INSTITUTE OF DRUG RESEARCH

ACADEMY OF SCIENCES OF THE GDR

INSTITUT FÜR WIRKSTOFFORSCHUNG

der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin

INSTITUTE OF DRUG RESEARCH

Academy of Sciences of the GDR

1976-1986

© 1985: Inst. f. Wirkstoffrschg., Berlin
Heraugeber: Institut für Wirkstofforschung der
Akademie d. Wissenschaften d. DDR
Redaktion: Dr. J. Axt
Grafik: R. Richter
Fotos: M. Fröbus
Übersetzung: E. Boldt
Satz u. Druck: VEB Druckhaus Köthen
Buchbind. Bearbeitung: VEB Druckhaus „Maxim Gorki"
Altenburg
Ag 521/017/85

1 Historische Entwicklung und Forschungsanliegen des Instituts für Wirkstofforschung 7
Development and Research Lines of the Institute of Drug Research

2 Pharmaka zur Beeinflussung des Blutdrucks 15
Pharmaceutics to Influence Blood Pressure

3 Pharmaka zur Beeinflussung des insuffizienten Herzmuskels und des Infarktes 23
Pharmaceutics to Influence Insufficient Myocardium and Infarction

4 Pharmaka zur Beeinflussung immunologischer Vorgänge 29
Pharmaceutics to Influence Immunological Processes

5 Blutgefäßwachstum aus pharmakologischer Sicht 33
Blood Vessel Growth from a Pharmacological Point of View

6 Wirkstofforschung auf elektronenmikroskopischer Ebene 39
Electron Microscopy in Drug Research

7 Profil und Perspektiven der Arzneimittelsynthese 43
Characteristics and Prospects of Drug Synthesis

8 Theoretische Arbeiten zur gezielten Entwicklung von Wirkstoffen 51
Theoretical Drug Design Methode

9 Biopharmazie und Analytik von Wirkstoffen 61
Biopharmaceutics and Analytics

10 Forschungstierhaltung 71
Animal Laboratory

11 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Zellkulturen 75
Evaluation of Cytotoxicity by means of Cell Cultures

12 Klinische Prüfung von Arzneimittel-Entwicklungen 79
Clinical Trials of Drug Developments

13 Forschungstechnologie 83
Technology and Research

14 Publikationstätigkeit und wissenschaftliche Veranstaltungen 89
Publications and Scientific Events

1 Historische Entwicklung und Forschungsanliegen des Instituts für Wirkstofforschung

Development and Research Lines of the Institute of Drug Research

Am 1. Januar 1986 besteht das Institut für Wirkstofforschung (IWF) der Akademie der Wissenschaften der DDR 10 Jahre. Dieses Jubiläum ist für die Mitarbeiter der Instituts Anlaß, über das in diesem Zeitraum Erreichte Bilanz zu ziehen und sich gleichzeitig anspruchsvolle Ziele für zukünftige Aufgaben zu stellen.

Mit dem in Berlin-Friedrichsfelde nahe dem Tierpark angesiedelten Institut ist in den zurückliegenden 10 Jahren eine Forschungseinrichtung entstanden, die anknüpft an die mehr als 100jährige Berliner Tradition auf dem Gebiet der Pharmakologie und Arzneimittelforschung.

Angefangen mit O. Liebreich, der 1879 in Berlin das erste Ordinariat für Pharmakologie übernahm und das Chloralhydrat in die Therapie einführte, über A. Heffter, dem Verfasser des Standardwerkes „Handbuch der experimentellen Pharmakologie", bis zu P. Trendelenburg, dessen pharmakologische Testmethoden teilweise noch heute gebräuchlich sind, und W. Heubner reicht die Liste bedeutender Berliner Pharmakologen.

Als nach Beendigung des 2. Weltkrieges und der Zerschlagung des Faschismus die personellen und materiellen Voraussetzungen für pharmakologisches Arbeiten in Berlin wieder völlig neu geschaffen werden mußten, übernahm F. Jung sowohl die Leitung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität als auch in Personalunion die Leitung der Abteilung für Pharmakologie des Instituts für Medizin und Biologie der Akademie der Wissenschaften in Berlin-Buch.

1972 gab F. Jung die Funktion als Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität ab, um die Leitung des neu gegründeten Zentralinstituts für Molekularbiologie (ZIM) der AdW zu übernehmen, in welches auch das Akademie-Institut für Pharmakologie integriert wurde.

1 Institut für Wirkstofforschung (IWF) der Akademie der Wissenschaften der DDR

Institute of Drug Research (IDR), Academy of Sciences of the GDR

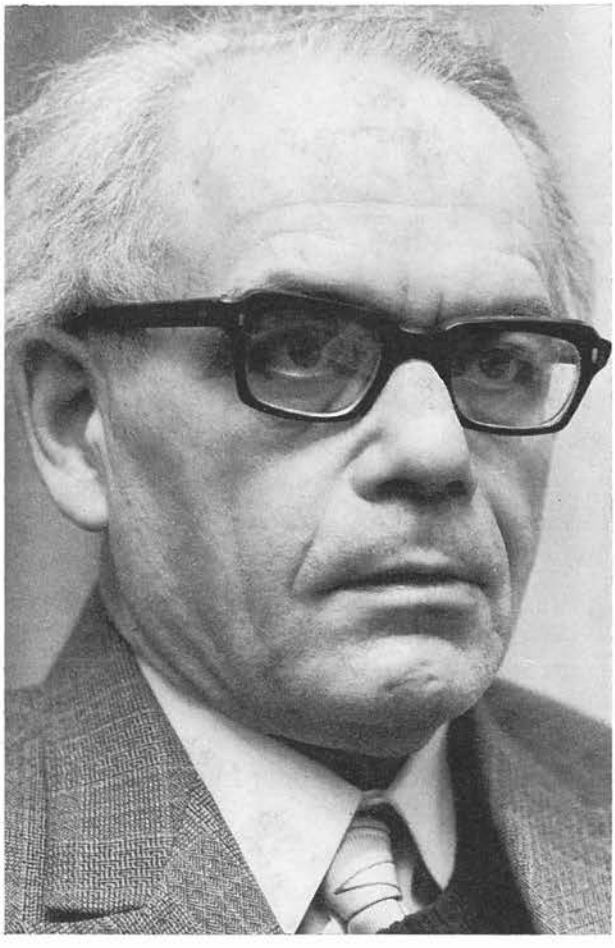
January 1, 1986, is the 10th anniversary of the Institute of Drug Research (IDR), Academy of Sciences of the GDR. On this occasion we should like to assess our past achievements and present our new high-level aims.

The institute in Berlin-Friedrichsfelde, near the Zoological Gardens, carries on the traditions of over 100 years of research in pharmacology and drug research in Berlin.

There is a long list of important Berlin pharmacologists, among them O. Liebreich, who in 1879 took over the professorship in pharmacology and who introduced chloralhydrate into therapy, A. Heffter, the author of the standard "Handbook on Experimental Pharmacology", P. Trendelenburg, whose pharmacological testing methods are still used to some extent, and last but not least W. Heubner.

Ausgehend von dem Bereich Molekular- und zellbiologische Wirkstofforschung des ZIM wurde 1976 das Institut für Wirkstofforschung unter dem Direktorat des Jung-Schülers P. Oehme gegründet, der das Institut seitdem leitet. Das IWF hat inhaltlich und organisatorisch seine Wurzeln in dem von F. Jung langjährig geleiteten Pharmakologischen Institut der Akademie bzw. dem Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW.

Eine Reihe von Forschungsrichtungen des IWF gehen auf diese Traditionen zurück; so die umfangreiche Peptidforschung des IWF auf die Arbeiten von Niedrich, Oehme und Jung in den 60er Jahren zu Hydrazinosäuren bzw. Hydrazinopeptiden. Zahlreiche neue pharmakologische und chemische Forschungsrichtungen wurden seit 1976 im IWF neu etabliert und geben dem Institut jetzt ein spezifisches nationales und internationales wissenschaftliches Gesicht. Dabei wird eine anspruchsvolle Grundlagen- und An-



3 F. Jung

2 M. E. O. Liebreich

After World War II and the defeat of fascism, a completely new staff of research workers as well as new technical equipment required for the pharmacological work was to be established in Berlin. So the eminent pharmacologist F. Jung was appointed in Berlin. He became both head of the Institute of Pharmacology and Toxicology at Humboldt-University and of the Department of Pharmacology at the Institute of Medicine and Biology at the Academy of Sciences in Berlin-Buch.

In 1972 Jung resigned from the post as head of the Institute of Pharmacology and Toxicology at Humboldt-University and took charge of the new Central Institute of Molecular Biology (CIM)/ Acad. of Sc., which the Institute of Pharmacology/Academy of Sciences was attached to.

In 1976 the Department of Molecular and Cellular Biology in Drug Research became the Institute of Drug Research (IDR) headed by P. Oehme, one of Jung's former students. A number of present IDR research lines date back to the traditions established at the Pharmacological Institute of the Academy and the Central Institute of Molecular Biology/Acad. of Sc., for many years headed by F. Jung.

The extensive IDR peptide research is based on the investigation of hydrazine acids and hydrazine peptides carried out by Niedrich, Oehme and Jung in the sixties. The numerous new phar-

wendungsforschung betrieben, die sich an den Bedürfnissen des Gesundheitswesens, der Landwirtschaft und der pharmazeutischen Industrie der DDR orientiert.
Mit wesentlicher Unterstützung der Akademie der Wissenschaften wurde auf dem Gelände des IWF in den zurückliegenden 10 Jahren unter der Leitung des Jung-Schülers E. Göres das Institut für Pharmakologische Forschung (IPF) des Pharmazeutischen Kombinats GERMED aufgebaut, mit dem das IWF im Akademie-Industrie-Komplex (AIK) ARZNEIMITTELFORSCHUNG eine effektive Zusammenarbeit verbindet. Eine traditionsreiche Kooperation besteht mit dem VEB „Berlin-Chemie". Auch mit weiteren Betrieben des PKG werden gemeinsame Themen bearbeitet.

macological and chemical research lines that have been established since 1976 have created the IDR's specific national and international reputation. Generally speaking the IDR does basic and applied research meeting the demands of medical care, agriculture and the pharmaceutical industry in the GDR.
The IDR supported the establishment, on its own premises, of the Institute of Pharmacological Research (IPR) headed by E. Göres a former Jung's student, which belongs to the Pharmaceutical Combine GERMED. Both institutes have been cooperating successfully within the Academy-Industry Complex "Arzneimittelforschung" (Drug Research). Furthermore, the Institute cooperates with VEB Berlin-Chemie and other GERMED enterprises.

4 Prof. Dr. P. Oehme, Direktor des Instituts für Wirkstofforschung
Prof. Dr. P. Oehme, Director, Institute of Drug Research

In den zurückliegenden 10 Jahren hat sich das IWF zu einer anerkannten interdisziplinären Forschungseinrichtung entwickelt, die bei primär pharmakologischer Grundkonzeption biologische, chemische, biopharmazeutische und experimentell-medizinische Grundlagen der Arzneimittelforschung bearbeitet. Die Zielstellung des IWF besteht dabei darin, ausgehend von neuen Erkenntnissen der medizinischen Forschung, der Biowissenschaften, der Chemie, anderer Naturwissenschaften und der Gesellschaftswissenschaf-

In the last 10 years the IDR has developed into an interdisciplinary research institution, which on the basis of primarily pharmacological concepts works on the fundamentals in drug research, these ranging from biology, chemistry, biopharmaceutics, and experimental medicine. On the basis of the latest results in medicinal research, biosciences, chemistry and other natural as well as social sciences new drugs are to be developed and their large-scale production to be prepared as far as possible in cooperation with health

ten, originäre Ansatzpunkte für Wirkstoffentwicklungen zu finden und in enger Zusammenarbeit mit Einrichtungen des Gesundheitswesens und der pharmazeutischen Industrie soweit wie möglich zur Praxisreife zu führen. Das Institut betreibt weiterhin Forschungen zur disziplinären Vertiefung von wichtigen Teilgebieten der Pharmakologie und Arzneimittelchemie.

Die Forschungsthemen des Instituts sind auf 5 Schwerpunktgebiete konzentriert:

- Pharmaka zum Einsatz bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Regulationsstörungen
- Pharmaka zur Beeinflussung des Immunsystems
- Peptidwirkstoffe zum Einsatz in Medizin, Veterinärmedizin und Landwirtschaft
- Neue Applikationsformen für Arzneimittel
- Theoretische Verfahren zur Auffindung neuer Wirkstoffe und zur Rationalisierung der Wirkstoffsuche.

Die pharmakologischen Abteilungen des IWF prägen wesentlich das Forschungsprofil des Institutes.

Die Abteilung Pharmakologie I (Leiter: MR Prof. Dr. sc. med. Löwe) befaßt sich mit Untersuchungen zur Pathogenese der Herzinsuffizienz mit dem Ziel, neue Wege zur medikamentösen Behandlung abzuleiten. In Zusammenarbeit mit dem Bereich Arzneimittelsynthese und Synthesegruppen außerhalb des Institutes werden neuartige Substanzen einer biologischen Testung zugeführt.

In der Abteilung Pharmakologie II (Leiter: VR Prof. Dr. med. vet. habil. K. D. Jentzsch) liegt der Schwerpunkt der Arbeiten in der Entwicklung blutdrucksenkender Substanzen, insbesondere mit einem Angriff am Angiotensinsystem. Dazu werden sowohl biochemische Methoden als auch kultivierte Zellinien eingesetzt. Speziell in der Handhabung von Zellkulturen bestehen in dieser Abteilung jahrzehntelange Erfahrungen. Außerdem besitzt die Abteilung eine Arbeitsgruppe zur Entwicklung von Radioimmunoassays zur Bestimmung endogener Peptide in Körperflüssigkeiten.

In der Abteilung Pharmakologie III (geleitet von Prof. Dr. med. habil. P. Oehme) gilt das Hauptaugenmerk der Aufklärung regulatorischer Funk-

service institutions and the pharmaceutical industry.

Moreover, the Institute does research in a number of branches of pharmacology and drug chemistry. The Institute has 5 main topics:

- heart and blood circulation drugs
- immune drugs
- peptide drugs in human and veterinary medicine and agriculture
- new modes of drug application
- theoretical strategies of rationalizing the search for drugs.

The character of IDR research is mainly determined by the pharmacological departments.

The Department of Pharmacology I (headed by Medizinalrat Prof. Dr. sc. med. Löwe) does research into the pathogenesis of heart failure aiming at developing new methods for drug therapy. In cooperation with the Division of Drug Synthesis and synthesis groups outside the Institute new substances are subjected to biological testing.

The Department of Pharmacology II (headed by Prof. Dr. sc. med. vet. Jentzsch) focusses research on the development of blood pressure-decreasing substances mainly targeted at the angiotensin system. In doing so, both biochemical methods and cultured cell lines are applied. This department has many years of experience in dealing with cultured cell lines.

In addition, one group is specialized in developing radioimmunoassays for determining endogenous peptides in body fluids.

The Department of Pharmacology III (headed by Prof. Dr. med. habil. P. Oehme) concentrates on investigating regulatory functions of endogenous peptides. It is mainly SP research that has yielded insight into the modification of the sympathetic nervous system through peptides thus opening up future application in medicine.

In recent years the IDR has done a growing amount of research in the field of immunopharmacology. A separate team (headed by Dr. sc. nat. H. Repke), cooperating with Pharmacology II, endeavours to find up-to-date immunological techniques, e. g., hybridom technique to be used in solying pharmacological problems. The aim is to develop antianaphylactics for use in human medicine.

tionen endogener Peptide. Dabei haben insbesondere die Arbeiten zur Substanz P international anerkannte Erkenntnisse zur Modulation des sympathischen Nervensystems durch Peptide mit prospektiven Nutzungsmöglichkeiten in der Medizin erbracht.

In den letzten Jahren wurden im IWF zunehmend immunpharmakologische Fragestellungen bearbeitet. Durch eine selbständige Arbeitsgruppe (Leiter: Dr. sc. nat. H. Repke) werden gemeinsam mit der Abt. Pharmakologie II moderne immunologische Techniken, z. B. Hybridomtechnik, zur Lösung pharmakologischer Fragestellungen eingesetzt. Ziel ist u. a. die Entwicklung von Antianaphylaktika für einen Einsatz in der Humanmedizin.

In allen pharmakologischen Abteilungen des IWF wird davon ausgegangen, daß die Gewinnung neuer Erkenntnisse und deren Verwirklichung in hohem Maße von anspruchsvollen methodischen Möglichkeiten abhängen. Aus diesem Grunde wird der Förderung eigener methodischer Entwicklung im IWF besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Zur Sicherung einer effektiven interdisziplinären Arbeit wurde in den zurückliegenden Jahren besonders auch die Entwicklung einer leistungsfähigen Arzneimittelsynthese gefördert. Bei Gründung des IWF beschränkten sich die Synthesearbeiten im wesentlichen auf Peptide. Heute werden im Bereich Arzneimittelsynthese des IWF (Leiter: Prof. Dr. sc. nat. H. Niedrich) neben den Peptiden auch andere organische Verbindungen, z. B. Heterozyklen, synthetisiert und bei Bedarf in Mengen bis zu mehreren Kilogramm bereitgestellt. Der Bereich Arzneimittelsynthese besteht aus den drei Abteilungen Organische Synthese (Leiter: Prof. Dr. H. Niedrich), Peptidchemie (Leiter: Dr. sc. nat. M. Bienert) und Entwicklung/Technikum (Leiter: Doz. Dr. sc. nat. K.-D. Kaufmann).

Die im Aufbau befindliche Abteilung Biopharmazie/Analytik (Leiter: Prof. Dr. sc. nat. B. Mehlis) sichert die notwendige pharmazeutische Begutachtung und führt zugleich Forschungen zur Retardierung der Wirkstoffeffekte mittels geeigneter Arzneiformen sowie in neuen Applikationsformen durch. Dabei hat sich die Abteilung gegenwärtig vor allem die Verlängerung

All three pharmacological departments are convinced that new ideas and practical application is to a large extent a question of sophisticated methods. This is why the IDR pays so much attention to the development of its own methods.

In order to make our interdisciplinary work more effective much emphasis has been placed on developing efficient forms of drug synthesis in recent years. When the IDR came into being synthesis was in general limited to peptides. Today the Division of Drug Synthesis (headed by Prof. Dr. sc. nat. H. Niedrich), synthesizes other organic compounds apart from peptides, among them heterocyclic compounds, which, on request, can be supplied in amounts up to several kilograms.

The Division of Drug Synthesis consists of three departments: Organic Synthesis (headed by Prof. Dr. Niedrich), Peptide Chemistry (headed by Dr. sc. nat. M. Bienert), Kilo-Lab (headed by Dozent Dr. sc. nat. K.-D. Kaufmann).

The Department of Biopharmaceutics/Analytics (headed by Prof. Dr. sc. nat. B. Mehlis), at present still being completed, is responsible for the pharmaceutical examinations. Furthermore, they do research into the retardation of drug effects to be accomplished by the appropriate form of the drugs and new modes of application, the main

5 Durchführung von Arzneistoff-Synthesen im Labor
Drug synthesis in the laboratory

der Wirkung des Peptidhormons GnRH als Ziel gesetzt.

Eine rationelle Wirkstoffsuche erfordert den Einsatz moderner Methoden der quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse (QSWA). Im IWF wurden in den zurückliegenden 10 Jahren in der Abt. Theorie (Leiter: Prof. Dr. sc. nat. R. Franke) derartige Methoden entwickelt und eingesetzt. Die Abt. Theorie des IWF als führende QSWA-Gruppe der DDR führt Arbeiten auch für eine Reihe anderer Einrichtungen durch. Schwerpunkte der Anwendung moderner QSWA-Methoden sind u. a. Antibiotika, Herz-Kreislauf-Pharmaka und Fungizide.

In der Abt. Applikation/Überführung des IWF (Leiter: Doz. Dr. sc. med. H. Landmann) besteht die Aufgabe, Arzneimittelentwicklungen klinisch zu erproben. Dazu baut das IWF gegenwärtig gemeinsam mit einem großen Berliner Krankenhaus eine Außenstelle auf, in der derartige Prüfungen in den Stufen I und II realisierbar sind. Daneben führt das IWF in Abhängigkeit von der Indikation des Wirkstoffes auch klinische Prüfungen bei Kooperationspartnern durch bzw. unterstützt Prüfeinrichtungen bei der Planung und Auswertung der Prüfprogramme. Die Abteilung hat weiterhin die Aufgabe, Trends bei internationalen Wirkstoffentwicklungen zu verfolgen und auszuwerten.

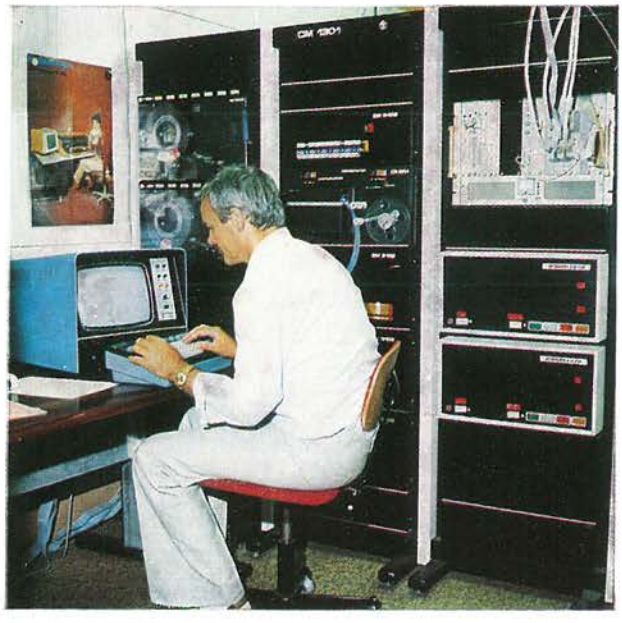
Bei der schutzrechtlichen Absicherung der im IWF gewonnenen Ergebnisse erfahren die Struk-

aim being to prolong the effects of the peptide hormone GnRH.

Efficient search for new drugs requires the latest methods of evaluating quantitative structure-activity relationships (QSARs). The Theoretical Department (headed by Prof. Dr. sc. nat. R. Franke) has both developed and applied such methods in the past decade. Being the leading QSAR group in the country this department accepts orders from a number of other institutions as well. Advanced QSAR methods are mainly applied to research into antibiotics, cardiovascular drugs and fungicides.

The Department of Application/Transfer (headed by Dozent Dr. sc. med. H. Landmann) is concerned with the clinical trials of drug developments. For this purpose the IDR, in cooperation with a big Berlin hospital, is organizing a branch hospital where this type of phase I and phase II trials can be carried out. The department is responsible for carrying out the clinical trials at one of our cooperative hospitals selected in accordance with the specific indication a drug is expected to show. Drug controlling institutions are given recommendations with regard to the planning and evaluation of their test programmes.

The team for patents/innovations (headed by Dr. rer. nat. H. Wehlan) furnishes advice to all structural units as to patent rights regulations for the results yielded at the IDR. They



6 Rechner-Einsatz in der Wirkstofforschung
Computing technique in Drug Research

tureinheiten eine wirksame Unterstützung durch eine Arbeitsgruppe Patente/Neuererwesen (Leiter: Dr. rer. nat. H. Wehlan). Durch diese Arbeitsgruppe erfolgte auch eine fachkundige Beratung bei der Erarbeitung von Schutzrechtskonzeptionen und Lizenzstrategien.

Zur materiellen Absicherung eigener methodischer Entwicklungen und zur ingenieurtechnischen Betreuung des vorhandenen umfangreichen Geräteparks ist im IWF in den 10 Jahren seines Bestehens eine leistungsfähige Abt. Forschungstechnologie (Leiter: Dr. paed. H. Reinecke) aufgebaut worden. Zu dieser Abteilung gehören auch eine EDV-Gruppe mit moderner Rechentechnik sowie zwei weitere Arbeitsgruppen, in denen elektronische bzw. feinmechanische Entwicklungsarbeiten realisiert werden.

Die für pharmakologische Arbeiten benötigten Versuchstiere werden durch die Arbeitsgruppe Forschungstierhaltung versorgt und bereitgestellt (Leiter: Dr. med. vet. E. Karasek).

Das Institut hat gegenwärtig etwa 240 Mitarbeiter, davon 90 Wissenschaftler.

In der DDR arbeitet das IWF mit zahlreichen Einrichtungen der Akademie der Wissenschaften, des Hochschulwesens, des Gesundheitswesens und der pharmazeutischen Industrie eng zusammen. Im Rahmen des Programms Biowissenschaften wird durch das Institut die Hauptforschungsrichtung „Wirkstofforschung", koordiniert.

International hat das Institut mit mehr als 30 Einrichtungen sozialistischer Länder und ausgewählter kapitalistischer Staaten Kooperationsbeziehungen. Enge Beziehungen bestehen zu wissenschaftlichen Einrichtungen der UdSSR, so u. a. zum Allunionszentrum für Kardiologie der Akademie der Medizinischen Wissenschaften der UdSSR, dem Institut für Organische Synthese der Lettischen Akademie der Wissenschaften u. a.

Seit mehr als 10 Jahren ist der Direktor des Institutes Vorsitzender der Unterkommission „Physiologisch aktive Verbindungen" im Rahmen des multilateralen Akademieabkommens „Molekularbiologie/Biochemie".

Eine Reihe von Mitarbeitern des Institutes sind Mitglieder von Redaktionskollegien nationaler und internationaler Zeitschriften. Vom IWF

also provide expert advice as to developing patent rights concepts and licence strategies.

Since the IDR was set up, the Department of Technology and Research (headed by Dr. H. Reinecke) has been providing the material and technological prerequisites for the development of new methods, and has been responsible for the maintenance of the extensive equipment. An electronic data processing group using sophisticated computing technique and two other groups concerned with the development of electronic equipment and precision instruments are attached to this department.

The laboratory animals required for the pharmacological research are bred and kept by the special team of laboratory animal-keepers.

At present the Institute has a staff of about 240 employers, among them 90 scientists. The IDR cooperates with numerous institutions of the Acad. of Sc., Higher Education, the Health Service, and the Pharmaceutical Industry. Within the research program of biosciences, the Institute coordinates all activities in the main research line of drug research.

The IDR cooperates with over 30 institutions in the socialist and in some capitalist countries. It has close relations to scientific institutions in the USSR including the All-Nations-Centre of Cardiology of the Academy of Medical Sciences of the USSR, the Institute of Organic Synthesis of the Latvian Acad.

For over 10 years the Director of the Institute has been the chairman of the "Physiologically Active Compounds" subcommittee within the framework of the "Molecular biology/Biochemistry" agreement between several academies.

A number of IDR scientists are members of the editorial staff of national and international periodicals. Since 1976 the IDR and IPR have published "Beiträge zur Wirkstofforschung". The more than 20 monographs have met with great response. In the past decade over 600 publications, among them ten monographs and contributions to monographs, have appeared; 160 patents have been claimed; 1300 papers have been presented at national and international scientific events.

IDR research workers are members of boards of various scientific associations. Prof. Oehme is

werden seit 1976 gemeinsam mit dem IPF die „Beiträge zur Wirkstofforschung" herausgegeben. Die bisher erschienenen, mehr als 20 Titel erfahren gute Resonanz.

Von den Mitarbeitern wurden seit Bestehen des Institutes mehr als 600 wissenschaftliche Arbeiten, einschließlich Monographien bzw. Monographiebeiträge, veröffentlicht; 160 Ergebnisse wurden zu Patenten angemeldet. In den zurückliegenden 10 Jahren hielten die Mitarbeiter 1300 Vorträge im nationalen und internationalen Rahmen.

Auch in den Vorständen wissenschaftlicher Gesellschaften der DDR arbeiten zahlreiche Mitarbeiter des Institutes. Prof. Oehme ist Präsident der Gesellschaft für experimentelle Medizin der DDR.

Im Rahmen einer langjährigen Tradition ist das IWF in Aus- und Weiterbildungsaufgaben für Pharmakologen und Arzneimittelchemiker einbezogen. Insbesondere im Rahmen der Humboldt-Universität zu Berlin nehmen Mitarbeiter des Institutes zahlreiche Lehrverpflichtungen wahr.

Nach dieser einleitenden Übersicht geben die nachfolgenden Kapitel einen tieferen Einblick in die Konzeptionen und erzielten Forschungsergebnisse der wichtigsten Struktureinheiten des IWF.

the president of the Society of Experimental Medicine in the GDR. It is now a tradition that the IDR is drawn into the training and postgraduate training of pharmacologists and drug chemists, also through the Humboldt-University Berlin.

The chapters following this introductory survey will present details of the work done in the most important structural units of the IDR.

2 Pharmaka zur Beeinflussung des Blutdrucks

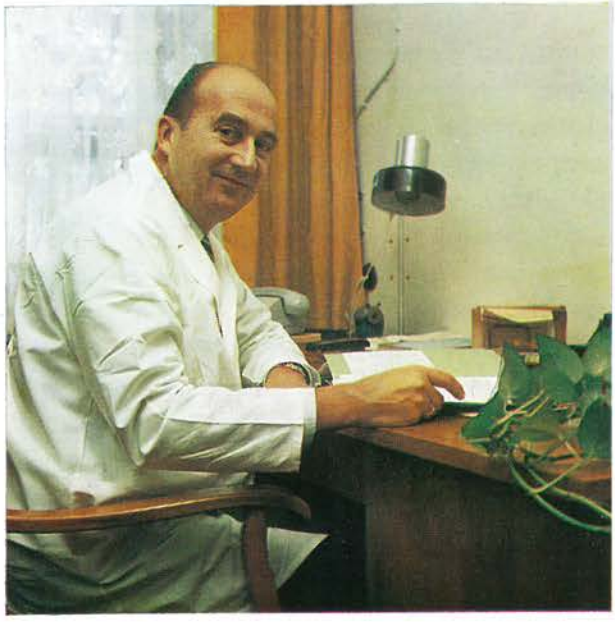
Pharmaceutics to Influence Blood Pressure

Die Entwicklung von Arzneimitteln nahm häufig ihren Ausgang von in der Natur vorkommenden Stoffen. Auf der Grundlage von Naturstoffen mit interessanten therapeutischen Eigenschaften wurden zahlreiche Pharmaka entwickelt, die noch heute für unsere Arzneimittelpalette unverzichtbar sind. Es sei hier nur an das von SERTÜRNER aus dem Schlafmohn isolierte Morphin und die zahlreichen davon abgeleiteten synthetischen Derivate erinnert. Während in der Vergangenheit solche „Vorbilder" für Arzneimittel meistens pflanzlichen Ursprungs waren, gewinnen in den letzten Jahren zunehmend Naturstoffe aus tierischem und menschlichem Gewebe an Interesse. Bei Tier und Mensch regulieren derartige endogene Mediatoren die Funktion des Nervensystems, das Herz-Kreislauf-System, Wachstums- und Differenzierungsvorgänge, immunologische Prozesse u. a. Endogene Mediatoren besitzen eine sehr unterschiedliche chemische Struktur. Es handelt sich bei ihnen sowohl um Aminosäuren, Amine, Lipide, Peptide, Glykopeptide als auch Proteine.

Störungen von Mediatorsystemen sind ursächlich an zahlreichen psychischen Erkrankungen, Immunkrankheiten und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt. Ein pharmakologischer Eingriff in krankhaft veränderte Mediatorsysteme eröffnet deshalb neue therapeutische Möglichkeiten.

Im IWF wird diesem Konzept der pharmakologischen Beeinflussung endogener Mediatorsysteme zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt. Waren es in den ersten Jahren nach Institutsgründung Arbeiten zu Inhibitoren der Katecholaminbiosynthese, so sind es gegenwärtig vorwiegend Untersuchungen zur Beeinflussung peptiderger Mediatoren. Diese Schwerpunktverlagerung erfolgte auf Grund der Tatsache, daß bei Mammalia 70% aller bekannten Mediatoren Peptide bzw. Proteine sind.

Die Arbeiten im IWF zur pharmakologischen



7 Prof. Dr. K.-D. Jentzsch,
Leiter der Abteilung Pharmakologie II

Head of the Department of Pharmacology II

The development of pharmaceutics has often proceeded from natural substances that were found to have interesting therapeutic effects. One needs mention only morphine, which SERTÜRNER isolated from poppy seeds, and the numerous synthetic morphine analgetics derived from it. While in the past these initial substances were of phytogenic origin, in recent years natural substances from animal or human tissues have been of increasing interest. In humans and animals, endogenous mediators regulate both the nervous and the heart and circulation systems, growth and differentiation as well as immunological processes, and others. Endogenous mediators differ in their chemical structures in that they range from amino acids, amines, lipids, peptides, glycopeptides and proteins.

Disorders in the mediator systems may cause various psychic, immune and heart and circulation diseases. So, pharmacological influence on

Beeinflussung des Katecholaminsystems und von peptidergen Systemen (vor allem Substanz P, Angiotensin II und Opioidpeptide) erfolgen vor allem mit dem Ziel, neue Möglichkeiten zur Therapie der Hypertonie und zur Verhinderung bzw. Normalisierung streßbedingter Störungen zu erschließen.

Die *Dopamin-ß-Hydroxylase* (DBH) ist ein Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese. Sie kommt in Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems vor und wird zusammen mit Noradrenalin freigesetzt. Man kann sie deshalb auch als Indikator für die sympathische Nervenaktivität ansehen.

DBH hydroxyliert das Dopamin zu Noradrenalin. Beide Verbindungen fungieren bekanntlich als Transmitter. Die aktuelle Aktivität des Enzyms bestimmt also das Konzentrationsverhältnis dieser für die Blutdruckregulation wichtigen Überträgersubstanzen.

Die Aktivität der DBH wird durch endogene Inhibitoren, möglicherweise organspezifisch, reguliert. Über deren chemische Natur ist bisher wenig bekannt. Besonderes Interesse galt demzufolge den natürlichen exogenen Inhibitoren sowie von ihnen abgeleiteten synthetischen Verbindungen. Durch sie können der Aktivitätszustand dieses Enzyms geregelt und dadurch grundlegende Funktionen des Organismus beeinflußt werden. Ein vom IPF gemeinsam mit dem IWF und dem Zentralinstitut für organische Chemie der AdW der DDR entwickelter DBH-Inhibitor befindet sich z. Z. in intensiver Prüfung. Es ist zu hoffen, daß die Arbeiten zu einem neuartigen Typ antihypertensiv wirkender Stoffe führen werden, die dadurch charakterisiert sind, daß ihr Angriffspunkt nicht im Rezeptorbereich der Synapse, sondern bereits eine Stufe vorher, nämlich am Enzymmolekül, liegt und die damit in die Transmitterbiosynthese eingreifen können.

Auch die DBH selbst steht im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses, besonders im Hinblick auf ihre Indikatorrolle bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen. So werden im Zentralinstitut für Herz- und Kreislaufforschung der AdW der DDR mit Hilfe einer von uns erarbeiteten und überführten Methode zur Bestimmung der DBH-Aktivität diagnostische Untersuchungen an Hy-

the pathological mediator systems may lead to new methods of therapy.

The IDR pays increasing attention to this concept. During the first period of IDR research it was the inhibitors of catecholamine biosynthesis that were investigated, now work is focussed on ways of influencing peptidergic mediators.

This change is due to the fact that with mammalia 70% of all the known mediators are peptides or proteins.

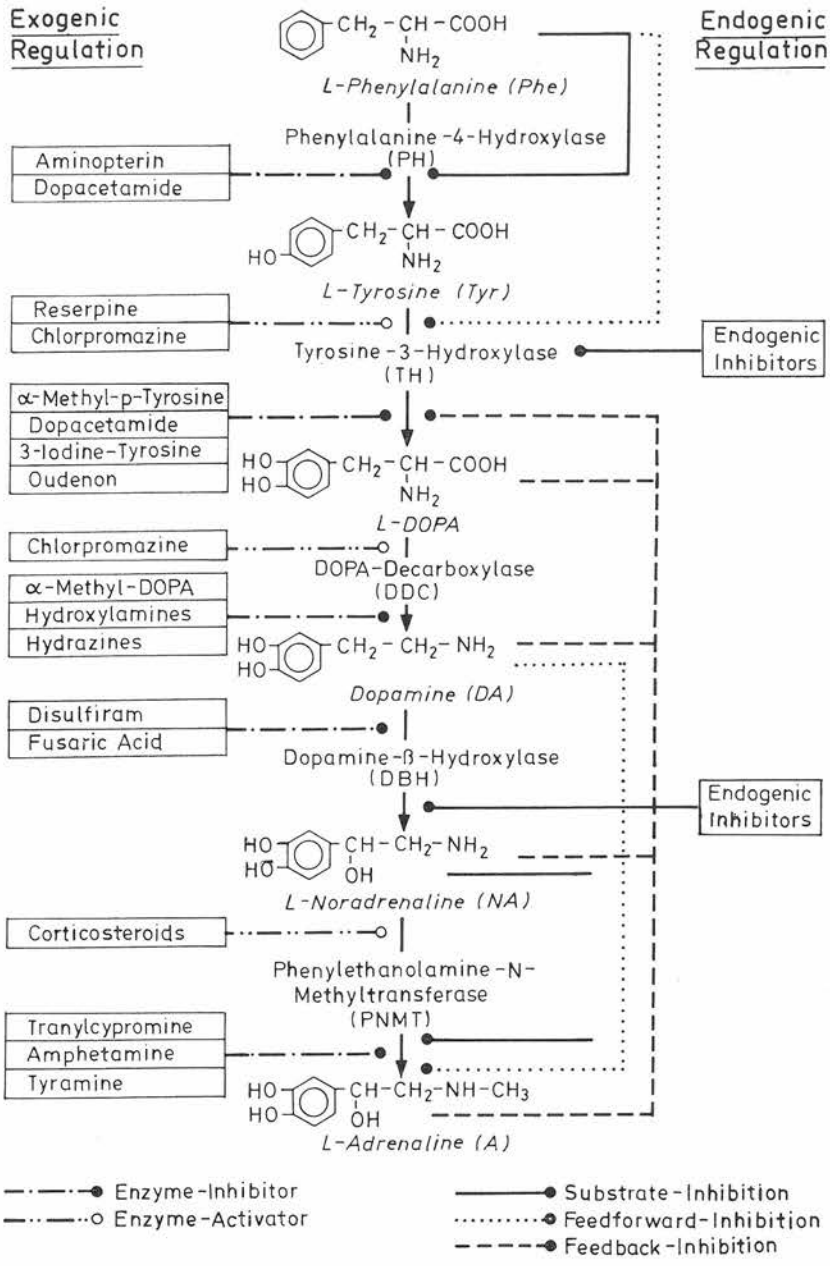
IDR research into ways of pharmacologically influencing catecholamine and peptide-like systems (above all SP, angiotensin II and opioid peptides) is in the first place aimed at deriving new possibilities for treating hypertension and preventing or normalizing stress-related disorders.

Dopamine-ß-Hydroxylase (DBH) is a key enzyme in catecholamine biosynthesis. It occurs in the nerve terminations of the sympathetic nervous system and is secreted along with noradrenaline, which is the reason why it serves as an indicator for the sympathetic nerve function.

DBH hydroxylates dopamine to noradrenaline. Both of them are known to be transmitters. The actual activity of this enzyme determines the ratio of concentration of these transmitter substances, which are essential for blood pressure regulation.

The activity of DBH is regulated by endogenous inhibitors, possibly organ-specific. Little is known so far about their chemical nature. Therefore, the natural exogenous inhibitors and their synthetic derivatives have been of particular interest, as they can regulate the activity of this enzyme and thus make it possible to influence basic functions of the organism. A DBH-inhibitor developed through the cooperation of the IPR, the IDR and the Central Institute of Organic chemistry is now under intensive investigation aiming at antihypertensives whose target will not be within the receptor range of the synapse but at an earlier stage, i. e. the enzyme molecule itself, thus opening up ways to influencing transmitter biosynthesis.

DBH itself continues to be in the centre of interest especially as regards its part in heart and circulation diseases. At the Central Institute



8 Schema zur Einordnung von Dopamin-ß-Hydroxylase (DßH) in die Prozeßkette der Adrenalin-Biosynthese

Scheme of the position of dopamine-ß-hydroxylase (DßH) within the process of adrenalin biosynthesis

pertonikern verschiedener Schweregrade und unterschiedlicher Ätiologie und Genese durchgeführt. Dabei interessieren besonders der prognostische Wert der DBH-Aktivität, Veränderungen im zirkadianen Rhythmus des Enzyms, der Einfluß körpereigener Inhibitoren, die Differenzierung primärer Hypertonieformen unter Pharmaka und andere einschlägige Probleme.

Das *Angiotensin-Converting-Enzym* (ACE) ist ein Schlüsselenzym im Metabolismus wichtiger blutdruckregulierender Peptide. Es bildet das blutdrucksteigernde Angiotensin II und inakti-

of Heart and Circulation Research (Ac. of Sc. GDR) examinations are made with patients suffering from hypertension at various degrees and of different etiology and genesis, with the help of a method developed at our institute to determine the DBH-activity. In the centre of interest are the prognostic value of DBH-activity, shifts in the circadian rhythm of the enzyme, the influence of endogenous inhibitors, the differentiation between primary forms of hypertension under the influence of pharmaceutics, and other problems.

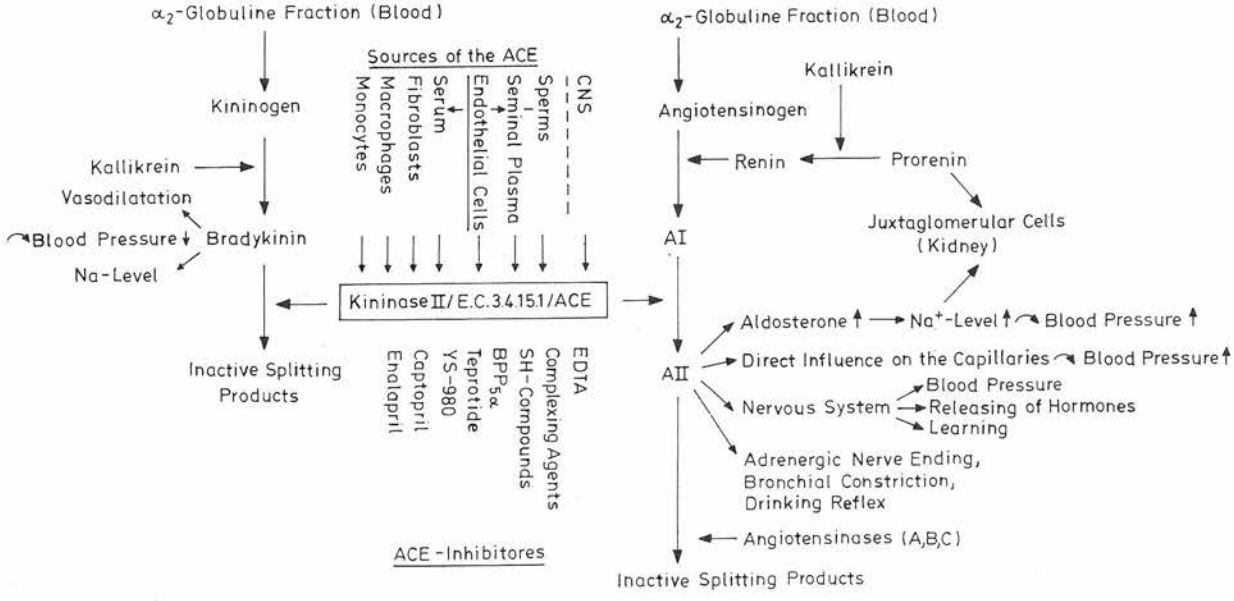
viert das vasodilatorische Bradykinin. Die Hemmung dieses Enzyms führt folglich zur Blutdrucksenkung.

Vorlaufforschung zur Entwicklung von Antihypertensiva auf der Grundlage der Hemmung des ACE ist ein relativ junges Arbeitsgebiet in unserem Institut. Die Aufgabe besteht darin, Stoffklassen mit bereits bekannter ACE-Inhibitorwirkung (Peptide und Peptidanaloga) chemisch zu modifizieren und dadurch ihre Stabilität und Wirkung bei oraler Anwendung zu verbessern. Gleichzeitig wird eine Reduzierung von Nebenwirkungen, wie sie bei den in die Therapie eingeführten Verbindungen auftreten, angestrebt. In Untersuchungen, die mit selbstgewonnenen, aufgereinigten ACE-Präparaten durchgeführt werden, wurde außerdem eine Reihe organischchemischer Verbindungsklassen als neue ACE-Inhibitoren erkannt. Diese neuen Ergebnisse zur ACE-Hemmung und die gleichzeitig an anderen Metalloenzymen (z. B. Carboxypeptidasen) durchgeführten Inhibitionsversuche erweitern die bisherigen Vorstellungen über die Wechselwirkungen zwischen dem ACE und seinen Inhibitoren, ohne jedoch die prinzipielle Gültigkeit des ACE-Modells von CUSHMAN in Frage zu stellen.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der biochemischen Testung und durch den Einsatz von Ver-

Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) is a key enzyme in the metabolism of important blood pressure regulating peptides. It forms blood pressure increasing angiotensin II and inactivates vasodilating bradykinin. Consequently, inhibition of this enzyme will result in a blood pressure decrease. Research into the development of antihypertensives based on ACE-inhibition is a relatively new field at the IDR. At present we aim to chemically modify substances which are known to inhibit ACE (peptides and peptide analogs) in order to improve their stability and therapeutical effect for oral application. Simultaneously the undesired side effects occurring with the substances already introduced into therapy need to be reduced. In investigations carried out with ACE preparations developed and purified at the IDR, a number of other chemical compounds were found to be ACE-inhibitors. These findings as well as inhibition tests with other metal enzymes (e. g. carboxypeptidases) extend our knowledge of the interaction between ACE and its inhibitors without denying the principal validity of CUSHMAN's model.

Both biochemical testing and quantitative structure-activity analysis (see chapter 8) contribute to optimizing the chemical structure of highly effective compounds. Some of the ACE-inhibi-



9 Schema zur zentralen Rolle von Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) im Renin-Angiotensin- (und Kallikrein-Kinin)-System

Scheme of the central function of angiotensin converting enzyme (ACE) in the renin-angiotensin (and kallikrein kinin)-system

fahren der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse (siehe Kapitel 8) wird laufend zur Optimierung der chemischen Struktur wirkungsstarker Verbindungen beigetragen. Für einen Teil der über in-vitro-Tests ausgewählten ACE-Hemmer dieser Art ließ sich inzwischen auch eine antihypertensive Wirkung in in-vivo-Versuchen nachweisen.

DerAnwendungsbereich ACE-hemmender Wirkstoffe beschränkt sich nicht nur auf renovaskuläre Hypertonieformen, bei denen durch Unterdrükkung der Angiotensin II-Bildung innerhalb des Renin-Angiotensin-Systems des Blutes bzw. des Gefäßendothels eine Blutdrucknormalisierung erreicht werden kann. Es wird darüber hinaus eine antihypertensive Wirkung auch bei solchen Hypertonieformen angestrebt, bei denen das schwerer zugängliche ACE innerhalb sogenannter gewebsautonomer Renin-Angiotensin-Systeme erreicht bzw. blockiert werden muß. Solche Angriffspunkte (z. B. im ZNS oder in der Gefäßwand) spielen bei der essentiellen Hypertonie, bei der der Plasma-Reninspiegel unverändert oder sogar erniedrigt ist, eine wichtige Rolle. Erfahrungen über die Wirksamkeit von bereits klinisch erprobten ACE-Hemmern bei der essentiellen Hypertonie beweisen, daß bei geeigneter Dosierung ACE-Hemmer ihr physiologisches Target dort zu erreichen vermögen. Zur Überwindung physiologischer Schranken auf dem Weg zum Wirkort können chemische Modifizierungen des Wirkstoffes bedeutungsvoll sein; ihnen wird auch von uns Beachtung geschenkt.

Eine langjährige Tradition im Institut haben Arbeiten zu *Substanz P* (SP) und Substanz P-ähnlichen Peptiden. SP wurde u. a. nachgewiesen in primär sensorisch afferenten Neuronen, in sympathischen Ganglien, in der nigro-striatalen Achse. Damit ist dieses Peptid von physiologischer Bedeutung vor allem für die Schmerzaufnahme und -verarbeitung, die Kreislaufregulation und für psychomotorische Prozesse.

Im IWF konnten für das Verständnis der Wirkung von SP zahlreiche weiterführende Ergebnisse erzielt werden. Im Tierexperiment gelang der Nachweis (Science, 1980), daß die Wirkung von SP auf die Schmerzschwelle von der Ausgangslage vor Peptidapplikation abhängig ist. Das bedeutet, daß SP bei Mäusen mit niedriger

tors of this kind selected through in-vitro tests have also shown an antihypertensive effect in in-vivo tests.

The application of ACE-inhibiting drugs is not restricted to renovascular forms of hypertension, where suppressed angiotensin-II formation in the renin-angiotensin-system of the blood or vascular endothelium results in normalizing the blood pressure. Moreover, such forms of hypertension are to be treated where it is difficult to gain access to the ACE in the so-called tissue-autonomous renin-angiotensin system but where ACE must be inhibited. These targets (e. g. in the central nervous system or in the vascular wall) are of particular importance in essential hypertension with the plasma-reninlevel unchanged or even decreased. The results of clinical trials of ACE-inhibitors in essential hypertension prove that ACE-inhibitors reach their physiological target if administered in appropriate dosage. Physiological obstacles preventing the drug from reaching its target may be overcome by chemical modifications of the drug, a problem which is also dealt with at our institute.

The IDR has a long tradition of research into Substance P (SP) and SP-like peptides.

SP was proven to occur in primarily sensorially afferent neurones, in sympathetic ganglions, on the nigro-striatal axis.

This means that this peptide is physiologically relevant for perceiving and coping with pain, for regulating blood-circulation and psychomotor processes.

IDR research has largely contributed to the better understanding of SP action. In animal experiments it was proved that SP action on the pain threshold depends on the level prior to peptide application (Science, 1980), i. e. in mice with a low pain threshold SP causes analgesia, but has an analgetic effect in mice with a high pain threshold, and it does not cause any change in mice with a medium pain threshold. The dependence between SP action and the starting level was also proved in other types of experiments, e. g., those influencing locomotion (cooperation with a team headed by K. Hecht, Dept. of Neuropathophysiology at the Medicine Section of the Humboldt-University Berlin).

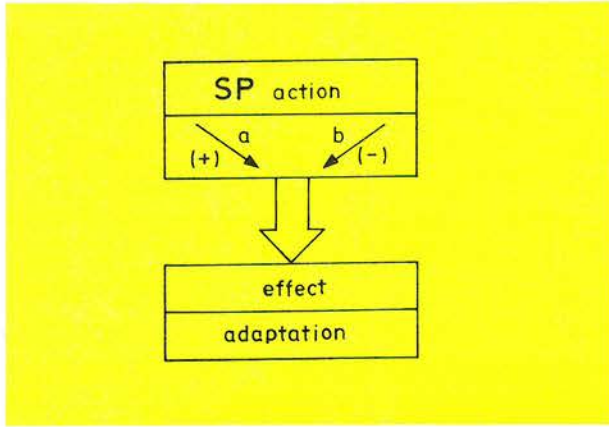
Schmerzschwelle eine Analgesie auslöst, bei Mäusen mit einer hohen Schmerzschwelle hyperalgetisch wirkt und bei Mäusen mit einer mittleren Schmerzschwelle keine Veränderungen hervorruft. Diese Abhängigkeit der SP-Wirkung von der Ausgangslage konnte gemeinsam mit der Gruppe von K. Hecht (Abt. Neuropathophysiologie des Bereiches Medizin der Humboldt-Universität Berlin) auch in anderen Versuchsanordnungen nachgewiesen werden, so in Untersuchungen zur Beeinflussung der Verhaltensaktivität bzw. der Lokomotion.

In Ergänzung zu dieser Abhängigkeit der SP-Wirkung von der Ausgangslage wurde von uns 1981 nachgewiesen, daß die N- und C-terminalen Sequenzbereiche von Substanz P gegenläufige pharmakologische Effekte auslösen können. So ist der N-terminale Bereich Träger der hyperalgetischen Wirkkomponente dieses Peptides, während der C-Terminus die analgetische Wirksamkeit verursacht. Ausgehend von dieser im IWF gefundenen Abhängigkeit der SP-Wirkung sowohl von der Ausgangslage des Versuchstieres als auch von einzelnen Sequenzbereichen des SP-Moleküls wurde für SP ein Mechanismus als „*regul*atory pept*ide*" („regulide") postuliert. Ziel einer solchen „regulide-Funktion" ist es, zur Homöostasesicherung im Organismus beizutragen (Abb. 10).

Auf der Grundlage dieser Theorie wurde gemeinsam mit K. Hecht und sowjetischen Kollegen für SP erstmals ein Antistreßeffekt beschrieben. Für die Entdeckung dieses Antistreßeffektes erteilte die UdSSR 1982 einen Urheberschein (Nr. 946548). Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht verschiedener „Antistreßeffekte" von SP.

Als Ursache des „Antistreßeffektes" von exogen applizierter SP wurde eine Beeinflussung des Katecholaminsystems der Nebenniere nachgewiesen, welches eine fundamentale Rolle im Streßgeschehen spielt. Mit diesen Befunden stimmt überein, daß die im Nebennierenmark vorkommende endogene SP unter chronischem Streß erniedrigt wird. Der „Normalisierungseffekt" exogen applizierter SP bei Dysstressymptomen ist demzufolge als ein Substitutionseffekt des Peptides im Sinne eines „Adaptogens" zu verstehen.

In 1981 we proved that N- and C-terminal sequences of SP can cause opposite pharmacological effects. The N-terminal sequence carries the hyperalgetic component of this peptide, the C-termination causing the analgetic effect. Proceeding from both the above mentioned findings the so-called *regul*atory pept*ide* ("regulide") mechanism has been postulated. This "regulide function" aims at the homeostasis of the organism (Fig. 10).



10 Wirkungsweise regulatorischer Peptide
Mode of action of regulatory peptides

In cooperation with K. Hecht and our Soviet collegues SP was – on the basis of this theory – described as having an "anti-stress effect" for the first time.

The discovery of this anti-stress effect was awarded the inventor's certificat No. 946548. The following table provides a survey of various anti-stress effects of SP.

Chronic experimental stress causes numerous functional disorders in laboratory animals.
SP administration (2.5 – 250 µg/kg) prevents or reduces the stress induced disorder. The effect lasts for up to 72 hours after discontinuing the peptide.

	Chronically stressed rats	SP administered chronically stressed rats
waking and sleeping phases	reduction of deep sleep and REM sleep	normalization
biorhythm	dissynchrony	normalization
learning processes	deterioration	normalization
	hypertension	normalization
heart frequency	tachycardia	normalization

Chronischer experimenteller Streß führt bei Versuchstieren zu zahlreichen funktionellen Störungen.
SP-Gabe (2,5 – 250 µg/kg) verhindert oder normalisiert diese streßinduzierten Störungen. Die Wirkung hält bis zu 72 Stunden nach Absetzen des Peptides an.

	Chronisch gestreßte Ratten	Chronisch gestreßte Ratten mit SP
Wach-Schlaf-Phasen	Reduktion des Tief- und REM-Schlafes	Normalisierung
Biorhythmus	Desynchronosie	Normalisierung
Lernvorgänge	Verschlechterung	Normalisierung
Blutdruck	Hypertonie	Normalisierung
Herzfrequenz	Tachykardie	Normalisierung

Im Plasma hypertoner Patienten konnte in Kooperation mit dem Zentralinstitut für Herz-Kreislauf-Forschung der AdW eine erniedrigte SP-Konzentration mittels Radioimmunoassays nachgewiesen werden. Damit ist in Übereinstimmung, daß bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) der SP-Pool im Nebennierenmark sehr labil ist, so daß kurzzeitiger Stressoreinfluß zu einer drastischen Reduktion der SP-Konzentration führt. SP zeigt demzufolge an SHR auch einen (partiellen) „Normalisierungseffekt". Diese Befunde zur „Antistreßwirkung" und zur antihypertensiven Wirkung von SP können neue therapeutische Möglichkeiten für die Medizin erschließen.

Die Durchführung dieser umfangreichen pharmakologischen und biochemischen Arbeiten basierte auf einem langjährigen Vorlauf auf peptidchemischem Gebiet. Zahlreiche originäre chemische Ergebnisse u. a. zur Verfahrensentwicklung, zu Reinigungsoperationen, zu neuen Applikationsformen und zu gezielten Strukturvariationen trugen zum erreichten, international beachteten Stand wesentlich bei.

Im Rahmen derartiger interdisziplinär betriebener Struktur-Wirkungs-Untersuchungen gelang für SP eine Differenzierung von neurotoper und vegetativer Wirkkomponente. Diese Arbeiten sind auch zukünftig ein wichtiger Arbeitsschwerpunkt. Damit in Zusammenhang stehen die interessanten Befunde, daß N-terminale Sequenzen von SP, nämlich Arg-Pro-Lys-Pro (SP^{1-4}) und Lys-Pro (SP^{3-4}) das ACE in vitro hemmen.

This anti-stress effect of exogenously applied SP has been proven to be caused by an influence on the catecholamine system of the suprarenal gland, which plays a major part in stress related phenomena.

This finding corresponds to the decrease of endogenous SP under chronic stress. So the "normalizing effect" of exogenously applied SP in case of dysstress symptoms can be seen to be a substitution effect through the peptide acting as an "adaptogen".

In cooperation with the Central Institute of Heart and Circulation Research (Ac. of Sc. GDR) we proved by radioimmunoassay that hypertensive patients have decreased SP concentration in the plasma. This corresponds to the unstable SP pool in the suprarenal medulla in spontaneously hypertensive rats (SHR) causing a drastic reduction of SP concentration under short-term stressor influence. Thus SP has a (partial) "normalizing effect". The results of the

11 Ein komplexer Meßplatz, mit dem entweder die Ableitung der sympathischen Nervenaktivität oder die elektrische Stimulation peripherer Nerven bei der Ratte möglich sind. Darüberhinaus werden wichtige Parameter – wie EKG, Blutdruck, Atmung und Körpertemperatur – erfaßt.

A complex equipment for both recording of the sympathetic nerve activity and electrical stimulation of peripheral nerves of the rat. Furthermore, a variety of parameters – such as ECG, blood pressure, respiration frequency and body temperature – can be recordet.

Da mit dem Auftreten dieser Sequenzen beim Abbau von SP zu rechnen ist, könnte hier ein interessanter Zugang zum Verständnis der Wechselwirkung zweier Peptidmediatorsysteme liegen.

Die umfangreichen Ergebnisse zu SP wurden in zahlreichen Veröffentlichungen in international führenden Zeitschriften bzw. Monografiebeiträgen (erschienen 1976 und 1980 bei Raven Press New York bzw. 1982 bei Pitman, London) niedergelegt.

1981 erschien eine Zusammenfassung wichtiger Ergebnisse zu SP im Rahmen der „Beiträge zur Wirkstofforschung" mit einer russischsprachigen Übersetzung (1984) im Verlag Sinatne, Riga.

Das Institut war 1984 Mitveranstalter eines Satellitensymposiums in Großbritannien zum „Metabolismus und zur biologischen Wirksamkeit von Substanz P" in Verbindung mit dem 9. internationalen Pharmakologenkongreß in London. Auch 1986 und 1988 wird das Institut an der Durchführung von internationalen Substanz P-Symposien mitverantwortlich beteiligt sein.

Der Fortschritt in den Forschungen zu SP und anderen Peptidmediatoren war in den zurückliegenden Jahren international außerordentlich groß. Das betrifft die Entdeckung zahlreicher neuer Peptidmediatoren, Kenntnisse zu ihrer Lokalisation, zum Wirkungsmechanismus und insbesondere zu ihrem Koergismus mit anderen Mediatorsystemen, z. B. den Katecholaminen.

Die hohe Dynamik in der internationalen Peptidforschung wird auch in den nächsten Jahren weiter anhalten. Dabei werden sich zunehmend neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie in der Medizin aus derartigen Forschungen ergeben.

Aus diesem Grunde werden interdisziplinär angelegte Arbeiten zu medizinisch bedeutsamen Peptidmediatoren langfristig ein wichtiger Schwerpunkt der Forschungen im IWF sein.

research into the anti-stress and antihypertensive effects of SP may bring about new therapeutic possibilities. This extensive pharmacological and biochemical investigation was based on many years of advance research in peptide chemistry.

Many original chemical and biopharmaceutical results concerning process development, purification, new modes of application and systematic structural variations, and other contributed greatly to the high level achieved.

Interdisciplinery structure-activity analyses succeeded in differentiating between neurotropic and vegetative effective components of SP. Research into this problem is being continued. Another finding interesting in this connection is that the N-terminal sequences of SP, i. e. Arg-Pro-Lys-Pro (SP^{1-4}) and Lys-Pro (SP^{3-4}) inhibit ACE in vitro. As these sequences are likely to occur during SP degradation this could help to further elucidate the interaction between two mediator systems.

The results of our SP research have been published in a number of leading international journals and in monographs (published 1976 and 1980 by Raven Press New York and 1982 by Pitman, London).

In 1981 a survey of significant results in SP research appeared in "Beiträge zur Wirkstoffforschung", published also in Russian by Sinatne, Riga, 1984.

In 1984 the Institute was co-organizer of a satellite symposium on "Substance P – Metabolism and Biological Action" in Great Britain, in connection with the 9th International Congress of Pharmacology in London. Furthermore, the IDR will be co-organizer of international SP-Symposia in 1986 and 1988. Great progress has been made in the research of SP and other peptide mediators with regard to the discovery of a number of new peptide mediators, their localization, their mechanisms of action and their coergism with other mediator systems, such as the catecholamines.

The dynamic development in international peptide research will continue and new methods of medical diagnosis and treatment will result.

Therefore interdisciplinery research into medically relevant peptide mediators will be given priority in long-term IDR research.

3 Pharmaka zur Beeinflussung des insuffizienten Herzmuskels und des Infarktes

Pharmaceutics to Influence Insufficient Myocardium and Infarction

Neben den Störungen der Blutdruckregulation spielen für die Morbidität der Bevölkerung der DDR direkte Erkrankungen des Herzens eine große Rolle, wie die myokardialen Durchblutungsstörungen und die Insuffizienz des Herzens. Das Ziel, auch unserer Arbeiten ist es, diese Erkrankungen durch vorbeugende Maßnahmen zu verhindern, oder aber durch therapeutische Eingriffe zu behandeln.

Die Arbeiten konzentrieren sich dabei auf die beiden Schwerpunkte:

- Entwicklung neuer myokardprotektiv wirkender Substanzen.
- Entwicklung neuer, positiv inotrop wirksamer Substanzen.

Unseren Arbeiten liegen folgende Erkenntnisse und Überlegungen zugrunde:

Durchblutungsstörungen (Ischämie) des Herzmuskels haben sehr komplexe Ursachen, können in unterschiedlicher Ausprägung auftreten und zu reversiblen oder irreversiblen Gewebeschäden führen. Fällt nach einem irreversiblen Myokardschaden (Herzinfarkt) so viel Herzmuskelgewebe aus, daß das verbleibende Gewebe diesen Ausfall funktionell nicht mehr kompensieren kann, wird das Herz insuffizient. Jedoch können neben der Ischämie auch andere Ursachen zu einer Herzinsuffizienz führen, wie erhöhter Blutdruck, Infektionen, Einwirkung toxischer Substanzen u. a. m. Nicht nur die Ischämie des Herzens, sondern auch die Insuffizienz ist so durch viele Faktoren bedingt, und es ist nur begrenzt möglich, alle Faktoren prophylaktisch oder therapeutisch zu beeinflussen. So wird es sinnvoll, unmittelbar an der gefährdeten Herzmuskelzelle einzuwirken. Das Myokard soll in die Lage versetzt werden, Störungen in der Sauerstoffversorgung intakt zu überstehen (Myokardprotektion). Können geschädigte Muskelzellen nicht mehr ausreichend kontrahieren, muß die mangelhafte Kontraktilität angehoben werden, was durch po-

12 Prof. Dr. H. Löwe,
Leiter der Abteilung Pharmalogie I
Head of the Department of Pharmacology I

Beside disorders in blood pressure regulation, direct heart diseases play a major role in the morbidity of people in the GDR, among them the disturbed myocardial blood perfusion and the myocardial heart failure. The aim is to prevent these diseases by either taking prophylactic or therapeutic measures. This is also the basis of our investigations. The two main topics are:

- development of new myocardium-protecting substances
- development of new positive inotropic acting substances

Our work is based on the following fundamental findings and considerations:

Ischemia, i. e. insufficient blood perfusion of the heart muscle, has complex causes. They may vary in intensity, resulting in reversible or irreversible injuries of the tissue. If the myocardium is irreversibly damaged to such an extent (myo-

13 Am Minischwein können wertvolle Informationen über potentielle Wirkstoffe gewonnen werden. Es sind Aussagen über Veränderungen der Myokard-Durchblutung, über mehr als 20 Druck-, Volumen-, Vor- und Nachlast-Parameter, über die systolischen Zeitintervalle sowie über Änderungen von EKG, Blutdruck und Herzfrequenz möglich

Valuable information about potential drugs can be obtained from the mini pig, where effects on myocardial blood flow, more than twenty pressure-, volume-, pre- and afterload parameters, the systolic time intervals and ECG, blood pressure and heart rate are evaluated

sitiv inotrope Wirkstoffe (Kardiotonika) möglich wird. Eine Protektion des bedrohten Myokards ist immer auch als eine Prophylaxe vor einer eventuell resultierenden Herzinsuffizienz zu verstehen. Wir sehen daher Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet in einem konzeptionellen Zusammenhang mit Arbeiten zur Beeinflussung des insuffizienten Herzmuskels.

Man versucht, den ischämisch bedrohten Herzmuskel funktionell so weit wie möglich zu entlasten, und eine möglichst optimale Durchblutung des Herzmuskels zu erreichen. Eine Mangeldurchblutung des Myokards ist immer eine Diskrepanz in der Relation des Blutangebotes zur Myokardfunktion. Bei gesteigerter Funktion steigt die Durchblutung des Gewebes an. Ist diese eingeengt, kann die Energiebilanz nicht aufrecht erhalten werden und es resultiert eine relative Ischämie. Wird die Funktion des Herzmuskels gesenkt – z. B. durch Senkung der notwendigen Kontraktionsarbeit – kann eine relative Ischämie behoben werden. Bei relativen oder absoluten Durchblutungsstörungen des Myokards werden Katecholamine freigesetzt, welche zum Anstieg der Herzfrequenz und der Kontraktilität des Herzmuskels, sowie zur Verengung von Arteriolen der peripheren Gefäßstrombahn führen. Dieser, für den Herzmuskel bedrohlichen Situation kann durch Blockade der Betakatecholaminrezeptoren entgegengewirkt werden. Eine Verengung peripherer Gefäße, kann auch durch dilatierend wirkende Substanzen, wie Hydralazin oder Kalziumantagonisten,

cardial infarction) that the remaining tissue cannot compensate for it functionally, the result will be heart failure. Ischemia is not the only factor leading to heart failure. Hypertension, infections or the influence of toxic substances on the cardiac muscle tissue also result in heart failure. This goes to show that both, myocardial ischemia and heart failure may be caused by a variety of factors, which is why the chances of influencing all possible factors prophylactically or therapeutically are limited. It also explains the attempt to directly influence the threatened myocardial cell. The myocardium is to be enabled to remain functionally intact despite disturbed circulation (myocardial protection). In case of insufficient contraction the aim is to regain contractility by positive inotropic substances (cardiotonics). The protection of the threatened myocardium is at the same time a prophylactic measure against potential heart failure. For this reason we see our work in this field and research into the treatment of the insufficient myocardium as one entity.

Interference is to relieve the myocardium at risk of ischemia functionally and reach the possible optimum of perfusion with blood. In every case ischemia results from a discrepancy in the relation between the blood supply and the myocardial function. Functional increase demands increased perfusion of the tissue. In case of limited perfusion, the energy balance cannot be maintained which results in relative ischemia. If the heart muscle is relieved functionally, espe-

behoben werden. Kalziumantagonisten bewirken über die dilatierende Wirkung hinaus zusätzlich eine Senkung überschießender Kontraktilität von Myokardzellen. Der Kalziumeintritt in Myokardzellen kann massiv ansteigen, wenn der Herzmuskel hypoxisch wird. Das führt zur zusätzlichen Spaltung von ATP über eine Aktivierung von ATPasen, zur Aktivierung kalziumabhängiger Phospholipasen usw. Die Hemmung dieses überschießenden Kalziumeintritts in die Zelle führt so auch zu einer myokardprotektiven Wirkung, die teilweise bereits klinisch genutzt wird. Weiterhin werden für eine Myokardprotektion gerinnungshemmende Stoffe eingesetzt. Dadurch werden intravasale Gerinnungen verhindert, die eine bereits bestehende Mangeldurchblutung komplizieren können. Hier spielt die lokale Freisetzung von Prostazyklin/Thromboxan eine Rolle. Prostazyklin ist ein sehr wirksamer Dilatator. Chemisch stabilisierte Prostazyklinderivate werden bereits als Myokardprotektiva eingesetzt.

Im subzellulären Bereich treten unter Sauerstoffmangel Störungen der Funktion der zellulären Membranen auf, an denen essentielle Kationengradienten aufrechterhalten werden. Solche Störungen zeigen sich z. B. in einer sehr schnell auftretenden massiven Schwellung von Endothelzellen in versorgenden Kapillaren, die bis zum totalen Verschluß der Gefäße führen können. In verschiedenen Myokardregionen konnten wir in experimentellen Studien solche Endothelzellschwellungen im Kapillarbereich in unterschiedlichem Ausmaß bereits innerhalb kürzester Zeit nach Einsetzen einer Hypoxie (5 min. nach Hypoxiebeginn) beobachten. Wie wir zeigen konnten, nimmt der mittlere Kapillardurchmesser im Myokard dabei um ca. 40% ab.

Ähnliche Effekte sind in den betroffenen Myokardzellen zu beobachten. Es kommt zu einer Abnahme der Kontraktilität, zu Störungen der Mitochondrienfunktion usw. Wie experimentelle Arbeiten auch aus unserem Institut belegen, können solche Defekte durch Peroxidationen membranständiger, ungesättigter Fettsäuren entstehen. Die Ursache für die Peroxidationen können vermehrt auftretende Sauerstoffradikale sein. Bisher ist nicht endgültig geklärt, welche pathogenetische Bedeutung diese Vorgänge haben.

cially by a decrease of the necessary stroke work, relative ischemia can be cured. In relative or absolute ischemia of the myocardium, catecholamines are released causing an increase in heart frequency and contractility, and a narrowing of the peripheral arterioles. This myocardium-threatening condition can be treated by applying blockers of the betacatecholamine receptors. The narrowing of the peripheral vessels can be reversed also by the application of vasodilating substances, such as hydralazine or calcium antagonists. Beside their dilating action, calcium antagonists effect a decrease in the excessive contractility of the myocardial cell. The Ca-influx into hypoxic myocardial cells may rise drastically thus leading to the enhanced splitting of ATP through the activation of ATPases, to an activation of Ca-dependent phospholipases, and others. Consequently, the inhibition of excessive Ca-influx into the cells has a myocardium-protecting effect. This is already made use of to a certain extent in clinical treatment. Besides, coagulation inhibiting substances are applied to protect the myocardium. The main aim of this therapy is the prevention of intravascular coagulations, which may complicate already existing circulation insufficiency. In this area local release of prostacycline/thromboxane plays a role, prostacycline turning out to be a very efficacious dilating substance. Chemically stabilized derivatives of prostacycline are already used as protectives. In the subcellular area disturbances of the cellular membranes, where essential cation gradients are maintained, may come about under hypoxia. This type of disturbance also shows up in a very rapid and massive swelling of the endothelial cells in the supplying capillaries, which may result in the total occlusion of the vessels.

We could show in our studies that the endothelial capillary cells of several myocardial areas swell shortly after the onset of a hypoxia (up to 5 min after hypoxia). It could be shown by these experiments that the mean diameter of the capillaries of the myocardium is decreased in this period by nearly 40%.

The same effects leading, among others, to decreased contractility of the myocardial cells, to disturbances of the mitochondrial functions

Sollte es sich um Schlüsselreaktionen handeln, dann gäbe es Möglichkeiten hier gezielt pharmakologisch einzugreifen. Mann kann sowohl entstehende Sauerstoffradikale durch Radikalfänger beseitigen, als auch Schutzmechanismen des Organismus gegen auftretende Radikale stimulieren. Ein solcher Schutzmechanismus ist beispielsweise durch die Funktion der Superoxiddismutase gegeben, die Superoxidradikale beschleunigt in H_2O_2 überführt. Dieses und auch andere Peroxide werden durch Peroxidasen weiter umgesetzt. Peroxidasen sind in der Zelle in Peroxisomen kompartimentiert.

In einer Reihe von Arbeiten konnten wir zeigen, daß Radikalfänger wie Rutosidderivate, das Manitol und andere Verbindungen in der Lage sind, gegen hypoxische Myokardschäden protektiv zu wirken. Aus diesen Ergebnissen werden in der Zukunft myokardprotektiv wirkende Arzneimittel entwickelt. Weiterhin wird untersucht, ob ein wirksamer Myokardschutz gegen Hypoxien zu erreichen ist, wenn mittels pharmakologischer Einwirkung die Superoxiddismutasen oder auch Peroxidasen vermehrt induziert werden. Eine Reihe von Substanzen führen zu einer Vermehrung der Peroxisomen z. B. in Leberzellen. Solche Substanzen, wie u. a. Clofibrinsäurederivate, werden als Antiarteriosklerotika eingesetzt, da sie einen erhöhten Lipidspiegel im Blutplasma senken können.

Hier sei auf die Abbildung 22/Bild 3 verwiesen, in der vermehrte Peroxisomen in Leberzellen dargestellt sind, die unter dem Einfluß einer lipidsenkenden Substanz standen.

Kommt es infolge Myokardschäden zur Herzinsuffizienz, muß versucht werden der Insuffizienz entgegenzuwirken. Zur Zeit werden Katecholaminderivate, wie Dopamin oder Dobutamin und Digitalisglykoside breit als positiv inotrop wirkende Arzneimittel in der Klinik eingesetzt. Beide Substanzgruppen sind jedoch in ihrer Einsetzbarkeit begrenzt. Die Katecholaminderivate haben unterschiedlich ausgeprägt immer auch eine chronotrope Wirkung, die die Energiebilanz des insuffizienten Myokards zusätzlich belasten kann. Die Herzglykoside (Digitoxin, Digoxin u. a.) haben eine so geringe therapeutische Breite (ca. 1,5), daß bereits bei therapeutischen Dosierungen toxische Nebenwirkungen

are watched in the myocardial cells, concerned. Several findings from our institute, too, prove that these disorders are caused by peroxidations of unsaturated fatty acids of the membrane. This may be due to an increased concentration of oxygen radicals. As yet the pathogenic significance of these processes has not been fully clarified. Should they be key reactions, then specific pharmacological interference would be possible. Oxygen radicals could be removed by exogenous substances scavenging the radicals or by stimulating the protective mechanisms of the organism against occuring radicals. Such a protective mechanism is, among others, provided by the function of the superoxide dismutase which accelerates the conversion of superoxide radicals into H_2O_2. This and other peroxides are further degraded by peroxidases. In the cell, peroxidases are compartmented in peroxisomes. In some experiments we could show that derivatives of rutoside, mannitol and other substances as radical scavengers effect protection against hypoxic injuries of the myocardium. In future we will develop myocardium-protecting drugs taking into account these connections. Thereafter we will examine the possibility of protecting the myocardium against hypoxia by inducing an increase of superoxide dismutases or peroxidases through pharmacological interference. A number of substances are known to cause an increase of peroxisomes in liver cells. These substances such as derivatives of clofibrinic acid are used as so-called anti-arteriosclerotics as they decrease the lipid level in the blood plasma. Figure 22/pict. 3 shows an increased number of peroxisomes in liver cells, pre-treated with a lipid-decreasing substance.

In case of heart failure due to myocardial damage we must interfere, either using cardiotonics or relieving the insufficient heart. Catecholamine derivatives such as dopamine or dobutamine and digitalis glycosides are introduced as positive inotropic drugs. Both groups are, however, limited in their application. Catecholamine derivatives always have a more or less distinct additional chronotropic action, which may be an additional load on the energy balance of the insufficient myocardium. The therapeutic index of heart glycosides (digitoxin, digoxin and others)

14 Arbeiten am isolierten Herzen der Ratte unter Einsatz eines Mikrorechners zur Meßwert-Erfassung einschließlich Protokoll-Druck

Experiments with an isolated rat heart using a microcomputer for data collection, processing and load audit

auftreten. Es stellt sich daher international die Frage nach neuen, besser wirksamen Substanzen. Solche Substanzen sind u. a. auch in unserem Institut in Bispyridinerivaten gefunden und bis zur praktischen Anwendung gebracht worden. Neben einer besseren therapeutischen Breite zeigen Bispyridine eine peripher dilatierende Wirkung und wären somit für die Behandlung von Herzinsuffizienzen besonders geeignet. Nebenwirkungen lassen z. Z. jedoch nur einen begrenzten klinischen Einsatz bei schweren, digitalisresistenten Insuffizienzen zu. Man kann jedoch davon ausgehen, daß international auf diesem Gebiet weitere Arbeiten laufen. Auch wir konnten hier bereits zu neuen Erkenntnissen kommen. Über eine neue rationelle Synthese unter Nutzung einheimischer Vorprodukte war es uns möglich, ein Bispyridinderivat (Amrinon) herzustellen und als Cordemcura® in der DDR in die Testung einzuführen.

Biochemische Untersuchungen zeigen, daß sich die insuffiziente Myokardzelle dadurch auszeichnet, daß die normal bereitgestellte chemische Energie nicht oder nur ungenügend in mechanische Kontraktionsarbeit umgesetzt werden kann. So ist eine verminderte Kontraktilität bei unvermindertem Gehalt an energiereichen Nukleotiden (ATP, Kreatinphosphat u. a.) und auch bei normalem Kalziumgehalt für die insuffiziente Myokardzelle charakteristisch. Da für die normale Kontraktion eine Kompartimentierung des Kalzium an zellulären Membranstrukturen erfolgt, ist die Annahme berechtigt, daß Störungen von Membranfunktionen im subzellulären Bereich, wie sie oben für die hypoxischen Schäden der

is so low (ca. 1,5) that even therapeutic dosages will produce toxic side effects in some cases. So other substances of improved efficacy are being searched for. Such substances have been found also in our institute with bispyridine derivatives which are in clinical trial. Bispyridines have additional peripherally dilating effects, which would make it most suitable for heart failure treatment. Owing to a number of side effects it is at present only recommendable for the treatment of digitalis-resistent heart failure. Naturally, research and development in this field continue, in our institute, too. A more rational technique of chemical synthesis and indigenous preproducts have enabled the IDR-researchers to produce a bispyridine derivative (amrinone), which was subjected to clinical trials as Cordemcura® in the GDR.

As shown by biochemical studies the insufficient myocardial cell cannot convert the normally supplied chemical energy into mechanical contraction work either at all or only to an inadequate extent. And so, the insufficient myocardial cell is characterized by impaired contractility alongside unchanged amounts of energy-rich nucleotides (ATP, creatine phosphate, and others) and a normal content of calcium. A number of studies aim to prove that the homeostasis of calcium in the insufficient myocardial cell is in fact impaired. The decisive results, however, are yet to come. The compartmenting of calcium at cellular membrane structures leads to the assumption that membrane function disorders in the subcellular area, as described above for hypoxic impairment of myocardial cells, is an essential cause of myo-

Myokardzelle beschrieben wurden, eine Ursache von Myokardinsuffizienzen sind. In experimentellen Arbeiten untersuchen wir z. Z. diese Hypothese. In dieser Arbeit bestehen enge Kooperationen mit anderen wissenschaftlichen Einrichtungen. Sollte es gelingen, solche subzellulären, für eine Pathogenese der Herzinsuffizienz essentiellen Reaktionen aufzuklären, würden sich auch für einen gezielteren pharmakologischen Angriff neue Wege erschließen.

cardial insufficiencies. We carry out experimental studies required as proof of this assumption in close collaboration with other institutions. If we succeed to fully understand these subcellular reactions, new ways for a more specific pharmacological interference will be open.

4 Pharmaka zur Beeinflussung immunologischer Vorgänge

Pharmaceutics to Influence Immunological Processes

Im Gegensatz zum Nervensystem handelt es sich beim Informationsaustausch zwischen Immunzellen nicht um die Wechselwirkung von strukturell fixierten, langlebigen und zu großen Teilen permanent „verschalteten" Zellen, sondern um die Kommunikation zwischen mobilen, voneinander unabhängigen Zellen, die einem Reifungs- und Alterungsprozeß unterliegen.
Die Aufgabe des sich gegenwärtig entwickelnden Gebietes der Immunopharmakologie liegt somit in der gezielten Beeinflussung der Differenzierung von Immunzellen sowie der immunologischen Kommunikationssysteme mit dem Ziel der selektiven Unterdrückung oder Stimulierung bestimmter Teilfunktionen des Immunsystems.

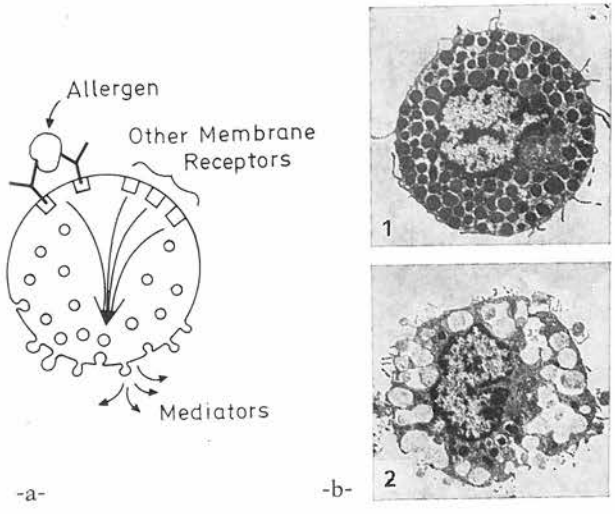
Antianaphylaktika-Entwicklung

Im Rahmen der Immunopharmakologie nimmt die Suche nach Antianaphylaktika eine gewisse Sonderstellung ein. Dies liegt darin begründet, daß die seit hundert Jahren bekannten Mastzellen als Bindungsort des vor etwa 15 Jahren entdeckten Immunglobulin E erkannt wurden. Werden mehrere IgE-Moleküle, die an die IgE-Fc-Rezeptoren der Membran der Mastzellen

The information exchange among lymphocytes, in contrast to the nervous system, is not the interaction among structurally fixed, long-lived and permanently connected cells but the communication among mobile cells independent of each other and subject to a process of maturation and ageing.
Therefore, immunopharmacology, a developing discipline, seeks to systematically influence the differentiation of lymphocytes and immunological communication systems, its final aim being to selectively suppress or stimulate certain functions of the immune system.

Antianaphylactics

In immunopharmacology the search for antianaphylactics is a particular problem, since the mast cell has been found to be the binding site for immunoglobuline E (IgE).
If several IgE-molecules bound to the IgE-Fc-receptors of the mast cell membrane are connected with one another by an antigene (allergene) (Fig. 15 a) rapid exocytosis of the mediatorcontaining granula of the mast cells will occur preceded by a number of reactions, which are not



15 Mediatorfreisetzung aus Mastzellen:
a Schematische Darstellung
b Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ratten-Peritonealmastzellen
1 intakte Mastzellen, 2 degranulierte Mastzellen

Mediator release from mast cells:
a schematic representation
b electronmicroscopic images of the rat peritoneal mast cells
1 intact mast cells, 2 degranulated mast cells

gebunden sind, durch ein Antigen (Allergen) miteinander verbunden (Abb. 15 a), kommt es nach einer Reihe auch heute noch unvollkommen verstandener Teilprozesse zur schnellen Exozytose der mediatorhaltigen Granula der Mastzellen (Abb. 15 b). Die Folge sind lokale oder systematische Entzündungserscheinungen, Bronchokonstriktion, erhöhte Gefäßpermeabilität und in besonderen Fällen der anaphylaktische Schock mit letalem Ausgang.

Da die Verbreitung allergischer Erkrankungen insbesondere in den Industrieländern sehr groß ist, wurden sie (ab 1977) zu einem wichtigen Thema für erste immunopharmakologische Arbeiten im Institut für Wirkstofforschung.

Umfangreiche Screening-Untersuchungen ermöglichten unter Verwendung verschiedener Anaphylaxie-Modelle die Selektion einer Gruppe wirksamer, oral applizierbarer Verbindungen, deren Wirkungsspektrum gegenwärtig vertieft untersucht wird. Hierzu zählen Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung der Mediatorfreisetzung sowie zur Wechselwirkung der Substanzen mit bestimmten Membranrezeptoren. In Kooperation mit der Abt. Theorie des IWF wurden die Daten mit Methoden der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse bearbeitet, um Ansätze zu einer gezielten Optimierung abzuleiten. Erste aussichtsreiche Befunde deuten darauf hin, daß Pharmaka, die die Mediatorfreisetzung aus Mastzellen hemmen, auch bei anderen Krankheitsbildern, bei denen Mastzellen möglicherweise von Bedeutung sind, zum Einsatz kommen könnten.

yet fully understood (Fig. 15 b). The consequences are local or systemic inflammations, bronchoconstriction, increased vascular permeability, and anaphylactic shock with fatal outcome.

As allergic diseases are particularly wide-spread in the industrialized countries they became a major subject of the first immunopharmacological studies at the IDR.

After screening a variety of compounds a group of effective, orally applicable compounds was selected using various anaphylaxis models. Their range of action is now under extensive investigation. This includes research both into the mechanism of mediator-release inhibition and the interaction of these substances with certain membrane receptors. In order to find ways for a systematic optimization, the data obtained have been processed then with methods of Quantitative-Structure-Activity Analysis. The first encouraging findings suggest that substances inhibiting the mediator-release from mast cells may also be applied in other cases where mast cells could be significant.

Immunopharmacological basic research

In recent years we have become increasingly aware of the fact that mast cell populations differ considerably in man and animals with regard to their characteristics and pharmacological susceptibility. Cooperative efforts of both the Immunopharmacology and Cell Model group resulted in the selection of monoclonal antibodies against rat mast cell surface determinants. These anti-

16 Untersuchung der Bindung monoklonaler Antikörper an Membran-Antigene von reinen, an eine Glasoberfläche fixierten Mastzellen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenz-Tests

Investigation of the binding of monoclonal antibodies to membrane antigens of pure mast cells fixed to a glass surface, by means of the indirect immunofluorescence test

17 Durchführung von Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien an reinen Mastzell-Suspensionen

Studies of the receptor-ligand binding assay in pure mast cells

Immunopharmakologische Grundlagenforschung

In den letzten Jahren rückte zunehmend die Tatsache ins Bewußtsein, daß bei Mensch und Tier Mastzellpopulationen vorkommen, die sich sehr stark hinsichtlich ihrer Eigenschaften und pharmakologischen Beeinflußbarkeit unterscheiden. In Kooperation der Arbeitsgruppe Immunpharmakologie und der Abt. Pharmakologie II gelang erstmalig im internationalen Maßstab die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächendeterminanten von Ratten-Mastzellen. Diese Antikörper erlauben eine Differenzierung und Separation unterschiedlicher Mastzell-Typen sowie deren Prekursorzellen (Abb. 16).
Die Analyse der physiologischen Regelkreise, die die Mediatorfreisetzung aus Mastzellen beeinflussen, bietet mit hoher Wahrscheinlichkeit aber auch neue Ansatzpunkte für eine gezielte pharmakologische Beeinflussung. Hierzu dienen in der Arbeitsgruppe Immunopharmakologie des IWF einerseits Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien und andererseits Untersuchungen zur Beeinflussung der (durch unterschiedliche Mechanismen ausgelösten) Mediatorfreisetzung durch Agonisten und Antagonisten des zu untersuchenden Transmittersystems (Abb. 17).

Thymuspeptide

Die wesentlichen neuen Erkenntnisse zur Immunregulation basierten in den letzten Jahren einerseits auf der Analyse der funktionalen Heterogenität von T-Zellsubpopulationen und

bodies permit the differentiation and separation of different mast cell subtypes as well as their precursor cells (Fig. 16).
It is, however, most probable that the analysis of the physiological feedback mechanism influencing the mediator-release from the mast cell opens up new prospects of systematic pharmacological interference. Therefore the IDR immunopharmacological team studies both the receptor-ligand binding and the agonist and antagonist influence on the mediator-release (triggered by different mechanisms) in the transmitter system under investigation (Fig. 17).

Thymus peptides

Latterly investigation of immune regulation has been based both on the analysis of the functional heterogeneity of T-cell subpopulations and on the discovery and characterization of a new category of signal transmitters in the immune system, the lymphokines. The development of T-cell hybridomes producing certain lymphokines in larger quantities and the preparation of lymphokines via genetic engineering has raised the question of their therapeutic value. Despite the fundamental importance of these investigations, direct lymphokine-therapy will be the exeption rather than the rule, as things now stand. What could be more relevant in this context is either the stimulation or the inhibition of certain lymphokineproducing cell types.
Thymus-peptides are of particular interest since

andererseits auf der Entdeckung und Charakterisierung einer neuen Klasse von Signalüberträgern im Immunsystem, der Lymphokine. Die Entwicklung von T-Zellhybridomen, die bestimmte Lymphokine in größeren Mengen herstellen, und schließlich die Gewinnung von Lymphokinen mit gentechnischen Methoden haben schnell die Frage nach ihrem therapeutischen Einsatz aufkommen lassen. Ungeachtet der grundsätzlichen Bedeutung, die diesen Untersuchungen zukommt, dürfte jedoch auch in Zukunft eine direkte Lymphokintherapie eher die Ausnahme darstellen. Wesentlicher könnte in diesem Zusammenhang die pharmakologische Stimulierung oder Hemmung bestimmter Lymphokin-produzierender Zelltypen sein.

In diesem Zusammenhang sind die Thymuspeptide von besonderem Interesse. Es handelt sich hier im wesentlichen um Peptide, die eine wichtige Rolle bei der Differenzierung bestimmter T-Zellen spielen.

Die Untersuchungen einer Arbeitsgruppe der Abteilung Peptidsynthese des IWF konzentrieren sich auf die Aminosäuren 32–36 des aus 49 Aminosäuren bestehenden Peptids Splenin.

Diese Arbeiten werden sich in ein zukünftiges Forschungsprogramm zu den Wechselwirkungen zwischen Nervensystem und Immunsystem einordnen.

they play a major part in the differentiation of certain T-cells. The relevant investigations in the IDR dept. of Peptide Synthesis are focused on the amino acids 32–36 of splenin consisting of 49 amino acids.

The work on these topics will be included in a more general research strategy regarding the interactions between the nervous system and the immune system.

5 Blutgefäßwachstum aus pharmakologischer Sicht

Blood Vessel Growth from a Pharmacological Point of View

Die im Ergebnis der internationalen biowissenschaftlichen Forschung gewonnene Erkenntnis, daß Biofaktoren im Organismus existieren, die Zellvermehrung und -differenzierung regulieren sowie der Nachweis der Peptidnatur einiger dieser wurden als Herausforderung an die Wirkstofforschung verstanden. Isolierung, Strukturaufklärung und chemische Nachsynthese zeichnen sich als Wege ab, die zu einer Nutzung derartiger Faktoren in der Medizin führen können. Das war der Grund dafür, daß mit dem Gründungszeitpunkt des Instituts für Wirkstofforschung zellbiologisch und biochemisch profilierte Arbeitsgruppen sich diesem Problemkreis stellten. Aus klinischen Gesichtspunkten verdienten hierbei Forschungsarbeiten zur Frage der Regulation und der pharmakologischen Beeinflussung des Wachstums von Blutgefäßen besondere Favorisierung.

Die Bildung neuer Blutgefäße – als Angiogenese bezeichnet – ist einerseits erwünscht und notwendig, wie im Falle der Wundheilung, andererseits aber auch unerwünscht, wie beim Tumorwachstum, bei der diabetischen Retinopathie, bei zellvermittelten Immunreaktionen und anderen Erkrankungen. Es können demzufolge sowohl Stimulatoren als auch Inhibitoren des Blutgefäßwachstums wichtige Indikationsgebiete finden.

Ausgehend von Untersuchungen einer amerikanischen Arbeitsgruppe, die in Tumorextrakten eine angiogen wirkende Aktivität anreichern konnte, wurden Versuche unternommen, aus einem schnellwachsenden Gewebe einen „Angiogenesefaktor" zu gewinnen. Als ein solches Ausgangsgewebe bot sich das Corpus luteum an, das periodisch von den Follikelzellen des Eierstocks gebildet wird.

Bei den im Jahr 1976 durchgeführten biologischen Tests ließ sich erstmalig zeigen, daß Corpus luteum-Gewebe Blutgefäßneubildungen in vivo induziert, wie sie vorher nur als Wirkungs-

It is common bio-scientific knowledge now that there are biofactors in the organism regulating cell proliferation and cell differentiation. The proof of the peptide nature of some of them was a challenge to drug research. Isolation, structure analysis and chemical synthesis will one day be of practical value in medicine. That was the reason why the specialists in cell biology and biochemistry started to tackle this problem when the IDR was set up. For clinical reasons research into the regulation of and potential influence on blood vessel growth was favoured.

The formation of new blood vessels, i. e. angiogenesis, is desirable and necessary on the one hand, for instance in wound healing, but undesirable on the other, for instance in tumor growth, in diabetic retinopathy, in cell-mediated immune reactions, and other diseases. Consequently, either stimulation or inhibition of blood vessel growth may be indicated.

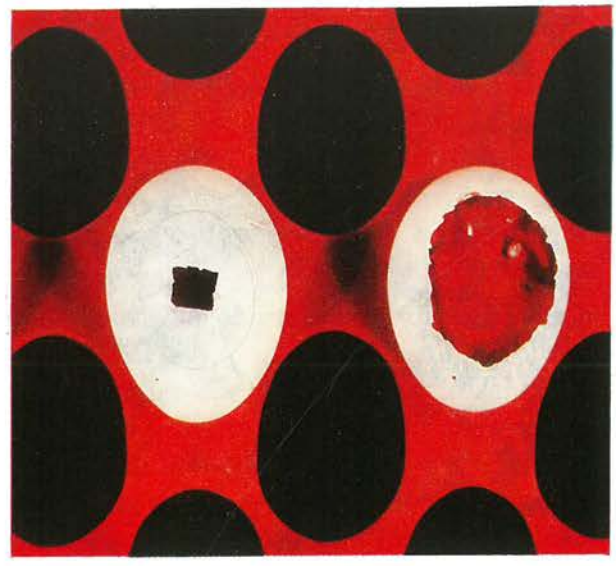
Proceeding from investigations made by American researchers who succeeded in enriching angiogenic activities in tumor extracts, experiments were made to obtain an "angiogenesis factor" from a fast growing tissue. A suitable initial tissue was corpus luteum, which is periodically formed by the follicular cells in the ovary. Biological tests made in 1976 showed for the first time that corpus luteum tissue induces blood vessel formation in vivo, which had previously been described as an effect characteristic of tumor tissues only.

In order to enrich and characterize these and other angiogenic activities it was necessary to develop appropriate animal and test models on the basis of cell cultures. The animal models selected were internationally available models such as chick chorioallantoic membrane (CAM) and rabbit cornea. The models were, however, standardized in very few cases only, and what is

effekt von Tumorgeweben beschrieben worden waren. Zur Anreicherung und biologischen Charakterisierung dieser und anderer angiogenen Aktivitäten war es notwendig, geeignete Tiermodelle und Testmodelle auf der Ebene von Zellkulturen zu entwickeln. Als Tiermodelle wurden international bereits genutzte Modelle, nämlich die Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier (CAM) (Abb. 18) und die Kaninchenkornea, eingesetzt.

Als unbefriedigend stellte sich jedoch heraus, daß die für Angiogeneseuntersuchungen bislang genutzten Modelle wenig standardisiert und vor allem nicht quantifizierbar waren. Es mußte deshalb ein umfangreicher Teil der Arbeiten darauf verwendet werden, die Testbedingungen zu erarbeiten, sie zu standardisieren und die Gefäßreaktion zu quantifizieren. Für die in vivo-Untersuchungen wurde dem *CAM-Modell* der Vorzug gegeben. Dieses Modell ist sehr sensitiv, besitzt aber den Nachteil, daß eine Vielzahl von unspezifischen Einflüssen zu Gefäßproliferationen führt. Beispielsweise konnten wir zeigen, daß Filtermaterialien, Schwämme und Gele, die häufig bei Angiogenesetests auf der CAM als Wirkstoffträger Verwendung fanden, bei ihrer Auflage auf die CAM mehr oder weniger regelmäßig zu entzündlichen Reaktionen führen, die häufig mit Kapillarproliferationen gekoppelt sind und die eigentliche Wirkung der Testsubstanzen zu überdecken vermögen. Auch andere Einflüsse wie Traumen, extreme pH-Werte usw. können zu unspezifischen Reaktionen in der CAM führen. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge ist eine wichtige Voraussetzung für die richtige Interpretation und Einordnung der Testergebnisse.

Für die eindeutige Erfassung von Unterschieden in der Reaktionsweise der CAM auf verschiedenartige Einflüsse erwies es sich als notwendig, ein geeignetes Quantifizierungsverfahren zu entwikkeln. In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin wurde der Versuch unternommen, die Methode der automatischen Mikroskopbildanalyse für die Messung des Kapillarisierungsgrades in der CAM einzusetzen. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der automatischen Zählung neugebildeter Kapillaren mit radialer Anordnung um die



18 Bebrütete Hühnereier für den Angiogenese-Test. Zur Sichtbarmachung der Chorioallantois-Membran wurde bei dem rechten Ei ein größeres Stück der Kalkschale entfernt

Incubated hen's eggs for the angiogenesis test. In order to make the chorioallantoic membrane visible a piece of the shell was removed from the egg on the right

more not quantifiable. A great deal of effort was therefore made to overcome these deficiencies. For in-vivo experiments the *CAM-model* was favoured (Fig. 18). This is a very sensitive model but has the disadvantage of possible vessel proliferation due to a great number of unspecific influences. We have proved that filters, sponges, and gels frequently used as carriers in angiogenesis on the CAM cause more or less regular inflammatory reactions when put in contact with the CAM. These reactions are often combined with capillary proliferations and may thus conceal the original action of the test substances. Other influences such as traumas or extreme pH-values, may also lead to unspecific reactions in the CAM. Knowledge of these factors help to evaluate and classify the test results properly.

For the registration of the differences of the CAM reactions to various kinds of influences it was necessary to develop a quantification technique. Together with the Pathological Institute of Humboldt-University Berlin we applied automatic image analysis to measure the degree of capillarization in the CAM. This measurement is based on the automatic registration of newly formed capillaries, radially arranged on the ap-

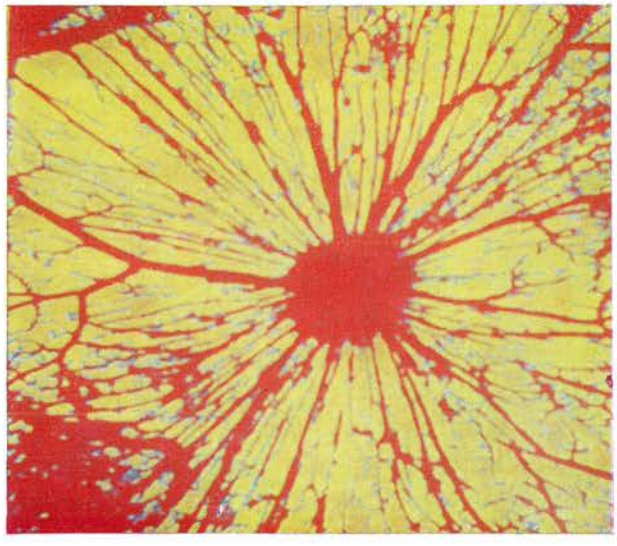
Substanzauftragstelle auf mehreren unterschiedlich großen Zählkreisen. Die Meßwerte sind gut reproduzierbar, und die Meßdauer je Präparat liegt unter einer Minute. Die einzelnen dosisbezogenen Meßwerte können an eine hyperbole Funktion angepaßt und die mittleren Dosen für eine halbmaximale Wirkung gut abgeschätzt werden. Diese gemeinsam entwickelte Meßmethode, die objektiv, bequem, ausreichend rasch und zuverlässig ist, ermöglicht jetzt die quantitative Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung beliebiger Faktoren mit angiogener Wirkung (Abb. 19).

Als in-vitro-Modell wurden *kultivierte Gefäßendothelzellen* eingesetzt, da zur Initiierung und zum Ablauf der Angiogenese Migration, DNA-Synthese, Proliferation sowie invasives Vordringen der Kapillarendothelzellen die fundamentalen Prozesse sind (Abb. 20). Unter diesem Aspekt wurden angiogene Biofaktoren und chemische Substanzen an Gefäßendothelzellen zur Abklärung der Spezifität ihrer Wirkung vergleichsweise zu transformierten tierischen Zellen (Zellinie L der Maus), Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen auf migrations- und proliferationsstimulierende Wirkung untersucht. Verwendet wurden aus Kälberaorten isolierte Endothelzellen, die sich in einem serumarmen Nährmedium kultivieren lassen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte erstmalig eine Endothelzelllinie mit der Bezeichnung BKEz-7 in einem Nährmedium mit einem Zusatz von nur 1% Rinderserum etabliert werden. Diese Zellinie zeichnet sich durch eine Reihe strukturell und funktionell gewebsspezifischer Marker aus. Diese konnten mit bio- und histochemischen, physiologischen und morphologischen Methoden eingehend charakterisiert werden.

Verschiedene Corpus-luteum-Rohpräparate, eine „Fibroblast Growth Factor"- und eine Chorioallantoismembran-Präparation stimulierten die Proliferationsaktivität der Endothelzellen, aber auch die anderer Zelltypen (Mäusefibroblasten, L-Zellen). Damit konnten Literaturhinweise bestätigt werden, daß die angiogenen Biofaktoren eine wachstumsstimulierende Wirkung bei verschiedenen Zelltypen entfalten und daß das Modellsystem „Endothelzellkulturen" zumindest nicht als zelltypspezifisches Werkzeug für die

plication site over several registering circles at different radii. The measured values are easy to reproduce and the measuring time per preparation is less than a minute. The individual dosis-related measured values can be adapted to a hyperbolic function. The medium dosage for half maximum effect can be well estimated. This jointly developed measuring procedure, which is objective, easy to handle, sufficiently fast, and reliable, enables quantitative investigation of the dose-response-relationship of any given angiogenic factor (Fig. 19).

Cultured vascular endothelial cells formed the basis of our in-vitro models since migration, DNA-synthesis, proliferation, and invasive advance of the capillary endothelial cells are the fundamental processes involved in angiogenesis (Fig. 20). A study was made of angiogenic biofactors and chemical substances in *vascular endothelial cells* in order to elucidate the specificity of their action with regard to the stimulation of migration and proliferation. The results obtained with endothelial cells were compared to those obtained with transformed animal cells (cell line L of mice), fibroblasts, and vascular muscle cells. The experiments were made with endothelial cells isolated from calf aortae. These cells can be well cultured in a medium with a low content of



19 Eine auf dem Monitor der Bildauswertungs-Anlage abgebildete Angiogenese-Reaktion, deren Intensität automatisch gemessen wird

The monitor of the device for image analysis showing an angiogenic response the intensity of which is automatically measured

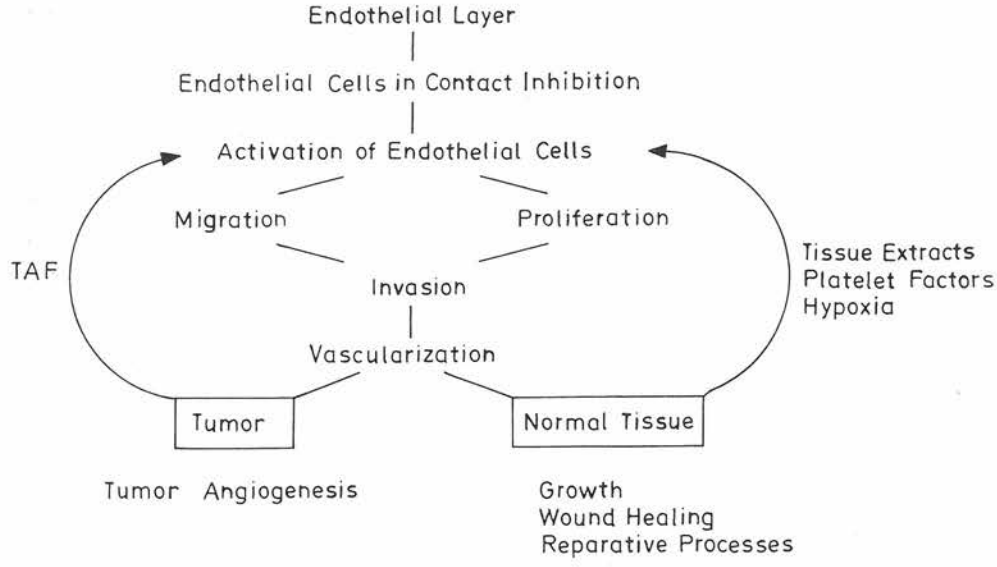
Auffindung angiogener Faktoren einsetzbar ist.

Durch *parallele Testung* von Gewebsextrakten und Substanzen am CAM-Modell und an kultivierten Endothelzellen (Proliferations- und DNS-Synthesetest) konnte herausgearbeitet werden, daß Gewebepräparationen oder Faktoren, die die DNS-Synthese und/oder Proliferation von Kälberaortenendothelzellen stimulieren, keine oder keine besonders ausgeprägte angiogene Aktivität in vivo besitzen. Andererseits ließ sich zeigen, daß Extrakte aus Tumorgeweben, die die DNS-Synthese und Proliferation von Endothelzellen entweder nicht beeinflußten oder sogar hemmten, sich am CAM-Modell in hohem Maße als angiogen erwiesen. Das Fehlen einer eindeutigen Beziehung zwischen der Angiogenese-Initiation und der Fähigkeit zur Steigerung der DNS-Synthese oder Proliferation von Endothelzellen in vitro spricht nicht dafür, daß Proliferationsfaktoren den primär entscheidenden Stimulus für die Auslösung der Angiogenese in vivo darstellen. Inwieweit allerdings Faktoren mit der Fähigkeit, die Migration, insbesondere die gerichtete Zellbewegung (Chemotaxis), zu beeinflussen, hierbei entscheidend beteiligt sind, bedarf noch letzter Klärung. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, daß derartige biologische Faktoren, die von uns in verschiedenen Geweben und Zellen nachgewiesen wurden, bei Angio-

serum. For the first time it was possible to establish an endothelial cell line called BKEz-7 with an additive of only 1% of bovine serum. This cell line is characteristic for its tissue-specific markers, which were comprehensively analyzed by biochemical, histochemical, physiological, and morphological methods.

Various crude corpus-luteum preparations, a "fibroblast growth factor" and a chorioallantoic membrane preparation stimulated the proliferation activity of the endothelial cells and also that of other cell types (mouse fibroblast, L-cells). This confirmed statements in literature to the effect that angiogenic biofactors have a growth-stimulating effect on different cell types and that the endothelial cell culture model is not applicable as a cell-specific tool in tracing angiogenic factors.

Parallel testing of tissue extracts and substances on the CAM and in cultured endothelial cells proved that tissue preparations or factors stimulating DNA-synthesis and/or proliferation of calf aortic endothelial cells are not – or at least not very distinctly – angiogenic in vivo. On the other hand extracts from tumor tissues were shown to be highly angiogenic on the CAM although they did not influence or even inhibit DNA-synthesis and proliferation of endothelial cells. The lack of an unambiguous relationship between angiogenesis initiation and the ability of activating DNA-



20 Vorstellungen über Beginn und Ablauf von Vaskularisierungsprozessen im Tumor und im Normalgewebe

Hypothetic course of vascularisation processes in tumour and normal tissues

geneseprozessen eine wichtige Rolle spielen könnten. Aus der Vielzahl der von uns durchgeführten experimentellen Untersuchungen läßt sich die Schlußfolgerung ableiten, daß der Vorgang der Initiation des Kapillarwachstums seiner Natur nach viel komplexer ist als bisher angenommen. Es konnten Anhaltspunkte dafür gefunden werden, daß bei diesem Prozeß auch lokale Permeabilitätsstörungen der Kapillaren, Austritte von Plasmaproteinen und eine extravaskuläre Gerinnung eine Rolle spielen könnten und daß darüberhinaus den Veränderungen der extrazelluläre Matrix (proteolytischer Abbau der Basalmembranen, Fibronektinbindung an die veränderte Gewebematrix usw.) eine besondere Bedeutung zukommt.

Aus unseren Untersuchungen läßt sich ferner schlußfolgern, daß an der Regulation des Angiogeneseprozesses eine Vielzahl von Faktoren beteiligt ist, von denen ein Teil direkt auf die Kapillarendothelzelle wirkt und zelluläre Prozesse, wie die Adhäsion, Migration, DNS-Synthese und Proliferation, aber auch bestimmte Syntheseprozesse induziert und stimuliert (Kollagenasen, Plasminogenaktivator, Fibronektin, Kollagen, Glukosaminoglykane usw.). Andere Faktorengruppen dürften Kapillarproliferationen vor allem dadurch induzieren, daß sie das Zellmilieu verändern, z. B. die Kapillarpermeabilität steigern (vasoaktive Peptide, Prostaglandine), die Blutgerinnung fördern und die extrazelluläre Matrix modulieren (aktivierte Gewebs- und Plasmaproteasen).

Für die Stimulation von Angiogeneseprozessen, z. B. im Falle der Wundheilung, könnte prinzipiell der Weg beschritten werden, migrations- und/oder proliferationsfördernde Faktoren lokal zu applizieren. In Versuchen, die in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß aus Rinderhirnen hergestellte Gewebsextrakte, die zellwachstumsstimulierende Aktivitäten enthielten, den Wundheilungsprozeß bei der Ratte (Modif. Modell nach RUDAS) fördern. Die Isolierung der wirksamen Komponenten, bei denen es sich um hormonähnliche Wachstumsfaktoren handelt, ist jedoch nur mit einem hohen materiellen und technischen Aufwand möglich, so daß die

synthesis or proliferation of endothelial cells in vitro suggests that proliferation factors are not the primary stimulus for the initiation of angiogenesis in vivo. However, the importance of factors in this process which are capable of influencing migration, especially chemotaxis, is not quite clear as yet. First investigations suggest that the biological factors, which we found in different kinds of tissues and cells, may play an important part in angiogenesis. The great number of experiments we have carried out lead us to conclude that capillary growth is much more complex than has been assumed so far.

There have been indications that local disorders in capillary permeability, escape of plasma proteins, and extravascular coagulation may be involved. Apart from this, changes in the extracellular matrix (proteolytic degradation of the basal membranes, fibronectin binding to the changed tissue matrix, etc.) are of particular significance.

Furthermore we conclude from our investigations that the regulation of angiogenesis involves a number of factors, some of which not only act directly on the capillary endothelial cell and such cellular processes as adhesion, migration, DNA-synthesis and proliferation, but induce and stimulate certain synthesis processes as well. Other groups of factors may induce capillary proliferation mainly by changing the cellular environment, for instance by increasing capillary permeability, by initiating blood coagulation and modifying the extracellular matrix.

In principal local application of migration and proliferation promoting factors is possible for the stimulation of angiogenic processes among others in cases of wound healing.

Experiments carried out together with the Pathological Institute of Humboldt-University Berlin showed that bovine brain tissue extracts with cell growth stimulating activities promoted the wound healing process in rats (modified model after RUDAS). However, the isolation of these hormone-like growth factors requires a great deal of material and technical effort, so that large-scale isolation processes and the further development of this biofactor to a biopreparation would necessitate great expenditure. This was one of the main reasons why this investigation

Isolierung in ausreichenden Mengen und Weiterentwicklung eines solchen Faktors zu einem Biopräparat sehr hohe Kosten verursachen würden. Dies war einer der Hauptgründe für die Entscheidung, die Untersuchungen zur Auffindung und Isolierung von Biofaktoren zum Abschluß zu führen und auf Substanzen zu orientieren, die chemisch definiert und auf synthetischem Wege zu gewinnen sind.

Abgeleitet aus Aufgabenstellungen der Substanz P-Forschung am Institut ließ sich neuerdings für ein *Dipeptid* der Nachweis führen, daß es neben einer regenerationsfördernden Wirkung auf kultivierte Nervenzellen (Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Humboldt-Universität Berlin) und einer Makrophagen-aktivierenden Wirkung (Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock) einen deutlichen stimulierenden Effekt auf das Wachstum von Granulationsgewebe im vorgenannten Rattenwundheilungsmodell besitzt, der morphometrischer Auswertungen zufolge auf eine verstärkte Kapillarneubildung im Wundgebiet zurückzuführen ist.

Tatsächlich läßt sich auch im CAM-Modell bei Einhaltung bestimmter Testparameter die angiogene Wirksamkeit nachweisen.

Für dieses Dipeptid bestehen – im Gegensatz zu obigen Extrakten und Biofaktoren – gute Aussichten für eine Weiterentwicklung zu einem Therapeutikum. Hierdurch würden die Grundlagenuntersuchungen zur Beeinflussung der Angiogenese die angestrebte medizinrelevante Krönung finden.

had to be terminated and why we started searching for chemically defined and synthesizable substances.

IDR Substance P-research recently proved that a certain *dipeptide*, apart from its regeneration-stimulating action on cultured nerve cells (collaboration with the Anatomical Institute of Humboldt-University) and its macrophage-activating effect (collaboration with the Institute of Pharmacology and Toxicology of Wilhelm-Pieck-University Rostock), has a distinct stimulating effect on the growth of granulation tissue in the above mentioned rat model. The morphometric evaluation showed that the growth of granulation tissue is mainly due to enforced capillary neoformation in the wound area.

The angiogenic activity of the dipeptide in question can also be proved on the CAM model providing certain test parameters are adhered to. Unlike the above mentioned extracts and biofactors, it seems feasable that this dipeptide can be developed to become a therapeutic.

Our basic research of methods influencing angiogenesis by pharmaceutics will then have achieved the much desired results so important to medicine.

6 Wirkstofforschung auf elektronenmikroskopischer Ebene - Auswahl eigener Untersuchungsergebnisse -

Electron Microscopy in Drug Research - Selection of some of our Investigations -

Die aktuelle biowissenschaftliche Literatur bietet ständig eine Vielzahl von Beispielen dafür, daß die moderne Morphologie auf Grund ihrer z. T. einzigartigen Möglichkeiten, entscheidend zur Erfassung und Aufklärung von Funktions- und Wirkungsmechanismen beizutragen, ein integrierendes Element der biologischen und medizinischen Forschung ist. Dieser Tatsache wird jedoch in bezug auf die Schaffung notwendiger Voraussetzungen oder eine angemessene Nutzung gegebener Bedingungen nicht immer entsprochen. Das gilt auch für die Wirkstofforschung, wo nicht selten auf eine eigentlich essentielle Einbeziehung morphologischer Methoden zur Charakterisierung von Funktionszuständen, Lokalisation exogener oder endogener Stoffe und topischen Zuordnung der verschiedensten Prozesse verzichtet wird oder werden muß.

In dieser Hinsicht stellt sich die Situation unseres Institutes insofern als besonders günstig dar, als hier der Notwendigkeit eines gewissen Spektrums morphologischer Untersuchungsmöglichkeiten von Anfang an Rechnung getragen worden ist.

Unter Ausklammerung toxikologischer und anderer histo- oder zytologischer Aspekte unserer morphologischen Untersuchungen soll im folgenden durch einige ultrasktrukturelle Abbildungen schlaglichtartig gezeigt werden, inwieweit auf elektronenmikroskopischer Ebene verschiedenartige Beiträge zur Wirkstofforschung geleistet werden konnten.

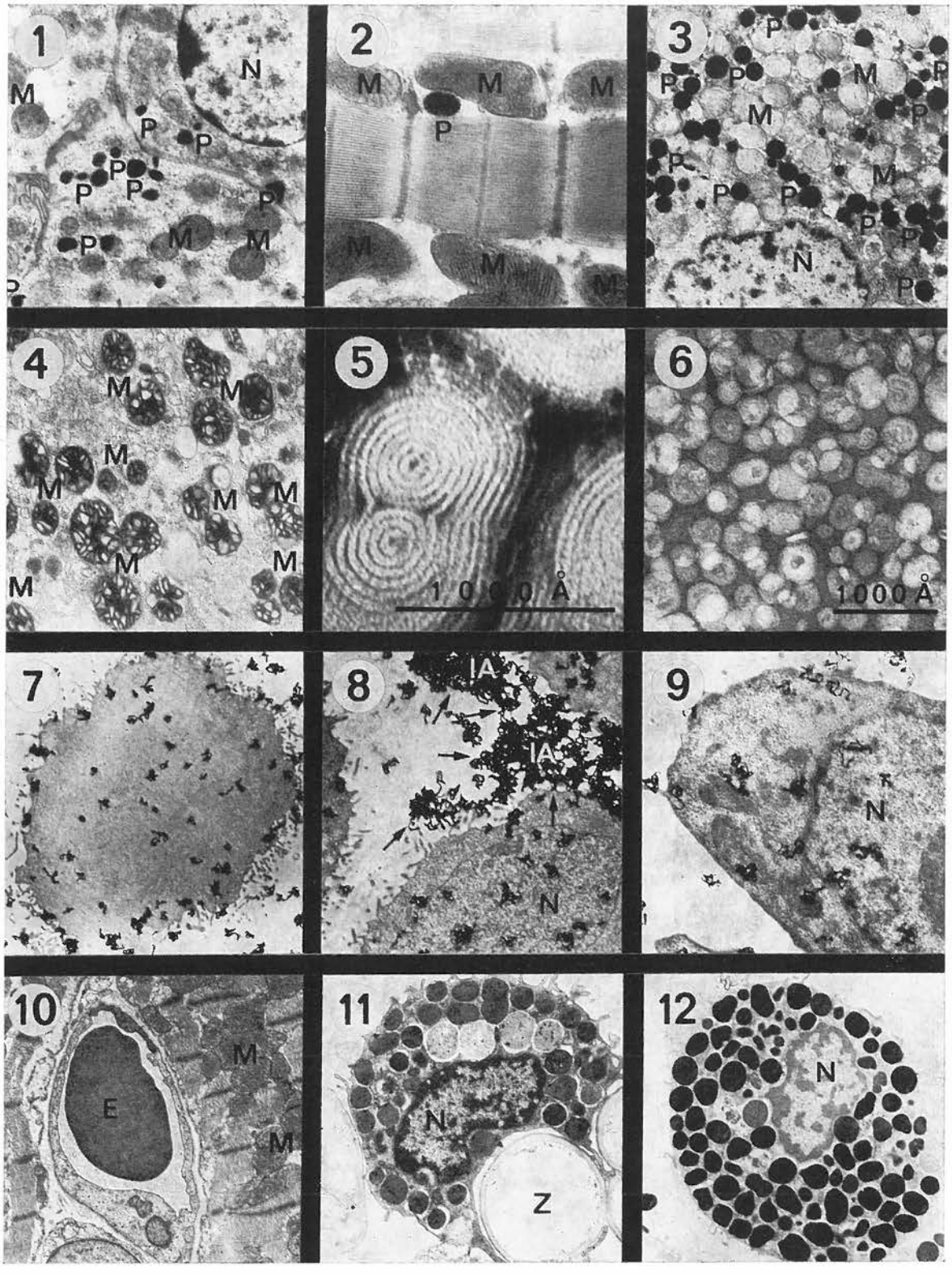
Current bio-scientific literature is full of examples showing modern morphology to be an integral part of biological and medical research. It can make an almost unique contribution to detecting and analysing actions and functions. Often, this fact is not taken into account, however, in that the necessary preconditions are not organized, or where facilities exist they are not made use of sufficiently. This also holds for drug research in general, where morphological methods are not used as they should be to describe functions, to localize exogenous or endogenous substances, or to determine various processes topologically.

At the IDR, however, the situation is different, because a certain spectrum of morphological methods were considered essential from the very beginning.

Without touching upon toxicological and other histological or cytological aspects of morphological investigation we should like to present the

21 TESLAR-Elektronenmikroskop BS-500

TESLAR-Electronmicroscope BS-500



22 Beispiele für elektronenmikroskopische Beiträge zur Wirkstofforschung

Legenden zu den einzelnen Bildern: s. S. 41
Abkürzungen: P = Peroxisomen, M = Mitochondrien, N = Nukleus, IA = extrazelluläre Insulin-Assoziate, E = Erythrozyt, Z = phagozytierte Zymosan-Partikel

Examples for electronmicroscopic investigations in drug research

Explanations of the pictures: see p. 41
Abbreviations: P = peroxisomes, M = mitochondria, N = nucleus, IA = extracellular insulin associates, E = erythrocyte, Z = phagocyted zymosan particles

● Die Bilder 1–3 der Abb. 22 (1 Nebenniere; 2 Myokard; 3 Leber) zeigen Peroxisomen, die uns als fast ubiquitäre Zellorganellen mit einer Reihe erwiesener und möglicher bedeutender metabolischer Funktionen vor allem wegen der Induzierbarkeit ihrer Vermehrung und Enzymaktivitätssteigerungen durch zahlreiche Wirkstoffe sowie verschiedene Stoffwechselzustände als potentielle Ansatzpunkte für protektive oder therapeutische Maßnahmen besonders interessieren.

● Das Bild 4 stellt isolierte Lebermitochondrien dar und steht lediglich als Beispiel dafür, daß subzelluläre Fraktionen, wie sie häufig Gegenstand biochemischer und pharmakologischer Untersuchungen sind, oft einer elektronenmikroskopischen Charakterisierung bedürfen.

● Die Bilder 5 und 6 zeigen insulinhaltige Liposomen (5 multilamellär; 6 monolamellär) und betreffen damit einen biopharmazeutischen Aspekt unserer Untersuchungen. Diese Lipidvesikel bieten auf Grund der Möglichkeit des Einschlusses der verschiedensten Wirkstoffe und der z. T. beeinflußbaren Interaktionen mit biologischen Membranen interessante Ansatzpunkte für stärker zielgerichtete, vor Abbau schützende und Wirkspiegel begünstigende Applikationsformen, deren Effektivität jedoch unter anderem von Eigenschaften abhängt, die eine elektronenmikroskopische Charakterisierung erforderlich machen.

● Die Bilder 7–9 sollen in erster Linie darauf hinweisen, daß die Autoradiographie vor allem auch in Kombination mit der Elektronenmikroskopie einzigartige Voraussetzungen zur präzisen Lokalisation von Stoffen und biologischen Prozessen und damit schließlich in besonderer Weise zur Erfassung und Darstellung von Struktur-Funktionsbeziehungen schafft. Das gilt auch trotz teilweise alternativer und in mancher Hinsicht auch darüber hinausgehender Möglichkeiten moderner immunhisto-oder zytochemischer Techniken, die besonders in Verbindung mit der Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper zunehmende Bedeutung erlangen. Die abgebildeten Autoradiogramme zeigen verschiedene Grade einer rezeptorvermittelten Endozytose von 125 J-Insulin bei L-Zellen (7; 8) und einer kultivierten Gefäßendothelzelle (9), was zugleich unsere Beschäftigung mit Peptidwirkstoffen und Zellkulturen als pharmakologischen Modellen widerspiegelt.

● Das Bild 10 repräsentiert in Gestalt einer myokardialen Kapillarregion insofern ein besonders wichtiges Untersuchungsobjekt, als die Suche nach Wirkstoffen zur Prävention oder möglichst günstigen Beeinflussung von ischämischer Herzkrankehit und Herzinsuffizienz zu den Schwerpunktaufgaben unseres Institutes gehört.

● Die Bilder 11 und 12 demonstrieren isolierte Mastzellen und damit auch einen Hauptgegenstand der immunpharmakologischen Forschung im Institut. Elektronenmikroskopische Untersuchungen erweisen sich dabei vor allem im Hinblick auf eine qualitätsbezogene morphologische Kontrolle von entsprechenden Zellpräparationen, die Erfassung spezies- und organspezifischer Besonderheiten und die ultrastrukturelle Charakterisierung in Verbindung mit einer durch Wirkstoffe induzierten oder verhinderten Mediatorfreisetzung als notwendig oder wünschenswert.

● Pictures 1–3 of Fig. 22 (1 suprarenal gland; 2 myocardium; 3 liver) show peroxisomes, which are particularly interesting to us as they open up new possibilities for prevention or therapy due to the following features: they are almost ubiquitous cell organelles with a number of proved or potential significant metabolic functions. Furthermore, both proliferation and increase in enzymatic activity can be induced by numerous drugs and various states of metabolism.

● Picture 4 presents isolated liver mitochondria. It is only meant to show that subcellular fractions, frequently under biochemical and pharmacological investigation, often neer electron microscopic characterization.

● Pictures 5 and 6 show liposomes containing insulin (5 multilamellar; 6 monolamellar), thus dealing with a biopharmaceutical aspect of our investigations. These lipid vesicles are able to integrate the most diversified drugs, and their interaction with biological membranes can be partly influenced. This makes them interesting in connection with the search for more target-specific, degradation-protected highly effective modes of drug application. However, the complete determination of the efficiency of this mode of application also depends on properties which require electron microscopic characterization.

● Pictures 7–9 above all show that autoradiography, mainly in combination with electron microscopy, is a unique precondition for the precise localization of substances and biological processes and thus for determining as well as presenting structure-function-relationships. This is true despite the alternatives of modern immunohistological and immunocytochemical techniques, which are gaining in significance especially in connection with the availability of monoclonal antibodies. The autoradiographs presented show different degrees of receptor-mediated endocytosis of 125 J-insulin in L-cells (7,8), and in a cultured vascular endothelial cell (9).
The pictures also reflect our work with peptide drugs and cell cultures as pharmacological models.

● Picture 10 shows a capillary area in the myocardium, a most important object of investigation, since the search for drugs preventing or positively influencing ischaemic heart diseases and heart failure is one of the central tasks at our institute.

● Pictures 11 and 12 represent isolated mast cells – a main object of immunopharmacological research at the IDR. Electron microscopic investigations are necessary or desirable mainly in the qualitative morphological control of the respective cell preparations, for determining species and organ specific particularities and for ultrastructural characterization in connection with a drug-induced or drug-inhibited mediator-release.

Die ausgewählten Beispiele sind nicht zuletzt auch Ausdruck interdisziplinärer Kooperation, bei denen elektronenmikroskopische Untersuchungen im Interesse solider Ergebnisse der Ergänzung und Präzisierung dienten oder bedurften.

ultrastructural pictures (Fig. 22) to illustrate, at one stroke, what electron microscopic investigation has contributed to drug research.

The examples selected also testify to our interdisciplinary cooperation, which made it possible to arrive at well-founded results.

7 Profil und Perspektiven der Arzneimittelsynthese

Characteristics and Prospects of Drug Synthesis

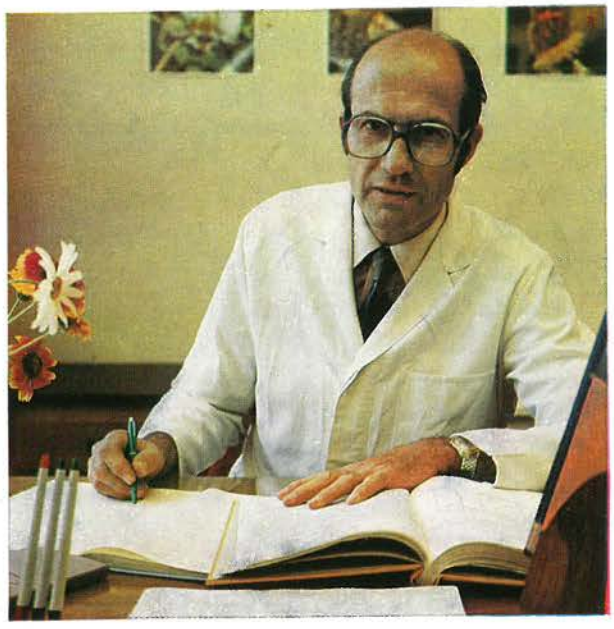
Die Arzneimittelsynthese nimmt seit jeher einen wichtigen Platz im IWF ein.
War anfangs die Peptidchemie alleinige Bearbeitungseinrichtung, so wurde auf medizinisch-chemischer Grundlage die Synthese kreislaufwirksamer Verbindungen inzwischen zur zweiten profilbestimmenden Bearbeitungsrichtung entwikkelt. Der Bereich Arzneimittelsynthese besteht jetzt aus den Abteilungen Peptidchemie, Organische Synthese und Entwicklung/Technikum. Letztere wurde neu gegründet und hat folgende Aufgaben:

- Entwicklung von Laborverfahren für den kleintechnischen Maßstab und deren Überleitung in die pharmazeutische Industrie.
- Bereitstellung von Substanzen für toxokologische Studien und klinische Prüfungen in der notwendigen Qualität.

Um internationalen Maßstäben in der modernen Arzneimittelforschung zu entsprechen, wurde eine Arbeitsgruppe zur radioaktiven Markierung von Arzneimitteln aufgebaut. Ihre bisherigen Arbeiten zur Tritium-Markierung von Peptiden fanden weltweit Anerkennung.
Die analytische Kontrolle der Synthesearbeiten erfolgt in der Abteilung Biopharmazie und Analytik. Spezielle analytische Untersuchungen mittels Hochleistungsmethoden werden im Zentralinstitut für Molekularbiologie und im Zentralinstitut für Organische Chemie der Akademie der Wissenschaften durchgeführt.

Peptidsynthese

Innerhalb der Peptidforschung unseres Institutes hat die Peptidsynthese stets eine wichtige Rolle gespielt. Die wichtigsten Aufgaben bestehen in dem Auffinden effektiver Synthese- und Reinigungsmethoden, in der Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und in der Entwicklung pharmazeutisch bedeutsamer synthetischer



23 Prof. Dr. H. Niedrich,
Leiter des Bereiches Arzneimittelsynthese

Head of the Division of Drug Synthesis

Drug synthesis has always been an important research subject at the IDR.
Peptide chemistry, at first the only line of research at this institute, was later joined by work on medicochemically based synthesis of compounds affecting heart and circulation. The Drug Synthesis Division was established comprising the departments of Peptide Chemistry and Organic Drug Synthesis. Recently a third department was set up which is concerned with the following:

- development of laboratory procedures for small scale production and their transfer to the pharmaceutical industry
- supply of substances of an approved quality for toxicological studies and clinical trials.

In order to meet the international standards in modern drug research a group was set up for radioactive drug labelling. Their work on tritium

Analoga. Die Peptidsynthese ist aber auch in den Aufbau von Radiorezeptor- und Radioimmunoassays einbezogen.

Substanz P und Cholezystokinin

Für die Synthese des Undecapeptides Substanz P (SP) ist ein Verfahren erarbeitet worden, nach dem die Herstellung im 10g-Maßstab unter Verwendung einer 4 + 7 Fragmentkondensation in etwa 10%iger Ausbeute gelingt und eine 98%ige Reinheit erzielt wird. Auftretende Nebenreaktionen wie Alkylierungen am Methionin wurden sorgfältig untersucht. Wir konnten zeigen, daß die Abspaltung von Boc- und O^{t}Bu-Gruppen mit Fluorwasserstoff quantitativ zur Bildung von S-tert. Butylsulfoniumsalzen führt. Die Sulfoniumverbindungen sind bei niedriger Temperatur stabil und können bei erhöhter Temperatur ohne Nebenreaktionen wieder in die entsprechenden Methionin-Peptide umgewandelt werden. Diese reversible Modifizierung der Methioninseitenkette wurde erfolgreich zur Verhinderung einer S-Oxydation bei Iodierungen Methionin-enthaltender Tyrosin-Peptide wie Tyr^8-SP, Met-Enkephalin oder Physalaemin-Sequenzen verwendet (Abb. 24). Die Sulfoniumgruppe erhöht die Löslichkeit hydrophober Peptide und senkt ihre Assoziationstendenz. Die hergestellten Sulfonium-Zwischenstufen konnten deshalb auch zur Verbesserung der chromatographischen Reinigung von SP-Peptiden, Physalaemin, Eledoisin sowie eines Gastrin-Tetrapeptides eingesetzt werden.

labelling of peptides has gained an international reputation.

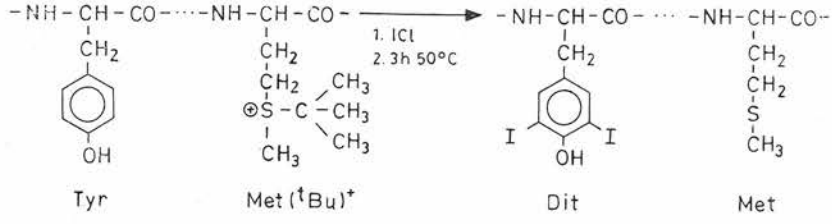
Our synthesizing work is analytically controlled by the department of Biopharmaceutics and Analytics. Special analytical investigations with high performance methods and equipment are made at the Central Institute of Molecular Biology and the Central Institute of Organic Chemistry/Academy of Sciences.

Peptide synthesis

Synthesis has always played an important role in the peptide research of our institute concerned with the search for efficient methods of synthesis and purification, the analysis of structure-activity relationships, the development of synthetic analogs for pharmaceutical use, and the development of radioreceptor and radioimmunoassays.

Substance P and cholecystokinin

A procedure has been developed for the solution synthesis of the undecapeptide substance P (SP) on a 10 g-scale using a 4 + 7 segment condensation. Material of 98% purity was obtained in an overall yield of about 10%. Side reactions such as the alkylation of methionine were thoroughly investigated. It was shown that deprotection of Boc- and O^t-Bu-derivatives by means of hydrogen fluoride leads quantitatively to S-tert. butylsulfonium salts of the corresponding meth-



24 Schutz der Methionin-Seitenkette bei Jodierungen von Peptiden durch Sulfoniumsalz-Bildung

Protection of methionine in peptides during iodination by sulfonium salt formation

Es sind viele Analoga der SP mit unterschiedlichen Zielen hergestellt worden: Über die Peptide II, III, VI (Abb. 25) wird die Einführung von Tritium, durch die Synthese von IV eine Radioiodierung ermöglicht. Die Synthese vieler Analoga diente der Ableitung von Struktur-Wir-

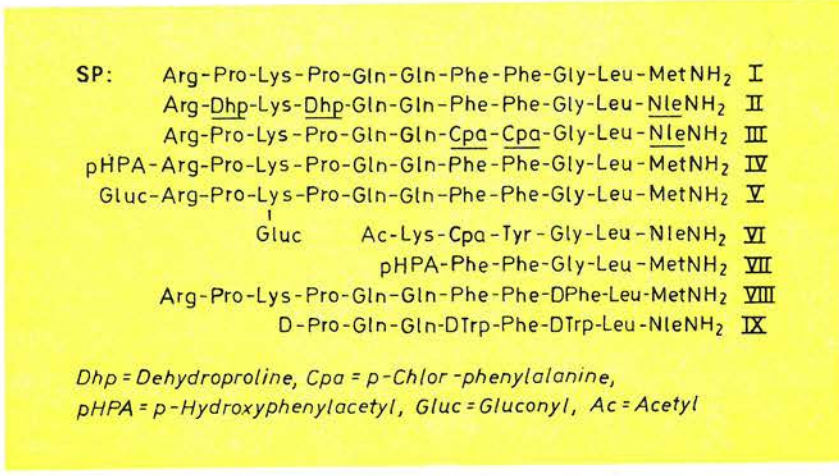
ionine peptides. The sulfonium compounds are stable at low temperatures and can be reconverted to the methionine peptides at elevated temperatures without side reactions. This reversible modification of methionine was successfully applied to prevent S-oxydation during iodination

kungs-Beziehungen. Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse konnten Analoga mit außergewöhnlich hoher glattmuskulärer Aktivität (VII), oder verringerter Histamin-freisetzender Wirkung (V), synthetisiert werden. Andere Peptide (z. B. VIII) zeigen verringerte glattmuskuläre, aber beträchtliche neurotrope Wirkung.

Bei der Suche nach verbesserten SP-Antagonisten fanden wir, daß der durch die Einführung von D-Trp in die Positionen 7 und 9 (ROSELL und FOLKERS) induzierte Antagonismus durch den im Vergleich zu Methionin hydrophoberen Norleucin-Rest in Position 11 gesteigert werden kann (IX).

of methionine-containing tyrosine peptides such as Tyr^8-SP, Met-enkephalin and physalaemin sequences (Fig. 24). The sulfonium group increases the solubility of hydrophobic peptides and decreases their association. Sulfonium intermediates have therefore been used to improve the chromatographic purification of SP peptides, physalaemin, eledoisin and a gastrin tetrapeptide.

Many analogs of SP have been synthesized to permit tritium labelling (Fig. 25, analogs II, III, VI), radioiodination (IV) and structure-activity studies. Based on our findings of the structure-activity relationships, analogs were designed



25 Die wichtigsten der im IWF synthetisierten Substanz-P-Analoga

The most important Substance P analogs synthesized at the IDR

Umfassende Struktur-Wirkungs-Untersuchungen mit C-terminalen Sequenzen des Cholezystokinins (CCK) führten zum Auffinden des hoch aktiven Desamino-CCK-oktapeptides.

$HOOC-CH_2-CH_2-CO-Tyr(OSO_3Na)$-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2, das als Werkzeug in der Diagnostik von Gallenblasen- und Pankreaserkrankungen einsetzbar ist.

Nach Untersuchungen zur O-Sulfatierung von Boc-Tyr-Met-Gly-OEt und zur Stabilität der Sulfatester Gruppe bei Verseifungen, Kupplungen, und Boc-Abspaltungen wurde mit der Kondensation von $Boc-Tyr(OSO_3Na)$-Met-Gly-OH und dem C-terminalen Tetrapeptid eine geeignete Synthesevariante entwickelt. Ein alternativer Weg zur Einführung der Sulfatgruppe in das Desamino-CCK-oktapeptid wurde gemeinsam mit PENKE, Szeged, realisiert.

showing extremely high smooth-muscle activity (VII), or diminished histamine releasing activity (V). Others showed decreased response to smooth-muscle preparations but pronounced neurotropic activity (VIII). In search of antagonists of SP we found that the antagonism induced by introducing D-Trp at positions 7 and 9 (ROSELL and FOLKERS) can be increased by using the more hydrophobic norleucine at position 11 (IX).

Extensive structure-activity studies with C-terminal sequences of cholecystokinin (CCK) resulted in the development of a highly active desamino-CCK octapeptide.

$HOOC-CH_2-CH_2-CO-Tyr(OSO_3Na)$-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2, can be used to diagnose gall bladder and pancreas diseases. To overcome difficulties arising from the presence of meth-

Durch Ausarbeitung einer neuen Synthese unter Verwendung von Aminosäureaktivestern des N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximids (HONB-Reagens von FUYINO) gelang eine wesentliche Verbesserung der Herstellung des Tetrapeptides Trp-Met-Asp-Phe-NH_2, das auch als Zwischenprodukt der "Acignost"-Herstellung durch den VEB Berlin-Chemie Verwendung findet. Der Einsatz von HONB erwies sich auch bei der Herstellung von Angiotensin I sowie von Angiotensin II-Antagonisten als vorteilhaft.

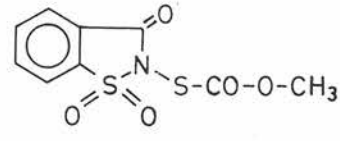
Neue Methoden in der Peptidsynthese

Die effektive Synthese von Peptiden erfordert große Erfahrungen bei der Anwendung etablierter Methoden, aber auch permanente Anstrengungen bei der Verbesserung des Methodenspektrums. Wir synthetisierten auf der Basis von N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (HONB) die stabilen Reagenzien Boc-ONB, Z-ONB, Msoc-ONB und Fmoc-ONB über das Zwischenprodukt Cl-CO-ONB. Die Verbindungen sind brauchbare Hilfsmittel bei der Einführung von Urethan-Schutzgruppen in Aminosäuren und Amine. Cl-CO-ONB ist darüberhinaus gut anwendbar für die Herstellung aktivierter polymerer Träger mit hoher Lagerbeständigkeit.
Boc-Aminosäure-ONB-ester konnten erfolgreich in die Ausarbeitung einer neuen Schnellsynthese-Methode einbezogen werden, bei der der Aufbau der Peptidkette im Zweiphasensystem ohne Isolierung von Zwischenprodukten erfolgt. Diese Methode, die in Kooperation mit der Sektion Chemie der Humboldt-Universität entwickelt wurde, gestattet die Durchführung von mindestens zwei Kupplungsschritten pro Tag und liefert saubere Peptide mit guten Ausbeuten.
Mit einem weiteren Synthesereagens wurde ein Beitrag zur Synthese unsymmetrischer Disulfide geleistet. Substituiert man im Methyloxycarbonylsulfenylchlorid das Chloratom durch den Saccharin-Rest, so erhält man N-(Methyloxycarbonylsulfenyl)-1,2-benzoisothiazol-3-oxo-1,1-dioxid, das sich als ein ausgezeichnetes Reagens für die Herstellung aktivierter Thiole, R-S-S-CO-OCH_3, erwies (Abb. 26). Die Verbindung ist bereits erfolgreich zur Synthese unsymmetrischer Disulfide

ionine, tryptophan and sulfated tyrosine, different strategies have been examined. After elucidating the O-sulfation of Boc-Tyr-Met-Gly-OEt and studying the behaviour of the sulfate ester during saponification, coupling and Boc-deprotection it was found that segment condensation of Boc-Tyr(OSO_3Na)-Met-Gly-OH with the C-terminal tetrapeptide gave satisfactory results. An alternative method to introduce the sulfate group into the desamino-CCK octapeptide was developed jointly with PENKE, Szeged.
In order to improve the production of the tetrapeptide, Trp-Met-Asp-Phe-NH_2, which is also used as an intermediate for the preparation of "Acignost" – VEB Berlin-Chemie, we developed a new method using active esters of amino acids with N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximide (HONB reagent of FUYINO). This technique also proved advantageous in the synthesis of angiotensin I and angiotensin II-antagonists.

New methods in peptide synthesis

The efficient synthesis of peptides requires considerable experience in the use of established methods as well as permanent efforts to improve and enlarge the arsenal of techniques.
On the basis of N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximide (HONB) we synthesized the stable reagents Boc-ONB, Z-ONB, Msoc-ONB, and Fmoc-ONB via the intermediate Cl-CO-ONB. The compounds have been found to be useful in the synthesis of urethane- protected amino acids and amines. Cl-CO-ONB is also quite suitable for the preparation of activated polymer supports of high shelf stability.
Boc-amino acid-ONB-esters were also used in a new rapid peptide synthesis which takes place in a solution without the isolation of intermediates. This method – developed in cooperation



26 N-(Methyloxicarbonylsulfenyl)-1,2-benzoisothiazol-3-oxo-1,1-dioxid

Ein neues Reagenz für die Herstellung aktivierter Thiole
A new reagent for the synthesis of activated thioles

aus selektiv geschützten Cysteinpeptiden eingesetzt worden.

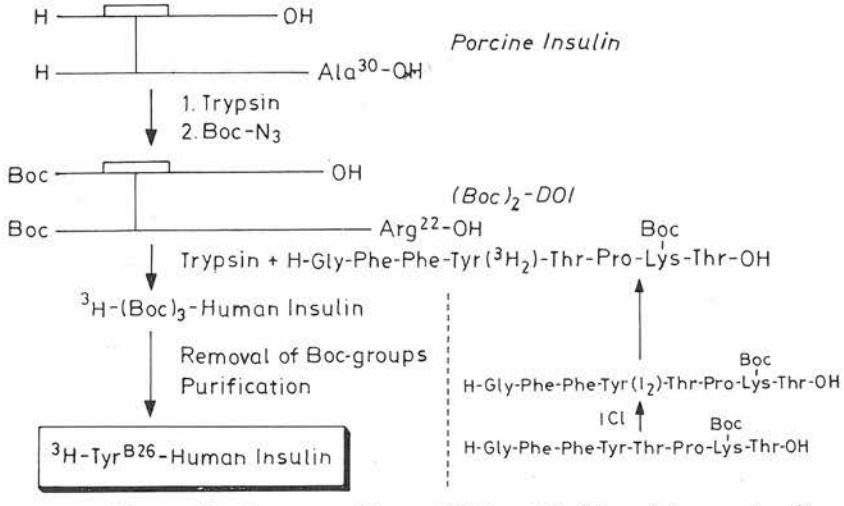
Radioaktive Markierung von Peptiden

Für die Einführung von Tritium in Peptide synthetisierten wir zunächst Präkursoren, die L-p-Chlorphenylalanin oder L-Dehydroprolin enthalten. Die katalytische Tritiierung erfolgte gemeinsam mit dem Biochemischen Zentrum, Szeged, sowie mit dem Zentralinstitut für Kernforschung, Rossendorf. Wir erhielten [^{3}H-Phe^{7,8}, Nle^{11}]-SP und [^{3}H-Pro]^9-GnRH mit spezifischen Radioaktivitäten von 15–55 Ci/mMol.
Ausgehend von Beobachtungen über einen ursprünglich unerwünschten unspezifischen Einbau von Tritium in aromatische Aminosäuren bei der Tritiierung von Dehydroprolin-enthaltenden Peptiden entwickelten wir eine einfache Methode zur Direktmarkierung von Histidinpeptiden. Diese Variante gestattet z. B. die schnelle Tritiummarkierung von GnRH und seinen Analogen im 10–15 Ci (350–500 GBq)/mMol-Bereich, aber auch von Angiotensin I (3 Ci/mMol).
Unsere gegenwärtigen Bemühungen sind auf die Erweiterung unserer Kenntnisse über die bei der Tritiummarkierung ablaufenden katalytischen Prozesse gerichtet.
Bei unseren Arbeiten zur ^{3}H-Markierung von h-Insulin wurde die Anwendbarkeit von Methoden der enzymatischen Semisynthese untersucht. Wie in Abb. 27 dargestellt, gelang die Darstellung von ^{3}H-Humaninsulin durch enzymatische

with the Chemistry Section of the Humboldt University – allows at least two coupling steps per day and provides pure peptides in high yields.
A further useful synthetic reagent was derived from saccharine. The N-(methyloxycarbonylsulfenyl)-1,2-benzisothiazol-3-oxo-1,1-dioxid (Fig. 26) proved to be an excellent reagent for the preparation of activated thiols (R-S-S-CO-OCH$_3$). This reagent has been successfully applied in the synthesis of unsymmetric disulfides from selectively protected cystein peptides.

Radioactive labelling of peptides

In tritium labelling of peptides we started from specially synthesized precursors containing either L-p-chlorophenylalanine or L-dehydroproline. Jointly with the Biochemical Centre Szeged and the Central Institute of Nuclear Research, Rossendorf, we obtained [^{3}H-Phe^{7,8}, Nle^{11}]-SP and [^{3}H-Pro]^9-GnRH with specific radioactivities of 15–55 Ci (0.5–1.6 TBq) per mmol.
Proceeding from the observation that additional tritium incorporation into aromatic amino acids occurs during the tritiation of a dehydroproline peptide we developed a method for direct tritium labelling of histidine peptides. It makes it possible to obtain, for instance, stable tritiated GnRH and its analogs with 10–15 Ci (350–500 GBq)/mmol. In this way tritium was also introduced into angiotensin I. Our present efforts



27 Tritiummarkierung von Human-Insulin unter Einsatz von Methoden der enzymatischen Semisynthese

Tritium labelling of human insulin using procedures of enzymatic semisynthesis

Kupplung des Desoktapeptid (B 23–30)-Insulins mit [^{3}H-Tyr(B 26)]-Insulinoktapeptid (B 23–30).

Synthese herz-kreislauf-aktiver heterocyclischer Verbindungen

Die Beeinflussung von Enzymen kreislaufregulierender Systeme bietet lohnende Ansätze für potentielle Arzneistoffe. Die Hemmung von Dopamin-ß-hydroxylase (DBH) und Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) sind Ziele von Forschungsarbeiten. Auch die Synthese potentieller Kardiotonika ist eines unserer Aufgabengebiete.

Zwei bekannte Wirkstoffe, der DBH-Hemmer Fusarsäure (5-n-Butyl-2-picolinsäure) und das kardioton wirkende Amrinon (5-Pyridyl-3-amino-2-(1H)-pyridon) sind nach Erarbeitung rationeller Syntheseverfahren zu Leitverbindungen für Struktur-Wirkungs-Optimierungen geworden.

Zahlreiche Analoga der Fursarsäure und des Amrinons wurden synthetisiert.

Mit der Synthese 5-substituierter-2-Picolinsäuren konnte eine wichtige Voraussetzung für die umfassenden Untersuchungen zur Struktur-Abhängigkeit ihrer DBH-Hemmung und Blutdrucksenkung geschaffen werden.

Zur Auffindung wirksamer Kardiotonika wurde ausgehend von dem Verfahren zur Herstellung von Amrinon (Cordemcura®, VEB Arzneimittelwerk Dresden) die Synthese weiterer Arylpyridon-Derivate in Angriff genommen.

Verfahrensentwicklungen

Im Rahmen der Entwicklung neuer Syntheseverfahren standen die Synthese von Cordemcura® und die Semisynthese von Humaninsulin im Vordergrund.

Cordemcura®-Synthese:

Zu Beginn unserer Forschungs- und Entwicklungsarbeiten über Kardiotonika bestand die Aufgabe, Cordemcura® aus einem ausreichend verfügbaren Picolinbasen-gemisch zu gewinnen. Wir verbesserten den bekannten Syntheseweg (Abb. 28) durch eine Reihe origineller Problem-

are aimed at enhancing our knowledge of catalytic processes during tritium labelling.

In the case of insulin, the suitability of enzymes for the semisynthetic coupling of desoctapeptide (B 23–30) porcine insulin with a tritium labelled peptide fragment (B 23–30) was examined and $^3H_2$-Tyr B^{26}-human insulin was obtained as shown in Fig. 27.

Synthesis of heart and circulation-influencing heterocyclic compounds

Chemical structures interacting with enzymes relevant for the regulation of blood circulation are promising targets in search of new drugs. Under present investigation is the inhibition of dopamine-ß-hydroxylase (DBH) and of the angiotensin-converting enzyme (ACE). At the same time we are engaged in synthesizing cardiotonics. Two well known drugs, DBH-inhibitor fusaric acid and cardiotonically acting amrinone (5-pyridyl-3-amino-2-(1H)-pyridon) have become lead compounds of structure-activity optimization, after rational procedures for their synthesis had been developed.

A series of analogs have been synthesized from fusaric acid and amrinone. The synthesis of other 5-substituted-2-picolinic acids was an important prerequisite for comprehensive investigations into the structure-dependence of DBH-inhibition and blood pressure decrease.

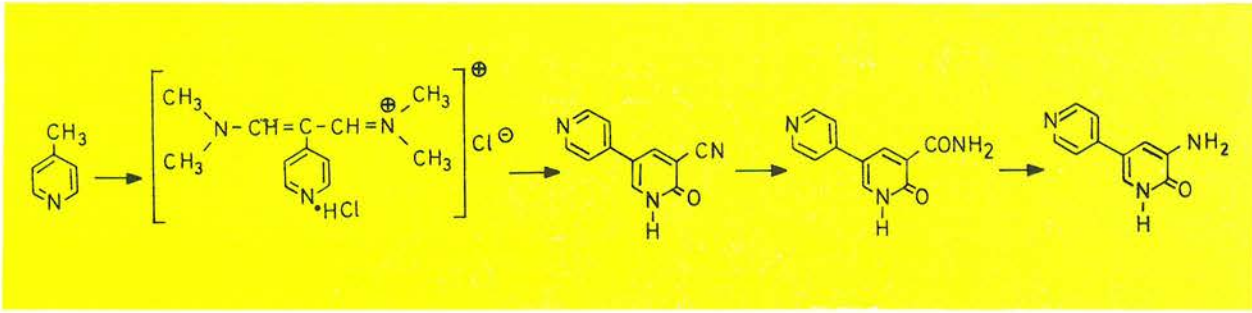
In search of even more efficacious cardiotonics, the synthesis of further arylpyridone -derivatives has been started proceeding from the technique of producing amrinone (Cordemcura® is the registred name of the product from VEB Arzneimittelwerk Dresden).

Development of procedures

Within the framework of developing new synthesizing techniques prominence has been given to the synthesis of Cordemcura® and the semisynthesis of human insulin.

Cordemcura®-synthesis

When research and development of cardiotonics was started we had to provide Cordemcura®



28 Synthese von Amrinon (Cordemcura®)

Synthesis of Amrinone (Cordemcura®)

lösungen und erhielten dadurch analytisch genau deklarierte Zwischenprodukte und ein Endprodukt von höchster pharmazeutischer Reinheit. Drei Patente wurden angemeldet. Die Existenz von zwei Kristallmodifikationen konnte nachgewiesen werden. Das modifizierte Verfahren ist inzwischen in der Pilotanlage des VEB AWD zur Herstellung von Prüfmustern für die klinische Erprobung erfolgreich getestet worden.

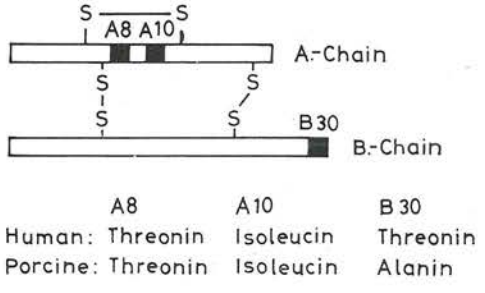
Semisynthese von Humaninsulin aus Schweine-Insulin:

In Zusammenarbeit mit dem VEB Berlin-Chemie und der Sektion Biochemie an der Karl-Marx-Universität Leipzig entwickelten wir ein Verfahren zur Umwandlung von Schweineinsulin in Humaninsulin (Abb. 29). Die grundlegenden Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden an der Humboldt-Universität Berlin und am IWF bereits zwischen 1975 und 1980 durchgeführt. Diese Arbeiten zeigten,

using an easily available mixture of alkylpyridines as the initial product.
We modified a well-known synthesis process (Fig. 28) by a number of innovations and managed to prepare clearly defined intermediates and a final product of high pharmaceutical purity. Three innovations have been patented. The existence of two crystal modifications was confirmed. Meanwhile the modified synthesizing process has been successfully tested for the production of clinical samples in the pilot plant of VEB AWD.

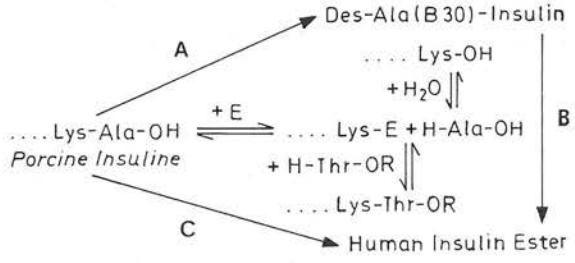
Semisynthesis of human insulin from porcine insulin

Collaborating with VEB Berlin-Chemie and the Biochemical Section at Karl-Marx University Leipzig we developed a process for converting porcine insulin into human insulin (Fig. 29). The fundamental studies in this field were made at Humboldt-University Berlin and at the IDR as early as the years 1975 to 1980. These studies showed that



29 Schematische Darstellung des Unterschiedes in der Primärstruktur therapeutisch verwendeter Insuline vom Schwein und vom Menschen

Difference in the primary structure of therapeutically used insulins from pigs and humans



30 Schematische Darstellung der Wege der enzymatisch-semisynthetischen Umwandlung von Schweine-Insulin in Human-Insulin

Scheme of enzymatic semisynthetic conversion of porcine insulin into human insulin

daß Des-Ala(B 30)-Insulin aus Schweineinsulin und Trypsin hergestellt werden und mit einem Überschuß eines Threoninesters und Trypsin oder Carboxypeptidase A in Humaninsulin umgewandelt werden kann

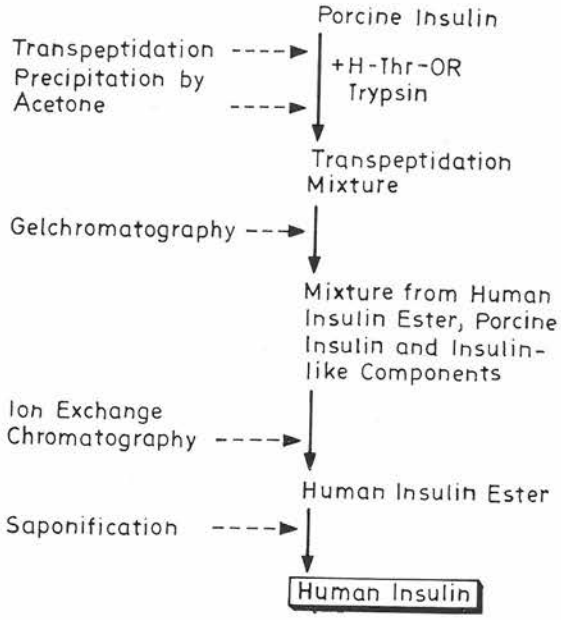
und daß

Humaninsulin auch direkt aus Schweineinsulin durch Transpeptidierung unter ähnlichen Bedingungen (Weg A–C in Abb. 30) gewonnen werden kann.

des-Ala(B 30)-insulin can be prepared from porcine insulin by trypsin and transformed into human insulin by using an excess of threonine ester and trypsin or carboxypeptidase A;

and that

human insulin can also be directly obtained from porcine insulin by transpeptidation under similar conditions (paths A–C in Fig. 30).



31 Verfahrensschema der Semisynthese von Human-Insulin aus Schweine-Insulin

Scheme of the semisynthesis of human insulin from porcine insulin

Die letztgenannte Methode, die einstufige Transpeptidierung von Schweineinsulin durch Trypsin und einen Threoninester (Weg C) war für die Entwicklung eines Verfahrens mit den Stufen enzymatische Transpeptidierung, Entfernung des Trypsins, Isolierung des Humaninsulinesters, Verseifung und einer Endreinigung des Humaninsulins besonders geeignet (Abb. 31).

Die Struktur des semisynthetischen Humaninsulins entspricht den theoretischen Erwartungen und seine Reinheit genügt den hohen Anforderungen des Einsatzes in der Behandlung von Diabetikern. Das Humaninsulinverfahren wird gegenwärtig unter Mitwirkung des IWF im VEB Berlin-Chemie in die Produktion überführt.

Especially the latter method, the one-step transpeptidation of porcine insulin by trypsin and a threonine ester (path C) was suitable for developing a process including enzymatic transpeptidation, removal of trypsin, isolation of the human insulin ester, saponification and final purification of human insulin (Fig. 31). The structure of the semisynthesized human insulin was confirmed to be correct, and its purity satisfies the high standards needed for pharmaceutics administered to diabetics. At present VEB Berlin-Chemie is developing the synthesizing process up to production scale.

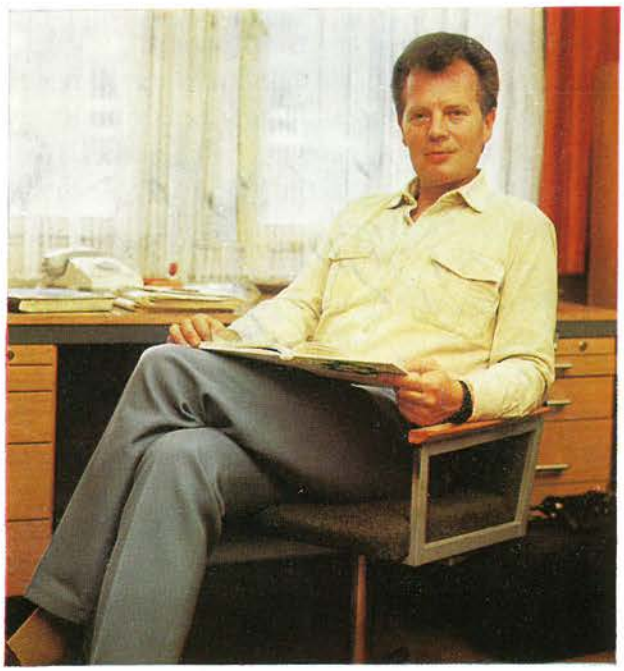
8 Theoretische Arbeiten zur gezielten Entwicklung von Wirkstoffen

Theoretical Drug Design Methods

Als wir vor etwa 15 Jahren auf diesem Gebiet zu arbeiten begannen, wurden Methoden zur Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei biologisch aktiven Substanzen gewöhnlich unter dem Begriff „quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse" zusammengefaßt. Damit erhält man sogenannte „quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen" (QSAR's), die den Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und physikochemischen bzw. strukturellen Eigenschaften von Wirkstoffen quantitativ beschreiben.

In der letzten Zeit hat sich die Zahl der Methoden auf dem Struktur-Wirkungs-Gebiet rapide vergrößert, wobei nicht alle diese Methoden zu quantitativen Ausdrücken im Sinne der klassischen QSAR's führen. Gemeinsam ist ihnen jedoch die Zielstellung, zu einer rationaleren und rationelleren Entwicklung neuer Wirkstoffe beizutragen sowie auch der umfangreiche Einsatz von Computern. Wir glauben daher, daß der Terminus „theoretical drug design methods" am ehesten der Vielfalt der heute verfügbaren Techniken dieses Gebietes gerecht wird und haben ihn aus diesem Grund auch als Titel für eine kürzlich erschienene Monographie gewählt (R. Franke, Elsevier, Amsterdam und Akademie-Verlag, Berlin, 1984), in der Teile unserer Arbeiten sowie ein Gesamtüberblick dargestellt sind.

Mit Hilfe solcher Techniken ist es möglich, die biologische Wirksamkeit noch nicht synthetisierter Verbindungen abzuschätzen, und solche Abschätzungen sowie die sich ergebenden tieferen Einsichten gestatten es dann, weitere Untersuchungen in die erfolgversprechendste Richtung zu lenken und/oder Kriterien dafür zu formulieren, wann die Untersuchung einer speziellen Substanzserie abgebrochen werden sollte. Außerdem lassen sich Schlußfolgerungen hinsichtlich molekularer Wirkungsmechanismen erhalten, die dann



32 Prof. Dr. R. Franke,
Leiter der Abteilung Theorie

Head of the Theoretical Department

When we started work in this area about 15 years ago methods to analyze structure-activity relations in drugs were usually summarized under the heading "quantitative structure-activity analysis". Their application yields the so-called "quantitative structure-activity relationships" (QSAR's) which describe the relation between biological potency and physicochemical or structural characteristics of drugs in a quantitative manner.

During the last few years the number of techniques applied in the structure-activity field has been rapidly increasing, but not all of them lead to quantitative expressions in the classical QSAR sense. What they do have in common, however, is the objective to aid in the design or in a more rational development of new drugs and that they all make extensive use of computers. We feel that "theoretical drug design methods" is pro-

ebenfalls der Konzipierung potentiell aktiver Strukturen dienen können. Dies alles resultiert in einer Einsparung chemischer Synthesen, biologischer Testungen und Zeit und in einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit, Wirkstoffe mit den angestrebten pharmakologischen Eigenschaften aufzufinden.

Ein „drug designer" sieht sich mit vielen unterschiedlichen Problemen konfrontiert, beispielsweise hinsichtlich chemischer Strukturen, Art und Ausmaß deren Abwandlung, die Zahl der zu betrachtenden Verbindungen sowie auch die Art und Präzision biologischer Testdaten. Auch die Zielstellung kann bei unterschiedlichen Problemen sehr verschieden sein, wobei es z. B. um die gezielte Vorauswahl von Substanzen für Screening-Programme, die Optimierung einer gegebenen Leitverbindung oder die Ableitung neuer Leitstrukturen gehen kann. Aus diesen Gründen muß ein ganzes Spektrum theoretischer Verfahren verfügbar sein, aus dem dann entsprechend den jeweiligen Umständen die optimale Variante auszuwählen ist. Es war und ist daher stets unser Hauptanliegen, neben der Bearbeitung praktischer Probleme dieses Spektrum zu erweitern und uns ein genaues Verständnis darüber zu verschaffen, was die verschiedenen Methoden leisten können und wie sie im Sinne eines soliden „QSAR know how" anzuwenden sind. Einige ausgewählte Aspekte dieser Arbeiten sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

Auswahl optimaler Serien

Eine optimale Trainingsserie sollte mit einem Minimum an Verbindungen ein Maximum an Information liefern. Die Verbindungen der Serie sind so auszuwählen, daß *alle* wichtigen physikochemischen Eigenschaften *systematisch* und *voneinander unabhängig* über einen genügend großen Bereich variiert werden. Um alle diese Voraussetzungen gleichzeitig zu erfüllen, sind spezielle Auswahlverfahren auf der Grundlage mathematischer Algorithmen notwendig. Wir haben zwei derartige Verfahren entwickelt: die PCMM-Methode (*p*rincipal *c*omponent analysis and *m*ultidimensional *m*apping) und die TMIC-Methode (*t*wo-dimensional *m*apping of *i*ntra-class *c*orrelation matrices). Beide werden routinebably the most adequate term to cover the large variety of all such techniques; we have chosen this, too, as the title for a recent monograph presenting some of our work and a general outline of the whole field in more detail (R. Franke, Elsevier, Amsterdam und Akademie-Verlag, Berlin, 1984).

With the help of such methods it is possible to estimate biological potencies for compounds not yet synthesized, and together with the general insight obtainable such estimates can be used to steer further research in the most promising direction and/or to establish criteria for when to stop the investigation of a particular series of compounds. In addition, conclusions on the molecular mechanisms of drug action may be obtained which, in turn, may also aid in designing potentially active compounds. As a result, synthetic work, biological testing, and time, can be saved, and the chance of finding compounds with the desired properties is considerably increased.

A drug designer is faced with many different situations regarding, for example, chemical structures, type and extent of structural variations, the number of compounds to be considered, and the type and precision of biological data. Also, the purpose of his work may largely depend on the type of problem to be tackled, such as a simple preselection of compounds for a screening program, or the optimization of a given lead compound or the design of new leads. It is for these reasons that a whole "tool box" (one might also speak of a "QSAR kit") of drug design methods must be available from which the drug designer has to select the best variant for each particular problem. In addition to solving practical drug design problems the major aim of our work has always been, therefore, to make the "tool box" more complete and to gain a detailed understanding of what the different methods can do and how they have to be applied in the sense of a sound "QSAR know how". In this chapter we will briefly present some few selcted areas of our research without going into detail.

Series design

An optimal training series should provide a maximum of information with a minimum of

mäßig genutzt und zeigen auch im Vergleich mit anderen, in der Literatur beschriebenen Verfahren dieser Art günstige Eigenschaften. PCMM läßt sich auf nahezu beliebige Mengen von Verbindungen bzw. Sätze von Molekülparametern anwenden, hat aber für den Synthesechemiker den Nachteil, daß ihm der eigentliche Selektionsprozeß als eine „black box" erscheint. Bei der einfacheren TMIC-Methode, die jedoch auf etwa 50 Substituenten beschränkt ist, ist dies nicht der Fall. Hier kann der Synthesechemiker Substituenten aus einer einfachen zweidimensionalen Karte (siehe Abb. 33) auswählen. Die Achsen des Koordinatensystems sind die ersten beiden aus einer Intraklass-Korrelationsmatrix extrahierten Hauptkomponenten, und eine gute Trainingsserie kann leicht durch einfache Inspektion erhalten werden. Punkte (Substituenten) werden so ausgewählt, daß alle vier Quadranten der „Karte" überstrichen werden und dabei die Abstände zwischen den ausgewählten Punkten etwa gleich sind.

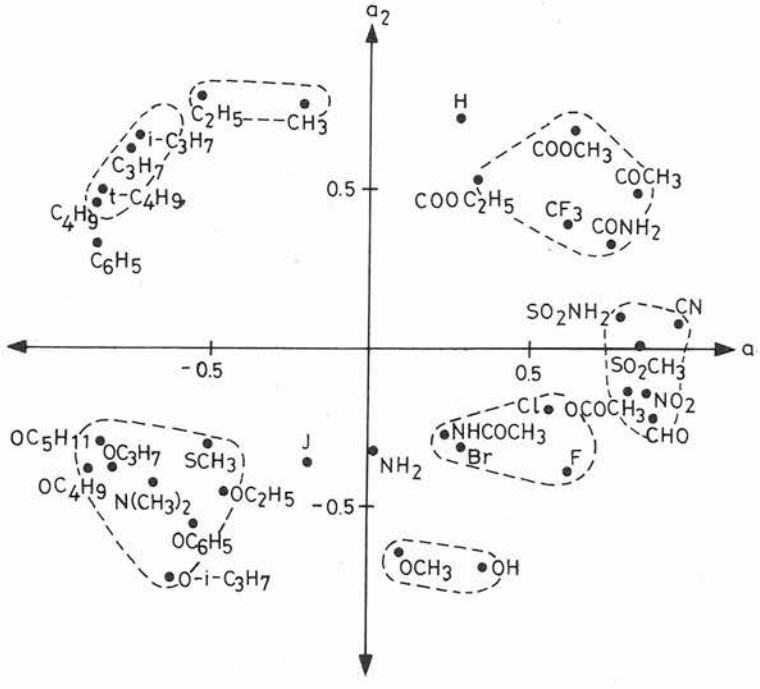
Hydrophobizität und hydrophobe Wechselwirkungen

Ein genaues Verständnis, in welcher Weise Hydrophobizitätsparameter wie log P oder π von der Molekülstruktur und von Eigenschaften von

analogs. In order to meet this requirement, the compounds comprising the series must be selected in such a way that *all* important physicochemical properties governing biological potency must be varied *systematically* and *independently* of each other over a *sufficiently wide range*. Special selection methods based on mathematical algorithms become necessary in order to fulfil all these conditions simultaneously. We have devised two such methods, the PCMM (*p*rincipal *c*omponent analysis and *m*ultidimensional *m*apping) and TMIC (*t*wo-dimensional *m*apping of *i*ntra-class correlation *m*atrices) techniques, which are routinely used and both compare fairly well with other series design techniques described in the literature. PCMM can deal with practically any number of molecular parameters and compounds but has the disadvantage for the synthetic chemist that the selection process presents itself as a black box to him. This is not the case with the simpler TMIC method which, however, is limited to about 50 substituents. Here, the syn-

33 Darstellung von 35 aromatischen Substituenten im Raum der ersten beiden aus einer Intraklasskorrelationsmatrix extrahierten Hauptachsen a_1 und a_2 (Betrachtete Molekülparameter: π, $\mathfrak{F}$, $\mathfrak{R}$ und MR)

Plot of 35 aromatic substituents in the space spanned by the first two principal components, a_1 and a_2, extracted from an intra-class correlation matrix. (Molecular parameters considered: π, $\mathfrak{F}$, $\mathfrak{R}$ and MR)



Lösungsmitteln abhängen, ist für die korrekte Anwendung dieser Parameter in QSAR-Arbeiten von größter Bedeutung. Es ist daher nicht überraschend, daß diesem Problem intensive Arbeit nicht nur in unserem, sondern auch in vielen anderen Laboratorien gewidmet wurde.

Einige unserer Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. π-Werte aromatischer meta- und para-Substituenten lassen sich als eine Linearkombination ihrer – wie wir es genannt haben – „intrinsischen aromatischen Hydrophobizität" (ausgedrückt durch die entsprechenden π-Werte in mono-substituierten Benzenen) und elektronischer Korrekturen darstellen. Die elektronischen Korrekturen folgen regulär aus den elektronischen Eigenschaften sowohl der Substituenten als auch der funktionellen Gruppen. Die Resultate gestatten nicht nur die Abschätzung von π-Werten, sondern haben auch wesentliche praktische Konsequenzen für QSAR-Arbeiten.
2. Der Verteilungsprozeß hängt von der Größe der gelösten Moleküle, einem polaren Faktor und Wasserstoffbrücken-Bindungen ab. Hinsichtlich der Solvens-Abhängigkeit von log P-Werten hat dies die Konsequenz, daß die einfache Collander-Gleichung nur insoweit gilt, als die betrachteten Solventien das gleiche Verhalten hinsichtlich der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zeigen oder auch, wenn sich die gelösten Moleküle hinsichtlich dieser Eigenschaft gleich verhalten. Trifft dies nicht zu, muß ein weiterer Term eingeführt werden, der die Ausbildung unterschiedlicher Wasserstoffbrücken berücksichtigt.
3. Bei der Verknüpfung von Hydrophobizitätsdaten mit geeigneten Größenparametern (z. B. cavity surface area) innerhalb heterogener Serien gelöster Moleküle müssen für chemisch und/oder sterisch unterschiedliche Molekülteile auch unterschiedliche Beiträge zur Hydrophobizität zugelassen werden (Kooperation mit K. Bocek, IHE, Prag). Das resultierende Modell („erweitertes Gruppenbeitrags-Konzept") liefert eine ausgezeichnete Beschreibung und kann als generell gültig betrachtet werden.

thetic chemist himself can chose from a two-dimensional map of substituents (see Fig. 33). The axes of the coordinate system are the first two principal components extracted from an intraclass correlation matrix, and a good training series can easily be obtained by simple inspection: points (substituents) are selected so that all four quadrants of the map are covered and the distances between selected points are about equal.

Hydrophobicity and hydrophobic interactions

A detailed understanding of how hydrophobicity parameters such as log P or π depend on solute structure and solvent properties is of the utmost importance for their correct application in QSAR work. It is not surprising, therefore, that quite a lot of work has centred around this problem not only in our own but in many other laboratories.

Some of our results may be summarized as follows:

1. π values of aromatic meta- and para-substituents can be described by a linear combination of what we have termed their "intrinsic aromatic hydrophobicity" (expressed by their respective π values in mono-substituted benzenes), and by electronic corrections. These electronic corrections depend regularly on the electronic properties of both the substituents and the functional group. The results not only allow the estimation of π values but also have important practical implications for QSAR work.
2. Partitioning is governed by solute bulk, a polar factor, and hydrogen bonding. With regard to the solvent dependence of log P values this has the consequence that the simple Collander equation is valid only insofar as the solvents compared show the same hydrogen bonding behaviour or if the solutes considered do not differ with respect to hydrogen bonding. Otherwise, an additional term correcting for hydrogen bonding becomes necessary.
3. When relating hydrophobicity data to appropriate size parameters (e. g., cavity surface areas) in heterogeneous sets of solutes, allowance must be made for different contributions

Klassifizierungsmethoden

In vielen Fällen werden aus biologischen Tests nur semiquantitative Resultate erhalten, so daß sich eine Klassifizierung der Verbindungen hinsichtlich der biologischen Aktivität ergibt. In solchen Fällen müssen Klassifizierungsverfahren angewendet werden, die QSAR's in Form von Klassifikatoren liefern. Wir haben Klassifizierungsmethoden außerordentlich nützlich gefunden und wenden diese in großem Umfange an.

Die in unserem Laboratorium am häufigsten verwendeten Verfahren sind die lineare nichtelementare Diskriminanzanalyse (Algorithmus nach Ahrens und Läuter), die von Wold entwickelte SIMCA-Methode und die klassischen Zeichenerkennungsverfahren der linearen Lernmaschine (LLM) sowie der k-nächste-Nachbarn-Methode (KNN); Verfahren der Cluster-Analyse sollten in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnt werden.

Um ein Maximum an Information zu erhalten, sind häufig bestimmte Strategien der Klassifizierung und Klassentrennung erforderlich. Solche Strategien müssen berücksichtigen, daß in Problemen mit mehreren Klassen unterschiedliche Eigenschaftskombinationen (oder Variable) notwendig werden können, um unterschiedliche Kombinationen von Klassen zu trennen.

Ein einfaches Beispiel hierfür ist eine diskriminanzanalytische Untersuchung zum Einfluß von substituierten Toluylharnstoffen und -thioharnstoffen auf den Blutzuckerspiegel in Ratten, die wir in Kooperation mit Kollegen des Institutes für Feinorganische Chemie der Armenischen Akademie der Wissenschaften durchführten. Hierbei handelte es sich um ein 3-Klassen-Problem mit den Klassen Blutzucker-erniedrigende (Klasse 1), inaktive (Klasse 2) und Blutzuckererhöhende (Klasse 3) Substanzen. Eine simultane Separierung aller drei Klassen mit dem gleichen Merkmalssatz erwies sich als unmöglich, so daß das 3-Klassen-Problem in zwei 2-Klassen-Probleme zerlegt werden mußte (Klasse 1 gegen Klasse 2 und Klasse 3 gegen Klasse 2). Die resultierenden Diskriminanzfunktionen enthielten unterschiedliche Variable. Dies hat nicht nur Konsequenzen für Vorhersagen und Interpretationen, sondern führte auch zu der Schlußfolge-

to hydrophobicity from chemically and/or sterically different portions of the molecules (cooperation with K. Bocek, IHE, Prague). The resulting model ("extended group contribution concept") gives an excellent fit and can be regarded as of general validity.

Classification Methods

There are many cases where only semiquantitative results are obtained from biological testing leading to a classification of compounds with respect to biological potency. In such cases, classifiation methods are required which yield QSAR's in the form of classificators. We have found classification methods extremely useful and use them extensively. The methods most frequently applied in our laboratory are linear nonelementary discriminent analysis (algorithm according to Ahrens and Läuter), SIMCA as developed by Wold, and the classical pattern recognition techniques of the linear learning machine (LLM) and the k-nearest neighbours (KNN) methods; method of cluster analysis should be mentioned in this context as well.

To obtain a maximum of information certain strategies of classification and class separation are frequently necessary. Such strategies must take into account that, in multi-class problems, different sets of properties (or variables) may be required to separate different sets of classes. A simple example of this is provided by a discriminant analytical investigation of the influence of substituted toluenesulfonyl ureas and thioureas on blood glucose level in rats, an investigation we have performed jointly with colleagues from the Institute of Fine-Organic Chemistry of the Armenian Academy of Sciences. In this example, we had three classes, namely blood sugar decreasing (class 1), inactive (class 2), and blood sugar increasing (class 3) compounds. A simultaneous separation of all three classes by the same optimal set of variables turned out to be impossible so that the three-class problem had to be resolved into two two-class problems, class 1 versus class 2 and class 3 versus class 2, respectively. The two resulting discriminant functions contained different variables, which not only has consequences for predictions and interpretation

rung, daß hyper- und hypoglykämische Wirkung über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden.

Drug Design – ein multidimensionales Problem

Üblicherweise werden Wirkstoffe nicht nur in einem, sondern einer ganzen Batterie von biologischen Tests geprüft. Die resultierenden multiplen biologischen Daten können eine recht komplexe interne Struktur haben und in vielfältiger Weise untereinander verknüpft sein; in vielen Fällen ist es deshalb schwer, sie in ihrer Gesamtheit wirklich zu verstehen. Hierzu ist eine komplexe Datenanalyse notwendig, wobei gewöhnlich eine der beiden folgenden Zielstellungen im Vordergrund steht: i. Ermittlung multivariater QSAR's zur multidimensionalen Optimierung von Wirkstoffstrukturen und ii. Information über Verknüpfung von Tests.

Für kontinuierliche biologische Aktivitätsdaten kann hier das gesamte Spektrum der multivariaten statistischen Verfahren eingesetzt werden. Zwei Methoden, die wir in diesem Zusammenhang als besonders nützlich empfunden haben, sind Faktor- und Hauptkomponentenanalyse. Hauptkomponentenanalyse ist einfach eine mathematische Technik zur Beschreibung und Reproduktion der Variablen einer Datenmatrix mit Hilfe eines neuen Satzes „abstrakter" Variable, der sogenannten Hauptkomponenten; diese haben die Eigenschaft, orthogonal (unkorreliert) zu sein. Die Komponenten werden aus der Korrelationsmatrix der standardisierten Variablen extrahiert. Da (für den richtigen Datentyp) die Zahl der relevanten Komponenten gewöhnlich wesentlich kleiner ist, als die Zahl der Spalten in der ursprünglichen Datenmatrix, wird hierbei die Dimensionalität des Datenraumes erheblich reduziert.

Man kann sagen, daß die statistisch relevanten Komponenten mit grundsätzlichen, für die Datenstruktur verantwortlichen Einflüssen verknüpft sind. Die Bedeutung dieser Einflüsse für die einzelnen Variablen der ursprünglichen Datenmatrix kann mit Hilfe der Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen und den Komponenten beurteilt werden. Um eine physikalische Interpretation zu ermöglichen, können die

but also led to the conclusion that hyper- and hypoglycaemic activity are regulated by different mechanisms.

Drug design – a multidimensional problem

Drugs are usually investigated in not only one but in a battery of biological tests. The multiple biological data obtained may have quite a complex internal structure and be interrelated in various ways so that, in many cases, they are not easy to understand in their entirety. This requires a complex analysis of the data, with one of the following objectives in the foreground: i. derivation of multivariate QSAR's aiming at a multidimensional optimization of drug structures, and ii. to obtain information about the relatedness of tests.

For continuous biological potency data, the whole spectrum of multivariate statistical methods can be used here. Two methods we have found particularly useful in this context are factor and principal component analysis. Basically, principal component analysis is simply a mathematical technique for describing and reproducing variables of a data matrix by means of a new set of "abstract" variables, i. e., the principal components which have the property of being orthogonal (uncorrelated).

The statistically relevant components can be regarded as being related to basic influences responsible for the data structure, and the role these influences play for the individual variables of the original data matrix can be judged from the correlations between the variables and the components. For a physical interpretation, the components can be correlated with molecular parameters by means of regression analysis. A very simple example of this technique is provided by the investigation of 7-substituted-4-hydroxy quinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of three dehydrogenase enzymes in vitro and of the respiration of Ehrlich ascites tumor cells which we performed in cooperation with E. Coats from the University of Cincinnati. Principal component analysis yielded two components the first reflecting enzyme inhibition in vitro, whereas the second is afforded by the ascites system. It thus became evident that the ascites test is completely

Komponenten mit Molekülparametern mittels multipler Regressionsanalyse korreliert werden.

Ein sehr einfaches Beispiel für diese Technik bieten Untersuchungen zur Hemmwirkung von 7-substituierten 3-Hydroxychinolin-3-Carbonsäuren auf drei Dehydrogenasen in vitro sowie auf die Atmung von Ehrlich Ascites-Zellen, die wir gemeinsam mit E. Coats von der Universität Cincinnati durchführten. Hauptkomponentenanalyse lieferte zwei Komponenten, wobei die erste die Enzymhemmung in vitro repräsentiert, während die zweite dem Ascites-System zuzuschreiben ist. Damit wurde deutlich, daß der Ascites-Test von den drei Enzym-Systemen vollständig separiert ist. Für die erste Komponente, die als ein allgemeiner Ausdruck für die Enzymhemmung in vitro angesehen werden kann, ergab sich eine einfache Beziehung mit dem Dipolmoment und dem Weitenparameter B_4.

Dies zeigt, daß die Enzymhemmung mit dem Dipolmoment oder den elektronenschiebenden Eigenschaften sowie der Weite der Substituenten zunimmt. Die entsprechende Beziehung für die zweite Komponente enthielt nur die hydrophobe Substituentenkonstante als Deskriptor, so daß die Atmungshemmung bei Ehrlich Asciteszellen im Gegensatz zur Enzymhemmung von elektronischen und sterischen Substituenteneigenschaften unabhängig ist und ausschließlich von der Hydrophobiztät der Substituenten beeinflußt wird. Insgesamt zeigt dieses einfache Beispiel, in welcher direkten und einfachen Weise mittels Hauptkomponentenanalyse ein klares Bild der gesamten Datenstruktur erhalten werden kann.

Faktorenanalyse hat einiges mit der Hauptkomponentenanalyse gemeinsam, wobei die Variablen der Datenmatrix wieder durch eine Linearkombination neuer, orthogonaler Variable, die in diesem Falle Faktoren heißen, dargestellt werden. Der grundlegende Unterschied besteht darin, daß in der Faktoranalyse nur ein Teil der gesamten Datenvarianz als allen Variablen gemeinsam angesehen wird; dieser Teil wird durch die sogenannten gemeinsamen Faktoren repräsentiert. Der Anteil des k-ten gemeinsamen Faktors an der j-ten Variablen wird durch eine Größe charakterisiert, die den Charakter eines

separate from the three enzyme systems. For the first component which may be regarded as an average expression for the inhibition of all three enzymes a simple relation with the dipole moment and the width-parameter B_4 was obtained indicating that enzyme inhibitory potency increases with dipole moment or electron donating power of the substituents and with increasing substituent width. The corresponding equation obtained for the second component contained only the hydrophobic substituent constant as descriptor so that, in contrast to enzyme inhibition in vitro, inhibition of Ehrlich ascites respiration is not influenced by electronic and steric substituent effects but depends entirely on the hydrophobicity of substituents. As a whole, this simple example shows in what straightforward and simple manner a clear picture of the whole data structure can be obtained by principal component analysis.

No.	Biological test	1st Factor	2nd Factor	3rd Factor
1	Growth inhibition in S. alba seedlings	+		
2	Amylase activity in Triticum aleurone cells		+	
3	Growth inhibition in S. alba hypocotyl	+		
4	Dry weight of seedlings		+	
5	Antihelmintic activity			+
6	Fungistatic activity			+
7	Bacteriostatic activity			
8	Inhibition of ribosomal protein synthesis	+		

34 Faktor-Ladungen (nach Varimax-Rotation) für multiple biologische Daten, die für eine Serie von 27 Piperidinoazetaniliden in acht biologischen Tests ermittelt wurden. Signifikant von Null verschiedene Ladungen werden durch Kreuze angezeigt.

Factor loadings (after Varimax rotation) obtained from multiple biological response data of a series of 27 piperidinoacetanilides investigated in eight biological tests. Significant non-zero loadings are indicated by a cross.

Korrelationskoeffizienten zwischen beiden hat und als Faktorladung bezeichnet wird. Die Faktorladungen liefern essentielle Information über die Datenstruktur (meist nach einer Rotation der Faktoren). Variable mit einer hohen Ladung im gleichen Faktor sind miteinander verknüpft, und dies um so enger, je höher die Ladungen sind. Keine Korrelationen bestehen zwischen solchen Variablen, die von Null verschiedene Ladungen nur in unterschiedlichen Faktoren haben. Abb. 34 (Kooperation mit der Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg) zeigt die Faktorladungen für acht unterschiedliche biologische Wirkungen, die für eine Serie von substituierten Piperidinoazetaniliden gemessen wurden, als Bei spiel.

Daten von Tests, die die biologische Aktivität nur in Form einer Klassifizierung liefern, können mit den obigen Methoden nicht behandelt werden. Aus diesem Grunde haben wir hierfür eine neue Technik entwickelt, die auf Informationstheorie mit Shannon's Entropie als Informationsmaß basiert. Diese Technik liefert vollständige Information über die Gruppierung von Tests in einer Testbatterie, so daß redundante Tests eliminiert und spezifische Tests erkannt werden können. Für die Aufstellung effektiver Screening-Strategien sowie zur Auswahl von Schlüsseltests für QSAR-Untersuchung ist dies von erheblicher Bedeutung, und einige Anwendungen haben gezeigt, daß dieses Vorgehen einen hohen praktischen Wert hat.

Pharmakophore und die Generierung von Leitverbindungen

Die Ereignisse der Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen sind drei-dimensional und dynamisch. Aus diesem Grund sind die Konformation von Wirkstoffen, ihre konformationelle Flexibilität und ihre Fähigkeit, durch bestimmte Arten von Kräften „zu wechselwirken", von außerordentlicher Bedeutung.

Zur Konformationsanalyse nutzen wir sowohl quantenchemische (semiempirische und ab initic) als auch Potentialverfahren (siehe Abbildungen 35 u. 36). Konformationsvergleiche werden in unterschiedlicher Weise vorgenommen: durch Superposition von Molekülen, Testung von Kon-

Factor analysis shares many features with principal component analysis. Again, the variables of a data matrix are presented as linear combinations of new orthogonal variables, called factors in this case. The important difference is that in factor analysis only part of the total data variance is considered to be common to all variables, which is represented by the so-called common factors. The contribution of the k-th common factor to the j-th variable is characterized by a quantity which has the property of a correlation coefficient between the two and which is called factor loading. The factor loadings provide essential information about the data structure (usually after an appropriate rotation of the factors). Variables with a high loading in the same factor are interrelated and will be the more so the higher the loadings are. No correlation exists between variables with non-zero loadings in different factors only. Fig. 34 (cooperation with the Martin-Luther-University, Halle/Wittenberg) shows the factor loadings for eight different biological activties in a series of substituted piperidinoacetanilides, as an example.

Data from tests which yield biological potency only in the form of a classification cannot be treated with the above methods. For this reason we have developed a new technique based on information theory with Shannon's entropy as a measure of information content. This technique yields complete information about the grouping of tests in a test battery so that redundant tests can be eliminated and unique tests recognized which is of considerable importance for deriving effective screening strategies and selecting "key tests" for QSAR work. Some applications have shown this approach to be of high practical value.

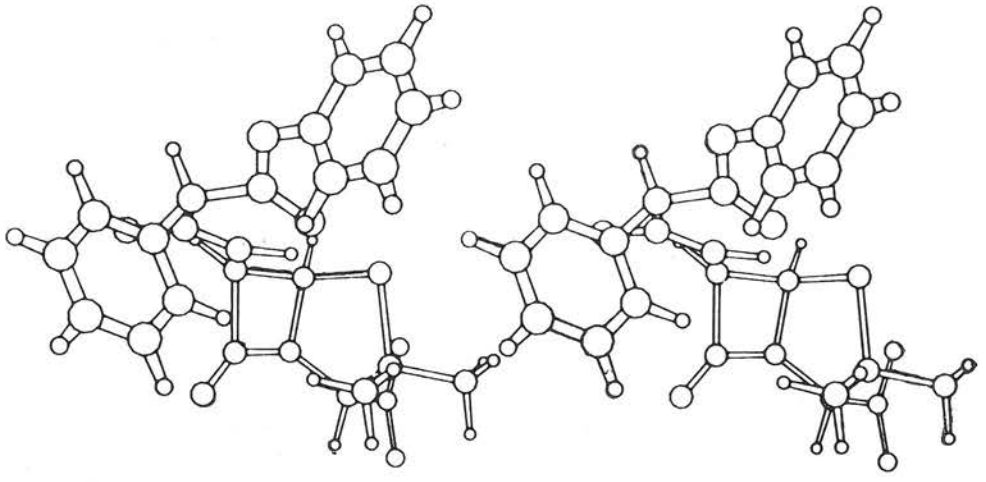
Pharmacophores and lead generation

The events of drug-receptor interactions are three-dimensional and dynamic. For this reason, the conformation of drugs, their conformational flexibility and their ability "to interact" via certain types of forces are of the utmost importance.

For conformational analysis we use quantum mechanical (semiempirical and ab initio) as well

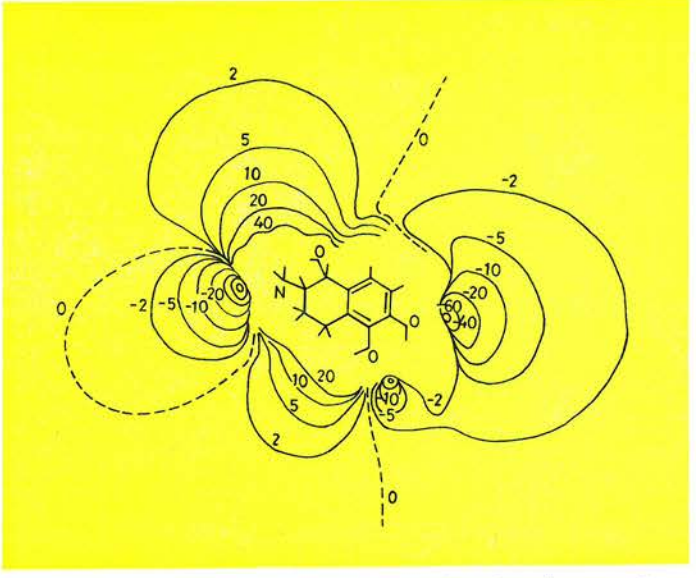
formationshypothesen, etc. Quantenchemische Verfahren werden auch zur Berechnung elektronischer Molekülindices und daraus ableitbarer Größen eingesetzt. Von besonderer Bedeutung ist hier das molekulare elektrostatische Potential, das den Erkennungsschritt zwischen Wirkstoff und Rezeptor determiniert. Eine unserer Hauptaufgaben in den nächsten Jahren ist die Entwicklung neuer Strategien, um den Vergleich dreidimensionaler molekularer Informationen, wie sie für die Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen verantwortlich sind, so komplex und objektiv wie

as classical mechanical (potential functions) methods (see Figures 35 and 36). Comparisons of conformations are performed in various ways: by molecular superimposition, testing certain conformational hypotheses, etc. Quantum mechanical methods are also used to compute electronic indices of molecules and related quantities. Of particular importance is the molecular electrostatic potential which is the essential determinant for the drug-receptor recognition step. One of the main tasks for our work in the coming years will be the development of new strategies to



35 Computer-generiertes Stereobild von CARFECILLIN (ein Penicillin-Derivat). Das räumliche Bild entsteht mit Hilfe einer Stereobrille. Der systematische Vergleich solcher Bilder kann wichtige Informationen über pharmakophore Muster liefern.

Computer-generated stereo-picture of CARFECILLIN (a penicillin derivate). The three-dimensional impression is generated by means of a stereo-viewer. Systematic comparisons of such pictures may yield important information about pharmacophoric patterns.



36 Das molekulare elektrostatische Potential des 5,6-ADTN in der Molekülebene

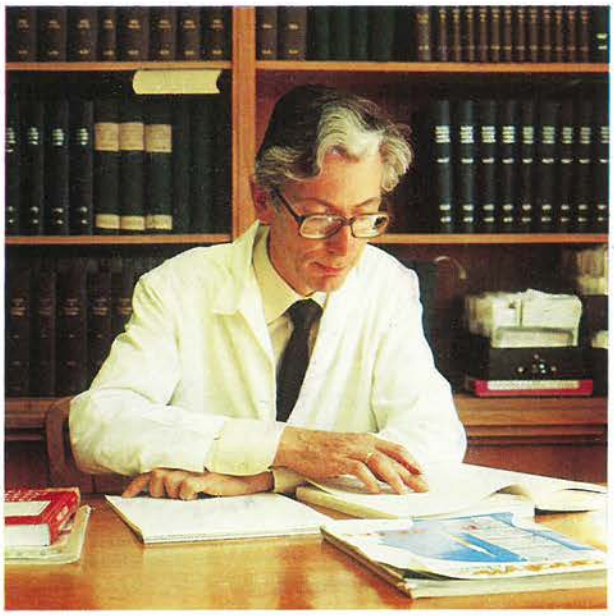
The molecular electrostatic potential of 5,6-ADTN in the plane of the molecule

möglich zu gestalten. Das Endziel hierbei ist die Ermittlung von Pharmakophoren als Grundlage zur Generierung neuer Leitverbindungen. Hier werden offensichtlich Approximationen auf verschiedenen Ebenen der Komplexität notwendig, wobei Resultate aus einer die Eingangshypothese für die nächste bilden können. Die einfachste Approximation besteht darin, Pharmakophore auf der Grundlage der zwei-dimensionalen Struktur von Wirkstoffen als topologische Muster von Atomen oder Gruppen von Atomen zu definieren, die für eine spezifische biologische Wirkung typisch sind. Zur Ermittlung solcher topologischen Pharmakophore wurden kürzlich bei uns zwei neue Verfahren, LOGANA und LOCON, entwickelt, die sich bereits als sehr wertvoll für die Praxis erwiesen haben. Beide Methoden basieren auf einer Beschreibung chemischer Verbindung mittels binärer Deskriptoren, die die An- oder Abwesenheit vorher definierter substruktureller Merkmale charakterisieren. In einem schrittweisen und interaktiven Vorgehen werden mit Hilfe der logischen Operation „und" (Konjunktion) Kombinationen von Variablen gebildet. Die Konjunktionen können direkt in Strukturen rückübersetzt werden, die dann die topologischen Pharmakophore darstellen. Beide Verfahren sind so angelegt, daß der Chemiker optimalen Gebrauch von seinen professionellen Kenntnissen und Erfahrungen machen kann.

make the comparison of the 3-dimensional molecular features responsible for drug-receptor interactions as complex and objective as possible. The ultimate objective is the evaluation of pharmacophores for the design of novel lead compounds. Approximations at different levels of complexity will become necessary here. The results obtained on one level may then be used, for example, as an input hypothesis for the subsequent level. The simplest approximation is to define pharmacophores in terms of the two-dimensional structure of drugs as topological patterns of atoms or groups of atoms typical of a specific biological response. Two new methods, LOGANA and LOCON, were recently, developed in our department for the purpose of generating such topological pharmacophores which have already turned out to be of enormous practical value. Both methods are based on a representation of chemical compounds by means of binary variables describing the presence or absence of pre-defined substructural features. In a stepwise and interactive manner combinations of the variables are now formed using the logical operation "and" (conjunction). The conjunctions can be directly retranslated into structures which represent the topological pharmacophores. Both methods are so designed that the chemist has an optimal chance to make full use of his professional skill and experience.

9 Biopharmazie und Analytik von Wirkstoffen

Biopharmaceutics and Analytics



37 Prof. Dr. B. Mehlis,
Leiter der Abteilung Biopharmazie/Analytik

Head of the Department of Biopharmaceutics/Analytics

Die *Biopharmazie* ist ein international erst Ende der sechziger Jahre entstandener Zweig der pharmazeutischen Forschung.

Diese Forschungsrichtung hat bereits zu beträchtlichen Fortschritten in einigen der vorstehend behandelten Gebieten geführt. Standard-Methoden der Biopharmazie wurden deshalb im IWF aufgebaut und stehen für Entwicklungsaufgaben ständig zur Verfügung. Wenig Erfahrungen lagen jedoch auch international auf dem Gebiet der Peptid-Pharmaka vor. Wir orientierten uns in der Grundlagenforschung auf dieses Problem, für das, wie im Kapitel 7 dargestellt, gute Voraussetzungen gegeben waren. Ausgewählt zur speziellen Bearbeitung wurden zwei Peptidwirkstoffe mit unterschiedlichem Stand der Entwicklung. Substanz P, ein Wirkstoff, bei dem der Schwerpunkt noch auf dem Gebiet der Grundlagenforschung liegt, und Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH), das bereits eine

Biopharmaceutics is a relatively new branch of pharmaceutical research, that came into being in the late sixties. However, it has already achieved remarkable results, which were dealt with in the preceding chapters. At the IDR, standard methods of biopharmaceutics have been developed, which are now permanently available in drug development. There was, however, little experience both in international and national biopharmaceutical research of peptide drugs. So basic research at the IDR is aimed at solving this problem, all the more so since the conditions are given at our institute, as lined out in chapter 7. Two peptide drugs were selected for long-term biopharmaceutical research: substance P, still under basic research, and gonadotropine releasing hormone (GnRH), which is already widely applied, especially in animal reproduction.

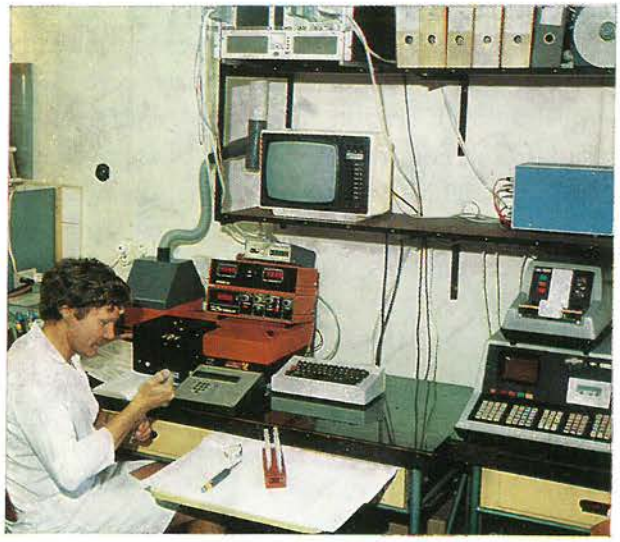
Simultaneously, a laboratory for *analytical chemistry* started to work, which has since developed into the special unit "Analytics" supplying the whole institute with analytical data, and the Dept. of Biopharmaceutics with the specific methods and the measured values of the bioavailability of the drugs under study.

Substance P (SP), owing to its multifarious biological action, is particularly interesting, as already mentioned in chapter 2. A problem still unsolved is its long-term action in combination with a speedy biological response. Though rapid degradation had always been assumed no experimental data had been obtained. We then succeeded in showing experimentally that substance P is indeed eliminated rapidly from the circulation. Fig. 39

This is obviously caused by proteolytic degradation at the peripheral organs. Consequently, the long-term action must be assumed to be due to secondary processes. In this connection the function of SP as a neurotransmitter has been discussed without elucidating the influence of SP-

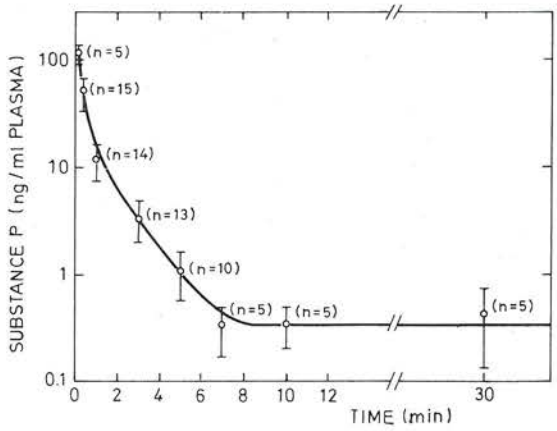
breite Anwendung in der Praxis – insbesondere in der Tierproduktion – gefunden hat.
Parallel dazu nahm ein Labarotorium für *Analytik* seine Arbeit auf. Dieses inzwischen zu einer besonderen Struktureinheit „Analytik" ausgebaute Labor versorgt sowohl das gesamte Institut mit analytischen Daten als auch speziell die Biopharmazie mit den entsprechenden Verfahren und Meßwerten zur Bioverfügbarkeit. *Substanz P* (SP) besitzt, wie bereits im Kapitel 2 ausgeführt, wegen seiner vielfältigen biologischen Wirkungen ein besonderes Interesse. Ein ungeklärtes Problem ist das Auftreten langanhaltender Wirkungen dieses Peptids neben den schnell eintretenden Reaktionen. Obgleich ein rascher Abbau im Organismus vermutet wurde, lagen keine experimentellen Ergebnisse darüber vor. Wir konnten zeigen, daß tatsächlich nach Applikation von SP eine sehr schnelle Elimination aus dem Kreislauf erfolgt. Abb. 39

degradation in the brain on the biological effect of the peptide.
The results of our investigations showed that SP is degraded rapidly by a neutral metalloendopeptidase of brain fractions, which may account for its time-limited action. Therefore every degradation decreasing step is of particular importance in finding the optimum in SP administration. Besides, our investigations provided additional information concerning the absorption of SP onto different materials such as glass, plastics, etc.
Drug association, i. e. the formation of complexes of a higher molecular weight in aqueous solutions, can result in considerable changes in the bioavailability of drugs. The formation of SP associates observed for the first time within the framework of these investigations may be regarded as a model for small peptides. Fig. 40



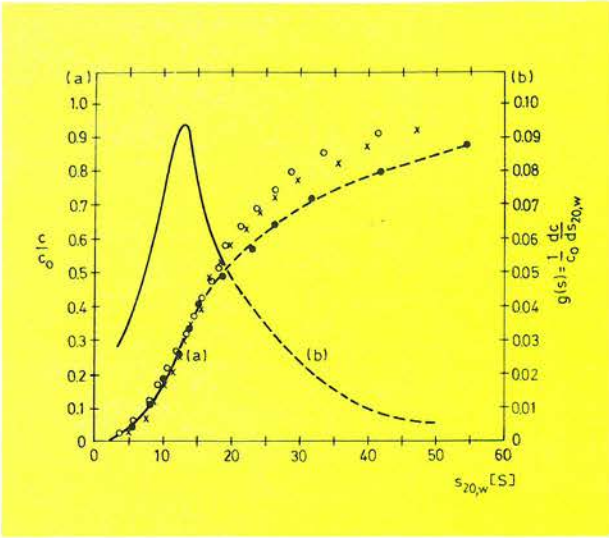
38 Messungen am Spektrofluorimeter mit Rechnerkopplung ergeben wertvolle Informationen über Konzentration und Struktur von Arzneistoffen bei niedrigen Konzentrationen.

Computer assisted spectrofluorimetric measurements give valuable information on the concentration and the structure of drugs at low concentrations.



39 Zeitlicher Verlauf des Plasmaspiegels von immunoreaktiver Substanz P in Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts nach intravenöser Bolus-Injektion von 25 µg Substanz P/100 g Körpermasse in die Schwanzvene

Time course of immunoreactive SP in the plasma of Wistar rats of both sexes after i. v. bolus injection of 25 µg SP per 100 g body mass into the tail vene



40 Integrale Verteilung der Sedimentations-Konstanten des C-terminalen Oktapeptides von Substanz P in Wasser (Kurve a). Die sedimentierten Teilchen sind sehr heterogen. Die höchste Konzentration zeigt die Molekül-Fraktion mit einer Sedimentationskonstante von $s_{20}/_{w}$ = 12 S (vgl. Kurve b: differentielle Verteilung der Sedimentations-Konstanten)

Integral sedimentation-constant distribution of the C-terminal octapeptide of Substance P in water (curve a). The sedimentating particles show considerable heterogeneity. The molecular fraction with a sedimentation-constant of $s_{20}/_{w}$ = 12 S shows the highest concentration (see curve b: differential sedimentation-constant distribution)

Dies ist offensichtlich durch proteolytischen Abbau in den peripheren Organen bedingt. Damit muß die Langzeitwirkung dieses Peptids auf sekundäre Prozesse zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist die Funktion von SP als Neurotransmitter diskutiert worden, wobei die Signifikanz des Abbaus im Gehirn für den biologischen Effekt unklar blieb.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß SP schnell von Hirnfraktionen durch eine neutrale Metalloendopeptidase abgebaut und auf diese Weise möglicherweise seine biologische Wirkung zeitlich begrenzt wird. Daraus ergab sich, daß Maßnahmen, die zur Verminderung des proteolytischen Abbaus führen, von besonderer Bedeutung für eine optimale Applikation im o. g. Sinne sind. Als ein interessantes zusätzliches Ergebnis lieferten diese Untersuchungen einen Überblick über die Adsorption von SP an verschiedenen Materialien, wie Glas, Kunststoffe etc.

Wirkstoff-Assoziation, d. h. die Vereinigung von Wirkstoffmolekülen zu höhermolekularen Komplexen, kann zu beträchtlichen Veränderungen der biologischen Verfügbarkeit führen. Die von uns im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals festgestellte Assoziatbildung von SP kann als ein Modellfall für diesen Prozeß bei kleinen Peptiden betrachtet werden. Abb. 40

Umfassende physikalisch-chemische Untersuchungen ergaben neue Erkenntnisse über Konformation und Größenverteilung solcher Komplexe. Besonders wichtig für das biopharmazeutische Verhalten ist unser Ergebnis, daß kleine Partikel

Extensive physicochemical investigations have revealed new knowledge concerning the conformation and size distribution of the complexes. One of our results is of major significance to the biopharmaceutical behaviour of the substance, it being that only small particles (~50 nm) are able to dissociate into monomers, whereas the macroscopic particles of associates can be described as quasi irreversible products reducing the bioavailability of SP. These results are of practical importance for preparing pharmaceutical dosage forms of SP. In order to obtain stable solutions of SP-peptides the conditions must be such as to avoid the formation of associates. These conditions were obtained by adjusting the peptide concentration, the pH-value, and the salt concentration.

Biopharmaceutical investigations of the peptide hormone GnRH were carried out under two aspects:

1. In which way can soluble polymers prolong the release of the peptide from solutions administered parenterally?
2. How is the hormone metabolized?

There has been no systematic investigation of 1. so far, and so the IDR took up research into this problem, both in vitro and in vivo.

Polymers of different properties and structure ranging from modified celluloses to vinyl polymers have been included in these studies. The measuring methods applied were equilibrium dialysis, "flow-through" and free diffusion, using tritium labelled hormone. For the first time we

(~ 50 nm) leicht wieder in die Monomeren zurückgeführt werden können, während makroskopische Assoziatpartikel quasi irreversible Produkte mit entsprechender Verminderung der Bioverfügbarkeit ergeben. Von praktischer Bedeutung sind diese Ergebnisse für die Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen. Zur Gewinnung stabiler Lösungen von SP-Peptiden müssen solche Bedingungen eingehalten werden, die Assoziatbildung vermeiden. Diese wurden von uns durch die Ermittlung günstiger Lösungsbedingungen (Peptidkonzentration, pH-Wert, Salzkonzentration) realisiert.

Biopharmazeutische Untersuchungen mit dem *Peptidhormon GnRH* wurden zu zwei Fragestellungen unternommen:

1. Wie beeinflussen (verlängern) lösliche Polymere die Freisetzung des Peptids aus parenteral applizierten Lösungen?
2. Welchen metabolischen Prozessen unterliegt das Hormon?,

Das erste Problem ist international bisher noch nicht systematisch untersucht worden. Im IWF wurden deshalb sowohl in vitro als auch in vivo Studien zu diesem Problem durchgeführt.

Einbezogen wurden Polymere unterschiedlicher Eigenschaften und Struktur von modifizierten Zellulosen bis zu Vinylpolymeren. Als Meßmethoden wurden die Gleichgewichtsdialyse, die Durchfluß-Diffusionskammer und die freie Diffusion mit Tritium-markiertem Hormon angewandt. In diesen Versuchen ermittelten wir erstmals experimentelle Daten für die verlängerte Freisetzung eines Peptidmoleküls aus viskosen Makromoleküllösungen. In diesen Lösungen gilt der klassische reziproke Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient und Viskosität ($D \sim 1/\eta$) nicht, und es treten erhebliche Unterschiede im Diffusionsverhalten des Peptidhormons in den verschiedenen Polymerlösungen auf. Die praktische Bedeutung dieser Resultate besteht darin, daß Voraussagen für die Eignung bestimmter Polymere in o. g parenteralen Applikationsformen getroffen werden können (Abb. 41.)

GnRH gehört zu den Peptidhormonen, für die es keine einfache Beziehung zwischen Plasmaspiegel und biologischer Wirkung gibt. Wir verwenden daher Polymer-GnRH-Formulierungen, um Unterschiede im zeitlichen Verlauf des GnRH-

obtained experimental data for the prolongation of peptide release from viscous polymer solutions. The classical reciprocal relationship between diffusion coefficient D and viscosity η, ($D \sim 1/\eta$), does not apply to the afore-mentioned solutions, a fact accounting for the noticeable differences in the diffusion of the peptide hormone in different polymer solutions. This means for practical purposes that predictions can be made as regards the suitability of certain polymers for the above mentioned dosage forms (Fig. 41).

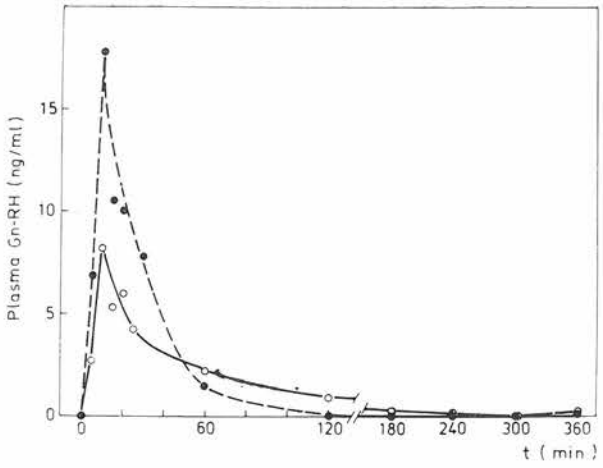
GnRH is one of the peptides that do not show a simple relation between plasma level and biological action. We therefore use polymer GnRH formulations to obtain different temporal profiles of the GnRH plasma levels and correlate them with the primary biological response to GnRH (FSH, LH).

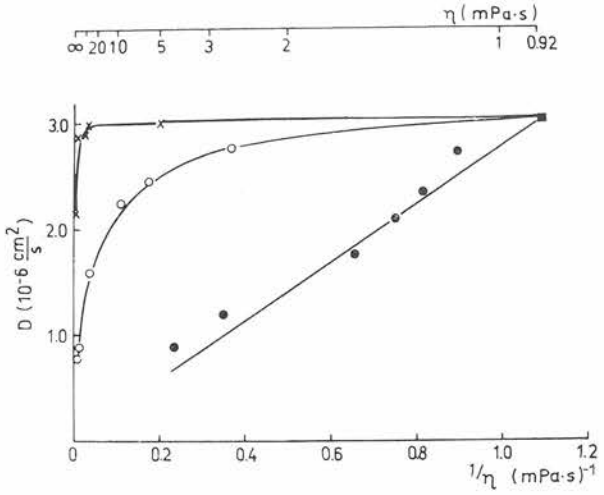
The rapid metabolic inactivation of the hormone is one of the reasons why it is necessary to develop dosage forms with prolonged action. Therefore, part of our basic research deals with the proteolytic degradation of GnRH and its biologically more active analogs. Under investigation is the degradation of GnRH by peripheral organs as well as target organs of GnRH, since both processes are assumed to be causally related to the extent and the prolongation of the biological activities exhibited by the superactive analogs. Superactive agonists were found to be degraded by subcellular fractions of the kidney and other organs of rats at a lower rate than the native GnRH sequence. They are nevertheless degradable and consequently eliminated at a relatively high rate, too, after administration.

The results summarized in Fig. 42 were obtained with tritium labelled analogs prepared at our institute, and with a radiochemical assay that we specially designed for this purpose.

Analogous experiments with perfused rat kidneys have confirmed the results.

The ovary has recently been recognized to be a target organ for the inhibitory action of LHRH in rats. We therefore used the rat ovary as a model for studying the proteolytic degradation of GnRH by a target organ, and it was found to contain two systems differing basically in their ways of GnRH degradation, the one being in the





41 Einfluß der Viskosität η auf die Freisetzung von GnRH:

a Vergleich der in-vivo-Freisetzung von GnRH aus Polymer-Lösung und polymerfreier Lösung. Plasmaspiegel von GnRH in männlichen Ratten nach i. m. Injektion von (o) 10 µg GnRH/10% Dextran T-500 (η = 27 mPa · s) und (●) 10 µg GnRH ohne Dextran (η = 0.92 mPa · s). Dextran als pharmazeutischer Hilfsstoff in der Injektionslösung verlängert den Plasmaspiegel von GnRH.

b Vergleich des Einflusses der Viskosität auf den Selbstdiffusions-Koeffizienten D von GnRH in Polymerlösungen und in niedermolekularen Saccharose-Lösungen.

(×) – Lösung von Methylzellulose MH 4000,
(○) – Lösung von Dextran T-500,
(●) – Saccharose-Lösung,
(■) – Pufierlösung.

Influence of viscosity η on GnRH release:

a In-vivo release of GnRH from polymer and polymer-free solutions. Plasma level of GnRH in male rats after i. m. injection of (o) 10 µg GnRH/10% dextran T-500 (η 27 mPa · s) and (●) 10 µg GnRH without dextran (η = 0.92 mPa · s). Dextran as a pharmaceutical additive in the injection solution prolongs the plasma level of GnRH.

b Influence of viscosity on self-diffusion coefficient D of GnRH in polymer solutions and in low-molecular-weight sucrose solutions.

(×) – solution of methylcellulose MH 4000,
(○) – solution of dextran T-500,
(●) – sucrose solution,
(■) – buffer solution.

Während die Diffusion von GnRH in Saccharose-Lösung der Beziehung $D \sim 1/\eta$ genügt, zeigt die Diffusion von GnRH in der Polymer-Lösung große Abweichungen von dieser Beziehung. Eine 10%ige Dextran-Lösung (η = 27 mPa · s) vermindert D von GnRH um 45%. Eine Methylzellulose-Lösung gleicher Viskosität beeinflußt den Selbstdiffusions-Koeffizienten D jedoch nicht.

In sucrose solution the diffusion of GnRH complies with the relation $D \sim 1/\eta$ but in polymer solutions it deviates from this relation considerably. A 10% dextran solution (η = 27 mPa · s) decreases D of GnRH by 45%. A methylcellulose solution of identical viscosity does not influence the self-diffusion coefficient.

Plasmaspiegels einzustellen und mit der unmittelbaren biologischen Wirkung (LH, FSH) zu korrelieren. Die Notwendigkeit, GnRH-Applikationsformen mit verlängerter Wirkung zu entwickeln, ergibt sich aus der schnellen metabolischen Inaktivierung des Hormons. Ein Teil unserer Forschung beschäftigt sich daher mit den Prozessen des proteolytischen Abbaus von GnRH

soluble cellfraction, and the other being associated to the membrane fraction.

Efficient *analytics* is an essential precondition of efficient drug research. Being interdisciplinary in nature it is at the same time an independent discipline, which was taken into account by setting up a special unit of Analytics at the IDR, the tasks of which are:

und seinen biologisch aktiveren Analoga. Untersucht wird der Abbau durch periphere Organe und Targetorgane des GnRH, da davon ausgegangen wird, daß beide Prozesse für das Ausmaß der biologischen Wirkung und ihrer Verlängerung im Falle der superaktiven Agonisten von Bedeutung sind. Superaktive Analoga werden von subzellulären Fraktionen der Niere und anderer Organe der Ratte mit geringerer Geschwindigkeit abgebaut als die native GnRH-Sequenz, erweisen sich aber durchaus nicht als abbaustabil Abb. 42, so daß auch für sie eine relativ schnelle Eliminierung nach Applikation erfolgt. Diese Ergebnisse, die mit in unserem Institut ^{3}H-markierten Analoga und einem dafür ausgearbeiteten radiochemischen Assay gewonnen wurden, wurden durch entsprechende Experimente mit der perfundierten Niere untermauert.

Am Rattenovar, das für exogenes GnRH erst kürzlich als ein Targetorgan für dessen inhibitorische Wirkung identifiziert wurde, wurden zwei prinzipiell unterschiedlich abbauende Systeme gefunden, von denen das eine an die lösliche Zell-Fraktion und das andere an die Membranfraktion gebunden ist.

Eine qualifizierte *Analytik* ist eine entscheidende Voraussetzung für eine effektive Arzneimittelforschung. Sie besitzt in besonderem Maße interaktiven Charakter und muß andererseits eine unabhängige Position aufweisen. Diesen Forderungen wurde im IWF mit der Einrichtung einer besonderen Struktureinheit „Analytik" Rechnung

42 Geschwindigkeit des proteolytischen Abbaus von [(^{3}H)His^2, D-Ser(Bu^t)^6,desGly^{10}]- und von [(^{3}H)His^2, D-Phe^6,desGly^{10}]-LHRH-Äthylamid durch Rattengewebe-Homogenate, bezogen auf die entsprechende Abbaugeschwindigkeit von [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH.

a — Halbwertszeiten von [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH bei Inkubation mit den Gewebe-Homogenaten (1 mg Gewebe [Naßgewicht] pro ml Inkubations-Lösung),

b — Die %-Werte beziehen sich auf die jeweilige Abbaugeschwindigkeit von [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH und stellen Mittelwerte von Messungen an jeweils vier Präparaten dar.

Velocities of the proteolytic breakdown of [(^{3}H)His^2, D-Ser(Bu^t)^6,desGly^{10}]- and [(^{3}H)His^2,D-Phe^6,desGly^{10}]-LHRH-ethylamide by rat tissue homogenates related to that of [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH.

a — Half-lives of [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH in incubations with the tissue homogenates (calculated for 1 mg tissue wet weight per ml incubation)

b — Data are expressed as the percentage of the velocity of the breakdown of [(^{3}H)pGlu^1]-LHRH and represent mean ± S. E. of four preparations.

Rat tissue	t_{50} for LHRH[a] (min)	Degradation velocity (%)[b]		[D-Phe^6,desGly^{10}]-LHRH-ethylamide
		LHRH	[D-Ser(Bu^t)^6,desGly^{10}]-LHRH-ethylamide	
Liver	83	100	25.3 ± 1.9	21.0 ± 1.0
Kidney	81	100	49.2 ± 6.2	35.0 ± 6.4
Lung	167	100	20.5 ± 2.4	28.5 ± 3.0
Ovary	39	100	17.3 ± 1.3	21.9 ± 2.7
Hypothalamus	147	100	10.0 ± 1.5	9.2 ± 1.8
Anterior pituitary	75	100	9.9 ± 0.8	12.9 ± 0.8
50% plasma	4 h	100	<10	<15

getragen. Folgende Aufgaben werden von der „Analytik" übernommen:

- Sicherung der analytischen Anforderungen in der Arzneimittelsynthese
- Schaffung von analytischen Voraussetzungen für die Anfertigung von pharmazeutischen und klinischen Gutachten
- Qualitätskontrolle von IWF-Präparaten
- Lösung von speziellen analytischen Problemen, die im Prozeß der Arzneimittelforschung auftreten.

43 Spektroskopische Methoden (z. B. UV/VIS-Messungen) gehören zu den unentbehrlichen Techniken der Wirkstofforschung.

Spectroscopic methods (e. g. u.v./vis.-measurements) are indispensible in drug research

In der *„Analytik"* sind die für die Wirkstofforschung unentbehrlichen Techniken der Radioaktivitätsmessung und der Spektroskopie zusammengefaßt, ebenso wie die chromatographischen Methoden. Von besonderer Wirksamkeit erwies sich der Ausbau der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie, die in Kombination mit der Fluoreszenzmeßtechnik weiterentwickelt wurde. Diese Methoden werden ergänzt durch Rechentechnik, wobei durch die Abteilung Forschungstechnologie des IWF sowohl der Einsatz von Mikrorechnersystemen als auch ein Anschluß an serielle Terminals des Institutsrechners erfolgte. Hier wird auch die eigene Entwicklung spezieller Geräte für die Analysenmeßtechnik entsprechend den aktuellen Problemstellungen gesichert.

- supporting drug synthesis processes
- providing the analytical preconditions for pharmaceutical and clinical opinions
- quality control of IDR preparations
- solving special analytical problems occurring in the process of drug research.

Techniques indispensable in drug research such as measurements of radioactivity, spectroscopy and chromatography are comprised in the Department of *Analytics*. The extensive development of high-performance liquid chromatography in combination with fluorescence-measuring techniques turned out to be very effective. All these methods are computer-aided. The IDR Department of Technology and Research has installed microcomputer systems which are connected to serial terminals of the main computer at the institute.

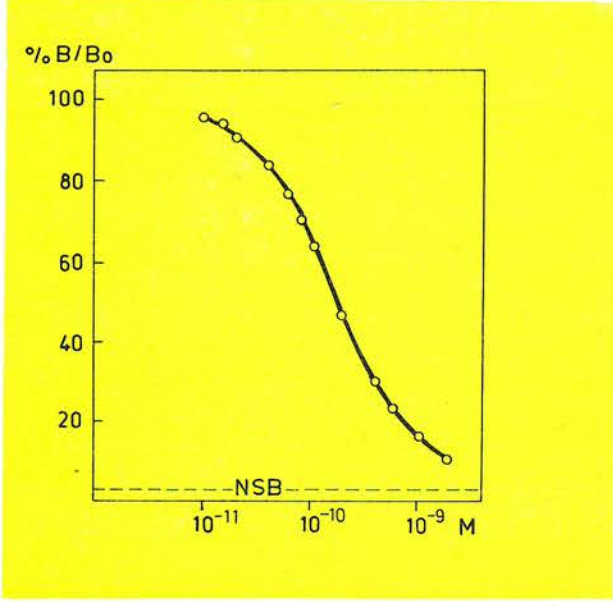
Close cooperation with this IDR department facilitates the development of special devices required in analytical measuring techniques according to the specific tasks we are faced with.

44 Von besonderer Bedeutung für die Arzneimittel-Analytik ist die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

High-performance liquid chromatography (HPLC) is most important in the analysis of drugs.

Innerhalb der Analytik nimmt die Radioimmunoassay-Technik einen besonderen Platz ein. Biopharmazeutische und pharmakokinetische Untersuchungen von hochwirksamen Wirkstoffen – insbesondere von Peptiden – erfordern den Einsatz der entsprechenden Radioimmunoassays. Falls der RIA mit den geforderten Eigenschaften nicht zur Verfügung steht (kommerziell nicht erhältlich, Spezifität oder Empfindlichkeit unzureichend), entwickelt unser RIA-Labor in Kooperation mit dem Zentralinstitut für Isotopen- und Strahlenforschung der AdW der DDR (Bereich Nuklearpharmaka und Strahlenquellen) den geforderten Assay. Besondere Erfahrungen bei der RIA-Entwicklung liegen für Substanz P, Angiotensin I, ß-Casomorphin und GnRH vor.

Werden für den Aufbau eines RIA spezielle natürliche Peptide oder Proteine in hoher Reinheit benötigt, so können diese von unserem Labor für Peptid- und Proteinanalyse isoliert werden. Dieses Vorgehen hat sich u. a. für das Luteinisierende Hormon (LH) von verschiedenen Tierspezies bewährt.



46 RIA-Standardkurve für Substanz P.
Antikörper: Antisubstanz P, M 27;
Tracer: 125 J-p-HP-Arg[1]-Substanz P.

RIA standard curve for substance P.
Antibody: anti-substance P, M 27;
tracer: 125 J-p-HP-Arg[1]-substance P.

Radioimmunoassay technique (RIA) ranks high among the methods practiced in the Dept. of Analytics. Biopharmaceutical and pharmacokinetic studies of highly active compounds – i. e. mainly peptides – require a particular RIA in each case.

In case there is no RIA with the desired properties (commercially not available, specificity or sensitivity insufficient), our RIA-laboratory develops the RIA requested, in cooperation with the Central Institute for Isotope and Radiation Research (Dept. of Radiopharmaceuticals and Radiation Sources)/Academy of Sc. We are especially experienced in RIA techniques for substance P, angiotensin I, ß-casomorphine, and GnRH.

45 Die Radioimmunassay-Technik nimmt wegen ihrer hohen Empfindlichkeit einen besonderen Platz in der Arzneimittel-Analytik ein. Die automatische Messung der γ-Strahlung bildet die instrumentelle Basis.

Because of its extreme sensitivity, RIA techniques rank high in the field of drug analysis. Automatic γ-counting is the instrumental basis.

If special natural peptides or proteins of high purity are requested for RIA developments we are able to isolate them from their natural sources in our laboratory for peptide and protein analysis. This approach has proved to be a success, among others, for the luteinizing hormone (LH) of various animal species. Thus the Dept.

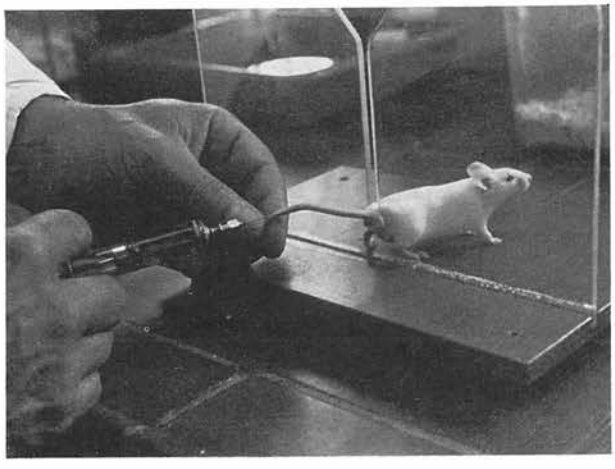
Die Analytik des IWF ist damit in der Lage, als Partner der verschiedenen Forschungslabors des IWF analytische Methoden und Forschungstechnologie zur Lösung ihrer Probleme zur Verfügung zu stellen.

of Analytics is in the position of rendering help in problem solving to the various research laboratories of the institute and providing the research teams with analytical methods and research techniques for their specific tasks.

10 Forschungstierhaltung

Animal Laboratory

Das Experimentieren mit Versuchstieren ist ein wichtiges und unverzichtbares wissenschaftliches Werkzeug für die Grundlagenforschung, das Studium prospektiver neuer Arzneimittel, neuer Therapieverfahren oder verbesserter Applikationsformen.
Wir stimmen mit den Zielen des Tierschutzes und mit der Deklaration des Internationalen Komitees für Versuchstierkunde zur Notwendigkeit der Tierexperimente überein und treten für minimierte Tierzahlen im Experiment, optimierte Haltungsbedingungen und die Einführung einer Genehmigungspflicht für Versuche an lebenden Tieren ein.
Für alle Aufgaben und Probleme, die sich aus Versuchstierzucht, -unterbringung, Management und teilweise auch die Experimente im Akademie-Industriekomplex Arzneimittelforschung in Berlin-Friedrichsfelde ergeben, ist die Forschungstierhaltung verantwortlich, die Mitarbeiter beider Institute vereinigt.



48 Die vorklinische Prüfung eines neuen Arzneimittels erfordert Tierexperimente: Intravenöse Applikation in die Schwanzvene einer Maus

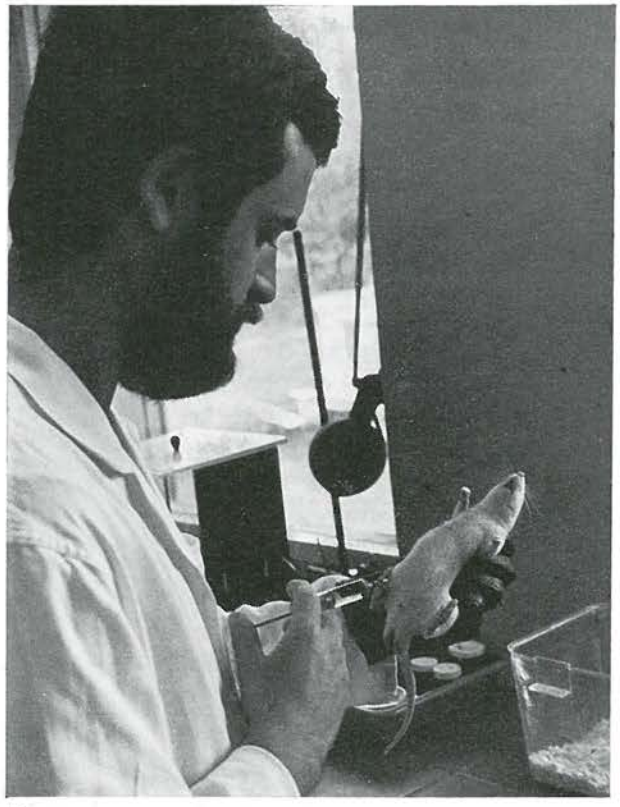
The non-clinical study of a new drug requires animal experiments: intravenous application into the tail vein of a mouse

47 Die Haltung von Versuchsratten im IWF: Raum (> 36 m³) mit 1000 Tieren

Husbandry of laboratory rats in the IDR: room (> 36 m³) with 1000 animals

Experimentation with laboratory animals is an important and indispensable scientific means in basic research, in studying new drugs, new therapeutic methods or improved application forms.
We agree with the aims of animal protection and with the declaration of the International Committee for Laboratory Animal Science "Need for animal experimentation", and we endeavour to keep the number of animals in experiments to a minimum and provide optimal housing conditions for the animals, and we fully support the introduction of a live animal experimentation permit.
The Animal Laboratory is responsible for all tasks and problems concerning laboratory animal breeding, housing, management, and partly for experimentation in the Academy-Industry-Complex of Drug Research in Berlin-Friedrichsfelde. The co-workers in this group come from both institutes.
There is an annual demand for about 50 000 rats, 42 000 mice, 5000 guinea pigs, 600 rabbits and 15 minipigs at both institutes.
The housing capacity for small animals is about 3500 rats, 5000 mice, 600 guinea pigs and 100

Die experimentell arbeitenden Gruppen beider Institute benötigen jährlich etwa 50 000 Ratten, 42 000 Mäuse, 5000 Meerschweinchen, 600 Kaninchen und 15 Minischweine. Die Haltungskapazität für kleine Versuchstiere beträgt ungefähr 3500 Ratten, 5000 Mäuse, 600 Meerschweinchen und 100 Kaninchen. Die Tiere werden unter konventionellen Bedingungen gehalten;



49 Intraperitoneale Applikation einer Arzneimittel-Lösung bei einer Ratte. Später wird der Arzneimittelspiegel in Blut und Urin ermittelt

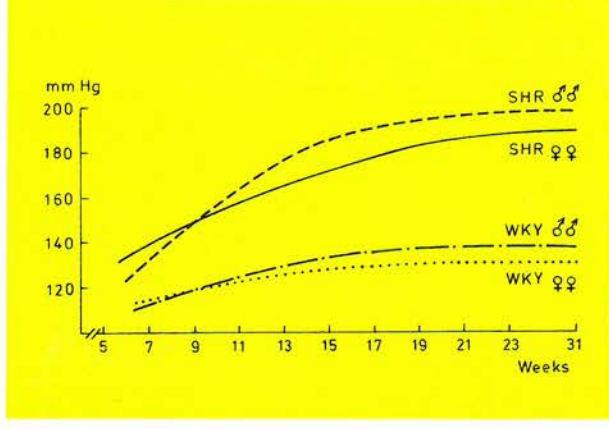
Intraperitoneal injection of a drug solution into a rat. Later on the drug level in the blood plasma and urine is measured

eine Klimatisierung ist nicht gegeben. Die Tierräume (3 × 5 m) haben einen Hell/Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden (Licht von 6.00 bis 18.00 Uhr). Zwei spezielle Rattenstämme züchten wir jedoch unter spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Bedingungen: SHR/Frid und WKY/Frid. Der SHR (spontan hypertensive Ratten-)-Stamm ist das bestgeeignete Modell für die menschliche Bluthochdruckkrankheit. Dieser Stamm wurde von OKAMOTO (1966) entdeckt und herausselektiert und wird seit 1979 bei uns gezüchtet (Inzucht Bruder × Schwesteranpaarung, F 46 + 10).

rabbits. The animals are kept under conventional conditions, without air conditioning. The animal rooms (3 × 5 m) have a dark/light rhythm of 12/12 hours (light from 6.00 a. m. to 6.00 p. m.). But we breed two special rat strains under specified pathogenfree (SPF) conditions: SHR/Frid and WKY/Frid. The SHR (= *s*pontaneous *h*ypertensive *r*at) strain is the best known model for human hypertension. The strain was discovered and selected by OKAMOTO (1966) and has been bred in our laboratory since 1979 (inbred, brother × sister mating, F 46 + 10).

The SHR/Frid model is used for basic research in hypertension and drug development. As an adequate control the normotensive inbred strain WKY (Wistar Kyoto) is needed and has been bred in our laboratory since 1979 (F 22 + 10).

Our breeding unit is specified free from the following pathogens: endo-, ectoparasites, Toxoplasma gondii, Salmonella sp., Bordetella bronchiseptica, leptospires, Coryne bacterium kutscheri, Pasteurella sp., Mycoplasma pulmonis, mycobacterial diseases, Sendai-, LCM-, TOOLAN-H1 virus, PVM, MHV. All the animals of the SHR strain develop genetically determined hypertension at the age of 10 to 15 weeks.



50 Modell für die Bluthochdruckkrankheit des Menschen: SHR-Ratteninzuchtstamm. Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen systolischem Blutdruck und Alter bei dem hypertensiven SHR/Frid- und dem normotensiven WKY/Frid-Rattenstamm

Model for human essential hypertension:
SHR rat inbred strain. The figure shows the correlation between systolic blood pressure and age in the hypertensive SHR/Frid and normotensive WKY/Frid rat strain

Das SHR/Frid-Modell wird für Hypertonie-Grundlagenforschung und Arzneimittelsuche eingesetzt. Als adäquate Kontrolle wird der normotensive Inzuchtstamm WKY (Wistar Kyoto) benötigt und ebenfalls seit 1979 bei uns gezüchtet (F 22 + 10). Unsere Zuchteinheit ist spezifiziert frei von folgenden Pathogenen: Ekto- und Endoparasiten, Toxoplasma gondii, Salmonellen, Leptospiren, Corynebacterium kutscheri, Pasteurellen, Bordetella bronchiseptica, Mycoplasma pulmonis, Mykobakteriosen, Sendai-, LCM-, TOOLAN-H1-Virus sowie PVM und MHV. Alle Tiere des SHR-Stammes entwickeln im Alter von 10–15 Wochen eine genetisch bedingte Hypertonie.

Zur Verbesserung der Bedingungen für Tierhaltung und experimentell-wissenschaftliche Arbeiten ist ein neues Versuchstierhaus geplant.

Mit anderen Gruppen des Instituts zusammen arbeitet die Forschungstierhaltung wissenschaftlich auf dem Gebiet der Arzneiapplikation, speziell der Suche nach unkonventionellen Applikationstechniken und neuen Zubereitungen für Peptidarzneimittel, die im Institut entwickelt werden. Für Peptidarzneimittel ist die orale Applikation unzweckmäßig, da diese Arzneistoffe im Magen und Dünndarm schnell zerstört werden, ohne die gewünschte Wirkung im Organismus. Die rektale, sublinguale und nasale Applikation sind alternative Möglichkeiten, die erwähnten Probleme zu überwinden. Gemeinsam mit der Abt. Biopharmazie und Analytik im Institut testen wir gegenwärtig die intranasale Applikation von Peptiden in einem Rattenmodell.

In Zukunft wird die intranasale Applikation Bedeutung für die Insulin- und Peptidhormon-Verabreichung erlangen; sie scheint eine einfache, gut anwendbare und wenig gefährliche Methode zu sein (Sprays, Hydrogele u. a.). Die Experimente mit Versuchstieren sind Voraussetzung für die Einführung derartiger Arzneimittel in die Therapie bei Erkrankungen des Menschen.

In order to improve the conditions for animal husbandry at our institute a new laboratory animal house is being planned.

Together with other IDR groups the animal laboratory works in the field of drug application. They are in search of unconventional application techniques and new formulae of peptide drugs which are under development at the institute. For peptide drugs oral application is unfavourable because these drugs are digested in the stomach and the small intestine within a short period of time without the desired effect in the organism. Rectal, sublingual and nasal application are alternative forms by which the problems mentioned can be overcome. In cooperation with the IDR Dept. of Biopharmaceutics and Analytics we test intranasal application of peptides in a rat model.

In future, intranasal application will be important for insulin and peptide hormone application. It seems to be a simple method, easy to apply and of low risk (sprays, hydrogels, etc.).

Experiments with laboratory animals are the precondition for the introduction of this kind of drug into the therapy of human diseases.

11 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Zellkulturen

Evaluation of Cytotoxicity by Means of Cell Cultures

Die toxikologischen Prüfungen der im IWF entwickelten und bearbeiteten Substanzen werden im wesentlichen von unserem Partner-Institut der Pharmazeutischen Industrie, dem Institut für Pharmakologische Forschung, sowie dem Pharmazeutischen Kombinat GERMED durchgeführt. Die bei einer vorklinischen Prüfung neuentwickelter potentieller Arzneimittel notwendigen Tierversuche zur Bestimmung der akuten Toxizität sind aufwendig und im internationalen Maßstab zunehmender Kritik ausgesetzt. Hauptargumente von Gegnern von Toxizitätsprüfungen am Versuchstier werden aus fachlichen und ethischen Gründen vorgebracht. Verständlich sind daher weltweite Bemühungen der verschiedensten Institutionen, Tierversuche durch sogenannte Alternativmethoden zu ersetzen. Doch nach unseren heutigen Kenntnissen sind zur Charakterisierung der Toxizität einer Verbindung Tierversuche wohl kaum durch andere Methoden völlig zu ersetzen. Daher kann es sich nur um die Suche nach ergänzenden Methoden zur Bestimmung einer Toxizität potentieller Arzneimittel handeln, wenn es darum geht, Tierversuche von ihrem Umfange her beträchtlich zu reduzieren.

The toxicological tests of the substances developed and processed at the IDR are mainly carried out at the Institute of Pharmacological Research and the Pharmaceutical Combine GERMED.

Prior to clinical application, newly developed potential drugs must be tested through animal experiments in order to assess their toxicity, especially in case of the lethal dosis (LD_{50}). These experiments are, however, very expensive, and moreover, the LD_{50} data are subject to increasing international criticism, both professional and ethical objections being raised. Therefore it is understandable that worldwide efforts are made to find alternatives to animal experiments. But we know that for the present none of these alternatives can completely replace animal tests.

Nevertheless the search for complementary methods to assess the basal toxicity of a drug may help reduce animal experiments and/or the number of animals involved in a test. The most important complementary method for determining toxicity is to substitute living organisms by cell cultures. Of particular importance in this context is determining cytotoxicity by cell cultures, for

51 Quantitative Bestimmung der Zellzahl isolierter Endothelzellen (BKEz-7) mit einem elektronischen Teilchenzählgerät in Verbindung mit dem Mikroprozessor HZM-81 zur Berechnung und Charakterisierung biostatistischer Parameter

Determination of the number of isolated endothelial cells (BKEz-7) by an electronic particle counter in combination with the microprocessor HZM-81 for computing biostatistic parameters

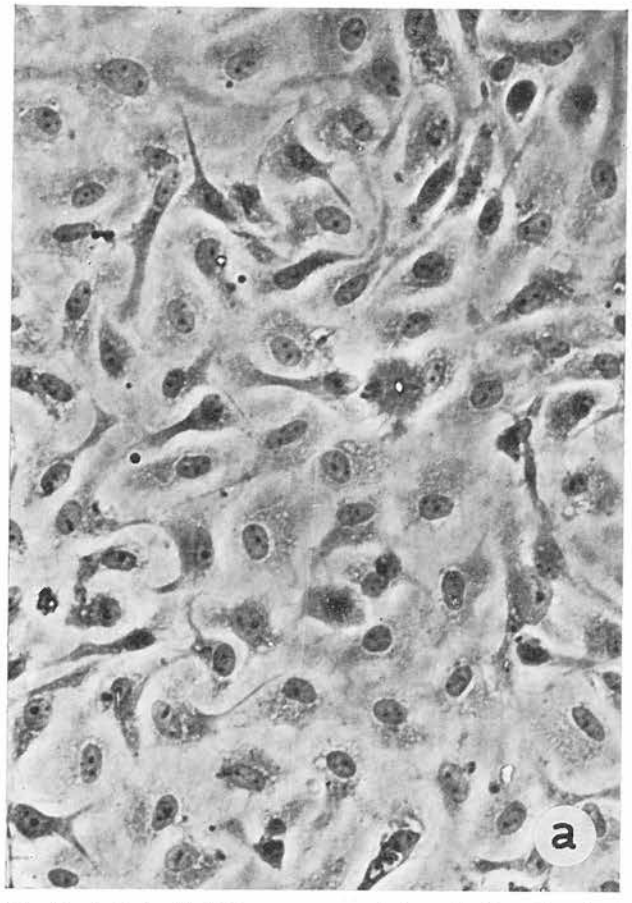
An erster Stelle solcher ergänzenden Methoden steht der Einsatz von Zell-, Gewebe- und Organkulturen zur Toxizitätsbestimmung. Dabei spielt die Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe von Zellkulturen eine besondere Rolle. Im Institut für Wirkstofforschung stehen für solche Untersuchungen etablierte und in bezug auf wichtige strukturelle und funktionelle Merkmale gut charakterisierte Endothelzellinien aus Kälberaorta (Linie BKEz-7) und Schweineaorta (Linie BSEz-3) zur Verfügung. Gefäßendothelzellen sind aus zwei wichtigen Gründen besonders geeignet:

- Im Organismus gehören sie mit zu den Zelltypen, die mit einem applizierten Wirkstoff zuerst in Kontakt kommen.
- In der Zellkultur zeichnen sie sich bei unveränderter Proliferationsaktivität durch einen gewebsspezifischen Marker (Faktor-VIII-Antigen) aus.

which IDR-established endothelial cell lines prepared from calf aorta (cell line BKEz-7) and porcine aorta (cell line BSEz-3) are available. There are two reasons why vascular endothelial cells are particularly suitable:

- In the organism, they belong to those cell types that first come into contact with an applied drug.
- In the cell culture, while showing unchanged proliferation activity, they are functionally characterized by a tissue-specific marker (factor VIII-antigen).

In a general, that is to say nonspecific cytotoxicity test, non-organ-specific cell activities of in-vitro cultured cells, such as cell proliferation, spreading of cells on the surface of the support, are inhibited to various degrees by toxic concentrations of different kinds of drugs (Fig. 52). Consequently, these tests can serve to determine the IC_{50}, i. e. the inhibition concentration of a



52 Endothelzellschicht a vor und b nach Intoxikation durch einen Wirkstoff: Verringerte Zellzahl infolge Ablösung der Zellen von der Unterlage, Kern- und Zytoplasma- Schädigungen bei den morphologisch veränderten Zellen

Endothelial monolayer a before and b after intoxication with a drug: decreased number of cells due to the detachment of cells from their support; damage to nucleus and cytoplasma in the morphologically changed cells

Im allgemeinen, d. h. unspezifischen, Zytotoxizitätstest können nichtorganspezifische Zelleistungen in vitro kultivierter Zellen, wie Zellproliferation, Ausbreitung der Zellen auf der Unterlage u. a., durch toxische Konzentrationen verschiedenartigster Wirkstoffe unterschiedlich stark gehemmt werden (Abb. 52). In solchen Versuchen ist es möglich, die IC_{50} zu ermitteln. Das ist die Inhibitionskonzentration eines Wirkstoffes, die eine Zelleistung kultivierter Zellen zu 50% hemmt. Wie Untersuchungen in unserem Institut mit Endothelzellkulturen ergeben haben, existiert ein bestimmter Zusammenhang zwischen der IC_{50} (Zellkultur) und der LD_{50} (als ein Parameter der akuten Toxizität im Tierexperiment). Dieser Zusammenhang konnte durch Anwendung statistischer Prüfverfahren präzisiert werden. Ziel weiterer Experimente ist es, die gewonnenen Ergebnisse durch die Testung unterschiedlichster Wirkstoffgruppen zu bestätigen und abzusichern.

Durch die quantitative Bestimmung der Zytotoxizität (IC_{50}) in der Zellkultur könnten sich neue Möglichkeiten zur Einsparung von Tierversuchen bzw. zur Reduzierung der Zahl von Versuchstieren für Toxizitätstests ergeben, wenn mit der Zytotoxizität ergänzende Aussagen zur allgemeinen Toxizität eines Wirkstoffes im Organismus möglich sind. Eine praktische Nutzung dieser Ergebnisse bietet sich an, wenn die in vitro ermittelte IC_{50} zur Voraussage der annähernden LD_{50}-Werte herangezogen werden könnte. Darüber hinaus hat sich der Zytotoxizitätstest in der Zellkultur im Falle eines geringen Substanzaufkommens als vorteilhaft erwiesen; denn zur Bestimmung der LD_{50} werden Grammmengen eines Wirkstoffes benötigt, wohingegen zur Charakterisierung der Zytotoxizität Mengen im Milligramm-Bereich ausreichen.

drug by which 50% of the cell activity of cultured cells are inhibited. As shown in our investigations with endothelial cells, there is a certain relation between IC_{50} and LD_{50}, which we were able to specify more accurately by statistical methods. Further experiments are planned to confirm the results obtained by testing very different groups of drugs. The question is: Is it possible to predict approximate LD_{50} values with the help of IC_{50} values? If so, the quantitative determination of cytotoxicity (IC_{50}) in cell cultures would open up new ways for reducing the number of animal experiments required or of the animals involved, for IC_{50} can be determined in cell cultures in contrast to LD_{50}, which is determined in animal organisms. Another issue is the amount of substance required for testing: Cellular level tests need drug amounts in milligrams only, whereas for in-vivo toxicity evaluation grams are needed. So the in-vivo determination of toxicity is automatically made impossible for the case of drug developments as most drugs are always available in small quantities only.

12 Klinische Prüfung von Arzneimittel-Entwicklungen

Clinical Trials of Drug Developments

Die klinische Erprobung von im IWF entwickelten potentiellen Arzneimitteln selbst durchzuführen, gehört von Anfang an zur Konzeption des Institutes. In den frühen Phasen der klinischen Erprobung, bevor die durch ein neues Arzneimittel erreichbaren Möglichkeiten und Grenzen des Therapiefortschrittes in blind geführten Breiten-Studien herausgearbeitet werden, kann die Kooperation zwischen Wirkstoffentwicklerkollektiv (einschließlich Pharmakologen und Toxikologen) und dem Prüferkollektiv in der Klinischen Pharmakologie und Klinik erfahrungsgemäß nicht eng genug sein. Es ist daher am zweckmäßigsten, wenn Wirkstoffentwicklung und frühe klinische Erprobung in ein und derselben Einrichtung erfolgen. Diese klinischen Prüfungen selbst durchzuführen ist uns – obwohl das IWF über keine eigene Klinik verfügt – dank enger Zusammenarbeit mit einem größeren Berliner Krankenhaus möglich. Die klinische Erprobung von im IWF entwickelten potentiellen Arzneimitteln ist an folgende 3 Zielstellungen gebunden:

- Klinisch-pharmakologische Forschungstätigkeit im Rahmen der Durchführung von Phase I-Prüfungen (Verträglichkeit an gesunden Probanden, Bearbeitung der Humanpharmakokinetik, Bioverfügbarkeitsuntersuchungen). In Kooperation mit dem Krankenhaus konnte eine Arbeitseinrichtung geschaffen werden, in der die Bearbeitung der genannten Fragestellungen begonnen wurde. Die Arbeit mit hospitalisierten Probanden ist möglich. Die Untersuchungen werden von einem klinisch-pharmakologisch spezialisierten Forschungskollektiv durchgeführt, das in ständigem Arbeitskontakt zu den Wirkstoffentwickler-Kollektiven steht.
- Leitung von Phase II-Prüfungen (Therapieversuch an begrenzter Patientenzahl, Dosisfindung, erweiterte Humanpharmakokinetik).

53 Dr. H. Landmann,
Leiter der Abteilung Applikation/Überführung
Head of the Department of Application/Transfer

Clinical evaluation of potential drugs developed at the IDR was designed from the very beginning to be part of IDR research and development. In the early phase of clinical testing, i. e. before a new drug is subjected to blind field studies in order to test all its therapeutical values and frontiers, collaboration must be very close between the drug researchers including the pharmacologists and toxicologists, the clinical pharmacologists, and the clinicists. Therefore we think it advisable to carry out our own clinical trials, which, however, is only possible thanks to our close cooperation with a big Berlin hospital, as the IDR has no clinic of its own.

The early clinical trials have three aims:

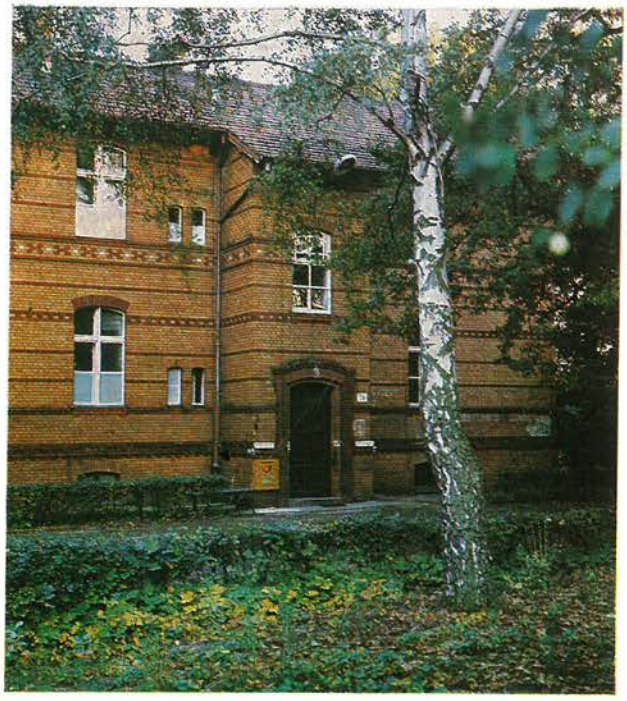
- Clinicopharmacological research within phase I-trials (compatibility in healthy volunteers, investigation of bioavailability and pharmacokinetics in humans). A research team speciali-

Phase II-Prüfungen werden, sofern es sich nicht um eine Indikation des Partner-Krankenhauses handelt, in entsprechend spezialisierten klinischen Einrichtungen durchgeführt. Die Mitarbeiter der klinisch pharmakologischen Arbeitsgruppe werden als verantwortliche Leiter derartiger Prüfungen von Wirkstoffentwicklungen des IWF tätig. Hierzu werden sie nach Möglichkeit für die Dauer der Prüfung ganz in die betreffenden Klinikerkollektive integriert. Sie arbeiten in enger Abstimmung mit den Wirkstoffentwickler-Kollektiven Prüfprotokolle und Befunderhebungsunterlagen aus.

- Mitwirkung bei der Durchführung von Phase III-Prüfungen (Klinischen Breitenprüfung). Phase III-Prüfungen werden unter verantwortlicher Leitung erfahrener Kliniker in klinischen Spezialeinrichtungen durchgeführt. Die Mitarbeiter der klinisch-pharmakologischen Arbeitsgruppe werden in diese Prüfungen von im IWF entwickelten Wirkstoffen als „mitwirkende Klinische Pharmakologen" einbezogen. Darüber hinaus können sie die Koordinierung der Vorbereitung und Durchführung multizentrischer Studien übernehmen. Sie nehmen in enger Zusammenarbeit mit den Wirkstoffentwickler-Kollektiven Einfluß auf die Gestaltung der Prüfprotokolle und Befunderhebungsunterlagen.

Die Tätigkeit der Klinischen Pharmakologen wird durch eine Arbeitsgruppe Prüforganisation unterstützt. Hier werden nicht nur alle organisatorischen Aufgaben der Prüfungsdurchführung, wie Koordination der Arbeitsabläufe, Musterverschlüsselung und -versand, Etikettierung der Muster und Proben für analytische und laborchemische Untersuchungen durchgeführt, sondern auch erster Entwurf und Endgestaltung der Prüfprotokolle und Befunderhebungsunterlagen erarbeitet und die statistischen Auswertungen der erhobenen Befunde vorgenommen. Hierfür werden die im IWF vorhandenen Datenverarbeitungsanlagen intensiv genutzt.

Die dargestellten Arbeitsleistungen und Kapazitäten stehen auch zur Lösung von Prüfaufgaben der Pharmazeutischen Industrie der DDR und ausländischen Interessenten zur Verfügung. Eine feste Bindung der Prüfkapazität an bestimmte



54 Klinische Pharmakologie: Die Einrichtung zur Durchführung von Untersuchungen an hospitalisierten Patienten befindet sich in einem größeren Berliner Krankenhaus

Clinical pharmacology: The building where probands undergo in-patient examinations is localized in a big Berlin hospital

zed in clinicopharmacological work carries out the respective investigations with the help of hospitalized volunteers, while keeping constant contact with the drug researchers.

- Supervision of phase II-trials (therapy test with a restricted number of patients, studies on dosage, extended pharmacokinetics in humans). In case the indication is not among those specialized on in the hospital, phase II-trials are then carried out in other partner hospitals with the respective specialities. The clinical pharmacologists are in charge of these tests and are, if possible, fully integrated with the team of clinicists for the time of the tests. In agreement with the drug researchers they prepare the test protocols and the questionaires for collecting clinical data.
- Participation in phase III-trials (field trials). Phase III-trials are carried out under the supervision of experienced clinicists in specialized clinics. The IDR clinicopharmacological team act as "cooperating clinical pharmacolo-

Indikationsgebiete besteht nicht. Bisher wurden vorwiegend Herz-Kreislauf-Pharmaka und Wirkstoffe, die in zentrale Regulationsmechanismen eingreifen, klinisch erprobt.

55 Bestimmung kardiovaskulärer Parameter im Rahmen einer Phase-I-Prüfung

The evaluation of cardiovascular parameters during the phase I study

gists" in these trials. Furthermore, they co-ordinate the preparation and execution of muliticentre studies. In close cooperation with the drug researchers they control the preparation of the test protocols and the questionaires for collecting clinical data.

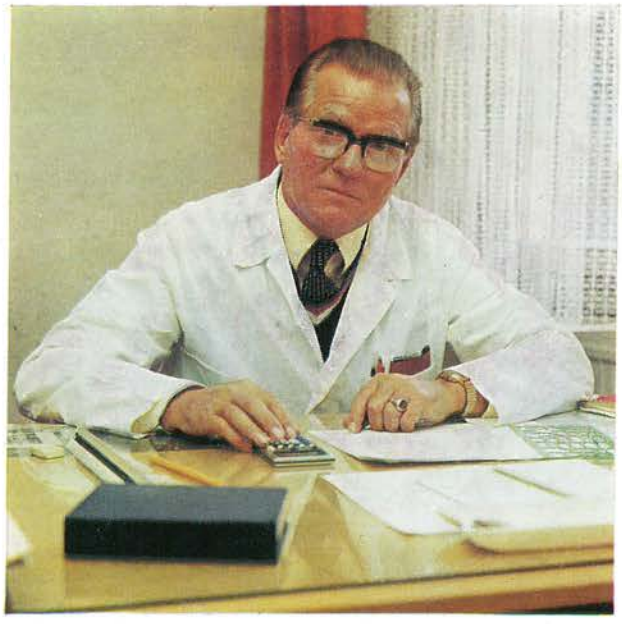
A special team is in charge of organizing the clinical trials. They co-ordinate the sequence of operations, encode medications, discharge the medicaments, and label the samples for analytical and laboratory tests. They also make the first as well as final design for the test protocols and the questionaires. They are also responsible for the computer-aided statistical evaluation of the clinical data.

The testing capacity is not bound to certain indications, but pharmaceutics and drugs influencing the central regulation mechanisms of heart and circulation have prevailed so far.

The services and capacities presented, are used not only by the IDR but are also available for clinical tests made by GDR pharmaceutical industry and that abroad.

13 Forschungstechnologie

Technology and Research



56 Dr. H. Reinecke,
Leiter der Abteilung Forschungstechnologie

Head of the Department of Technology and Research

Nach der Gründung des Instituts für Wirkstoffforschung erfolgte die Zuführung von Forschungsausrüstung und Laborgeräten für die experimentell arbeitenden Fachabteilungen fast ausschließlich auf kommerzieller Basis. Die zunehmende Profilierung auf Forschungsschwerpunkte und die dynamische Entwicklung ließen das Anforderungsprofil an die erforderliche Gerätetechnik sowohl in der Breite als auch in der Spezifik progressiv wachsen. Dazu kamen die auftretenden Probleme der Anpassung und Verkopplung der vorhandenen und hinzukommenden Technik. Die daraus sich ergebenden Aufgaben konnten zunächst einmal hinreichend von einigen, den Fachbereichen zugeordneten Mitarbeitern, gelöst werden.

Der ständig steigende Grad der Meßbarkeit in den Biowissenschaften und die sich laufend vermehrenden zu verarbeitenden Informationsmengen waren nicht mehr durch Einzelaktivitäten zu

During the first few years of its existence the IDR used almost exclusively commercially available research equipment. In the years that followed the latter not longer satisfied the higher standards neither quantitatively nor qualitatively, as specialization was growing with the rapid advance in biosciences. Another problem was the adaption and combination of the old to the new-purchased devices. At first a relatively small number of technologists assigned to the given research units managed to tackle all these problems satisfactorily. But these isolated efforts did not cope with the enormous increase in bioscientific data obtained by growingly sophisticated methods. The consequence was the establishment of the following technological units:

- *test workshop* – concerned with precision mechanics for equipment design, modernisation and maintenance;
- *test equipment* – concerned a) with the design of special electronic devices required for data collection and processing in the drug research units and for analysis and synthesis as such and b) with instrument adaptation and service;
- *electronic data processing/biometry* – concerned with developing strategies for data and information processing, for computer-aid in research work, for the supply of hard and software.

The mini-computer installed in the IDR is mainly used as a process control computer. It helps increase the level of statistical significance or reduce the extent of investigation required for obtaining statistically significant data. Process periphery is supplied by the CAMAC (Computer-Aided Measurement and Control) system of instrumentation. Its broad spectrum of modules grant rapid adaptation to special test conditions. An example is the testing of heart and circulation-influencing substances in laboratory animals

verarbeiten. Aus dieser Entwicklung heraus entstanden aus den unterschiedlichen beteiligten Fachkadern die folgenden Struktureinheiten:

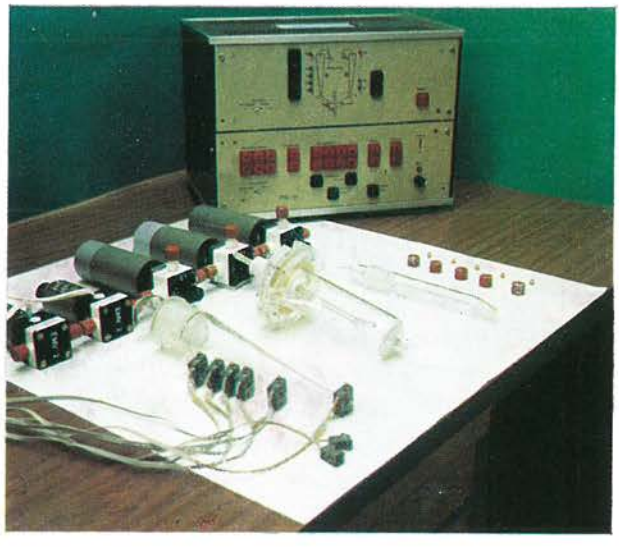
- Versuchswerkstatt für die Durchführung präziser feinmechanischer Arbeiten im Rahmen der Geräteentwicklung und Instandhaltung. Hierfür sowie für Reparaturen, Rationalisierungs- und Modernisierungsaufgaben ist die erforderliche Ausrüstung vorhanden;
- Versuchstechnik zur Realisierung von Aufgabenstellungen auf den Gebieten der Entwicklung autonomer elektronischer Gerätetechnik für die Erfassung und Verarbeitung von Meßwerten in der pharmakologischen Forschung sowie für die Analyse- und Synthesetechnik der Geräte-Anpassung sowie des Geräte-Service;
- Elektronische Datenverarbeitung und Biometrie mit der Verantwortung für die Strategie auf den Gebieten der Meßwert- und Informationsverarbeitung, der Interpretation sowie der Automatisierung wissenschaftlicher Forschung und den dazu erforderlichen Hard- und Softwarelösungen.

Der installierte Kleinrechner dient hauptsächlich als Prozeßrechner und für nutzerfreundliche Statistikroutinen zur Signifikanzverbesserung bzw. Minderung des Untersuchungsaufwandes.
Als Prozeßperipherie wird das CAMAC (Computer Aided Measurement and Control) Instrumentierungssystem angewendet, das mit einem

by using a hierarchical multicomputer system. Micro-computer controlled data collection and a specially developed program package as a rule make it possible to measure four bio-signals (ECG , blood pressure in the left ventricle, pulmo-aortic pressure and aortic flow) from beat to beat. Up to 50 parameters can be selected optionally and subjected to random analysis.

57 Durchführung feinmechanischer Arbeiten

Precission mechanics



58 Ventile, Vorratsgefäße, Reaktionsgefäß, Füllstands-Sensoren und Steuereinheit für einen Peptid-Synthesizer

Valves, metering and reaction vessels, metering sensors and control unit for a peptide synthesizer

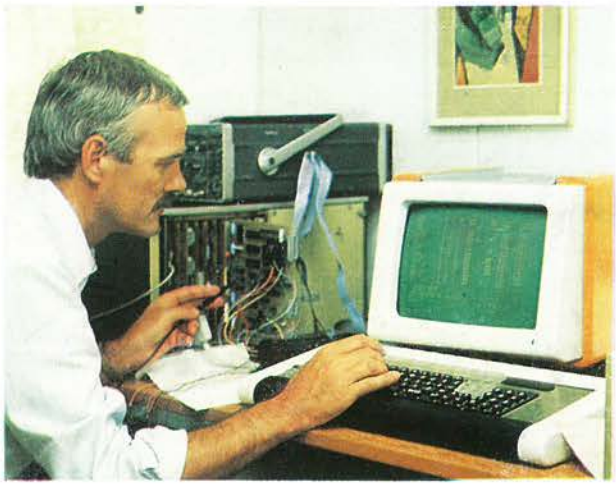


Abb. 59

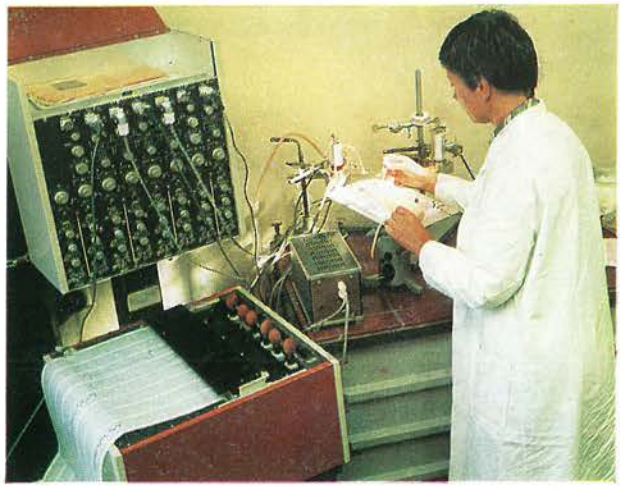


Abb. 60

Abb. 61

Abb. 62

59 Entwicklungssystem für Labor-Mikrorechner

Development system for laboratory microcomputers

60 Aufzeichnung verschiedener Kreislaufparameter (u. a. Blutdruck und Blutvolumen) der Ratte unter hämorrhagischem Schock.

Measurement of various cardiovascular parameters (among others blood pressure and blood volume) of the rat under haemorrhagic shock.

61 Elektrische Feldstimulation von isolierten Organen in vitro mit einem speziellen elektronischen Stimulator

Electrical field stimulation of isolated organs in vitro with a special electronic stimulator

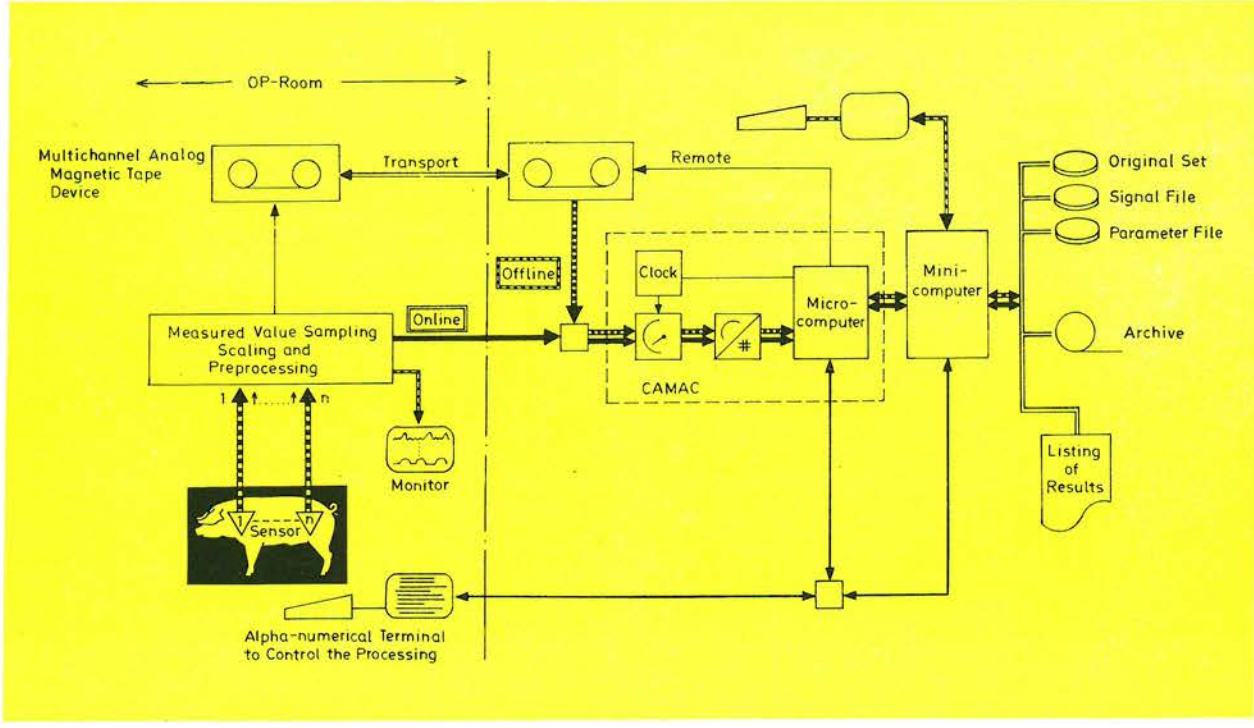
62 Mikrochemische Analysen-Verfahren werden durch spezielle forschungstechnologische Entwicklungen unterstützt

Microchemical analyses are supported through the technological department

breiten Modulspektrum eine schnelle Anpassung an spezielle Versuchsbedingungen gewährleistet. Ein Beispiel dafür mit einer hierarchischen Mehrrechneranwendung ist z. B. die Testung herz-kreislaufwirksamer Substanzen am Versuchstier. Ein mikrorechnergesteuertes Meßwerterfassungssystem in Verbindung mit dem Kleinrechner und einem speziell entwickelten Programmpaket erlaubt in der Regel 4 Biosignale (EKG, Blutdruck im linken Ventrikel, Pulmunararteriendruck und Fluß in der Aorta) "beat to beat" zu messen. Wahlweise können daraus bis zu 50 Parameter bestimmt und Stichprobenanalysen zugeführt werden.

For the benefit of efficient research, i. e. good results in the shortest possible time, the work of these separate units must be co-ordinated and concentrated on the central tasks of IDR research. A central unit for Technology and Research was recently established in order to meet this demand, thus providing the complex structures and efficient organisation that drug research depends on.

At present there are over ten different spheres of activities at the IDR. The research units regularly make use of one computer or multi-computer systems in combination with the new and more efficient mini-computer including its de-



63 Schematische Darstellung der Biosignalverarbeitung

Scheme of Biosignal Processing

Die Gesamtheit der Arbeitsergebnisse der gebildeten Kollektive stellt einen weiteren Schritt zur Bildung und Vervollkommnung eines Systems der Forschungstechnologie über die Grenzen der Struktureinheiten hinaus dar. Dies erweist sich insofern von Wert, als unsere Forschung auf derartige komplexe Strukturen und auf das Bemühen um effektive Prozeßgestaltung nicht verzichten kann, da wissenschaftlich qualifiziert und effektiv sowie ökonomisch und zeitlich führend gearbeitet werden muß. Die experimentelle Ar-

centralized terminals installed in 1984. Each department has access to this computer. It is increasingly used in various fields, among others for providing a research data base, for evaluating clinical trials, for planning laboratory animal breeding, for basic research and substance testing. The local data net of the institute enables a more efficient coupling of the micro-computer systems directly involved in research processes to the computers of the institute.

Research in quantum chemistry and quantitative

beit des Hauses wird in ständig wachsendem Umfang durch einen entsprechend fundierten wissenschaftlichen Gerätebau und eine gut entwickelte Automatisierung wissenschaftlicher Forschung leistungsfähiger. Zugleich tritt durch diese beiden Faktoren in Verbindung mit originellen fachspezifischen Verfahren und Methoden eine laufende prozeß- und systemorientierte Weiterentwicklung ein.

Die Realisierung der technischen Basis für diese Zielstellung übernimmt seit einiger Zeit eine Struktureinheit Forschungstechnologie, die im wesentlichen die gesamten Arbeitsgruppen Elektronische Datenverarbeitung und Biometrie, Versuchstechnik und Versuchswerkstatt nicht nur zusammenfaßt, sondern das damit gebildete Potential konsequent auf Schwerpunkte der Forschung einzusetzen gestattet.

Heute bestehen im Institut mehr als 10 Einsatzfälle der Automatisierung wissenschaftlicher Forschung mit Ein- oder Mehrrechneranwendung neben bzw. auch in Verbindung mit einem 1984 neu installierten leistungsfähigeren Kleinrechner mit dezentralen Terminals, zu dem alle Abteilungen des Hauses Zugriff haben. Der Kleinrechner wird zunehmend, u. a. auch zum Aufbau von Forschungsdatenbanken, Auswertung von klinischen Prüfungen und zur Versuchstierzuchtplanung sowie für Aufgaben der Grundlagenforschung und Substanztestung eingesetzt. Mit dem Aufbau eines lokalen Datennetzes im Institut werden die prozeßnahen, zur Automatisierung der experimentellen Forschung und der routinemäßigen Meßwerterfassung eingesetzten Mikrocomputersysteme im Verbund mit der Rechentechnik leistungsfähiger gekoppelt. Zur Lösung von Aufgaben der Quantenchemie und der quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse – s. Kapitel 8 – erfolgt der Zugriff zu entsprechender Großrechentechnik.

So ordnen sich der Gerätebau, die Automatisierung der wissenschaftlichen Forschung sowie die Software-Lösungen in die Gesamtkonzeption des Hauses ein. Auch unter Berücksichtigung des derzeit hohen Entwicklungsgradienten auf dem Gebiet der Biowissenschaften ist damit im Institut ein förderlicher Beitrag für die Anwendung geeigneter Technologien zur Lösung der wissenschaftlichen Aufgaben gesichert.

64 Pharmakologische Daten werden durch Messungen biochemischer Parameter – hier der Aminosäure-Konzentration – ergänzt

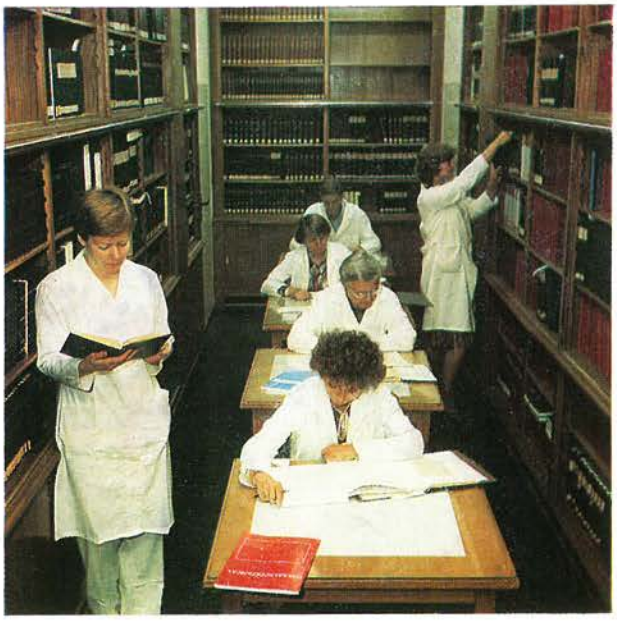
Pharmacological data are completed by measurements of biochemical parameters, in this example of amino acid concentration

structure-activity analysis (see chapter 8) has access to super computers.

Summing up, it may be said that equipment design, computer-aid in research and the supply of software solutions, is able to contribute to advance in biosciences.

14 Publikationstätigkeit und wissenschaftliche Veranstaltungen

Publications and Scentific Events



65 Institutsbibliothek

Library of the institute

Seit Gründung des Instituts entwickelte sich seine *Bibliothek* zu einer auf die Belange der Wirkstofforschung ausgerichteten Querschnittseinrichtung, in der den Mitarbeitern die erforderliche Fachliteratur des In- und Auslandes bereitgestellt wird.

Von einer Arbeitsgruppe für *Information* werden die Wissenschaftler durch Vermittlung aktueller Fachinformationen sowie durch Anfertigung themenspezifischer Literatur-Recherchen auf der Basis eines institutseigenen Informations-Speichers sowie auswärtiger automatisierter Informations-Systeme forschungsvorbereitend unterstützt. Ebenso werden hier die aus der Arbeit des Instituts resultierenden wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge computergerecht erfaßt und deren Titel jährlich in Form eines IWF-PUBLIKATIONSVERZEICHNISSES herausgegeben. Das Verzeichnis widerspiegelt den quantitativen sowie qualitativen Anstieg der

All publications on drug research are available at the IDR *library*. Information specialists provide the researchers with current research results and compile specialized bibliographies based on IDR and other computer-aided *information* systems. The publications and papers written at the IDR are collected in a computer-compatible form while the titles are published in the annual IDR publications reference list.

In the past decade, over 1300 papers or posters have been presented at internationl conferences. 600 publications, among them 10 monographs, have appeared. Studies, expertise, reviews and other scientific manuscripts for special users are part of routine IDR work.

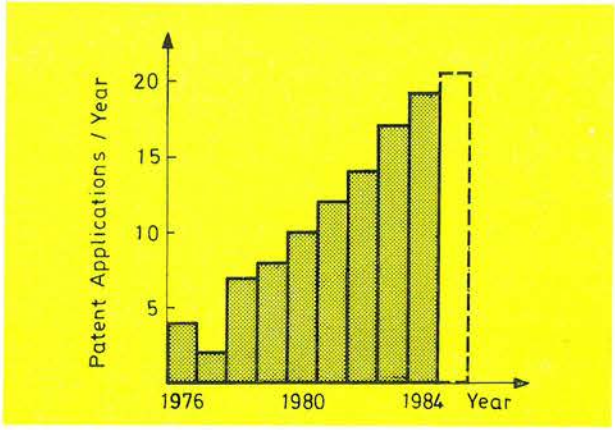
Publications and lectures of a popular science nature have presented aims and findings of general interest to the non-specialist public.

The series BEITRÄGE ZUR WIRKSTOFFFORSCHUNG ("Contributions to Drug Research") has now been published for ten years, as a rule four editions each year. They meet with

66 Die Monographienreihe „Beiträge zur Wirkstofforschung"

The series of monographs "Contributions to Drug Research"

Publikationstätigkeit und damit der wissenschaftlichen Leistungen des Instituts, die vielfach in enger Kooperation mit Forschungseinrichtungen des In- und Auslandes erbracht wurden.
So wurden seit Institutsgründung anläßlich nationaler und internationaler Fachveranstaltungen von Institutsangehörigen mehr als 1300 wissenschaftliche Vorträge gehalten beziehungsweise Poster vorgestellt, während im gleichen Zeitraum über 600 wissenschaftliche Publikationen – davon 10 Monographien – aus dem IWF erschienene Darüberhinaus laufend angefertigte Studien, Gutachten, Literaturbesprechungen und andere wissenschaftliche Ausarbeitungen für spezielle Nutzerkreise gehören zu den konstanten Arbeitsaufgaben des Instituts. Ebenso wurden interessierte Kreise in der Öffentlichkeit im Rahmen zahlreicher populär-wissenschaftlicher Veröffentlichungen und Vorträge mit Zielen und Resultaten der Wirkstofforschung bekannt gemacht.
In Fachkreisen des In- und Auslandes erfährt eine seit Gründung des IWF herausgegebene Monographienreihe „BEITRÄGE ZUR WIRKSTOFFORSCHUNG" zunehmende Resonanz; international bekannte Referate-Organe weisen auf ihr Erscheinen hin. Die jährlich etwa viermal herausgegebenen Beiträge werden aus speziellen Arbeitsgebieten der im IWF sowie in anderen – auch ausländischen – biowissenschaftlichen Forschungseinrichtungen tätigen Autoren abgeleitet. Diese aktuellen Publikationen aus Biowissenschaften und Medizin machen auf neue Ansatzpunkte in der Grundlagenforschung aufmerksam und zeigen – stets unter Berücksichtigung von Anwendungs-Aspekten – interessante Entwicklungstendenzen in der Wirkstoff- und Arzneimittelforschung auf.
Besonderer Erwähnung bedarf die *Erfindertätigkeit* im IWF, die seit Gründung des Instituts zunehmend an Bedeutung gewinnt. Bisher über 100 im Inland und mehr als 60 im Ausland erteilte Patente sind Ausdruck der kreativen Potentiale im Institut. Die so erlangte schutzrechtliche Sicherung der im IWF erbrachten erfinderischen Leistungen gilt sowohl Wirkstoffen und Arzneimitteln als auch speziellen Eigenschaften neuer oder bereits bekannter Substanzen. Der beanspruchte Schutz dieser Erfindungen erstreckt



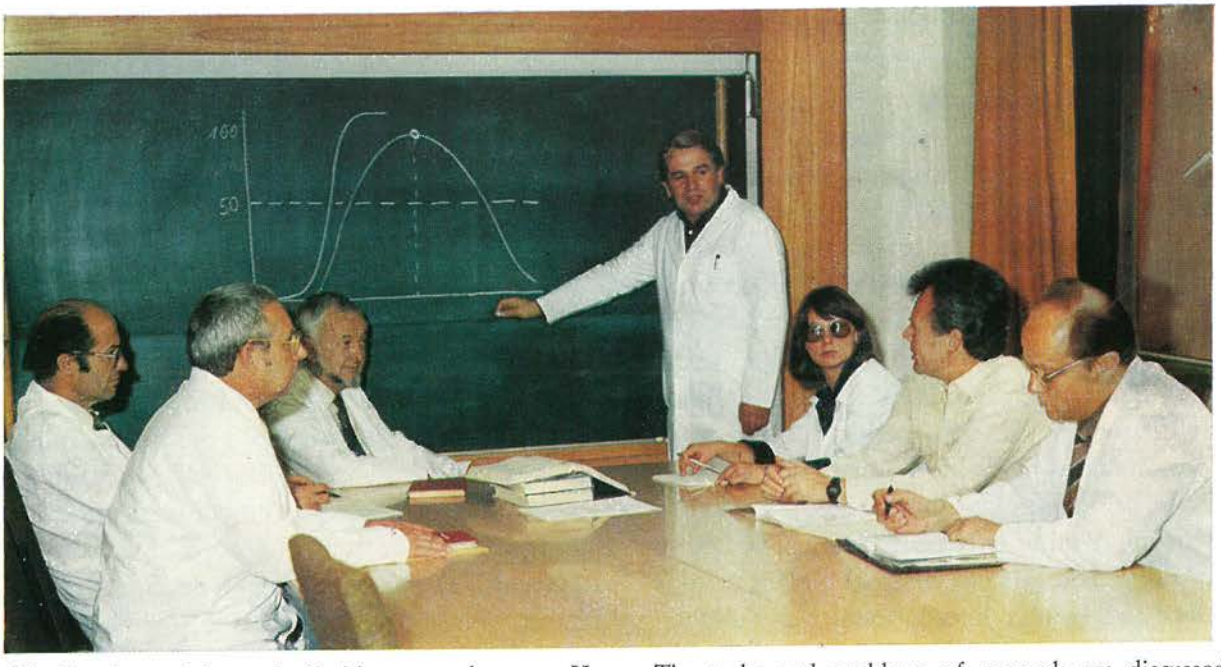
67 Patentanmeldungen aus den zurückliegenden zehn Jahren

Patents claimed in the past ten years

a growing response and are referred to in international reference bulletins.
Innovations. Over 100 GDR patents and over 60 international patents have been granted for drugs, pharmaceutics or for special effects of new or well-known substances. The patent rights mainly apply to the socialist countries, Western Europe, the USA, and Japan. The international patents chiefly protect peptide drugs and intermediate products for the preparation of the lat-

68 IWF-Patente

IDR patents



69 Forschungsziele und -Probleme werden von Vertretern unterschiedlicher Fachrichtungen diskutiert und die Lösung der Aufgaben gründlich geplant

The tasks and problems of research are discussed by experts from the various fields and their solution carefully planned

sich neben den sozialistischen Ländern vor allem auf Westeuropa, die USA und Japan. Die Auslandspatente betreffen in erster Linie Peptidwirkstoffe und Zwischenprodukte zu ihrer Herstellung sowie andere organische Wirkstoffe mit neuen therapeutischen Eigenschaften. Ein Großteil der Erfindungen entstand in Zusammenarbeit mit anderen Akademie-Instituten, mit Universitäten und Kooperationspartnern in der Industrie, aber auch mit Einrichtungen der anderen sozialistischen Länder.

Ein wesentlicher Faktor der Arbeit in unserem Institut besteht in der Durchführung *wissenschaftlicher Veranstaltungen*. Sie wirken vielfach weit über die Institutsgrenzen hinaus, indem ebenso die Kooperationspartner des In- und Auslandes wie auch andere, an der Wirkstofforschung beteiligte oder interessierte Fachkreise einbezogen werden. Breiten Raum nimmt hierbei der wissenschaftliche Meinungs- und Erfahrungsaustausch – beispielsweise im Rahmen der innerhalb des IWF regelmäßig stattfindenden Arbeits-, Literatur- und Institutskolloquien – ein.

Jährlich einmal wird ausschließlich den jungen Wissenschaftlern des Instituts Gelegenheit geboten, anläßlich einer wissenschaftlichen Veranstaltung ihre Forschungsergebnisse vorzustellen.

ter, or other drugs with new therapeutic effects.

Many of these *innovations* have been achieved in collaboration with other Academy institutes, universities, industrial enterprises, and institutes from the socialist countries.

Scientific events. Scientific events such as colloquia, conferences, etc. are attended by our partners in the GDR and abroad, other drug researchers or interested circles. Workshops and colloquia are held regularly as a platform to exchange views, ideas and experience.

Once a year, a special occasion is reserved for the junior scientists to present their findings. In the past decade thirteen junior scientists took their doctor's degrees (Promotion A), and six graduated scientists took their second doctor's degrees (Promotion B).

If a new research project is to be started, the institute and its partners hold brain-storming conferences. Annual conferences attended by all our partners deal with the problems of intensifying and economizing research.

As some of the topics investigated at the IDR, such as peptide chemistry, are of interdisciplinary interest, the IDR alternating with other research institutions organizes major scientific events like

In den vergangenen zehn Jahren erlangten dreizehn junge Wissenschaftler des IWF eine Promotion A, weitere sechs eine Promotion B.

Gemeinsam mit seinen Kooperationspartnern führt das Institut in Fällen neuer Forschungsvorhaben spezielle Ideenkonferenzen und jährlich einmal auf gleicher Ebene Intensivierungskonferenzen mit dem Ziel höchstmöglicher Effektivität der Forschungsarbeit durch.

Da einige Arbeitsgruppen des Instituts an überregional und interdisziplinär interessierenden Spezialthemen – z. B. der Peptidchemie – arbeiten, gestaltet das IWF im Wechsel mit anderen Forschungseinrichtungen auch zu solchen Themen in gewissen Abständen größere wissenschaftliche Veranstaltungen. Als ein Beispiel hierfür sei das im März 1984 unter internationaler Beteiligung sehr erfolgreich durchgeführte Reinhardsbrunner Symposium über „Peptide im Nervensystem" genannt.

Innerhalb der Berliner Physiologischen Gesellschaft veranstaltet das IWF ein- bis zweimal monatlich sein Kolloquium WIRKSTOFFORSCHUNG. Es wird von Fachkollegen des In- und Auslandes bestritten und nimmt im wissenschaftlichen Leben Berlins inzwischen einen festen Platz ein.

Am 3. Mai 1983 veranstaltete das Institut für Wirkstofforschung – gemeinsam mit dem Institut für Pharmakologische Forschung der Pharmazeutischen Industrie der DDR – ein erstes BERLINER WIRKSTOFF-SYMPOSIUM zum Themenkreis „Lipidstoffwechsel und Antihyperlipämika". Diesem folgte am 5. Juni 1985 ein zweites Symposium zur „Pharmakologie nichtglykosidischer Kardiotonika", an dessen Gestaltung darüberhinaus auch das Zentralinstitut für Herz-Kreislaufforschung der AdW der DDR entscheidend mitbeteiligt war. Beide Veranstaltungen fanden im gediegen restaurierten Schloß Friedrichsfelde – dem Veranstaltungsort auch künftiger BERLINER WIRKSTOFFSYMPOSIEN – statt und standen unter der Schirmherrschaft des Pharmazeutischen Kombinats GERMED sowie darüberhinaus im Mai 1983 der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie der DDR. Namhafte Wirkstofforscher und Ärzte des In- und Auslandes stellten hier zu beiden Themenkreisen aktuelle Beiträge von internationalem Rang vor

the symposium on PEPTIDES IN THE NERVOUS SYSTEM held at Reinhardsbrunn in March 1984, with international participation.

Together with the Berlin Physiological Society the IDR organizes the Colloquium WIRKSTOFFORSCHUNG (Colloquium on Drug Research) once or twice a month, which is attended by drug researchers from home and abroad and which enjoys a good reputation in Berlin Science.

On May 3, 1983 the IDR and the Institute for Pharmacological Research held the first BERLINER WIRKSTOFFSYMPOSIUM (Berlin Drug Symposium) on "Lipid Metabolism and Antihyperlipemics". It was followed by a second symposium of this kind on June 5, 1985 on "Pharmacology of non-glycoside Cardiotonics", jointly organized with the Central Institute of Heart and Circulation Diseases of the Academy of Sciences of the GDR. Both symposia took place in Schloß Friedrichsfelde (Berlin), where the forthcoming Berlin Drug Symposia will also be held, under the auspices of GERMED (Pharmaceutical Combine), the 1983 symposium also under the auspices of the Society of Pharmacology and Toxicology. Renowned drug researchers and physicians from this country and abroad presented their contributions, which like those of the other two symposia were published in the above-mentioned CONTRIBUTIONS OF DRUG RESEARCH.

70 Schloß Friedrichsfelde im Tierpark Berlin

Friedrichsfelde Castle in the Zoological Gardens

und nahmen die Gelegenheit zu regem Meinungsaustausch wahr. Die wissenschaftlichen Beiträge zu diesen zwei bisherigen Symposien erschienen – ebenso wie die zum Symposium „Peptide im Nervensystem" – in je einem Band der oben vorgestellten Monographienreihe BEITRÄGE ZUR WIRKSTOFFORSCHUNG. Ihre Resonanz sowie der erfolgreiche Verlauf dieser Veranstaltungen ermutigt zu einer kontinuierlichen Weiterführung des BERLINER WIRKSTOFFSYMPOSIUMS als Forum enger nationaler und internationaler Zusammenarbeit von Grundlagenforschung, Pharmazeutischer Industrie und klinischer Praxis mit dem gemeinsamen Ziel erfolgreicher Arzneimittel-Entwicklungen.

The response to these conferences and publications encourages us to continue this kind of symposia as a platform for direct information exchange between people from basic research, the pharmaceutical industry and clinical practice.