

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bedeutung genetischer Polymorphismen im organischen
Kationentransporter OCT1 für die Pharmakokinetik
und Nebenwirkungen von Proguanil**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annabelle Tann

aus

Heidelberg

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent	Prof. Dr. med. J. Brockmöller
Ko-Referentin:	Prof. Dr. med. H. E. Hahn

Datum der mündlichen Prüfung: 23.01.2019

Teile der vorliegenden Arbeit sind an folgenden Stellen einem größeren Fachpublikum zugänglich gemacht bzw. veröffentlicht worden:

Johannes Matthaei, Tina Seitz, Annabelle Tann, Sina Tadjerpisheh, Jürgen Brockmöller, Mladen Tzvetkov, Effects of genetic polymorphisms in *OCT1* on the pharmacokinetics of the antimalarial drug proguanil, Göttinger Transportertage, Göttingen, 15.12.2016

Johannes Matthaei, Tina Seitz, Ole Jensen, Annabelle Tann, Jürgen Brockmöller, Mladen V. Tzvetkov, Effects of OCT1 and *OCT1* polymorphisms on the hepato-cellular uptake and the pharmacokinetics of proguanil, Second German PharmTox-Summit, Heidelberg, 07.03.2017

Matthaei J, Seitz T, Jensen O, Tann A, Prukop T, Tadjerpisheh S, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2018): OCT1 deficiency affects hepatocellular concentrations and pharmacokinetics of cycloguanil, the active metabolite of the antimalarial drug proguanil. Clin Pharmacol Ther, doi: 10.1002/cpt.1128

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
"Bedeutung genetischer Polymorphismen im organischen
Kationentransporter OCT1 für die Pharmakokinetik und Nebenwirkungen
von Proguanil"
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen
Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung, Prophylaxe und Therapie der Malaria	1
1.2 Das Medikament Proguanil	2
1.3 Resistenz in der Prävention und Therapie der Malaria	4
1.4 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik	5
1.4.1 Definition und Abgrenzung zu Erbkrankheiten	5
1.4.2 Individualisierte Medizin in der klinischen Anwendung	8
1.5 Physiologische Grundlagen der Pharmakokinetik: Bedeutung von Membrantransport und Metabolismus	9
1.5.1 Metabolismus und genetische Variation	10
1.5.1.1 Bekanntes zur Pharmakogenetik von Proguanil	12
1.5.2 Membrantransport und genetische Variation	14
1.5.2.1 Membrantransport organischer Kationen durch OCT1	17
1.6 Der organische Kationentransporter OCT1	19
1.6.1 Genetische Polymorphismen in <i>OCT1</i>	21
1.7 Aufgabenstellung	24
2 Studiendesign, Probandinnen und Probanden sowie Methoden der Bioanalytik und Datenauswertung	25
2.1 Design und Endpunkte der klinischen Studie	25
2.1.1 Probandendatenbank und Auswahl der Probandinnen und Probanden	26
2.1.1.1 Voruntersuchung der Probanden (Screening)	26
2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	28
2.1.2 Ablauf der Untersuchungen zu Proguanil	30
2.1.3 Appliziertes Arzneimittel (Prüfpräparat)	31
2.1.4 Interventionen	31
2.1.4.1 Blutentnahmen	31
2.1.4.2 Visuelle Analogskalen und Stanford Sleepiness Scale	31
2.1.4.3 Ernährungsfragebogen	32
2.1.4.4 EKG und Vitalparameter	32
2.1.5 Risiken der Interventionen	32
2.1.6 Überwachung der Probandinnen und Probanden	33
2.1.7 Ernährungsvorschriften und andere Verhaltensregeln	33
2.1.8 Dokumentation der Probanden- und Studiendaten	34
2.1.9 Studienabbruch	35
2.1.10 Ethische und rechtliche Aspekte	35

2.1.11	Versicherung	35
2.1.12	Datenschutz.....	35
2.2	Bioanalytische Methoden	36
2.2.1	Genotypisierung der funktionell relevanten Polymorphismen in <i>OCT1</i>	36
2.2.2	Messung der Plasmakonzentrationen von Proguanil und Cycloguanil	38
2.2.3	Messung der Blutkonzentrationen von Proguanil und Cycloguanil.....	40
2.2.4	Zytochrom-P450-Enzym-Polymorphismen.....	40
2.3	Pharmakokinetische und statistische Datenauswertung	42
2.3.1	Pharmakokinetische Analysen.....	42
2.3.2	Statistische Analysen.....	45
3	Ergebnisse	48
3.1	Untersuchte Studienpopulation	48
3.2	Pharmakokinetik der Gesamtgruppe	50
3.2.1	Konzentrationen im Blut.....	50
3.2.1.1	Proguanil	50
3.2.1.2	Cycloguanil.....	52
3.2.1.3	Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil	54
3.2.2	Konzentrationen im Blutplasma.....	54
3.2.2.1	Proguanil	54
3.2.2.2	Cycloguanil.....	56
3.2.2.3	Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil	57
3.2.3	Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration	58
3.2.3.1	Proguanil	58
3.2.3.2	Cycloguanil.....	59
3.3	Auswertung nach <i>OCT1</i>-Genotypen und Transportaktivität	59
3.3.1	Analyse der Zusammenhänge im Blut.....	61
3.3.1.1	Proguanil	61
3.3.1.2	Cycloguanil.....	66
3.3.1.3	Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil	70
3.3.2	Analyse der Zusammenhänge im Blutplasma.....	71
3.3.2.1	Proguanil	71
3.3.2.2	Cycloguanil.....	74
3.3.2.3	Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil	78
3.3.3	Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration	78
3.3.4	Vergleich der Erythrozyten- und Plasmakonzentrationen.....	80
3.4	Auswertung nach <i>CYP2C19</i>-Genotyp	81
3.4.1	Analyse im Blut	82
3.4.2	Analyse im Plasma.....	83
3.5	Auswertung in Abhängigkeit vom <i>CYP3A4</i>- und <i>CYP3A5</i>-Genotyp	85
3.5.1	Analyse im Blut	85
3.5.2	Analyse im Plasma.....	87
3.6	Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut in Abhängigkeit vom <i>CYP2C19</i>- und <i>CYP3A5</i>-Genotyp.....	88

3.7	Multifaktorielle Auswertung aller betrachteten Einflussfaktoren.....	90
3.7.1	Demografische Daten, OCT1-Aktivität, CYP2C19- und CYP3A-Aktivität, Rauchen und Kreatinin-Wert.....	90
3.7.1.1	Analyse im Blut.....	91
3.7.1.1.1	Proguanil	92
3.7.1.1.2	Cycloguanil.....	93
3.7.1.2	Analyse im Plasma.....	94
3.7.1.2.1	Proguanil	96
3.7.1.2.2	Cycloguanil.....	97
3.7.1.3	Anteil der signifikanten Einflussfaktoren an der Variation der AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma.....	98
3.7.1.4	Darstellung des Einflusses hormoneller Kontrazeptiva auf die AUCs in Blut und Plasma.....	98
3.7.2	Kombinierter Einfluss von OCT1- und CYP2C19-Aktivität auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma.....	100
3.7.3	Untersuchung des Einflusses der Ernährungsgewohnheiten	102
3.7.3.1	Analyse im Blut.....	102
3.7.3.2	Analyse im Plasma.....	102
3.8	Unerwünschte Wirkungen von Proguanil in dieser Studie	102
3.8.1	Von Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern aktiv berichtete unerwünschte Wirkungen.....	102
3.8.2	Ausgewählte unerwünschte Wirkungen erfasst mittels visueller Analogskalen..	104
4	Diskussion	106
4.1	Ergebnisse der klinischen Studie im Vergleich mit <i>in-vitro</i> -Daten und anderen klinischen Studien zu Proguanil.....	106
4.2	Bedeutung der Pharmakogenetik für die Wirksamkeit von Proguanil und Bedeutung für die klinische Anwendung des Medikamentes.....	113
4.3	Arzneimittel-Nebenwirkungen und -Wechselwirkungen.....	119
4.4	Entstehung von Resistenzen gegenüber Proguanil.....	122
4.5	Ausblick.....	123
5	Zusammenfassung	124
6	Literaturverzeichnis	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Vermehrungszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> und Angriffspunkte einiger Malaria-Medikamente.....	2
Abbildung 2. Angriffspunkte von Malaria-Medikamenten an Enzymen, Transportern und anderen Proteinen des Parasiten.....	3
Abbildung 3. Menschlicher Hepatozyt	10
Abbildung 4. Metabolismus von Proguanil in der Leberzelle.	12
Abbildung 5. Transportprozesse an Biomembranen.....	15
Abbildung 6. Strukturformeln der vier OCT1-Substrate im Vergleich.	18
Abbildung 7. Struktur des OCT1-Transporters in der Zellmembran.....	20
Abbildung 8. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Blut aller Probandinnen und Probanden in linearer und halblogarithmischer Darstellung.....	50
Abbildung 9. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Proguanil im Blut.....	52
Abbildung 10. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Blut aller Probandinnen und Probanden in linearer und halblogarithmischer Darstellung.....	52
Abbildung 11. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Cycloguanil im Blut.....	53
Abbildung 12. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut aller Studien-teilnehmerinnen und -teilnehmer.....	54
Abbildung 13. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Plasma aller Probandinnen und Probanden in linearer und halblogarithmischer Darstellung.....	54
Abbildung 14. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Proguanil im Plasma	56
Abbildung 15. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Plasma aller Probandinnen und Probanden in linearer und halblogarithmischer Darstellung.....	56
Abbildung 16. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Cycloguanil im Plasma	57
Abbildung 17. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma aller Studien-teilnehmerinnen und -teilnehmer	58
Abbildung 18. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma aller Probandinnen und Probanden in halblogarithmischer Darstellung.....	61
Abbildung 19. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität	62
Abbildung 20. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität	64
Abbildung 21. AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut geordnet nach den <i>OCT1</i> -Genotypen.....	65
Abbildung 22. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität ..	67
Abbildung 23. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität	69
Abbildung 24. AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut geordnet nach den <i>OCT1</i> -Genotypen.....	69
Abbildung 25. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität	71

Abbildung 26. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität..	71
Abbildung 27. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	73
Abbildung 28. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	75
Abbildung 29. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	77
Abbildung 30. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	78
Abbildung 31. Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil und Cycloguanil nach OCT1-Aktivität	79
Abbildung 32. Geschätzte Randmittel der Verhältnisse von Proguanil und Cycloguanil in But zu Plasma.....	79
Abbildung 33. Konzentrations-Zeit-Verlauf der Erythrozyten- und Plasmakonzentration von Proguanil und Cycloguanil für die Gesamtgruppe	80
Abbildung 34. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma aller Probandinnen und Probanden in halblogarithmischer Darstellung.....	82
Abbildung 35. AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach <i>CYP2C19</i> -Genotyp	85
Abbildung 36. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach <i>CYP2C19</i> -Aktivität....	89
Abbildung 37. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach <i>CYP3A5</i> -Genotyp.....	90
Abbildung 38. Einfluss demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Blut.....	92
Abbildung 39. Einfluss demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Plasma	96
Abbildung 40. Anteil der in der multiplen linearen Regressionsanalyse signifikanten Einflussfaktoren an der Prädiktion der AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma	98
Abbildung 41. Kombiniertes Einfluss von OCT1- und <i>CYP2C19</i> -Aktivität auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma	101
Abbildung 42. Zeitstrahl zu pharmakogenetischen Studien zu Malariamedikamenten und speziell auch zu Proguanil.....	111
Abbildung 43. Maximale Konzentrationen von Proguanil und Cycloguanil im Blut und Plasma	115
Abbildung 44. Transport- und Stoffwechselwege von Proguanil und seinem Metaboliten Cycloguanil im Menschen.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Beispiele funktionell bedeutender Varianten in Genen mit Relevanz in der Medizin	7
Tabelle 2 Wichtige Enzyme der Biotransformation	11
Tabelle 3 Membrantransporter mit Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln.....	16
Tabelle 4 In der klinischen Studie eingeschlossene <i>OCT1</i> -Polymorphismen	22
Tabelle 5 Häufigkeit der in der Studie eingeschlossenen <i>OCT1</i> -Allele in Deutschland	22
Tabelle 6 Häufigkeiten homo- und heterozygoter <i>OCT1</i> -Genotypen verschiedener Bevölkerungsgruppen	23
Tabelle 7 Einschlusskriterien der klinischen Studie	28
Tabelle 8 Ausschlusskriterien der klinischen Studie	28
Tabelle 9 Ablauf der Untersuchungen zu Proguanil	30
Tabelle 10 Ernährungsvorschriften und Verhaltensregeln	33
Tabelle 11 Parameter der pharmakokinetischen Nicht-Kompartiment-Analyse	43
Tabelle 12 Demografische Daten der Studienpopulation nach <i>OCT1</i> -Genotypen.....	48
Tabelle 13 Demografische Daten der Studienpopulation nach <i>OCT1</i> -Aktivität.....	49
Tabelle 14 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Proguanil im Blut.....	51
Tabelle 15 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Cycloguanil im Blut.....	53
Tabelle 16 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Proguanil im Plasma	55
Tabelle 17 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Cycloguanil im Plasma	57
Tabelle 18 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil für die Gesamtgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages	58
Tabelle 19 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil für die Gesamtgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages	59
Tabelle 20 <i>OCT1</i> -Genotypen der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil	60
Tabelle 21 AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Genotyp.....	62
Tabelle 22 AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Aktivität	63
Tabelle 23 Aktivität verschiedener <i>OCT1</i> -Allele basierend auf <i>in-vitro</i> -Daten des Instituts für Klinische Pharmakologie Göttingen	64
Tabelle 24 Resultierender <i>OCT1-in-vitro</i> -Score der Genotypen.....	64
Tabelle 25 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Aktivität	66
Tabelle 26 AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Genotyp	67
Tabelle 27 AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Aktivität	68
Tabelle 28 Nicht-Kompartiment-Analyse für Cycloguanil im Blut nach <i>OCT1</i> -Aktivität	70
Tabelle 29 AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach <i>OCT1</i> -Genotyp	72
Tabelle 30 AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach <i>OCT1</i> -Aktivität	73

Tabelle 31 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	74
Tabelle 32 AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Genotyp	75
Tabelle 33 AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität	76
Tabelle 34 Nicht-Kompartiment-Analyse für Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität ...	77
Tabelle 35 Rangfolge der CYP2C19-Genotypen nach Aktivität.....	81
Tabelle 36 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach CYP2C19-Genotyp.....	83
Tabelle 37 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP2C19-Genotyp.....	84
Tabelle 38 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach CYP3A4-Genotyp.....	86
Tabelle 39 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach CYP3A5-Genotyp.....	86
Tabelle 40 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP3A4-Genotyp.....	87
Tabelle 41 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP3A5-Genotyp.....	88
Tabelle 42 Gruppierung der CYP2C19-Genotypen nach Aktivität	88
Tabelle 43 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut	93
Tabelle 44 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut	94
Tabelle 45 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma.....	96
Tabelle 46 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma.....	97
Tabelle 47 Deskriptive Darstellung der AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma nach Geschlecht und Einnahme hormoneller Kontrazeptiva.....	99
Tabelle 48 Adverse events der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil (ohne das adverse event „Kopfschmerzen“)	103
Tabelle 49 Adverse event „Kopfschmerzen“ am Studientag Proguanil.....	104
Tabelle 50 Auswertung der visuellen Analogskalen der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil	105
Tabelle 51 Transportverhalten der OCT1-Varianten in HEK293-Zellen für Proguanil und Cycloguanil	107
Tabelle 52 Einfluss von OCT1 in verschiedenen Lokalisationen im menschlichen Körper auf die Blutkonzentration von Proguanil	109
Tabelle 53 Vergleich von area under the curve (AUC) und maximaler Konzentration (C_{max}) im Blut der vorliegenden Studie mit anderen klinischen Studien	112
Tabelle 54 Vergleich von area under the curve (AUC) und maximaler Konzentration (C_{max}) im Plasma der vorliegenden Studie mit anderen klinischen Studien	113
Tabelle 55 Häufigkeit genetischer Polymorphismen mit Aktivitätsverlust von OCT1, CYP2C19, CYP3A4 oder CYP3A5 in verschiedenen Bevölkerungsgruppen.....	118

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>adenosin triphosphate-binding cassette</i> , Adenosintriphosphat-bindende Kasette
AE	<i>adverse event</i> , unerwünschtes Ereignis
AUC/ AUC _{0-inf}	<i>area under the curve</i> , Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
Arg61Cys	Aminosäureaustausch: Cystein statt Arginin an Position 61
BMI	Body Mass Index
Cl/F	<i>Clearance</i> /Bioverfügbarkeit
C _{max}	maximale Konzentration
CRF	<i>Case Report Form</i> , Formular zur Studiendokumentation
CYP	Zytochrom-P450-Enzym
CYP1A2	Zytochrom-P450-Enzym 1A2
CYP2C9	Zytochrom-P450-Enzym 2C9
CYP2C19	Zytochrom-P450-Enzym 2C19
CYP2D6	Zytochrom-P450-Enzym 2D6
CYP2E1	Zytochrom-P450-Enzym 2E1
CYP3A4	Zytochrom-P450-Enzym 3A4
CYP3A5	Zytochrom-P450-Enzym 3A5
Cys88Arg	Aminosäureaustausch: Arginin statt Cystein an Position 88
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ExoI	Exonuklease 1
Fast-AP	wärmeempfindliche alkalische Phosphatase
eGFR/GFR	<i>estimated glomerular filtration rate</i> / glomeruläre Filtrationsrate
Gly401Ser	Aminosäureaustausch: Serin statt Glycin an Position 401
Gly465Arg	Aminosäureaustausch: Arginin statt Glycin an Position 465
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H	Haplotyp
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry</i> , Tandem-Massenspektrometrie
MATE1	<i>multidrug and toxic compound extrusion 1</i>
MATE2-K	<i>multidrug and toxic compound extrusion 2-K</i>
Max	maximaler Wert des Bereichs
Met420del	Aminosäuredeletion von Methionin an Position 420
Min	minimaler Wert des Bereichs

MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MRT	<i>mean resistance time</i> , Zeit, die ein Medikamentenmolekül im Mittel im Körper verbleibt
n.s.	nicht signifikant
OATP1B1	organische Anionen-transportierendes Polypeptid 1B1
OCT1	<i>organic cation transporter 1</i> , organischer Kationentransporter 1
OCT2	<i>organic cation transporter 2</i> , organischer Kationentransporter 2
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
p.o.	<i>per os</i>
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SLC	<i>solute carrier</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
t _{max}	Zeitpunkt, an dem die maximale Konzentration erreicht wird
TMD	Transmembran-Domäne
TMF	<i>Trial Master File</i> , Sammlung der Formulare zur Studiendokumentation
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
t _{1/2} Lambda z	terminale Halbwertszeit
UDP	Uridindiphosphat
VAS	visuelle Analogskala
V _z /F	zentrales Verteilungsvolumen

1 Einleitung

In dieser Arbeit sollen mögliche erbliche Unterschiede im Membrantransport des Malaria-Medikamentes Proguanil untersucht werden. Deshalb möchte ich zunächst in die Malaria und ihre Arzneitherapie einführen, bevor die allgemeinen Ziele von Pharmakogenetik und individualisierter Medizin erläutert werden. Schließlich werde ich im weiteren Zusammenhang den Membrantransport und Metabolismus von Medikamenten darstellen und auf bereits bekanntes Wissen und noch offene Fragen zu dem Arzneimittel Proguanil eingehen.

1.1 Bedeutung, Prophylaxe und Therapie der Malaria

Malaria wird durch Plasmodien, also einzellige Parasiten, welche durch den Biss der Anopheles-Mücke übertragen werden, ausgelöst. Unter den fünf humanpathogenen Plasmodien-Arten ist *Plasmodium falciparum* eine der häufigsten und löst die Malaria tropica mit besonders schweren Verläufen aus (Ruiz Lopez del Prado et al. 2014). Etwa 36% der Weltbevölkerung in 107 Ländern leben in Malaria-Gebieten. Im Jahr 2016 waren laut World Health Organization (WHO) 216 Millionen Menschen in 91 Ländern an Malaria erkrankt. Im gleichen Jahr verstarben 445.000 Menschen an der Erkrankung (World Malaria Report 2017). Eine besonders hohe Mortalität findet sich in afrikanischen Ländern südlich der Sahara (Fernando et al. 2011). Auch Reisende sind von der Erkrankung bedroht. Bis zu 10.000 Krankheitsfälle pro Jahr treten in Industrieländern auf (Ruiz Lopez del Prado et al. 2014). Laut Robert Koch-Institut (RKI) traten in Deutschland in den letzten Jahren durchschnittlich 500 bis 600 Malaria-Erkrankungen pro Jahr neu auf, wobei 2014 sogar mehr als 1.000 Fälle erfasst wurden (Ratgeber für Ärzte - Malaria 2015).

Für die individuelle Prophylaxe der Malaria spielt neben der Expositionsprophylaxe gegenüber der Anopheles-Mücke auch die Chemoprophylaxe mit Arzneimitteln eine wichtige Rolle (Ruiz Lopez del Prado et al. 2014). Eines der in der Malaria-Prävention eingesetzten Medikamente ist Proguanil. In Abbildung 1 sind die Angriffspunkte einiger Malaria-Medikamente, darunter auch Proguanil, gezeigt. Aufgrund zunehmender Entwicklung von Resistenzen wird Proguanil heutzutage in Kombination mit Atovaquon oder Chloroquin genutzt. Proguanil/Atovaquon wird unter dem Handelsnamen Malarone[®] zur Malaria-Prophylaxe mit guter Wirksamkeit vor allem auch gegen *Plasmodium falciparum*-Malaria (Malaria tropica) verschrieben (Fernando et al. 2011). Malarone[®] ist

laut der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. (DTG) auch für die Therapie und notfallmäßige Selbstbehandlung der unkomplizierten *Plasmodium falciparum*-Malaria oder anderer Malariaformen geeignet (Malariaphylaxe 2015). Zusammen mit Artesunat wird die Kombination aus Atovaquon und Proguanil gegen arzneimittelresistente Formen der Plasmodien eingesetzt (McGready et al. 2003b).

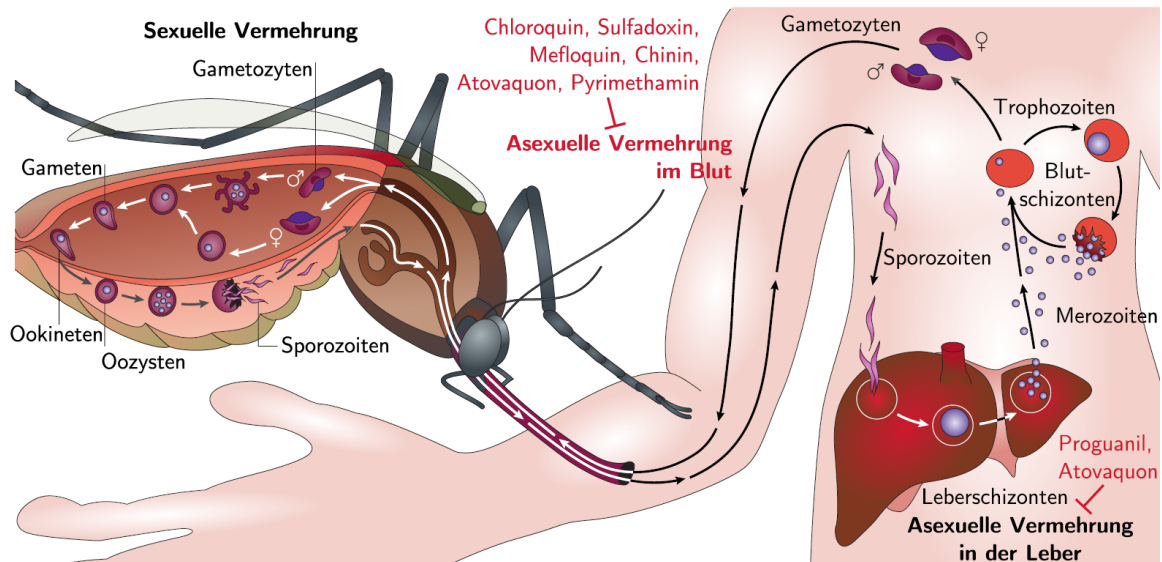


Abbildung 1. Vermehrungszyklus von *Plasmodium falciparum* und Angriffspunkte einiger Malaria-Medikamente. Abbildung modifiziert nach Su et al. 2007, die Verwendung erfolge mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group. In der Anopheles-Mücke findet die sexuelle Vermehrung der Parasiten statt, während sie sich im Menschen asexuell vermehren. Proguanil wirkt hauptsächlich auf die hepatischen Formen der Plasmodien. Atovaquon hemmt die Vermehrung der Parasiten im Menschen sowohl der in Leber als auch im Blut. Die dargestellten übrigen Malaria-Medikamente greifen primär die asexuellen Vermehrungsformen der Plasmodien im Blut an.

1.2 Das Medikament Proguanil

Das Phenylbiguanid Proguanil wurde erstmals im Jahr 1945 synthetisiert. Nach seiner Anwendung zur Prophylaxe der Malaria in den Fünfzigerjahren nahm der Einsatz dieses Medikamentes durch die wirksamere Prävention mit Chloroquin ab. Durch zunehmende Chloroquin-Resistenzen erlebte die Prophylaxe mit Proguanil in den 1980er Jahren einen Aufschwung, um in den folgenden Jahren in Kombination mit Chloroquin eingesetzt zu werden (Kaneko et al. 1999).

Das in dieser Studie eingesetzte Proguanil-Präparat wurde unter dem Handelsnamen Paludrine[®] von AstraZeneca produziert und im Juli 2015 aufgrund von Resistenzentwicklungen und dem Vorhandensein wirksamerer Kombinationstherapien, wie

beispielsweise Malarone[®] (Proguanil plus Atovaquon), vom deutschen Markt genommen (Apotheke adhoc 2015).

Proguanil wird in der Leber von Zytochrom-P450-Enzymen in Chlorophenyl-Biguanid und seinen aktiven Metaboliten Cycloguanil umgewandelt (Lochner und Thompson 2014). Wie in Abbildung 2 gezeigt, hemmt Cycloguanil das Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase der Plasmodien-Parasiten und stört so deren Folsäure-Biosynthese, welche für die Synthese von Nukleinsäuren benötigt wird (Helsby et al. 1991). Damit wird vor allem die Vermehrung der hepatischen, also in der Leber vorkommenden Formen von *Plasmodium falciparum* gehemmt (Fachinformation Paludrine[®] 2010). Es konnte auch gezeigt werden, dass Cycloguanil ebenfalls auf die erythrozytären Stadien der Malariaparasiten wirkt (Delves et al. 2012). Für Proguanil ist unklar, ob und wie die schwache antiparasitäre *in-vitro*-Aktivität von Proguanil selbst *in vivo* gegen Malariaparasiten wirkt (Pudney et al. 1999).

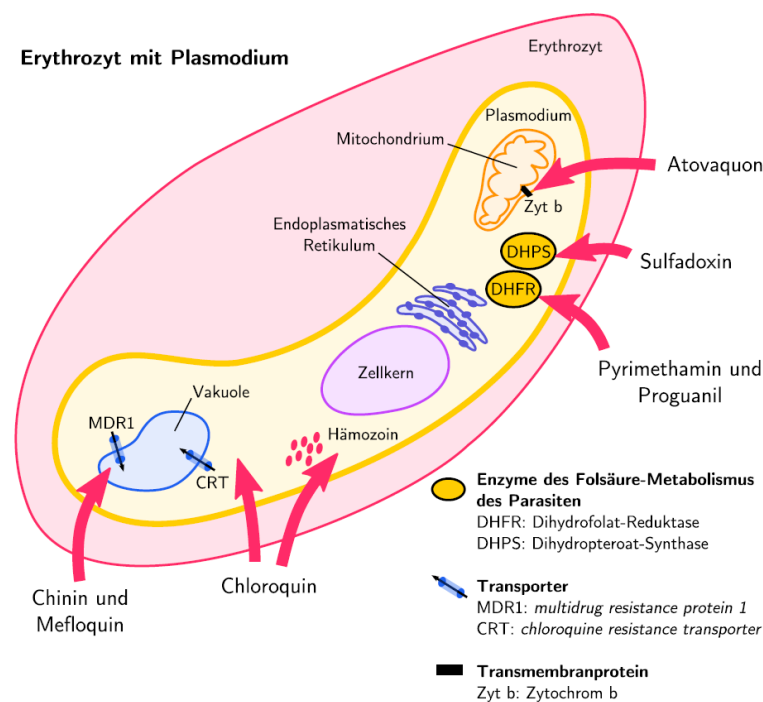


Abbildung 2. Angriffspunkte von Malaria-Medikamenten an Enzymen, Transportern und anderen Proteinen des Parasiten. Abbildung modifiziert nach Sinha et al. 2014. Proguanil hemmt das Enzym Dihydrofolat-Reduktase der Plasmodien, während Atovaquon auf das Transmembranprotein Zytochrom b wirkt. Auch die Angriffspunkte einiger anderen Malaria-Medikamente sind gezeigt.

Laut Fachinformation wird Proguanil nach oraler Applikation schnell resorbiert und erreicht nach drei bis vier Stunden maximale Plasmakonzentrationen, allerdings sind keine Ergebnisse von Studien zur absoluten Bioverfügbarkeit von Proguanil publiziert.

Cycloguanil erreicht erst nach vier bis neun Stunden maximale Plasmakonzentrationen. Beide Substanzen werden hauptsächlich über die Niere durch tubuläre Sekretion und gering auch über den Stuhl eliminiert.

Weiterhin ist Proguanil nach Angaben in der Fachinformation insgesamt ein eher gut verträgliches Medikament, kann gelegentlich aber Nebenwirkungen wie leichte Störungen des Magen-Darm-Traktes mit Durchfall und Verstopfung sowie temporär wunde und entzündliche Läsionen im Mund verursachen. Selten kann es zu vorübergehendem Haarausfall, Hautreaktionen, allergischen Reaktionen oder einer leichten Abnahme der Thrombozytenzahl und der Zahl der neutrophilen Granulozyten kommen. Sehr selten ist das Auftreten von arzneimittelinduziertem Fieber, Cholestase oder einer Vaskulitis beschrieben (Fachinformation Paludrine® 2010).

1.3 Resistenz in der Prävention und Therapie der Malaria

Die Prävention und Therapie der Malaria wird durch das Problem der primären oder sekundären Resistenz erschwert. Wegen der unterschiedlichen Resistenzlage sind die Empfehlungen in der Prophylaxe der Malaria für verschiedene Regionen der Welt sehr unterschiedlich (Fernando et al. 2011). Resistenzen können Ursachen im Erreger und im Wirt, dem Menschen, haben. Den Malaria-Erreger betreffend, handelt es sich vor allem um Mutationen in für Enzyme oder Transporter kodierenden Genen (Petersen et al. 2011). Durch Selektionsdruck sind vielfach Resistenzen der Parasiten gegen Arzneimittel oder Kombinationstherapien entstanden. Vor allem gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin (Fansidar®) liegen weit verbreitete Resistenzen vor, und auch die Kombination von Proguanil und Chloroquin verliert ihre Wirksamkeit. Ebenso traten in der Prophylaxe mit Malarone® bereits in den Jahren 2001 bis 2005 Resistenzen auf (Fernando et al. 2011). Bei der Anwendung von Proguanil treten Resistenzen durch Mutationen in dem Enzym Dihydrofolat-Reduktase der Parasiten auf, welches den Angriffspunkt des Medikamentes darstellt. Durch Punktmutationen in dem Gen, das für dieses Enzym kodiert, kommt es zu einer verminderten Affinität des Enzyms für den aktiven Metaboliten von Proguanil, Cycloguanil (Sinha et al. 2014). Dadurch kann die Dihydrofolat-Reduktase und damit auch die Vermehrung der Parasiten weniger erfolgreich gehemmt werden.

Die Entstehung von Resistenzen kann aber auch Ursachen im Menschen haben. Hier kommt der Pharmakokinetik eine bedeutende Rolle zu. Die Bioverfügbarkeit eines Medikamentes, also seine Konzentration im Blut bezogen auf die Zeit, hängt mit der

Selektion resistenter Erreger zusammen. Durch eine geringe Bioverfügbarkeit eines Malariamedikamentes und damit durch zu niedrige erreichte therapeutische Dosen können resistente Parasiten überleben und sich weiter vermehren (Klein 2013). Ein grundsätzlich anerkanntes, wenn auch nicht in allen Fällen empirisch belegtes Konzept geht davon aus, dass unter sub-inhibitorischen Konzentrationen eines antiinfektiv wirkenden Medikamentes resistente Erreger einen Vermehrungsvorteil haben und damit die Entwicklung resistenter Erreger begünstigt wird.

1.4 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik

1.4.1 Definition und Abgrenzung zu Erbkrankheiten

In der Arzneitherapie hat die Forschung auf dem Gebiet der Pharmakogenetik in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen (Brockmüller und Tzvetkov 2008). Pharmakogenetik ist die Untersuchung des Einflusses, den Gene auf die Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamenten haben können (Kalow 2005). Zum einen reagieren Patientinnen und Patienten individuell sehr unterschiedlich auf die Einnahme gleicher Medikamente in gleichen Dosierungen. Dafür gibt es nicht-erbliche (umweltbedingte) Ursachen und genetische (angeborene) Ursachen (Evans und Relling 1999). Genetische Polymorphismen sind Varianten von Genen, die mit einer Häufigkeit von 1% oder mehr in der Bevölkerung vorkommen. Für seltenere Varianten gibt es keinen spezifischen Begriff. Man spricht dann von seltenen Genvarianten oder, wenn sie bislang nur einmal beobachtet wurden, von *Singletons*. Die pharmakogenetische Forschung beschäftigt sich schon seit langem viel mit Polymorphismen in Genen, die für Proteine des Arzneistoffwechsels kodieren. Diese beeinflussen die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Medikamenten, sodass es zu Überdosierungen und unerwünschten Wirkungen oder sogar toxischen Effekten kommen kann. In der medizinisch angewandten Konsequenz ist das Ziel der pharmakogenetischen Forschung, Dosierungen von Arzneimitteln an die individuelle genetische Ausstattung von Patientinnen und Patienten anzupassen (Kirchheiner et al. 2006). Neben diesem Nutzen für die klinische Praxis wird die Pharmakogenetik zum anderen auch in der Arzneimittelentwicklung angewandt, um neue Medikamente oder Medikamenten-Angriffspunkte zu erforschen und die Arzneimittelsicherheit, auch in klinischen Studien, zu verbessern (Kalow 2005). Zum Beispiel werden Medikamente, deren Wirkungen und Nebenwirkungen sehr variabel sind und von Genvarianten abhängen, eher vermieden.

Die Weiterentwicklung in der Forschung führte von der Analyse einzelner Kandidatengene zur Nutzung genomweiter Analysen zur Klärung der Erbllichkeit individueller Unterschiede im Ansprechen auf Medikamente (Evans und McLeod 2003). Diese genomweiten Analysen begründeten Ende der 1990er Jahre den Begriff der „Pharmakogenomik“ in der medizinischen Literatur (Mini und Nobili 2009). Im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen werden die meisten Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten durch das Zusammenspiel verschiedener Genprodukte bestimmt, sind also polygenetisch beeinflusst. Deshalb werden in der Pharmakogenomik auch genetische Polymorphismen in Arzneimittel-Angriffspunkten, Transportern oder Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen erforscht (Evans und McLeod 2003). Genetische Variabilität in diesen Strukturen trägt bedeutend zum Auftreten von Nebenwirkungen in der Arzneitherapie bei (Nebert und Vesell 2004). Heutzutage werden die Begriffe Pharmakogenetik und Pharmakogenomik oft synonym verwendet (Mini und Nobili 2009).

Die Pharmakogenetik lässt sich durch zwei bedeutende Unterschiede von der Humangenetik abgrenzen. Zum einen befasst sich die Humangenetik unter anderem mit Erbkrankheiten (Nebert et al. 2008). Bestimmte erbliche Besonderheiten treten in einer Familie gehäuft auf, was zu Erkrankungen in der Familie in der Regel mit hoher Penetranz führt. Oft handelt es sich dabei um schwere Erkrankungen. Im Unterschied dazu ist ein Individuum, das eine pharmakogenetische Variante aufweist, gesund oder nur mit einem gering veränderten Risiko für manche Erkrankungen belastet. Dennoch kann sich diese pharmakogenetische Variante im Auftreten von Nebenwirkungen oder in einer reduzierten Wirksamkeit eines Medikamentes äußern (Kalow 2002). Zum anderen sind Erbkrankheiten in der Regel monogenetisch, also durch Mutationen in einem Gen, beeinflusst. Im Gegensatz dazu werden pharmakogenetische Varianten oft auch polygenetisch vererbt, da Arzneimittel von vielen verschiedenen Enzymen verstoffwechselt werden, für die unterschiedliche Gene kodieren (Nebert et al. 2008). Allerdings kommen auch pharmakogenetische Merkmale vor, die eher monogenetische Eigenschaften aufweisen. So ist der Stoffwechsel vieler Medikamente zu einem hohen Anteil fast monogenetisch durch die Zytochrom-P450-Enzyme (CYP) 2C19 oder 2D6 bedingt. Das Antikonvulsivum Mephenytoin wird zum Beispiel hauptsächlich über CYP2C19 verstoffwechselt, während das Antihypertensivum Debrisoquin und das Antiarrhythmikum Spartein vor allem von CYP2D6 metabolisiert werden (Goldstein 2001; Wijnen et al. 2007). Unterschiede zwischen dominanten monogenetischen und kodominanten Erbgängen lassen sich an der Häufigkeitsverteilung der so genannten Phänotypen, also der vererbten Eigenschaften,

erkennen. Der dominante monogentische Erbgang zeigt eine zweigipflige (bimodale) Verteilungsfunktion, bei der sich für Zytochrom-P450-Enzyme vor allem die schnellen von den langsamen Metabolisierern unterscheiden. Beim kodominanten Erbgang findet sich eher eine dreigipflige (trimodale) Verteilung, bei der sich zusätzlich Unterschiede zwischen den Gruppen der homozygoten und heterozygoten Trägerinnen und Träger finden (Rietbrock et al. 2013).

In der Pharmakogenetik sind zahlreiche Varianten in Enzymen, Transportern, Rezeptoren oder anderen Proteinen bekannt, die mit einem Funktionsverlust oder veränderter Funktion einhergehen und damit beispielsweise für schwere Nebenwirkungen von Medikamenten verantwortlich sein können. In Tabelle 1 sind exemplarisch die Häufigkeiten wichtiger genetischer Polymorphismen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen dargestellt:

Tabelle 1 Beispiele funktionell bedeutender Varianten in Genen mit Relevanz in der Medizin

Gen	Häufigkeit funktionell bedeutender Varianten	Beispiele für die biomedizinische Bedeutung	Quelle
Arylamin-N-Acetyltransferase (NAT2)	50% Träger zwei sehr gering aktiver Allele (kaukasische Bevölkerung)	Erhöhte Isoniazid-Toxizität und Hepatotoxizität	(Sim et al. 2014)
Zytochrom-P450-Enzym 2C19 (CYP2C19)	3% Träger 2 inaktiver Allele (kaukasische Bevölkerung)	Verminderte Bioaktivierung von Clopidogrel oder Proguanil	(Ingelman-Sundberg et al. 1999; Brockmöller und Tzvetkov 2008)
Zytochrom-P450-Enzym 2D6 (CYP2D6)	10% Träger 2 inaktiver Allele (kaukasische Bevölkerung)	Verminderte Bioaktivierung von Codein und Tamoxifen, verlängerte Wirkung von Amitriptylin und Metoprolol	(Wijnen et al. 2007; Brockmöller und Tzvetkov 2008)
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)	Über 10% (afrikanische Bevölkerung)	Hämolyse bei Therapie mit Primaquin und anderen Medikamenten	(Brockmöller und Tzvetkov 2008)
Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)	10% Heterozygote, 0,3% Homozygote (kaukasische Bevölkerung)	Erhöhte Toxizität von Azathioprin und 6-Mercaptopurin	(Brockmöller und Tzvetkov 2008)

Organische Anionen-transportierendes Polypeptid 1B1 (OATP1B1)	18% (europäische Bevölkerung)	Ver mehrt Nebenwirkungen von Simvastatin	(Pasanen et al. 2006; Pasanen et al. 2008)
Organische Kationen-transporter 1 (OCT1)	9% Träger 2 inaktiver oder sehr niedrig aktiver Allele (kaukasische Bevölkerung)	Verringerte Aufnahme von Metformin in die Leber, erhöhte Plasmaspiegel von Sumatriptan oder Tramadol	(Shu et al. 2008; Tzvetkov et al. 2011; Seitz et al. 2015; Matthaei et al. 2016)
Faktor-V-Leiden-Mutation	2-8% Heterozygote Träger (kaukasische Bevölkerung)	Ver mehrte Thromboseneigung	(Nurk et al. 2006)

1.4.2 Individualisierte Medizin in der klinischen Anwendung

Pharmakogenetik und Pharmakogenomik sollen in der individualisierten Medizin dazu genutzt werden, die optimale Dosierung eines Medikamentes für die jeweilige Patientin oder den jeweiligen Patienten auszuwählen und besonders von Nebenwirkungen gefährdete Patientinnen oder Patienten zu identifizieren, um deren Risiko für toxische Nebenwirkungen zu senken (Mini und Nobili 2009). Die Anpassung der Therapien an die individuelle genetische Ausstattung einer bestimmten Patientin oder eines bestimmten Patienten gestaltet sich allerdings dadurch schwierig, dass die meisten Arzneimittelwirkungen multifaktoriell bedingt und auch durch Umwelteinflüsse geprägt sind. Deshalb ist ein Ansatz die Zuordnung von Patienten zu einer Gruppe von Personen mit ähnlichen Eigenschaften, zum Beispiel den gleichen betrachteten Genen, als Grundlage der auf Daten zu Subgruppen basierten Medizin (Kalow 2002). Auch andere Faktoren wie Alter, Geschlecht oder ethnische Zugehörigkeit könnten für die Zuordnung genutzt werden. Beispielsweise kann ethnische Zugehörigkeit genetische Profile mitbestimmen, während der Prozess des Alterns die Expression von Genen und somit deren Aktivität verändern kann (Kalow 2006).

Aktuell können Pharmakogenetik und Pharmakogenomik vor allem in der Therapie mit Psychopharmaka und Antikoagulantien sowie in der Krebstherapie klinisch angewandt werden. Denn die Pharmakogenetik hat vor allem bei der gleichzeitigen Einnahme mehrerer Arzneimittel sowie bei der Einnahme von Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite eine Relevanz. Besonders Arzneimittel, die in der Krebstherapie

eingesetzt werden, zeigen eine geringe therapeutische Breite. Dazu kommt, dass Anti-Tumorthérapien standardisiert dosiert werden, zum Beispiel angepasst an die Körperoberfläche, und somit oft toxische Nebenwirkungen auftreten (Mini und Nobili 2009). Eine besondere Herausforderung der Krebstherapie stellt die Tatsache dar, dass sowohl Mutationen in der Keimbahn als auch im Genom des Tumors die Toxizität und Wirksamkeit der Chemotherapeutika beeinflussen (Paugh et al. 2011).

Ein Beispiel dafür, wie Pharmakogenetik klinisch angewandt werden kann, ist die Therapie der Akuten Lymphoblastischen Leukämie bei Kindern mit dem Zytostatikum 6-Mercaptopurin. Dieses Medikament kann von dem Enzym Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) inaktiviert werden. Das Enzym ist allerdings bei einem von 180 bis einem von 3.700 Menschen nicht aktiv. Patienten mit inaktivem Enzym laufen Gefahr, durch Akkumulation aktiver Metaboliten von 6-Mercaptopurin eine lebensbedrohliche Knochenmarkstoxizität zu entwickeln (Paugh et al. 2011). Auf dieser Grundlage begann man schon vor über 30 Jahren mit der individuellen Dosierung dieses Medikamentes (Evans et al. 2013). Doch obwohl der klinische Nutzen einer genetischen Testung für die Anwendung dieses Zytostatikums bewiesen ist (Relling und Ramsey 2013), gehört die Genotypisierung vor 6-Mercaptopurin-Applikation in der klinischen Anwendung in Europa noch nicht zum Therapiestandard (Brockmöller und Tzvetkov 2008).

1.5 Physiologische Grundlagen der Pharmakokinetik: Bedeutung von Membrantransport und Metabolismus

Pharmakokinetik kann generell durch das Akronym LADME charakterisiert werden. Dabei steht L für Liberation, also die Freisetzung des Wirkstoffes, welche hier nicht weiter betrachtet wird. A ist die Absorption des Medikamentes im Magen-Darm-Trakt. D bezeichnet die Distribution, also Verteilung des Arzneimittels im Körper, M steht für Metabolismus der Substanz und E für ihre Elimination (Kerb et al. 2009). In diesen Vorgängen unterscheiden sich Arzneimittel. Sie werden unterschiedlich aufgenommen und verstoffwechselt, da die Absorption eines Medikamentes von Transportproteinen abhängt und sein Metabolismus maßgeblich durch Modifikation und Konjugation im Phase-I- und Phase-II-Stoffwechsel in der Leber bestimmt wird (Grossman 2009). Weil in Genen, die für Transportproteine und Enzyme kodieren, Polymorphismen auftreten, tragen diese Varianten zur individuell variierenden Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels und damit seiner Wirksamkeit und dem Auftreten von Nebenwirkungen bei (Yoo und Lee 2011).

1.5.1 Metabolismus und genetische Variation

In der Biotransformation werden körpereigene oder körperfremde Substanzen in der Leber inaktiver und wasserlöslicher gemacht, um diese besser ausscheiden zu können. Dazu werden, wie schematisch in Abbildung 3 gezeigt, in Phase I durch Oxidations- oder Reduktionsreaktionen oder durch Hydrolyse reaktive Gruppen geschaffen, welche in Phase II durch Konjugation mit polaren Molekülen verbunden werden (Hoffmann et al. 2014). Diesen Prozessen unterliegen auch Arzneimittel. Die entstehenden wasserlöslichen Substanzen lassen sich über die Leber (hepatische Elimination) oder Nieren (extrahepatische Elimination) ausscheiden (Ito 2014).

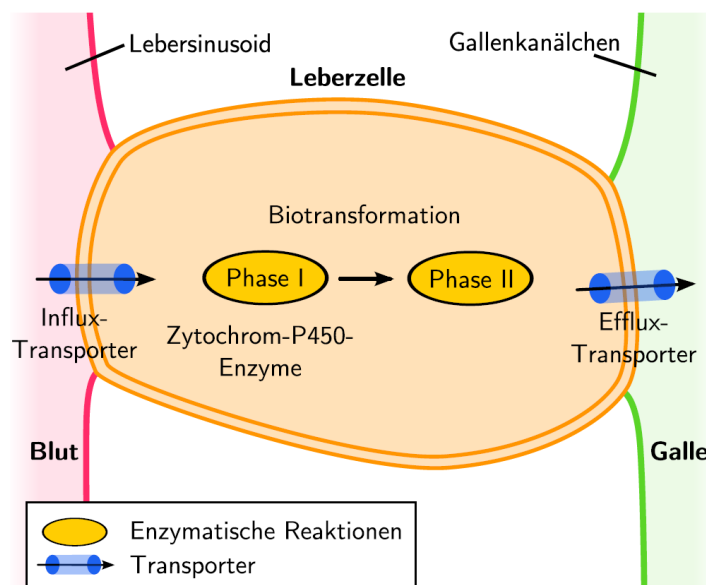


Abbildung 3. Menschlicher Hepatozyt. Gezeigt ist der Zusammenhang von Transportprozessen aus dem Blut über Influx-Transporter in die Leberzelle und den dort ablaufenden enzymatischen Reaktionen der so genannten Biotransformation sowie dem Transport aus der Leberzelle in die Galle durch Efflux-Transporter.

Prodrugs werden in Phase I durch Zytochrom-P450-Enzyme (CYPs) von einer inaktiven Vorstufe in den aktiven Metaboliten des Medikamentes überführt (Hoffmann et al. 2014). Andere Substanzen werden durch Biotransformation in der Leber inaktiviert oder aber zu toxischen Produkten umgewandelt. Paracetamol wird beispielsweise durch CYP2E1 in einen in der Leber akkumulierenden toxischen Metaboliten transformiert. In Phase II konjugieren Enzyme wie die UDP-Glucuronyltransferase Metaboliten mit hydrophilen Molekülen wie Glucuron (Ito 2014). In Tabelle 2 sind beispielhaft weitere wichtige Enzyme der Biotransformation dargestellt.

Tabelle 2 Wichtige Enzyme der Biotransformation

Enzym	Beispiele für Substrate	Quelle
Phase-I-Metabolismus		
CYP1A2	Clozapin, Imipramin, Lidocain, Paracetamol, Theophyllin	(Kirchheiner et al. 2006)
CYP2C9	Celecoxib, Clopidogrel, Diclofenac, Fluvastatin, Glibenclamid, Ibuprofen, Lorsartan, Phenprocoumon, Torasemid	(Kirchheiner et al. 2006)
CYP2C19	Diazepam, Omeprazol, Pantoprazol, Proguanil, Propranolol	(Kirchheiner et al. 2006)
CYP2D6	Ajmalin, Amitriptylin, Codein, Flecainid, Fluoxetin, Haloperidol, Metoprolol, Ondansetron, Propafenon, Tamoxifen	(Kirchheiner et al. 2006)
CYP2E1	Einige halogenierte Inhalationsnarkotika, Paracetamol	(Trautmann und Kleine-Tebbe 2013)
CYP3A4	Cyclophosphamid, Cyclosporin, Diazepam, Erythromycin, Nifedipin, Prednisolon, Proguanil, Repaglinid, Simvastatin, Tacrolimus, Verapamil	(Coller et al. 1999; Kato et al. 2010)
Phase-II-Metabolismus		
Catechol-O-Methyltransferase (COMT)	Alpha-Methyldopa, Amphetamin, L-Dopa, Östrogene	(Kirchheiner et al. 2006)
UDP-Glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1)	Bilirubin, Codein, Etoposid, Irinotecan, Simvastatin	(Guillemette et al. 2014)
Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)	Azathioprin, 6-Mercaptopurin	(Kirchheiner et al. 2006)

Als Phase III der Biotransformation wird der Transport der hydrophilen Produkte über die Zellmembran bezeichnet, der, wie oben erwähnt, großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln hat (Hoffmann et al. 2014).

Zytochrom-P450-Enzyme spielen eine Schlüsselrolle im Phase-I-Metabolismus von Arzneimitteln (Yoo und Lee 2011). Es kommen relevante Polymorphismen vor, welche Einfluss auf die Plasmakonzentration von Medikamenten nehmen. Außerdem können Zytochrome induziert oder gehemmt werden, wodurch es zu Medikamenten-Wechselwirkungen kommen kann (Bapiro et al. 2001). Auch in Enzymen des Phase-II-Metabolismus, wie beispielsweise den UDP-Glucuronyltransferasen, kommen klinische relevante Polymorphismen vor. Unterschiede in der Aktivität dieser Enzyme beeinflussen

den First-Pass-Effekt von Arzneimitteln und damit deren Bioverfügbarkeit (Guillemette et al. 2014)

1.5.1.1 Bekanntes zur Pharmakogenetik von Proguanil

Die Aktivierung und Inaktivierung von Proguanil zu dem aktiven Metaboliten Cycloguanil und dem inaktiven Metaboliten Chlorphenylbiguanid in der Leber erfolgt vor allem durch das Zytochrom-P450-Enzym (CYP) 2C19 (Kerb et al. 2009). Dieser Prozess ist in Abbildung 4 dargestellt. CYP2C19 ist ein polymorphes Leberenzym, welches Arzneimittel wie zum Beispiel Barbiturate, Mephenytoin, Proguanil, Omeprazol, Clopidogrel oder das Antimykotikum Voriconazol metabolisiert (Yoo und Lee 2011). Das Enzym kann unter anderem durch Fluvoxamin, Fluoxetin, Omeprazol, Ritonavir und orale Kontrazeptiva gehemmt werden. Rifampicin ebenso wie einige Antikonvulsiva induzieren die Enzymaktivität von CYP2C19 (Wijnen et al. 2007).

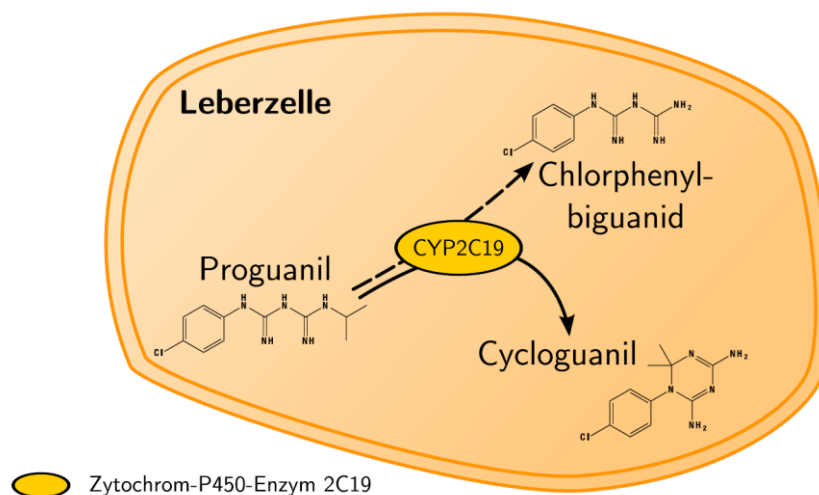


Abbildung 4. Metabolismus von Proguanil in der Leberzelle. Die Aktivierung von Proguanil zu Cycloguanil erfolgt hauptsächlich über das Zytochrom-P450-Enzym 2C19, in geringerem Umfang auch über CYP3A4. Gleiches gilt wahrscheinlich für die Entstehung des inaktiven Metaboliten Chlorphenylbiguanid.

Die Relevanz des genetischen Polymorphismus von CYP2C19 wurde zunächst für den Metabolismus des Antikonvulsivums Mephenytoin und später auch für den Metabolismus von Proguanil bestätigt (Coller et al. 1999). Der Wildtyp, das Allel *CYP2C19*1*, kodiert für ein Enzym mit normaler Aktivität. Varianten des Allels, wie *CYP2C19*2* oder *CYP2C19*3*, kodieren für Enzyme mit verminderter Aktivität. Homozygote Träger zweier mutierter Allele haben eine komplett fehlende Enzymaktivität und werden *poor metabolizer* (PM) genannt (Hoskins et al. 1998). Da Proguanil ein *Prodrug* ist, das durch CYP2C19 aktiviert wird, lässt sich bei CYP2C19-*poor metabolizern* eine reduzierte

Aktivierung von Proguanil zu seinem aktiven Metaboliten beobachten (Ingelman-Sundberg et al. 1999). Es wird auch in der Gruppe der *poor metabolizer* noch etwas Cycloguanil gebildet, aber nicht vermittelt durch CYP2C19, sondern durch andere Zytochrom-P450-Enzyme. Etwa 3% der kaukasischen Bevölkerung sind *poor metabolizer* von Proguanil (Helsby et al. 1990). Homozygote Trägerinnen und Träger des Allels *CYP2C19*1* werden *extensive metabolizer* (EM) genannt und haben eine normale Enzymaktivität (Yoo und Lee 2011). Heterozygote Trägerinnen und Träger des Wildtyp-Allels werden als *heterozygous extensive metabolizer* (HEM) zusammengefasst und haben folglich eine Enzymaktivität, die zwischen *poor* und *extensive metabolizern* liegt (Klotz et al. 2004).

Im Jahr 2006 wurde außerdem ein weiteres Allel entdeckt, *CYP2C19*17*, das einen Einfluss auf die Expression von CYP2C19 hat (Sim et al. 2006). Einer Reihe von Studien zufolge geht es mit vermehrter Expression von CYP2C19 einher. In einer klinischen Studie zeigte sich jedoch, dass dieser Genotyp möglicherweise keine Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Proguanil hat (Pedersen et al. 2014). Dieser Zusammenhang ist aber noch nicht abschließend geklärt und kann nicht ausgeschlossen werden.

Neben CYP2C19 spielen wahrscheinlich auch CYP3A-Zytochrome (CYP3A4, CYP3A5 und CYP1A2) eine Rolle in der Aktivierung von Proguanil (Birkett et al. 1994; Coller et al. 1999). In Versuchen an menschlichen Leberzellen war für die Umwandlung von Proguanil zu Cycloguanil zu 73% CYP2C19 und zu 16% CYP3A4 verantwortlich (Goldstein 2001). Die Zytochrom-P450-Enzyme 3A4 und 3A5 machen zusammen nahezu 30% der gesamten Zytochrom-P450-Aktivität in der Leber aus (Yoo und Lee 2011). Es gibt wenig Informationen zum Metabolismus von Proguanil durch CYP3A4 (Satyanarayana et al. 2009) oder CYP3A5. Allgemein bekannt ist, dass, obwohl die enzymatische Aktivität von CYP3A4 individuell stark variiert, in diesem Enzym im Gegensatz zu CYP2C19 kaum genetische Polymorphismen mit eindeutig und reproduzierbar nachweisbarer funktioneller Bedeutung gefunden wurden (Ito 2014). Im Gegensatz dazu sind für die Aktivität von CYP3A5 Polymorphismen, die in einer fehlenden oder hohen Expression des Enzyms resultieren, bekannt (Kerb et al. 2009).

Das Allel *CYP3A4*1* entspricht dem Wildtyp von CYP3A4 mit normaler Enzymfunktion. Der Polymorphismus *CYP3A4*1B* kodiert möglicherweise für ein Enzym mit verstärkter Aktivität (Assis et al. 2013). Für die Pharmakokinetik verschiedenster Medikamente ist seine Aktivität jedoch nicht abschließend geklärt und eher fraglich (Yoo und Lee 2011). Demgegenüber steht das Allel *CYP3A4*22*, das für ein Enzym mit verminderter Aktivität

kodiert (Assis et al. 2013). Dieser Zusammenhang ist vielfach in unterschiedlichen Studien repliziert worden.

Für CYP3A5 kodieren die Genotypen *CYP3A5*1/*1* und *CYP3A5*1/*3* für ein funktionsfähiges Enzym, während die Variante *CYP3A5*3/*3* in einem Enzym mit vollständigem Aktivitätsverlust resultiert (Zaltzman et al. 2016).

Aus diesen genetischen Varianten wird ersichtlich, dass für die Untersuchung der Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Proguanil neben Polymorphismen im Membrantransport auch der Einfluss bereits bekannter Polymorphismen auf den Metabolismus des Medikamentes beachtet werden müssen.

1.5.2 Membrantransport und genetische Variation

Biomembranen von Zellen regulieren den Austausch von Wasser, Ionen, Gasen, Nährstoffen, Vitaminen, Kofaktoren und Medikamenten über Transportproteine in der Lipiddoppelschicht (César-Razquin et al. 2015). Unabhängig davon können kleine ungeladene Substanzen durch einfache Diffusion über die Zellmembran gelangen. Unter den Transportproteinen werden Kanäle und Transporter unterschieden. Einfache Diffusion wird durch Ionenkanäle vermittelt, während erleichterte Diffusion durch Transporter (Uniporter) erfolgt. Beide Prozesse ereignen sich entlang des elektrochemischen Konzentrationsgefälles (Yan 2015). Neben diesen passiven Transportprozessen kommt in der Pharmakokinetik vor allem dem aktiven Transport von Arzneimitteln eine bedeutende Rolle zu, weil dieser die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Medikamenten beeinflusst. Medikamenten-Transporter kommen in Darm, Leber und Niere vor und befördern hydrophile ebenso wie hydrophobe Arzneistoffe über Zellmembranen (Yoo und Lee 2011).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, stellen primär aktive Transporter, wie ATP-bindende Kasette-Transporter (ABC-Transporter), die Energie für ihren Antrieb aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) bereit und können Substanzen gegen den elektrochemischen Gradienten transportieren. ABC-Transporter sind polyspezifische Efflux-Transporter, sie befördern verschiedenste Substrate vom intrazellulären in den extrazellulären Raum. Sekundär aktive Transporter, wie die Familie der *solute carrier* (SLC-Transporter), nutzen den zuvor aufgebauten elektrochemischen Konzentrationsgradienten für ihre Transportprozesse (Terada und Hira 2015). Dabei kann das Substrat entweder in die gleiche (Symport) oder die entgegengesetzte Richtung (Antiport)

transportiert werden, oder die Diffusion des Substrates wird, verglichen mit der einfachen Diffusion, erleichtert (Uniport).

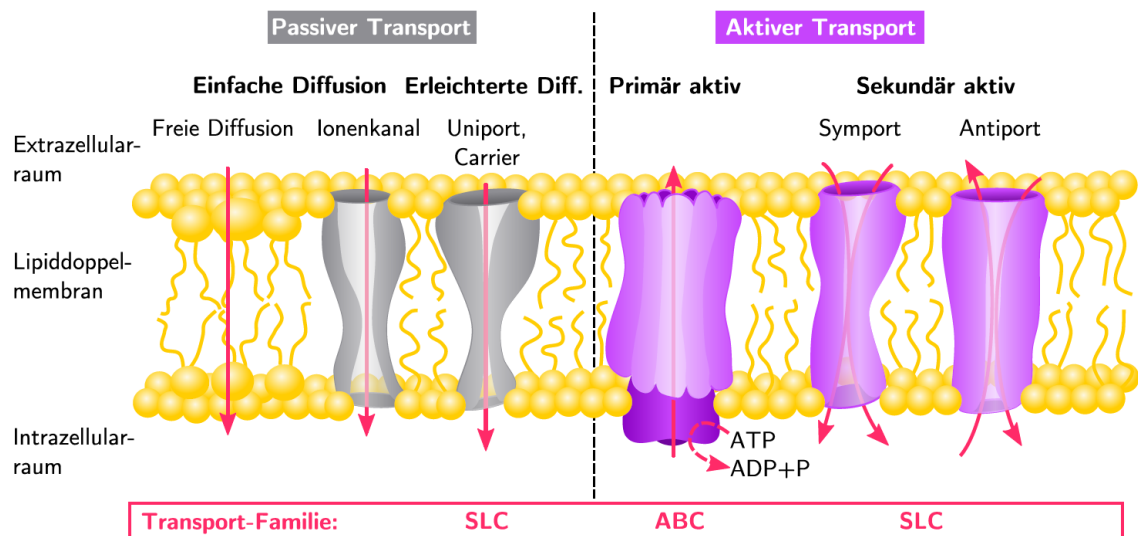


Abbildung 5. Transportprozesse an Biomembranen. Es werden aktive von passiven Transportprozessen unterschieden. Beide Vorgänge können durch Transporter der SLC-Familie vermittelt werden. Transporter der ABC-Familie stellen selbst Energie für ihre Transportprozesse bereit (primär aktiv), wodurch sie einen elektrochemischen Konzentrationsgradienten aufbauen. Dieser kann von SLC-Transportern genutzt werden (sekundär aktiv).

Zur SLC-Familie gehören wichtige polyspezifische Influx-Transporter, wie zum Beispiel das organische Anionen-transportierende Polypeptid 1B1 (OATP1B1) (Grapci et al. 2015) und der organische Kationentransporter OCT1 (Koepsell et al. 2007). Spezifische Transporter, wie beispielsweise der Glukose-Transporter GLUT1, befördern fast ausschließlich bestimmte Substrate (Yan 2015). In Tabelle 3 sind wichtige Membrantransporter mit Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln zusammengefasst.

Sowohl in der Familie der ABC-Transporter als auch innerhalb der SLC-Transporter sind klinisch relevante Polymorphismen bekannt. Beispielsweise weist das organische Anionen-transportierende Polypeptid 1B1 (OATP1B1) eine genetische Variante auf, die zu einer reduzierten Substrataufnahme in die Leber führt. Dadurch kommt es zu erhöhten Plasmakonzentrationen verabreichter Arzneimittel, wodurch starke Nebenwirkungen auftreten können. Und das *breast cancer resistance protein* (BCRP) exprimiert einen relevanten Polymorphismus, der für das Auftreten von Nebenwirkungen in der Krebstherapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren verantwortlich ist (Terada und Hira 2015).

Tabelle 3 Membrantransporter mit Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln

Membran-transporter	Exprimierende Gewebe	Beispiele für Substrate	Quelle
Polyspezifische Influx-Transporter der SLC-Familie			
OATP1B1	Leber	Methotrexat, Repaglinid, Ritonavir, Simvastatin	(Terada und Hira 2015)
OCT1	Leber, Gallenkanälchen, Darm, Niere, Milz, Magen, Lunge, Muskeln, Herz, Haut, Gehirn, Tumorzellen	Acetylcholin, Aciclovir, Desipramin, Dopamin, Epinephrin, Guanidin, Histamin, Kreatinin, L-Karnitin, Metformin, MPP ⁺ , Norepinephrin, Serotonin	(Koepsell und Endou 2003; Lozano et al. 2013)
OCT2	Gehirn, Neurone, Niere, Plazenta	Amantadin, Cholin, Cimetidin, Desipramin, Dopamin, Histamin, Memantin, MPP ⁺ , Noradrenalin, Serotonin	(Koepsell und Endou 2003)
MATE1	Leber, Niere, Skelettmuskel	Aciclovir, Cimetidin, Fexofenadin, Guanidin, Kreatinin, Metformin, Oxaliplatin, Thiamin	(Köck und Brouwer 2012)
PEPT1	Darm	Valacyclovir, Valganciclovir	(Terada und Hira 2015)
Polyspezifische Efflux-Transporter der ABC-Familie			
BCRP	Blut-Hirn-Schranke, Hoden, Darm, Leber, Niere, Plazenta	Erlotinib, Imatinib, Rosuvastatin, Sulfasalazin, Sunitinib	(Terada und Hira 2015)
MDR1 (P-Glykoprotein)	Darm, Gehirn, Hoden, Leber, Niere, Plazenta	Chinidin, Digoxin, Verapamil	(Terada und Hira 2015)
MRP4	Leber, Niere	ADP, Urat	(Terada und Hira 2015)
Substratspezifische Transporter			
GLUT1	Astroglia, Erythrozyten	Glukose	(Giorgis und Veggiotti 2013; Yan 2015)
Dopamin-Transporter	Dopaminerge Neurone	Dopamin	(Schmitt et al. 2013)

OATP1B1: organische Anionen-transportierendes Polypeptid 1B1; OCT1 und 2: organische Kationentransporter 1 und 2; MATE1: *multidrug and toxic compound extrusion 1*; PEPT1: Peptidtransporter 1; BCRP: *breast cancer resistance protein*; MDR1: *multidrug resistance protein 1*; MRP4: *multidrug resistance protein 4*; GLUT1: Glukosetransporter 1

1.5.2.1 Membrantransport organischer Kationen durch OCT1

In der Betrachtung des Membrantransports von Medikamenten müssen unter anderem Molekülgröße, Ladung und Lipophilie berücksichtigt werden. Da viele körpereigene oder körperfremde organische Verbindungen bei physiologischem pH-Wert positiv geladen und hydrophil sind, können sie nicht oder nur sehr langsam durch lipophile Lipiddoppelmembranen diffundieren. Die positive Ladung entsteht durch Anlagerung von Protonen (H^+ -Ionen) an funktionelle Gruppen. Diese Anlagerung ist einerseits vom pH-Wert der Zelle und andererseits vom pK_S -Wert abhängig (Lozano et al. 2013). Der physiologische pH-Wert in Zellen liegt bei etwa 7,0 bis 7,2 und bei 7,4 im Extrazellularraum (Amann-Vesti 2006). Durch den Einfluss auf die Ladung verschiedener funktioneller Gruppen hat er Auswirkungen auf Transportvorgänge in der Zelle. Der pK_S -Wert bezeichnet die Stärke einer Säure. Je niedriger er ist, umso stärker ist die Säure und dementsprechend schwächer die Base. Wenn für eine Lösung ihr pK_S -Wert und pH-Wert übereinstimmen, liegt die Säure jeweils zur Hälfte dissoziiert (negativ geladen) und nicht dissoziiert (ungeladen) vor (van Limburg Stirum 2008). Der pK_B -Wert bezeichnet die Stärke einer Base und kann aus dem pK_S -Wert berechnet werden. Er bezeichnet den pH-Wert, bei dem die Substanz oder funktionelle Gruppe zu 50% protoniert (positiv geladen) und zu 50% ungeladen vorliegt.

Die folgenden pK_B -Werte für Proguanil und Cycloguanil wurden mit der ADMET Predictor[®]-Software (Simulations Plus, Lancaster, USA) berechnet. Der pK_B -Wert von Proguanil liegt bei 11,8. Das heißt, dass bei einem pH-Wert von 11,8 Proguanil zu 50% positiv geladen ist und zu 50% ungeladen. Also ist Proguanil nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 zu 99,9 % positiv geladen und nur zu unter 0,1 % neutral. Allenfalls der geringe neutrale Anteil von Proguanil könnte also bei physiologischem pH-Wert durch einfache Diffusion die Membran überqueren. Da dieser Anteil sehr gering ist, kann hier davon ausgegangen werden, dass einfache Diffusion von Proguanil über die Membran keine große Rolle spielt und sein Transport in die Zelle durch einen Transporter realisiert werden muss. Der wirksame Hauptmetabolit von Proguanil, Cycloguanil hat einen pK_B -Wert von 8,4. Damit ist es etwas weniger basisch als Proguanil, aber bei physiologischem pH-Wert immer noch zu 91% positiv geladen. Das würde bedeuten, dass auch der Transport von Cycloguanil durch einen Transporter realisiert werden muss.

Etwa 40% aller Medikamente liegen bei physiologischem pH-Wert als Kationen, also positiv geladen, vor und werden über Transporter, wie beispielsweise OCT1, in die Leber

aufgenommen (Ahlin et al. 2008). Neben organischen Kationen kann OCT1 auch einige ungeladene Stoffe und Anionen transportieren (Koepsell und Endou 2003).

Ein bekanntes Substrat von OCT1 ist das Antidiabetikum Metformin, das Strukturähnlichkeiten zu dem heute überholten Medikament Debrisoquin besitzt, welches ebenfalls ein Substrat von OCT1 ist. Debrisoquin besitzt einen Guanidin-Rest, der protoniert werden kann. Sein pK_B -Wert beträgt 11,95, weshalb Debrisoquin vergleichbar mit Proguanil bei physiologischem pH-Wert als positiv geladene schwache Base vorliegt (Saadatmand et al. 2012). Hier zeigen sich Ähnlichkeiten zu Metformin, einem hydrophilen organischen Kation mit einem pK_B -Wert von 12,4 und damit einer schwachen Base (Tzvetkov et al. 2009). Metformin gehört wie Proguanil zu den Biguaniden. Biguanide besitzen zwei Guanidine als funktionelle Gruppe, die durch ein gemeinsames Stickstoffatom verbunden sind (Bridges et al. 2014).

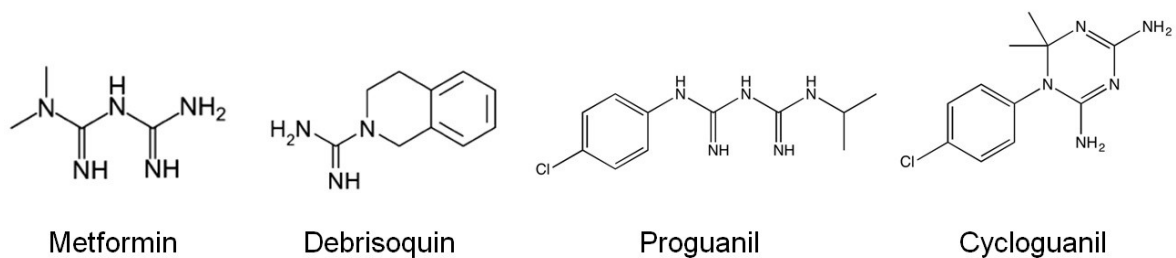


Abbildung 6. Strukturformeln der vier OCT1-Substrate im Vergleich. Die Strukturformeln von Metformin und Debrisoquin entstammen dem Paper Saadatmand et al. 2012. Die Strukturformeln von Proguanil und Cycloguanil wurden mit Hilfe der Software ChemDraw Professional® Version 15.1.0 (PerkinElmer, Rodgau) erstellt. Metformin und Proguanil sind Biguanide, Debrisoquin besitzt einen Guanidin-Rest.

Für Proguanil ist nicht geklärt, wie es in die Leber oder generell in Zellen aufgenommen wird. Da es sich wie bei Metformin um ein hydrophiles basisches Biguanid handelt, ist es naheliegend, dass OCT1 seine Aufnahme in die Leber vermittelt. Untersuchungen aus dem Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen an Zellen zeigten, dass bei OCT1-Expression Proguanil viel schneller in die Zellen aufgenommen wurde als ohne OCT1-Expression (Tadjerpisheh 2016).

Ein weiterer wichtiger Punkt zu der Frage, wie Medikamente in Zellen aufgenommen werden, ist deren Lipophilie. Die Lipophilie oder Fettlöslichkeit kann im Labor als Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient beschrieben werden. Da diese Verteilung sehr niedrige oder sehr hohe Werte annehmen kann, wird das Verhältnis oft als dekadischer Logarithmus (log) ausgedrückt. Dabei unterscheidet man zwischen dem Log P-Wert, der für nicht ionisierbare Substanzen gilt und dem Log D-Wert, der für ionisierbare

Substanzen gilt und vom pH-Wert abhängig ist. Je höher der Log P-Wert ist, umso lipophiler ist eine Substanz:

$$\log P = \log \frac{C_{Octanol}}{C_{Wasser}}$$

Dem dekadischen Logarithmus folgend entspricht einem Log P-Wert von 1 ein Verhältnis von 10:1 in Octanol zu Wasser. Einem Log P-Wert von 2 entspräche also ein Verhältnis von 100:1. Log P- und Log D-Wert können experimentell bestimmt oder, wie hier geschehen, mittels Molekülsimulation berechnet werden (ADMET Predictor[®]-Software, Simulations Plus, Lancaster, USA). Der berechnete Log P-Wert von Proguanil liegt bei 1,81 und der berechnete Log P-Wert von Cycloguanil bei 1,03. Damit wäre der Metabolit Cycloguanil offenbar hydrophiler und noch weniger membrangängig als die Muttersubstanz Proguanil. Und im Vergleich zu bekanntermaßen lipophilen basischen Psychopharmaka, wie zum Beispiel Amitriptylin mit einem Log P-Wert von 4,92 (Drugbank 2016), sind Proguanil und Cycloguanil damit eher hydrophil.

Aufgrund der Annahme, dass geladene hydrophile Moleküle Zellmembranen nur schwer durch Diffusion überqueren können und Proguanil ein hydrophiles basisches Kation ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Transport von Proguanil in Zellen durch einen Transporter vermittelt sein muss. Durch seine strukturellen Ähnlichkeiten mit dem Biguanid Metformin und mit Debrisoquin, zwei Substraten von OCT1, kann angenommen werden, dass Proguanil über OCT1 in die Zellen aufgenommen wird. Dies wurde aktuell in Zellversuchen bestätigt (Matthaei et al. 2018).

1.6 Der organische Kationentransporter OCT1

Die *solute carrier* (SLC-Transporter) werden nach den für sie codierenden Genen in zwei Gruppen eingeteilt. Einerseits die SLCO-Superfamilie, zu denen die organische Anionentransportierenden Polypeptide (OATPs) zählen und andererseits die SLC22A-Superfamilie, zu der die organischen Kationentransporter (OCTs) und organischen Anionentransporter (OATs) gehören (Roth et al. 2012). Beispiele für Transporter dieser Familien sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die SLC22-Superfamilie zählt zu den 18 Transporter-Familien, die zur *major-facilitator*-Superfamilie (MFS) gehören (Koepsell et al. 2007). Der organische Kationentransporter OCT1 war der erste Transporter der SLC22-Familie, der 1994 entdeckt wurde (Koepsell und Endou 2003). Es handelt sich um einen polyspezifischen Transporter, das heißt er bindet Substrate verschiedener Größen und Molekularstrukturen. Wie OCT2 und OCT3 kann er organische Kationen in beide Richtungen transportieren.

Dieser Transport findet unabhängig von Natrium oder Protonengradienten statt. Polyspezifische Kationentransporter wie OCT1 nehmen Einfluss auf wichtige Prozesse in der Pharmakokinetik von Arzneimitteln, indem sie die Absorption von Arzneistoffen im Magen-Darm-Trakt und ihre hepatische und renale Elimination beeinflussen (Koepsell et al. 2007).

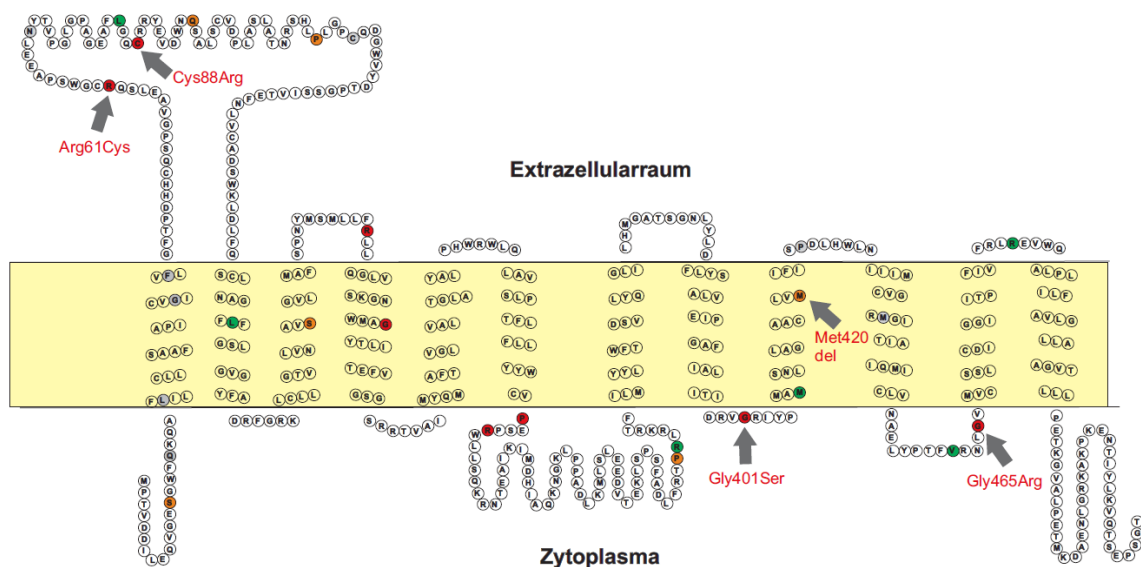


Abbildung 7. Struktur des OCT1-Transporters in der Zellmembran. Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015. Markiert sind die fünf Lokalisationen der Mutationen der in dieser klinischen Studie vorkommenden Allel-Varianten.

OCT 1 besitzt die typische Struktur eines Transporters der SLC22-Familie: Er besteht aus zwölf alpha-helikalen Transmembran-Domänen (TMD), mit intrazellulär gelegenem C- und N-Terminus, einer großen glykosylierten extrazellulären Schleife zwischen TMD eins und zwei sowie einer großen intrazellulären Schleife zwischen TMD sechs und sieben, die phosphoryliert werden kann (Lozano et al. 2013).

Das *SLC22A1*-Gen kodiert für den organischen Kationentransporter OCT1, der hauptsächlich in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten exprimiert wird. Durch seine Aufnahme von Arzneimitteln aus dem Blut in die Leberzellen ist er für die hepatische Elimination vieler Medikamente verantwortlich (Koepsell und Endou 2003). Neben der Expression in der Leber kommt OCT1 auch in vielen anderen Geweben, beispielsweise in Darm, Lungen, Nieren, Skelettmuskeln oder in Epithelzellen und Tumorzellen vor. Typische Substrate von OCT1 sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Transportleistung von OCT1 kann durch zahlreiche Moleküle inhibiert werden (Koepsell et al. 2007).

Dadurch kann die hepatische Elimination von lebertoxischen Arzneimitteln vermindert sein.

Auch die Expression von OCT1 ist regulierbar. Zum Beispiel kann die Transportleistung von OCT1 durch die Proteinkinase C stimuliert werden, wobei gleichzeitig eine Veränderung der Substratspezifität des Transporters auftritt (Koepsell und Endou 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass neben den Transkriptionsfaktoren USF und HNF4 die Transkription von OCT1 auch durch den Transkriptionsfaktor HNF1 beeinflusst wird, was zu seiner starken Expression vor allem in der Leber beiträgt (O'Brien et al. 2013). Zudem können auch pathologische Vorgänge im Organismus die Expression von OCT1 beeinflussen. Bei Cholestase zeigte sich beispielsweise eine verminderte Expression des Transporters (Koepsell et al. 2007).

1.6.1 Genetische Polymorphismen in *OCT1*

Neben genetischer Variation in der Expression von OCT1, kommt auch Polymorphismen eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung der Aktivität des Transporters zu. Etwa 8% der kaukasischen Bevölkerung weisen durch *loss-of-function*-Mutationen keine OCT1-Aktivität auf und circa 40% sind heterozygot, besitzen also ein nicht funktionierendes Allel, was in einer reduzierten Transportfunktion resultiert (Seitz et al. 2015). Bekannt ist, dass OCT1 innerhalb der zur SLC22-Familie gehörenden Transportproteine eine hohe genetische Variabilität aufweist. Dazu gehört auch eine große inter-ethnische Variabilität, da zum Beispiel eine verminderte Transportfunktion in der asiatischen Bevölkerung wesentlich seltener beobachtet werden konnte als in der kaukasischen Bevölkerung (Seitz et al. 2015).

Seitz und Kollegen publizierten 2015 das Ergebnis einer populationsgenetischen Analyse, die Daten von 2.171 Individuen aus 67 Populationen umfasste. Ziel war es, mit Hilfe des *next generation sequencing* die weltweite Verteilung genetischer Polymorphismen mit Verlust der OCT1-Aktivität zu untersuchen. Insgesamt wurden 85 Varianten gefunden, wovon 44 in kodierenden Regionen des *OCT1*-Gens auftraten und 29 durch den Austausch von Aminosäuren hervorgerufen wurden. Bei 14 Varianten hatte der Austausch von Aminosäuren einen gewissen Einfluss auf die Aktivität des OCT1-Transporters, die für 10 bekannte Substrate gemessen wurde. Die Überexpression des Wildtyps *OCT1*1* resultierte in einer erhöhten Transportfunktion, was auch bei den *gain-of-function*-Allelen *OCT1*8* und *OCT1*9* beobachtet werden konnte. Gleichzeitig wurde eine Reihe von *loss-of-*

function-Allelen mit verminderter Transportaktivität identifiziert: *OCT1**2 bis *7 und *OCT1**10 bis *15 (Seitz et al. 2015).

Die in der dieser Dissertation zugrunde liegenden klinischen Studie eingeschlossenen Aminosäurevarianten mit resultierendem Aktivitätsverlust sind in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 4 In der klinischen Studie eingeschlossene *OCT1*-Polymorphismen

Aminosäureaustausch	Haplotyp	Aktivität in HEK293-Zellen
Met420del	*2	Substratabhängig erheblich reduzierte Aktivität
Arg61Cys	*3	Erheblich reduzierte Aktivität für alle Substrate
Gly401Ser	*4	
Met420del und Gly465Arg	*5	Komplett fehlende Aktivität für alle Substrate
Met420del und Cys88Arg	*6	

* beschreibt die nummerierten varianten Allele des *OCT1*-Genotyps. Quelle: Seitz et al. 2015

Die Häufigkeit der in der Studie eingeschlossenen Allele in der deutschen Bevölkerung ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 5 Häufigkeit der in der Studie eingeschlossenen *OCT1*-Allele in Deutschland

Allel	Häufigkeit in Deutschland
*1	71,4 %
*2	15,8 %
*3	8,12 %
*4	2,14 %
*5	2,56%
*6	0%

* beschreibt die nummerierten varianten Allele des *OCT1*-Genotyps. Quelle: Seitz et al. 2015

Innerhalb dieser klinischen Studie zu Proguanil nahmen keine Probandinnen oder Probanden mit den Allelen *OCT1**5 oder *6 teil. Diese Genvarianten sind in Deutschland sehr selten, sodass keine Personen mit diesen Genvarianten für die Studie gefunden wurden.

Für die OCT1-Aktivität lassen sich drei Transporttypen festlegen. Der Genotyp H_1/H_1 mit zwei aktiven Allelen wird *extensive transporter* genannt. Der Genotyp H_1/H_x mit einem inaktiven Allel kodiert für den Phänotyp eines *intermediate transporters* und der Genotyp H_x/H_x mit zwei inaktiven Allelen entspricht dem Phänotyp eines *poor transporters* (Tzvetkov et al. 2016).

Bezogen auf die Verteilung der Häufigkeit des Verlustes der OCT1-Aktivität stellten Seitz und Kollegen fest, dass innerhalb von Europa kaum Unterschiede auftraten. 53% der Europäer besitzen zwei, 38% ein und 8% kein aktives *OCT1*-Allel. Weltweit hingegen variierte die Häufigkeit stark. Die Bevölkerung in Japan und Ozeanien besitzt generell zwei aktive *OCT1*-Allele, was auch für die Mehrheit der chinesischen Bevölkerung zutrifft, wohingegen beispielsweise die Surui-Indianer in Südamerika hauptsächlich zwei inaktive *OCT1*-Allele besitzen. Das Wissen über diese Unterschiede in der Aktivität von OCT1 zwischen verschiedenen Populationen könnte genutzt werden, um Unterschiede in der Pharmakokinetik und Wirksamkeit von Medikamenten zu erklären (Seitz et al. 2015).

Die Verhältnisse sind allerdings dadurch kompliziert, dass ein weltweit häufiges Allel, *OCT1**2, nur für einige Substrate zu fast fehlender Aktivität führt, während andere Medikamente nicht betroffen sind. Damit kommt es zu den in der folgenden Tabelle dargestellten Häufigkeitsverteilungen der Allele und Genotypen:

Tabelle 6 Häufigkeiten homo- und heterozygoter *OCT1*-Genotypen verschiedener Bevölkerungsgruppen

Bevölkerungsgruppe	Häufigkeiten homozygoter Genotypen			Häufigkeiten heterozygoter Genotypen		
	2 aktive Allele	2x *2	2 inaktive Allele	aktive Allele/ *2	aktive/ inaktive Allele	inaktive Allele/ *2
Europäer	55,4%	2,4%	0,94%	23,1%	14,4%	3,0%
Asiaten*	96,2%	0%	0%	1,4%	0%	0%
Afrikaner**	83,2%	0,26%	0%	9,3%	0%	0%

*Ostasien und Ozeanien, **südlich der Sahara

In dieser Tabelle wurden nicht alle Allele und Genotypen berücksichtigt. Aktive Allele bezeichnen die Varianten *1, *8 und *9. Inaktive Allele fassen sowohl die weitgehend inaktiven Allele *3 und *4 als auch die inaktiven Allele *5 und *6 zusammen. Die Häufigkeiten wurden auf Grundlage von Daten aus der Publikation Seitz et al. 2015 berechnet.

1.7 Aufgabenstellung

Proguanil kann als eher hydrophiles organisches Kation nur schlecht durch passive Diffusion in die Hepatozyten gelangen. Aus Strukturvergleichen und in Zellexperimenten ergab sich die Hypothese, dass Proguanil ebenso wie sein aktiver Metabolit Cycloguanil Substrate des organischen Kationentransporters OCT1 sein könnten.

Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, im Rahmen einer klinischen Arzneimittelstudie an gesunden Probandinnen und Probanden zu untersuchen, wie sich genetische Polymorphismen in *OCT1* auf die Pharmakokinetik von Proguanil und seinem Metaboliten Cycloguanil *in vivo* auswirken. Es sollte geprüft werden, ob genetische Variationen in diesem Transporter Einfluss auf die Blut- und Plasmakonzentration von Proguanil und Cycloguanil nehmen, und die Unterschiede in der Pharmakokinetik, einschließlich der Verteilung zwischen Gesamtblut, Butplasma und Erythrozyten, sollten dargestellt werden.

In dieser Analyse sollte auch die bereits bekannte Bedeutung der Polymorphismen in den Enzymen CYP2C19, CYP3A4 und CYP3A5, welche Proguanil in der Leber zu Cycloguanil aktivieren, mit berücksichtigt werden. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob im weiteren Zusammenhang eine Erklärung für das Auftreten von Nebenwirkungen oder Arzneimittel-Wechselwirkungen gefunden werden kann. Schließlich sollten die Untersuchungen auch als Grundlage für eventuelle weitere Studien zu der Frage dienen, welche Bedeutung die *OCT1*-Genvarianten für die Wirksamkeit von Proguanil und die Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Malaria-Medikament haben.

2 Studiendesign, Probandinnen und Probanden sowie Methoden der Bioanalytik und Datenauswertung

2.1 Design und Endpunkte der klinischen Studie

Bei der klinischen Studie mit dem Titel „*Effekte genetischer Polymorphismen im organischen Kationentransporter OCT1 auf zellulären Einwärts-Transport und Metabolismus von Antidepressiva und anderen Medikamenten aus der Gruppe der organischen Kationen*“ handelt es sich um eine nicht-randomisierte und nicht verblindete monozentrische pharmakokinetische Studie. Im Rahmen dieser Studie wurden auch fünf weitere Substanzen, die wie Proguanil über den organischen Kationentransporter OCT1 aufgenommen werden, verabreicht: Amitriptylin, Desvenlafaxin, Sumatriptan, Fenoterol und Thiamin. Der Abstand der Studienphasen betrug 14 Tage. In dieser Arbeit werden nur die von mir ausgewerteten Ergebnisse zu Proguanil und dessen aktivem Metaboliten Cycloguanil dargestellt.

In der Studie wurde primär die Pharmakokinetik, sekundär auch Nebenwirkungen in Relation zum *OCT1*-Genotyp untersucht. Hauptaugenmerk lag auf der Ermittlung der Konzentrations-Zeit-Verläufe von Proguanil und dessen Metaboliten Cycloguanil in Blut und Plasma. Zu diesem Zweck wurde den Probandinnen und Probanden am Studientag zu definierten Zeitpunkten Blut entnommen. Aus der in der pharmakokinetischen Analyse berechneten Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve oder *area under the curve* (AUC), ließ sich die systemische Exposition der Probandinnen und Probanden gegenüber der Testsubstanz und ihrem primär aktiven Metaboliten darstellen. Ziel war es, zu untersuchen, wie die AUCs *OCT1*-Genotyp-abhängig variieren. Neben den AUCs wurden auch andere pharmakokinetische Kenngrößen wie maximale Konzentration und deren Zeitpunkt, terminale Halbwertszeit, *mean resistance time*, totale *Clearance* und zentrales Verteilungsvolumen berechnet und nach *OCT1*-Aktivität dargestellt. Mittels statistischer Testung wurden signifikante genotypabhängige Unterschiede innerhalb der Parameter untersucht. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden mit Hilfe visueller Analogskalen und dem Erfragen unerwünschter Ereignisse (*adverse events*) erfasst.

Den Probandinnen und Probanden war während der Studienteilnahme ihr *OCT1*-Genotyp nicht bekannt. Eine Verblindung bezüglich der Medikamenteneinnahme fand nicht statt. Die Auswahl der Teilnehmerinnen und Teilnehmer erfolgte aus der Probandendatenbank

des Instituts für Klinische Pharmakologie, sodass auch von den selteneren Genvarianten eine ausreichende Anzahl eingeschlossen werden konnte.

2.1.1 Probandendatenbank und Auswahl der Probandinnen und Probanden

In die Studie wurden 20 weibliche und 19 männliche gesunde Teilnehmer eingeschlossen, die aus der Probandendatenbank des Instituts für Klinische Pharmakologie rekrutiert wurden. Die Probandendatenbank wurde seit längerer Zeit geführt und erfasst alle Personen, die grundsätzlich Interesse an der Teilnahme an klinischen Studien haben. Für die Aufnahme in die Datenbank füllten die Interessentinnen und Interessenten einen Fragebogen mit Angaben zu Herkunft, Lebensgewohnheiten, Medikamenteneinnahmen und zu ihrer Gesundheit aus. Weiterhin wurden sie durch einen Studienarzt in einem Probandendatenbank-Vorgespräch über Zweck der Datenbank, Datenschutz sowie Freiwilligkeit der Teilnahme und die Möglichkeit, mit entsprechender Löschung der Daten auszuscheiden, aufgeklärt. Nach gegebener Möglichkeit, Fragen zu stellen und ausreichender Zeit zur Entscheidungsfindung wurden den Interessentinnen und Interessenten zwei 2,7-ml-EDTA-Monovetten (S-Monovette[®], Firma Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die abgenommenen Blutproben wurden pseudonymisiert, um für die genetische Typisierung weiter verwendet zu werden.

2.1.1.1 Voruntersuchung der Probanden (Screening)

Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer, welche die Einschlusskriterien erfüllten, mussten durch einen Studienarzt in einem Vorgespräch über Inhalte und Ziele der Studie, über die praktische Durchführung, mögliche Risiken und Belastungen, über Aspekte des Datenschutzes sowie über die Versicherungsbedingungen und das Recht, jederzeit die Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen zu beenden, aufgeklärt werden. Weiterhin wurden die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer ausführlich über alle unerwünschten Wirkungen des Prüfpräparates, die in der Fachinformation genannt werden, informiert. Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer hatten die Möglichkeit, Fragen zu stellen und erhielten ausreichend Bedenkzeit von mindestens einem Tag zwischen Aufklärungsgespräch und mündlicher sowie schriftlicher Einwilligung zur Studie (*informed consent*). Anschließend erfolgte eine Gesundheits-Voruntersuchung (Screening).

Das Screening umfasste

- die Erhebung von Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und Abstammung sowie Kontrolle der Identität

- die Erfassung von Ernährungs- und Lebensgewohnheiten
- die Erfragung regelmäßiger Medikamenteneinnahmen und Dokumentation der Einnahme hormoneller Kontrazeptiva im Arzneimittel-Bogen
- die Frage nach im Zeitraum der Studie geplanter oder bestehender Schwangerschaft oder Stillzeit
- die Erhebung der Krankengeschichte und eine vereinfachte internistische körperliche medizinische Untersuchung mit orientierender neurologischer Untersuchung
- die Messung von Herzfrequenz und Blutdruck sowie Ableitung eines 12-Kanal-EKGs in Ruhe und die Messung der Körpertemperatur
- eine venöse Blutentnahme zur Bestimmung der Werte für Hämatologie und Klinische Chemie. Die hämatologischen Untersuchungen umfassten Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl und -indices, Leukozyten- und Thrombozytenzahl. Die klinisch-chemischen Untersuchungen umfassten die Serumkonzentrationen von Natrium und Kalium, Gesamt-Bilirubin, Kreatinin, CRP und TSH sowie die Enzymaktivitäten der AST und ALT. Ferner wurden in diesem Rahmen zwei 4,9-ml-EDTA-Monovetten (S-Monovette[®], Firma Sarstedt, Nümbrecht) zur studienspezifischen Nachgenotypisierung und Bestätigung des korrekten Probandeneinschlusses abgenommen
- eine Mittelstrahl-Urinprobe zur Urinanalyse mit Schwangerschafts- und Drogentest für Amphetamine und verwandte Substanzen, Benzodiazepine, Kokain, Metamphetamine und verwandte Substanzen, Opioide und Cannabis sowie ein Urinsticks mit Kontrolle von Leukozytenzahl, Nitrit, Urobilinogen, Protein, pH-Wert, Erythrozyten/Hämoglobin, spezifischem Gewicht, Ketonen, Bilirubin und Glucose
- einen Atemalkoholtest
- die Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien

Alle Untersuchungen wurden vom Studienpersonal der Probandenstation durchgeführt, wohingegen die Blutproben im Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen analysiert wurden. Das Screening fand innerhalb von sechs Wochen vor dem Beginn der Studie statt und musste bei längerem Zurückliegen wiederholt werden (Re-Screening). Falls ein Re-Screening erforderlich war, wurden Anamnese, körperliche Untersuchung, 12-Kanal-EKG, Blutentnahme für Hämatologie und Klinische Chemie und Urinsticks wiederholt sowie die Veränderung von Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Es mussten alle Einschlusskriterien erfüllt sein und keines der Ausschlusskriterien durfte zutreffen.

Tabelle 7 Einschlusskriterien der klinischen Studie

Einschlusskriterien
Einverständniserklärung zur Studienteilnahme (<i>informed consent</i>)
Einschluss beider Geschlechter und der typischen potentiell relevanten <i>OCT1</i> Genotyp-Gruppen in vergleichbarer Zahl (soweit möglich)
Gesunde Erwachsene im Alter zwischen 18 und 50 Jahren
Körpergewicht über 48 kg und BMI (Body Mass Index) nicht unter 17 kg/m ² oder nicht über 32 kg/m ²
Bereitschaft, sich an Studienanweisungen zu halten und mit dem Studienpersonal zu kooperieren
Keine relevanten Pathologien in der Voruntersuchung (Screening) (Da Laborwerte oft gering von den Normwerten abweichen, konnten geringe Abweichungen toleriert werden, wenn sie von einem der Prüfer als medizinisch irrelevant eingestuft wurden)
Im Screening gemessener systolischer Blutdruck zwischen 100 mmHg und 140 mmHg, diastolischer Blutdruck zwischen 60 mmHg und 90 mmHg, sowie Herzfrequenz zwischen 50 bpm und 90 bpm
Einschluss weiblicher Probanden nur bei sexueller Abstinenz oder Verwendung verlässlicher Verhütungsmethoden

Die Dokumentation und Kontrolle der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte im Screening-Fragebogen des *Case Report Form* (CRF). Leichte Abweichungen, zum Beispiel grenzwertige Vitalparameter, waren zulässig, falls diese vom Studienarzt als nicht relevant beurteilt wurden. Wenn sich während des Studienverlaufs ein Ausschlusskriterium ergab, wurde die Probandin oder der Proband von der Studie ausgeschlossen.

Tabelle 8 Ausschlusskriterien der klinischen Studie

Ausschlusskriterien
Fehlende Bereitschaft oder Unvermögen, das Einverständnis zu erteilen
Personen, die zugleich Mitarbeiterin/Mitarbeiter der Probandenstation oder des Instituts für Klinische Pharmakologie waren
Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den 30 Tagen vor der ersten Medikamentengabe
Blut-, Plasma- oder Thrombozytenspende in den letzten 15 Tagen vor der ersten Medikamentengabe und während der Studie

Geplante Operation in den letzten 14 Tagen vor bis 14 Tagen nach Medikamentenapplikation

Bekannte Schwangerschaft oder Stillzeit

Pathologische Auffälligkeiten im Screening einschließlich signifikanter Abweichungen der Laborparameter, soweit diese nicht als irrelevant eingeschätzt wurden

QTcF-Zeit > 450 ms im Screening-EKG

Leber- oder Nierenkrankheiten oder Verminderung der Leber- oder Nierenfunktion

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Mittlere bis schwere und eine medikamentöse Therapie erfordernde Hypertension

Dauerhafte Medikamenteneinnahme erforderndes Asthma bronchiale (Stadium 2 bis 4)

Diabetes mellitus, Hyperthyreodismus, Hypothyreodismus

Glaukom

Symptomatische Prostatahyperplasie

Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenabusus in der Vorgeschichte oder positives Drogenscreening

Vorbekannte psychiatrische oder neurologische Funktionsstörung, bei zweifelhafter Depression Probandenausschluss oder Vorstellung beim Psychiater zur Klärung

Eine wesentliche, mit der Pharmakokinetik der Studienmedikamente interferierende, gastrointestinale Erkrankung oder gastrointestinale Funktionsstörung

Eine die Pharmakokinetik der Studienmedikamente beeinflussende gastrointestinale Operation (außer Appendektomie oder Herniotomie)

Medikamenteneinnahme innerhalb der 7 Tage vor oder während der Studie mit den folgenden Ausnahmen: Hormonelle Kontrazeptiva, Paracetamol 12 Stunden vor oder 48 Stunden nach Applikation der Testsubstanz, in Einzelfällen Erlaubnis anderer Medikamente, falls diese nötig für Sicherheit und Wohlergehen der Probanden werden und wenn Interaktionen mit den Studienmedikamenten als irrelevant beurteilt werden

Andere, die Sicherheit der Teilnehmer oder Qualität der Studien-Ergebnisse beeinflussende, Befunde

Bekannte Hypersensitivität oder allergische Reaktion auf eines der Studienmedikamente

In der Vergangenheit durchgemachte schwere Hypersensitivitätsreaktionen und Anaphylaxie

Andere, vom Prüfarzt als medizinisch relevant beurteilte Erkrankungen

Körpertemperatur > 37,5 °C vor Medikamentenapplikation

Bekannte Infektion mit HIV, Hepatitis B (HbsAg) oder Hepatitis C (es erfolgte keine Labordiagnostik diese Erkrankungen betreffend)

Unvermögen oder Widerwille, die Aufnahme von Alkohol 48h vor bis 72h nach Arzneimittelgabe zu unterlassen

Schwangerschaft (positiver Schwangerschaftstest vor Medikamentengabe)

2.1.2 Ablauf der Untersuchungen zu Proguanil

Es nahmen 39 Probandinnen und Probanden an dem Studientag zu Proguanil teil. Dieser umfasste den eigentlichen Studientag und einen Folgetag, an dem die Teilnehmerinnen und Teilnehmer jeweils morgens und abends kurz auf der Probandenstation erschienen.

Zu Beginn des Studientages fand erneut eine kurze Gesundheitsuntersuchung mit Identitätskontrolle, Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien, Atemalkoholtest, Urinsticks sowie Urinschwangerschafts- und Urindrogentest, Frage nach Begleitmedikation, Ausgabe eines Ernährungsfragebogens und eine körperliche Untersuchung mit Erhebung der Vitalzeichen statt. Einmalig vor und zu definierten Zeitpunkten nach der Medikamentengabe wurden im Verlauf des Studientages und am Folgetag zu festgelegten Zeitpunkten (Tabelle 9) Blutproben zur Konzentrationsmessung entnommen sowie Blutdruck und Herzfrequenz gemessen. Weiterhin wurden denkbare unerwünschte Ereignisse (*adverse events*) mittels visueller Analogskalen und offener Fragen nach Nebenwirkungen erfasst. Für die Zeitpunkte gab es festgelegte Zeitfenster, welche eingehalten werden mussten. Abweichungen wurden als Protokollabweichungen im CRF dokumentiert.

Tabelle 9 Ablauf der Untersuchungen zu Proguanil

Proguanil																		
	Studientag 2*														Studientag 3*			
Zeitpunkt im Bezug zur Proguanil-Dosierung	-60 bis 0 min	0	30 min	60 min	90 min	2 h (120 min)	3 h (180 min)	3 h 30 min	4 h (240 min)	5 h	6 h (360 min)	7 h	8 h (480 min)	9 h	10 h (600 min)	23 h 30 min	24 h (1440 min)	36 h (2160 min)
Blutentnahme	X		X	X		X	X		X		X		X		X		X	X
Blutdruck																		
Herzfrequenz	X				X			X		X		X		X		X		
VAS-Bögen																		
Kurze Gesundheitsuntersuchung	X															X		X
Adverse event-Monitoring	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Zeitfenster	± 10 min				± 25 min										± 1 h 30 min			

*Die Nummerierung der Studientage bezieht sich auf die gesamte Studie (insgesamt 12 Studientage)

2.1.3 Appliziertes Arzneimittel (Prüfpräparat)

Das Malariamedikament Proguanil (Warenname Paludrine[®] von AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) wurde über die Krankenhaus-Apotheke der Universitätsmedizin Göttingen ohne Modifikation geliefert und auf der Probandenstation in einem abschließbaren Kühlschranks bei etwa 9 °C nur dem Studienpersonal zugänglich aufbewahrt.

Am Studientag wurden zwei Tabletten zu je 100 mg Proguanil *per os* mit 200 ml Wasser unzerkaut verabreicht. Eine Verblindung fand nicht statt. Die applizierte Dosis, welche einer gängigen Tagesdosis von Proguanil entspricht, wurde im *Dispensing Log* und *Inventory Log* des *Trial Master File* (TMF) notiert.

2.1.4 Interventionen

2.1.4.1 Blutentnahmen

Die venösen Blutentnahmen für die Pharmakokinetik-Proben erfolgten am Studientag über eine Venenverweilkanüle und am Folgetag mittels Flügelkanüle. Insgesamt wurden am Studientag zu Proguanil 128,7 ml Blut abgenommen. Vor Medikamentengabe wurde zunächst ein Leerwert abgenommen. Danach erfolgten Blutentnahmen zu den in Tabelle 9 gezeigten Zeitpunkten. Diese Zeitpunkte waren vor Studienbeginn, basierend auf bekannten Daten zur Pharmakokinetik von Proguanil, festgelegt worden. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine 9-ml-EDTA-Monovette (S-Monovette[®], Firma Sarstedt, Nümbrecht) für die Plasmaprobe sowie eine 2,7-ml-EDTA-Monovette für die Blutprobe abgenommen. Die 9-ml-EDTA-Monovette wurde 10 Minuten bei 4 000 U/min und 22 °C in einer Laborzentrifuge (Firma Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Danach wurden je 2,0 ml des Plasmas in drei Kryo-Röhrchen (Firma Greiner, Frickenhausen) überführt und bei unter -20 °C in Kryoboxen gelagert eingefroren. Von dem Blut des 2,7-ml-EDTA-Röhrchens wurde je 1,0 ml in drei andere Greiner-Röhrchen überführt und bei gleicher Temperatur tiefgefroren. Erfolgte das Einfrieren der Proben später als eine halbe Stunde nach Blutentnahme, wurde dies als Protokollabweichung vermerkt.

2.1.4.2 Visuelle Analogskalen und Stanford Sleepiness Scale

Zur Erfassung der Arzneimittel-Nebenwirkungen wurde den Probandinnen und Probanden am Studientag zu verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 9) visuelle Analogskalen (VAS-Fragebögen) ausgeteilt. Hierbei wurden folgende Parameter erfasst: Mundtrockenheit, Müdigkeit, Sehvermögen, innere Unruhe, Kopfschmerzen, Schwindel, Schweregefühl,

Übelkeit, Kälte, Ohrensausen, Herzklopfen und Zittern. Die Probandinnen und Probanden kreuzten auf einem Balken von 0 cm bis 15,4 cm an, wie stark sie diese Empfindungen wahrnahmen. Darüber hinaus aufgetretene Ereignisse oder durch die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer verbalisierte Vorkommnisse wurden zusätzlich als unerwünschtes Ereignis (*adverse event*) erfasst. Die Erfassung der Schläfrigkeit erfolgte mit Hilfe der Stanford Sleepiness Scale.

2.1.4.3 Ernährungsfragebogen

Zur besseren Beurteilung der pharmakokinetischen Ergebnisse bezüglich potentieller Einflüsse der Ernährung wurde von den Probandinnen und Probanden während des Screenings und am Proguanil-Studientag ein Ernährungsfragebogen ausgefüllt. Hierbei wurde der Ernährungsfragebogen genutzt, der im Rahmen der MONICA KORA Populations-Kohortenstudie verwendet wurde (Winkler und Döring 1998). Aus 38 Nahrungsmitteln und Getränken gaben die Teilnehmerinnen und Teilnehmer an, welche davon sie in den letzten 8 Wochen hauptsächlich zu sich genommen hatten. In diesem Fragebogen wurden außerdem auch Angaben zum Rauchen gemacht.

2.1.4.4 EKG und Vitalparameter

Zur Sicherheit der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer erfolgte während des Screenings die Ableitung und Auswertung eines Ruhe-12-Kanal-EKGs. So konnten Herzrhythmus und -frequenz, Lagetyp, Leitungszeiten, Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung beurteilt werden. Nur gesunde Probandinnen und Probanden wurden eingeschlossen. Gleiches galt für Blutdruck und Herzfrequenz in der Voruntersuchung. An dem Studientag wurden vor den Blutentnahmen Blutdruck und Herzfrequenz mit einem Monitoring-System (Firma WelchAllyn, Hechingen) gemessen und dokumentiert.

2.1.5 Risiken der Interventionen

Relevante Risiken während der Studienteilnahme bezogen sich vor allem auf Medikamenten-Nebenwirkungen und Risiken der Blutentnahmen. Deshalb wurden die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer einerseits über alle für Paludrine® bekannten Nebenwirkungen laut Fachinformation aufgeklärt und andererseits über die typischen Risiken einer Blutentnahme informiert. Diese umfassen zum Beispiel die Entstehung von

Blutergüssen, selten die Entzündung oberflächlicher Venen und extrem selten schwere Infektionen oder die Verletzung von Nerven, die Lähmungen zur Folge haben können.

2.1.6 Überwachung der Probandinnen und Probanden

Die Studientage wurden von Prüfarzten, Studienassistentinnen und -assistenten sowie einer *study nurse* durchgeführt. Die Sicherheit der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer war zu jeder Zeit durch Monitoring, Notfallkoffer und Nähe zur Notaufnahme der Universitätsklinik Göttingen mit Rufbereitschaft der Notfallmedizin gewährleistet. An den Studientagen erfolgte eine kontinuierliche Überwachung der Probandinnen und Probanden über das Monitoring-System und das Studienpersonal war zwischen den Untersuchungen über eine Notrufanlage alarmierbar.

2.1.7 Ernährungsvorschriften und andere Verhaltensregeln

Um einerseits die Sicherheit der Probandinnen und Probanden zu gewährleisten und andererseits keine Verfälschung der Pharmakokinetik-Ergebnisse zu riskieren, waren die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer angehalten, sich an einige Ernährungs- und Verhaltensvorschriften zu halten, die in folgender Tabelle dargestellt sind:

Tabelle 10 Ernährungsvorschriften und Verhaltensregeln

Zeitraum	Ernährungsvorschrift und Verhaltensregel
Generell	Keine Einnahme von Medikamenten, einschließlich Johanniskraut und anderer pflanzlicher Arzneimittel sowie frei verkäuflicher Medikamente, Tryptophan oder hoch dosierter Vitamine oder Nahrungsergänzungstoffe ohne vorherige Rücksprache mit dem Studienarzt
	Keine Drogeneinnahme
	Keine Durchführung von Diätmaßnahmen zur Gewichtsreduktion
	Keine veränderte oder vermehrte sportliche Aktivität als üblich
Eine Woche vor bis 48 h nach Arzneimittelgabe	Kein Trinken von Grapefruitsaft oder Essen von Grapefruit und keine Aufnahme chininhaltiger Getränke
48 h vor bis 72 h nach Arzneimittelgabe, sowie 24 h vor dem Screening	Kein Trinken von Alkohol
Ab 24 h vor Arzneimittelgabe	Kein Kaffee, schwarzer Tee, Cola, Kakao oder Schokolade
24 h vor bis 60 h nach Arzneimittelgabe	Keine Aufnahme Tyramin-haltiger Lebensmittel

24 h vor bis 48 h nach Arzneimittelgabe und 24 h vor und nach ärztlichen Untersuchungen der Studie	Keine sportlichen Aktivitäten mit erhöhter Verletzungsgefahr
10 h vor bis 4 h nach Arzneimittelgabe	Keine Aufnahme von Nahrungsmitteln (außer Wasser)
Am Studientag bis 48 h nach der letzten Arzneimittelgabe	Kein Führen von Kraftfahrzeugen oder Bedienen von Maschinen

Am Studientag wurde vier Stunden nach Medikamentengabe ein Tyramin-freies Mittagessen serviert. Bis dahin blieben die Probanden bis auf das Trinken von Wasser nüchtern. Nach dem Mittagessen war der Verzehr eines Tyramin-freien Imbisses erlaubt.

2.1.8 Dokumentation der Probanden- und Studiendaten

Das Screening, die Ergebnisse der Untersuchungen der Studientage sowie alle auftretenden unerwünschten Ereignisse (*adverse events*) und unerwünschten Wirkungen (*adverse reactions*), die eventuellen Begleitmedikationen, das *Investigational Medicinal Product* (IMP)-Protokoll und Chargenlog des Prüfpräparates sowie alle Protokollabweichungen wurden in *Case Report Forms* (CRF) dokumentiert. Für jede Probandin und jeden Probanden wurde ein CRF mit den Dokumenten seiner Studienphasen angelegt. Im *Trial Master File* (TMF) wurden alle relevanten Dokumente für Organisation und Durchführung der Studie aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte konform der Richtlinien für gute klinische Praxis oder *Good Clinical Practice* (GCP) und wurde durch regelmäßiges Monitoring der *Case Report Forms* und des *Trial Master Files* überwacht.

Nach den Richtlinien der European Medicines Agency handelte es sich bei *adverse events* (AE) um unerwünschte Ereignisse wie Symptome oder Erkrankungen, die den Probandinnen und Probanden nach der Arzneimittelgabe wiederfuhren, auch wenn sie nicht im kausalen Zusammenhang mit dem Prüfpräparat standen (Note for guidance on Good Clinical Practice 2002). Alle *adverse events* wurden unter Angabe von Start- und Endzeitpunkt, Art und Schweregrad des Ereignisses sowie Kausalzusammenhang mit der Prüfmedikation erfasst. Auch nötige Interventionen oder Arzneimittelgaben wurden notiert. Es wurden auch *adverse events* erfasst, die im Zeitraum zwischen dem Screening und dem ersten Studientag oder zwischen den Studientagen auftraten.

Serious adverse events (SAE) umfassen laut European Medicines Agency lebensbedrohliche oder tödliche Umstände, Situationen, die einen Krankenhausaufenthalt erfordern oder bleibende Behinderungen hervorrufen. Sie müssen, unabhängig von ihrem

Zusammenhang mit der Prüfmedikation, an den Sponsor gemeldet werden, der sich verpflichtet, die Ethikkommission sowie das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zu informieren (Note for guidance on Good Clinical Practice 2002). In dieser Studie traten keine *serious adverse events* auf.

2.1.9 Studienabbruch

Den Probandinnen und Probanden war es jederzeit möglich, ohne Angabe von Gründen, die Studienteilnahme zu beenden. Gründe für einen Studienabbruch seitens der Untersucher wären das Auftreten von *serious adverse events*, *non-compliance* der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer, inkorrektur Einschluss in die Studie oder Entwicklung von Ausschlusskriterien gewesen. Der Studientag zu Proguanil wurde von keiner Probandin oder keinem Probanden abgebrochen.

2.1.10 Ethische und rechtliche Aspekte

Die Studie mit der Antragsnummer 18/8/12 wurde am 16.10.2012 durch die Ethikkommission zustimmend bewertet. Unter der Vorlagennummer 4038436 erteilte am 25.10.2012 das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) die Genehmigung zur Studiendurchführung. Die Meldung an die Landesbehörde erfolgte am 12.11.2012. Die Studie wurde in den Datenbanken für klinische Studien European Clinical Trials Database (EudraCT-Nr. 2012-003546-33) und ClinicalTrials.gov (NCT02054299) registriert.

2.1.11 Versicherung

Alle Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer waren gemäß dem deutschen Arzneimittelgesetz bei der ECCLESIA mildenberger HOSPITAL GmbH, Klingenbergstraße 4, 32758 Detmold unter der Anmelde­nummer 852/2012-Gö1 versichert.

2.1.12 Datenschutz

Die Probandinnen und Probanden willigten in die pseudonymisierte Speicherung erhobener Daten elektronisch und auf Papier ein und erteilten die Erlaubnis zur Auswertung und Veröffentlichung sowie zur Überprüfung dieser Daten durch Drittinstanzen. Zur Pseudonymisierung erhielt jede Teilnehmerin und jeder Teilnehmer einen Studiencode unter dem im *Case Report Form* (CRF) und in der Datenbank die gesammelten Daten gespeichert wurden. Eine Zuordnung des Codes zu den Teilnehmern

war nur dem Studienpersonal möglich. Ergebnisse der Pharmakogenetik wurden getrennt gelagert. Ebenso wurden Blut- oder Plasmaproben nur unter dem Studiencode versandt.

2.2 Bioanalytische Methoden

2.2.1 Genotypisierung der funktionell relevanten Polymorphismen in *OCT1*

Von den jeweils zwei 2,7-ml-EDTA-Monovetten mit peripher venösem Blut, die den Interessentinnen und Interessenten vor Studienteilnahme abgenommen worden waren, wurde eine Monovette zur Bestimmung der *OCT1*-Genotypen in das Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen gebracht. Dort erfolgte die Genotypisierung durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors unter Einhaltung der *Standard Operating Procedures* (SOPs) wie folgt:

Nach Inkubation der Proben bei 37 °C wurde zunächst die DNA mit dem BioRobot EZ1 (Firma Qiagen, Hilden) mit Hilfe von *magnetic beads* automatisch aus den Proben extrahiert. Hierzu band die DNA an die mit Siliziumdioxid beschichteten Magnetpartikel unter Anwesenheit eines chaotropischen Salzes, das die DNA-Wasser-Interaktion reduzierte, sodass sich die DNA umso mehr an die Partikel band. Ein Magnet zog dann die magnetischen Partikel, an welche die DNA haftete, an und separierte so die DNA vom restlichen Lysat. Abschließend wurde die DNA eluiert und gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Vervielfältigung von drei Regionen des *OCT1*-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mit Hilfe des Multiplex PCR Kit[®] (Firma Qiagen, Hilden). Außerdem wurde auch eine Amelogenin (*AMEL*)-Region zur Geschlechtsbestimmung amplifiziert. Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden pro Region zwei *Primer*, welche die Startpunkte für die DNA-Polymerase darstellen, verwendet. Das Enzym DNA-Polymerase dient der Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte.

Folgende Reaktion lief im PCR-Thermocycler PTC-200 (Firma Bio-Rad, München) ab: Zunächst erfolgte bei 95 °C (15 min) die initiale Denaturierung, also Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen. Danach liefen 35 Zyklen zur Vervielfältigung der DNA-Einzelstränge wie folgt ab: Auf eine erneute kurze Denaturierung bei 94 °C (30 sec) folgte die Anlagerung der *Primer* an die Einzelstränge bei 65 °C (1 min 30 sec). Dann vervollständigte die DNA-Polymerase den fehlenden komplementären Strang der beiden Einzelstränge bei 72 °C (1 min). Der

Vorgang wurde mit der finalen Verlängerung, die ebenfalls bei 72 °C (10 min) stattfand, beendet. Abschließend wurde das PCR-Produkt mit SAP (Shrimp alkalischer Phosphatase) und ExoI (Exonuklease 1) aufgereinigt und auf 2% Agarose-Gel kontrolliert unter den Aspekten, dass einerseits ein Amplikon entstanden ist und andererseits nicht Amplikons falscher Länge entstanden sind.

Danach erfolgte die Genotypisierung der Polymorphismen in *OCT1* mittels *Primer-Extension-Methodik* unter Verwendung des SNaPshot-Kits[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt). Das Prinzip beruhte auf einer PCR mit Einzel-Basen-Verlängerung. Dazu band ein *Primer* an eine Sequenz, die mit dem 3'-Ende genau eine Base neben dem zu untersuchenden Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) endete bzw. sich anlagerte. An den *Primer* wurde dann komplementär zu der untersuchenden DNA eine farbmarkierte Base von der zugegebenen DNA-Polymerase eingebaut. Für das Prinzip ist wichtig, dass fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotid-Triphosphate angebaut werden. Somit kann über die eine Base hinaus keine weitere Verlängerung erfolgen. Es können vier fluoreszenzmarkierte Basen genutzt werden, um alle vier möglichen Basen zu untersuchen. Durch Nutzung von *Primern* verschiedener Längen können mit einer Reaktionsmischung bis zu zehn Einzel-Nukleotid-Polymorphismen untersucht werden. In der anschließenden Kapillarelektrophorese wurden die *Primer* nach ihrer Länge und dem Molekulargewicht der Farbmarkierungen aufgetrennt. Die in der Elektrophorese getrennten *Peaks* entsprachen den verschiedenen zu untersuchenden Einzel-Nukleotid-Polymorphismen.

Mit dieser Methode konnten sechs Aminosäure-Polymorphismen analysiert werden, die teils in Kombinationen die zehn weltweit häufigsten *OCT1*-Allele mit erheblich reduzierter oder komplett fehlender Funktion ausmachen. Auch das Geschlecht wurde ergänzend aus einem genetischen Marker analysiert, um zu verifizieren, dass es nicht zu Probenverwechslungen gekommen ist. Folgende fünf Aminosäuresubstitutionen bzw. Aminosäuredeletion repräsentierten die Genotypen, die in der klinischen Studie eingeschlossen waren: Met₄₂₀del (*OCT1**2), Arg₆₁Cys (*OCT1**3), Gly₄₀₁Ser (*OCT1**4), Met₄₂₀del und Gly₄₆₅Arg (*OCT1**5), sowie Met₄₂₀del und Cys₈₈Arg (*OCT1**6). Die Methode wurde in einer vorausgegangenen Publikation detailliert beschrieben (Seitz et al. 2015).

Die SNaPshot[®]-*Primer*-Mischung enthielt sechs Polymorphismus-spezifische *Primer* verschiedener Länge, welche der Auftrennung der Einzelnukleotid-Polymorphismen in der

nachfolgenden Kapillarelektrophorese dienten. In der PCR der SNaPshot[®]-Reaktion erfolgte zunächst die initiale Denaturierung bei 96 °C (2 min), gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96 °C (10 sec), Anlagerung bei 50 °C (5 sec) und Verlängerung bei 60 °C (30 sec). Vor der Kapillarelektrophorese wurde das Reaktionsprodukt mit Fast-AP (wärmeempfindlicher alkalischer Phosphatase) aufgereinigt.

Für die Kalibrierung der Kapillarelektrophorese wurde der Molekulargewichtsmarker GeneScan-120LIZ[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Nachdem die aufgereinigten Reaktionsprodukte für fünf Minuten bei 95 °C in einem PCR-Cycler erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt worden waren, konnte die Reaktion mittels Kapillarelektrophorese in dem Sequenzer 3130xl-GeneticAnalyzer[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert werden. Aufgrund der sich unterscheidenden Retentionszeit und Farbe der Signale in der Elektrophorese erfolgte die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Varianten mit Hilfe der Gene Mapper v3.7 Software[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt). Die OCT1-Allele ergaben sich aus der Kombination der Insertions-Deletions-Variante und der Einzelnukleotid-Polymorphismen.

2.2.2 Messung der Plasmakonzentrationen von Proguanil und Cycloguanil

Die Analyse erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Zunächst wurden die Plasmaproben aufgetaut und durch Proteinfällung vorbereitet, da Proteine zur Verstopfung der HPLC-Säule führen würden. Dazu wurden 100 µl Plasma in einem Eppendorf Tube[®] (Firma Eppendorf, Hamburg) mit 200 µl Fällungsreagenz (90% Acetonitril und 10% Methanol) versetzt und gemischt. Als interner Standard wurde das an sechs Atomen deuterierte Proguanil, Proguanil-d6-HCl (Toronto Research Chemicals, C329503) für Proguanil und O-Desmethylvenlafaxin-d6 (Cerillinat, V-027_1ml) für Cycloguanil, verwendet. Nachdem die Proben gut gemischt wurden, erfolgte die 15-minütige Zentrifugation mit 1800 U/min (VXR Vibrax[®], IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen) und anschließende 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Danach wurden 50 µl Überstand in eine 96-well-Platte überführt und bei 40 °C unter einem leichten Stickstoff-Strom in einem Heizblock (96-well Techne[®] Dri Block 3A[®], Firma Techne, Jahnsdorf) bis zur Trockenheit eingedampft. Die Rückstände wurden in 100 µl

0,1% Ameisensäure (Nr. 264, Firma Merck, Darmstadt) gelöst und in HPLC-*Vials* mit Mikroeinsätzen überführt.

Zur chromatografischen Auftrennung und Konzentrationsbestimmung wurde die HPLC-Anlage *Series 200* (Firma PerkinElmer, Rodgau) mit dem als Detektor fungierenden Tandem-Massenspektrometer *Autosampler API 4000* (Firma AB Sciex, Darmstadt) verwendet. Für die Kalibrierung wurde Proguanil HCL (Sigma-Aldrich, München) und Cycloguanil (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) benutzt.

Es erfolgte zunächst die Auftrennung der Analyten Proguanil, Proguanil-d₆, Cycloguanil und O-Desmethylvenlafaxin-d₆ mittels Flüssigkeitschromatographie über eine Phenomenex C18-Octadecylsilan-Vorsäule (4 x 2 mm Innendurchmesser und -länge, Phenomenex, Aschaffenburg) und die HPLC-Säule *Brownlee SPP* (4,6 x 100 mm Innendurchmesser und Innenlänge, 2,7 µm Partikelgröße, PerkinElmer, Rodgau). Das Fließmittel bestand aus 0,1% (v/v) Ameisensäure, 17,14% (v/v) Acetonitril und 2,86% (v/v) Methanol. Es wurde von zwei Pumpen gepumpt, sodass für die jeweilige Trennung passende Lösungsgemische schnell eingestellt werden konnten. Zur Chromatographie wurden jeweils 10 µl injiziert. Eingestellt wurde ein Flussgeschwindigkeits-Gradient von 300 bis 700 µl/min, um die Gesamt-Analysezeit zu reduzieren und auch für die spät eluierenden Substanzen relativ scharfe Signale zu bekommen.

Anschließend erfolgte im Massenspektrometer die Messung der Analyten. Dabei wurden im Massenspektrometer Moleküle durch Hitze in ihren gasförmigen Zustand gebracht und durch Elektronenbeschuss ionisiert, um anschließend nach ihrer Masse und Ladung im Magnetfeld aufgetrennt zu werden. Dabei wurden Moleküle in Abhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis vom Magneten abgelenkt und am Ende ihres Weges detektiert. In der hier eingesetzten Tandem-Massenspektrometrie wurden zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet, um die Selektivität zu erhöhen. Im ersten Magneten wurden die noch intakten Moleküle getrennt, im zweiten Magneten dann ihre Fragmentationen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Analyst[®] Classic Software* (Firma AB Sciex, Darmstadt). Proguanil, Proguanil-d₆, O-Desmethylvenlafaxin-d₆ und Cycloguanil konnten chromatografisch voneinander getrennt werden, wobei die Identifizierung und Integration der Peaks in den Chromatogrammen manuell überprüft wurde.

2.2.3 Messung der Blutkonzentrationen von Proguanil und Cycloguanil

Die Bestimmung der Konzentrationen von Proguanil und Cycloguanil im Blut erfolgte auf die gleiche Weise wie die vorausgehend beschriebene Konzentrationsbestimmung beider Substanzen im Plasma. Die beiden Abweichungen bestanden darin, dass nach der 15-minütigen Zentrifugation der gemischten Proben bei 1.800 U/min und Raumtemperatur, die Blutproben für 20 Stunden bei 8°C zur Inkubation gelagert wurden, um am Folgetag bei 16.500 g für 30 Minuten zentrifugiert zu werden. Anschließend wurden 50 µl Überstand mit 450 µl 0,1% (v/v) Ameisensäure gemischt und jeweils 10 µl in das LC-MS/MS-System injiziert.

2.2.4 Zytochrom-P450-Enzym-Polymorphismen

Die Genotypisierung der *Zytochrom-P450-2C19 (CYP2C19)*-Polymorphismen erfolgte mittels eines so genannten *real-time*-PCR-Verfahrens unter Nutzung des Prinzips der Fluoreszenz-Löschung. Hierfür wurde das allelspezifische TaqMan[®] *SNP Analysis* Verfahren (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) genutzt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine spezielle Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die es ermöglicht, gezielt die Menge eines bestimmten vervielfachten DNA-Produktes nachzuweisen, indem ein Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der jeweiligen DNA-Sequenz emittiert wird. Für CYP2C19 sollten die beiden Allele *CYP2C19*2* und *CYP2C19*17* nachgewiesen werden. Es wurde je eine Analyse pro Allel durchgeführt. Die TaqMan[®] Sonde bestand aus einem kurzen DNA-Stück mit einem Reporterfarbstoff und einem *Quencher*, der dessen Signal unterdrückte. Während der PCR baute das Enzym DNA-Polymerase die TaqMan[®]-Sonde ab, wodurch *Quencher* und Reporterfarbstoff voneinander getrennt wurden und der Fluoreszenz-Farbstoff sein Signal aussenden konnte. Der Abbau konnte effizient nur bei vollständiger Basenkomplementarität der TaqMan-Sonde zu der jeweils zu untersuchenden DNA erfolgen, sodass nur dann der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff VIC und/oder FAM freigesetzt wurde und fluoreszierte, wenn die entsprechende Allelkonfiguration vorlag.

Damit konnte jeweils für beide Allele getrennt ihr Vorhandensein nachgewiesen werden. Zur Auswertung wurde die Software SDS Version 2.4 genutzt. Für die Genotypisierung der Variante *CYP2C19*2* wurde ein kommerzieller Assay mit der ID C_1329163_10 (Applied Biosystems) und den Farbstoffen VIC und FAM nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die Variante *CYP2C19*17* wurde ein Assay mit der ID C_469857_10 (Applied Biosystems) benutzt.

Die Varianten in *CYP3A4* und *CYP3A5* wurden wiederum wie schon bei der *OCT1*-Genotypisierung mittels *Primer*-Extension-Methodik unter Verwendung des SNaPshot-Kits[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) genotypisiert. Dazu erfolgte zunächst die Vervielfältigung von zwei Regionen des *CYP3A4*-Gens und einer Region des *CYP3A5*-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe der speziellen Reagenzmischung im Multiplex PCR Kit[®] (Firma Qiagen, Hilden). Für die PCR wurden pro Region zwei *Primer*, welche die Startpunkte für die DNA-Polymerase darstellen, verwendet.

Folgende Reaktion lief im PCR-Thermocycler PTC-200 (Firma Bio-Rad, München) ab: Zunächst erfolgte bei 95 °C (15 min) die initiale Denaturierung. Danach liefen 35 Zyklen zur Vervielfältigung der DNA-Einzelstränge wie folgt ab: Auf eine erneute kurze Denaturierung bei 94 °C (30 sec) folgte die Anlagerung der *Primer* an die Einzelstränge bei 58,4 °C (1 min 30 sec). Dann vervollständigte die DNA-Polymerase den fehlenden komplementären Strang der beiden Einzelstränge bei 72 °C (2 min). Der Vorgang wurde mit der finalen Verlängerung, die ebenfalls bei 72 °C (10 min) stattfand, beendet. Abschließend wurde das PCR-Produkt mit SAP und ExoI aufgereinigt und auf 2% Agarose-Gel kontrolliert.

Mittels Einzel-Basen-*Primer*-Verlängerung konnten die Allele *CYP3A4*22*, *CYP3A4*1B* und *CYP3A5*3* analysiert werden. Hierzu wurde für die PCR der SNaPshot[®]-Reaktion drei *Primer* verwendet. Es erfolgte zunächst die initiale Denaturierung bei 96 °C (2 min), gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96 °C (10 sec), Anlagerung bei 50 °C (5 sec) und Verlängerung bei 60 °C (30 sec). Das PCR-Produkt wurde mit Fast-AP im Thermocycler bei 37,0 °C aufgereinigt.

Für die Sequenzierung der Polymorphismen wurde der Molekulargewichtsmarker GeneScan-120LIZ[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Nachdem der Sequenzierungsmix für fünf Minuten bei 95 °C in einem PCR-Cycler erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt worden war, konnte die Reaktion mittels Kapillarelektrophorese in dem Sequenzer 3130xl-GeneticAnalyzer[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert werden. Aufgrund der sich unterscheidenden Retentionszeit und Farbe der Signale in der Elektrophorese erfolgte die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Varianten mit Hilfe der Gene Mapper v3.7 Software[®] (Firma Applied Biosystems, Darmstadt). Die beobachteten Allel-Häufigkeiten wurden zur Plausibilitätskontrolle für die Richtigkeit der Häufigkeit der Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz analysiert und auf Anwendbarkeit auf größere Populationen geprüft.

2.3 Pharmakokinetische und statistische Datenauswertung

2.3.1 Pharmakokinetische Analysen

Nach der oralen Gabe eines Arzneimittels löst es sich im Magen oder im oberen Dünndarm auf und wird im Dünndarm resorbiert. Im weiteren Verlauf geht das Medikament dann in der Regel über die Pfortader in die Leber und verteilt sich über den systemischen Blutkreislauf im Körper, um schließlich über die Leber und/oder die Nieren eliminiert zu werden. Die überwiegende Mehrzahl der Medikamente wird vor Elimination im menschlichen Körper metabolisiert. Um Resorption, Verteilung und Elimination mit wenigen Zahlen zu beschreiben, werden Kenngrößen (pharmakokinetische Parameter) verwendet. Zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter können entweder pharmakokinetische Modellanalysen (meist sogenannte Kompartiment-Modelle) oder rein empirische Verfahren ohne Annahme von Kompartiment-Modellen (Nichtparametrische Analysen) verwendet werden. Die Kompartiment-Analyse nimmt an, dass sich ein Medikament in einem oder mehreren Kompartimenten des Körpers verteilt, bevor es eliminiert wird.

In der vorliegenden Studie haben wir uns auf die robusteren nichtparametrischen Verfahren beschränkt und insbesondere die *area under the curve* (AUC) von Proguanil und Cycloguanil als Hauptzielgrößen definiert und analysiert. Die AUC eines Medikamentes spiegelt die sogenannte systemische Exposition der Probandinnen und Probanden gegenüber diesen Substanzen wider und ist damit eine zentrale Größe, die über Wirkungen und Nebenwirkungen bestimmt. Da die pharmakokinetische Berechnung der AUC im Mittelpunkt stand, wurde die Nicht-Kompartiment-Analyse oder *non-compartmental analysis* (NCA) als bevorzugte Methode durchgeführt, da sie weniger hypothetische Annahmen als die Kompartiment-Analyse benötigt (Gabrielsson und Weiner 2013). Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe des Programmes Phoenix WinNonlin[®] Version 6.4.

Die wesentlichen Parameter, die bei der nicht-kompartimentellen pharmakokinetischen Analyse ermittelt wurden, werden in der Tabelle auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Tabelle 11 Parameter der pharmakokinetischen Nicht-Kompartiment-Analyse

Parameter	Abkürzung	Definition/Berechnungsverfahren
Maximale Blut- oder Plasmakonzentration	C_{\max}	Der nach Medikamentenapplikation gemessene höchste Konzentrations-Wert in Blut oder Plasma ohne weitere Berechnung
Zeitpunkt von C_{\max}	t_{\max}	Der Zeitpunkt, an dem C_{\max} erreicht wurde
Letzte Blut- oder Plasmakonzentration	C_{last}	Letzte noch messbare Konzentration in Blut oder Plasma
Eliminationskonstante	Lambda_z	Rate, mit der der letzte Teil der Konzentrations-Zeit-Kurve abfällt (in einer Kinetik 1. Ordnung), berechnet durch lineare Regression der logarithmierten Konzentration über der Zeitachse
Terminale Halbwertszeit	$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	Konzentrationsabfall der letzten, in logarithmischer Darstellung auf einer Geraden liegenden, Blut- oder Plasmakonzentrationen; aus der Steigung der Geraden der logarithmierten Konzentrationen bestimmt: $t_{1/2 \text{ Lambda } z} = \frac{\ln(2)}{\text{Lambda}_z}$
Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve)	$\text{AUC}_{0-\text{inf}}$	Die nach der linearen Trapezregel berechnete Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) mit Extrapolation nach unendlich (<i>infinity</i>): $\text{AUC}_{0-\text{inf}} = \text{AUC}_{\text{last}} + \frac{C_{\text{last}}}{\text{Lambda}_z}$
AUMC		Fläche unter dem ersten Moment der Konzentrations-Zeit-Kurve (auf eine genauere mathematische Herleitung wird hier verzichtet)
Mean resistance time	MRT	Zeit, die ein Medikamentenmolekül im Mittel im Körper verbleibt: $\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}}$
Totale Clearance	Cl/F	<i>Clearance</i> in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit (F): $\text{Cl}/F = \frac{\text{Dosis}}{\text{AUC}_{0-\text{inf}}}$
Zentrales Verteilungsvolumen	V_z/F	Verteilungsvolumen der terminalen Endphase der Elimination in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit berechnet als: $V_z/F = \frac{\text{Dosis}}{\text{Lambda}_z \times \text{AUC}_{0-\text{inf}}}$

Die Parameter $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$, C_{\max} , MRT und V_z/F definieren die Verteilung eines Arzneimittels, während $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ und Cl/F ihre Elimination beschreiben.

Zur Ermittlung dieser Parameter wurden zunächst die Konzentrations-Zeit-Verläufe dargestellt. Aus der Fläche unter den Konzentrations-Zeit-Kurve von Zeitpunkt Null bis zum Zeitpunkt der letzten messbaren Arzneimittelkonzentration (C_{last}) konnte dann die

area und the curve_{last} (AUC_{last}) berechnet werden. Um darzustellen, wie der Verlauf nach der letzten messbaren Arzneimittelkonzentration ist, wurde sie nach der linearen Trapezregel basierend auf dem logarithmischen Abfall am Ende nach unendlich extrapoliert (AUC_{0-inf}). Die lineare Trapezregel über- oder unterschätzt die AUCs wenn die Blutentnahme-Intervalle zu weit auseinanderliegen. Dies war in der vorliegenden Studie nicht der Fall. Die AUC_{last} berechnet sich wie folgt:

$$AUC_{last} = \sum_{i=1}^n \frac{C_i + C_{i+1}}{2} \times \Delta t (t_{i+1} - t_i)$$

Dabei ist C_i die Plasmakonzentration zu ihrem Zeitpunkt t_i und C_{i+1} die folgende Plasmakonzentration zu ihrem Zeitpunkt t_{i+1} (Gabrielsson und Weiner 2013). Die Berechnung der AUC_{0-inf} mit Hilfe der AUC_{last} ist in Tabelle 11 gezeigt. Der Wert der AUC_{0-inf} liegt insbesondere darin, dass sie alle Einzelmessungen sinnvoll zusammenfasst und sich aus ihr die totale *Clearance* berechnen lässt.

Weiterhin wurde aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen eine lineare Regression der logarithmierten Konzentration über der linearen Zeitachse durchgeführt, um die Steigung λ_z zu ermitteln. λ_z beschreibt dabei in einer Kinetik 1. Ordnung die Rate, mit der der letzte Teil der Konzentrationskurve abfällt und wird deshalb auch Eliminationskonstante genannt. Der Zusammenhang von λ_z und terminaler Halbwertszeit ist in Tabelle 11 dargestellt. Für die weiteren Berechnungen der Pharmakokinetik-Parameter wurden für die Extrapolationen der sehr geringen Konzentrationen jeweils nach dem letzten Messwert die nach Regressionsanalyse prognostizierten (*predicted*) Werte der letzten Konzentration (C_{last}) zugrunde gelegt. Das restliche Dreieck dahinter wurde dann aus der letzten extrapolierten Konzentration und der Steigung λ_z berechnet (Gabrielsson und Weiner 2013).

Eine Größe der Verteilung eines Arzneimittels im Körper ist die *mean resistance time* (MRT). Sie entspricht der Zeit, für die ein Medikamentenmolekül im Mittel im Körper verbleibt. Die zur Berechnung der MRT benötigte AUMC ist die Fläche unter dem ersten Moment der Konzentrations-Zeit-Kurve. Diese lässt sich grafisch darstellen, indem man auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Zeit multipliziert mit der jeweiligen Konzentration darstellt.

Die totale *Clearance* als wichtiger Eliminations-Parameter, kann bei ausschließlich oraler Dosierung nur in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit bestimmt werden. Dieser Zusammenhang wird durch Cl/F symbolisiert. Sie wird aus der Dosis dividiert durch die

$AUC_{0-\infty}$ berechnet. Die totale *Clearance* fasst sowohl die renale *Clearance* als auch die extrarenale *Clearance* zusammen und auch alle eventuellen weiteren Eliminationswege, wobei unter der extrarenalen *Clearance* der hepatische *Clearance* die größte Bedeutung zukommt. Außerdem hat die totale *Clearance* ähnlich wie die AUC für die allermeisten Substanzen einen linearen Zusammenhang zur Dosis.

Auch das zentrale Verteilungsvolumen ist bei oraler Dosierung nur in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit bestimmbar. Es handelt sich um das Verteilungsvolumen der terminalen Endphase der Elimination, das bei einer Bioverfügbarkeit von 50% doppelt so groß wie bei einer Bioverfügbarkeit von 100% ist.

2.3.2 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel[®] 2010, IBM SPSS[®] Version 24.0 und Systat SigmaPlot[®] Version 12.0. Zunächst wurden deskriptive Analysen der Daten vorgenommen. Zentrale Tendenzen der Stichprobe wurden durch Mittelwert und Median beschrieben, während die Variabilität mit Hilfe der Standardabweichung (parametrische Statistik) oder auch der Bereiche (nichtparametrische Statistik) angegeben wurde. Weil die Daten nicht normalverteilt waren, wurden vorrangig die nicht-parametrischen Verfahren genutzt, allerdings wurden, wie in der internationalen Literatur üblich, für einige wichtige Größen auch die parametrischen statistischen Kenngrößen verwendet.

Zur Untersuchung der Signifikanz und Zusammenhänge wurde der Jonkheere-Terpstra-Test angewandt. Dieser Test untersucht ebenso wie der auch in der Auswertung genutzte Kruskal-Wallis-Test, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben im Bezug auf eine Variable unterscheiden. Der Kruskal-Wallis-Test unterscheidet sich darin, dass er die verschiedenen Stichproben gegeneinander testet. Außerdem basiert er wie der Mann-Whitney-U-Test auf rangskalierten Daten, hat diesem Test gegenüber aber den Vorteil, dass mehr als zwei Gruppen verglichen werden können.

Mangels alternativer nicht-parametrischer Verfahren wurden zur Untersuchung der Abhängigkeit unserer primären Zielgrößen auch die univariaten Varianzanalysen bzw. multiplen linearen Regressionsanalysen durchgeführt, obwohl grundsätzlich bekannt war, dass diese Verfahren eine Normalverteilung der Stichprobe voraussetzen. Der multiplen linearen Regressionsanalyse liegt die einfache lineare Regressionsanalyse zugrunde, welche eine abhängige Variable durch eine unabhängige Variable erklärt. Dabei wird der

stochastische Zusammenhang dieser Variablen durch eine lineare Beziehung (Regressionsgerade) beschrieben, die sich durch die übliche Geradengleichung darstellen lässt:

$$y = a + b \cdot x$$

y steht für das Kriterium (abhängige Variable), das durch den Prädiktor x (unabhängige Variable) erklärt werden soll. Y-Achsenabschnitt (a) und Steigung der Geraden (b) sind die Regressions-Koeffizienten, aus denen die Gleichung für eine Regressionsgerade bestimmt werden kann, welche eine Verteilung von Werten am besten beschreibt. Um die Steigung der Regressionsgeraden, die besonders relevant ist, zu definieren, wird der Korrelationskoeffizient verwendet. Dieser berücksichtigt die Varianz und Kovarianz des Prädiktors. Damit wird die Steigung der Regressionsgeraden direkt proportional zur Korrelation.

In der multiplen linearen Regression kann der Einfluss von mehr als einem Prädiktor auf das Kriterium berücksichtigt werden. Die Geradengleichung wird dann um mehrere Terme erweitert (z.B. $y = a + b \cdot x + c \cdot y + d \cdot z$). Der Steigungs-Koeffizient der Regressionsgeraden des jeweiligen Prädiktors beinhaltet dessen Einfluss auf das Kriterium und wird auch als partieller Regressions-Koeffizient bezeichnet (Bortz und Schuster 2010). R und R-Quadrat sind Gütemaße einer linearen Regression. R beschreibt die gemeinsame Korrelation zwischen Prädiktoren und dem Kriterium. R-Quadrat (R^2) definiert den Anteil der Varianz der abhängigen Variablen, der durch die unabhängigen Variablen erklärt werden kann, und liegt zwischen 0 und 1. Liegt R-Quadrat nahe 1, besteht ein linearer Zusammenhang. Der partielle Korrelationskoeffizient ist in einer multiplen linearen Regressionsanalyse ein Maß für die Korrelation von zwei Variablen, wenn die dritte Variable ausgeschaltet wird.

Im Rahmen der univariaten Varianzanalyse oder *analysis of variance* (ANOVA), wurde der Einfluss mehrere unabhängiger Variablen (multiple Varianzanalyse) auf eine einzige Zielvariable untersucht (deshalb univariat). Im Vergleich zum T-Test erlaubt die Varianzanalyse den Vergleich von mehr als zwei Gruppen.

Bei der Auswertung der demografischen Daten wurde eine Variante des Chi-Quadrat-Tests, der Anpassungstest, angewandt, um die Stichprobe daraufhin zu untersuchen, ob ein Merkmal auf eine bestimmte Art verteilt ist.

Der Signifikanzwert (p-Wert) beschreibt in der Statistik die Wahrscheinlichkeit, mit der das gefundene Ergebnis bei Gültigkeit der Nullhypothese eintritt. Für die Auswertungen dieser Arbeit wurde ein Signifikanz-Niveau von 0,05 festgelegt. Bei unter diesem Niveau liegenden p-Werten wurde die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als signifikant eingestuft. Wichtig hierbei ist die Berücksichtigung des sogenannten multiplen Testens. Daher war im Studienprotokoll die AUC der Substanzen als primäre Zielgröße festgelegt worden, sodass die zentrale Frage der Abhängigkeit der AUC vom *OCT1*-Genotyp nicht auf multiples Testen adjustiert werden brauchte. Genau genommen müssten alle anderen Analysen auf multiples Testen adjustiert werden, worauf teils im Sinne der Übersichtlichkeit verzichtet wurde und es in diesen Fällen um ergänzende Nebenfragestellungen ging.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchte Studienpopulation

Am Studientag zu Proguanil der klinischen Studie mit dem Kurztitel „PG-OCT“ nahmen 20 Probandinnen und 19 Probanden teil. Alle waren kaukasischer Herkunft. Das mittlere Alter der Studienpopulation lag bei 27,4 Jahren. Das mittlere Gewicht betrug 71,8 kg bei einer mittleren Größe von 1,76 m. Daraus ergab sich ein mittlerer Body Mass Index (BMI) von 23,1 kg/m². In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der demografischen Daten der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil entsprechend der *OCT1*-Genotypen gezeigt:

Tabelle 12 Demografische Daten der Studienpopulation nach *OCT1*-Genotypen

Einheit	OCT1-Aktivität	Total Anzahl	Geschlecht		Alter Jahre	Größe m	Gewicht kg	BMI kg/m ²
			Frauen	Männer				
Gesamt		39	20	19	27,4	1,76	71,8	23,1
<i>H1/H1</i>	2	14	7	7	25,6	1,77	72,1	22,8
<i>H1/H2</i>	2	4	2	2	26,3	1,75	71,1	23,3
<i>H1/H3</i>	1	4	1	3	32,8	1,84	75,9	22,4
<i>H1/H4</i>	1	3	1	2	23,0	1,77	68,9	21,6
<i>H2/H2</i>	2	4	2	2	22,5	1,77	76,6	24,5
<i>H2/H3</i>	1	5	3	2	30,0	1,77	70,7	22,7
<i>H2/H4</i>	1	1	1	0	24,0	1,64	76,9	28,6
<i>H3/H3</i>	0	3	2	1	39,0	1,66	69,6	25,2
<i>H3/H4</i>	0	1	1	0	24,0	1,64	52,0	19,3

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen

In der vorliegenden Arbeit wurden den *OCT1*-Genotypen Aktivitätsgrade von 0 bis 2 zugeordnet. Diese Gruppierung erfolgte anhand der Anzahl aktiver und weniger aktiver Allele. Aktive Allele stellen die Varianten *OCT1*1* und *OCT1*2* dar, wohingegen es sich bei *OCT1*3* und *OCT1*4* um weniger aktive Allele handelt. Somit wurden drei Gruppen mit verschiedener *OCT1*-Transportaktivität gebildet. *Poor transporter* besitzen zwei

inaktive Allele, was einer OCT1-Aktivität von 0 entspricht. *Intermediate transporter* besitzen ein aktives und ein weniger aktives Allel, ihnen wurde eine Aktivität von 1 zugeordnet. *Extensive transporter* haben zwei aktive Allele und erhielten die Aktivität 2.

Deshalb wurden die demografischen Daten der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer in der folgenden Tabelle auch nach OCT1-Aktivitätsgruppen geordnet dargestellt:

Tabelle 13 Demografische Daten der Studienpopulation nach OCT1-Aktivität

	OCT1-Genotyp			
	Gesamte Studienpopulation	<i>Poor transporter</i> (H_x/H_x)	<i>Intermediate transporter</i> ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	<i>Extensive transporter</i> ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)
OCT1-Aktivität		0	1	2
Anzahl gesamt	39	4	13	22
Frauen	20	3	6	11
Männer	19	1	7	11
Parameter [Einheit]		Median (Bereich)		
Alter [Jahre]	25,0 (18,0 - 48,0)	34,5 (24,0 - 48,0)	25,0 (21,0 - 48,0)	25,0 (18,0 - 31,0)
Größe [m]	1,74 (1,61 - 2,01)	1,66 (1,64 - 1,67)	1,75 (1,64 - 1,93)	1,76 (1,61 - 2,01)
Gewicht [kg]	75,8 (52,0 - 91,7)	58,6 (52,0 - 91,7)	72,7 (54,0 - 85,6)	77,0 (53,4 - 87,0)
BMI [kg/m^2]	23,1 (18,7 - 32,9)	21,5 (19,3 - 32,9)	22,5 (19,8 - 28,6)	23,3 (18,7 - 26,9)

H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4)

In dem für die demografischen Daten der Studienpopulation durchgeführten Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen OCT1-Aktivitätsgruppen. Auch der Chi-Quadrat-Test für die Verteilung des Merkmals „Geschlecht“ der Population war nicht signifikant.

Da es sich bei Proguanil um ein Malariamedikament handelt, das in Erythrozyten aufgenommen wird, wurden pharmakokinetische Parameter in Plasma und Blut analysiert. Durch die Aktivierung zu Cycloguanil in der Leber konnte auch dieser aktive Metabolit gemessen werden. Es wurde eine differenzierte Betrachtung nach Transportaktivität (OCT1), Enzymmetabolismus (CYP2C19, CYP3A4 und CYP3A5) sowie weiteren möglichen Einflussfaktoren für diese Parameter durchgeführt. Auch auf unerwünschte Wirkungen der Studienmedikation wurde eingegangen. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind in den folgenden Kapiteln im Einzelnen dargestellt.

3.2 Pharmakokinetik der Gesamtgruppe

3.2.1 Konzentrationen im Blut

3.2.1.1 Proguanil

Da den Probandinnen und Probanden bis 36 Stunden nach Medikamentengabe zu vorgegebenen Zeitpunkten Blut abgenommen wurde, ließen sich zunächst allgemein für die Gesamtgruppe die Blutkonzentrationen von Proguanil als Konzentrations-Zeit-Verlauf darstellen. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 8 dargestellt, dass die maximale Blutkonzentration (C_{\max}) von Proguanil im Mittel von den meisten Probandinnen und Probanden nach 180 Minuten erreicht wurde. Im Anschluss fiel die Blutkonzentration von Proguanil ab. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe variierten interindividuell stark.

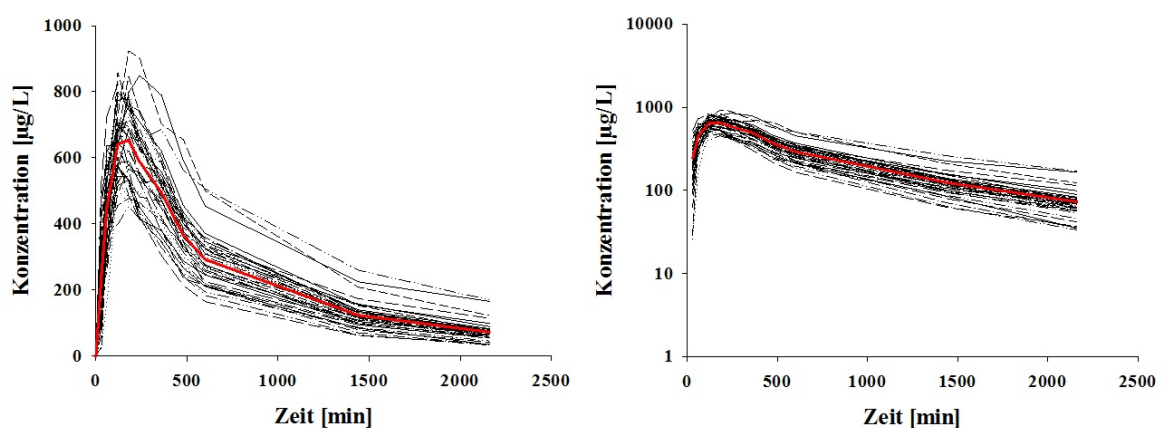


Abbildung 8. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Blut aller Probandinnen und Probanden in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Darstellung. Die rote Linie markiert den Mittelwert.

Aufgrund der Darstellung der Mittelwertkurven der Konzentrations-Zeit-Verläufe (Abbildung 8) war nicht eindeutig erkennbar, ob es sich um ein Ein- oder Zwei-Kompartimentmodell handelte. Deshalb wurden wichtige pharmakokinetische Parameter von Proguanil im Blut mittels sogenannter Nicht-Kompartiment-Analyse oder *non-compartmental analysis* (NCA) berechnet (Tabelle 14). Die AUC_{0-inf} von Proguanil in Blut betrug median 586 min*mg/L. Die mediane maximale Blutkonzentration lag bei 695 $\mu\text{g/L}$ und wurde median nach 2,03 Stunden erreicht. Für die deskriptive statistische Auswertung dieser Arbeit wurde die Variation der Parameter definiert als Quotient aus maximalem Wert des Bereichs (Max) und minimalem Wert des Bereichs (Min). Die stärkste Variation zeigten der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration t_{max} (4,4), die AUC_{0-inf} (2,9) und die *Clearance* (2,9).

Tabelle 14 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Proguanil im Blut

Proguanil				
Parameter	Einheit	Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert \pm Standardabweichung
AUC_{0-inf}	min* mg/L	586 (361 - 1061)	2,9	600 \pm 154
C_{max}	$\mu\text{g/L}$	695 (454 - 923)	2,0	681 \pm 116
t_{max}	h	2,03 (0,93 - 4,07)	4,4	2,38 \pm 0,78
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	11,95 (9,48 - 16,84)	1,8	12,15 \pm 1,64
MRT	h	15,53 (12,61 - 23,19)	1,8	15,97 \pm 2,39
Cl/F	L/min	0,34 (0,19 - 0,55)	2,9	0,35 \pm 0,08
V_z/F	L	350 (218 - 547)	2,5	366 \pm 75,71

AUC_{0-inf} = *area under the curve*; C_{max} = maximale Blutkonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Blutkonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*; Cl/F= *Clearance/Bioverfügbarkeit*; V_z/F = zentrales Verteilungsvolumen/Bioverfügbarkeit; Variation= Quotient aus maximalem und minimalen Wert des Bereichs

Im Folgenden wurden für die besonders relevanten Parameter *area under the curve* (AUC_{0-inf}) und maximale Konzentration (C_{max}) von Proguanil im Blut die Häufigkeitsverteilung dargestellt:

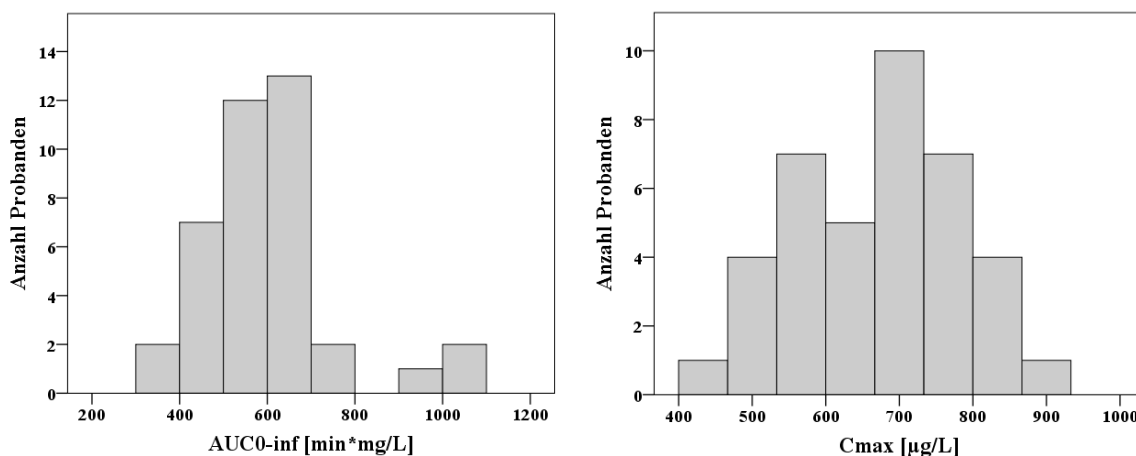


Abbildung 9. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Proguanil im Blut

3.2.1.2 Cycloguanil

Auch für Cycloguanil wurde zunächst der Konzentrations-Zeit-Verlauf für die Gesamtgruppe dargestellt. Die maximale Blutkonzentration von Cycloguanil, dem Metaboliten von Proguanil, stellte sich bei den meisten Probandinnen und Probanden drei Stunden später als für Proguanil, nach 360 Minuten, ein und fiel im Anschluss ab. Es zeigte sich eine starke interindividuelle Variation des Konzentrations-Zeit-Verlaufs.

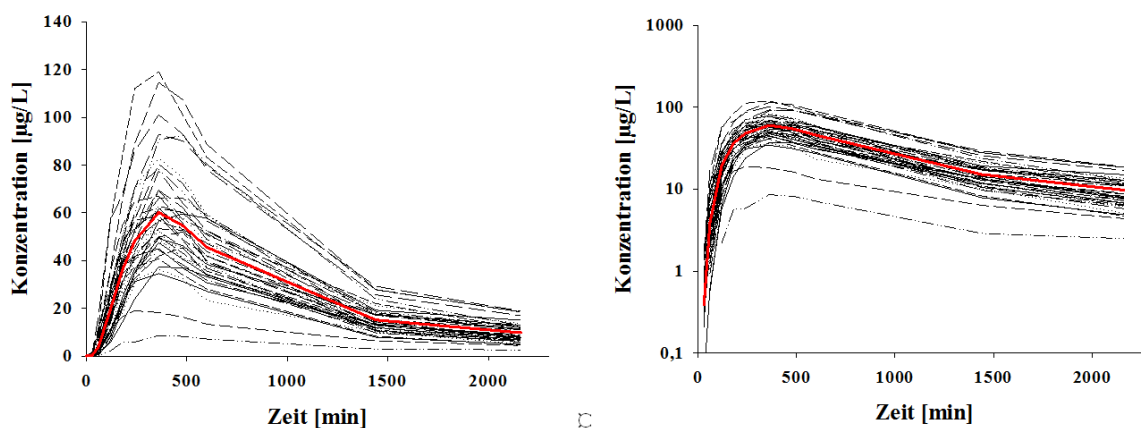


Abbildung 10. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Blut aller Probandinnen und Probanden in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Darstellung. Die rote Linie markiert den Mittelwert.

Wie in Tabelle 15 gezeigt, betrug für die Nicht-Kompartiment-Analyse von Cycloguanil im Blut die mediane AUC_{0-inf} 63,65 $\text{min} \cdot \text{mg/L}$. Die mediane maximale Plasmakonzentration lag bei 58,00 $\mu\text{g/L}$ und wurde median nach 6,02 h erreicht. Die maximale Plasmakonzentration C_{max} (13,9) und die AUC_{0-inf} (10,4) zeigten die stärkste

Variation. Da es sich bei Cycloguanil um den aktiven Metaboliten von Proguanil handelt, können *Clearance* und zentrales Verteilungsvolumen nicht berechnet werden.

Tabelle 15 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Cycloguanil im Blut

Cycloguanil				
Parameter	Einheit	Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert \pm Standardabweichung
AUC_{0-inf}	min* mg/L	63,65 (12,47 - 130,2)	10,4	67,02 \pm 25,57
C_{max}	μ g/L	58,00 (8,56 - 119,0)	13,9	60,40 \pm 23,02
t_{max}	h	6,02 (4,00 - 8,02)	2,0	6,18 \pm 0,71
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	10,70 (8,29 - 15,10)	1,8	10,92 \pm 1,60
MRT	h	16,97 (13,78 - 24,04)	1,7	17,51 \pm 2,59

AUC_{0-inf} = area under the curve; C_{max} = maximale Blutkonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Blutkonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT = mean residence time; Variation = Quotient aus maximalem und minimalen Wert des Bereichs

Die Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} und C_{max} für Cycloguanil im Blut stellten sich wie folgt dar:

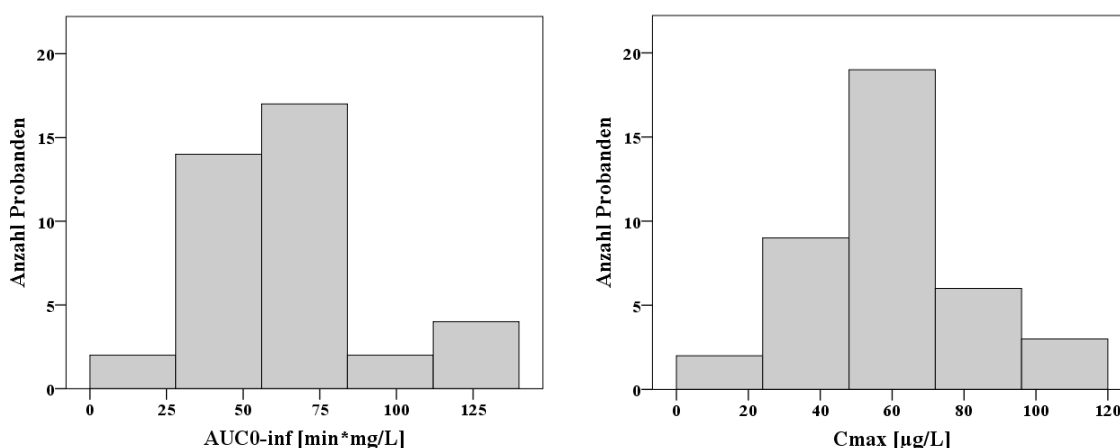


Abbildung 11. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Cycloguanil im Blut

3.2.1.3 Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil

Das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut ließ sich zunächst für alle Probandinnen und Probanden darstellen. Dieser Wert spiegelt den Metabolismus von Proguanil in der Leber wider und beschreibt den Anteil, in dem Proguanil in seinen Metaboliten Cycloguanil umgewandelt wird. Der Mittelwert des Verhältnisses im Blut betrug maximal 0,17 nach 600 Minuten.

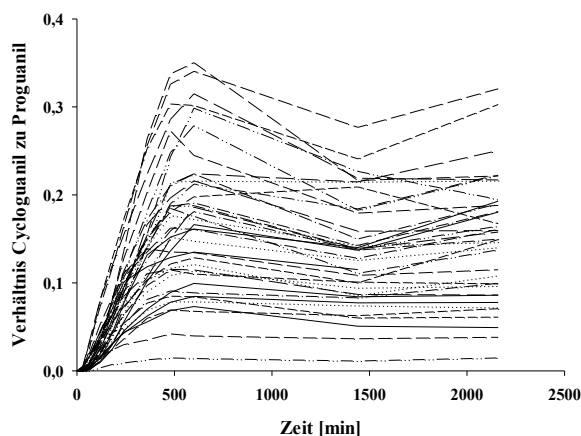


Abbildung 12. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut aller Studienteilnehmerinnen und –teilnehmer

3.2.2 Konzentrationen im Blutplasma

3.2.2.1 Proguanil

Die maximale Konzentration (C_{\max}) von Proguanil im Plasma wurde von den meisten Probandinnen und Probanden nach 120 Minuten, also eine Stunde früher als im Blut, erreicht. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf im Plasma variierte ebenso wie der im Blut interindividuell stark.

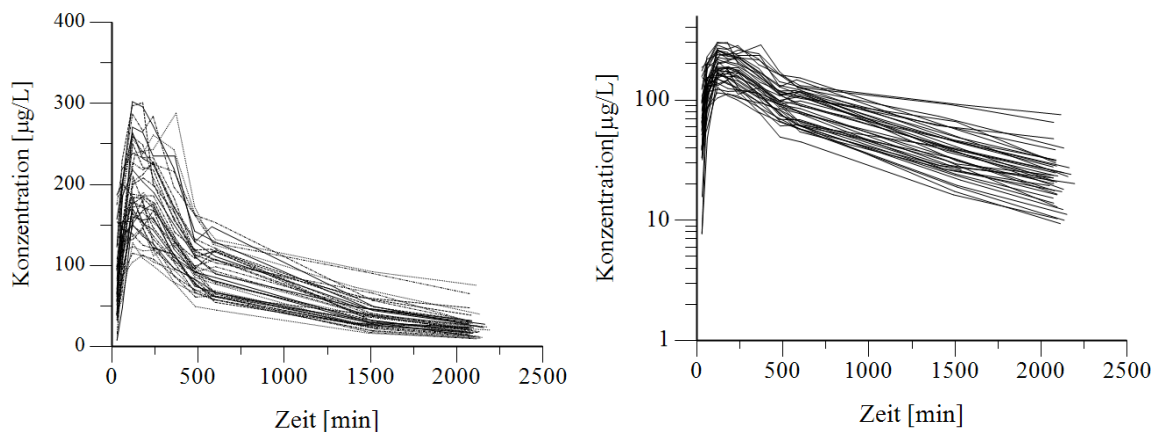


Abbildung 13. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Plasma aller Probandinnen und Probanden in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Darstellung

Die nicht-kompartimentelle Auswertung der pharmakokinetischen Parameter von Proguanil im Plasma (Tabelle 16) ergab eine mediane AUC_{0-inf} von 176 min*mg/L. Die mediane maximale Plasmakonzentration lag bei 185 $\mu\text{g/L}$ und wurde median nach 2,02 Stunden erreicht. Die stärkste Variation zeigten der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration t_{max} (6,7), die AUC_{0-inf} (5,3) und die *Clearance* (5,3).

Tabelle 16 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Proguanil im Plasma

Proguanil				
Parameter	Einheit	Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert \pm Standardabweichung
AUC_{0-inf}	min* mg/L	176 (90,21 - 475)	5,3	192 \pm 78,59
C_{max}	$\mu\text{g/L}$	185 (113 - 302)	2,7	199 \pm 53,39
t_{max}	h	2,02 (0,93 - 6,22)	6,7	2,43 \pm 0,90
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	11,93 (9,52 - 31,21)	3,3	13,17 \pm 4,26
MRT	h	15,77 (12,26 - 42,07)	3,4	17,63 \pm 5,85
Cl/F	L/min	1,13 (0,42 - 2,22)	5,3	1,19 \pm 0,41
V_z/F	L	1251 (687 - 2208)	3,2	1279 \pm 365

AUC_{0-inf} = *area under the curve*; C_{max} = maximale Plasmakonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*; Cl/F= *Clearance*/Bioverfügbarkeit; V_z/F = zentrales Verteilungsvolumen/Bioverfügbarkeit; Variation= Quotient aus maximalem und minimalen Wert des Bereichs

Auch für die Konzentration von Proguanil im Plasma ließen sich für AUC_{0-inf} und C_{max} die Häufigkeitsverteilungen darstellen:

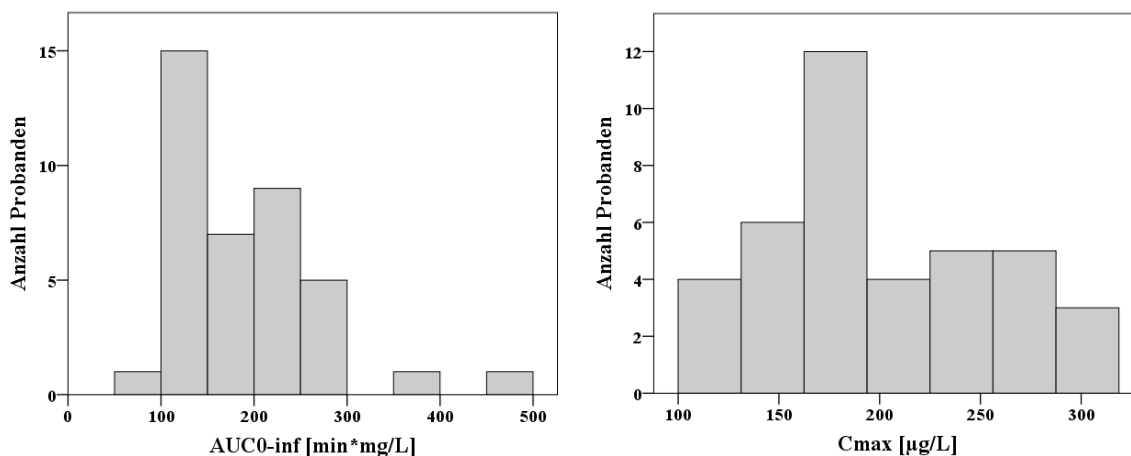


Abbildung 14. Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Proguanil im Plasma

3.2.2.2 Cycloguanil

Die maximale Konzentration von Cycloguanil im Plasma wurde, wie die maximale Konzentration von Cycloguanil im Blut, nach 360 Minuten erreicht und variierte ebenfalls interindividuell stark.

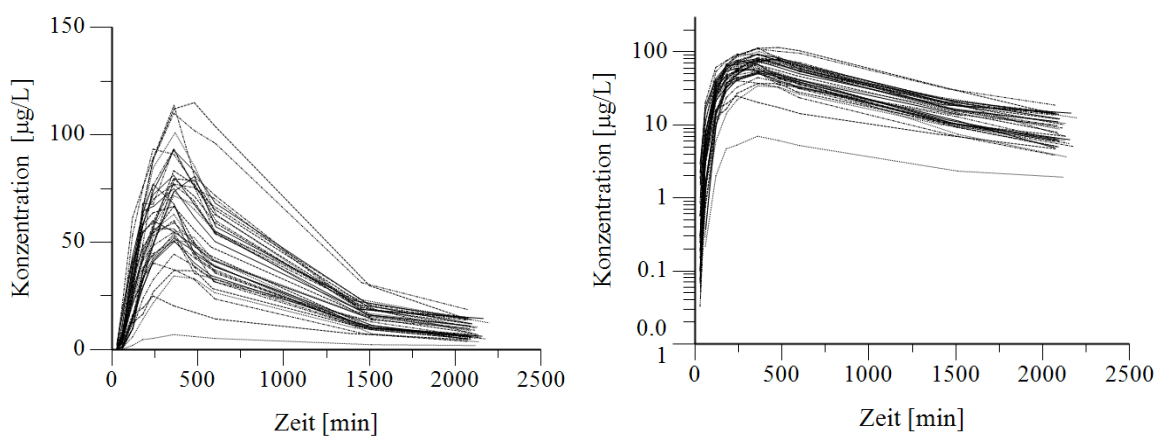


Abbildung 15. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Plasma aller Probandinnen und Probanden in linearer (links) und halblogarithmischer (rechts) Darstellung

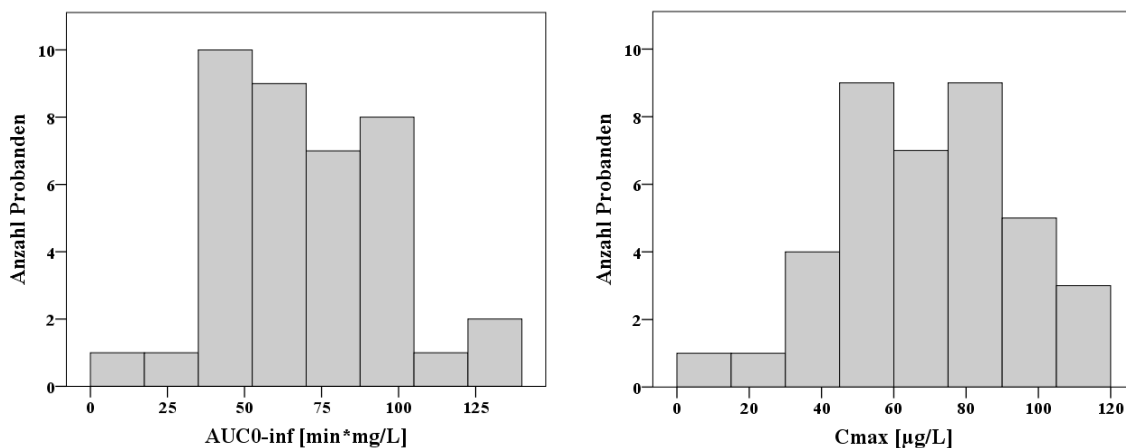
Die Ergebnisse der Nicht-Kompartiment-Analyse von Cycloguanil im Plasma sind in Tabelle 17 dargestellt. Die mediane AUC_{0-inf} betrug 66,41 $\text{min} \cdot \text{mg/L}$. Die mediane maximale Plasmakonzentration lag bei 66,80 $\mu\text{g/L}$ und wurde median nach 6,02 h erreicht. Die maximale Plasmakonzentration C_{max} (16,4) und die AUC_{0-inf} (13,2) zeigten die stärkste Variation.

Tabelle 17 Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter von Cycloguanil im Plasma

Cycloguanil				
Parameter	Einheit	Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert ± Standardabweichung
AUC_{0-inf}	min* mg/L	66,41 (9,92 - 130,8)	13,2	69,75 ± 25,72
C_{max}	µg/L	66,80 (7,01 - 115,0)	16,4	68,09 ± 24,04
t_{max}	h	6,02 (3,98 - 8,02)	2,0	5,82 ± 0,90
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	9,78 (7,19 - 15,89)	2,2	10,21 ± 1,88
MRT	h	15,54 (12,03 - 24,81)	2,1	16,22 ± 2,87

AUC_{0-inf} = area under the curve; C_{max} = maximale Plasmakonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT = mean residence time; Variation = Quotient aus maximalem und minimalen Wert des Bereichs

Die Häufigkeitsverteilungen der AUC_{0-inf} und C_{max} von Cycloguanil im Plasma stellten sich wie folgt dar:

**Abbildung 16.** Häufigkeitsverteilung für die Parameter AUC_{0-inf} und C_{max} für Cycloguanil im Plasma

3.2.2.3 Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil

Auch das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma ließ sich zunächst für die Gesamtgruppe darstellen. Der maximale Mittelwert des Verhältnisses im Plasma betrug 0,64 und wurde nach 480 Minuten erreicht.

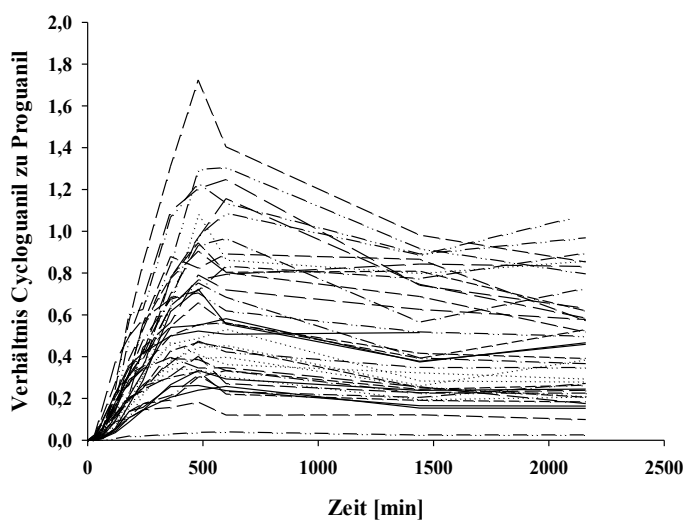


Abbildung 17. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma aller Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer

3.2.3 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration

3.2.3.1 Proguanil

Das Verhältnis der Blutkonzentration zur Plasmakonzentration von Proguanil zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages variierte im Mittel von 3,14 bis 3,66.

Tabelle 18 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil für die Gesamtgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages

Zeitpunkt im Bezug zur Proguanil-Dosierung [min]	Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil
	Mittelwert ± Standardabweichung
-60 bis 0	0
30	3,56 ± 0,80
60	3,47 ± 0,67
120	3,44 ± 0,63
180	3,61 ± 0,62
240	3,47 ± 0,60
360	3,64 ± 0,62
480	3,66 ± 0,59
600	3,31 ± 0,62
1440	3,28 ± 0,58
2160	3,14 ± 0,62

3.2.3.2 Cycloguanil

Das Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages variierte im Mittel zwischen 0,58 und 1,14.

Tabelle 19 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil für die Gesamtgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten des Studientages

Zeitpunkt im Bezug zur Proguanil-Dosierung [min]	Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil
Mittelwert ± Standardabweichung	
-60 bis 0	0
30	0,58 ± 0,59
60	0,73 ± 0,28
120	0,77 ± 0,19
180	0,84 ± 0,20
240	0,88 ± 0,20
360	0,92 ± 0,19
480	0,97 ± 0,22
600	0,98 ± 0,22
1440	1,04 ± 0,26
2160	1,14 ± 0,30

3.3 Auswertung nach *OCT1*-Genotypen und Transportaktivität

Da in dieser Studie vor allem der Einfluss des *OCT1*-Genotyps auf die Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Medikamenten dargestellt werden sollte, wurden die Probandinnen und Probanden nach dem *OCT1*-Genotyp vorselektiert. Die Festlegung der Gruppengrößen der drei Aktivitätsgruppen beruhte auf *in-vitro*-Daten zum Transportverhalten der *OCT1*-Genotypen für andere Substrate (Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2013). Deshalb war zunächst davon ausgegangen worden, dass es sich bei dem Allel *OCT1**2 um ein weniger aktives Allel handelt. Diese Annahme bestätigte sich in weiteren biochemischen Analysen zum Transportverhalten von *OCT1* für Proguanil nicht (Matthaei et al. 2018). Das Allel *OCT1**2 zeigte wie das Wildtyp-Allel *OCT1**1 für Proguanil kaum und Cycloguanil keine reduzierte Transportaktivität. Auch in der statistischen Auswertung der klinischen Studie war das Allel *OCT1**2 normal aktiv. Somit

ergab sich eine andere Anzahl eingeschlossener *OCT1*-Genotypvarianten für den Studientag zu Proguanil als ursprünglich festgelegt. Es nahmen 22 *extensive transporter*, 13 *intermediate transporter* und 4 *poor transporter* am Studientag Proguanil teil.

Tabelle 20 *OCT1*-Genotypen der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil

<i>OCT1</i> -Genotyp	Anzahl der Probandinnen und Probanden	<i>OCT1</i> -Aktivität	Transportaktivität	Anzahl nach Transportaktivität
<i>H1/H1</i>	14			
<i>H1/H2</i>	4	2	<i>Extensive transporter</i>	22
<i>H2/H2</i>	4			
<i>H1/H3</i>	4			
<i>H1/H4</i>	3	1	<i>Intermediate transporter</i>	13
<i>H2/H3</i>	5			
<i>H2/H4</i>	1			
<i>H3/H3</i>	3	0	<i>Poor transporter</i>	4
<i>H3/H4</i>	1			

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen

Ergänzend zur Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe von Proguanil und seinem Metaboliten Cycloguanil in Blut und Plasma für die Gesamtgruppe, wurden in Abbildung 18 die *OCT1-poor transporter* farblich hervorgehoben.

Weiterhin wurde eine Nicht-Kompartiment-Analyse pharmakokinetischer Parameter nach *OCT1*-Genotypen und *OCT1*-Aktivität durchgeführt, welche in den folgenden Kapiteln für Proguanil und seinen Metaboliten Cycloguanil in Blut und Plasma beschrieben ist.

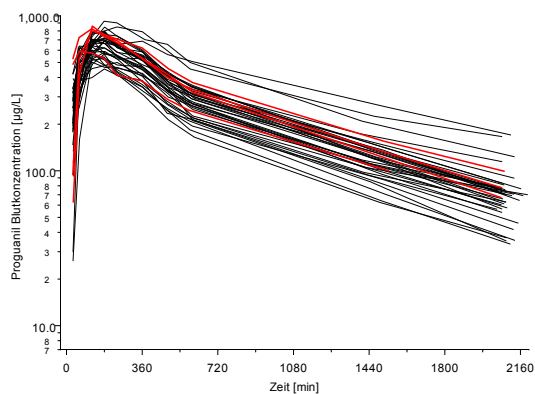
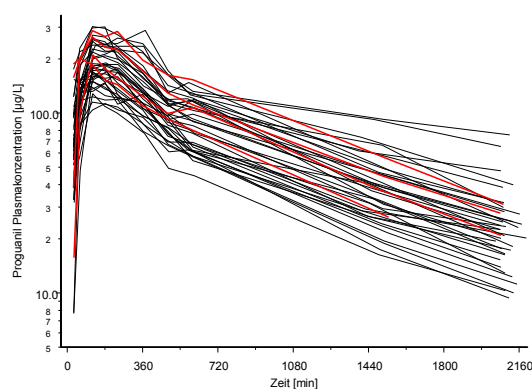
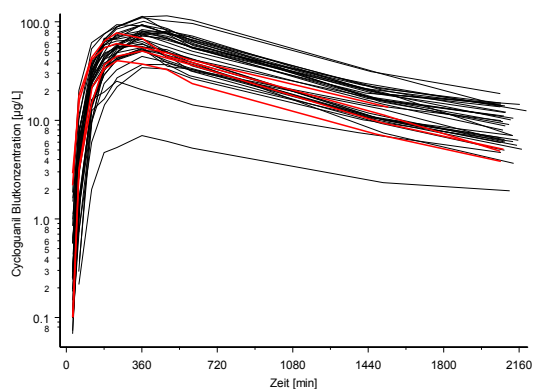
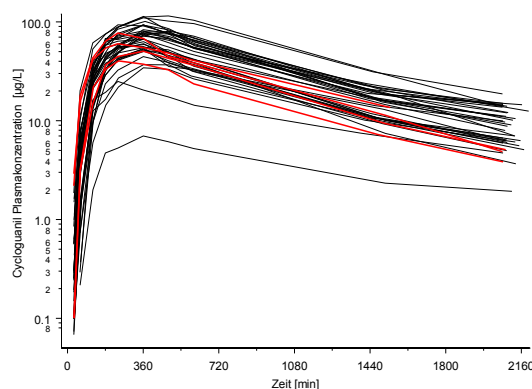
Proguanil im Blut**Proguanil im Plasma****Cycloguanil im Blut****Cycloguanil im Plasma**

Abbildung 18. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma aller Probandinnen und Probanden in halblogarithmischer Darstellung. OCT1-*poor transporter* sind rot markiert.

3.3.1 Analyse der Zusammenhänge im Blut

3.3.1.1 Proguanil

In der Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufes von Proguanil im Blut für die drei OCT1-Aktivitätsgruppen erreichten OCT1-*poor transporter* im Mittel höhere Konzentrationen als *intermediate* oder *extensive transporter*.

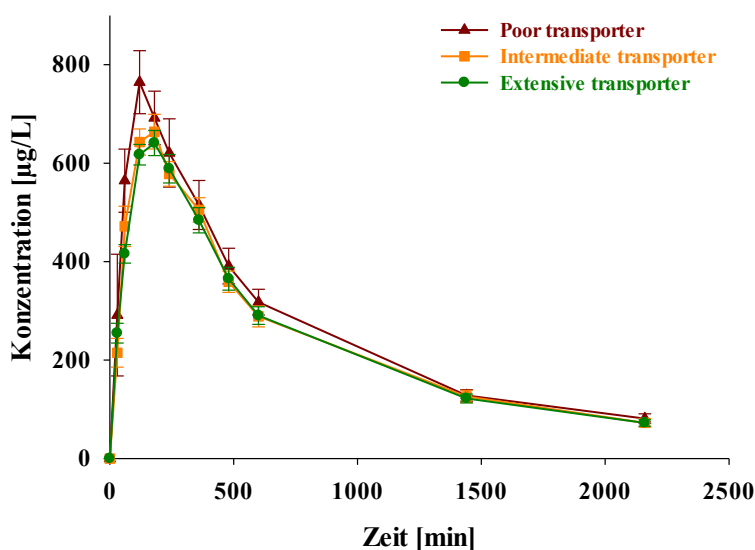


Abbildung 19. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Aus der durchgeführten nicht-kompartimentellen pharmakokinetischen Analyse stellt die AUC_{0-inf} die wichtigste pharmakokinetische Größe dar. Sie war für die vorliegende Studie die so genannte primäre Zielgröße, sodass bei der statistischen Betrachtung keine Adjustierung hinsichtlich des multiplen Testens durchzuführen war.

Die AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut ließ sich zunächst für die einzelnen *OCT1*-Genotypen darstellen:

Tabelle 21 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Proguanil im Blut nach *OCT1*-Genotyp

<i>OCT1</i> -Genotyp	Anzahl Probandinnen/ Probanden	AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]		
		Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert ± Standardabweichung
<i>H1/H1</i>	14	609 (361 – 1023)	2,8	588 ± 174
<i>H1/H2</i>	4	543 (363 – 642)	1,8	523 ± 121
<i>H1/H3</i>	4	502 (457 – 1060)	2,3	630 ± 289
<i>H1/H4</i>	3	583 (527 – 699)	1,3	603 ± 87,6
<i>H2/H2</i>	4	615 (545 – 908)	1,7	671 ± 165

H2/H3	5	602 (457 – 649)	1,4	582 ± 74,4
H2/H4	1	596	-	596 ± 0
H3/H3	3	654 (502 – 657)	1,3	604 ± 88,9
H3/H4	1	757	-	757 ± 0

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen; Variation= Quotient aus maximalem und minimalem Wert des Bereichs; $AUC_{0-inf} = \text{area under the curve}_{0-inf}$

Auch für die drei *OCT1*-Aktivitätsgruppen konnte die AUC_{0-inf} dargestellt werden (Tabelle 22). Ein für diesen Parameter durchgeführter Jonkheere-Terpstra-Test zeigte für Proguanil im Blut keinen signifikanten Trend.

Tabelle 22 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Proguanil im Blut nach *OCT1*-Aktivität

Parameter	Einheit	<i>OCT1</i> -Genotyp			P-Wert
		<i>Poor transporter</i> (H_x/H_x)	<i>Intermediate transporter</i> ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	<i>Extensive transporter</i> ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf}	min* mg/L	655 (502 – 757)	583 (457 – 1060)	583 (361 – 1022)	n.s.
		642 ± 105	603 ± 156	591 ± 164	

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle *OCT1*-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); $AUC_{0-inf} = \text{area under the curve}_{0-inf}$

Die Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nach *OCT1*-Aktivität zeigte sich wie folgt:

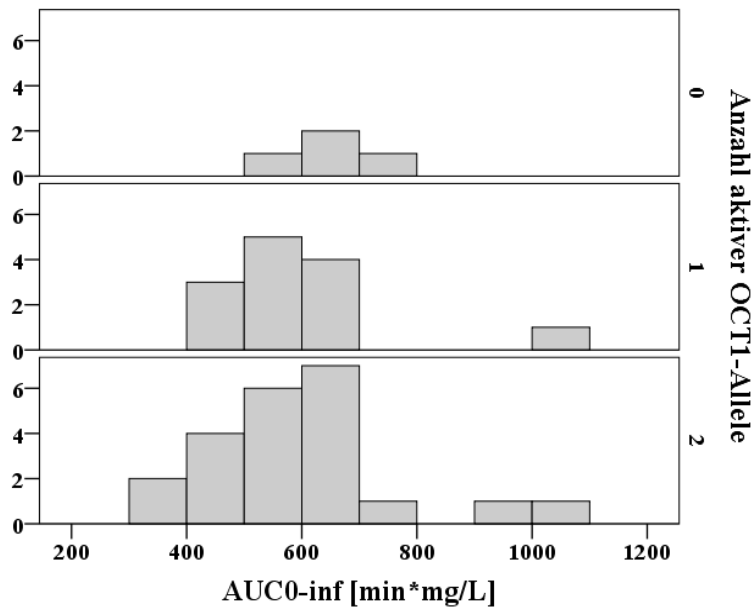


Abbildung 20. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität

Um die Aktivität der neun *OCT1*-Genotypen genauer zu untersuchen, wurden anhand von *in-vitro*-Daten zum Transportverhalten der *OCT1*-Mutationen Faktoren gebildet (Tabelle 23). Daraus konnte der in Tabelle 24 dargestellte OCT1-*in-vitro*-Score berechnet werden.

Tabelle 23 Aktivität verschiedener *OCT1*-Allele basierend auf *in-vitro*-Daten des Instituts für Klinische Pharmakologie Göttingen

Mutation Allel	Wildtyp <i>OCT1</i> *1	M420del <i>OCT1</i> *2	Arg61Cys <i>OCT1</i> *3	Gly401Ser <i>OCT1</i> *4
Aktivität in Prozent	100	71,42	44,25	20,36
Faktor	1	0,7	0,44	0,20

Tabelle 24 Resultierender OCT1-*in-vitro*-Score der Genotypen

<i>OCT1</i> -Genotyp	OCT1- <i>in-vitro</i> -Score
*1/*1	2
*1/*2	1,7
*1/*3	1,44
*2/*2	1,4
*1/*4	1,2

*2/*3	1,14
*2/*4	0,9
*3/*3	0,88
*3/*4	0,64

Somit ließ sich die $AUC_{0-\text{inf}}$ von Proguanil im Blut auch auf der Grundlage des OCT1-*in-vitro*-Scores der Genotypen darstellen:

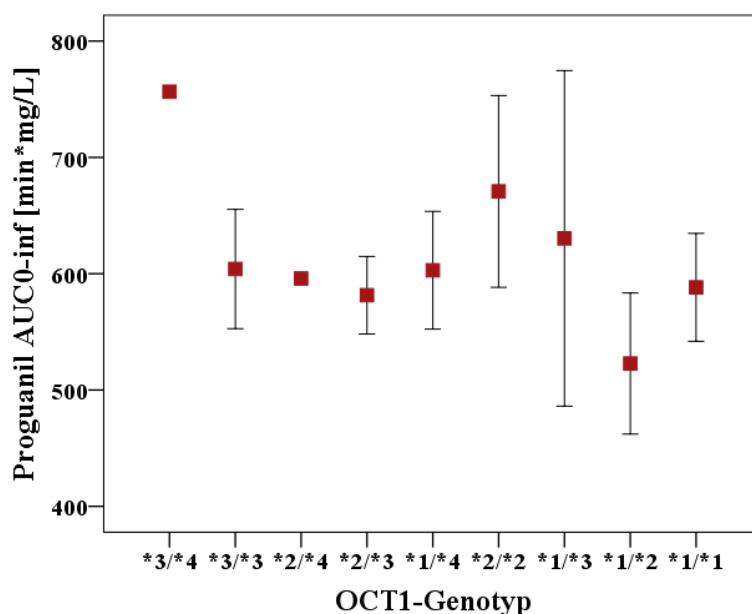


Abbildung 21. $AUC_{0-\text{inf}}$ von Proguanil im Blut geordnet nach den *OCT1*-Genotypen. Die Anordnung der *OCT1*-Genotypen entspricht dem aus *in-vitro*-Untersuchungen ermittelten Score, links beginnend mit der geringsten Aktivität und rechts mit der höchsten Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die anderen pharmakokinetischen Parameter sind für Proguanil im Blut in Tabelle 25 gezeigt. In dem für diese Parameter durchgeführten Jonkheere-Terpstra-Test, war für Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität der Zeitpunkt der maximalen Blutkonzentration (t_{max}) signifikant. Demnach erreichten *extensive transporter* später eine maximale Konzentration von Proguanil im Blut als *intermediate* oder *poor transporter*.

Tabelle 25 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität

Parameter	Einheit	OCT1-Genotyp			P-Wert
		Poor transporter (H_x/H_x)	Intermediate transporter ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	Extensive transporter ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
C_{max}	µg/L	812 (590 – 858)	691 (511 – 847)	691 (454 – 923)	n.s.
t_{max}	h	2,00 (1,03 – 2,05)	2,02 (0,93 – 3,05)	3,00 (1,00 – 4,07)	0,019
t_{1/2 Lambda z}	h	11,71 (10,82 – 12,90)	12,46 (10,24 – 16,02)	11,42 (9,48 – 16,84)	n.s.
MRT	h	15,41 (13,77 – 17,15)	15,72 (13,28 – 23,19)	15,57 (12,61 – 22,80)	n.s.
Cl/F	L/min	0,31 (0,26 – 0,40)	0,34 (0,19 – 0,44)	0,34 (0,20 – 0,55)	n.s.
V_z/F	L	301 (287 – 407)	350 (261 – 486)	362 (218 – 547)	n.s.

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); C_{max} = maximale Blutkonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Blutkonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda z}}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*; Cl/F= Clearance/Bioverfügbarkeit; V_z/F = zentrales Verteilungsvolumen/Bioverfügbarkeit

3.3.1.2 Cycloguanil

Der Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Blut für die drei OCT1-Aktivitätsgruppen ist in der folgenden Abbildung gezeigt. OCT1-*extensive transporter* erreichten im Mittel höhere Konzentrationen als *intermediate* oder *poor transporter*.

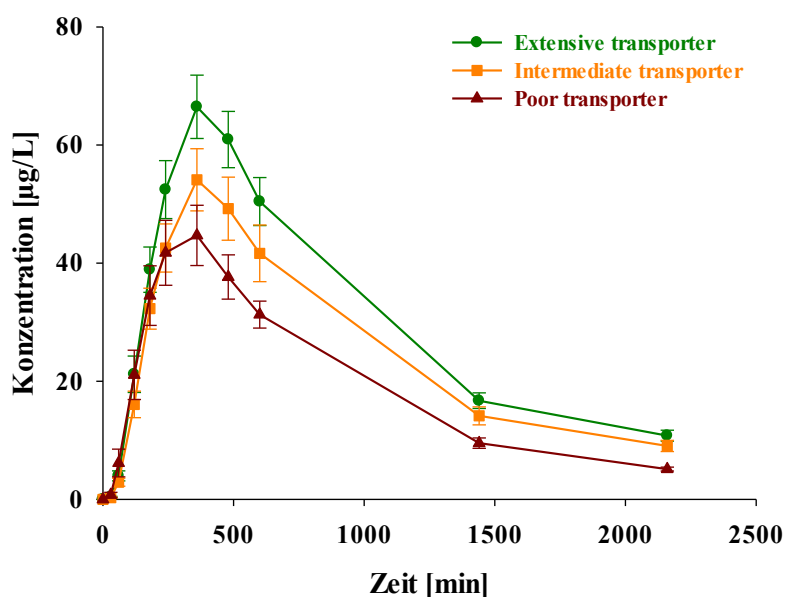


Abbildung 22. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Für Cycloguanil im Blut wurde die AUC_{0-inf} zunächst differenziert nach *OCT1*-Genotypen wie folgt beschrieben:

Tabelle 26 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Cycloguanil im Blut nach *OCT1*-Genotyp

<i>OCT1</i> -Genotyp	Anzahl Probandinnen/ Probanden	AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]		
		Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert ± Standardabweichung
<i>H1/H1</i>	14	69,49 (24,60 – 130,22)	5,3	74,70 ± 31,45
<i>H1/H2</i>	4	71,40 (63,65 – 82,96)	1,3	72,35 ± 10,13
<i>H1/H3</i>	4	65,97 (12,47 – 79,55)	6,4	55,99 ± 30,84
<i>H1/H4</i>	3	69,46 (57,83 – 102,73)	1,8	76,67 ± 23,30
<i>H2/H2</i>	4	64,69 (52,84 – 113,64)	2,2	73,96 ± 27,99
<i>H2/H3</i>	5	51,65 (39,98 – 76,29)	1,9	58,28 ± 15,39
<i>H2/H4</i>	1	52,71	-	52,71 ± 0

H3/H3	3	50,85 (40,16 – 55,84)	1,4	48,95 ± 8,01
H3/H4	1	37,82	-	37,82 ± 0

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen; Variation= Quotient aus maximalem Wert des Bereichs und minimalem Wert des Bereichs; AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

Die AUC_{0-inf} wurde auch nach *OCT1*-Aktivität dargestellt und war im Jonkheere-Terpstra-Test für Cycloguanil im Blut signifikant (Tabelle 27). *Poor transporter* hatten signifikant kleinere *areas under the curve* von Cycloguanil im Blut als *intermediate* oder *extensive transporter*.

Tabelle 27 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Cycloguanil im Blut nach *OCT1*-Aktivität

Parameter	Einheit	<i>OCT1</i> -Genotyp			P-Wert
		<i>Poor transporter</i> (H_x/H_x)	<i>Intermediate transporter</i> ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	<i>Extensive transporter</i> ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf}	min* mg/L	45,51 (37,82 – 55,84)	57,83 (12,47 – 102,73)	69,45 (24,60 – 130,22)	0,024
		46,17 ± 8,59	61,39 ± 22,04	74,14 ± 27,19	

P-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle *OCT1*-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

Die Häufigkeit der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach *OCT1*-Aktivität zeigte sich wie folgt:

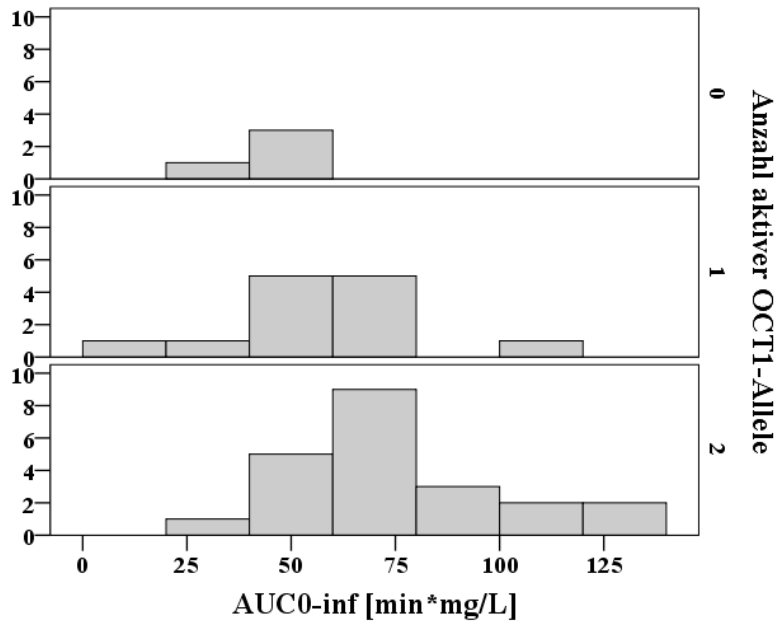


Abbildung 23. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität

Auch die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut konnte auf der Grundlage des OCT1-*in-vitro*-Scores dargestellt werden:

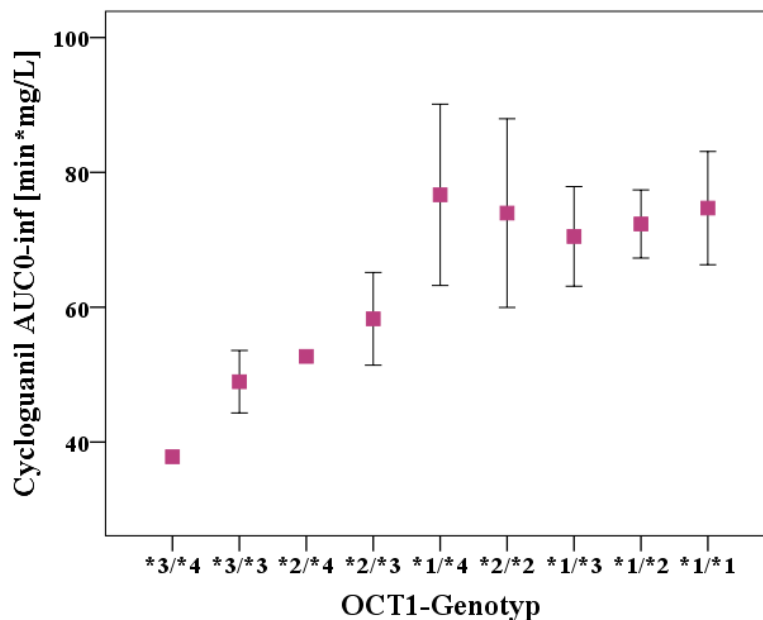


Abbildung 24. AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut geordnet nach den OCT1-Genotypen. Die Anordnung der OCT1-Genotypen entspricht dem aus *in-vitro*-Untersuchungen ermittelten Score, links beginnend mit der geringsten Aktivität und rechts mit der höchsten Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. In der Genotyp-Gruppe OCT1 *1/*3 wurde der CYP2C19-poor metabolizer *2/*2 nicht dargestellt.

In der Nicht-Kompartiment-Analyse der anderen pharmakokinetischen Parameter für Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität (Tabelle 28), war die maximale Blutkonzentration C_{\max} im durchgeführten Jonkheere-Terpstra-Test signifikant. *Extensive transporter* hatten signifikant höhere maximale Cycloguanil-Konzentrationen im Blut als *intermediate* oder *poor transporter*.

Tabelle 28 Nicht-Kompartiment-Analyse für Cycloguanil im Blut nach OCT1-Aktivität

Parameter	Einheit	OCT1-Genotyp			P-Wert
		<i>Poor transporter</i> (H_x/H_x)	<i>Intermediate transporter</i> ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	<i>Extensive transporter</i> ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
C_{\max}	µg/L	42,85 (34,5 – 58,6)	52,70 (8,56 – 92,40)	62,35 (18,95 – 119,00)	0,029
t_{\max}	h	6,00 (6,00 – 6,03)	6,03 (5,98 – 8,02)	6,02 (4,00 – 8,02)	n.s.
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	9,43 (9,07 – 10,39)	10,99 (9,22 – 15,10)	10,76 (8,29 – 14,38)	n.s.
MRT	h	15,12 (13,78 – 16,14)	17,53 (14,20 – 24,04)	17,18 (13,87 – 23,17)	n.s.

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); C_{\max} = maximale Blutkonzentration; t_{\max} = Zeitpunkt der maximalen Blutkonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*

3.3.1.3 Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil

Das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität ist in Abbildung 25 gezeigt. In der durchgeführten univariaten Varianzanalyse des Verhältnisses von Cycloguanil zu Proguanil im Blut, waren sowohl die OCT1-Aktivität (p-Wert <0,001) als auch der Zeitpunkt der Blutentnahme (p-Wert <0,001) signifikant. *Poor transporter* hatten ein signifikant kleineres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut als *intermediate* oder *extensive transporter*.

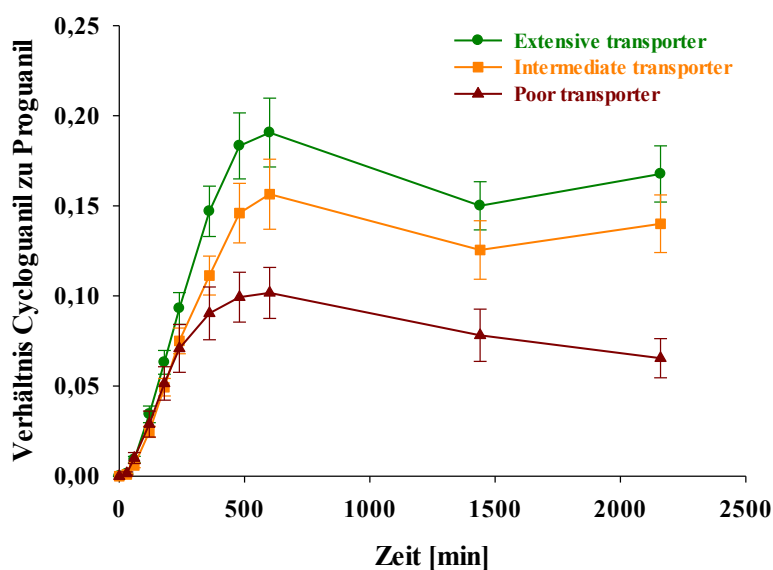


Abbildung 25. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.3.2 Analyse der Zusammenhänge im Blutplasma

3.3.2.1 Proguanil

Im Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Plasma für die drei OCT1-Aktivitätsgruppen erreichten OCT1-*poor transporter* im Mittel höhere Konzentrationen als *intermediate* oder *extensive transporter*.

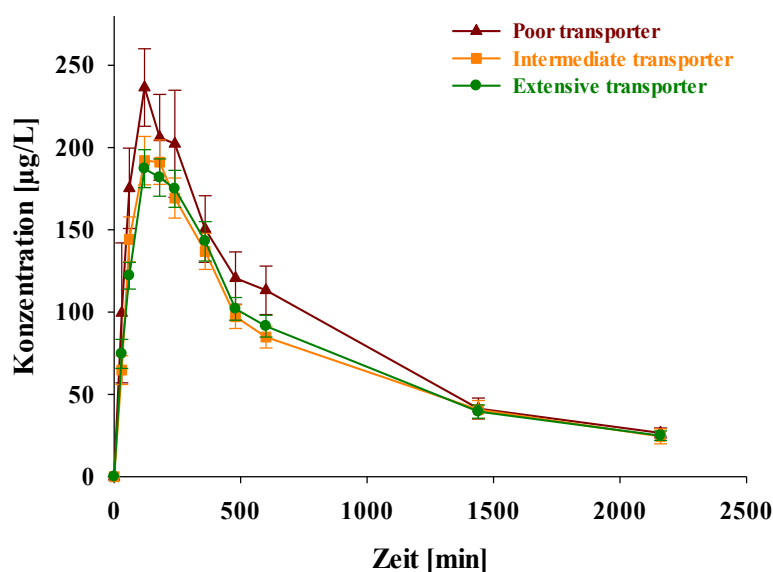


Abbildung 26. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

In der folgenden Tabelle ist die AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma zunächst differenziert nach den *OCT1*-Genotypen dargestellt:

Tabelle 29 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Proguanil im Plasma nach *OCT1*-Genotyp

<i>OCT1</i> -Genotyp	Anzahl Probandinnen/ Probanden	AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]		
		Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert \pm Standardabweichung
<i>H1/H1</i>	14	190 (90,21 - 400)	4,4	194 \pm 81,53
<i>H1/H2</i>	4	154 (101 - 208)	2,1	154 \pm 47,39
<i>H1/H3</i>	4	135 (124 - 475)	3,8	218 \pm 172
<i>H1/H4</i>	3	154 (144 - 211)	1,5	170 \pm 36,00
<i>H2/H2</i>	4	202 (136 - 295)	2,2	209 \pm 80,00
<i>H2/H3</i>	5	193 (118 - 245)	2,1	180 \pm 49,53
<i>H2/H4</i>	1	204	-	204 \pm 0
<i>H3/H3</i>	3	175 (149 - 227)	1,5	183 \pm 39,67
<i>H3/H4</i>	1	271	-	271 \pm 0

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen; Variation= Quotient aus maximalem Wert des Bereichs und minimalem Wert des Bereichs; AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

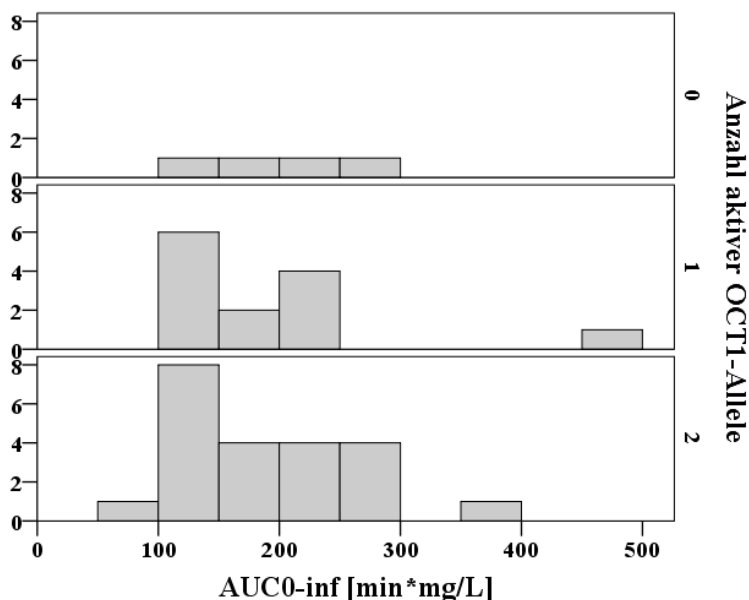
In der Darstellung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach *OCT1*-Aktivität (Tabelle 30) ergab sich im Jonkheere-Terpstra-Test keine Signifikanz.

Tabelle 30 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität

Parameter	Einheit	OCT1-Genotyp			P-Wert
		Poor transporter (H_x/H_x)	Intermediate transporter ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	Extensive transporter ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
Mittelwert \pm Standardabweichung					
AUC_{0-inf}	min* mg/L	201 (149 – 271)	154 (118 – 475)	178 (90,21 – 400)	n.s.
		205 \pm 54,46	191 \pm 93,98	189 \pm 75,28	

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

Die Häufigkeit der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität zeigte sich wie folgt:

**Abbildung 27.** Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität

Auch für die anderen pharmakokinetischen Parameter der Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität ergab sich im Trend-Test keine Signifikanz.

Tabelle 31 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität

Parameter	Einheit	OCT1-Genotyp			P-Wert
		Poor transporter (H_x/H_x)	Intermediate transporter ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	Extensive transporter ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
C_{max}	µg/L	237 (201 – 287)	181 (145 – 301)	180 (113 – 302)	n.s.
t_{max}	h	2,00 (1,03 – 2,05)	2,03 (0,93 – 3,05)	2,02 (2,00 – 6,22)	n.s.
t_{1/2 Lambda z}	h	10,56 (9,72 – 11,93)	12,69 (9,67 – 31,21)	12,00 (9,52 – 25,75)	n.s.
MRT	h	15,15 (12,77 – 15,55)	16,46 (12,26 – 42,07)	15,82 (12,85 – 35,36)	n.s.
Cl/F	L/min	1,01 (0,74 – 1,35)	1,30 (0,42 – 1,69)	1,13 (0,50 – 2,22)	n.s.
V_z/F	L	969 (687 – 1133)	1279 (820 – 1598)	1303 (689 – 2208)	n.s.

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); C_{max} = maximale Plasmakonzentration; t_{max} = Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda z}}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*; Cl/F= *Clearance/Bioverfügbarkeit*; V_z/F = zentrales Verteilungsvolumen/Bioverfügbarkeit

3.3.2.2 Cycloguanil

Im in der folgenden Abbildung gezeigten Konzentrations-Zeit-Verlauf hatten OCT1-*extensive transporter* im Mittel höhere Plasma-Konzentrationen von Cycloguanil als *intermediate* oder *poor transporter*.

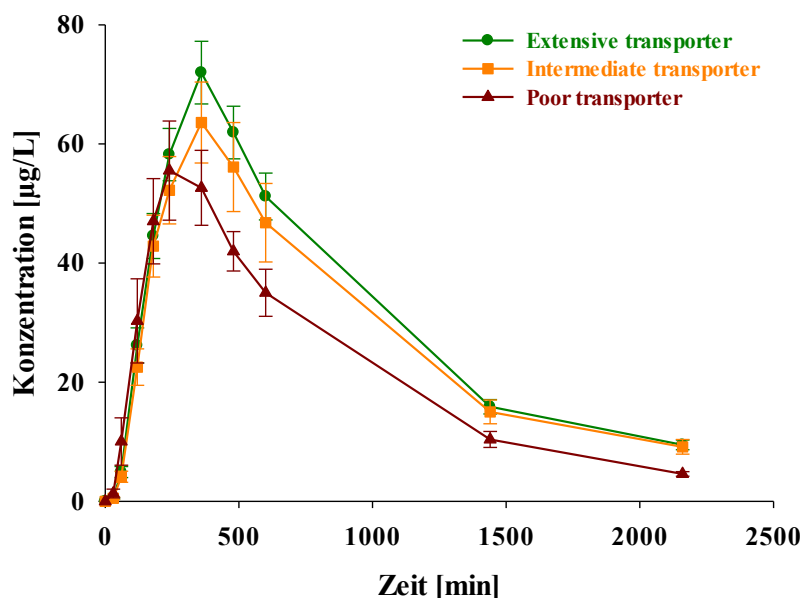


Abbildung 28. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Auch die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma ließ sich deskriptiv für alle *OCT1*-Genotypen darstellen:

Tabelle 32 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Cycloguanil im Plasma nach *OCT1*-Genotyp

<i>OCT1</i> -Genotyp	Anzahl Probandinnen/Probanden	AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]		
		Median (Bereich)	Variation (Max/Min)	Mittelwert ± Standardabweichung
<i>H1/H1</i>	14	82,18 (28,82 - 130,8)	4,5	72,52 ± 27,64
<i>H1/H2</i>	4	72,43 (50,66 - 88,35)	1,7	70,97 ± 19,82
<i>H1/H3</i>	4	81,28 (9,92 - 96,45)	9,7	67,23 ± 39,27
<i>H1/H4</i>	3	87,24 (43,39 - 129,9)	3,0	86,86 ± 43,28
<i>H2/H2</i>	4	76,30 (66,41 - 105,1)	1,6	81,01 ± 18,19
<i>H2/H3</i>	5	53,47 (49,95 - 85,30)	1,7	59,21 ± 14,72

<i>H2/H4</i>	1	61,15	-	61,15 ± 0
<i>H3/H3</i>	3	60,95 (36,63 - 63,74)	1,7	53,77 ± 14,91
<i>H3/H4</i>	1	49,12	-	49,12 ± 0

H beschreibt die unterschiedlichen Haplotypen der *OCT1*-Genotypen; Variation= Quotient aus maximalem Wert des Bereichs und minimalem Wert des Bereichs; AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

In der Analyse von Cycloguanil im Plasma nach *OCT1*-Aktivität war die AUC_{0-inf} im Jonkheere-Terpstra-Test nicht signifikant.

Tabelle 33 AUC_{0-inf} (primäre Zielgröße) von Cycloguanil im Plasma nach *OCT1*-Aktivität

Parameter	Einheit	<i>OCT1</i> -Genotyp			P-Wert
		<i>Poor transporter</i> (H_x/H_x)	<i>Intermediate transporter</i> ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	<i>Extensive transporter</i> ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf}	min* mg/L	55,03 (36,63 – 63,74)	61,15 (9,92 – 129,9)	82,18 (28,82 – 130,8)	n.s.
		52,61 ± 12,40	68,21 ± 29,92	73,78 ± 24,27	

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle *OCT1*-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

Die Häufigkeit ließ sich nach *OCT1*-Aktivität für die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma darstellen:

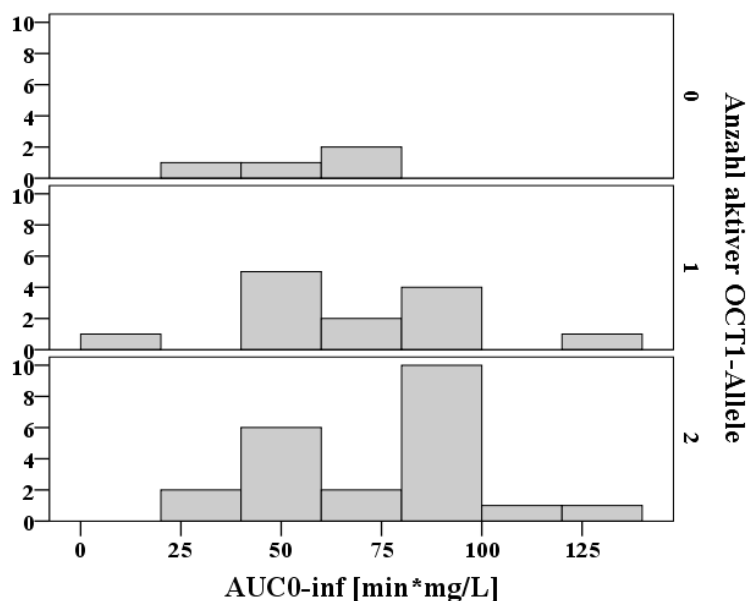


Abbildung 29. Häufigkeitsverteilung der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität

Auch für die anderen pharmakokinetischen Parameter der nicht-kompartimentellen Analyse von Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität ergab sich keine Signifikanz im Jonkheere-Terpstra-Test.

Tabelle 34 Nicht-Kompartiment-Analyse für Cycloguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität

Parameter	Einheit	OCT1-Genotyp			P-Wert
		Poor transporter (H_x/H_x)	Intermediate transporter ($H_1/H_x, H_2/H_x$)	Extensive transporter ($H_1/H_1, H_1/H_2, H_2/H_2$)	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		4	13	22	
Median (Bereich)					
C_{max}	$\mu\text{g/L}$	55,30 (40,30 – 77,00)	66,80 (7,01 – 115,0)	75,25 (25,00 – 113,75)	n.s.
t_{max}	h	4,03 (3,98 – 6,00)	6,03 (5,98 – 8,02)	6,02 (4,00 – 6,22)	n.s.
$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$	h	8,91 (8,33 – 9,72)	10,42 (8,40 – 15,89)	9,77 (7,19 – 15,25)	n.s.
MRT	h	13,93 (12,49 – 14,93)	16,36 (12,71 – 24,81)	15,51 (12,03 – 22,21)	n.s.

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05); p-Wert des Jonkheere-Terpstra-Tests; H_x = alle OCT1-Haplotypen, die weniger aktiv sind (H_3 und H_4); C_{\max} = maximale Plasmakonzentration; t_{\max} = Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ = terminale Halbwertszeit; MRT= *mean residence time*

3.3.2.3 Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil

In der für das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität durchgeführten univariaten Varianzanalyse, waren sowohl die OCT1-Aktivität (p-Wert 0,001), als auch der Zeitpunkt der Blutentnahme (p-Wert <0,001) signifikant. *Poor transporter* hatten ein signifikant kleineres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma als *intermediate* oder *extensive transporter*.

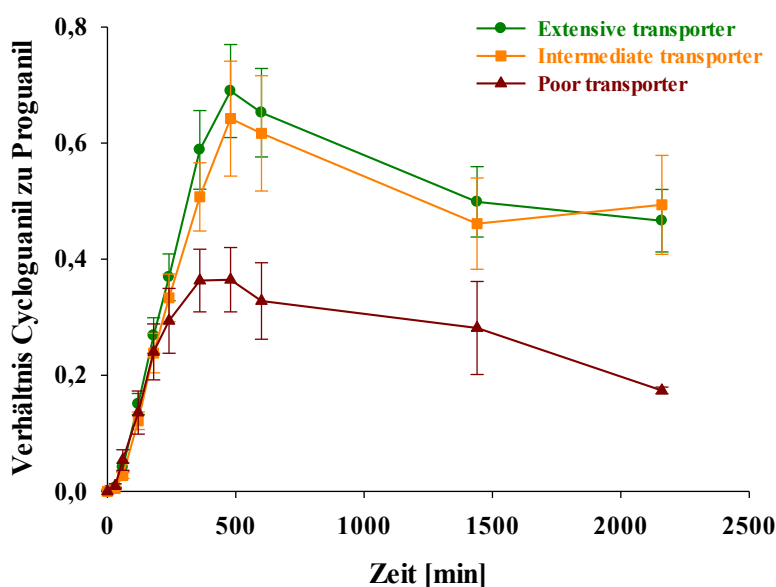


Abbildung 30. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Plasma nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.3.3 Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration

Das Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil ist in Abbildung 31 dargestellt. In der für dieses Verhältnis durchgeführten univariaten Varianzanalyse waren weder die OCT1-Aktivität noch der Zeitpunkt der Blutentnahme signifikant. Für das Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil war in einer univariaten Varianzanalyse sowohl die OCT1-Aktivität (p-Wert 0,012) als auch der Zeitpunkt der Blutentnahme (p-Wert <0,001) signifikant.

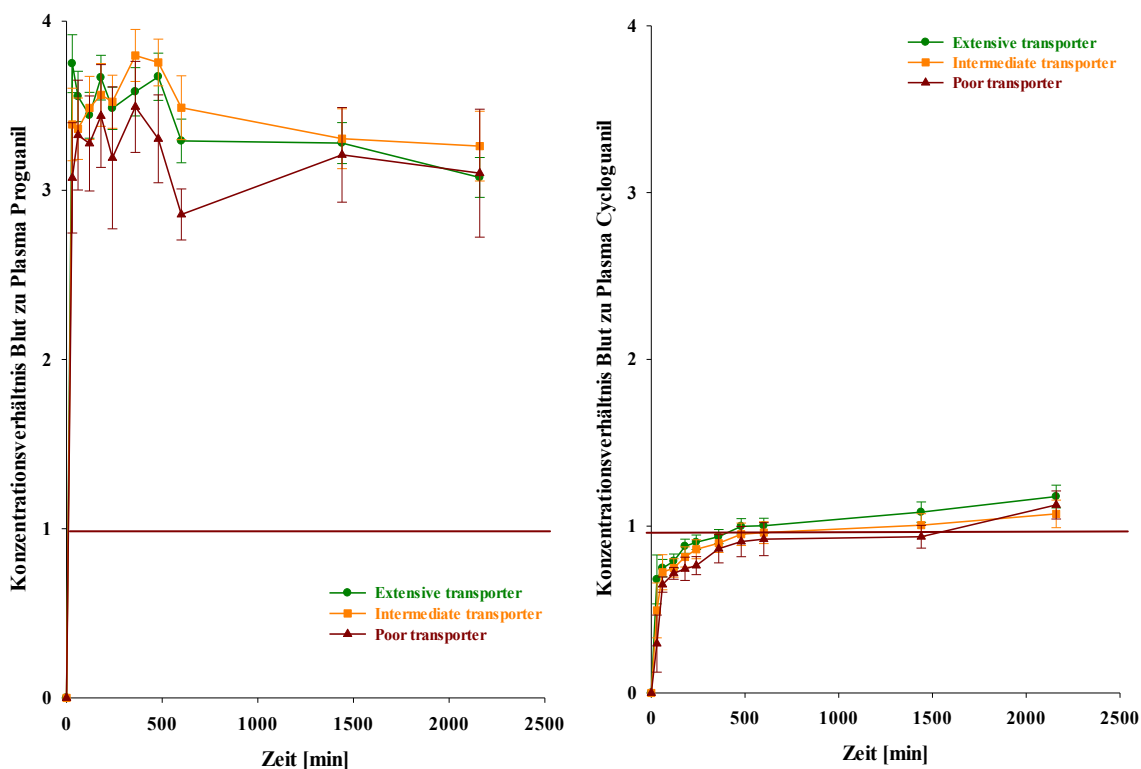


Abbildung 31. Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil (links) und Cycloguanil (rechts) nach OCT1-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Die rot eingezeichnete Gerade markiert das 1:1-Verhältnis der Blut zur Plasma-Konzentration.

Zum Vergleich wurden auch die geschätzten Randmittel des Verhältnisses von Proguanil und Cycloguanil in Blut zu Plasma dargestellt:

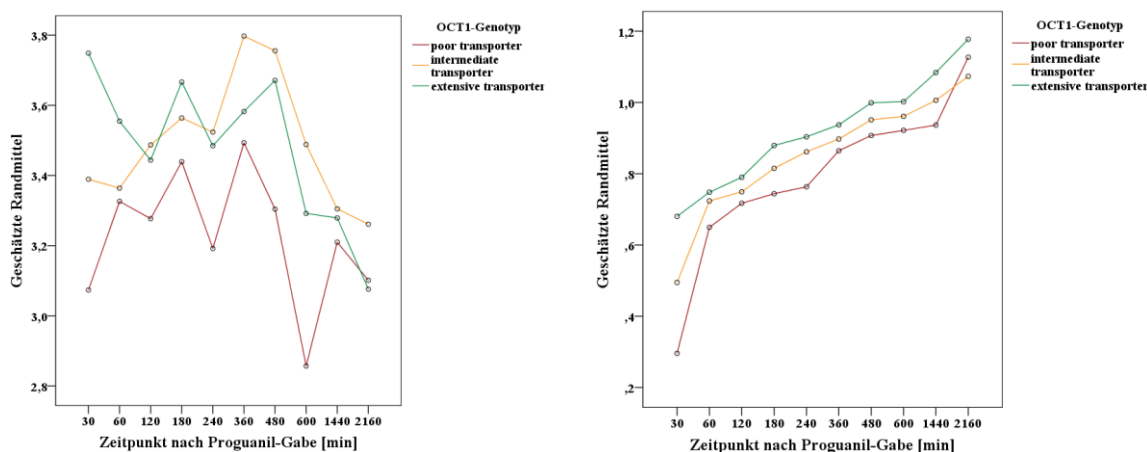


Abbildung 32. Geschätzte Randmittel der Verhältnisse von Proguanil (links) und Cycloguanil (rechts) in Blut zu Plasma

3.3.4 Vergleich der Erythrozyten- und Plasmakonzentrationen

Neben dem Vergleich von Blut- und Plasmakonzentration sollte hier auch die genauere Erythrozytenkonzentration mit der Plasmakonzentration gegenübergestellt werden. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe für Proguanil und Cycloguanil in Erythrozyten und Plasma sind in der folgenden Abbildung gezeigt:

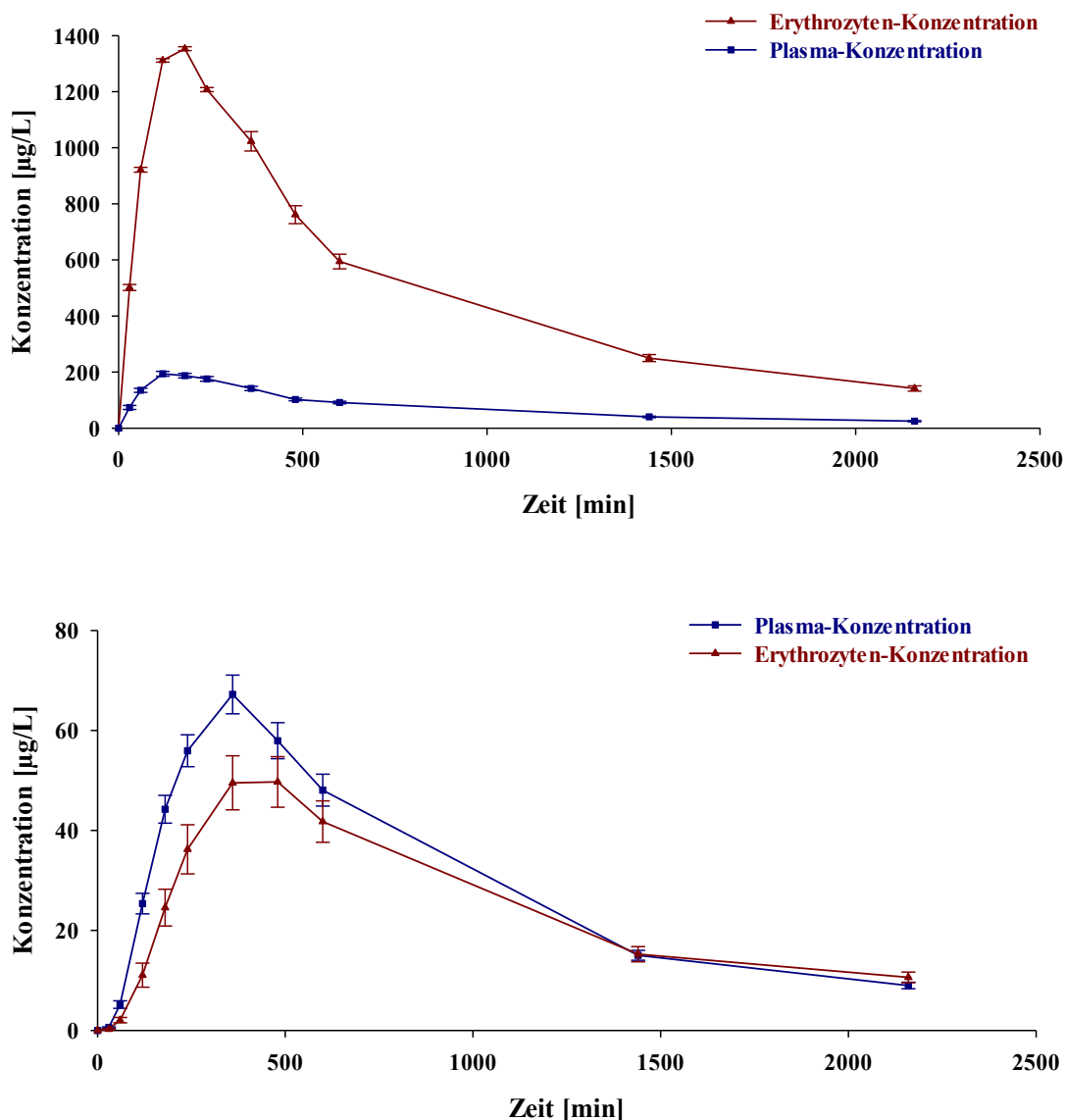


Abbildung 33. Konzentrations-Zeit-Verlauf der Erythrozyten- und Plasmakonzentration von Proguanil (oben) und Cycloguanil (unten) für die Gesamtgruppe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Rechnerisch ergaben sich für die ersten 180 Minuten teilweise negative Cycloguanil-Konzentrationen, welche mit Null gleichgesetzt wurden.

Für Proguanil war die mittlere maximale Erythrozytenkonzentration mit einem Faktor von etwa 6,75 deutlich größer als die mittlere maximale Plasmakonzentration. Die

Cycloguanil-Konzentration war hingegen im Plasma höher als in den Erythrozyten. Die mittlere maximale Plasmakonzentration von Cycloguanil war etwa um den Faktor 1,4 größer als die mittlere maximale Erythrozytenkonzentration.

Für die Berechnung der Erythrozytenkonzentrationen von Proguanil und Cycloguanil wurde für die Probandinnen und Probanden ein Hämatokrit-Wert von 40% angenommen. Dieser findet sich als Faktor 0,4 in folgender Formel wieder:

$$\text{Konzentration}_{\text{Erythrozyten}} = \frac{(\text{Konzentration}_{\text{Blut}} - \text{Konzentration}_{\text{Plasma}} \times 0,6)}{0,4}$$

3.4 Auswertung nach *CYP2C19*-Genotyp

Ziel der vorliegenden Studie war zwar nicht, die Bedeutung von *CYP2C19* festzustellen, jedoch war es nötig, dieses Enzym als weiteren Einflussfaktor auf die Pharmakokinetik von Proguanil zu untersuchen. Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei dem Allel *CYP2C19*1* um den Wildtyp des Enzyms mit normaler Aktivität, während das Allel *CYP2C19*2* ein defizientes Allel darstellt und *CYP2C19*17* für ein Enzym mit gesteigerter Aktivität kodiert. Entsprechend dieser Annahme wurde, wie in Tabelle 35 dargestellt, eine Rangfolge der *CYP2C19*-Aktivität zur Erleichterung der Auswertung mit Hilfe des Jonckheere-Terpstra-Tests erstellt.

Tabelle 35 Rangfolge der *CYP2C19*-Genotypen nach Aktivität

Anzahl Probandinnen/Probanden	<i>CYP2C19</i> -Genotyp	Rangfolge nach Aktivität
1	*2/*2	0
4	*1/*2	1
2	*2/*17	1,5
19	*1/*1	2
12	*1/*17	2,5
1	*17/*17	3

Die Rangfolge wurde nach der Annahme erstellt, dass dem Allel *1 eine Aktivität von 1, Allel *2 von 0 und Allel *17 eine Aktivität von 1,5 zugeordnet wurde.

In der Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma für die Gesamtgruppe wurden in der folgenden Abbildung Träger der gering aktiven *CYP2C19*-Allele *2/*2 und *1/*2 farblich hervorgehoben:

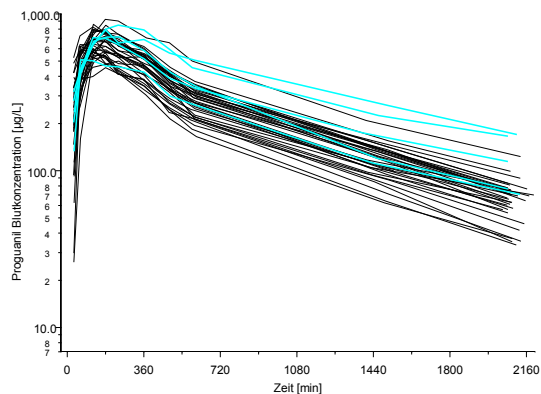
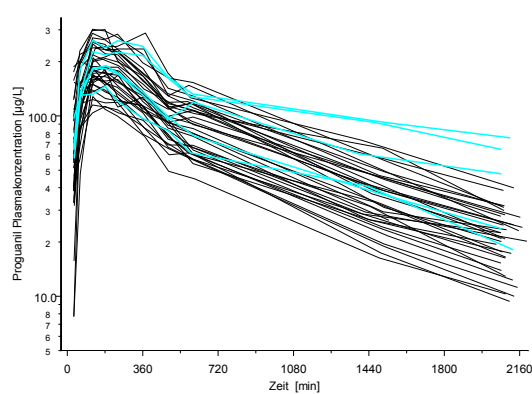
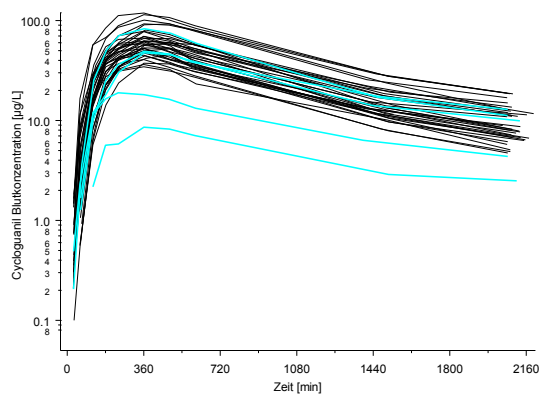
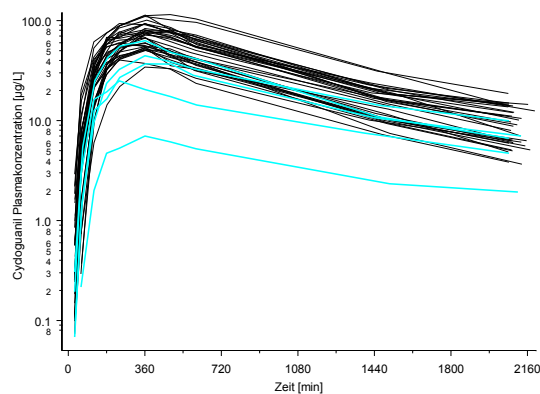
Proguanil im Blut**Proguanil im Plasma****Cycloguanil im Blut****Cycloguanil im Plasma**

Abbildung 34. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma aller Probandinnen und Probanden in halblogarithmischer Darstellung. Träger der gering aktiven *CYP2C19*-Allele **2/*2* und **1/*2* sind blau markiert.

3.4.1 Analyse im Blut

Die $AUC_{0-\infty}$ von Proguanil und Cycloguanil im Blut ist in der Tabelle auf der folgenden Seite für die *CYP2C19*-Genotypen dargestellt. Ein durchgeführter Jonkheere-Terpstra-Test zeigte keinen signifikanten Trend der Genotypen für Proguanil oder Cycloguanil.

Tabelle 36 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach *CYP2C19*-Genotyp

<i>CYP2C19</i> -Genotyp					
*2/*2	*1/*2	*2/*17	*1/*1	*1/*17	*17/*17
Anzahl Probandinnen/ Probanden					
1	4	2	19	12	1
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]					
1060	692 (527 – 1023)	661 (657 – 664)	578 (361 – 908)	562 (363 – 653)	667
1060 ± 0	734 ± 212	661 ± 4,62	571 ± 135	548 ± 26,05	667 ± 0
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]					
12,47	62,52 (25,0 – 83,0)	43,71 (40,0 – 47,0)	69,46 (38,0 – 128,0)	63,55 (40,0 – 130,0)	116
12,47 ± 0	58,15 ± 24,65	43,71 ± 5,02	70,89 ± 23,33	68,21 ± 23,58	116 ± 0

AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

3.4.2 Analyse im Plasma

Auch für AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma war der Jonkheere-Terpstra-Test nicht signifikant (Tabelle 37). Für die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach *CYP2C19*-Genotyp hingegen war der Jonkheere-Terpstra-Test signifikant (p-Wert 0,002). Die AUCs beider Substanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 37 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach *CYP2C19*-Genotyp

<i>CYP2C19</i> -Genotyp					
*2/*2	*1/*2	*2/*17	*1/*1	*1/*17	*17/*17
Anzahl Probandinnen/ Probanden					
1	4	2	19	12	1
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]					
475,3	218 (144 – 400)	177 (175 – 179)	154 (90,21 – 295)	171 (101 – 256)	200
475,3 ± 0	245 ± 114	177 ± 3,09	177 ± 59,89	175 ± 53,23	200 ± 0
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]					
9,92	49,36 (28,82 – 57,26)	37,83 (36,63 – 39,03)	74,44 (48,51 – 129,9)	82,18 (51,89 – 96,45)	131
9,92 ± 0	46,20 ± 13,11	37,83 ± 1,70	74,76 ± 23,11	74,89 ± 15,49	131 ± 0

AUC_{0-inf} = *area under the curve*_{0-inf}

Der signifikante Parameter AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach *CYP2C19*-Genotyp ließ sich wie folgt grafisch darstellen:

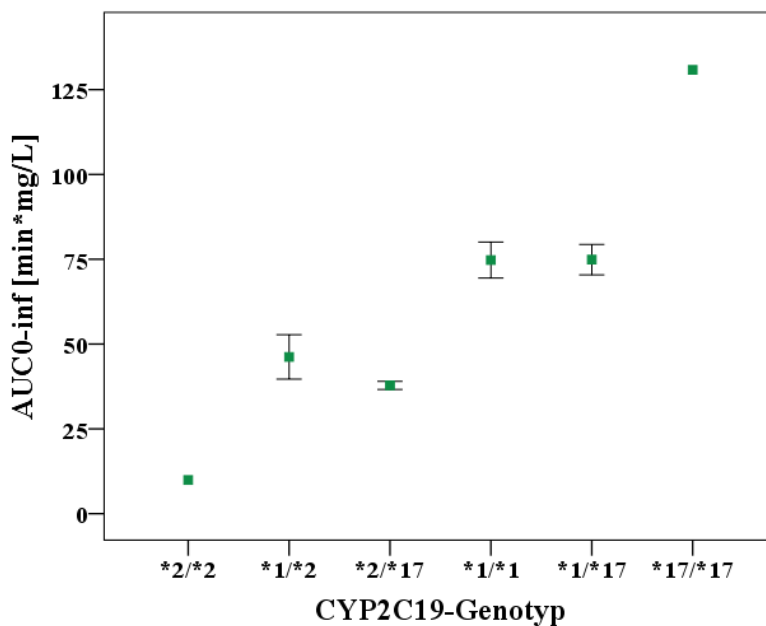


Abbildung 35. AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma nach *CYP2C19*-Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.5 Auswertung in Abhängigkeit vom *CYP3A4*- und *CYP3A5*-Genotyp

In der Analyse der Pharmakokinetik von Proguanil wurde neben dem Metabolismus über das Enzym *CYP2C19* auch der Einfluss von *CYP3A4* und *CYP3A5* betrachtet. Wie eingangs erwähnt, kodieren die Allele *CYP3A4*1* und *CYP3A4*1B* für aktive Enzyme, während die Variante *CYP3A4*22* für ein Enzym mit verringerter Aktivität kodiert. Bei *CYP3A5* kodiert der Genotyp *CYP3A5*1/*3* für ein funktionsfähiges Enzym, während die Variante *CYP3A5*3/*3* in einem Enzym mit vollständigem Aktivitätsverlust resultiert.

Für diese *CYP3A4*- und *CYP3A5*-Genotypen wurden im Folgenden die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma deskriptiv dargestellt und statistisch ausgewertet.

3.5.1 Analyse im Blut

Die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Blut nach *CYP3A4*-Genotyp ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Ein für beide Parameter durchgeführter Jonkheere-Terpstra-Test war nicht signifikant.

Tabelle 38 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach *CYP3A4*-Genotyp

Parameter [Einheit]	<i>CYP3A4</i> -Genotyp		
	*1/*1	*1/*1B	*1/*22
Anzahl Probandinnen/ Probanden	34	3	2
Median (Bereich)			
Mittelwert ± Standardabweichung			
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]	581 (361 – 1023)	639 (501 – 1061)	680 (661 – 699)
	584 ± 140	734 ± 292	680 ± 26,7
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]	63,51 (25,00 – 130,0)	50,85 (12,00 – 85,00)	75,23 (69,00 – 81,00)
	68,08 ± 25,25	49,54 ± 36,44	75,23 ± 8,16

AUC_{0-inf} = area under the curve_{0-inf}

Für die Darstellung nach *CYP3A5*-Genotyp war der Trend-Test für die AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut nicht signifikant. Für die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut nach *CYP3A5*-Genotyp hingegen war der Jonkheere-Terpstra-Test signifikant (p-Wert 0,029).

Tabelle 39 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Blut nach *CYP3A5*-Genotyp

Parameter [Einheit]	<i>CYP3A5</i> -Genotyp	
	*1/*3	*3/*3
Anzahl Probandinnen/ Probanden	5	34
Median (Bereich)		
Mittelwert ± Standardabweichung		
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]	664 (494 – 1061)	585 (361 – 1023)

	726 ± 252	582 ± 129
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]	50,85 (12,00 – 63,00)	68,33 (25,00 – 130,0)
	45,36 ± 19,34	70,21 ± 25,02

AUC_{0-inf} = area under the curve_{0-inf}

3.5.2 Analyse im Plasma

In der folgenden Tabelle ist die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP3A4-Genotyp gezeigt. Für beide Parameter war der Jonkheere-Terpstra-Test nicht signifikant.

Tabelle 40 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP3A4-Genotyp

Parameter [Einheit]	CYP3A4-Genotyp		
	*1/*1	*1/*1B	*1/*22
Anzahl Probandinnen/ Probanden	34	3	2
Median (Bereich)			
Mittelwert ± Standardabweichung			
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]	168 (90,21 – 400)	256 (149 – 475)	211 (211 – 211)
	182 ± 66,04	293 ± 167	211 ± 0,21
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]	63,78 (28,82 – 131)	63,74 (9,92 – 81,61)	87,94 (87,24 – 88,63)
	70,27 ± 25,05	51,75 ± 37,32	87,94 ± 0,98

AUC_{0-inf} = area under the curve_{0-inf}

Auch für die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach CYP3A5-Genotyp ergab sich im Trend-Test keine Signifikanz.

Tabelle 41 Nicht-Kompartiment-Analyse für Proguanil und Cycloguanil im Plasma nach *CYP3A5*-Genotyp

Parameter [Einheit]	<i>CYP3A5</i> -Genotyp	
	*1/*3	*3/*3
Anzahl Probandinnen/ Probanden	5	34
	Median (Bereich)	
	Mittelwert ± Standardabweichung	
AUC_{0-inf} Proguanil [min*mg/L]	179 (132 – 475)	176 (90,21 – 400)
	246 ± 143	184 ± 64,12
AUC_{0-inf} Cycloguanil [min*mg/L]	63,74 (9,92 – 84,24)	70,93 (28,82 – 130,83)
	52,67 ± 28,82	72,27 ± 24,70

AUC_{0-inf} = area under the curve_{0-inf}

3.6 Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut in Abhängigkeit vom *CYP2C19*- und *CYP3A5*-Genotyp

Der Einfluss der *CYP2C19*-Aktivität auf das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut sollte hier genauer dargestellt werden. Dazu wurden die *CYP2C19*-Genotypen, wie in folgender Tabelle gezeigt, entsprechend der ihnen zugeordneten Aktivität (Tabelle 35) in 3 Gruppen zusammengefasst:

Tabelle 42 Gruppierung der *CYP2C19*-Genotypen nach Aktivität

	<i>CYP2C19</i> -Genotyp					
	*2/*2	*1/*2	*2/*17	*1/*1	*1/*17	*17/*17
CYP2C19- Aktivität	gering		mittel		hoch	
Anzahl Probandinnen/ Probanden	5		21		13	

In dem für diese drei CYP2C19-Aktivitätsgruppen dargestellten Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil (Abbildung 36) im Blut zeigte sich, dass die Genotypen mit hoher CYP2C19-Aktivität ($*1/*17$ und $*17/*17$) im Mittel ein größeres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut hatten, als CYP2C19-Genotypen mit mittlerer oder geringer Aktivität.

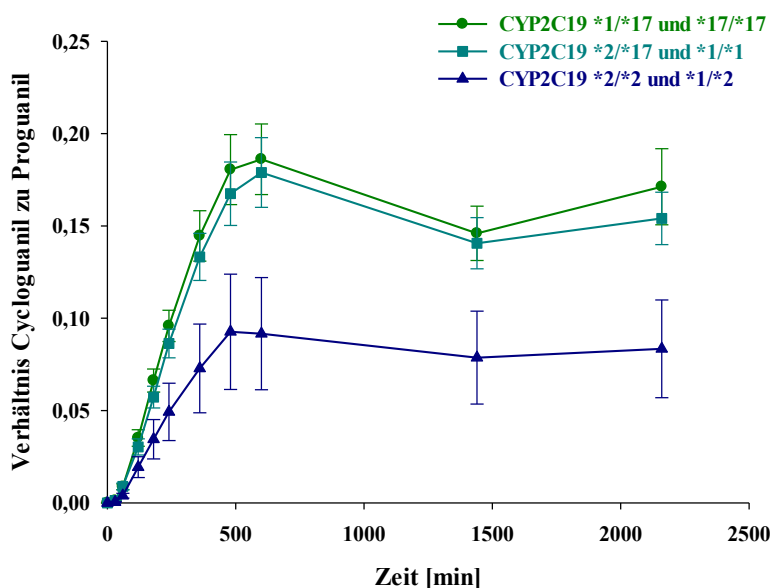


Abbildung 36. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach CYP2C19-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut sollte auch für den Einfluss des CYP3A5-Genotyps dargestellt werden (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass CYP3A5-defiziente Probandinnen und Probanden ($*3/*3$) ein höheres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut hatten, als Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer mit normaler CYP3A5-Aktivität ($*1/*3$).

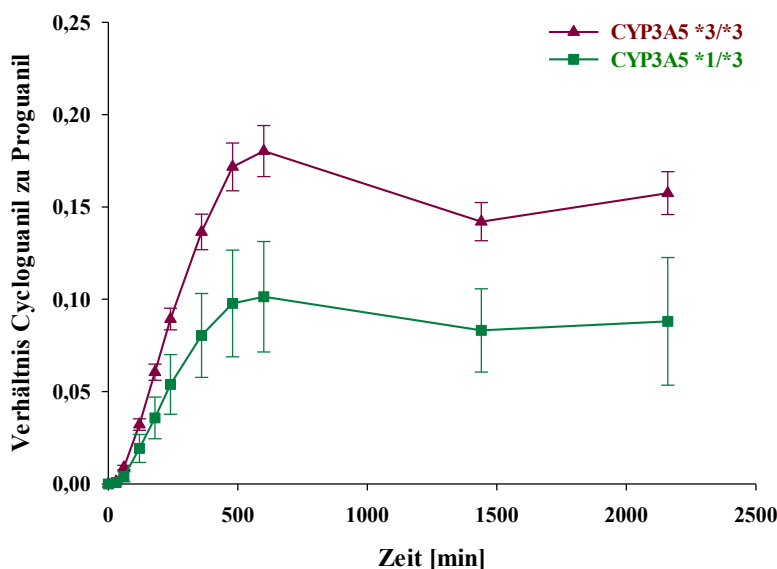


Abbildung 37. Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach *CYP3A5*-Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.7 Multifaktorielle Auswertung aller betrachteten Einflussfaktoren

3.7.1 Demografische Daten, OCT1-Aktivität, CYP2C19- und CYP3A-Aktivität, Rauchen und Kreatinin-Wert

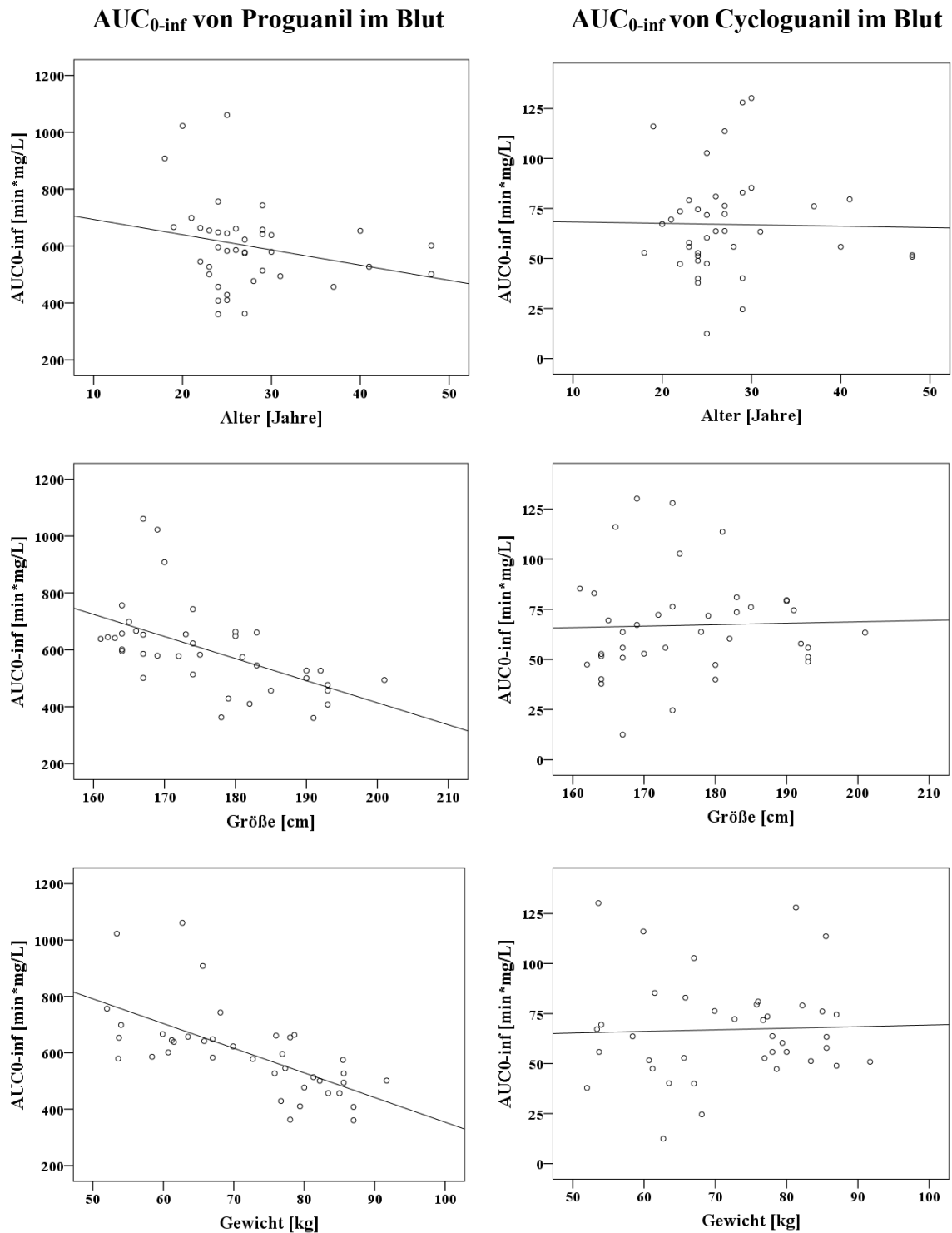
Die Auswertung aller bekannten oder denkbaren Einflussfaktoren auf die $AUC_{0-\text{inf}}$ von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma wurde mittels multipler linearer Regressionsanalyse durchgeführt. Betrachtete Einflussfaktoren waren: die demografischen Daten Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht, der OCT1-*in-vitro*-Score (Tabelle 24), die Rangfolge nach CYP2C19-Aktivität (Tabelle 35), die CYP3A4- und CYP3A5-Aktivität (Träger aktiver versus defizienter Varianten), das Rauchen und der Kreatinin-Wert.

Drei der insgesamt 39 Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer gaben an, zu rauchen. Da bei einer Probandin der Kreatinin-Wert fehlte, wurden die folgenden multiplen linearen Regressionsanalysen nur für 38 Personen durchgeführt. Aus den Kreatinin-Werten wurde auch die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate oder *estimated glomerular filtration rate* (eGFR), als Maß für die Nierenfunktion, mittels Cockcroft-Gault-Formel berechnet:

$$\text{eGFR [ml/min/1,73m}^2\text{]} = \frac{(140 - \text{Alter [Jahre]}) \times \text{Körpergewicht [kg]}}{72 \times \text{Serumkreatinin [\frac{mg}{dl}]}} \times [0,85 \text{ für Frauen}]$$

3.7.1.1 Analyse im Blut

Bevor die Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalysen für Proguanil und Cycloguanil im Blut beschrieben wurden, erfolgte zunächst die grafische Darstellung des Einflusses demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil im Blut (Abbildung 38):



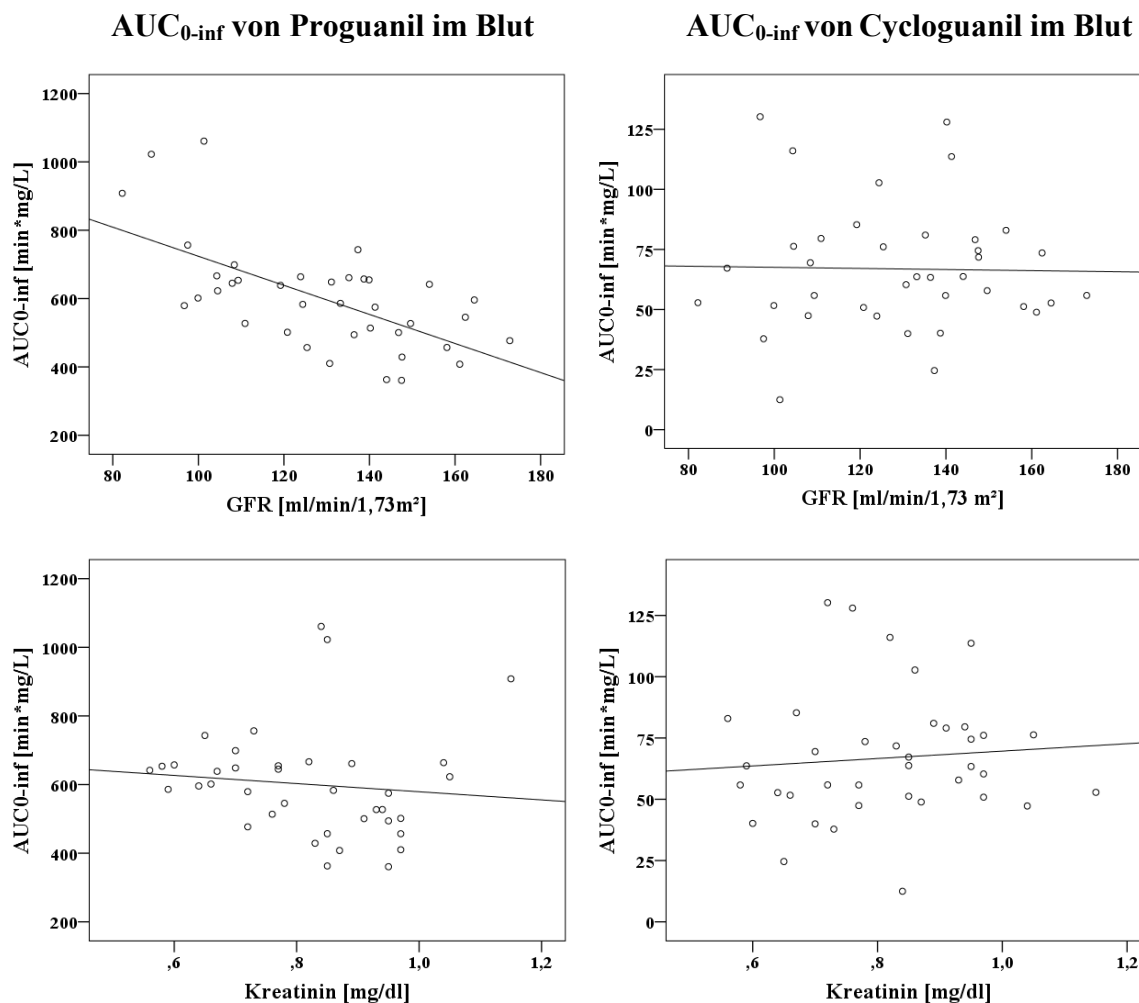


Abbildung 38. Einfluss demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Blut. Die Tatsache, dass die AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut tendenziell mit steigendem Kreatininwert sinkt, ist nicht nachvollziehbar. Bei fehlender statistischer Signifikanz handelt es sich um einen Zufallseffekt. Der starke Abfall der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut mit steigender glomerulären Filtrationsrate (GFR) ist im Wesentlichen auf das Körpergewicht zurückzuführen, das in die Formel nach Cockcroft-Gault eingeht.

3.7.1.1.1 Proguanil

In der multiplen linearen Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut waren, wie in der folgenden Tabelle dargestellt, der Einfluss des Geschlechts, das Gewicht der Probandinnen und Probanden, die CYP2C19- und CYP3A5-Aktivität sowie der Kreatinin-Wert signifikant.

Tabelle 43 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut

Modellzusammenfassung Abhängige Variable: AUC_{0-inf}	R 0,925	R-Quadrat 0,856
Unabhängige Einflussvariablen	Regressions-Koeffizient	P-Wert
Geschlecht	144	0,007
Alter	-	n.s.
Größe	-	n.s.
Gewicht	-6,46	0,001
OCT1-Aktivität	-	n.s.
CYP2C19-Aktivität	-104	<0,001
CYP3A4-Aktivität	-	n.s.
CYP3A5-Aktivität	97,8	0,032
Rauchen	-	n.s.
Kreatinin-Wert	370	0,010

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05), Gütemaße der linearen Regression: R und R-Quadrat

Im Gegensatz zu der monofaktoriellen grafischen Darstellung stieg, wie in Tabelle 43 gezeigt, die AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut um 370 min*mg/L pro 1 mg/dl Kreatinin an. Frauen hatten nach der multifaktoriellen Regressionsanalyse eine um 144 min*mg/L größere AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut als Männer und pro Kilogramm Körpergewicht sank die AUC_{0-inf} um 6,46 Einheiten. Dabei dürfte eine komplette Differenzierung der Faktoren Geschlecht und Körpergewicht, basierend auf unserer Stichprobe, nicht möglich sein. Der CYP3A5-Befund war anders als erwartet, worauf in der Diskussion noch genauer eingegangen wird.

3.7.1.1.2 Cycloguanil

Für die Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut waren die OCT1-Aktivität, die CYP2C19- und CYP3A5-Aktivität signifikant. Aus Tabelle 44 wird auch ersichtlich, dass die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut mit zunehmender Aktivität von OCT1 und CYP2C19 anstieg.

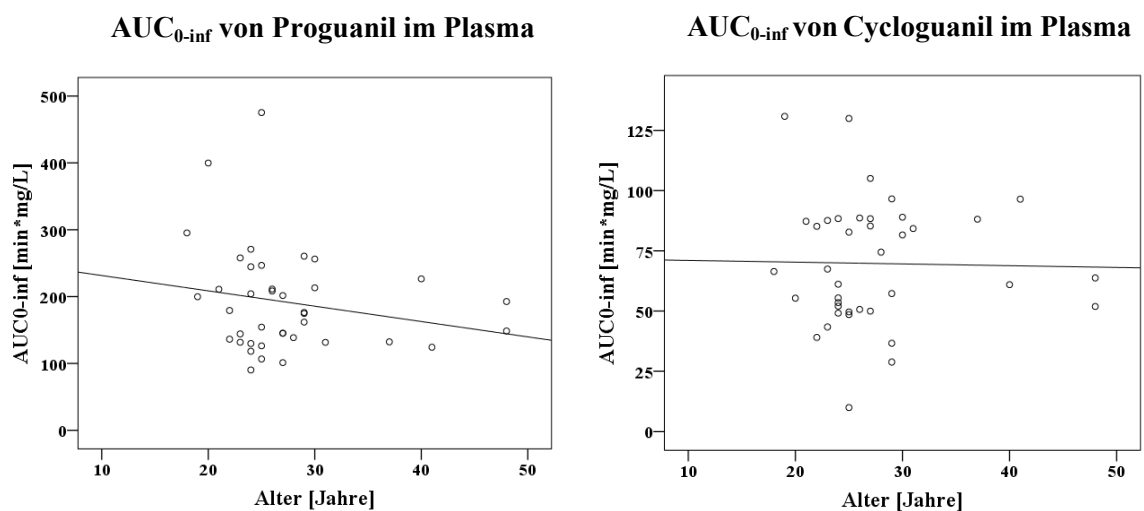
Tabelle 44 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut

Modellzusammenfassung Abhängige Variable: AUC_{0-inf}	R 0,650	R-Quadrat 0,422
Unabhängige Einflussvariablen	Regressions-Koeffizient	P-Wert
Geschlecht	-	n.s.
Alter	-	n.s.
Größe	-	n.s.
Gewicht	-	n.s.
OCT1-Aktivität	21,56	0,032
CYP2C19-Aktivität	15,80	0,037
CYP3A4-Aktivität	-	n.s.
CYP3A5-Aktivität	-31,84	0,036
Rauchen	-	n.s.
Kreatinin-Wert	-	n.s.

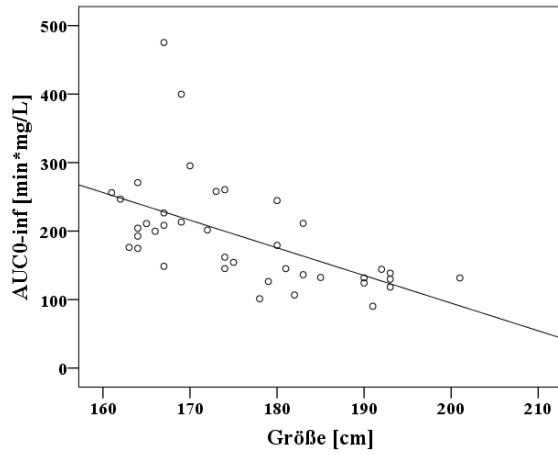
n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05), Gütemaße der linearen Regression: R und R-Quadrat

3.7.1.2 Analyse im Plasma

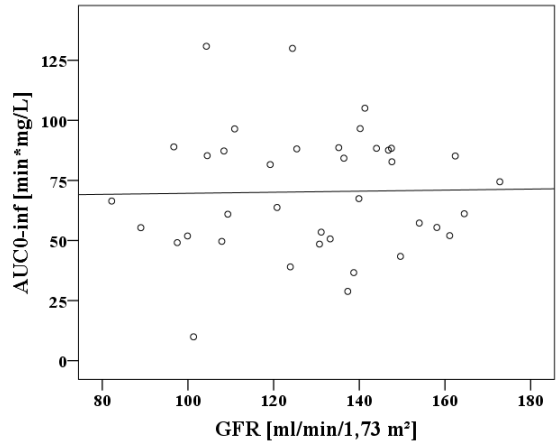
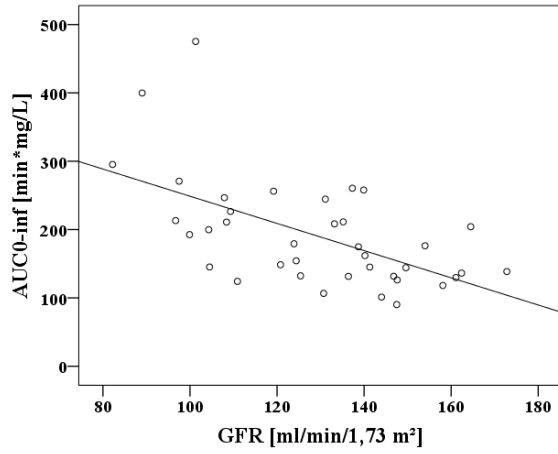
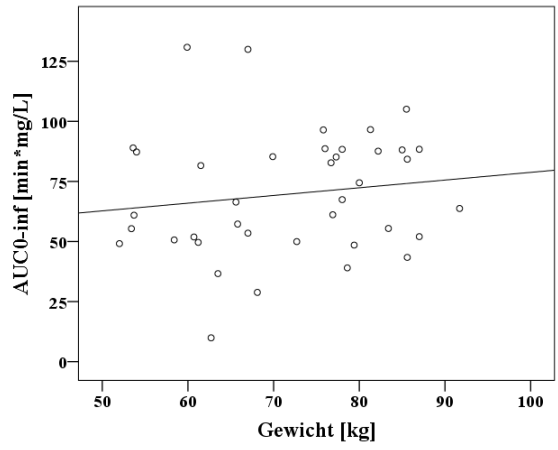
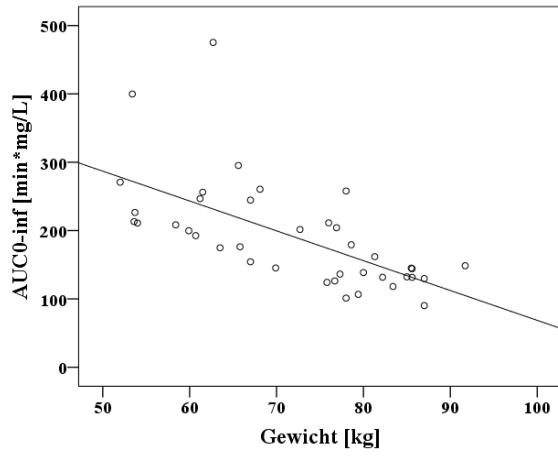
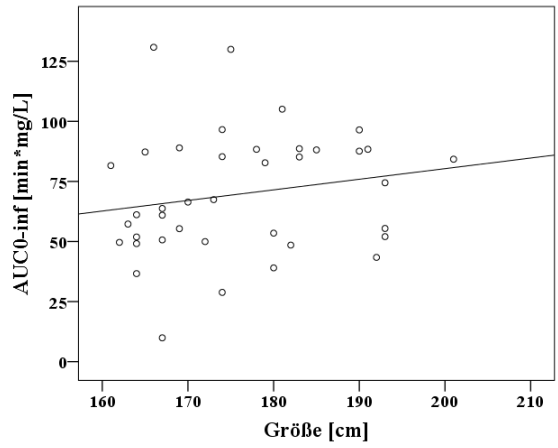
Auch der Einfluss demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil im Plasma konnten grafisch dargestellt werden:



AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma



AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma



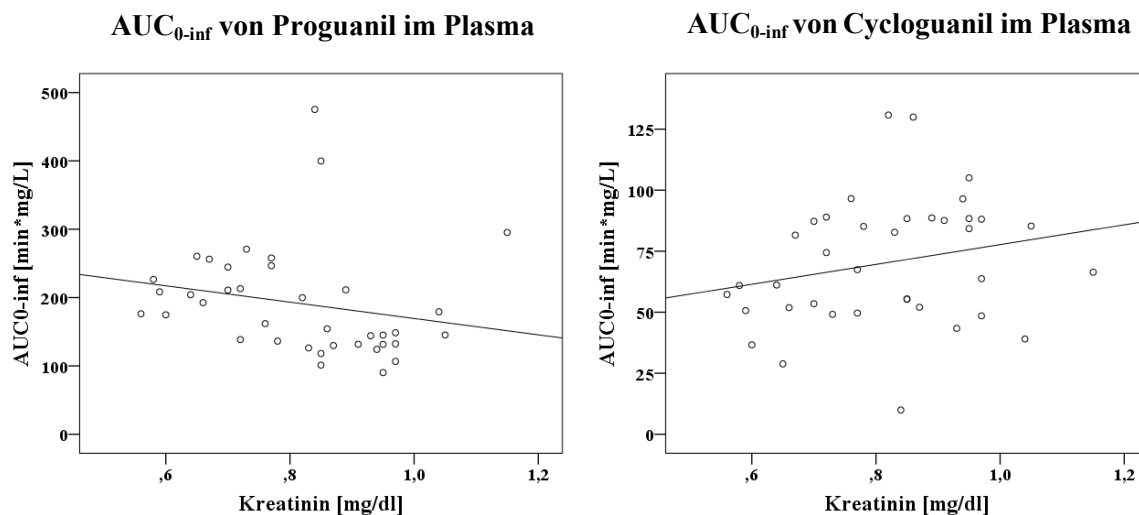


Abbildung 39. Einfluss demografischer Faktoren und der Nierenfunktion auf die AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil im Plasma

3.7.1.2.1 Proguanil

In der für die AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma durchgeführten multiplen linearen Regressionsanalyse waren das Geschlecht und Gewicht der Probandinnen und Probanden sowie die CYP2C19-Aktivität signifikant.

Tabelle 45 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma

Modellzusammenfassung		R	R-Quadrat
Abhängige Variable: AUC_{0-inf}		0,887	0,786
Unabhängige Einflussvariablen	Regressions-Koeffizient	P-Wert	
Geschlecht	92,71	0,006	
Alter	-	n.s.	
Größe	-	n.s.	
Gewicht	-2,44	0,032	
OCT1-Aktivität	-	n.s.	
CYP2C19-Aktivität	-49,67	0,001	
CYP3A4-Aktivität	-	n.s.	
CYP3A5-Aktivität	-	n.s.	
Rauchen	-	n.s.	

Kreatinin-Wert	-	n.s.
-----------------------	---	------

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05), Gütemaße der linearen Regression: R und R-Quadrat

3.7.1.2.2 Cycloguanil

In der multiplen linearen Regression der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma war nur die CYP2C19-Aktivität signifikant.

Tabelle 46 Multiple lineare Regressionsanalyse der AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma

Modellzusammenfassung		
Abhängige Variable: AUC_{0-inf}		
	R	R-Quadrat
	0,749	0,561
Unabhängige Einflussvariablen	Regressions-Koeffizient	P-Wert
Geschlecht	-	n.s.
Alter	-	n.s.
Größe	-	n.s.
Gewicht	-	n.s.
OCT1-Aktivität	-	n.s.
CYP2C19-Aktivität	25,20	<0,001
CYP3A4-Aktivität	-	n.s.
CYP3A5-Aktivität	-	n.s.
Rauchen	-	n.s.
Kreatinin-Wert	-	n.s.

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05), Gütemaße der linearen Regression: R und R-Quadrat

Es bleibt unklar, warum die Faktoren OCT1 und CYP3A5 für die Messung von Cycloguanil im Plasma im Gegensatz zu der Messung im Blut nicht statistisch signifikant waren. Eine einfache Erklärung könnte sein, dass die Messung im Blut weniger Arbeitsschritte umfasste, da keine Separierung von Blutzellen und Plasma erfolgte, weshalb sie insofern etwas genauer war.

3.7.1.3 Anteil der signifikanten Einflussfaktoren an der Variation der AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma

Aus der multiplen linearen Regressionsanalyse aller betrachteten Einflussfaktoren konnte der Anteil der signifikanten Faktoren an der Prädiktion der AUCs, wie in Abbildung 40 dargestellt, ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die Aktivität von CYP2C19 auf alle AUCs Einfluss hatte, während die OCT1-Aktivität ausschließlich zur Prädiktion der AUC von Cycloguanil im Blut beitrug. Für Proguanil im Blut sowie im Plasma ließ sich die Mehrheit der Prädiktion durch die signifikanten Einflussfaktoren erklären, während für Cycloguanil der Großteil dieser unbekannt ist.

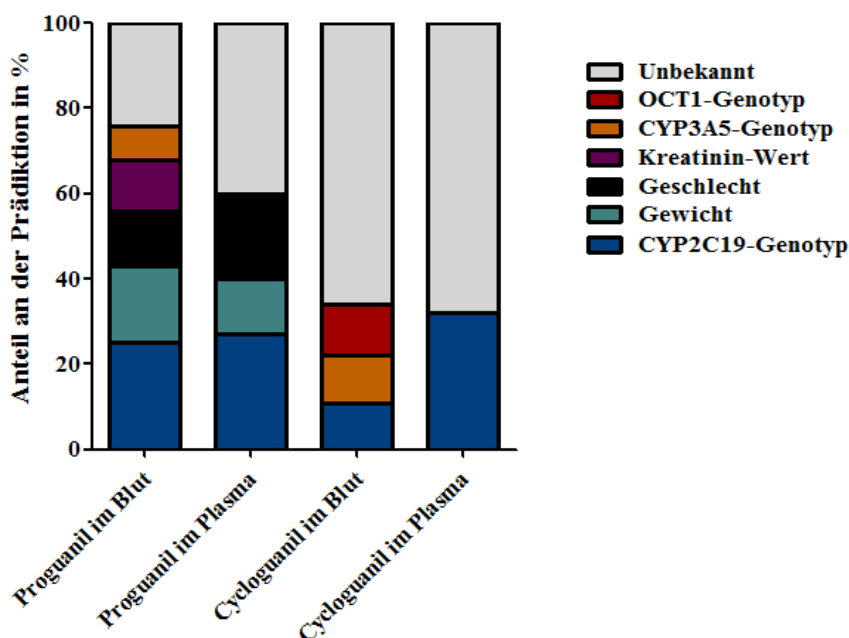


Abbildung 40. Anteil der in der multiplen linearen Regressionsanalyse signifikanten Einflussfaktoren an der Prädiktion der AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma. Für diese Darstellung wurde zunächst ein Faktor berechnet, indem R-Quadrat des Gesamtmodells durch die Summe der quadrierten partiellen Korrelationskoeffizienten geteilt wurde. Dieser Faktor wurde mit den signifikanten quadrierten partiellen Korrelationskoeffizienten multipliziert. Schließlich erfolgte eine Multiplikation mit 100 für die Angabe in %.

3.7.1.4 Darstellung des Einflusses hormoneller Kontrazeptiva auf die AUCs in Blut und Plasma

Um zu prüfen, ob die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva einen Einfluss auf die AUCs hatte, wurde die Studienpopulation in Männer, Frauen mit hormoneller Kontrazeption und Frauen ohne hormonelle Kontrazeption eingeteilt (Tabelle 47). Naturgemäß lag keine ausbalancierte Verteilung vor, was die statistische Analyse erschwerte. Dabei wurden in der Gruppe der Frauen mit hormoneller Kontrazeption die Einnahme der Pille (zehn

Probandinnen) mit der Anwendung der Spirale (zwei Probandinnen) oder des Nuvarings (drei Probandinnen) zusammengefasst.

Tabelle 47 Deskriptive Darstellung der AUC_{0-inf} von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma nach Geschlecht und Einnahme hormoneller Kontrazeptiva

Parameter	Einheit	Geschlecht und Einnahme hormoneller Kontrazeptiva			P-Wert
		Männer	Frauen mit hormoneller Kontrazeption	Frauen ohne hormonelle Kontrazeption	
Anzahl Probandinnen/ Probanden		19	15	5	
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
AUC_{0-inf} Proguanil im Blut	min* mg/L	501 (361 – 664)	654 (514 – 1061)	642 (579 – 756)	<0,001
		503 ± 90,62	708 ± 162	646 ± 69,47	
AUC_{0-inf} Proguanil im Plasma	min* mg/L	132 (90,21 – 211)	245 (162 – 475)	204 (175 – 271)	<0,001
		137 ± 26,95	256 ± 82,27	208 ± 39,03	
AUC_{0-inf} Cycloguanil im Blut	min* mg/L	71,76 (47,00 – 114,0)	55,84 (12,00 – 128,0)	52,71 (38,00 – 130,0)	n.s.
		69,87 ± 17,62	62,83 ± 30,25	68,77 ± 38,77	
AUC_{0-inf} Cycloguanil im Plasma	min* mg/L	85,17 (39,03 – 129,9)	55,34 (9,92 – 130,8)	57,26 (36,63 – 88,97)	n.s.
		78,24 ± 22,91	62,71 ± 28,60	58,62 ± 19,39	

n.s.= nicht signifikant (Niveau 0,05), p-Wert angegeben für Kruskal-Wallis-Test zwischen drei Gruppen

In dem für den Vergleich der drei Gruppen (Tabelle 47) durchgeführten Kruskal-Wallis-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied für die AUCs von Proguanil in Blut und

Plasma. In der im Anschluss durchgeführten einfachen Varianzanalyse mit Post-hoc-Test nach Bonferroni zeigte sich jedoch, dass es nur signifikante Subgruppenunterschiede zwischen Männern und Frauen gab, während zwischen den beiden Subgruppen der Frauen mit und ohne Kontrazeptiva kein signifikanter Unterschied bestand (Tabelle 47).

3.7.2 Kombiniertes Einfluss von OCT1- und CYP2C19-Aktivität auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma

In der Abbildung der folgenden Seite ist der Einfluss der OCT1- und CYP2C19-Aktivität auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma dargestellt. Dabei wurde für CYP2C19 die Gruppierung aus Tabelle 42 vorgenommen. Das Ergebnis der durchgeführten zweifaktoriellen linearen Regressionsanalyse mit dieser CYP2C19-Gruppierung und den drei OCT1-Aktivitätsgruppen ist in der jeweiligen Abbildungslegende gezeigt. Die OCT1-Aktivität war nur für die AUC von Cycloguanil im Blut signifikant.

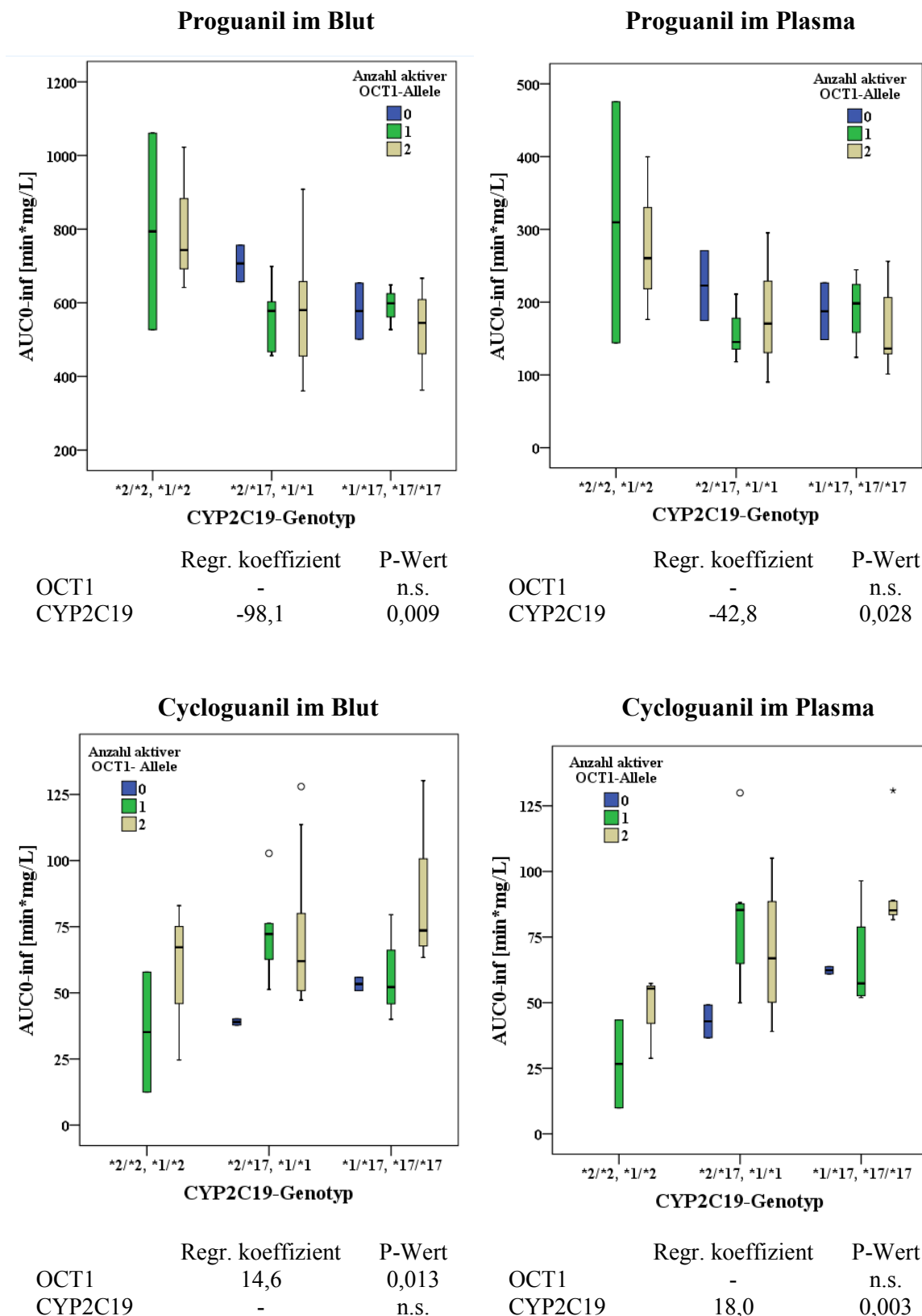


Abbildung 41. Kombiniertes Einfließen von OCT1- und CYP2C19-Aktivität auf die AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma. Dargestellt sind Boxplots der AUCs nach OCT1- und CYP2C19-Aktivität sowie das Ergebnis der zweifaktoriellen Regressionsanalyse.

3.7.3 Untersuchung des Einflusses der Ernährungsgewohnheiten

Um die Ernährungsgewohnheiten der Probandinnen und Probanden besser auswerten zu können, wurden 38 Nahrungsmittel und Getränke zu vier Gruppen zusammengefasst: Proteinreiche Ernährung, kohlenhydratreiche Ernährung, Obstverzehr und Gemüseverzehr. Die Häufigkeit der Aufnahme der verschiedenen Nahrungsmittel war im Fragebogen angegeben worden mit: täglich, 1-6x pro Woche, 1x in 2 Wochen, 1x in einem Monat, 1x in einem Jahr und nie. Diesen sechs Häufigkeiten wurden zur Auswertung Zahlen von eins bis sechs zugeordnet und daraus Rangfolgen für die vier Ernährungsgruppen erstellt.

3.7.3.1 Analyse im Blut

In der multiplen linearen Regressionsanalyse für die AUC_{0-inf} von Proguanil im Blut mit der Auswertung der vier Ernährungsgruppen, der OCT1- und der CYP2C19-Aktivität, war nur die CYP2C19-Aktivität signifikant (p-Wert 0,001).

Auch für die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Blut wurde diese Regressionsanalyse durchgeführt. Hier war ebenfalls nur die CYP2C19-Aktivität signifikant (p-Wert 0,007).

3.7.3.2 Analyse im Plasma

In der multiplen linearen Regressionsanalyse für die AUC_{0-inf} von Proguanil im Plasma mit der Auswertung der vier Ernährungsgruppen, der OCT1- und CYP2C19-Aktivität, war nur die CYP2C19-Aktivität signifikant (p-Wert 0,002).

Für die AUC_{0-inf} von Cycloguanil im Plasma war ebenfalls nur die CYP2C19-Aktivität signifikant (p-Wert <0,001).

Zusammenfassend ließ sich in der multiplen linearen Regressionsanalyse der AUCs von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma kein signifikanter Einfluss von protein- oder kohlenhydratreicher Ernährung oder dem Verzehr von Obst und Gemüse feststellen.

3.8 Unerwünschte Wirkungen von Proguanil in dieser Studie

3.8.1 Von Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern aktiv berichtete unerwünschte Wirkungen

Das Prüfpräparat Proguanil wurde von den Probandinnen und Probanden allgemein gut vertragen. Lediglich bei zehn Personen kamen *adverse events* vor. Bei zwei Teilnehmerinnen und Teilnehmern kam es zu Durchfall beziehungsweise dünnem

Stuhlgang (Tabelle 48). Dies ließ sich, ebenso wie die Übelkeit und das Erbrechen von Proband/in C, mit den in der Fachinformation beschriebenen gastrointestinalen Nebenwirkungen von Proguanil vereinbaren. Proband/in D und E wurde es bei der Blutentnahme schwindelig, was genauso wie der Schmerz der Venenverweilkanüle des rechten Armes von Proband/in F nicht auf die Studienmedikation zurückgeführt wurde. Proband/in G berichtete über eine leicht erhöhte Körpertemperatur von 38,1°C, die nach Ende des ersten Studientages zu Hause gemessen wurde. Es ist bekannt, dass Proguanil sehr selten arzneimittelinduziertes Fieber auslösen kann. Dies war bei einer einmalig nur leicht erhöhten Körpertemperatur hier nicht der Fall.

Tabelle 48 *Adverse events* der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil (ohne das *adverse event* „Kopfschmerzen“)

Probandin/ Proband	OCT1- Aktivität	CYP2C19- Genotyp	Zeit nach Proguanil- gabe/Dauer	<i>Adverse event</i>	Schwere- grad	Kausal- zusammen- hang
A	2	*1/*1	ab ca. 5 h/ etwa 10 Min.	Durchfall	Mild	Möglich
			ab ca. 16,5 h/ etwa 5 Min.	Durchfall	Mild	Möglich
B	1	*1/*17	1,5 h bis 3 h	Sehr dünn Stuhlgang	Mild	Möglich
C	0	*1/*17	8 h bis 10 h	Übelkeit	Mild	Möglich
			10 h	Erbrechen	Mild	Möglich
D	2	*1/*1	6 h	Schwindel bei Blutent- nahme	Mild	Unwahr- scheinlich
E	2	*1/*1	36 h	Schwindel bei Blutent- nahme	Moderat	Unwahr- scheinlich
F	1	*1/*1	0,5 h	Schmerz im rechten Arm (von Braunüle ausgehend)	Mild	Unwahr- scheinlich
G	0	*1/*17	ab ca. 12 h bis 25 h	Erhöhte Körper- temperatur (38,1°C)	Mild	Möglich

Vier Probandinnen und Probanden gaben am Studientag zu Proguanil Kopfschmerzen als *adverse event* an. Wie in der folgenden Tabelle gezeigt, wurden diese als mild bis moderat bewertet und hatten einen möglichen bis unwahrscheinlichen Zusammenhang mit der Studienmedikation:

Tabelle 49 *Adverse event* „Kopfschmerzen“ am Studientag Proguanil

Probandin/ Proband	OCT1- Aktivität	CYP2C19- Genotyp	Zeit nach Proguanil- gabe	<i>Adverse event</i>	Schwere- grad	Kausal- zusammen- hang
C	0	*1/*17	8 h - ca. 12 h	Spannungs- kopfschmerz	Mild	Unwahr- scheinlich
H	2	*1/*1	7 h - 9 h	Leichte Kopf- schmerzen	Mild	Möglich
			10,5 h - 11,5 h	Moderate Kopf- schmerzen	Moderat	Möglich
I	1	*1/*2	8 h - ca. 12 h	Spannungs- kopfschmerz	Mild	Unwahr- scheinlich
J	1	*1/*1	8 h - ca. 12 h	Leichter Kopfschmerz	Mild	Möglich

3.8.2 Ausgewählte unerwünschte Wirkungen erfasst mittels visueller Analogskalen

Mit Hilfe der visuellen Analogskalen (VAS-Fragebögen) sollten Nebenwirkungen der Studienmedikation erfasst werden. Von den für die gesamte Studie erfassten Parametern Mundtrockenheit, Müdigkeit, Sehvermögen, innere Unruhe, Kopfschmerzen, Schwindel, Schweregefühl, Übelkeit, Kälte, Ohrensausen, Herzklopfen und Zittern wurden im Folgenden nicht alle Größen dargestellt. Ausgewertet wurden ausschließlich Parameter mit möglicher Relevanz für die Nebenwirkungen von Proguanil sowie alle Vorkommnisse, die durch Probandinnen und Probanden als *adverse events* (AE) geäußert wurden. Da zu dem Prüfpräparat kein Einfluss auf die Aufmerksamkeit oder Sedation nach Einnahme bekannt ist, wurde die Stanford Sleepiness Scale nicht detailliert ausgewertet. Stattdessen konnte auf die Müdigkeit der Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus den Angaben in den visuellen Analogskalen geschlossen werden.

Die Mehrheit der Probandinnen und Probanden hatte mit Mittelwerten zwischen 0,21 cm und 0,62 cm von 15,4 cm auf der VAS-Skala im Tagesverlauf kaum Kopfschmerzen (Tabelle 50). Weiterhin trat mit Mittelwerten zwischen 0,21 cm und 0,31 cm kaum Übelkeit auf. Betreffend der Sedation war mit Mittelwerten zwischen 1,09 cm und 2,84 cm auf der VAS-Skala keine verstärkte Müdigkeit der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer feststellbar.

Tabelle 50 Auswertung der visuellen Analogskalen der Teilnehmerinnen und Teilnehmer der Analysen zu Proguanil

Zeitpunkt im Bezug zur Proguanil- Dosierung	<i>Adverse event</i> VAS-Wert aller Probandinnen/Probanden [cm]		
	Kopfschmerzen	Übelkeit	Müdigkeit
	Mittelwert ± Standardabweichung		
-60 bis 0 min	0,37 ± 0,65	0,28 ± 0,41	2,69 ± 2,50
90 min	0,32 ± 0,47	0,30 ± 0,40	2,84 ± 2,55
3 h 30 min	0,33 ± 0,59	0,31 ± 0,49	1,84 ± 1,91
5 h	0,27 ± 0,37	0,28 ± 0,44	1,33 ± 1,91
7 h	0,31 ± 0,35	0,23 ± 0,31	1,65 ± 2,01
9h	0,62 ± 1,13	0,26 ± 0,35	1,29 ± 1,81
23 h 30 min	0,21 ± 0,27	0,21 ± 0,22	1,09 ± 1,73

Die visuelle Analogskala reicht von 0 cm bis 15,4 cm.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss genetische Polymorphismen im organischen Kationentransporter OCT1 auf die Pharmakokinetik und Nebenwirkungen des Malaria-Medikamentes Proguanil und dessen aktivem Metaboliten Cycloguanil im Menschen haben. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen einer klinischen Studie 20 Probandinnen und 19 Probanden 200 mg Proguanil *per os* verabreicht und im Anschluss bis 36 Stunden nach Medikamentengabe zu festgelegten Zeitpunkten Blutentnahmen durchgeführt. Die dabei gewonnenen Blut- und Plasmaproben wurden pharmakokinetisch analysiert. Die primäre Zielgröße war die *area under the curve* (AUC), da sie die Exposition der Probandinnen und Probanden gegenüber dem Medikament integriert darstellt und proportional zur Menge des Arzneimittels im Blut ist.

Bereits bekannt ist, dass genetische Polymorphismen im Zytochrom-P450-Enzym 2C19, welches Proguanil in seinen aktiven Metaboliten Cycloguanil umwandelt, Einfluss auf die Konzentration von Proguanil und Cycloguanil im Plasma nehmen (Kerb et al. 2009). Dieser enzymatische Prozess, die Biotransformation, findet in der Leber statt. Unklar war hingegen, wie Proguanil und Cycloguanil, beide eher hydrophile Substanzen, in die Leber aufgenommen werden. Zellexperimente unserer Arbeitsgruppe (Tadjerpisheh 2016) zeigten, dass OCT1 eine bedeutende Rolle in der Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil in die Leber spielt, was inzwischen von unserer sowie einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt wurde (van der Velden et al. 2017; Matthaei et al. 2018). Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen in *OCT1* die Aufnahmerate beider Substanzen beeinflussen (Matthaei et al. 2018).

Zu untersuchen, inwieweit sich genetische Polymorphismen in *OCT1 in vivo*, also im lebenden Menschen, auf die Konzentration von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma auswirken, war Ziel dieser Arbeit.

4.1 Ergebnisse der klinischen Studie im Vergleich mit *in-vitro*-Daten und anderen klinischen Studien zu Proguanil

Grundlage der Planung dieser klinischen Studie waren Untersuchungen am Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen mit unterschiedlichen primären und genetisch modifizierten Zelllinien. In diesen Versuchen wurden die genetischen Polymorphismen im Transporter OCT1 durch Überexpression der

entsprechenden Proteinvarianten in *human embryonic kidney cells* (HEK293-Zellen) dargestellt und der Membrantransport der Substrate Proguanil und Cycloguanil in diesen Zellen gemessen. Bei dem Allel *OCT1*1* handelt es sich um den Wildtyp, der eine normale Transportaktivität besitzt. Die Varianten des *OCT1*-Gens werden, wie in Kapitel 1.6.1 beschrieben, mit *2, *3, etc. beschrieben. Die in der Zellkultur gemessenen Aktivitäten der *OCT1*-Allele sind in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 51 Transportverhalten der *OCT1*-Varianten in HEK293-Zellen für Proguanil und Cycloguanil

<i>OCT1</i> -Allel	Transportaktivität für Proguanil in % vom Wildtyp	Transportaktivität für Cycloguanil in % vom Wildtyp
<i>OCT1*1</i>	100 %	100 %
<i>OCT1*2</i>	71 %	100 %
<i>OCT1*3</i>	44 %	79 %
<i>OCT1*4</i>	20 %	61 %
<i>OCT1*5</i>	0 %	0 %
<i>OCT1*6</i>	0 %	0 %

Die Daten stammen aus Versuchen an Zellkulturen des Instituts für Klinische Pharmakologie Göttingen (Matthaei et al. 2018).

Unter den Probandinnen und Probanden der klinischen Studie waren die Varianten *OCT1*1* bis *4 vertreten, wobei die Allele *OCT1*1* und *OCT1*2* für bezüglich Proguanil und Cycloguanil aktiven und die Allele *OCT1*3* und *OCT1*4* für gering aktiven Transport kodierten.

Aus den pharmakokinetischen Analysen der klinischen Studie ergab sich, dass *intermediate* und *poor transporter* (Trägerinnen oder Träger von ein oder zwei weniger aktiven Allelen) signifikant niedrigere Cycloguanil-Konzentrationen im Blut hatten als *extensive transporter*. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Untersuchungen in der Zellkultur, bei denen Trägerinnen und Träger gering aktiver und defizienter Allele weniger Proguanil in die Leber aufnahmen, weshalb dort der Metabolit Cycloguanil in geringeren Mengen gebildet wurde. Anders als erwartet zeigte sich jedoch, dass die *intermediate* und *poor transporter* keine signifikant erhöhten Proguanil-Konzentrationen im Blut hatten. Aufgrund der Versuche in der Zellkultur, in denen Allel *OCT1*3* und *OCT1*4* deutlich weniger Proguanil aufnahmen, wäre bei Trägerinnen und Trägern dieser Allele eine erhöhte Proguanil-Konzentration zu erwarten gewesen, da eine verminderte Aufnahme von Proguanil in die Leber zu einer erhöhten Blutkonzentration führt (Matthaei et al. 2018). Es stellt sich also die Frage, warum Personen mit geringer aktiven Allelen weniger hohe

Proguanil-Konzentrationen im Blut erreichten, als aus den Versuchen in der Zellkultur erwartet.

Eine Ursache dafür könnte sein, dass Proguanil hauptsächlich über die Nieren eliminiert wird. Laut Fachinformation werden insgesamt etwa 31% - 53% einer verabreichten Dosis Proguanil im Urin wiedergefunden (Fachinformation Paludrine® 2010). Dies lässt sich bestätigen, wenn man die extra-renale *Clearance* von Proguanil aus einer früheren Studie berechnet (Somogyi et al. 1996). In der Studie waren 10 Probanden 100 mg Proguanil *per os* verabreicht worden und über vier Tage Urin gesammelt worden. Die renale *Clearance* betrug in der Studie im Mittel 8,1 l/h. Berechnet man die totale *Clearance* als Quotient der Dosis (100 mg) und AUC (6,3 mg/l), ergibt sich eine totale *Clearance* von 15,9 l/h. Eingesetzt in die folgende Formel, erhält man so eine extra-renale *Clearance* von 7,8 l/h:

$$Clearance_{total} = Clearance_{renal} + Clearance_{extra-renal}$$

Es ergibt sich ein prozentualer Anteil der extra-renalen *Clearance* von Proguanil an der gesamten Proguanil-*Clearance* von 49%. Somit macht die renale *Clearance* von Proguanil in diesem Beispiel 51 % aus. Wenn also etwa 50% des Proguanils renal eliminiert werden, kann höchstens die Hälfte des Medikamentes in die Leber aufgenommen oder hepatisch eliminiert werden. Demzufolge würden Polymorphismen in *OCT1*, welche die Aufnahme von Proguanil in die Leber beeinflussen, *in vivo* einen geringeren Effekt auf die Konzentration von Proguanil im Blut haben, als das der Fall wäre, wenn Proguanil in einem geringeren Umfang renal eliminiert werden würde. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass die in der deutschen Bevölkerung relativ häufigen *OCT1*-Varianten *3 und *4 nicht komplett defizient sind, sondern nur zu reduzierter Transportaktivität führen.

Auch in aktuellen Untersuchungen an Zellkulturen einer anderen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass *OCT1* für die Aufnahme von Proguanil in die Leber verantwortlich ist, während für die renale Elimination von Proguanil und Cycloguanil vor allem der Transporter *OCT2*, der sich in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen befindet, sowie die Transporter *MATE1* und *MATE2-K*, welche sich in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen befinden, verantwortlich sind (van der Velden et al. 2017). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* könnte eine variable Transportrate dieser drei renalen Transporter sowohl die Pharmakokinetik als auch die Pharmakodynamik von Medikamenten, die organische Kationen sind, beeinflussen. Dies wurde unter anderem für das Diabetes-Medikament Metformin nachgewiesen, das Proguanil strukturell ähnlich ist (Motohashi und Inui 2013). Genauere Untersuchungen zu genetischen Polymorphismen in

OCT2, *MATE1* und *MATE2-K* und deren Einfluss auf die Elimination von Proguanil *in vivo* liegen aktuell nicht vor. Außerhalb der starken Expression in der Leber ist für die zahlreichen anderen Expressionsorte von OCT1 (Koepsell et al. 2007) nicht abschließend geklärt, in welchem Umfang der Transporter exprimiert wird und welche Folgen sich aus der Expression in Niere und Darm für die Pharmakokinetik von Proguanil ergeben. Deshalb lassen sich Einflüsse auf die Blutkonzentrationen von Proguanil für verschiedene Lokalisationen von OCT1 im menschlichen Körper noch nur theoretisch beschreiben. Denkbare Zusammenhänge sind in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 52 Einfluss von OCT1 in verschiedenen Lokalisationen im menschlichen Körper auf die Blutkonzentration von Proguanil

Organ, Lokalisation	OCT1-Aktivität, falls im Organ exprimiert		Quelle
	Defizient	Aktiv	
Leber, apikal	Blutkonzentration ↑	Blutkonzentration ↓	(Lozano et al. 2013)
Niere, basolateral	Blutkonzentration ↓	Blutkonzentration ↑	(Tzvetkov et al. 2009)
Darm, basolateral	Blutkonzentration ↑	Blutkonzentration ↓	(Koepsell et al. 2007)

Die Bedeutung der individuellen Aktivität der renalen Elimination für die Blutkonzentration von Proguanil konnte in dieser Arbeit nicht in ihrem sonstigen Umfang aufgezeigt werden. Dies lag daran, dass nur Probandinnen und Probanden mit normaler Nierenfunktion in die Studie eingeschlossen wurden. In den einfachen Korrelationen der AUCs mit der GFR (Abbildung 38 und 39) zeigte sich deshalb nur eine geringe Streuung der glomerulären Filtrationsrate. Weiterhin wurde die Cockcroft-Gault-Formel zur Berechnung der GFR ursprünglich für Personen mit eingeschränkter Nierenfunktion ermittelt, wohingegen die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer gesund waren. Aus diesem Grund war der Einfluss der GFR auf die AUCs in der einfachen Korrelation dem Einfluss des Körpergewichts auf die AUC ähnlich und auch durch dieses zu erklären. Ein Nachteil der vorliegenden Studie war, dass auf die Sammlung von Urin während des Studientages verzichtet wurde. Am Studientag befanden sich die Teilnehmerinnen und Teilnehmer bis 10 Stunden nach Medikamentengabe auf der Probandenstation und kamen am Folgetag morgens und abends für eine Blutentnahme auf die Station. Laut einer früheren Studie, in der für vier Tage Urin gesammelt wurde, wäre eine Urin-Sammelzeit von 12 Stunden ungenügend gewesen, um ausreichende Mengen von Proguanil und Cycloguanil im Urin zu messen (Somogyi et al. 1996). Um Urin über eine angemessene

Zeit sammeln zu können, hätte der Studientag in einer Form geplant werden müssen, die eine höhere Bereitschaft der Probandinnen und Probanden zu einer Teilnahme unter erschwerten Bedingungen vorausgesetzt hätte. Weil ohne Sammelurin der Anteil der renalen *Clearance* an der totalen *Clearance* nicht berechnet werden konnte, ließ sich der Einfluss von OCT1 auf die hepatische *Clearance* von Proguanil nicht genau ermitteln. Andererseits waren die Konzentrationen von Proguanil oder Cycloguanil im Urin hinsichtlich der möglichen therapeutischen Bedeutung von *OCT1*-Polymorphismen für Proguanil oder Cycloguanil weniger relevant.

Eine andere Einschränkung der vorliegenden klinischen Studie war, dass eine relativ kleine Anzahl homozygoter Trägerinnen und Träger der weniger aktiven Allele *OCT1*3* und *OCT1*4* (*poor transporter*) eingeschlossen wurde. Dies ergab sich, weil in vorausgegangenen Publikationen das Allel *OCT1*2* für andere Substrate als weniger aktiv eingestuft worden war (Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2013). Diese Annahme erwies sich im Anschluss in den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen an Zelllinien mit Proguanil und in der pharmakokinetischen Auswertung dieser Studie als nicht zutreffend für den Membrantransport von Proguanil. Hier sollte *OCT1*2* als aktives Allel betrachtet werden. Es lässt sich jedoch festhalten, dass auch mit der kleinen Anzahl an Trägern homozygot gering aktiver Allele der Einfluss des *OCT1*-Genotyps auf das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut signifikant war und damit einen bedeutenden Einfluss auf die Produktion von Cycloguanil hatte (Matthaei et al. 2018).

Weiterhin wurden in der vorliegenden klinischen Studie keine Probandinnen oder Probanden mit den Allelen *OCT1*5* und *OCT1*6* eingeschlossen, welche für einen vollständigen Verlust der OCT1-Aktivität kodieren. Unter Berücksichtigung der Allelfrequenzen für die europäische Bevölkerung ergaben sich kombinierte Allelfrequenzen von 0,899 für Träger/innen von **1* und/oder **2*, von 0,077 für Träger/innen von **3* und/oder **4* und von 0,021 für Träger/innen von **5* und /oder **6* (Seitz et al. 2015). Damit wäre die Häufigkeit homozygoter Träger von **5* und/oder **6* nur etwa 0,04% bzw. nur etwa eine Person unter 2.000, während heterozygote Träger/innen von **5* oder **6* eine Häufigkeit von 4% hatten. Es waren einzelne Personen, die diese Allele trugen, in die Studie eingeschlossen worden. Allerdings konnten diese aus unterschiedlichen Gründen nicht an den Untersuchungen zu Proguanil teilnehmen. Deshalb wurden nur Kombinationen der Allele *OCT1*1* und *OCT1*2*, welche effizient Proguanil und Cycloguanil in die Leber aufnehmen, und Kombinationen der Allele *OCT1*3* und *OCT1*4*, welche nach den *in-vitro*-Daten für Cycloguanil nur eine gering reduzierte

Aktivität hatten, verglichen. Allerdings kann die Aktivität in den Zellkulturen speziell mit den rekombinanten Zelllinien nicht einfach auf den Menschen übertragen werden, da die Proteinvarianten möglicherweise auch mit anderer Expression bzw. Proteinstabilität in der Leber einhergehen könnten. Nur für die seltenen Trägerinnen und Träger der Allele *OCT1*5* und *OCT1*6* wird angenommen, dass sie sowohl Proguanil als auch Cycloguanil nicht in die Leberzelle aufnehmen können. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass die Effekte des *OCT1*-Genotyps auf die Pharmakokinetik von Proguanil in Vergleichen von Kombinationen der Allele *OCT1*1* und *OCT1*2* mit Kombinationen der Allele *OCT1*5* und *OCT1*6* stärker ausgeprägt sind, auch wenn der klinische Beweis wegen der Seltenheit der Varianten nicht möglich war.

Um die vorliegende klinische Studie mit anderen klinische Studien zur Pharmakogenetik des Malaria-Medikamentes Proguanil zu vergleichen, soll zunächst kurz auf den zeitlichen Verlauf der Forschung eingegangen werden. Wie in Abbildung 42 gezeigt, wurden in der Vergangenheit zunächst klinische Studien zu Polymorphismen im Metabolismus von Proguanil durchgeführt. In diesen wurde die Relevanz genetischer Varianten im Cytochrom-P450-Enzym 2C19 für die Pharmakokinetik von Proguanil bestätigt (Helsby et al. 1990; Ward et al. 1991; Helsby et al. 1993; Kaneko et al. 1999; Satyanarayana et al. 2009).

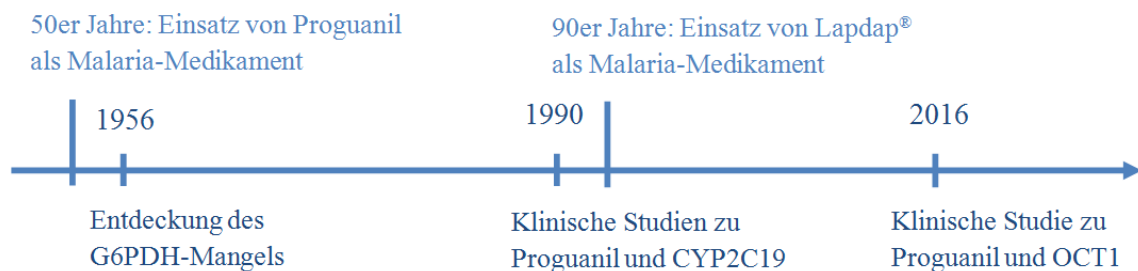


Abbildung 42. Zeitstrahl zu pharmakogenetischen Studien zu Malariamedikamenten und speziell auch zu Proguanil. G6PDH-Mangel: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Dieser führt bei Trägerinnen und Trägern dieser Variante bei oxidativem Stress zu Hämolyse. 1956 wurde bestätigt, dass besonders das Malaria-Medikament Primaquin bei Personen mit G6PDH-Mangel zu hämolytischen Krisen führt (Carson et al. 1956). Auch eine Kombination aus Chlorproguanil und Dapson (Lapdap[®], GlaxoSmithKline) führte zu Hämolyse bei G6PDH-Mangel und wurde 2008 vom Markt genommen. Es zeigte sich, dass in diesem Kombinations-Präparat der oxidative Stress durch Dapson verursacht wurde (Luzzatto 2010). Zum Auftreten hämolytischer Krisen bei Personen mit G6PDH-Mangel unter der Therapie mit Proguanil/Atovaquon (Malarone[®]) gibt es aktuell keine Hinweise.

In der Pharmakogenetik ging man, nachdem man besonders zwischen 1960 und 2000 vor allem Polymorphismen in Enzymen des Medikamenten-Metabolismus untersucht hatte,

dazu über, Polymorphismen in Membrantransportern und deren Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln zu erforschen. Zu diesem Ziel wurde die vorliegende klinische Studie zum Einfluss genetischer Polymorphismen im organischen Kationentransporter OCT1 auf verschiedene Substrate, darunter auch Proguanil, durchgeführt. Ergebnisse anderer klinischer Studien zum Vergleich liegen für Proguanil und OCT1 nicht vor. Dieser Transporter wurde vor allem für das Substrat Metformin beforscht (Shu et al. 2008; Tzvetkov et al. 2009).

Im Allgemeinen waren wichtige pharmakokinetische Parameter der vorliegenden Studie mit Daten aus älteren klinischen Studien zur Pharmakokinetik von Proguanil in Blut und Plasma vergleichbar:

Tabelle 53 Vergleich von *area under the curve* (AUC) und maximaler Konzentration (C_{\max}) im Blut der vorliegenden Studie mit anderen klinischen Studien

Anzahl Probandinnen/ Probanden	AUC [min*mg/L] Proguanil	C_{\max} [µg/L] Proguanil	AUC [min*mg/L] Cycloguanil	C_{\max} [µg/L] Cycloguanil	Studie
Median (Bereich)					
Mittelwert ± Standardabweichung					
39	586 (361 - 1061)	695 (454 - 923)	63,65 (12,5 - 130)	58,00 (8,56 - 119)	[1]
	600 ± 154	681 ± 116	67,0 ± 25,6	60,4 ± 23,0	
9	844 (664 - 957)	980 (730 - 1200)	50,0 (5,46 - 84,0)	50,0 (18,0 - 70,0)	[2]
10	756 ± 225	888 ± 206	43,2 ± 33,6	52,0 ± 32,0	[3]*

[1] Vorliegende Studie, [2] (Wattanagoon et al. 1987), [3] (Somogyi et al. 1996)*. In den Studien wurden 200 mg Proguanil *per os* verabreicht. Ausnahme ist die mit * gekennzeichnete Studie, hier betrug die Proguanil-Dosis 100 mg p.o. und um es vergleichbar zu machen, wurden die dosisabhängigen Größen AUC und C_{\max} bei dieser Studie mit zwei multipliziert. Die einheitliche Darstellung der Parameter dieser Tabelle war wegen fehlender Angaben zu Mittelwert und Standardabweichung in Publikation [2] nicht möglich.

Tabelle 54 Vergleich von *area under the curve* (AUC) und maximaler Konzentration (C_{\max}) im Plasma der vorliegenden Studie mit anderen klinischen Studien

Anzahl Probandin- nen/ Probanden	AUC [min*mg/L] Proguanil	C_{\max} [μ g/L] Proguanil	AUC [min*mg/L] Cycloguanil	C_{\max} [μ g/L] Cycloguanil	Studie
Median (Bereich)					
39	176 (90,2 - 475)	185 (113 - 302)	66,4 (9,92 - 131)	66,8 (7,01 - 115)	[1]
9	179 (160 - 213)	170 (150 - 220)	39,7 (11,8 - 76,0)	41,0 (21,0 - 69,0)	[2]

[1] Vorliegende Studie, [2] (Wattanagoon et al. 1987). In beiden Studien wurden 200 mg Proguanil *per os* verabreicht.

4.2 Bedeutung der Pharmakogenetik für die Wirksamkeit von Proguanil und Bedeutung für die klinische Anwendung des Medikamentes

Im Vermehrungszyklus der Malaria-Erreger wirkt der aktive Metabolit von Proguanil, Cycloguanil, vor allem auf die Entwicklungsstadien der Plasmodien in der Leber (Fachinformation Paludrine® 2010). Daher ist die Betrachtung der Zusammenhänge von *in-vitro*-Versuchen und den Ergebnissen dieser klinischen Studie besonders interessant in Bezug auf diesen Wirkungsort. In parallel aktuell durchgeführten Versuchen am Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen mit menschlichen Leberzellen zeigte sich, dass eine Inhibition von OCT1 mit MPP⁺ zu einer signifikant verringerten Aufnahme von Proguanil in die Leberzellen führt. Weiterhin waren bei OCT1-Inhibition fünffach niedrigere Cycloguanil-Konzentrationen in den Hepatozyten messbar (Matthaei et al. 2018). Auch in der vorliegenden klinischen Studie war die Cycloguanil-Bildung, repräsentiert durch das Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut, bei OCT1-defizienten Probandinnen und Probanden signifikant vermindert. Diese Ergebnisse sprechen für einen relevanten Einfluss der erworbenen und der angeborenen OCT1-Defizienz sowohl auf die Aufnahme von Proguanil in die Leber als auch auf den Metabolismus von Proguanil zu Cycloguanil.

Durch niedrigere Konzentrationen von Cycloguanil in den Leberzellen könnte die Wirksamkeit des Medikamentes gegen hepatische Formen der Malaria-Parasiten vermindert sein. Da in dieser Studie die Wirksamkeit von Proguanil nicht erfasst wurde, konnte nicht geklärt werden, ob durch *OCT1*-Polymorphismen verursachte niedrigere

Konzentrationen von Cycloguanil in Leberzellen tatsächlich in einer schlechteren Wirksamkeit des Arzneimittels resultieren. Aktuell liegen keine klinischen Studien zum Einfluss von Polymorphismen in *OCT1* auf die Wirksamkeit von Proguanil vor. Klinische Studien zum Einfluss von *CYP2C19*-Polymorphismen auf den Metabolismus von Proguanil zeigten, dass bei *CYP2C19-poor metabolizern* keine signifikant verminderte Wirksamkeit des Arzneimittels auftrat (Kerb et al. 2009). Hierbei bleibt unklar, warum kein Einfluss der erheblichen Unterschiede in den Konzentrationen (bis zu sechsfache Variation) des aktiven Metaboliten auf die Wirksamkeit gezeigt werden konnte (Herrlin et al. 2000). Eine nahe liegende Erklärung könnte sein, dass die statistische *Power* aller bisher dazu durchgeführten Studien zu gering war. Die komplette *CYP2C19*-Defizienz, ebenso wie die erblich sehr niedrige Aktivität von *OCT1*, ist recht selten, sodass sehr große Studien erforderlich wären. Die größte in dem Rahmen zu *CYP2C19* durchgeführte Studie umfasste 216 Personen und schloss zehn *CYP2C19-poor metabolizer* ein (Skjelbo et al. 1996). Soweit nur Studien mittlerer Größe möglich wären, wäre es auch denkbar, dass sich kein Einfluss der Polymorphismen in *OCT1* auf die Wirksamkeit von Proguanil zeigen lässt. Dies könnte ferner daran liegen, dass Proguanil selbst eine stärker als bisher angenommene Wirksamkeit gegen Parasiten hat, welche die geringeren Wirkspiegel von Cycloguanil ausgleichen würde. Andererseits wäre es auch denkbar, dass das Medikament über die Entstehung eines weiteren bisher unbekanntem Metaboliten wirkt (Goldstein 2001; Kerb et al. 2009). Da sich jedoch aus Versuchen in der Zellkultur und der vorliegenden Studie ein relevanter Einfluss von Polymorphismen in *OCT1* auf die intrahepatischen Konzentrationen von Cycloguanil ergab und angenommen wird, dass Proguanil hauptsächlich über seinen aktiven Metaboliten Cycloguanil auf die Stadien der Malaria-Parasiten in der Leber wirkt, wäre es auch denkbar, dass *OCT1*-Defizienz einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Proguanil in der Leber hat. Zur Klärung dieses Zusammenhangs sind weitere Versuche und klinische Studien notwendig.

Da Cycloguanil auch auf Stadien der Malaria-Parasiten in den Erythrozyten wirkt, stellt sich die Frage, ob *OCT1* für die Aufnahme von Proguanil oder Cycloguanil in Erythrozyten verantwortlich sein könnte. In der Abbildung auf der folgenden Seite sind die Konzentrationsunterschiede von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma dargestellt.

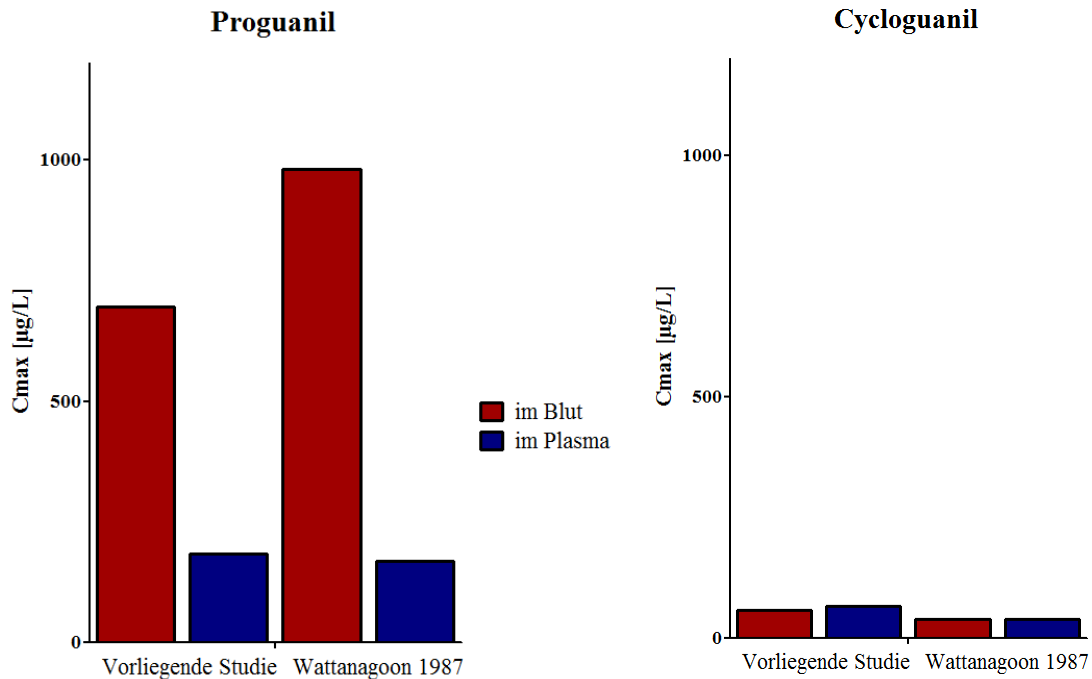


Abbildung 43. Maximale Konzentrationen von Proguanil und Cycloguanil im Blut und Plasma. Vergleich dieser klinischen Studie mit einer älteren Studie (Wattanagoon et al. 1987). Dargestellt sind die medianen Werte der maximalen Blut- und Plasmakonzentrationen (C_{max}) aller Probandinnen und Probanden.

Es fielen deutlich höhere Konzentrationen von Proguanil im Blut als im Plasma auf. In dieser Arbeit wurde auch die genauere Konzentration von Proguanil in Erythrozyten unter Berücksichtigung des Hämatokrit-Wertes berechnet und dargestellt (Abbildung 33). Dabei ergab sich eine etwa 6,5-fach höhere Konzentration von Proguanil in Erythrozyten als im Plasma. Hierbei muss erwähnt werden, dass in dieser Berechnung der Anteil von Proguanil, der in Leukozyten aufgenommen wird, auch in der Erythrozyten-Konzentration enthalten ist und nicht separat berechnet wurde. Laut einer alten Studie aus dem Jahr 1946 von Maegraith befinden sich zwischen 73% und 79% der Konzentration von Proguanil im Blut in Erythrozyten, 14% in Leukozyten und 7% bis 13% im Plasma (Maegraith und Tottey 1946; Wattanagoon et al. 1987). Die hohen Konzentrationen von Proguanil in Blut und Erythrozyten sprechen für eine Aufnahme von Proguanil in Erythrozyten. Zusätzlich zeigte sich, dass die Konzentration von Proguanil im Blut bereits nach 30 Minuten etwa dreifach so hoch war wie die Konzentration von Proguanil im Plasma. Dieser schnelle Konzentrationsanstieg spricht für eine aktive, durch Transporter vermittelte Aufnahme von Proguanil in Erythrozyten. Allerdings war das Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Proguanil nach *OCT1*-Genotyp nicht signifikant. Somit ließ sich kein Einfluss der *OCT1*-Polymorphismen auf die Aufnahme von Proguanil in Erythrozyten

nachweisen, und es konnte ein OCT1-abhängiger Transport von Proguanil in Erythrozyten nicht bestätigt werden. Dies passt zu bisherigen Erkenntnissen, dass es bislang keine Hinweise für eine nennenswerte Expression von OCT1 in der Erythrozytenmembran gibt.

Für Cycloguanil fiel auf, dass die Aufnahme von Cycloguanil in Erythrozyten im Vergleich zur Proguanil-Aufnahme erheblich langsamer ablief (Abbildung 33). Daher könnte es sich um einen passiven, also von Transporterproteinen unabhängigen, diffusionsvermittelten Einstrom von Cycloguanil in Erythrozyten handeln. Gleichzeitig war das Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil nach *OCT1*-Genotyp signifikant. Die einfachste Erklärung dafür dürfte sein, dass *OCT1-poor transporter* weniger Cycloguanil in der Leber bilden. Somit besteht ein geringerer Konzentrationsgradient für Cycloguanil im Blut, und es dringt weniger Cycloguanil in Erythrozyten ein. In diesem Fall würde sich also die Lokalisation von OCT1 in der Leber auf die Aufnahme von Cycloguanil in Erythrozyten auswirken, ohne dass von einer Lokalisation von OCT1 in der Erythrozyten-Membran ausgegangen werden muss. Andererseits könnte das signifikante Verhältnis der Blut- zur Plasmakonzentration von Cycloguanil nach *OCT1*-Genotyp aber auch ein Hinweis darauf sein, dass OCT1 in geringem Maße in der Erythrozyten-Membran exprimiert wird und einen Einfluss auf die Aufnahme von Cycloguanil in Erythrozyten hat. In beiden Fällen könnte OCT1-Defizienz die intraerythrozytären Konzentrationen von Cycloguanil in geringem Maße beeinflussen und eventuell zu einer geringeren Wirksamkeit von Cycloguanil gegen die erythrozytären Formen der Malaria-Parasiten führen. Der Einfluss von OCT1-Defizienz auf die Wirksamkeit von Cycloguanil in Erythrozyten wäre allerdings deutlich geringer zu erwarten als der Einfluss auf die Wirksamkeit von Cycloguanil in den Leberzellen, und es sind auch hier weitere Versuche und klinische Studien zum Nachweis dieser Überlegung notwendig.

Weiterhin konnte in dieser Studie die bereits bekannte Bedeutung des *CYP2C19*-Polymorphismus für die Pharmakokinetik von Proguanil bestätigt werden (Funck-Brentano et al. 1997). Der *CYP2C19*-Genotyp hatte einen signifikanten Einfluss auf die *areas under the curve* von Proguanil und Cycloguanil in Blut und Plasma. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass trotz einer kleinen Anzahl von fünf Probandinnen und Probanden mit defizienten Allelen der Einfluss der CYP3A5-Aktivität auf die *area under the curve* von Cycloguanil im Blut signifikant war. In welchem Umfang CYP3A5 im Metabolismus von Proguanil eine Rolle spielt, ist im Vergleich zum *CYP2C19*-Polymorphismus nicht geklärt (Funck-Brentano et al. 1997; Kerb et al. 2009). Unerwarteterweise hatten CYP3A5-

defiziente Probandinnen und Probanden signifikant höhere AUC-Werte für den Metaboliten Cycloguanil im Blut als solche mit normaler CYP3A5-Aktivität. Weiterhin fiel in der Auswertung der Ergebnisse dieser Studie auf, dass in der Darstellung des Verhältnisses von Cycloguanil zu Proguanil im Blut nach *CYP3A5*-Genotyp Probandinnen und Probanden mit defizienten Allelen ein höheres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut hatten als solche mit normaler *CYP3A5*-Aktivität (Abbildung 37). Das würde bedeuten, dass Individuen mit einer verminderten *CYP3A5*-Enzymaktivität mehr Cycloguanil bilden als Individuen mit einer normalen Enzymaktivität, was nicht denkbar ist. Wenn *CYP3A5*, wie angenommen, parallel zu *CYP2C19* an der Umwandlung von Proguanil zu Cycloguanil beteiligt ist (Abbildung 44), wäre das Gegenteil zu erwarten gewesen. Für diese Beobachtung gibt es mehrere theoretisch mögliche Erklärungen.

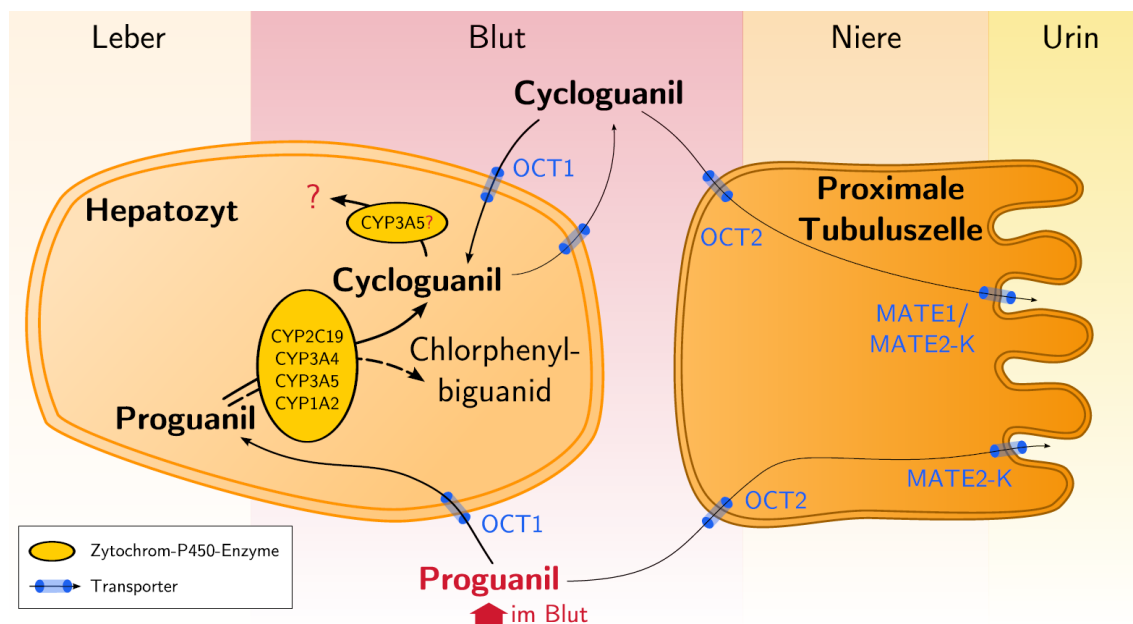


Abbildung 44. Transport- und Stoffwechselwege von Proguanil und seinem Metaboliten Cycloguanil im Menschen. Proguanil wird von OCT1 aus dem Blut in die Leberzelle aufgenommen. Dort wird es durch Cytochrom-P450-Enzyme zu Cycloguanil und Chlorphenylbiguanid verstoffwechselt. Unklar ist, ob Cycloguanil in der Leber zu einem weiteren Metaboliten umgewandelt wird und ob CYP3A5 daran beteiligt sein könnte. Auch Cycloguanil wird über OCT1 in die Leber aufgenommen. In der Niere werden Proguanil und Cycloguanil durch OCT2 in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und über die Transporter MATE1 und MATE2-K in den Urin ausgeschieden.

Da für Cycloguanil nicht klar ist, ob es zu einem weiteren Metaboliten verstoffwechselt wird, könnten höhere Cycloguanil-Konzentrationen bei *CYP3A5*-defizienten Probandinnen und Probanden darauf hinweisen, dass *CYP3A5* eine Rolle im weiteren Metabolismus von Cycloguanil spielt. Somit würden *CYP3A5*-defiziente Individuen Cycloguanil in geringerem Maße weiter verstoffwechseln und hätten höhere Cycloguanil-

Konzentrationen (Abbildung 44). Eine andere Erklärung könnte sein, dass CYP3A5 insbesondere bei der Bildung des inaktiven Metaboliten Chlorphenylbiguanid eine Rolle spielt. Dann könnten im Enzym CYP3A5-gering aktive Individuen über CYP2C19 und/oder über CYP3A4 statt Chlorphenylbiguanid mehr Cycloguanil bilden. Aktuell gibt es keine genaueren Untersuchungen zu den beiden genannten Stoffwechselwegen, weshalb diese zunächst nur theoretisch diskutiert werden können. Denkbar wäre darüber hinaus auch, dass Kopplungen von auf einem Chromosom benachbarten Genvarianten den beobachteten Effekt erklären. Allerdings sind solche Kopplungen zwischen CYP3A5 und dem benachbarten CYP3A4 bisher nicht bekannt und bleiben damit gegenwärtig nur eine Spekulation, der weiter nachgegangen werden müsste. Interessant sind Überlegungen zum CYP3A5-Metabolismus des Malaria-Medikamentes Proguanil aufgrund der Tatsache, dass bei Afrikanern vor allem genetische Varianten mit hoher CYP3A5-Aktivität vorkommen. Nur etwa 10% bis 20% der afrikanischen Bevölkerung hat eine defiziente CYP3A5-Aktivität, im Vergleich zu etwa 90% der kaukasischen Bevölkerung (Tabelle 55). Das könnte bedeuten, dass die Mehrheit der afrikanischen Bevölkerung aufgrund eines generell sehr aktiven CYP3A5-Metabolismus weniger Cycloguanil bildet. Ob dem so ist und welchen Einfluss das auf die Wirksamkeit von Proguanil hat, müsste in klinischen Studien untersucht werden.

Tabelle 55 Häufigkeit genetischer Polymorphismen mit Aktivitätsverlust von OCT1, CYP2C19, CYP3A4 oder CYP3A5 in verschiedenen Bevölkerungsgruppen

Transporter/ Enzym	Häufigkeit genetischer Polymorphismen resultierend im Aktivitätsverlust des Transporters/Enzyms in der Population			Quelle
	Europäer	Afrikaner*	Asiaten**	
OCT1	8% homozygot defizient***	0,26 % homozygote Träger von *2	Nur 2% heterozygot defizient	(Seitz et al. 2015)
CYP2C19	2-6% <i>poor metabolizer</i>	10-20% <i>poor metabolizer</i>	15-30% <i>poor metabolizer</i>	(Wijnen et al. 2007)
CYP3A4	Komplette Defizienz sehr selten	Komplette Defizienz sehr selten	Komplette Defizienz sehr selten	(Werk et al. 2014)
CYP3A5	91,5% homozygot defizient	16,9% homozygot defizient	42,25% homozygot defizient	(Zeigler- Johnson et al. 2004; Lamba et al. 2012)

*Südlich der Sahara lebend, **Chinesen, ***sofern man auch die Träger/innen von *2 als defizient einordnet, sonst wäre der Anteil geringer; wenn nur die Träger/innen der Allel *3, *4, *5 und *6 als defizient bezeichnet werden, wäre der Anteil nur etwa 1% je nach Allelfrequenzen.

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass OCT1-Defizienz zu niedrigeren Konzentrationen von Cycloguanil in Leberzellen führt. Damit könnte die Wirksamkeit des Medikamentes gegen die hepatischen Formen der Malaria-Parasiten vermindert sein. In einem geringeren Umfang könnte OCT1-Defizienz außerdem auch die Wirksamkeit von Cycloguanil gegen erythrozytäre Formen der Malaria-Parasiten verringern. Aktuell liegen nur wenige Studien vor, in denen der Einfluss von genetischen Polymorphismen in Enzymen und Transportern auf Wirkung und Nebenwirkungen von Malaria-Medikamenten untersucht wurde (Kerb et al. 2009). Auch für Proguanil können ohne weitere klinische Studien keine endgültigen Aussagen über den Einfluss von Polymorphismen in *OCT1* auf die Wirksamkeit und die klinische Anwendung des Medikamentes gemacht werden. Für solche Studien wäre eine relativ große Anzahl an Teilnehmerinnen und Teilnehmern notwendig, da nur etwa 1% der europäischen Bevölkerung homozygote bzw. gemischt-homozygote Trägerinnen und Träger bezüglich Proguanil gering aktiver *OCT1*-Allele sind. In Malaria-Regionen ist OCT1-Defizienz sogar noch weniger verbreitet. Etwa 2% der asiatischen Bevölkerung und unter 0,26% der afrikanischen Bevölkerung südlich der Sahara sind homozygote Trägerinnen und Träger defizienter *OCT1*-Allele (Tabelle 55). Weitere klinische Studien wären außerdem nötig, um Aussagen über die individuelle Anpassung der Dosierung des Malaria-Medikaments Proguanil an beispielsweise den *OCT1*-Genotyp treffen zu können, um im Sinne der individualisierten Medizin eine bestmögliche Arzneimittel-Wirksamkeit und ein möglichst geringes Auftreten von Nebenwirkungen zu erreichen. Die Notwendigkeit sehr großer Studien ergibt sich damit einerseits aus der geringen Häufigkeit der relevanten Genotypen. Allein um zehn Afrikaner mit den gering aktiven Genotypen zu finden, müssten 4000 Personen untersucht werden. Andererseits hängt in diesen zehn Personen wiederum die Wahrscheinlichkeit und Schwere der Malaria-Infektion von vielen Faktoren ab, darunter insbesondere von der allgemeinen Expositionsprophylaxe und dem Gesundheitszustand.

4.3 Arzneimittel-Nebenwirkungen und -Wechselwirkungen

Durch genetische Polymorphismen verursachte Variationen in den Wirkspiegeln von Malaria-Medikamenten können nicht nur zu einer verminderten Wirksamkeit der Substanzen, sondern auch zu einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen führen (Kerb et al. 2009). In der vorliegenden Studie traten bei 7,7% der Probandinnen und Probanden leichte gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Durchfall und Erbrechen, auf. In einer älteren Studie traten bei bis zu 40% der Patientinnen und Patienten Nebenwirkungen

wie Bauchschmerzen oder Erbrechen auf. In der Studie waren Polymorphismen in *CYP2C19* untersucht worden. Dabei fielen keine Unterschiede im Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich von *poor* mit *extensive metabolizern* auf. Es ließ sich aber ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Konzentration von Proguanil und dem Auftreten von Nebenwirkungen feststellen (Kaneko et al. 1999). Für diesen Zusammenhang spricht auch, dass in der vorliegenden Studie, in der 200 mg Proguanil verabreicht worden waren, weniger gastrointestinale Nebenwirkungen auftraten als in der älteren Studie, in der 300 mg Proguanil appliziert wurden. Aus den Ergebnissen der vorliegenden klinischen Studie ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nebenwirkungen des Medikaments und dem *OCT1*-Genotyp feststellen. Allerdings war diese Studie nicht zur Erfassung von Nebenwirkungen von Proguanil ausgelegt und umfasste nur eine relativ kleine Anzahl von Probandinnen und Probanden. Es zeigte sich aber, dass *OCT1*-defiziente Individuen entgegen den Erwartungen keine erheblich erhöhten Konzentrationen von Proguanil im Blut aufwiesen. Da eine stärkere Toxizität eines Arzneimittels bei erhöhten Medikamenten-Konzentrationen entsteht, wäre somit das vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen bei der Einnahme von Proguanil bei *OCT1*-defizienten Individuen unwahrscheinlich (Tzvetkov et al. 2016). Weiterhin handelt es sich bei Proguanil um ein eher gut verträgliches Medikament. Während vieler Jahre der Malaria-Prophylaxe mit Proguanil traten sehr selten schwerwiegende Nebenwirkungen auf (Kaneko et al. 1999). Das Auftreten von Nebenwirkungen könnte gemeinsam mit der Wirksamkeit von Proguanil in künftigen klinischen Studien erfasst und für *OCT1*-Defizienz genauer charakterisiert werden.

Im klinischen Alltag sind nicht nur Nebenwirkungen eines Arzneimittels, sondern auch seine Wechselwirkung mit anderen Medikamenten relevant. Der Einfluss von Membrantransportern ist hierfür in geringerem Umfang relevant als die Bedeutung der Hemmung oder Induktion von Zytochrom-P450-Enzymen (van der Velden et al. 2017). Dennoch kann auch die Bedeutung der Hemmung von Medikamenten-Transportern für Arzneimittel-Wechselwirkungen untersucht werden. Eine interessante Frage ist, ob andere Malariamedikamente, die teilweise zusammen mit Proguanil verabreicht werden, *OCT1* hemmen und so zu einer verminderten Bioaktivierung von Proguanil führen können. In aktuellen Versuchen mit HEK293-Zellen wurde das Inhibitions-Potential von elf Malaria-Medikamenten auf *OCT1* untersucht. Keines der untersuchten Malaria-Medikamente inhibierte *OCT1* signifikant. Unter den analysierten Substanzen waren Proguanil und Cycloguanil selbst sowie die in Kombination mit Proguanil verabreichten Medikamente

Chloroquin und Atovaquon (van der Velden et al. 2017). Das spricht dafür, dass das Auftreten von Arzneimittel-Wechselwirkungen durch OCT1-Inhibition bei beispielsweise Kombination von Atovaquon mit Proguanil (Malarone[®]) unwahrscheinlich ist. Weiterhin hatte die Inhibition von OCT1 auch durch andere Medikamente, wie beispielsweise Spironolacton, Verapamil oder Amitriptylin, in den meisten Fällen nur begrenzte Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln. Allerdings könnten diese Auswirkungen bei OCT1-Defizienz deutlicher sein (Ahlin et al. 2008). In der Malariaprophylaxe mit Proguanil bei Diabetikern, die Metformin einnehmen, könnte relevant sein, dass sich Metformin und Proguanil strukturell sehr ähnlich sind und beide über OCT1 in die Leber aufgenommen werden. Somit könnte es zu Arzneimittel-Wechselwirkungen kommen (van der Velden et al. 2017). Zur weiteren Klärung des Einflusses der medikamenten-induzierten Inhibition von OCT1 auf das Auftreten von Arzneimittel-Wechselwirkungen ist die Durchführung klinischer Studien nötig.

Arzneimittel-Wechselwirkungen und Zytochrom-P450-Enzyme betreffend, kann die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva die Aktivität von CYP2C19 hemmen (Wijnen et al. 2007). In der von uns durchgeführten Studie konnte kein signifikanter Einfluss der Einnahme hormoneller Kontrazeptiva auf die AUC von Proguanil im Blut festgestellt werden. In einer anderen klinischen Studie wurde gezeigt, dass sowohl Schwangerschaft als auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva die Umwandlung von Proguanil zu Cycloguanil hemmen. Dies könnte durch eine östrogen-vermittelte Inhibition von CYP2C19 bedingt sein (McGready et al. 2003a). Wenn weniger Cycloguanil gebildet wird, wäre eine höhere Menge von Proguanil im Blut messbar, was in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnte. Es müsste in weiteren Studien geklärt werden, ob die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva zu verminderten Wirkspiegeln des aktiven Metaboliten Cycloguanil führt und dadurch die Wirksamkeit des Malaria-Medikamentes Proguanil beeinflusst wird.

Weiterhin können auch andere Arzneimittel, die in Malaria-Gebieten zusammen mit Proguanil verabreicht werden, die Aktivität von CYP2C19 beeinflussen. Ritonavir, ein Medikament zur HIV-Therapie beispielsweise, hemmt ebenfalls die Aktivität von CYP2C19. Rifampicin, ein Arzneimittel zur Behandlung von Tuberkulose, induziert hingegen die Aktivität von CYP2C19 (Wijnen et al. 2007). Inwieweit sich diese Einflüsse beider Medikamente allerdings auf die Wirksamkeit von Malaria-Therapien auswirken, ist aktuell noch nicht abschließend geklärt (van der Velden et al. 2017).

4.4 Entstehung von Resistenzen gegenüber Proguanil

Resistenzen in Malaria-Erregern können sowohl durch Prozesse in den Parasiten, als auch im Menschen bedingt sein. Im Malaria-Parasiten tragen Varianten in drei Mechanismen zur Entstehung von Resistenzen bei: Im Transport, Metabolismus und am Angriffspunkt von Medikamenten (Horn und Duraisingh 2014). Für die Wirksamkeit von Proguanil relevante Mutationen in Arzneimittel-Angriffspunkten wurden in der Einleitung erläutert. Aber auch Transporter sind für die Selektion resistenter Erreger relevant. Beispielsweise sorgen die Transporter-Gene *PfMDR1* und *PfCRT1* in Vakuolen von Plasmodien dafür, dass Malaria-Parasiten gegen Chloroquin resistent sind. Anhand der Variation der Anzahl der Kopien von *PfMDR1* lässt sich sogar das *Outcome* der Malaria-Therapie vorhersagen (Kerb et al. 2009). Über die Expression von OCT1 (bzw. dem entsprechenden orthologen Protein) in Malaria-Parasiten liegen aktuell allerdings keine Erkenntnisse vor.

Der hauptsächliche Mechanismus, der in Menschen für die Selektion resistenter Malaria-Erreger verantwortlich ist, sind, wie allgemein in der anti-infektiven Therapie, wahrscheinlich subtherapeutische Arzneimittel-Dosen (Klein 2013). In diesem Zusammenhang könnte OCT1-Defizienz ebenfalls eine Rolle spielen, denn in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in *OCT1* sich auf die Bioverfügbarkeit von Proguanil auswirken, indem sie die Aufnahme von Proguanil aus dem Blut in die Leberzellen beeinflussen. Dadurch wird weniger Proguanil zu Cycloguanil aktiviert. In der Konsequenz wären Malariaparasiten sowohl in der Leber als auch in Erythrozyten niedrigeren Dosen des Medikamentes ausgesetzt. Dadurch könnten resistente Parasiten überleben und sich weiter vermehren (Klein 2013). Somit könnte OCT1-Defizienz die Selektion resistenter Parasiten begünstigen. In diesem Zusammenhang ist auch die Betrachtung der weltweiten Verteilung der *OCT1*-Allele interessant. Im Afrika südlich der Sahara ist OCT1-Defizienz beispielsweise deutlich weniger verbreitet als in Europa (Tabelle 55).

Nebenwirkungen eines Medikamentes können dazu führen, dass ein Arzneimittel seltener eingenommen wird und geringere therapeutische Dosen erreicht werden. Das würde auch zur Selektion resistenter Parasiten beitragen. Aktuell gibt es allerdings keinen Hinweis darauf, dass Polymorphismen in *OCT1* zu stärkeren Nebenwirkungen von Proguanil führen. Auch Studien zu Polymorphismen in *CYP2C19* stellten keinen Zusammenhang des Genotyps mit einer geringeren Wirksamkeit von Proguanil oder dem Auftreten von Nebenwirkungen fest (Kerb et al. 2009). Jedoch war wie bereits erwähnt die statistische

Power dieser Studien wegen der relativen Seltenheit der relevanten Genotypen nicht sehr groß. Deshalb können die Effekte solcher Polymorphismen auf Nebenwirkungen von Proguanil nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin können auch Arzneimittel-Wechselwirkungen zu geringeren therapeutischen Dosen führen (Kerb et al. 2009; van der Velden et al. 2017). Wie weiter vorn erwähnt, wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die Einnahme oraler Kontrazeptiva die Cycloguanil-Produktion hemmen kann (McGready et al. 2003a), was in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnte. Es müsste also in weiteren Studien untersucht werden, ob die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva einerseits die Wirksamkeit von Proguanil beeinträchtigen kann und andererseits durch niedrigere therapeutische Dosen auch die Entwicklung von Resistenzen begünstigen könnte.

Inwieweit sich OCT1-Defizienz auf die Selektion resistenter Malaria-Erreger auswirkt, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Hier wäre es interessant herauszufinden, inwieweit sich genetische Polymorphismen im Membrantransporter OCT1 auf die absolute orale Bioverfügbarkeit von Proguanil auswirken und in welchem Maße die *OCT1*-Polymorphismen zur Entstehung von Resistenzen gegen diese Substanz beitragen.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass OCT1-Defizienz die Blutspiegel des aktiven Metaboliten von Proguanil, Cycloguanil, *in vivo* beeinflusst. Genauere Erkenntnisse über den Zusammenhang dieser Tatsache mit der Wirksamkeit und dem Auftreten von Nebenwirkungen und Wechselwirkungen bei der Anwendung von Proguanil könnten weitere Versuche und klinische Studien liefern. Aber auch Tierexperimente zum Beispiel mit genetisch modifizierten Mäusen, die Kombinationen von CYP2C19- und OCT1-Defizienz tragen, wären denkbar. In diesen ließe sich die Malaria-Infektion studieren, da es in diesem Bereich leicht nachweisbare rekombinante fluoreszierende Malaria-Parasiten gibt (Amino et al. 2006). Zum einen würden diese Untersuchungen zum allgemeinen Verständnis der Zusammenhänge von Polymorphismen in Arzneimittel-Transportern und der Pharmakokinetik von Medikamenten beitragen. Zum anderen könnte dieses Wissen für die individuelle Dosierung von Proguanil genutzt werden. In der Kombination mit Atovaquon (Malarone[®]) wird Proguanil weit verbreitet zur Malaria-Prophylaxe eingesetzt. Somit könnten bessere Wirkspiegel bei Patienten erzielt werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die Bedeutung erreichter Wirkspiegel für die Selektion resistenter Malaria-Parasiten untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der Erforschung des Einflusses von Polymorphismen in Arzneimittel-Transportern auf die Pharmakokinetik von Medikamenten gibt es aktuell nur begrenzte Daten zum organischen Kationentransporter OCT1 und seiner Bedeutung in Menschen. *In-vitro*-Versuche haben gezeigt, dass das Malaria-Medikament Proguanil und sein Metabolit Cycloguanil Substrate von OCT1 sind. Außerdem hatten Polymorphismen in *OCT1* einen relevanten Einfluss auf die Aufnahme von Proguanil in die Leber. Zellen mit OCT1-Suppression nahmen weniger Proguanil auf und bildeten weniger aktiven Metaboliten Cycloguanil. Inwieweit sich genetische Polymorphismen in *OCT1* auf die Pharmakokinetik von Proguanil *in vivo* auswirken, wurde bisher nicht untersucht. Deshalb ist Grundlage dieser Doktorarbeit eine klinische Studie, in der 39 Probandinnen und Probanden 200 mg Proguanil *per os* verabreicht wurden. Aus den bis 36 Stunden nach Medikamentengabe erfolgten Blutentnahmen wurden wichtige pharmakokinetische Parameter in Blut und Plasma ermittelt.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass OCT1-defiziente Probandinnen und Probanden signifikant niedrigere Konzentrationen von Cycloguanil im Blut hatten. Dies bestätigt die Annahme, dass OCT1-Defizienz zu einer verminderten Aufnahme von Proguanil in die Leber führt und somit weniger Proguanil zu Cycloguanil aktiviert wird. Inwieweit dieser Effekt allerdings die Wirksamkeit von Proguanil beeinflusst, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden. Es zeigte sich kein Zusammenhang von Polymorphismen in *OCT1* mit dem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen in der Therapie mit Proguanil. Im Kontext der zunehmenden Entwicklung von Resistenzen gegen Malaria-Medikamente könnten verringerte therapeutische Dosen von Cycloguanil zur Selektion resistenter Malaria-Erreger beitragen.

Zunächst unerwartet angesichts der Messungen in der Zellkultur, hatten in der klinischen Studie OCT1-defiziente Probandinnen und Probanden keine erheblich höheren Konzentrationen von Proguanil im Blut. Die wichtigste Erklärung hierfür könnte sein, dass Proguanil bis zu etwa 50% renal eliminiert wird und dadurch Einflüsse auf die hepatische Elimination eine begrenzte Rolle spielen. Darüber hinaus sind die in dieser Studie gefundenen Varianten von OCT1 nicht komplett defizient, was den Proguanil-Membrantransport angeht.

Eine etwa dreieinhalbfach höhere Konzentration von Proguanil im Blut als im Plasma deutete darauf hin, dass Proguanil aktiv in Erythrozyten aufgenommen wird. Eine relevante Beteiligung von OCT1 an dieser Aufnahme konnte aber nicht bestätigt werden.

In dieser Studie konnte die bereits bekannte Bedeutung von Varianten in CYP2C19 für die Pharmakokinetik von Proguanil bestätigt werden. Im Zusammenhang mit Arzneimittel-Wechselwirkungen ließ sich jedoch kein Einfluss der Einnahme oraler Kontrazeptiva auf CYP2C19 und die Konzentrationen von Proguanil im Blut feststellen. Weiterhin hatten, entgegen den Erwartungen, CYP3A5-defiziente Probandinnen und Probanden ein höheres Verhältnis von Cycloguanil zu Proguanil im Blut als Probanden mit normaler Enzymfunktion. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass CYP3A5 eine Rolle im weiteren Metabolismus von Cycloguanil spielt oder an der Bildung des inaktiven Metaboliten Chlorphenylbiguanid beteiligt ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals der Einfluss der OCT1-Defizienz auf den Metabolismus von Proguanil zu Cycloguanil im Menschen und auf die Konzentrationen von Cycloguanil im Blut nachgewiesen werden. Zusammen mit den hier ebenfalls relevanten erblichen polymorphen metabolisierenden Enzymen CYP2C19 und CYP3A5 konnten circa 34% der Variation in den Blutkonzentrationen von Cycloguanil erklärt werden. Weitere klinische Studien wären nötig, um zu klären, inwieweit sich daraus Konsequenzen für die Wirkung und Nebenwirkungen des Malariamedikamentes ergeben.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergström CAS, Artursson P (2008): Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *J Med Chem* 51, 5932–5942
- Amann-Vesti BR: Einfache singuläre Störungen des Säure-Base-Haushaltes: Respiratorische Azidose. In: Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg.): *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, 192–197
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R (2006): Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12, 220–224
- Assis J, Pereira D, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R (2013): Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med* 6, 552–561
- Bapiro TE, Egnell A-C, Hasler JA, Masimirembwa CM (2001): Application of Higher Throughput Screening (HTS) Inhibition Assays to Evaluate the Interaction of Antiparasitic Drugs with Cytochrome P450s. *Drug Metab Dispos* 29, 30–35
- Birkett DJ, Rees D, Andersson T, Gonzalez FJ, Miners JO, Veronese ME (1994): In vitro proguanil activation to cycloguanil by human liver microsomes is mediated by CYP3A isoforms as well as by S-mephenytoin hydroxylase. *Br J Clin Pharmacol* 37, 413–420
- Bortz J, Schuster C: *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2010
- Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J (2014): Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J* 462, 475–487
- Brockmöller J, Tzvetkov MV (2008): Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 64, 133–157
- Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS (1956): Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes. *Science* 124, 484–485
- César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, Reithmeier RA, Hepworth D, Hediger MA, Edwards AM (2015): A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* 162, 478–487
- Coller JK, Somogyi AA, Bochner F (1999): Comparison of (S)-mephenytoin and proguanil oxidation in vitro: contribution of several CYP isoforms. *Br J Clin Pharmacol* 48, 158–167
- Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, Sinden RE, Leroy D (2012): The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Med* 9, e1001169
- Evans WE, Relling MV (1999): Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* 286, 487–491

- Evans WE, McLeod HL (2003): Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med* 348, 538–549
- Evans WE, Crews KR, Pui C-H (2013): A Healthcare System Perspective on Implementing Genomic Medicine: Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia as a Paradigm. *Clin Pharmacol Ther* 94, 224
- Fachinformation Paludrine® (2010): Paludrine® AstraZeneca GmbH, Deutschland
- Fernando SD, Rodrigo C, Rajapakse S (2011): Chemoprophylaxis in malaria: drugs, evidence of efficacy and costs. *Asian Pac J Trop Med* 4, 330–336
- Funck-Brentano C, Becquemont L, Leneuve A, Roux A, Jaillon P, Beaune P (1997): Inhibition by Omeprazole of Proguanil Metabolism: Mechanism of the Interaction In Vitro and Prediction of In Vivo Results from the In Vitro Experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 730–738
- Gabrielsson J, Weiner D: Non-compartmental Analysis. In: Reisfeld B, Mayeno AN (Hrsg.): *Computational Toxicology: Volume I*. 1. Auflage; Humana Press, New York 2013, 377–389
- Giorgis VD, Veggiotti P (2013): GLUT1 deficiency syndrome 2013: Current state of the art. *Seizure - Eur J Epilepsy* 22, 803–811
- Goldstein JA (2001): Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52, 349–355
- Grapci AD, Dimovski A, Kapedanovska A, Vavlukis M, Eftimov A, Geshkovska NM, Labachevski N, Jakjovski K, Gorani D, Kedev S (2015): Frequencies of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of the SLCO1B1 gene in selected populations of the western balkans. *Balk J Med Genet BJMG* 18, 5–21
- Grossman I (2009): ADME pharmacogenetics: current practices and future outlook. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 449–462
- Guillemette C, Lévesque É, Rouleau M (2014): Pharmacogenomics of Human Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferases and Clinical Implications. *Clin Pharmacol Ther* 96, 324–339
- Helsby NA, Ward SA, Edwards G, Howells RE, Breckenridge AM (1990): The pharmacokinetics and activation of proguanil in man: consequences of variability in drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 30, 593–598
- Helsby NA, Watkins WM, Mberu E, Ward SA (1991): Inter-individual variation in the metabolic activation of the antimalarial biguanides. *Parasitol Today* 7, 120–123
- Helsby NA, Edwards G, Breckenridge AM, Ward SA (1993): The multiple dose pharmacokinetics of proguanil. *Br J Clin Pharmacol* 35, 653–656
- Herrlin K, Masseur AY, Rimoy G, Alm C, Rais M, Ericsson O, Bertilsson L, Gustafsson LL (2000): Slow chloroguanide metabolism in Tanzanians compared with white subjects and Asian subjects confirms a decreased CYP2C19 activity in relation to genotype. *Clin Pharmacol Ther* 68, 189–198
- Hoffmann MF, Preissner SC, Nickel J, Dunkel M, Preissner R, Preissner S (2014): The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Res* 42, D1113–D1117

- Horn D, Duraisingh MT (2014): Antiparasitic chemotherapy – from genomes to mechanisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54, 71–94
- Hoskins JM, Shenfield GM, Gross AS (1998): Relationship between proguanil metabolic ratio and CYP2C19 genotype in a Caucasian population. *Br J Clin Pharmacol* 46, 499–504
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA (1999): Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 20, 342–349
- Ito S (2014): Biotransformation. *Clin Pharmacol Ther* 96, 281–283
- Kalow W (2002): Pharmacogenetics and personalised medicine. *Fundam Clin Pharmacol* 16, 337–342
- Kalow W (2005): A pharmacogeneticist's look at drug effects and the drug development process: an overview. *Expert Opin Pharmacother* 6, 1299–1303
- Kalow W (2006): Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J* 6, 162–165
- Kaneko A, Bergqvist Y, Taleo G, Kobayakawa T, Ishizaki T, Björkman A (1999): Proguanil disposition and toxicity in malaria patients from Vanuatu with high frequencies of CYP2C19 mutations. *Pharmacogenetics* 9, 317–326
- Kato M, Chiba K, Ito T, Koue T, Sugiyama Y (2010): Prediction of interindividual variability in pharmacokinetics for CYP3A4 substrates in humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 367–378
- Kerb R, Fux R, Mörike K, Krensner PG, Gil JP, Gleiter CH, Schwab M (2009): Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis* 9, 760–774
- Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmöller J (2006): Stand der Pharmakogenetik in der klinischen Arzneimitteltherapie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 49, 995–1003
- Klein EY (2013): Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *Int J Antimicrob Agents* 41, 311–317
- Klotz U, Schwab M, Treiber G (2004): CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95, 2–8
- Köck K, Brouwer KLR (2012): A Perspective on Efflux Transport Proteins in the Liver. *Clin Pharmacol Ther* 92, 599–612
- Koepsell H, Endou H (2003): The SLC22 drug transporter family. *Pflüg Arch* 447, 666–676
- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res* 24, 1227–1251
- Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB (2012): PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics* 22, 555–558
- Lochner M, Thompson AJ (2014): The Antimalarial Drug Proguanil Is an Antagonist at 5-HT₃ Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 351, 674–684

- Lozano E, Herraéz E, Briz O, Robledo VS, Hernandez-Iglesias J, Gonzalez-Hernandez A, Marin JJG (2013): Role of the Plasma Membrane Transporter of Organic Cations OCT1 and Its Genetic Variants in Modern Liver Pharmacology. *BioMed Res Int* 2013
- Luzzatto L (2010): The rise and fall of the antimalarial Lapdap: a lesson in pharmacogenetics. *Lancet* 376, 739–741
- Maegraith BG, Totteý MM (1946): The absorption and excretion of paludrine in the human subject. *Ann Trop Med Parasitol* 40, 493–506
- Matthaei J, Kuron D, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira J, Abu Abed M, Prukop T, Brockmüller J, Tzvetkov M (2016): OCT1 mediates hepatic uptake of sumatriptan and loss-of-function OCT1 polymorphisms affect sumatriptan pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 99, 633–641
- Matthaei J, Seitz T, Jensen O, Tann A, Prukop T, Tadjerpisheh S, Brockmüller J, Tzvetkov MV (2018): OCT1 deficiency affects hepatocellular concentrations and pharmacokinetics of cycloguanil, the active metabolite of the antimalarial drug proguanil. *Clin Pharmacol Ther*, doi: 10.1002/cpt.1128
- McGready R, Stepniewska K, Seaton E, Cho T, Cho D, Ginsberg A, Edstein MD, Ashley E, Looareesuwan S, White NJ (2003a): Pregnancy and use of oral contraceptives reduces the biotransformation of proguanil to cycloguanil. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 553–557
- McGready R, Stepniewska K, Edstein MD, Cho T, Gilveray G, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F (2003b): The pharmacokinetics of atovaquone and proguanil in pregnant women with acute falciparum malaria. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 545–552
- Mini E, Nobili S (2009): Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. *Clin Cases Miner Bone Metab* 6, 17–24
- Motohashi H, Inui K (2013): Organic Cation Transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the Human Kidney. *AAPS J* 15, 581–588
- Nebert DW, Vesell ES (2004): Advances in pharmacogenomics and individualized drug therapy: exciting challenges that lie ahead. *Eur J Pharmacol* 500, 267–280
- Nebert DW, Zhang G, Vesell ES (2008): From Human Genetics and Genomics to Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Past Lessons, Future Directions. *Drug Metab Rev* 40, 187–224
- Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE (2006): Factor V Leiden, pregnancy complications and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *QJM* 99, 289–298
- O'Brien VP, Bokelmann K, Ramírez J, Jobst K, Ratain MJ, Brockmüller J, Tzvetkov MV (2013): Hepatocyte Nuclear Factor 1 Regulates the Expression of the Organic Cation Transporter 1 via Binding to an Evolutionary Conserved Region in Intron 1 of the OCT1 Gene. *J Pharmacol Exp Ther* 347, 181–192
- Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2006): SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 16, 873–879

- Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008): Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9, 19–33
- Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, Diouf B, Crews KR, Evans WE (2011): Cancer pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther* 90, 461
- Pedersen RS, Nielsen F, Stage TB, Vinholt PJ, el Achwah AB, Damkier P, Brosen K (2014): CYP2C19*17 increases clopidogrel-mediated platelet inhibition but does not alter the pharmacokinetics of the active metabolite of clopidogrel. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41, 870–878
- Petersen I, Eastman R, Lanzer M (2011): Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett* 585, 1551–1562
- Pudney M, Gutteridge W, Zeman A, Dickins M, Woolley JL (1999): Atovaquone and proguanil hydrochloride: a review of nonclinical studies. *J Travel Med* 6 Suppl 1, 8–12
- Relling MV, Ramsey LB (2013): Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *ASH Educ Program Book 2013*, 126–130
- Rietbrock N, Staib AH, Loew D: *Klinische Pharmakologie: Arzneitherapie*. 4. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2013
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012): OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165, 1260–1287
- Ruiz Lopez del Prado G, Hernán García C, Moreno Cea L, Fernández Espinilla V, Moreno MF, Delgado Marquez A, Polo Polo MJ, Andrés García I (2014): Malaria in developing countries. *J Infect Dev Ctries* 8, 001–004
- Saadatmand AR, Tadjerpisheh S, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2012): The prototypic pharmacogenetic drug debrisoquine is a substrate of the genetically polymorphic organic cation transporter OCT1. *Biochem Pharmacol* 83, 1427–1434
- Satyanarayana CRU, Devendran A, Jayaraman M, Mannu J, Mathur PP, Gopal SD, Rajagopal K, Chandrasekaran A (2009): Influence of the Genetic Polymorphisms in the 5' Flanking and Exonic Regions of *CYP2C19* on Proguanil Oxidation. *Drug Metab Pharmacokinet* 24, 537–548
- Schmitt KC, Rothman RB, Reith MEA (2013): Nonclassical Pharmacology of the Dopamine Transporter: Atypical Inhibitors, Allosteric Modulators, and Partial Substrates. *J Pharmacol Exp Ther* 346, 2–10
- Seitz T, Stalman R, Dalila N, Chen J, Pojar S, Dos Santos Pereira JN, Krätzner R, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2015): Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1. *Genome Med* 7, 56
- Shu Y, Brown C, Castro R, Shi R, Lin E, Owen R, Sheardown S, Yue L, Burchard E, Brett C (2008): Effect of Genetic Variation in the Organic Cation Transporter 1, OCT1, on Metformin Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 83, 273–280
- Sim E, Abuhammad A, Ryan A (2014): Arylamine N-acetyltransferases: from drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. *Br J Pharmacol* 171, 2705–2725

- Sim SC, Risinger C, Dahl M-L, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M (2006): A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 79, 103–113
- Sinha S, Medhi B, Sehgal R (2014): Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite* 21, 61
- Skjelbo E, Mutabingwa TK, Bygbjerg I, Nielsen KK, Gram LF, Brøosen K (1996): Chloroguanide metabolism in relation to the efficacy in malaria prophylaxis and the S-mephenytoin oxidation in Tanzanians. *Clin Pharmacol Ther* 59, 304–311
- Somogyi AA, Reinhard HA, Bochner F (1996): Pharmacokinetic evaluation of proguanil: a probe phenotyping drug for the mephenytoin hydroxylase polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 41, 175–179
- Su X, Hayton K, Wellems TE (2007): Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet* 8, 497–506
- Tadjerpisheh S: HPLC-Analysen zur Bedeutung genetischer Varianten organischer Kationentransporter für hydrophile kationische Medikamente. Med. Diss. Marburg 2016
- Terada T, Hira D (2015): Intestinal and hepatic drug transporters: pharmacokinetic, pathophysiological, and pharmacogenetic roles. *J Gastroenterol* 50, 508–519
- Trautmann A, Kleine-Tebbe J: Allergologie in Klinik und Praxis: Allergene, Diagnostik, Therapie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2013
- Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehr D, Sabolić I, Koepsell H, Brockmöller J (2009): The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 86, 299–306
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lötsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmöller J (2011): Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 90, 143–150
- Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmöller J (2013): Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol* 86, 666–678
- Tzvetkov MV, Dalila N, Faltraco F: Genetic Variability in Organic Cation Transporters: Pathophysiological Manifestations and Consequences for Drug Pharmacokinetics and Efficacy. In: Ciarimboli G, Gautron S, Schlatter E (Hrsg.): *Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology, and Pharmacology*. 1. Auflage; Springer International Publishing, Cham 2016, 93–137
- van der Velden M, Bilos A, van den Heuvel JJMW, Rijpma SR, Hurkmans EGE, Sauerwein RW, Russel FGM, Koenderink JB (2017): Proguanil and cycloguanil are organic cation transporter and multidrug and toxin extrusion substrates. *Malar J* 16, 422
- van Limburg Stirum J: *Moderne Säure-Basen-Medizin: Physiologie, Diagnostik, Therapie*. 1. Auflage; Hippokrates Verlag, Stuttgart 2008

- Ward SA, Helsby NA, Skjelbo E, Brøsen K, Gram LF, Breckenridge AM (1991): The activation of the biguanide antimalarial proguanil co-segregates with the mephenytoin oxidation polymorphism - a panel study. *Br J Clin Pharmacol* 31, 689–692
- Wattanagoon Y, Taylor RB, Moody RR, Ocheke NA, Looareesuwan S, White NJ (1987): Single dose pharmacokinetics of proguanil and its metabolites in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 24, 775–780
- Werk AN, Lefeldt S, Bruckmueller H, Hemmrich-Stanisak G, Franke A, Roos M, Kuchle C, Steubl D, Schmaderer C, Bräsen JH (2014): Identification and characterization of a defective CYP3A4 genotype in a kidney transplant patient with severely diminished tacrolimus clearance. *Clin Pharmacol Ther* 95, 416–422
- Wijnen PAHM, Op Den Buijsch RAM, Drent M, Kuipers PMJC, Neef C, Bast A, Bekers O, Koek GH (2007): Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther* 26, 211–219
- Winkler G, Döring A (1998): Validation of a short qualitative food frequency list used in several German large scale surveys. *Z Ernährungswiss* 37, 234–241
- Yan N (2015): Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* 44, 257–283
- Yoo H-D, Lee Y-B (2011): Interplay of pharmacogenetic variations in ABCB1 transporters and cytochrome P450 enzymes. *Arch Pharm Res* 34, 1817–1828
- Zaltzman ASR, Glick LA, Zaltzman JS, Nash M, Huang M, Ramesh Prasad GV (2016): The role of CYP3A5 polymorphism and dose adjustments following conversion of twice-daily to once-daily tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Res* 5, 2
- Zeigler-Johnson C, Friebel T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB (2004): CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res* 64, 8461–8467
- <http://www.apotheke-adhoc.de/nachrichten/pharmazie/nachricht-detail-pharmazie/amk-meldungen-paludrine-viread-rueckrufe/>; Zugriff am 30.12.2015
- <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00321>; Zugriff am 05.04.2016
- <http://www.dtg.org/7.html>; Zugriff am 12.12.2015
- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/01/WC500219562.pdf; Zugriff am 11.09.2015
- http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html;
Zugriff am 15.09.2015
- <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>;
Zugriff am 05.03.2018

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Brockmöller für die umfangreiche, unkomplizierte und sehr freundliche Betreuung während des Verfassens dieser Arbeit bedanken.

Ich danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen auf der Probandenstation des Instituts für Klinische Pharmakologie für die angenehme gemeinsame Zeit während der Durchführung der klinischen Studie zu OCT1. Bedanken möchte ich mich außerdem bei den mir vorausgegangenen und nachgefolgten Doktorandinnen und Doktoranden für die Durchführung der Studie. Ein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Johannes Matthaei, der mir jederzeit bei Fragen zum Verfassen dieser Arbeit weitergeholfen hat. Herrn Jan Gerrit Horstmann möchte ich für seine Hilfe bei der grafischen Gestaltung danken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in den Laboren des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Durchführung der bioanalytischen Untersuchungen bedanken. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tzvetkov danke ich sehr für seinen Rat bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Schließlich gilt mein großer Dank allen Probandinnen und Probanden, die an der klinischen Studie zu OCT1 teilgenommen haben.