Baseline nicht bestätigt. Diese steigen im Bereich zwischen 20 mg und 60 mg noch deutlich an.

Um den Einfluss der Plasmakonzentrationen von SPP301 und Ro 68-5925 auf die Endothelin-1 Abweichung von Baseline zu bestimmen, wurden in **Abbildung 11** sogenannte Hysteresis-Plots für die beiden höchsten Dosierungen 40 mg und 60 mg nach einmaliger Verabreichung angefertigt. Dazu sind die Plasmakonzentrationen von SPP301 und des Metaboliten auf der Ordinate aufgetragen und die Abweichung der Endothelin-1 Konzentrationen auf der Abszisse. Jedem Punkt in der Abbildung ist ein gemeinsamer Zeitpunkt von 0 Stunden bis 48 Stunden nach Applikation zuzuordnen. Die Hysteresis-Kurve wird dabei gegen den Uhrzeigersinn durchlaufen (van Boxtel et al., 1992; Derendorf und Hochhaus, 1995; Gabrielsson und Weinert, 2002).

Beide Hysteresis-Kurven beschreiben einen Verlauf, der für pharmakodynamische Effekte typisch ist. Die Plasmakonzentrationen von SPP301 steigen relativ schnell, um nach etwa 4.5 Stunden das Maximum zu durchlaufen. In dieser Zeit bleiben die Endothelin-1 Konzentrationen noch mehr oder weniger auf ihrem Ausgangswert. Erst wenn die Konzentrationen der Muttersubstanz wieder abfallen, steigen die Endothelin-1 Konzentrationen bis etwa 12 Stunden. Zwischen 12 Stunden und 36 Stunden bleiben sie auf einem konstanten Niveau von 60% beziehungsweise 80% für die 40mg und die 60 mg Dosierung. In dieser Zeit ist die Plasma Konzentration von SPP301 bereits deutlich abgesunken. Die relative Fläche innerhalb der Hysteresis-Kurve ist ein Maß für die zeitliche Entkopplung des pharmakodynamischen Effektes von der treibenden Plasma Konzentration des unveränderten SPP301.

In der Zeit bis zum Maximum der Konzentrationen von SPP301 wird die Substanz absorbiert und im Organismus verteilt. Dabei bindet sie auch an die Endothelin-1 Rezeptoren und blockiert diese. Infolgedessen erscheint das vom Rezeptor vertriebene Endothelin-1, ebenso wie neu produziertes Endothelin-1 in deutlich höherem Maße im Blut. Erst wenn SPP301 die Rezeptoren wieder frei gibt, sinkt auch die Plasmakonzentration von Endothelin-1 auf den Ausgangswert. Aus der Zeitdauer des Plateaus von 12 bis 36 Stunden lässt sich schließen, dass die Bindung von SPP301 an die Endothelin-1 Rezeptoren sehr stabil sein muss.

Im Gegensatz zu SPP301 ist die Fläche zwischen der Hysteresis-Kurve von Ro 68-5925 und Endothelin-1 deutlich geringer. Wie aus **Tabelle 13** zu entnehmen ist, werden maximale Ro 68-5925 Konzentrationen erst nach 9 Stunden erreicht, nur geringfügig früher als die maximalen

Endothelin-1 Konzentrationen, die ihr Maximum bei 12 Stunden nach Applikation haben. Nach der 40 mg Applikation liegen auf- und absteigender Teil der Hysterese fast übereinander, nach 60 mg nimmt die Fläche in der Hysterese etwas zu, aber deutlich geringer als für SPP301.
Die Auswertung anhand des Hysteresis-Verhalten von unverändertem SPP301 und Metaboliten könnte die Vermutung nahe legen, dass Ro 68-5925 allein für den pharmakodynamischen Effekt verantwortlich ist. Dieser Schluss ist allerdings aufgrund dieser Analyse allein nicht gerechtfertigt, zumal aus pharmakologischen Experimenten bekannt ist, dass sowohl SPP301 als auch RO 68-5925 pharmakologisch wirksam sind.

3.8.2 Effekt von SPP301 auf Blutdruck und Herzfrequenz

Die **Abbildung 12** zeigt den zeitlichen Verlauf der Abweichung von den jeweiligen Baselinewerten für den systolischen und diastolischen Blutdruck, sowie für die Pulsfrequenz. Als Baseline wurde der Mittelwert der jeweiligen Parameter am Tag 1 gewählt. Es wurden nur die 8 Stunden Werte nach Applikation dargestellt. Placebo und 5 mg SPP301 zeigten keinen Effekt, der im Zusammenhang mit der Administration stehen könnte. Allerdings stieg die Pulsfrequenz bis zu 20% nach 5 mg SPP301 und lag somit systematisch über den Pulswerten, die nach Placebo gemessen wurden. SPP301 Dosierungen von 20 mg bis 60 mg bewirkten einen Abfall des systolischen und diastolischen Blutdruck in diesen normotensiven Probanden. Dieser blutdrucksenkende Effekt machte sich am deutlichsten beim diastolischen Blutdruck bemerkbar. Er wurde dosisabhängig bis zu 20% für die höchste Dosierung gesenkt. Die Auswirkung auf den systolischen Blutdruck war weniger stark ausgeprägt; er reduzierte sich bis zu 10% für die 20 mg und die 60 mg Dosierung, während die 40 mg Dosierung ähnliche systolische Blutdruckwerte wie nach Placebo bewirkte.
Die Pulsfrequenz stieg im Laufe der Mehrfachadministration von SPP301 bis zu 30% des Baselinewertes am Tag 10. Allerdings ist beim Anstieg der Pulsfrequenz keine Dosisabhängigkeit festzustellen.

3.9 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Schlussfolgerungen

Die interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter von SPP301 ist moderat und bewegt sich in einem Rahmen von 15% (5 mg) und 24% (40 und 60 mg) für C_{max} und von 9% (5mg) und 28% (40 mg) für die AUC unter einmaliger Einnahme, sowie in einem Rahmen von 10% (40 mg) und 30% (20 mg) für C_{max} und von 13% (5 mg) und 22% (60 mg) für die AUC unter mehrmaliger Einnahme. Die Untersuchungen von Ro 68-5925 zeigten ähnliche Er-

gebnisse. Die pharmakokinetischen Auswertungen belegen eine lineare Pharmakokinetik von SPP301 und Ro 68-5925 bis zu einer Dosis von 60 mg, dies sowohl nach einmaliger als auch nach mehrmaliger oraler Gabe unter Nüchternbedingungen. Der pharmakokinetische Steady State wurde schon nach der dritten bis vierten Einnahme der Studienmedikation erreicht.
Die Ausscheidung von SPP301 und seinem Metaboliten Ro 68-5925 über den Urin ist sehr gering; nach einmaliger und mehrmaliger oraler Einnahme betrug sie weniger als 1‰ für die Ausgangssubstanz und weniger als 5% für den Metaboliten.
Die **Abbildung 13** zeigt eine Übersicht der zeitlichen Profile der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter, wie sie in dieser Studie an gesunden, normotensiven Probanden nach der höchsten Dosierung von 60 mg SPP301 erfasst wurden. Deutlich erkennbar ist der langsame Anstieg der Endothelin-1-Konzentrationen über den gesamten Verlauf bis zur letzten Administration. Der Anstieg der Pulsfrequenz folgt eindeutig dem Verlauf der Plasmakonzentration von SPP301, maximale Plasmaspiegel koinzidieren mit maximalem Anstieg der Pulsfrequenz. Simultan werden systolischer und diastolischer Blutdruck gesenkt.
Es ist interessant festzustellen, dass sich der Verlauf der Plasmakonzentrationen von SPP301 im Verlauf der Vitalparameter deutlich wiederspiegelt, während im Verlauf die Endothelin-1-Konzentrationen zwar ansteigen, aber nicht so ausgeprägte Spitzen aufweisen wie Pulsfrequenz und diastolischer Blutdruck. Hier ist allerdings zu bemerken, dass der Anstieg der Endothelin-1-Konzentration im Plasma nur ein indirektes Maß für die eigentliche Bindung an den Rezeptor darstellt. Endothelin-1 im Plasma kann als ein großes und tiefes Kompartment interpretiert werden, das dazu in der Lage ist, kurzfristige Spitzen in der Freisetzung von Endothelin-1 von den Rezeptoren abzupuffern.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war die Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit des selektiven ET-A-Antagonisten SPP301 bei gesunden, jungen, männlichen Probanden unter mehrmaliger oraler Einnahme einer Dosierungsbreite zwischen 5 mg und 60 mg. Zusätzlich wurden die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik unter oben genannten Bedingungen untersucht, sowie die Auswirkung der mehrmaligen Einnahme von SPP301 auf die Serum-Gallensäuren.

4.1 Sicherheit und Verträglichkeit von SPP301

SPP301 zeigte eine gute Verträglichkeit, es kam weder zu Todesfällen, noch zu schweren Nebenwirkungen. Die Einnahme der Substanz SPP301 führte bei den beiden niedrigsten Dosierun-

gen sowohl nach einer Einzeldosis als auch nach mehrmaliger Verabreichung nur zu wenigen Nebenwirkungen. Unter 40 mg und 60 mg nahm das Auftreten von Nebenwirkungen zu. Die Häufigkeit der Nebenwirkungen nimmt offensichtlich mit steigender Dosis des Medikaments zu. In keiner der Gruppen stieg die Anzahl der Nebenwirkungen beim Vergleich der Einzelgabe mit den Mehrfachdosierungen weiter an. Mit Abstand am Häufigsten traten Kopfschmerzen auf, gefolgt vom Auftreten eines Gesichtsödems und schmerzhafter Augenrötung. In einigen Fällen kam es zu Übelkeit und Erbrechen. Zudem fiel in den höheren Dosierungsgruppen bei mehreren Probanden ein reversibler Anstieg der Transaminasen auf. Die drei erstgenannten Nebenwirkungen sind als typische Begleiterscheinungen bei der Verabreichung von vasodilatativ wirkenden Medikamenten, wie z.B. Hydralazin, Minoxidil oder AT1-Rezeptorblocker, bekannt (D´Arcy et al., 1985; de la Sierra et al., 2004; Elliott 1996; Mehta et al., 1975; Miura et al., 1988; Woo und Pun, 1990). Auch in den bisherigen Studien mit ET-1-Antagonisten sind diese Nebenwirkungen am häufigsten zu beobachten gewesen, sowohl bei normotensiven als auch bei hypertensiven Versuchspersonen (Freed et al. 1999, Krum et al. 1998a, Torre-Amione et al. 2001). Aufgrund dieser Erfahrungen kann man von einem Klasseneffekt ausgehen, der sich über den Wirkmechanismus von SPP301 erklären lässt. Möglicherweise ist die erhöhte Freisetzung von NO, durch nichtantagonisierte ET-1-Wirkung am ET-B-Rezeptor, hierfür verantwortlich (Webb und Strachan, 1998), denn auch unter exogener Zufuhr von Nitraten tritt ein transienter Kopfschmerz auf.

Die Auswertungen der Daten ließ erkennen, dass Kopfschmerzen bei den meisten Probanden zwischen 3h und 5h nach der Einnahme des Medikaments auftraten. Zu diesem Zeitpunkt, d.h. innerhalb von 4.8h bei einmaliger Einnahme und 4.3h bei mehrmaliger Einnahme, erreicht SPP301 seine maximale Plasmakonzentration. Es scheint demzufolge ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Kopfschmerzen und der maximalen Plasmakonzentration von SPP301 zu bestehen. Zu diesem Zeitpunkt ist die ET-1-Konzentration in der 60 mg Gruppe um circa 40% der Baseline-Konzentration angestiegen. In 42% der Fälle sieht man in den individuellen Blutdruckprofilen zum Zeitpunkt des Auftretens der Kopfschmerzen einen deutlichen Blutdruckabfall. Es ist anzunehmen, dass dieser Zusammenhang noch häufiger hätte gezeigt werden können, wenn synchron mit Auftreten der Kopfschmerzen eine zusätzliche Blutdruckmessung durchgeführt worden wäre. An Tag 2 und Tag 4, dem Tag der Einzeldosierung und dem ersten Tag der Mehrfachdosierung, kam es häufiger zu Kopfschmerzen als im Verlauf bis Tag 10.

Demnach scheinen die Kopfschmerzen einen transienten Charakter zu haben und werden unter Dauertherapie noch seltener vorkommen.
Das Gesichtsödem, welches drei der Probanden entwickelten, trat unabhängig von den maximalen SPP301 Plasmakonzentrationen zwischen 22h und 24h nach der Medikamenteneinnahme auf. Das Auftreten beschränkte sich auf Tag 6-8. Zu diesem Zeitpunkt ist der Steady State von SPP301 erreicht, d.h. auch nach 22-24h liegen noch wirksame Plasmaspiegel vor. Bei den ET-1-Konzentrationen unter Einfluss von 60 mg SPP301 (siehe **Abbildung 10**) kann man in diesem Zeitintervall eine Abweichung von ungefähr 80% über die Baseline-Konzentrationen feststellen. An Tag 9 und 10 trat kein Gesichtsödem mehr auf. Deshalb könnte man annehmen, dass es sich ebenfalls um einen transienten Effekt handelt. Um hierüber eine verlässliche Aussage machen zu können, sollte jedoch eine größere Gruppe über einen längeren Zeitraum untersuchen werden.
Es bleibt zu diskutieren, ob das Gesichtsödem hier im Sinne eines peripheren Ödems aufgrund von Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität zustande kam, oder ob es sich um ein Angioödem handelt. Letzteres tritt in seltenen Fällen auch unter der Therapie mit ACE-Hemmern oder AT_1-Rezeptorblockern auf (Acker und Greenberg, 1995). Es manifestiert sich als teigige, nicht juckende Schwellung der Unterhaut und ist eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung. Sie klingt nach Absetzen des Medikaments wieder ab. Es ist eine erbliche Variante der Erkrankung und ein Angioödem pseudoallergischer Genese bekannt. Gefährlich wird das Angioödem, wenn es durch Schwellung der Schleimhäute der Atemwege zur Dyspnoe kommt. In diesem Fall wird eine Notfalltherapie mit Antihistaminika und Glucokortikoiden notwendig. Tritt das Angioödem im Bereich der Darmschleimhaut auf, so kommt es zum Auftreten des klinischen Bildes eines “Akuten Abdomens“ (Elliott, 1996). In einer Studie, bei der 293 Patienten mit essentieller Hypertonie mit Bosentan behandelt wurden, traten gehäuft Beinödeme auf (Krum et al., 1998a). In diesem Fall ist zu bedenken, dass es durch die Blockade der ET-B-Rezeptoren an der Niere zur Natriumretention mit nachfolgender Wasserretention gekommen sein kann und die Überwässerung die Ödeme bedingt. Ein auf den Gesichtsbereich begrenztes Ödem lässt sich über diesen Mechanismus allerdings schwerlich erklären.
Dosisabhängig kam es unter mehrmaliger Einnahme von SPP301 zu einem asymptomatischen, reversiblen Anstieg der Lebertransaminasen. Dieser überstieg zwar nie das Dreifache der Obergrenze des Normbereichs, wurde aber doch in drei Fällen als klinisch relevant erachtet. In diesen drei Fällen waren SGPT und SGOT erhöht. Nach Absetzen von SPP301 normalisierten sich die Werte ohne weitere Maßnahmen. Diese Nebenwirkung ist in vorangegangenen Studien mit ET-

1-Antagonisten ebenfalls aufgetreten (Krum et al., 1998a; Channick et al. 2001). In diesen Studien mit Bosentan waren jedoch auch die alkalische Phosphatase und die Gallensäuren erhöht. Die Autoren gehen davon aus, dass man über einen abfallenden SGPT/AP-Index einen cholestatischen, gallensäureinduzierten Leberschaden feststellen kann. Es wird aufgrund von Ergebnissen im Tiermodel postuliert, dass Bosentan mit der biliären, kanalikulären Gallensäurenexportpumpe interferiert. Die Empfindlichkeit, diese unerwünschte Wirkung des Medikaments zu erfahren, ist intraindividuell unterschiedlich. Zusätzliche hepatotoxische Auswirkungen von Bosentan können noch nicht ausgeschlossen werden (Fattinger et al., 2001). Es wurden verschiedene Screeningmethoden entwickelt, um Endothelin-1-Antagonisten auf ihre Leberverträglichkeit hin zu testen. Hierbei wird einmal die Interaktion mit dem Taurocholattransporter (kanalikuläre Gallensalz-Exportpumpe) untersucht, aber auch die Wechselwirkung mit dem „multidrug-resistance related protein“ (mrp2), welches an der Elimination organischer Anionen und konjugierter Substanzen, wie z.B. des glucuronidierten Bilirubins beteiligt ist. SPP301 hat eine schwächere Affinität zur kanalikulären Gallensalz-Exportpumpe als Bosentan. Bosentan und SPP301 haben einen ähnlichen, schwach ausgeprägten hemmenden Effekt auf das „multidrug-resistance related protein“ (mrp2). Außerdem wurde in einem in vivo Modell das Potenzial verschiedener ET-1-Antagonisten zur Induktion einer Cholestase untersucht; hierbei führte SPP301 verglichen mit Bosentan zu einem geringeren Anstieg der Serum-Gallensäuren. Eine Provokationsuntersuchung mit Infusion exogener Gallensäuren und nachfolgender Messung der Serum-Gallensäuren im zeitlichen Verlauf, sowie der Lebertransaminasen vergleichend bei Infusion von Bosentan und SPP301 in die Mesenterialvene, ergab einen Anstieg der Serum-Gallensäuren um das Dreifache und einen begleitenden Anstieg der SGOT und SGPT unter Bosentan. SPP301 induzierte weder signifikante Veränderungen der Gallensäurenkonzentration noch der Transaminasen und kumulierte zudem weniger in der Leber (Speedel internes Dokument).

Unsere Ergebnisse zeigen dementsprechend normale Werte für die alkalische Phosphatase (AP) und für Bilirubin. Deshalb steigt der SGPT/AP-Index unter SPP301 im Vergleich zu Placebo an. Im Provokationstest, durch Einnahme einer fettreichen Mahlzeit, wurde deutlich, dass die SPP301-Einnahme keinen Einfluss auf die Konzentration der Gallensäuren im Serum hat, d.h. die Exkretion ungestört zu sein scheint. Der Mechanismus, der bei der Einnahme von SPP301 zum Anstieg der Transaminasen führt, lässt sich also nicht durch eine Cholestase erklären und bleibt weiterhin unklar.

In allen Dosierungsgruppen fielen grenzwertige Abfälle von Hämoglobin, Hämatokrit und Erythrozytenzahl auf. Da dies auch in der Placebogruppe der Fall war, ist es am ehesten auf studienbedingte Blutverluste durch die häufigen Blutabnahmen zurückzuführen. Während einer Studie mit Tezosentan kam es unter 50 mg/h i.v. zum Abfall der oben genannten Werte, nicht jedoch unter 20 mg/h i.v. (Torre-Amione et al., 2001), hier stellt sich die Frage, ob nicht ein Zusammenhang zur Studienmedikation hergestellt werden muss. Bei Douglas und Ohlstein (2001) wird erwähnt, dass es bekannt ist, das ET-1 den Hämatokrit ansteigen lässt. Im Fall von SPP301 traten die Veränderungen regelmäßig in allen Gruppen und unter Placebo auf, weshalb ihnen keine weitere klinische Relevanz bezüglich der Studienmedikation beigemessen wird.
Die körperliche Untersuchung, das EKG und alle weiteren Laborparameter blieben unter SPP301 in allen Dosierungen und unter Placebo ohne Veränderungen von klinischer Relevanz. Die Überwachung der Vitalparameter, d.h. Blutdruckmessung und Herzfrequenz im Liegen, sofort, eine und zwei Minuten nach dem Aufstehen, ergaben in der Regel Werte innerhalb der Referenzbereiche mit normalen tagesrhythmischen Schwankungen. Bei einigen Probanden kam es zu Abweichungen über die Normbereiche hinaus, wobei die veränderten Lebensbedingung hier sicherlich mit eine Rolle spielen. Es zeigten sich jedoch selbst bei den normotensiven Probanden in der prozentualen Auswertung der Abweichung von den Baselinewerten für Blutdruck und Puls die antihypertensiven Effekte des Medikaments. Unter 5 mg SPP301 war keine Auswirkung auf den Blutdruck zu bemerken, allerdings stieg die Pulsfrequenz um 20% an und lag systematisch über den Werten, die unter Placebo gemessen wurden. In den höheren Dosierungsgruppen machte sich der Blutdruck senkende Effekt besonders am diastolischen Wert bemerkbar, dieser Effekt ist dosisabhängig und betrug unter 60 mg 20%. Auch der systolische Blutdruck wurde, wenn auch weniger ausgeprägt, unter 20 mg und 60 mg um 10% reduziert. Unter 40 mg konnte keine Änderung des systolischen Blutdrucks gezeigt werden. Die Herzfrequenz stieg im Verlauf bis zu Tag 10 um 30% gegenüber den Baseline-Werten an. Dieser Anstieg verhält sich jedoch dosisunabhängig. Daran, dass unter 5 mg SPP301 lediglich die Herzfrequenz steigt, während beide Blutdruckwerte unverändert bleiben, lässt sich erkennen, dass es sich um einen kompensatorischen Anstieg handelt. Der Anstieg der Herzfrequenz ist dosisunabhängig, d.h. es treten keine anderen Mechanismen als der kompensatorische in Kraft. Dieser kompensatorische Frequenzanstieg wird bei einem Blutdruckabfall über den Baroreflex gesteuert und bewirkt eine Aktivierung des Sympathikus sobald der Blutdruck im Begriff ist, eine physiologische Grenze zu unterschreiten. Da diese Grenze nur bei normotensiven Probanden durch

die medikamentöse Blutdrucksenkung unterschritten wird, ist nicht davon auszugehen, dass es bei Hypertonikern durch SPP301 zu einer dauerhaften Sympathikusaktivierung kommt. In diesem Fall bedarf es keiner Kompensation. Dies muss in zukünftigen klinischen Studien an Patienten mit Hypertonie weiter beobachtet werden, denn eine langfristige neurohumorale Aktivierung hätte negative Konsequenzen. Die neurohumorale Aktivierung ist eine unerwünschte Wirkung bei anderen direkten Vasodilatatoren, wie z.B. Dihydralazin und Minoxidil. Sie beruht ebenfalls auf dem Baroreflex und der nachfolgende Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Über Beta-Adrenorezeptoren führt die neurohumorale Aktivierung zur Steigerung der Herzfrequenz und über Aldosteron zur Natrium-Wasser-Retention, was wiederum die Blutdruckeinstellung negativ beeinflusst (Elliott, 1996). Der Übergang von der Reflextachykardie zur neurohumoralen Aktivierung ist fließend und kann nur über die Bestimmung der Plasmaspiegel der Katecholamine und des Renins festgelegt werden. Die Einnahme von SPP301 führt zu Therapiebeginn nicht wie andere Antihypertensiva z.B. ACE-Hemmer, AT_1-Rezeptorblocker und Prazosin, zur „first-dose"-Hypotension, welche sich durch einen nicht - orthostatischen Blutdruckabfall ohne reflektorischen Anstieg der Herzfrequenz äußern würde (Elliott, 1996). Unsere Ergebnisse zeigen durch den Anstieg der Herzfrequenz, dass der Kompensationsmechanismus intakt bleibt. Es ist auch wichtig ausgeschlossen zu haben, dass SPP301 zu drastischen Blutdruckabfällen führt, denn man weiß, dass einige vasodilatatorischen Medikamente, unter anderem Hydralazin und Minoxidil, beim Hund eine segmentale Nekrose der Media der Koronarien auslösen. Man nimmt an, dass dies nicht auf direkte toxische Wirkung zurückzuführen ist, sondern sekundär aufgrund von erhöhter Wandspannung, bei erhöhtem Blutfluss, nach zu starkem Abfall des arteriellen Mitteldrucks entsteht. Man kennt ähnliche Auswirkungen des gemischten ET-Antagonisten SB 209670 nach i.v.-Verabreichung an Hunden. Im Allgemeinen hält man jedoch den Hund nicht für das ideale Model zur Testung der Kardiotoxizität von Medikamenten, deshalb gelten ET-1-Antagonisten bislang als nicht kardiotoxisch (Morgan et al., 2001).

4.2 Pharmakokinetik von SPP301 und seinem Metaboliten Ro 68-5925

Die pharmakokinetischen Auswertung belegt eine lineare Pharmakokinetik von unverändertem SPP301 und des Metaboliten Ro 68-5925, nach Einmalgabe wie auch unter Mehrfachverabreichung. Die Konzentrations-Zeit-Profile wurden vor allem im Hinblick auf $C_{max,}$ $t_{max,}$ AUC, $t_{1/2}$ und CL/f untersucht. Es wurde auf Dosisabhängigkeit und auf Auswirkungen der Mehrfacheinnahme über sieben Tage geachtet. Mit der steigenden Dosis werden dosis-proportional höhere

Plasmaspiegel von SPP301 erreicht. Es kommt unter Mehrfacheinnahme nicht zur Akkumulation und der Steady State stellt sich nach der dritten bis vierten Dosierung ein. Die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) und die „orale“ Clearence (CL/f) bleiben über den Gesamtzeitraum und bei allen Dosierungen konstant. Dies schließt bei vergleichbarer AUC_{inf} unter Einmalgabe und $AUC_{(\tau)}$ unter Mehrfachgabe eine Akkumulation oder einen beschleunigten Abbau durch Induktion oder einen gesättigten Resorptionsmechanismus aus. Diese These wird auch durch das gleichbleibende Verhältnis zwischen SPP301 und dem Metaboliten Ro 68-5925 gestützt. Auch ein beschleunigter Abbau von SPP301 zu dem zweiten Metaboliten, der nicht gemessen wurde, ist nicht anzunehmen, da $t_{1/2}$ und $AUC_{(\tau)}$ von SPP301 auch unter Mehrfachgabe konstant bleiben. Der Metabolit Ro 68-5925 zeigt ebenfalls eine lineare Pharmakokinetik, seine Maximalkonzentrationen werden ungefähr 4 Stunden nach den Maximalkonzentrationen von SPP301 erreicht. Der einzige Parameter, der eine leichte Veränderung aufweist ist t_{max}, die Dauer bis zum Erreichen der Maximalkonzentration. Mit steigender Dosis nimmt t_{max} leicht zu, d.h. der Absorptionsprozess ist unter höheren Dosen SPP301 tendenziell verlangsamt. Wahrscheinlich kommt es zur Sättigung des Carriersystems. Ähnliches wird von der Absorption der Substanz Bosentan angenommen. Man geht davon aus, dass bei der intestinalen Absorption von Bosentan Transporterproteine wie z.B. das P-Glycoprotein beteiligt sind, die unter höheren Dosierungen einer Sättigung unterliegen (Dingemanse et al., 2002). Der Nachweis der linearen Pharmakokinetik unter Mehrfachverabreichung von SPP301 bestätigt die Ergebnisse der Studie mit einer Einzeldosis SPP301, verabreicht an gesunde, männliche Probanden (Dieterle et al., 2004), und ergänzt das Wissen über diesen ET-1-Antagonisten um die Erfahrung mit der Substanz bei mehrmaliger oraler Anwendung. Der schwache Induktionsmechanismus der CYP450, der bei einer Studie an Hunden auftrat, bestätigte sich im Menschen nicht. SPP301 wurde beim Menschen nach mehrmaliger Einnahme nicht beschleunigt abgebaut; in *in vitro* Tests war eine Induktion ebenfalls ausgeschlossen worden (Speedel internes Dokument). In diesem Zusammenhang hat SPP301 einen deutlichen Vorteil gegenüber Bosentan, welches eine Induktion von CYP450 3A4 auslöst, und so z.B. zu einer gesteigerten Clearance von einigen oralen Antikoagulatien führt (Weber et al., 1999). Ob die von SPP301 durch *in vitro* Tests nachgewiesene, wahrscheinlich kompetitive Hemmung von CYP450-3A4 (Speedel internes Dokument) klinische Relevanz hat, muss bei zukünftiger Anwendung, besonders bei Co-Medikation mit Kalzium-Antagonisten und Cyclosporin A, kritisch beobachtet werden. Es könnte zu einer verzögerten

Clearence dieser Substanzen kommen, da sie über dasselbe Enzym abgebaut werden (Berthold H, 1999).

4.3 Beziehung zwischen der SPP301-Konzentration und den ET-1-Plasmaspiegeln

Die Ergebnisse der Messungen der ET-1-Plasmakonzentration nach Verabreichung der verschiedenen SPP301-Dosen zeigten keinen Anstieg nach Einnahme von 5 mg und einen maximalen Anstieg schon bei 20 mg, bei nur geringfügigem weiterem Anstieg unter 40 mg und 60 mg. Dies lässt darauf schließen, dass es ab einer Dosis von 20 mg SPP301 aufgrund der Verdrängung von rezeptorgebundenem ET-1 zum Anstieg der ET-1-Plasmakonzentration kommt. Die 5 mg SPP301 Dosis ist anscheinend zu gering, um einen signifikanten Anstieg der ET-1-Konzentration im Plasma zu bewirken. Es ist anzunehmen, dass Dosierungen ab 20 mg benötigt werden, um einen befriedigenden pharmakodynamischen Effekt zu erzielen. Unter den beiden höheren Dosierungen ist kein weiterer Anstieg zu beobachten, da der Antagonist SPP301 selektiv den ET-A-Rezeptor blockt und deshalb nicht zusätzlich die über ET-B-Rezeptoren vermittelte Clearence herabsetzt. Bei der Berechnung der prozentualen Abweichung der ET-1-Konzentrationen von den Baseline-ET-1-Konzentrationen konnte man feinere Tendenzen der Veränderung nachweisen: hier errechneten wir auch unter 5 mg SPP301 eine prozentuale Abweichung um 25% über die Baseline. Ebenso konnte der fehlende dosisabhängige Anstieg von ET-1 bei den Dosierungen zwischen 20 mg und 60 mg in der prozentualen Berechnung widerlegt werden. An Tag 9 vor der letzten Verabreichung von 20 mg, 40 mg und 60 mg SPP301 wurden Endothelin-1 Konzentrationen gemessen, die circa 50%, 100% und 150% über der Ausgangskonzentration der jeweiligen Gruppe lagen.

Aus früheren Studien weiß man, dass unter Blockade der ET-B-Rezeptoren mit dem selektiven Antagonisten BQ-788 die ET-1-Plasmakonzentrationen um das Zweifache ansteigen, während bei Anwendung des selektiven ET-A Rezeptorblockers weder die ET-1-Konzentrationen, noch die Big-ET-Konzentrationen im gleichen Maße steigen (Strachan et al., 1999). Unter Anwendung eines nicht-selektiven Antagonisten TAK-044 kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der ET-1-Konzentrationen, in diesem Fall um das dreifache, aufgrund von Verdrängung des ET-1 aus der Rezeptorbindung und Einschränkung der ET-1-Clearence. Eine gesteigerte Neusynthese wurde ausgeschlossen, da weder die Big-ET-1 Konzentration, noch das C-terminale Fragment erhöht nachweisbar waren (Plumpton et al. 1996). Die intravenöse Verabreichung von Bosentan zog einen Anstieg der ET-1-Konzentration um das Zweifache nach sich, während auch hier die Baseline-Konzentrationen von Big-ET-1 unverändert blieben (Kiowski et al., 1995). Allerdings

weisen Krum et al. (1998b) darauf hin, dass die Messung der ET-1 Konzentration zur Abschätzung der ET-B-Blockade sehr kritisch beurteilt werden muss, da es eben auch unter ET-A-Rezeptorblockade zu einem Anstieg kommt. Um genaue Aussagen diesbezüglich machen zu können, sei es notwendig, die Dosis-Wirkungskurven von nicht-selektiven und ET-A-selektiven Antagonisten genau zu vergleichen, und dies unter den Bedingungen von relevanten kardiovaskulären Erkrankungen (Krum et al. 1998b).

Das Ergebnis unserer Studie lässt zudem das Vorhandensein einer intrinsischen Aktivität des Antagonisten SPP301 unwahrscheinlich erscheinen, denn es ist bekannt, dass die Infusion von ET-1 einen Anstieg der ET-1-Plasmakonzentration, durch Stimulation der DeNovo-Synthese, um das 50-fache zur Folge hat (Douglas und Ohlstein, 2001). Dies hätte durch Messung der Big-ET-1 Konzentrationen und der terminalen C-Fragmente noch ausgeschlossen werden müssen.

Zur Beurteilung der Pharmakokinetik-Dynamik-Beziehung wurden Hysteresis-Plots erstellt, durch welche die zeitlichen Verhältnisse des Erscheinens von SPP301 im Plasma und die effektive Blockade der Rezeptoren, erkennbar an der fortbestehenden Erhöhung der ET-1-Konzentration, dargestellt werden. Es wird ersichtlich, dass die ET-1-Konzentrationen erst ansteigen, wenn die Maximalkonzentration der Muttersubstanz im Plasma schon überschritten ist. Zwischen 12 und 36 Stunden bleiben die ET-1-Spiegel stabil auf erhöhtem Niveau. In dieser Zeit ist SPP301 fest an den Rezeptor gebunden und nur noch in geringem Maße frei im Plasma nachweisbar. Die Dauer des Plateaus lässt auf eine sehr stabile Bindung schließen. Wenn SPP301 die Rezeptoren wieder frei gibt, sinkt auch die ET-1-Konzentration wieder ab. Die relative Fläche innerhalb der Hysterese-Kurve ist ein Maß für die zeitliche Entkopplung des pharmakodynamischen Effekts von der treibenden Plasmakonzentration von SPP301. Im Vergleich zur Hysterese-Fläche, die für den Metaboliten berechnet wurde, ist die von SPP301 relativ groß, was bedeutet, dass es eine zeitlich Verzögerung zwischen dem Erreichen der Maximalkonzentration und der Rezeptorbesetzung gibt. Der Metabolit erreicht sein Maximum fast zur gleichen Zeit, wie es auch zum Anstieg der ET-1-Konzentrationen kommt, d.h. ohne große zeitliche Verzögerung. Dies könnte daran liegen, das der Metabolit eine höhere Affinität zu den Endothelin-Rezeptoren hat als SPP301 selbst. Allerdings könnte die ET-1-Konzentration auch schon durch SPP301 angestiegen sein und der Zusammenfall mit dem ungefähren Zeitpunkt der Maximalkonzentration des Metaboliten nur zufällig sein. Eine andere Hypothese wäre, dass SPP301 erst zu Ro 68-5925 metabolisiert wird, um dann seine pharmakologische Wirkung, d.h. die Blockade der ET-A-Rezeptoren zu entfalten. Das ist jedoch unwahrscheinlich, da an verschiedenen Zell-

systemen die Rezeptorbindung der beiden Substanzen am ET-A-Rezeptor bewiesen wurde (Speedel internes Dokument).

Eine abschließende Übersicht der Ergebnisse, wie sie in dieser Studie an gesunden, normotensiven Probanden nach der höchsten Dosierung von 60 mg SPP301 erfasst wurden, gibt die Darstellung der zeitlichen Profile der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter (**Abbildung 13**). Deutlich erkennbar ist der langsame Anstieg der Endothelin-1-Konzentrationen über den gesamten Verlauf bis zur letzten Administration. Der Anstieg der Pulsfrequenz folgt eindeutig dem Verlauf der Plasmakonzentration von SPP301. Maximale Plasmaspiegel von SPP301 koinzidieren mit maximalem Anstieg der Pulsfrequenz. Simultan werden systolischer und diastolischer Blutdruck gesenkt. Es ist interessant festzustellen, dass sich der Verlauf der Plasmakonzentrationen von SPP301 im Verlauf der Vitalparameter deutlich wiederspiegelt, während im Verlauf die Endothelin-1 Konzentrationen zwar ansteigen, aber nicht so ausgeprägte Spitzen aufweisen wie Pulsfrequenz und diastolischer Blutdruck. Hier ist allerdings zu bemerken, dass der Anstieg der Endothelin-1 Konzentration im Plasma nur ein indirektes Maß für die eigentliche Bindung an den Rezeptor darstellt. Die Endothelin-1 Konzentration im Plasma kann als ein großes und tiefes Kompartment interpretiert werden, das dazu in der Lage ist, kurzfristige Spitzen in der Freisetzung von Endothelin-1 von den Rezeptoren abzupuffern. Zudem kann ein gesteigertes Re-uptake in die Endothelzellen stattfinden, wie unter physiologischen Bedingungen, wenn vermehrt Endothelin-1 anfällt. Vielleicht wird auch die durch Blockade der ET-A-Rezeptoren an den glatten Gefäßmuskelzellen zustandegekommene ET-1 Konzentrationserhöhung durch den negativen Feedback-Mechanismus (ET-1 Erhöhung führt über ET-B Rezeptoren zur verminderten Expression von ECE-1 und damit zu einer geringeren DeNovo-Synthese), den Naomi et al. (1998) beschrieben haben, geglättet. Das bedeutet, dass durch SPP301 die ET-A-Rezeptoren zwar blockiert sind, was sich an der Blutdruckabsenkung und dem Herzfrequenzanstieg zeigt, diese Blockade sich aber nicht im gleichen Maße aus den ET-1-Plasmakonzentrationen ablesen lässt, da auf diese noch andere Mechanismen oder Umstände Einfluss nehmen. Die messbaren ET-1 Plasmakonzentrationen spiegeln den pharmakodynamischen Effekt von SPP301 anscheinend nur indirekt wieder. Blutdruck und Puls reagieren sehr sensibel auf die Konzentrationsänderungen von SPP301 und machen so die Wirkung von SPP301 sichtbar.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war die Beurteilung der Verträglichkeit, der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik der Substanz SPP301, einem neuen, oral verabreichbaren, selektiven ET-A-Antagonisten, unter der Bedingung der mehrmaligen Einnahme von Dosierungen zwischen 5 mg und 60 mg.

Zweiunddreißig (32) gesunde, junge, männliche Probanden nahmen an der Studie Teil, acht (8) erhielten Placebo, vierundzwanzig (24) Verum. Das Medikament wurde an Tag 2 als Einmaldosis eingenommen, ab Tag 4 begann die Mehrfachadministration über sieben Tage. Es wurde ein Provokationstest durchgeführt, um die Wirkung von SPP301 auf die Gallensäureexkretion zu beurteilen.

Der primäre Endpunkt, die Sicherheitsanalyse mittels beschreibender Analyse der Nebenwirkung, Erhebung des körperlichen Untersuchungsstatus und Durchführung von klinischen Labortests und EKG-Untersuchung, bestätigte sich. SPP301 ist im getesteten Dosierungsbereich gut verträglich. Das Nebenwirkungsprofil passt zum Wirkungsprinzip der Substanz. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Kopfschmerzen, schmerzhafte Augenrötung und Gesichtsödem, bekannte Nebenwirkungen von vasodilatierenden Medikamenten. Der reversible Anstieg der Transaminasen unter höheren Dosen ist auch von anderen Endothelin-Antagonisten bekannt, wahrscheinlich handelt es sich um einen Klasseneffekt. Es konnte kein Einfluss auf die Gallensäureexkretion nachgewiesen werden. Zur Beurteilung der Pharmakokinetik wurden SPP301 und der Metabolit Ro 68-5925 im Plasma und im Urin gemessen. SPP301 und sein Metabolit zeigen auch unter mehrmaliger Einnahme eine lineare Pharmakokinetik, eine Akkumulation wurde ausgeschlossen. Die $AUC_{(\tau)}$ und die C_{max} steigen dosis-proportional an. Zur Beurteilung der Pharmakodynamik wurde ET-1 im Plasma bestimmt. Die ET-1-Konzentration steigt nach Verabreichung von SPP301 an und zeigt so die Verdrängung von rezeptorgebundenem ET-1 durch den Antagonisten an. Gleichzeitig ist die Wirkung an den Blutdruck- und Herzfrequenzprofilen abzulesen, deutlich sind hier mit Anstieg der SPP301-Plasmakonzetration korrelierende Blutdruckabsenkungen und kompensatorische Pulsanstiege zu erkennen.

Nachdem sich der ET-A-Antagonist SPP301 bei der Erprobung an Gesunden bewährt hat, ist es nun notwendig, die Wirkung und die Nebenwirkungen in größeren Patientenkollektiven mit den jeweiligen kardiovaskulären Erkrankungen klinisch zu testen.

6 Alphabetisches Literaturverzeichnis

Acker CG and Greenberg A. Angioedema induced by the angiotensin II blocker losartan.N Engl J Med 1995;333:1572

Berthold H, ed.. In: Klinikleitfaden Arzneimitteltherapie. Urban&Fischer Verlag, 1999

Blezer ELA, Nicolay K, Goldschmeding R, Jansen GH, Koomans HA, Pabelink RJ, Joles JA. Early-Onset But Not Late-Onset Endothelin-A-Receptorblockade Can modulate Hypertension, Cerebral Edema, and Proteinuria in Stroke-Prone Hypetensive Rats. Hypertension 1999;33:137-144.

Boulanger C and Lüscher TF. Release of Endothelin from the Porcine Aorta Inhibition by Endothelium-derived Nitric Oxide. J. Clin. Invest. 1990;85:587-590

Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon III RO, Panza JA. Role of Endothelin in the Increased vascular tone of Patients with essential Hypertension. Hypertension 1999;33:753-758.

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon III RO, Panza JA. Interactions Between Nitric Oxide and Endothelin in the Regulation of Vascular Tone of Human Resistance Vessels In Vivo. Hypertension 2000;35:1237-1241.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual Endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. Lancet 2001;358:1119-23

D´Arcy V, Laher M, McCoy D, Sullivan P, Walsh CH, Hickey MP. Pinacidil, a new vasodilatator, in treatment of mild to moderate essential hypertension. Eur J Clin Pharmacol. 1985;28(3):347-349

De la Sierra, Gil-Extremera B, Calvo C, Campo C, Garcia-Puig J, Marquez E, Olivan J, Roca cusachs A, Sanz de Castro S, Pontes C, Delgadillo J. Comparison of the antihypertensive effects of the fixed dose combination enalapril 10 mg/nitrendipine 20 mg vs lorsartan 50 mg/hydrochlorothiazide 12,5 mg, assesed by 24-h ambulatory blood pressure monitoring, in essential hypertensive patients. J Hum Hypertens 2004;18(3):215-222

Derendorf H and Hochhaus G. Handbook of Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Correlation. CRC Press; 1995

Dieterle W, Mann J, Kutz K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ETA-selective endothelin receptor antagonist SPP301 in healthy human subjects. J Clin Pharmacol 2004;44(1):59-66.

Dingemanse J, Bodin F, Weidekamm E, Kutz K, van Giersberg P. Influence of Food Intake and Formulation on the Pharmacokinetics and Metabolism of Bosentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist. J Clin Pharmacol 2002; 42:283-289

Douglas SA and Ohlstein EH. Vascular and Cardiac Effects of Endothelin. In: Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 423.

Elliott HL. In: Antihypertensive Drugs. Meyler's Side Effects of Drugs, 13thEdition, Elservier Science B.V. 1996

Elliott JD und Xiang JN. Endothelin Recptor Antagonists. In: Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001:239-264.

Endoh M, Fujita S, Yang H-T, Talukder MAH, Mauya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca2+ transients and contractility in rabbit myocardium. Life Sci 1998;62:1485-1489

Ergul A. Hypertension in black patients - An emerging role of the endothelin system in salt-sensitive hypertension. Hypertension 2000, 36:62-67

Ertl G and Bauersachs J. Endothelin Receptor Antagonists in Heart Failure. Current Status and Future Directions. Drugs 2004;64(10):1029-1040

Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier PJ. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: A potential mechanism for hepatic adverse reactions. Clin Pharmacol Ther 2001; 69:223-231

Fernandez-Durango R. The Endothelin System in Glaucoma: a New Therapeutic Target. Arch Soc Esp. Oftalmol 2003;78(8):401-402

Freed IM, Wilson DE, Thompson KA, Harris RZ, Ilson BE, Jorkasky DK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of SB 209670, an endothelin receptor antagonist: Effect on the regulation of renal vascular tone. Clin Pharmacol Ther 1999; 65:473-482

Gabrielsson J and Weiner D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis. Garnder's UK; 2002

Goldie RG and Henry PJ. Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 364-365.

Haynes GW and Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and desease. Journal of Hypertension 1998;16:1081-1098

Henry PJ and Goldie. Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New Y-ork: Springer-Verlag, 2001:73-76.

Ihara M, Fukuroda T, Saeki T, Nishikibe M, Kojiri K, Suda H, Yano M. An Endothelin Recptor (ET-A) Antagonist Isolated from *Streptomyces Misakiensis*. Biochem and Biophys Res Com 1991;178:132-137

Kiowsky W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. Lancet 1995; 346:732-736

Kopetz ES, Nelson JB, Carducci MA. Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. Invest New Drugs 2002;20(2):173-182

Krum H, Viscoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The Effect of an Endothelin-Receptor Antagonist on Blood Pressure in Patients with Essential Hypertension. N Engl J Med 1998a; 338:784-790

Krum H, Lacourciere Y, Charlon V. Correspondence. N Engl J Med 1998b; 339:347

Kurihara H, Kurihara Y, Yazaki Y. Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 142-143

LeRoy BE, Sellers RS, Rosol TJ. Canine Prostate Stimulates Osteoblast Function Using the Endothelin Recptors. The Prostate 2004;59:148-156

Love MP, Haynes WG, Gray GA, Webb DJ, McMurray JJV. Vasodilatator Effects of Endothelin-Converting Enzyme Inhibition and Endothelin ET-A Receptor Blockade in Chronic Heart Failure Patients Treated With ACE Inhibitors. Circulation 1996; 94:2131-2137.

Lüscher TF, Barton M. Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists, Therapeutic Considerations for a novel class of Cardiovascular Drugs, Current Perspective. Circulation 2000;102:2434.

Martin C, Held HD, Uhlig S. Differential effects of the mixed ETA/ETB-receptor antagonist bosentan on endothelin-induced bronchoconstriction, vasoconstriction and prostacyclin release. Naunyn - Schmiedebergs Archives of Pharmacology 2000, 362:128-136

Masaki Tomoh,(1998) Review: The discovery of endothelins. Cardiovascular Research 1998; 39:530-533

Massart P, Hodeige DG, Van Mechelen H, Charlier AA, Ketelslegers J, Heyndrickx GR, Donckier JE. Angiotensin II and endothelin-1 receptor antagonists have cumulative hypotensive effects in canine Page hypertension. Journal of Hypertension 1998; 16:835-841

Mehta PK, Mamdani B, Shansky RM, Mahurkar SD, Dunea G. Severe hypertension. Treatment with minoxidil. JAMA 1975;233(3):249-252

Miura Y, Yoshinaga K, Fukuch S, Kikawada R Kuramoto K, Satoh T. Antihypertensive efficacy and safety of urapidil, alone or in combination with beta-blocker, in patients with phaeochromocytoma. J Hypertens Suppl. 1988;6(2):S59-62

Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M, Stewart DJ. Beneficial effects of long-term selektiv endothelin type A receptor blockade in canin experimental heart failure. Cardiovascular Research 1998;39:571-579

Montagnani M, Vulpis V, Nazzaro P, Potenza MA, Rinaldi R, Nacci C, De Salvia MA, Brigiani GS, Pirreli A, Mitolo-Chieppa D. Endothelin-1-receptor-mediated responses in resistance vessels of young and adult spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension 2000; 18:893-900

Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Luscher TF. Blood Pressure and Vascular Effects of Endothelin Blockade in Chronic Nitric Oxid-Deficient Hypertension. Hypertension 1997;29(3):763-769

Moreau P. Endothelin in hypertension: A role for receptor antagonists? Cardiovascular Research 1998;39:534-542.

Morgan SJ, Cusick PK, Trela BA. Toxicology of Endothelin Antagonists. In:Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 239-264.

Müller D. Development and Validation of a LC/MS/MS assay for the determination of SPP301 [Ro 67-0565] and Ro 68-5925 in human plasma and urine samples. MDS PS Report No. V111210A. June 05, 2002

Münter K, Ehmke H, Kirchengast M. Maintenance of blood pressure in normotensive dogs by endothelin. Am J Heart Circ Physiol 1999; 276(3):H1022-H1027

Naeije R und Barbera JA. Pulmonary hypertension associated with COPD. Critical Care 2001,5:286-289

Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, Inoue J, Kanesaka Y, Tokunaga H, Tomita K. Endothelin-1 inhibits Endothelin-Converting Enzyme-1 Expression in Cultured Rat Pulmonary Endothelial Cells. Circulation 1998; 97(3):234-236

Nelson JB. Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. J Urol 2003;170(6):S65-68

Pecher S, Pflug BR, Brink AKW, Nelson JB. Endothelin A Receptor Blockade Does not Alter PSA Sekretion in Prostate Cancer Cell Lines. The Prostate 2004; 60:175-177

Plumpton C, Ferro CJ, Haynes WG, Webb DJ, Davenport AP. The increase in human plasma immunoreactive Endothelin but not big Endothelin-1 or its C-terminal fragment induced by systemic administration of the endothelin antagonist TAK-044. Br J Pharmacol 1996; 119:311-314

Pollock DM. Endothelin antagonists in the treatment of renal failure. Current Opinion in Investigational Drugs 2001; 2(4):513-520

Rockey DC and Weisinger RA. Endothelin Induced Contractility of Stellate Cells From Normal and Cirrhotic Rat Liver: Implications for Regulation of Portal Pressure and Resistance. Hepatology 1996;24:233-240

Schalcher C, Cotter G, Reisin L, Bertel O, Kobrin I, Guyene T, Kiowski W. The dual endothelin recptor antagonist acutely improves hemodynamic parameters in patients with advanced heart failure. Am Heart J 2001; 142:340-349

Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Potential Role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular deseases. Basic Res Cardiol 2000; 95:290-298

Schmitz-Spanke S, Schipke JD. Role of Endothelin-1 Receptors in Healthy Anaesthetized Rabbits. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology 2001; 28(8):647-650

Spiropoulos K, Trakada G, Nikolaou E, Prodromakis E, Efremidis G, Pouli A, Koniavitou A. Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. Respiratory Medicine 2003; 97:983-989

Spratt JCS, Goddard J, Patel N, Strachan FE, Rankin AJ, Webb DJ. Systemic ETA receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resitance in healthy men. British Journal of Pharmacology 2001; 134:648-654

Stewart DJ and Zhao YD. Endothelin-1 and Pulmonary Hypertension. In: Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 389-397

Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ. Systemic Blockade of the Endothelin-B Receptor Increases Peripheral Vascular Resistance in Healthy Men. Hypertension 1999;33:581-585

Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. Circulation. 1998; 98(21):2262-2268

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Notari M, Salvetti A. Vasoconstriction to Endogenous Endothelin-1 is increased in the peripheral Circulation of Patients with Essential Hypertension. Circulation 1999;100:1680-1683

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Magagna A, Salvetti A. Role of Endothelin in the control of peripheral vascular tone in human hypertension. Heart Fail Rev 2001; 6(4):277-285

Tiret L, Piorier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JJV, Dargie HJ, Arveiler D, Riudavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F. The Lys198Asn Polymorphism in the Endothelin-1 Gene Is Associated with Blood Pressure in Overweight People. Hypertension 1999; 33:1169-1174

Torre-Amione G, Durand J-B, Nagueh S, Vooletich MT, Kobrin I, Pratt C. A Pilot Safety Trial of Prolonged (48 h) Infusion of the Dual Endothelin-Receptor Antagonist Tezosentan in Patients With Advanced Heart Failure. Chest 2001; 120:460-466

Touzani O and McCulloch J. The Involvement of Endothelins in Cerebral Vasospasm and Stroke. In: Warner TD, ed. Endothelin and Its Inhibitors. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2001: 323-346.

van Boxtel CJ, Holford NHG, Danhof M. The in vivo Study of Drug Action:Principles and Applications of Kinetic-Dynamic Analysis. Elsevier;1992

Webb DJ and Strachan FE. Clinical Experience with Endothelin Antagonists. Am J Hypertens 1998;11:71S-79S

Weber C, Banken L, Birnboeck H, Schulz R. Effect of the Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin. Journal of Clinical Pharmacology 1999;39:847-854

Woo KS, Pun CO. Long-acting nifedipine versus metoprolol as monotherapy for essential hypertension. A randomized, controlled crossover study. West J Med 1990;152(2):149-152

Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. Development 1998; 125:825-836

Yanagisawa M, Kurihara H, KimuraS, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988; 332:411-415

Yokokawa K, Tahara H, Masakazu K Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, Hamada T, Otani S, Yanagisawa M, Takeda T. Hypertension Associated with Endothelin-Secreting Malignant Hemangioendothelioma. Annals of Internal Medicine 1991; 114:213-215

Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin Regulates Endothelin Production through Endothelium-derived Nitric Oxid in Human Endothelial Cells. Journal of Clinical Investigation 1993; 92(4):2080-2085

7 Tabellenanhang

Tabelle 1: Beschreibende Statistik der demographischen Variablen der Studienpopulation

Variable	**Statistik**	**Behandlungsgruppe***			
(Einheit)	**Parameter**	**5 mg SPP301**	**20 mg SPP301**	**40 mg SPP301**	**60 mg SPP301**
Anzahl	n	8	8	8	8
Alter	Mittelwert	28.0	39.0	35.0	33.0
(Jahre)	St.Abw.	5.0	5.0	7.0	6.0
	Minimum	21.0	29.0	25.0	26.0
	Maximum	34.0	45.0	43.0	42.0
Gewicht	Mittelwert	75.0	78.0	77.0	73.0
(kg)	St.Abw.	8.0	9.0	8.0	8.0
	Minimum	63.1	64.8	67.1	60.2
	Maximum	89.4	93.5	91.1	84.0
Größe	Mittelwert	182.0	178.0	181.0	179.0
(cm)	St.Abw.	5.0	7.0	6.0	6.0
	Minimum	174.0	161.0	172.0	173.0
	Maximum	192.0	184.0	194.0	191.0
BMI	Mittelwert	23.0	25.0	23.0	23.0
(kg/cm^2)	St.Abw.	2.0	3.0	2.0	3.0
	Minimum	19.0	20.1	21.1	19.4
	Maximum	24.3	28.9	26.3	27.4

*Jede Gruppe besteht aus sechs Probanden unter SPP301 und zwei Probanden unter Placebo

Tabelle 2: Beschreibende Statistik der demographischen Variablen der Studienpopulation unterteilt nach Placebo und Verum

Variable (Einheit)	**Statistik**	**Behandlungsgruppe**	
		Placebo	**SPP301**
Anzahl	n	8	24
Alter (Jahre)	Mittelwert	36.0	33.0
	St.Abw.	6.0	7.0
	Minimum	25.0	21.0
	Maximum	42.0	45.0
Gewicht (kg)	Mittelwert	76.0	76.0
	St.Abw.	12.0	7.0
	Minimum	63.1	60.2
	Maximum	93.5	89.4
Größe (cm)	Mittelwert	177.0	181.0
	St.Abw.	9.0	5.0
	Minimum	161.0	172.0
	Maximum	194.0	192.0
BMI (kg/cm^2)	Mittelwert	24.0	23.0
	St.Abw.	3.0	2.0
	Minimum	19.0	19.4
	Maximum	28.9	27.4

Tabelle 3: Individuelle Nebenwirkungen

Dosierung	Subjekt Nummer	Nebenwirkungen	Studien tag	Zeit nach letzter Dosis (h)	Dauer (h)	Intensität	Relation zur Studienmedikation
5 mg	0.02	Kopfschmerzen	Tag 10	0.92	5.00	Mild	Möglich
5 mg	0.04	Kopfschmerzen	Tag 10	15.25	1.00	Mild	Möglich
5 mg	0.05	Halsschmerzen	Tag 5	6.67	120.00	Mild	Sicherlich nicht
Placebo	0.06	Schwindelgefühl	Tag 2	17.58	8.00	Mild	Sicherlich nicht
Placebo	0.06	Kopfschmerzen (frontal)	Tag 5	23.17	6.42	Mild	Unwahrscheinlich
20 mg	1.02	Druck im ganzen Kopf	Tag 2	7.43	5.83	Mild	Möglich
20 mg	1.02	Fieber - 38.5°C	Tag 10	7.77	115.67	Mild	Unwahrscheinlich
20 mg	1.02	Erkältung	Tag 11	24.43	99.00	Mild	Unwahrscheinlich
20 mg	1.04	Kopfschmerzen vorne und hinten im Kopf	Tag 2	7.30	6.00	Mild	Möglich
20 mg	1.04	Kopfschmerzen	Tag 4	4.80	7.23	Mild	Möglich
20 mg	1.04	Kopfschmerzen	Tag 5	3.55	7.25	Mild	Möglich
20 mg	1.04	Kopfschmerzen	Tag 8	4.38	6.92	Mild	Möglich
20 mg	1.04	Kopfschmerzen	Tag 9	5.80	5.00	Mild	Möglich
20 mg	1.05	Kopfschmerzen in der rechten und linken Schläfe	Tag 1	5.23	9.00	Mild	Unwahrscheinlich
20 mg	1.05	Kopfschmerzen	Tag 2	5.23	11.00	Mittel	Möglich
Placebo	1.06	Kopfschmerzen	Tag 1	4.17	9.00	Mild	Unwahrscheinlich
Placebo	1.06	Kopfschmerzen	Tag 6	5.67	3.33	Mild	Möglich
Placebo	1.06	Kopfschmerzen	Tag 10	5.67	6.50	Mild	Möglich
20 mg	1.08	Kopfschmerzen	Tag 6	11.03	1.50	Mild	Möglich
40 mg	2.01	Kopfschmerzen	Tag 2	5.50	10.00	Mittel	Möglich
40 mg	2.01	Kopfschmerzen	Tag 4	4.88	9.00	Mild	Möglich
40 mg	2.01	Kopfschmerzen	Tag 5	6.00	9.00	Schwer	Möglich
40 mg	2.01	Unwohlsein	Tag 6	23.50	24.50	Mittel	Möglich
40 mg	2.01	Gesichtsödem	Tag 6	23.50	3.00	Mild	Möglich
40 mg	2.01	Konjunktivale Injektion	Tag 6	23.50	2.50	Mild	Möglich
40 mg	2.01	Kopfschmerzen	Tag 6	27.50	2.50	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 2	4.83	6.75	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 4	4.75	7.00	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 5	4.83	5.00	Mild	Möglich

Tabelle 3: Individuelle Nebenwirkungen

Dosierung	Subjekt Nummer	Nebenwirkungen	Studien tag	Zeit nach letzter Dosis (h)	Dauer (h)	Intensität	Relation zur Studienmedikation
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 7	3.33	10.50	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 8	4.83	6.00	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 9	4.83	6.00	Mild	Möglich
40 mg	2.03	Kopfschmerzen	Tag 10	4.83	6.00	Mild	Möglich
40 mg	2.04	Kopfschmerzen	Tag 2	3.75	8.00	Mild	Möglich
40 mg	2.04	Kopfschmerzen	Tag 4	4.67	7.00	Mild	Möglich
40 mg	2.04	Rhinitis	Tag 7	23.75	36.00	Mild	Unwahrscheinlich
40 mg	2.05	Kopfschmerzen	Tag 5	4.67	3.00	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 2	8.08	3.50	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 4	4.50	4.50	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Übelkeit	Tag 4	8.08	0.92	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Erbrechen	Tag 4	8.25	0.00	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 6	12.00	2.58	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 7	2.57	13.00	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 8	4.58	5.00	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 9	4.58	4.00	Mild	Möglich
40 mg	2.06	Kopfschmerzen	Tag 10	3.08	9.50	Mittel	Möglich
40 mg	2.06	Konjunktivale Injektion	Tag 10	5.08	7.50	Mittel	Möglich
40 mg	2.07	Kopfschmerzen	Tag 2	4.50	8.50	Mittel	Möglich
40 mg	2.07	Übelkeit	Tag 2	8.50	4.00	Mittel	Möglich
40 mg	2.07	Erbrechen	Tag 2	10.50	0.02	Mild	Möglich
40 mg	2.07	Kopfschmerzen	Tag 5	6.50	5.50	Mild	Möglich
40 mg	2.07	Kopfschmerzen	Tag 10	2.50	12.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 2	3.50	11.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 4	5.00	6.83	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 5	4.50	5.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 6	3.50	7.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 7	4.00	8.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 8	3.25	7.75	Mittel	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 9	6.00	4.00	Mild	Möglich
60 mg	3.01	Kopfschmerzen	Tag 10	4.50	7.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.02	Kopfschmerzen	Tag 2	7.92	7.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.02	Kopfschmerzen	Tag 4	4.42	4.50	Mittel	Möglich

Tabelle 3: Individuelle Nebenwirkungen

Dosierung	Subjekt Nummer	Nebenwirkungen	Studien tag	Zeit nach letzter Dosis (h)	Dauer (h)	Intensität	Relation zur Studienmedikation
60 mg	3.02	Kopfschmerzen	Tag 7	8.92	2.00	Mild	Möglich
60 mg	3.02	Kopfschmerzen	Tag 9	4.92	2.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.02	Kopfschmerzen	Tag 10	4.42	7.58	Mittel	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 2	5.33	9.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.03	Übelkeit	Tag 2	7.33	2.50	Mild	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 3	23.83	2.00	Mild	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 4	4.83	6.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 5	4.83	9.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 6	4.83	10.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.03	Kopfschmerzen	Tag 7	4.83	4.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 2	9.58	6.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 4	5.58	7.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 5	4.67	8.92	Mittel	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 6	4.58	5.00	Mild	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 7	1.08	11.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.06	Kopfschmerzen	Tag 9	11.58	2.00	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Kopfschmerzen	Tag 2	4.50	26.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.07	Übelkeit	Tag 2	10.25	0.42	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Erbrechen	Tag 2	10.50	0.02	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Kopfschmerzen	Tag 4	1.50	56.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.07	Gesichtsödem	Tag 6	22.50	5.00	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Gesichtsödem	Tag 7	22.47	6.00	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Kopfschmerzen	Tag 7	1.50	11.00	Mittel	Möglich
60 mg	3.07	Gesichtsödem	Tag 8	22.00	80.50	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Kopfschmerzen	Tag 8	1.50	10.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.07	Tinnitus rechtes Ohr	Tag 9	12.50	1.75	Mild	Möglich
60 mg	3.07	Kopfschmerzen	Tag 10	2.00	11.50	Mittel	Möglich
60 mg	3.08	Kopfschmerzen	Tag 2	10.38	3.00	Mild	Möglich
60 mg	3.08	Rhinitis	Tag 6	22.92	196.50	Mild	Unwahrscheinlich
60 mg	3.08	Gesichtsödem	Tag 8	22.92	4.00	Mild	Möglich

Tabelle 4: Auftreten von Kopfschmerzen (KS) unter SPP301 (5-60 mg) im zeitlichen Verlauf

Tag	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
schwache KS	1	6	1	5	4	4	3	3	5	3
mittel-starke KS	0	8	0	5	3	2	4	2	1	5
starke KS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Gesamt	1	13	1	10	8	6	7	5	6	8

Tabelle 5: Anzahl der Probanden mit Nebenwirkungen generell und nach Organsystemen aufgeteilt, aufgetreten nach einmaliger Verabreichung von Placebo oder unterschiedlichen Dosen SPP301

	Placebo	**SPP301**			
Dosis		**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Untersuchte Probanden					
Gesamtzahl	8	6	6	6	6
Probanden mit NW	0	0	3	5	6
Betroffenes Organsystem					
Nervensystem			3	5	5
Gastrointestinaltrakt				2	2

Tabelle 6: Anzahl der Probanden mit Nebenwirkungen generell und nach Organsystemen aufgeteilt, aufgetreten nach mehrmaliger Verabreichung von Placebo oder unterschiedlichen Dosen SPP301

	Placebo	**SPP301**			
Dosis		**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Untersuchte Probanden					
Gesamtzahl	8	6	6	6	6
Probanden mit NW	2	3	3	6	6
Betroffenes Organsystem					
Nervensystem	2	2	2	6	5
Allgemeinbefinden und Punktionsstelle			1	1	
Gastrointestinaltrakt		1		1	
Respiratorische, thorakale und mediastinale Störungen			1	1	1
Störungen der Augen				2	
Störungen der Haut und des Subkutangewebes				1	4
Gehör und Gleichgewichtsorgan					1

Tabelle 7: Anzahl der Probanden mit Nebenwirkungen nach deren Häufigkeit, nach einmaliger Einnahme von Placebo oder verschiedenen Dosen SPP301

		SPP301			
Dosis	**Placebo**	**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Untersuchte Probanden					
Gesamtzahl	8	6	6	6	6
Probanden mit NW	0	0	3	5	6
Nebenwirkung					
Kopfschmerzen			3	5	5
Übelkeit				1	2
Erbrechen				1	1
Gesamtzahl der Nebenwirkungen					
	0	0	3	7	10

Tabelle 8: Anzahl der Probanden mit Nebenwirkungen nach deren Häufigkeit, nach mehrmaliger Einnahme von Placebo oder verschiedenen Dosen SPP301

		SPP301			
Dosis	**Placebo**	**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Untersuchte Probanden					
Gesamtzahl	8	6	6	6	6
Probanden mit NW	2	3	5	6	6
Nebenwirkung					
Kopfschmerzen	2	2		19	24
Übelkeit				1	
Erbrechen				1	
Gesichtsödem				1	4
Pyrexie			1		
Halsschmerzen		1			
Nasopharyngitis			1		
Tinnitus					1
Unwohlsein				1	
Schmerzhafte rote Augen				2	
Rhinitis				1	1
Gesamtzahl der Nebenwirkungen					
	2	3	7	26	30

Tabelle 9: Klinisch relevante abnorme Laborwerte

Behandlung	Proband	Zeit-punkt	Parameter	Einheit	Wert	Referenz-bereich	Ausserhalb der Norm	klinisch relevant
60 mg	3.02	Tag 13	SGPT	U/L	46	<22	++	ja
60 mg	3.03	Tag 13	SGPT	U/L	52	<22	++	ja
60 mg	3.06	Tag 12	SGPT	U/L	62	<22	++	ja
60 mg	3.06	Tag 13	SGPT	U/L	60	<22	++	ja

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung der wichtigsten Parameter der Gallensäuren (GS) im Serum nach einmaliger und mehrmaliger oraler Einnahme von unterschiedlichen Dosen SPP301 oder Placebo bei gesunden, jungen, männlichen Probanden

		SPP301			
Parameter	**Placebo**	**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Day 1					
$GS_{t=0}$ (pg/mL)	2.34 ± 2.15	2.13 ± 0.72	2.03 ± 1.22	2.68 ± 2.33	3.18 ± 2.96
$GS\text{-}AUC_{(0\text{-}2.5h)}$* (h·pg/mL)	12.5 ± 4.0	17.7 ± 1.9	14.0 ± 9.3	13.6 ± 6.1	18.7 ± 11.6
Day 9					
$GS_{t=0}$ (pg/mL)	2.49 ± 0.94	3.20 ± 2.25	2.12 ± 1.11	3.28 ± 1.49	5.77 ± 3.65
$GS\text{-}AUC_{(0\text{-}2.5h)}$* (h·pg/mL)	14.6 ± 5.1	23.8 ± 2.7	13.5 ± 3.0	14.1 ± 10.6	21.3 ± 7.0

*die Parameter sind über einen Zeitraum von 0-24h nach Medikamenteneinnahme berechnet

Tabelle 11: Meßspezifikation der analytischen Methoden

Substanz / Medium	**Exaktheit (% Differenz von QK*)**	**Präzision (CV %)**	**Untere Nachweis-grenze (LLQ)**
SPP301 im Plasma	99.8 – 102.0	1.1 – 7.7	0.5 ng/mL
Ro 68-5925 im Plasma	98.9 – 102.2	1.8 – 6.2	2.0 ng/mL
SPP301 im Urin	88.0 – 106.3	0.7 – 2.2	0.5 ng/mL
Ro 68-5925 im Urin	97.5 – 102.9	1.0 – 2.6	2.0 ng/mL

* QK: Qualitätskontrollproben

Tabelle 12: Mittelwerte ± Standardabweichung und Bereich der pharmakokinetischen Parameter von SPP301 nach Einzelgabe von SPP301 und im Steady State in gesunden, jungen, männlichen Probanden

		SPP301			
	Parameter	**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Einmal – Administration	**N**	6	6	6	6
	C_{max}	138.1 ± 20.4	622.1 ± 145.8	900.4 ± 215.9	1730.8 ± 413.5
	(ng/mL)	118.0 – 169.9	497.4 – 881.6	630.5 – 1239.0	1112.0 – 2212.0
	t_{max}	3.8 ± 1.1	4.1 ± 1.0	4.5 ± 0.0	4.8 ± 0.6
	(h)	2.0 – 4.5	2.0 – 4.5	4.5 – 4.6	4.5 – 6.0
	$AUC_{0-\infty}$	1483.8 ± 130.7	6089.4 ± 1036.8	12521.7 ± 3536.1	22386.9 ± 5159.3
	(h·ng/mL)	1387.8 – 1705.0	4939.1 – 7678.4	8032.4 – 17527.2	16191.4 – 29049.8
	$t_{½}$	8.2 ± 1.2	6.5 ± 0.5	8.4 ± 1.5	10.4 ± 2.2
	(h)	6.2 – 9.3	6.0 – 7.1	6.5 – 9.9	7.9 – 14.4
	CL/f	3.4 ± 0.3	3.4 ± 0.6	3.4 ± 1.0	2.8 ± 0.7
	(L/h)	2.9 – 3.6	2.6 – 4.0	2.3 – 5.0	2.1 – 3.7
	Ae_{0-48h}	0.006 ± 0.009	0.007 ± 0.004	0.011 ± 0.007	0.011 ± 0.007
	(% der Dosis)	0.000 – 0.019	0.000 – 0.010	0.004 – 0.025	0.000 – 0.020
Mehrfach - Administration	**N**	6	6	5*	6
	C_{max}	136.0 ± 17.7	606.6 ± 183.2	992.4 ± 97.6	1160.1 ± 337.5
	(ng/mL)	117.1 – 164.9	464.5 – 968.9	903.7 – 1133.0	681.4 –1594.0
	t_{max}	3.6 ± 1.1	4.3 ± 1.8	3.1 ± 1.4	4.0 ± 1.6
	(h)	2.0 – 4.5	1.5 – 6.0	1.6 – 4.5	1.5 – 6.0
	AUC_{τ}	1398.3 ± 181.9	5270.7 ± 1103.1	10501.5 ± 1619.4	14147.7 ± 3066.6
	(h·ng/mL)	1178.4 – 1686.9	3790.6 – 6986.1	8323.0 – 12434.7	11378.1 – 19835.1
	$t_{½}$	7.7 ± 0.9	7.6 ± 1.2	7.6 ± 1.3	9.7 ± 2.5
	(h)	6.2 – 8.6	5.3 – 8.8	5.5 – 8.9	7.5 – 13.8
	CL/f	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.6	4.4 ± 0.8
	(L/h)	3.0 – 4.2	2.9 – 5.3	3.2 – 4.8	3.0 – 5.3
	Ae_{τ}	0.000 ± 0.000	0.003 ± 0.003	0.008 ± 0.008	0.011 ± 0.003
	(% der Dosis)	0.000 – 0.000	0.000 – 0.006	0.000 – 0.020	0.006 – 0.013

* ohne Proband Nr. 2.01

Tabelle 13: Mittelwerte ± Standardabweichung und Bereich der pharmakokinetischen Parameter von Ro 68-5925 nach Einzelgabe von SPP301 und im Steady State in gesunden, jungen männlichen Probanden

		SPP301			
	Parameter	**5 mg****	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Einmal Administration	**N**	6	6	6	6
	C_{max} (ng/mL)	5.4 ± 1.1 4.3 – 7.3	23.3 ± 3.0 20.6 – 28.9	36.8 ± 4.4 32.4 – 44.7	69.1 ± 14.9 50.9 – 87.7
	t_{max} (h)	7.3 ± 2.8 4.5 – 12.0	7.5 ± 2.5 6.0 – 12.0	9.3 ± 2.8 4.5 – 12.0	9.0 ± 2.7 6.0 – 12.0
	$AUC_{0-\infty}$ (h•ng/mL)	101.3 ± 15.9 82.9 – 124.2	386.8 ± 58.0 326.9 – 487.7	795.5 ± 170.1 631.1 – 1039.0	1360.6 ± 309.6 943.1 – 1631.7
	$t_{½}$ (h)	(8.2) **	8.2 ± 2.7 6.2 – 13.5	9.0 ± 2.1 5.9 – 11.9	9.7 ± 1.4 7.4 – 11.5
	Ae_{0-48} (% der Dosis)	3.460 ± 0.626 2.816 – 4.337	3.205 ± 0.569 2.570 – 3.753	3.086 ± 0.950 2.129 – 4.440	3.957 ± 1.368 2.635 – 6.277
Mehrfach Administration	**N**	6	6	5*	6
	C_{max} (ng/mL)	6.3 ± 1.1 4.5 – 7.4	26.1 ± 3.4 21.9 – 29.9	42.5 ± 0.9 41.6 – 43.8	56.6 ± 11.4 38.9 – 70.6
	t_{max} (h)	6.5 ± 1.2 6.0 – 9.0	7.0 ± 2.4 6.0 – 12.0	7.2 ± 1.6 6.0 – 9.0	9.4 ± 4.1 4.6 – 16.0
	AUC_{τ} (h•ng/mL)	83.5 ± 26.3 50.7 – 111.9	346.6 ± 71.4 263.0 – 434.9	674.5 ± 67.1 601.3 – 741.1	924.9 ± 169.6 661.1 – 1131.9
	$t_{½}$ (h)	(7.8) **	7.8 ± 1.3 6.5 – 9.8	7.2 ± 0.6 6.1 – 7.6	9.7 ± 2.7 6.6 – 13.7
	Ae_{τ} (% der Dosis)	3.205 ± 0.677 2.451 – 4.367	2.497 ± 1.405 0.195 – 3.761	1.392 ± 0.352 1.076 – 1.792	2.403 ± 1.000 1.184 – 4.064

* Ohne Proband Nr. 2.01;

** wegen zu niedriger Plasmakonzentrationen in der terminalen Phase konnte die Halbwertszeit nicht berechnet werden; für Berechnungen wurde die Halbwertszeit der 20 mg Dosis verwendet

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung der wichtigsten pharmakodynamischen Parameter von ET-1 im Plasma nach einmaliger und mehrmaliger Verabreichung unterschiedlicher Dosen SPP301 oder Placebo an gesunde, junge, männliche Probanden

		SPP301			
Parameter	**Placebo**	**5 mg**	**20 mg**	**40 mg**	**60 mg**
Tag 2 bis Tag 10					
$ET\text{-}1_{t=0h}$ (pg/mL)	1.1 ± 0.6	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.5	1.0 ± 0.3
$ET\text{-}1_{min}$ (pg/mL)	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.2
$ET\text{-}1_{max}$ (pg/mL)	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.3	2.6 ± 0.8	2.8 ± 0.8	3.1 ± 0.5
Tag 2					
$ET\text{-}1_{AUC(0\text{-}24h)}$ (h·pg/mL)	24.7 ± 10.7	25.7 ± 6.0	35.3 ± 8.9	37.1 ± 6.6	37.5 ± 9.0
Tag 10					
$ET\text{-}1_{AUC(0\text{-}24h)}$ (h·pg/mL)	23.3 ± 7.3	26.2 ± 5.6	37.1 ± 9.3	34.0 ± 24.4	43.7 ± 8.4

8 Abbildungsanhang

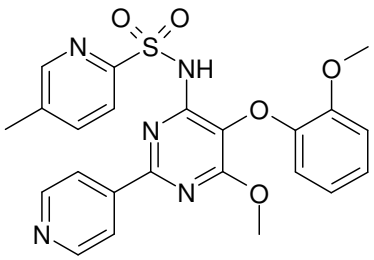

Abbildung 1: Chemische Struktur von SPP301 (Ro 67-0565)

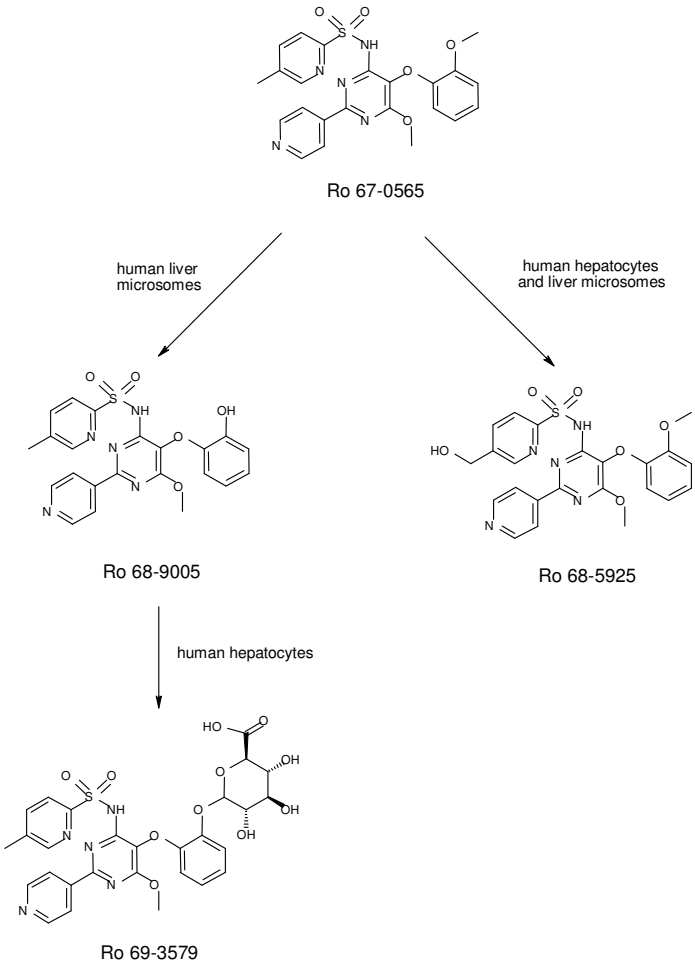

Abbildung 2: Stoffwechsel von SPP301 (Ro 67-0565)

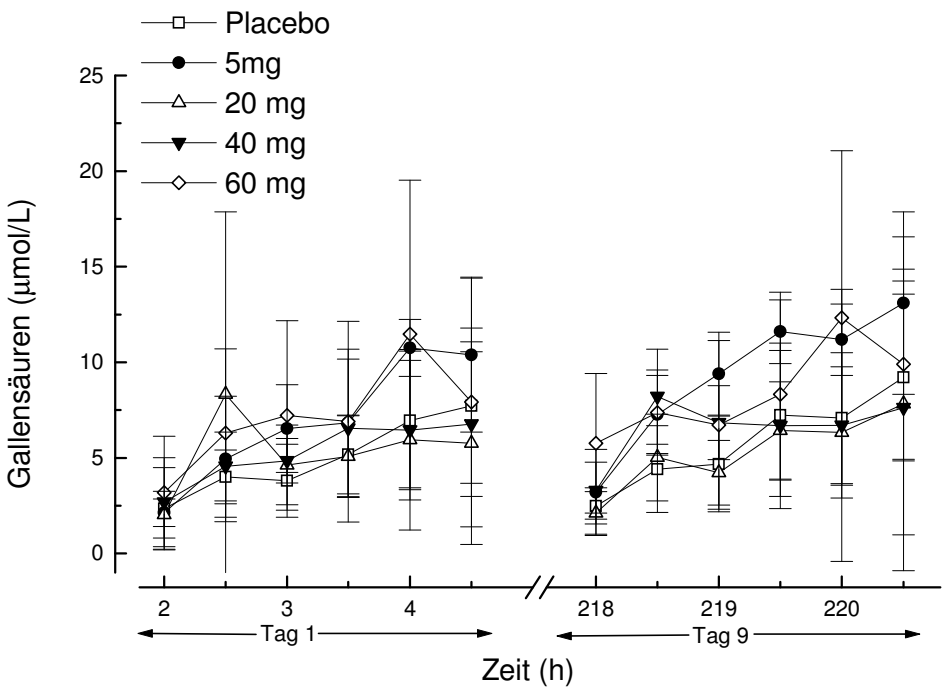

Abbildung 3: Konzentrations-Zeit-Kurven der Serum-Gallensäuren nach einmaliger und mehrmaliger oraler Einnahme von unterschiedlichen Dosen SPP301 oder Placebo bei gesunden, jungen, männlichen Probanden, nach Einnahme einer fettreichen Mahlzeit.

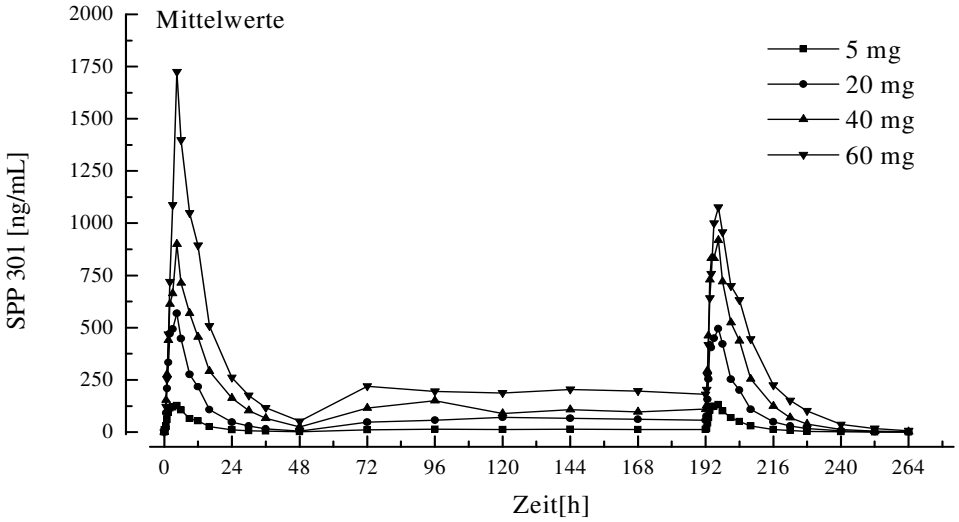

Abbildung 4: Mittlere Plasma Konzentrationen (ng/mL) von SPP301 nach ein- und mehrmaliger Gabe von SPP301 in ansteigender Dosierung

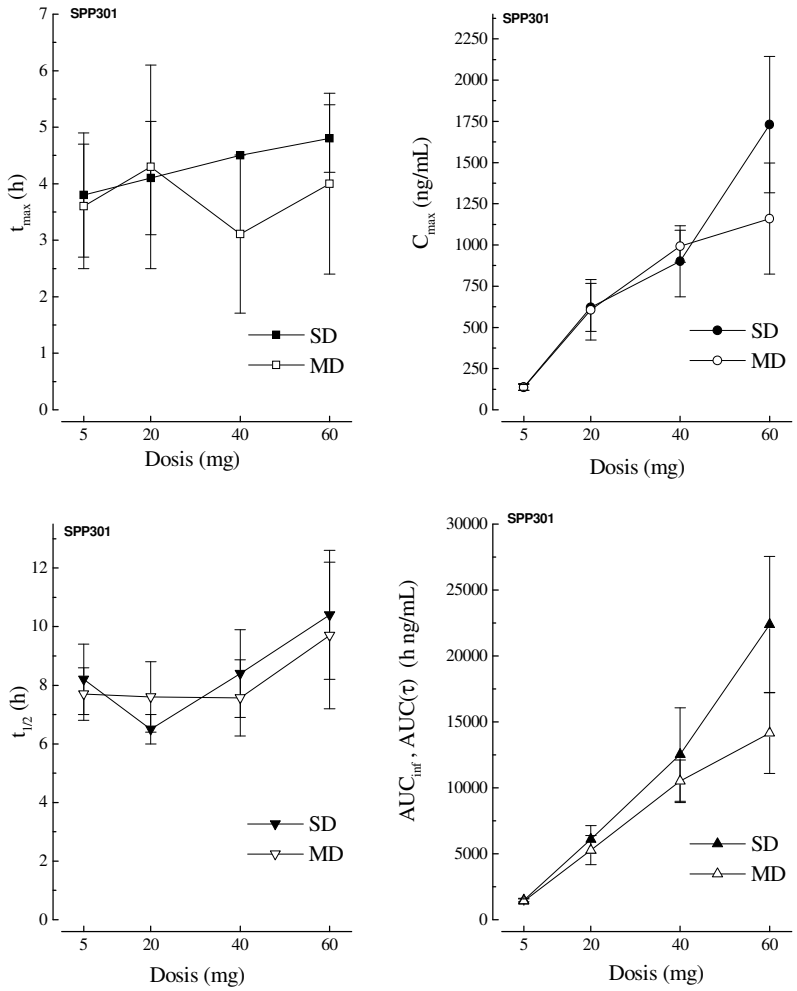

Abbildung 5: Mittelwert ± Standardabweichung der wichtigsten pharmakokinetischen Parameter von SPP301 nach einmaliger und mehrfacher oraler Administration von ansteigenden Dosen von SPP301 (SD = Einmaldosierung, MD = Mehrfachdosierung)

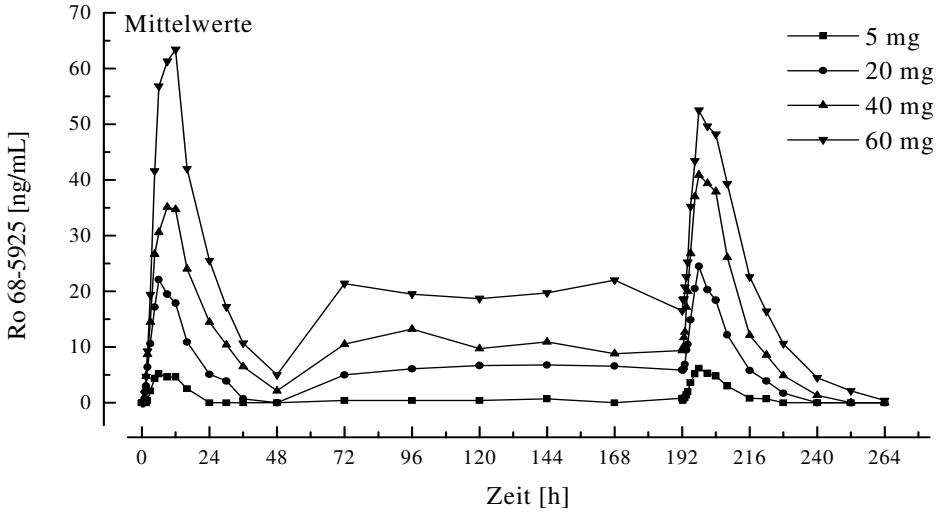

Abbildung 6: Mittlere Plasmakonzentrationen (ng/mL) von Ro 68-5925 nach ein- und mehrmaliger Administration von SPP301 in ansteigender Dosierung

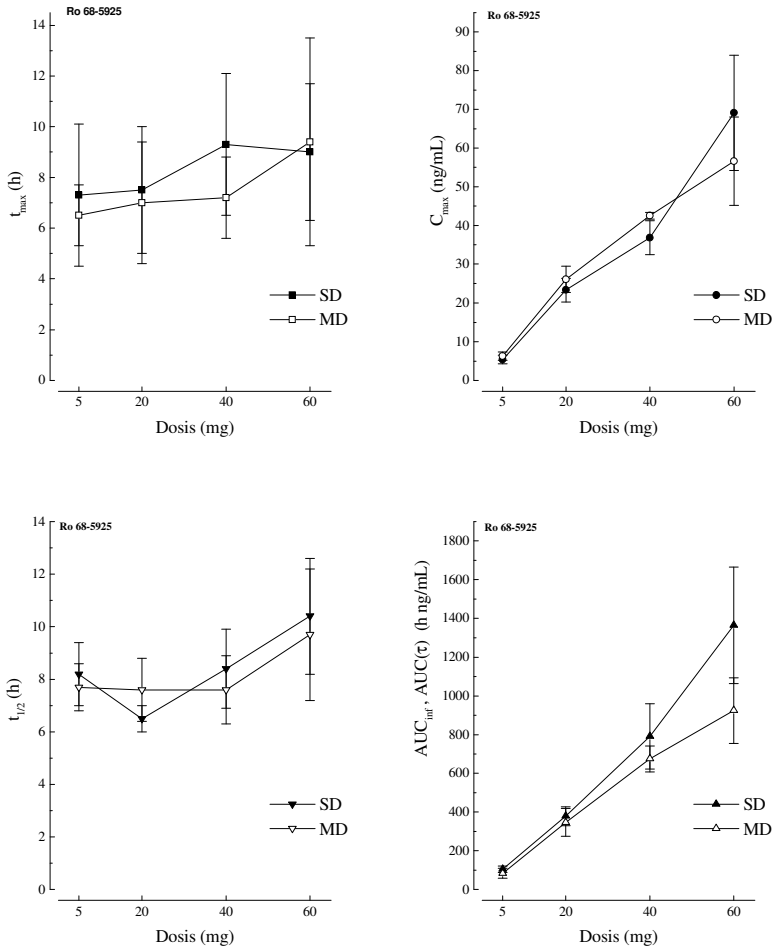

Abbildung 7: Mittelwert ± Standardabweichung der wichtigsten pharmakokinetischen Parameter von Ro 68-5925 nach einmaliger und mehrfacher oraler Administration von ansteigenden Dosen von SPP301 (SD = Einmaldosierung, MD = Mehrfachdosierung)

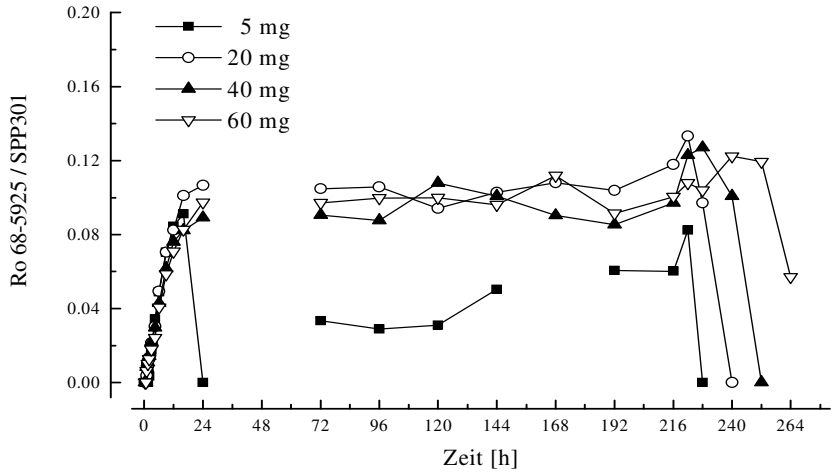

Abbildung 8: Verhältnis der Plasma Konzentrationen von Metabolit Ro 68-5925 zum unverändertem SPP301 nach oraler Verabreichung von ansteigenden Dosen von SPP301. Die Auswaschphase nach einmaliger Dosierung (24h – 48h) ist nicht dargestellt.

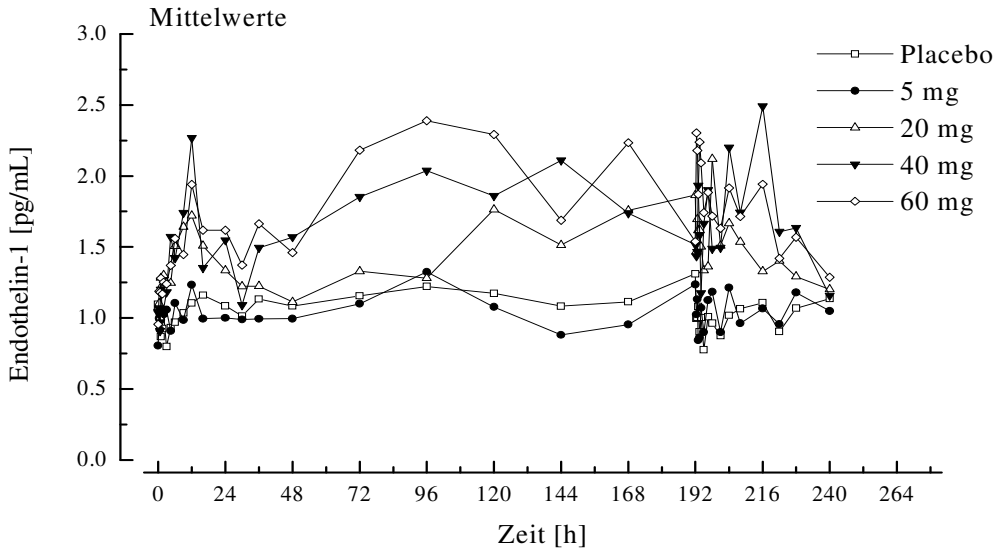

Abbildung 9: Mittlere Endothelin-1 Konzentrationen [pg/mL] nach einmaliger und mehrfacher Administration von Placebo und ansteigenden Dosen von SPP301

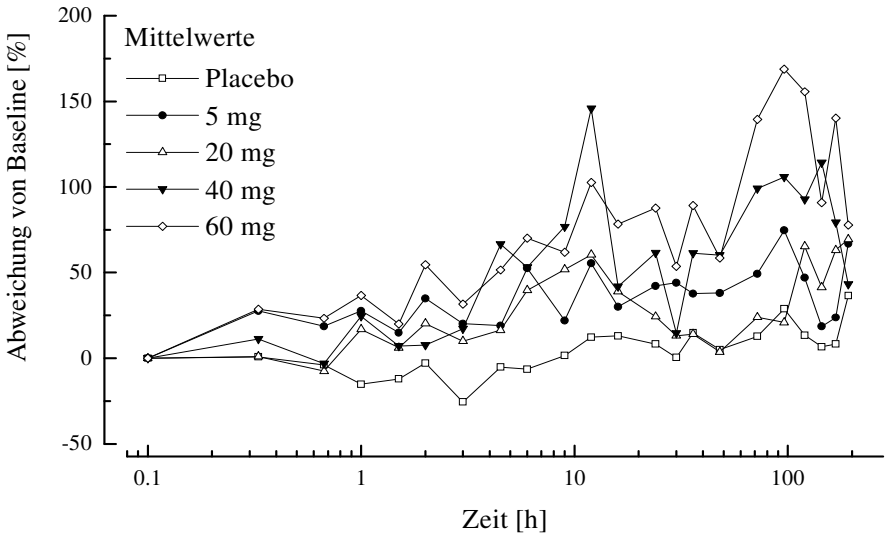

Abbildung 10: Pharmakodynamischer Effekt, berechnet als prozentuale Abweichung der Endothelin-1 Konzentrationen von den Baseline Werten, nach Placebo und aufsteigenden Dosen von SPP301. Die Daten nach der letzten Administration sind nicht dargestellt. Beachte die logarithmische Darstellung der Zeit-Achse.

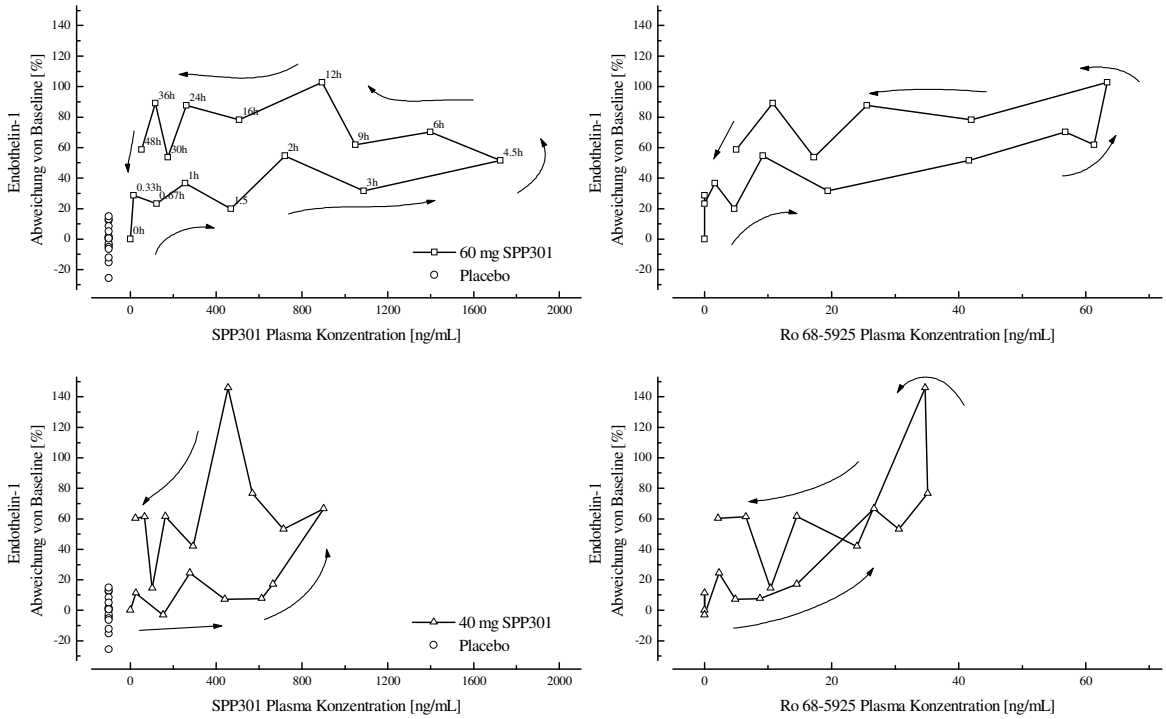

Abbildung 11: Hysteresis-Plots der Endothelin-1 Abweichung von Baseline versus die Plasma Konzentrationen von SPP301 und Ro 68-5925 nach einmaliger Administration von 40 mg und 60 mg SPP301.

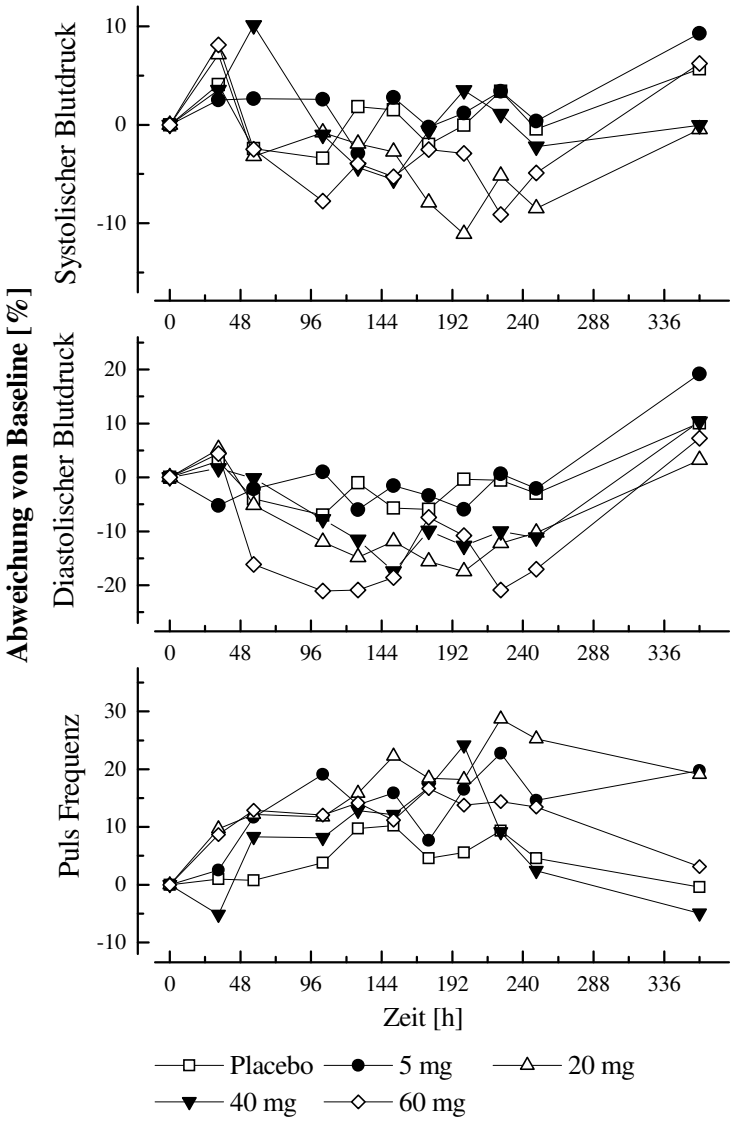

Abbildung 12: Mittelwerte von systolischem und diastolischem Blutdruck sowie Pulsfrequenz 8 Stunden nach Applikation, dargestellt als Abweichung von den Baseline-Werten (Mittelwert von Tag 1).

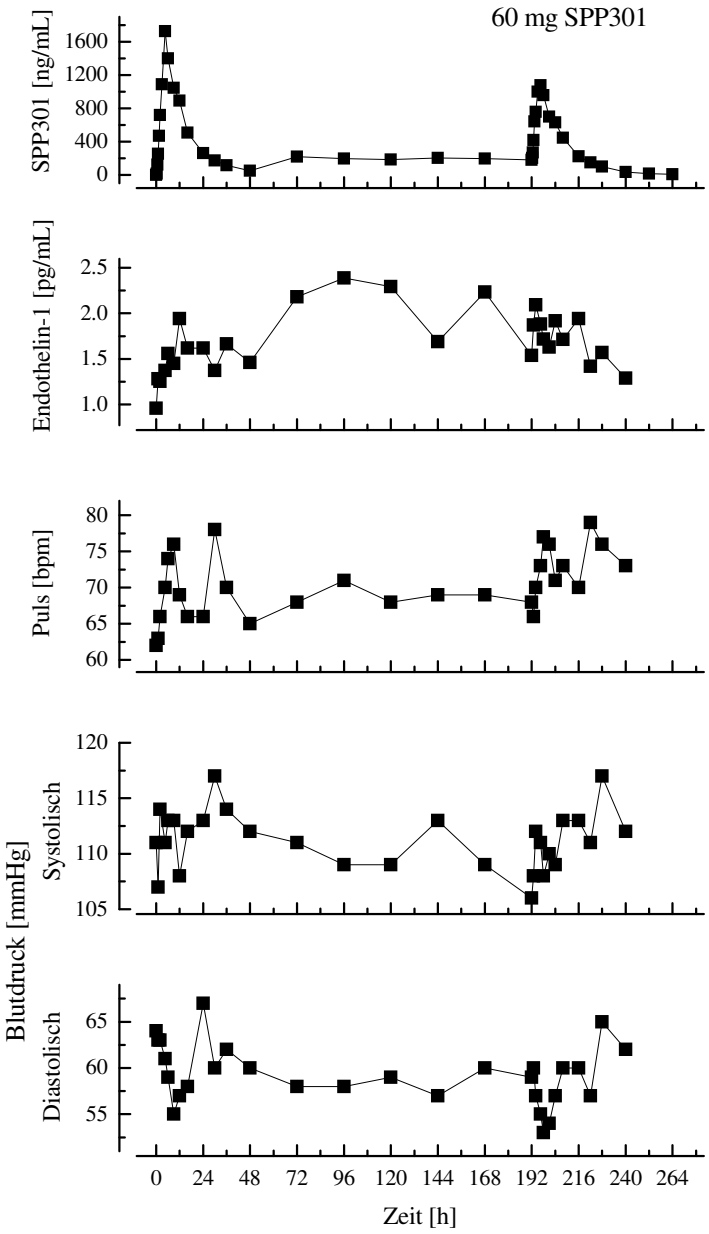

Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der mittleren Konzentrationen von SPP301 und Endothelin-1, Puls, systolischer und diastolischer Blutdruck nach einmaliger und mehrmaliger Gabe von 60 mg SPP301

Lebenslauf

Name	Wibke Graß
geboren am	5. Januar 1976 in Marburg/Lahn
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982 – 1995	Freie Waldorfschule in Marburg und Schopfheim
26.06.1995	Abitur

Studium

1995 - 2004	Studium der Humanmedizin
	Vorklinischer Abschnitt an der Freien Universität Berlin
20.08.1997	Ärztliche Vorprüfung
	Klinischer Abschnitt an der Humboldt Universität Berlin
23.03.1999	1. Staatsexamen
14.09.2001	2. Staatsexamen
19.05.2003	3. Staatsexamen; Abschlußnote: gut
15.10.2003 - 30.09.2004	ÄiP Vivantes Klinikum Neukölln, Abteilung für Pneumonologie und Infektiologie, Rettungsstelle
01.10.2004	Approbation als Ärztin

Berufstätigkeit

01.10.2004 - 30.11.2004	Assistenzärztin im Vivantes Klinikum Neukölln, Abteilung für Pneumonologie und Infektiologie, Rettungsstelle
ab 01.01.2005	Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin, Rüdersdorf / Seebad