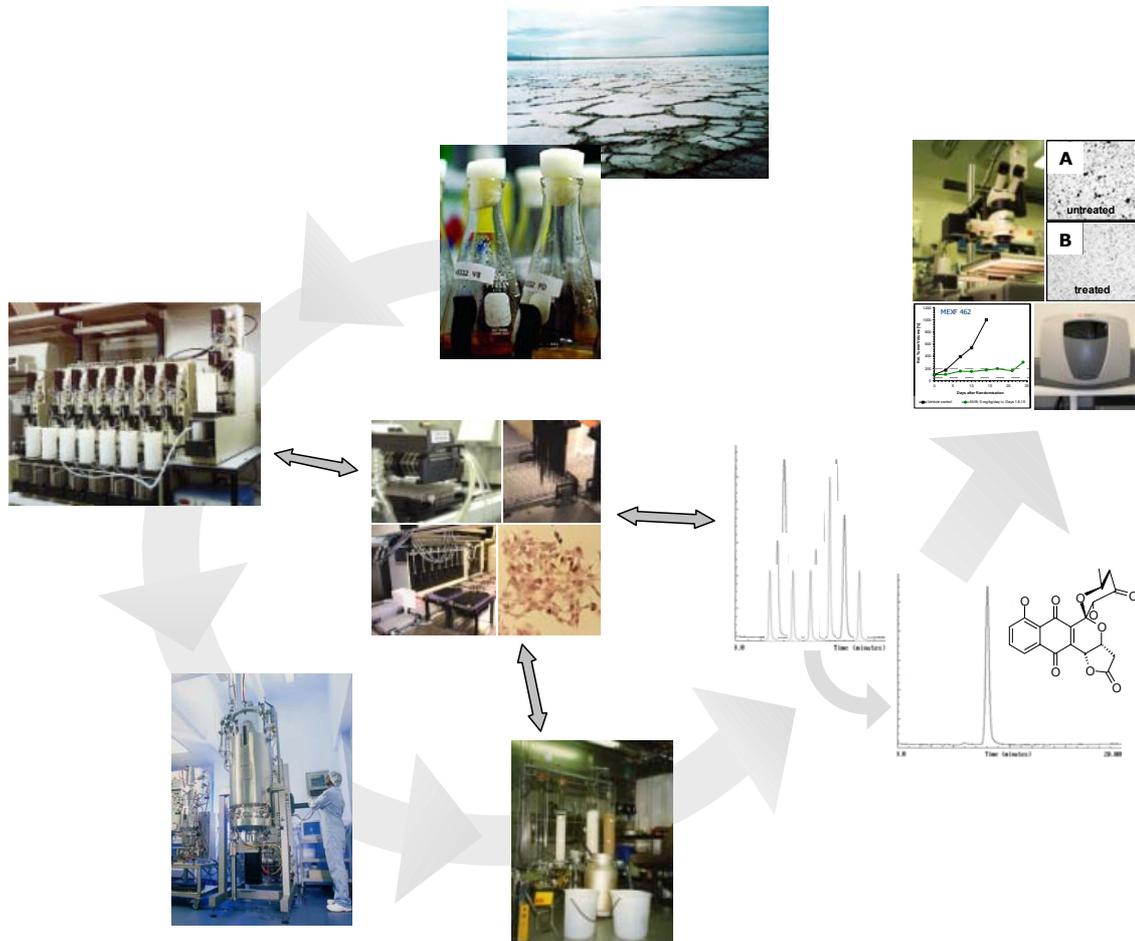


Extreme und ungewöhnliche Habitate als Quellen neuer pharmazeutischer Wirkstoffe mikrobiellen Ursprungs („EXTENSION“)

BMBF-gefördertes Verbundvorhaben mit Laufzeit vom 01.05.2002 - 30.04.2005

Abschlussbericht: Zusammenfassung und Teilprojekte A und B



Verbundpartner:	Koordination:
<p>Teilprojekt A: Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, Deutschland (FKZ 0312848A)</p> <p>Teilprojekt B: Oncotest GmbH, Institut für Experimentelle Onkologie, Freiburg, Deutschland (FKZ 0312848B)</p>	<p>Prof. Dr. Susanne Grabley, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut (HKI), Beutenbergstr. 11a, D-07745-Jena</p>
<p>Yunnan Institute of Microbiology (YIM), Yunnan University, Kunming, Yunnan, V.R. China</p> <p>North China Pharmaceutical Corporation (NCPC), Shijiazhuang, V.R. China</p>	<p>Prof. Dr. Jiang Cheng-Lin, Yunnan Institute of Microbiology (YIM), Yunnan University, 650091 Kunming, Yunnan, V.R. China</p>

Vorbemerkung

Der Abschlussbericht wurde unter Berücksichtigung der Vorgaben aus den Zuwendungsbescheiden des Projektträgers verfasst. Wesentliche Punkte werden in den getrennt erstellten, aber eng abgestimmten Teilberichten abgehandelt. In der Zusammenfassung werden nur übergeordnete Aspekte dargestellt.

Inhalt

I. Zusammenfassung

1. Rahmenbedingungen	Seite	1
2. Planung und Ablauf	Seite	1
3. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	Seite	2
4. Veröffentlichung der Ergebnisse	Seite	3

II. Bericht zum Teilprojekt A Hans-Knöll-Institut (FKZ 0312848A)

III. Bericht zum Teilprojekt B Oncotest GmbH (FKZ 0312848B)

1. Rahmenbedingungen

Das Kooperationsprojekt konnte in enger fachlicher und persönlicher Abstimmung durchgeführt werden. Die Einbindung von Prof. Jiang und seinen Mitarbeitern wurde dank eines begleitenden WTZ-Projektes (Projektträger DLR; CHN 01/328), das drei 6-monatige Aufenthalte von chinesischen Gastwissenschaftlern vom YIM am HKI finanzierte, sehr begünstigt. Zudem haben diese Kollegen durch Ihre Rückkehr an die Heimatinstitution ganz entscheidend zum Charakter einer vertrauensvollen Zusammenarbeit zwischen der deutschen und der chinesischen Seite beigetragen.

Dazu kamen mehrere Besuche von den deutschen Projektbeteiligten in Kunming. Bei einem der Besuche in Kunming wurde Prof. Grabley der „Friendship with Yunnan Award 2003“ verliehen, den jedes Jahr 10-15 ausländische Experten für ihren Beitrag zur Förderung des wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Fortschritts der Provinz Yunnan erhalten. Dies dokumentiert das übergeordnete Interesse von Prof. Jiang bzw. der Provinzregierung an dem Projekt. Eine weitere Zusammenarbeit ist allerdings wegen Umstrukturierungen an der chinesischen Partnerinstitution unklar.

Der Kooperationspartner North China Pharmaceutical Corporation (NCPC), Shijiazhuang, V.R. China trat im Verlaufe des Projektes kaum in Erscheinung. Allerdings wurde die über NCPC eingeplante biotechnologische Bereitstellung großer Substanzmengen von Hit-Verbindungen auch nicht eingefordert.

2. Planung und Ablauf

Der im Projektantrag formulierte Arbeitsplan konnte in der Strukturierung, im zeitlichen Ablauf und in der Verteilung auf die Projektpartner HKI, Oncotest und YIM gut eingehalten werden.

Projektgemäße Arbeitspakete im zeitlichen Ablauf (lt. Antrag):

Objectives	6	12	18	24	30	36
I. Microbial strain isolation & optimization of culturing conditions	++	++	+	+	+	+
II. Natural product microbiology	+	++	++	++	+	
III. Natural product screening	+	+	++	++	+	
IV. Scale up, isolation & structure elucidation			+	++	++	++
V. Biological characterization				+	+	++
VI. Activities towards drug development						++
VII. Joint Patenting and publishing				+	+	++

Projektgemäße Arbeitspakete in der Verteilung auf die Projektpartner (lt. Antrag):

Objectives	YIM	HKI	Onco	NCPC
I. Microbial strain isolation & optimization of culturing conditions	++	+	+	
II. Natural product microbiology	++	++		
III. Natural product screening	+	+	++	++
IV. Scale up, isolation & structure elucidation	++	++		
V. Biological characterization	+	+	++	++
VI. Activities towards drug development			+	+
VII. Joint Patenting and publishing	+	+	+	+

3. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen des Verbundprojektes wurden am HKI bislang 103 Verbindungen isoliert und 91 davon bei der Oncotest eingehend biologisch charakterisiert. Von diesen 91 Verbindungen konnten 83 in ihrer Struktur bestimmt werden; 21 waren strukturell neuartig. Von den neuen, stoffschutzbefähigten Substanzen, zu denen noch drei synthetische Verbindungen hinzu zu zählen sind, zeigten sechs eine relevante Antitumoraktivität. **Drei Griseusin-Derivate und ihre biologische Aktivität wurden während der Projektlaufzeit zum Patent angemeldet** (Europäische Patentanmeldung unter dem Aktenzeichen 04 024779.3-2117: „Griseusin derivatives and their use as anticancer agents“).

[TEXT entfernt]

Die Darstellung weiterer Detailergebnisse ist aus Gründen des nicht abschließend bewerteten Stoffschutzes vertraulich.

4. Veröffentlichung der Ergebnisse

4.1 Erfolgte Veröffentlichungen

Publikationen

Li, Y.Q.; Huang, X.S.; Li, M.G.; Sattler, I.; Wan*, M. L., Grabley, S.:

"Three Compounds isolated from a Bioactive Streptomycece." Chin. Chem. Lett. **2005**, 16, 613-5.

Vorträge

- Fiebig, H.H.: „EXTENSION.“ Kunming, V.R. China, Oktober 2004.

- Grabley, S.: "Naturstoffe für die Wirkstoffsuche." GDCh-Vortrag, Universität Ulm, Dezember 2005.

- Sattler, I.; Lange, C.: "Natural Products in Drug Discovery: Recent Results and Perspectives for the Future." 26. Tübinger-Göttinger Gespräche zur Chemie von Mikroorganismen, Goslar, 2005.

4.2 Veröffentlichungen in Vorbereitung

Publikationen

Nach abschließender Beurteilung im Hinblick auf die Verwertbarkeit der Ergebnisse und ggf. weitere patentrechtliche Absicherungen sind Veröffentlichungen zu den folgenden Substanzgruppen geplant (vgl. Teilberichte HKI und Oncotest):

[Text entfernt, da vertraulich]

Poster

He, J.; Huang, X.S.; Li, Y.Q.; Sattler, I.; Grabley, S.; Maier, A.; Kelter, G.; Fiebig, H.H., Jiang, C.-L.:

"New Antitumour Compounds from Actinomyces (working title)." Irseer Naturstofftage 2006 der DECHEMA (akzeptiert).

Vorträge

In Abhängigkeit von den Publikationen



Abschlussbericht zum BMBF-geförderten Verbundvorhaben

"Extreme und ungewöhnliche Habitate als Quellen neuer pharmazeutischer Wirkstoffe mikrobiellen Ursprungs" („EXTENSION“)

Teilprojekt A " Suche nach Wirkstoffen für die Tumorthherapie"

Förderkennzeichen 0312848A

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung
und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut (HKI)
Beutenbergstr. 11a, D-07745 Jena

Teilprojektleiterin: Dr. Isabel Sattler

Laufzeit des Vorhabens:

01.05.2002 – 30.04.2005

Inhalt

1.	Aufgabenstellung	Seite	A1
2.	Rahmenbedingungen	Seite	A1
3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	Seite	A1
4.	Stand der Wissenschaft und Technik, an den angeknüpft wurde	Seite	A2
5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	Seite	A3
6.	Ergebnisse	Seite	A3
7.	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	Seite	A7
8.	Veröffentlichung der Ergebnisse	Seite	A7

1. Aufgabenstellung

Die Aufgaben des HKI-Teilprojektes lassen sich im Wesentlichen in zwei Bereiche unterteilen, das Screening und die Naturstoffchemie. Das **Screening** umfasste die Inkulturnahme der vom YIM bereitgestellten Mikroorganismen und die Probenherstellung daraus, die chemische Produktmuster-Profilierung und die Bereitsstellung der Proben für die cytotoxischen Assays an Tumorzelllinien beim Projektpartner Oncotest GmbH. Zu dem großen Arbeitspaket der **Naturstoffchemie** gehören die physikochemische Feinanalytik von auffälligen Extrakten, die Anzucht ausgewählter Stämme im Pilotmaßstab und schließlich die Reindarstellung von Naturstoffen und ihre Strukturaufklärung. Die in ausreichender Menge verfügbaren, relevanten Naturstoffe wurden einer vertieften Testung beim Industriepartner unterzogen.

2. Rahmenbedingungen

Die beantragten und in vollem Umfang genehmigten **Finanzmittel** haben bezüglich der **Verbrauchsmittel** den Bedarf des Projektes gut gedeckt.

Es zeigte sich jedoch, dass der **Personalbedarf** über die beantragten Stellen hinausging. Daher war es für den Projekterfolg entscheidend, dass über ein begleitendes DLR-WTZ-Projekt (CHN 01/328) für dreimal 6 Monate Gast-Wissenschaftler des Verbundpartners YIM in die Arbeiten eingebunden werden konnten. Zwar benötigten die Gast-Wissenschaftler lange Einarbeitungszeiten und intensive Betreuung, aber sie konnten insbesondere bei der Reindarstellung von Naturstoffen wesentliche Beiträge leisten.

Relativ **häufigen Personalwechsel** innerhalb des BMBF-Projektrahmens und zeitliche Verschiebungen bei der Ausschöpfung der Stellen waren so nicht geplant. Sie haben den Ablauf der Arbeiten aber in keinster Weise behindert. Es konnten, im Gegenteil, Freiräume geschaffen werden, den Personaleinsatz flexibel an die jeweiligen Erfordernisse anzupassen, z.B. Einbindung eines zweiten Wissenschaftlers in der zweiten Projekthälfte für die spektroskopische Strukturaufklärung und Synthesestudien an Hitsubstanzen (s. Abschnitt 6.4), die ansonsten nicht durchführbar gewesen wären.

Über die Förderphase und den an sich erfüllten Projektauftrag hinaus wurden und werden am HKI projektgemäße Arbeiten weitergeführt, die aus anderen Quellen finanziert werden. Dies betrifft zum einen die Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus weiteren interessanten Produzentenstämmen und zum anderen die Bereitstellung von Nachsubstanz von interessanten Hitsubstanzen, z.B. iso-Gilvocarcin V.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“.

4. Stand der Wissenschaft und Technik, an den angeknüpft wurde

Medikamente auf der Basis von Naturstoffen aus Actinomyceten oder filamentösen Pilzen machen ungefähr 30% des weltweiten Pharmamarktes aus, wobei für Tumortheraeutika und Antiinfektiva sogar noch höhere Anteile gelten.¹ Bis heute sind diese mikrobiellen Produzenten eine reiche Quelle für neue Naturstoffe. Insbesondere "ungewöhnliche", bislang wenig bearbeitete ökologische Habitate gelten als interessant für die Auffindung neuer mikrobieller Produzenten. Die Provinz Yunnan im Südwesten Chinas zeichnet sich durch eine große und extreme geologische und klimatische Vielfalt aus, die sich in einer reichen Flora und Fauna widerspiegelt. Es finden sich dort tropische, subtropische und kalte Wälder, weite alkalische Böden und Seen, saure Böden und Hunderte von heißen Quellen. Diese Gebiete wurden bislang für das Bio-Propecting und ökologische Untersuchungen wenig erforscht.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Pflanzen eine enorme Vielfalt an endophytischen Mikroorganismen beherbergen.² Definitionsgemäß sind Endophyten Mikroorganismen (Pilze oder Bakterien), die Teile oder die Gesamtheit ihres Lebenszyklus inter- oder intra-zellulär in den (gesunden) Geweben der Wirtspflanze verbringen und dabei an der Pflanze keine auffälligen Defekte hervorrufen. Endophyten sind eine taxonomisch und ökologisch vielfältige Organismengruppe. Außer Stickstoff-Fixierern sind bislang nur wenige endophytische Bakterien näher untersucht worden. Erste Studien zeigen jedoch, dass Actinomyceten nicht nur in der Rhizosphäre höherer Pflanzen gefunden werden, sondern auch aus anderen Pflanzenteilen wie Blättern isoliert werden können.^{3,4} Die gefundenen Actinomyceten gehören nicht nur zur Gattung *Streptomyces*, sondern auch zu *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Streptosporangium*, *Tsukumarella*, *Dactylosporangium* und anderen, die dafür bekannt sind, über komplexe Stoffwechselwege zu verfügen, die auch zu kommerziell relevanten Produkten führen. Befunde aus der Literatur zeigen, dass höhere Pflanzen in Ergänzung zu Bodenproben eine hervorragende Quelle für die Isolierung von Mikroorganismen mit außergewöhnlichen Sekundärstoffwechsel-Eigenschaften darstellen

Arzneimittel aus der Natur bilden in China seit Jahrtausenden die Grundlage für die Behandlung und Heilung von Krankheiten. In der „Traditionellen Chinesischen Medizin“ (TCM) spielen dabei Extrakte aus Heilpflanzen eine herausragende Rolle. Die Wirkstoff-orientierte Naturstoff-Forschung in China wendet sich inzwischen zunehmend der Frage nach den zugrunde liegenden chemischen Strukturen der Inhaltsstoffe zu und versucht, die Wirkprinzipien zu identifizieren, zu charakterisieren und einem molekularen Wirkort zuzuordnen, um so die Basis für die Entwicklung neuer verbesserter Therapeutika zu schaffen.

¹ Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. (1997) J. Nat. Prod. 60: 52.

² Tan, R.X., Zou, W.X. (2001) Nat. Prod. Rep. 18: 448.

³ Azevedo, J.L., Maccheroni Jr., W., Pereira, J.O., de Araújo, W.L., EJB Electronic Journal of Biotechnology [online]. 15 April 2000, vol. 3, n. 1 [cited 25 Sept. 2001]. Available from <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4/index.html>. ISSN 0717-3458.

⁴ Kizuka, M., et al., Abstracts 12th Int. Symp. on the Biology of Actinomycetes, 5-9 Aug. 2001, Vancouver, Canada; Coombs, J.T., Franco, C.M.M., Abstracts 12th Int. Symp. on the Biology of Actinomycetes, 5-9 Aug. 2001, Vancouver, Canada.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten des Teilprojektes wurden im Wesentlichen innerhalb der Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung (Leitung Prof. Dr. S. Grabley) durchgeführt. Einzelne Arbeitsschritte wurden im Auftrag von anderen HKI-internen Arbeitsgruppen übernommen (z.B. Kultivierungen im Pilomaßstab, Aufnahme spektroskopischer Daten) bzw. bei der CyBio Screening GmbH, Jena, einer Ausgründung des HKI, durchgeführt.

6. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Teilprojektes A entsprechend der im Antrag formulierten Arbeitspakete dargestellt.

6.1 Bereitstellung von Stämmen und Optimierung von Anzuchtbedingungen

Insgesamt wurden vom Projektpartner YIM in drei Serien 650 Stämme für das Screening nach neuen Turmorthérapeutika zur Verfügung gestellt (Tabelle 1). Die als Schrägagar-Kulturen übersandten Isolate wurden am HKI zunächst durch Mehrfachausstrich auf Vitalität und Reinheit überprüft. Es konnten 450 Mikroorganismen erfolgreich in Kultur genommen werden. Diese Rate kommt zum einen durch Ausfälle in der Vitalität zum zustande, zum anderen befanden sich insbesondere in der dritten Lieferung Mikroorganismen, für die am HKI keine Erfahrungen in der Naturstoffmikrobiologie vorlagen bzw. für die keine Aussicht auf Erfolg bestand [z.B. Hefen und gram-(+) Bakterien] und die daher zurückgestellt wurden. Damit liegt der Umfang des mikrobiologischen Ausgangsmaterials zwar unter den im Antrag formulierten 1000 Isolaten; durch ein vertieftes Screening-Programm, z.B. Anzucht der Stämme in mindestens drei Nährmedien und teilweise Probenfraktionierung bereits im Primärscreening, konnte dennoch eine sehr gute Basis für die Wirkstoffsuche geschaffen werden.

Datum	Zahl und Art der Stämme	In Kultur genommen
1. 02.2002	222 Stämme: 135 Alkalophile 31 Halophile 56 seltene Actinomyceten	219
2. 08.2002	215 Stämme (Frischisolate aus Erdproben): 55 Streptomyceten 160 seltene Actinomyceten	169
3. 05.2002	213 Stämme (Frischisolate aus 35 TCM Pflanzen): 149 Pilze 64 Bakterien [darunter Bacillus, Gram(-), Coryneforme, Hefen]	124

Tabelle 1: Übersicht über die vom YIM an das HKI übergebenen Isolate

6.2 Naturstoffmikrobiologie

Die erfolgreich in Kultur genommenen Isolate wurden nach Anpassung der etablierten SOP in 100 mL Schüttelkulturen angezogen. Streptomyceten wurden in drei Nährmedien (Soja/Mannit, Hafer, Malzextrakt) und Pilzkulturen in vier Nährmedien (Malzextrakt, Casein/Fleischpepton, Maisquellwasser, Hefeextrakt) kultiviert. Dabei wurden bei den extremophilen Actinomyceten die Standardmedien an die speziellen Wachstumsbedingungen angepasst: 10% Salzgehalt (NaCl) bei den Halophilen und pH 9.5 (nach Sterilisation) für die Alkalophilen.

Die am HKI gut etablierten Verfahren zur getrennten Probenaufbereitung von Mycel (flüssig/fest Extraktion nach Zellaufschluss und Lyophilisation) und Kulturfiltrat nach Festphasen-Extraktion (solid phase extraction, SPE) an Amberchrom Adsorberharz konnten auf die im Projekt untersuchten Kulturen erfolgreich angewendet werden.⁵ Je nach Kapazitäten konnte die Festphasen-Extraktion auch im chromatographischen Modus durchgeführt werden. Dabei wird durch mehrfache Elution mit schrittweise steigendem Methanol-Anteil in Wasser (20%, 40%, 60%, 80%, 100% Methanol) eine Auftrennung der Inhaltsstoffe des Kulturfiltrates möglich. Die damit erreichte deutliche Verminderung der stofflichen Komplexität der einzelnen Proben führt zu zuverlässigeren Aussagen in der biologischen Testung der Extraktproben. Insgesamt 7200 Testproben wurden im Projektrahmen aus Kulturen im Screening-Maßstab hergestellt, davon dienten ca. 30% für Versuche zur Reproduktion von zuvor positiv getesteten Proben.

Die naturstoffmikrobiologischen Arbeiten umfassten auch die Anzucht von ausgewählten Mikroorganismen im Pilotmaßstab. 30 der Hitstämme wurden im 20L Bioreaktor re-kultiviert, um so ihre Eignung für die die 300 L Fermentationen zur Isolierung der cytotoxischen Sekundärmetabolite abzuschätzen. Insgesamt wurden 44 Fermentationen im 20 L Maßstab und 37 Fermentationen im 300 L Maßstab durchgeführt. Von letzteren wurden im Projektrahmen 11 der Produktisolierung zugeführt.

6.3 Naturstoffscreening

Die Screeningproben wurden zunächst dem Projektpartner Oncotest GmbH für die Testung zur Verfügung gestellt. Dazu wurde gemeinsam eine Übergabelogistik festgelegt: Abfüllung der Proben unter Verdünnung mit Wasser (50%) in MTP-Tochterplatten am HKI und Übergabe wesentlicher Probandaten in Excel-Dateien (Produzentenstamm, Kulturmedium, Kultivierungsdauer, Probenart). Die Testergebnisse wurden dann am HKI zu einer einheitlichen ACCESS Datenbasis zusammengeführt.

Nach gemeinsam festgelegten Auswahlparametern über relevante Wirkhöhen wurden die wirksamen Extrakte ausgewählt und parallel einem physikochemischen Screening zur Produktmuster-Analytik unterzogen. Dazu wurden Dünnschichtchromatogramme auf HPTLC-Kieselgel-Platten in zwei Laufmitteln angefertigt [Chloroform/Methanol = 9:1 und 1-Butanol/Eisessig/-Wasser = 4:1:5 (obere Phase)]. Die Substanzbanden in den Chromatogrammen wurden unter UV-Licht (254 nm) und durch Anfärbung mit drei verschiedenen Sprühreagenzien detektiert. Die parallele Auswertung der Chromatogramme ermöglicht den schnellen und zuverlässigen Ausschluss von (uninteressanten) ubiquitären Metaboliten. Charakteristische Parameter der

⁵ Schmid I, Sattler I, Grabley S, Thiericke R. Natural Products in High Throughput Screening: Automated High-Quality Sample Preparation. *J. Biomol. Screening* 4, 13–23 (1999).

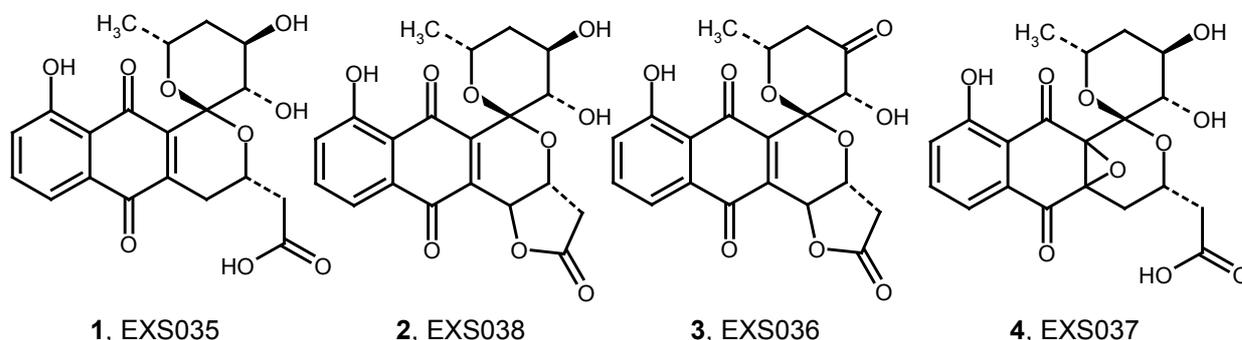
singulär auftretenden Substanzbanden wurden dann mit vorliegenden Daten zu ca. 6000 bekannten mikrobiellen Naturstoffen abgeglichen. Letzteres erfolgte insbesondere mit Unterstützung von HPLC/UV/MS Daten. Auf diesem Wege sollten solche Stämme für die vertiefende Bearbeitung ausgewählt werden, bei denen neue Naturstoffe zu erwarten waren. Parallel zur physikochemischen Feinanalytik wurden Versuche zur Reproduzierbarkeit der Produktbildung durchgeführt.

6.4 Scale up, Isolierung und Strukturaufklärung

Im Projektrahmen wurden elf Rohprodukte aus Kultivierungen von interessanten Mikroorganismen im 300 L Maßstab der chromatographischen Reindarstellung der Inhaltsstoffe zugeführt. Reine oder zumindest stark angereicherte Substanzen wurden mit spektroskopischen Methoden in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt. **Insgesamt wurden im Projektrahmen 103 Substanzen isoliert**, von diesen wurden 80 in Ihrer Struktur aufgeklärt. 45 davon können als relevante Sekundärmetabolite angesehen werden. **21 von ihnen waren strukturell neu**.

Folgenden Substanzen bzw. Substanzgruppen erwiesen sich als besonders interessant (Details zu den cytotoxischen Wirkungen siehe Abschnitt 7.4.1 im Abschlussbericht zu Teilprojekt B):

Aus dem als *Nocardopsis* sp. bestimmten Produzenten GT20021094 (DSM16644, YIM80133) konnten vier **Griseusine** isoliert werden, von denen zwei Verbindungen - 4'-Dehydrodeacetylgriseusin A (**3**, EXS036) und 6,7-Epoxy-deacetylgriseusin B (**4**, EXS037) - strukturell neu waren. Die Deacetyl-Griseusine A (**2**, EXS038) und B (**1**, EXS035) gehören zu den insgesamt fünf Verbindungen aus der Gruppe der Isochromanchinone, die in der Literatur als Metabolite von *Streptomyces griseus* bekannt sind und im Zusammenhang mit ihrer Biosynthese mittels einer aromatischen Polyketidsynthase intensiv untersucht wurden.⁶ Bei den Untersuchungen zur cytotoxischen Aktivität fiel insbesondere die Verbindung EXS036 durch ihre Wirkhöhe (mittlere IC₅₀ = 0.172 mg/mL) und hohe Selektivität im Panel mit 36 Tumorzelllinien auf.

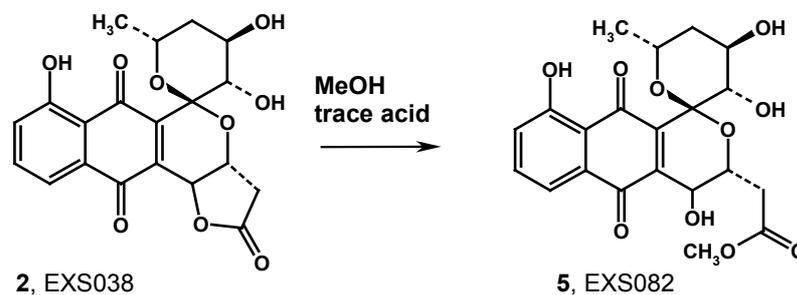


Da die interessanteste Verbindung der Substanzgruppe nur als Nebenprodukt isoliert werden

⁶ a) Tsuji N, Kobayashi M, Wakisaka Y, Kawamura Y, Mayama M. New antibiotics, griseusin A and B. Isolation and characterization. J. Antibiot. 29, 7-9 (1976); b) Igarashi M, Chen W, Tsuchida T, Umekita M, Sawa T, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T. 4'-Deacetyl(-)-griseusins A and B, new naphthoquinone antibiotics from an actinomycete. J. Antibiot. 48, 1502-1505 (1995).

konnte (**1** 300 mg, **2** 290 mg, **3** 36 mg, **4** 25 mg; alle aus 200 L Kulturbrühe), wurden Studien zur **chemischen Partialsynthese von EXS036 (3)** aus EXS038 (**2**) durchgeführt. Nach Testung verschiedener Oxidationsmittel konnte durch Anwendung des Jones Reagenz (Chromschwefelsäure in Aceton) eine nahezu glatte Umsetzung erreicht werden. Im Zuge dieser Synthesearbeiten konnten außerdem noch weitere strukturell neue Derivate von Griseusin hergestellt werden:

4-Hydroxy-deacetylgriseusin-B-methylester (**5**, EXS082) aus **2**,
4'-Dehydro-4-hydroxy-deacetyl-griseusin-B-methylester (EXS083) aus **3** und
4'-Dehydro-4a,10a-Epoxy-deacetylgriseusin B (EXS084) aus **4**.



Bei den Untersuchungen zur Cytotoxizität dieser neuen Derivate fiel auf, dass wiederum das 4'-Dehydro-Analogon die größte Potenz gegen Tumorzelllinien besitzt (z.B. $IC_{50} = 0.067 \mu\text{M}$ gegen die Melanom-Zelllinie MEXF462NL).

[TEXT entfernt]

Die Darstellung weiterer Detailergebnisse ist aus Gründen des nicht abschließend bewerteten Stoffschutzes vertraulich.

6.5 Biologische Charakterisierung

Die biologische Charakterisierung der Reinsubstanzen lag in den Händen des Kooperationspartners Oncotest. Die Daten besonders relevanter Substanzen sind zudem in den voranstehenden Abschnitt 6.4 aufgenommen worden. Für detailliertere Informationen siehe Abschnitt 7.4.1 im Bericht zum Teilprojekt B.

6.6 Wirkstoffentwicklung

Insbesondere das neue Griseusin-Derivat EXS036 (**3**) hat sich als potentieller Kandidat für eine Wirkstoffentwicklung gezeigt. Vertiefte Untersuchungen, z.B. an Mausmodellen, liegen in den Händen den Kooperationspartners Oncotest.

7. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“.

Alle im Bericht aufgeführten Ergebnisse und Informationen sind vertraulich zu behandeln.

8. Veröffentlichungen der Ergebnisse (Publikationen, Poster, Vorträge)

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“.

Jena, den

(Dr. I. Sattler)



Abschlussbericht zum BMBF-geförderten Verbundvorhaben

„Extreme und ungewöhnliche Habitate als Quellen neuer pharmazeutischer Wirkstoffe mikrobiellen Ursprungs“ („EXTENSION“)

Teilprojekt B „Charakterisierung von Naturstoffen aus ungewöhnlichen Habitaten auf antitumorale Aktivität“

Förderkennzeichen 0312848B

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2002 - 30.04.2005

Inhalt

1.	Einleitung	Seite	B1
2.	Aufgabenstellung	Seite	B1
3.	Rahmenbedingungen	Seite	B2
4.	Planung und Ablauf	Seite	B2
5.	Stand der Wissenschaft und Technik	Seite	B2
6.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	Seite	B3
7.	Erzielte Ergebnisse	Seite	B3
8.	Ergebnisverwertung	Seite	B13
9.	Veröffentlichung der Ergebnisse	Seite	B13

1. Einleitung

Krebs ist nach wie vor die zweit häufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen weltweit. Ungefähr 20 Millionen Menschen leiden an Krebs in Japan, Europa und Nord-Amerika, und 10 Millionen neue Diagnosen werden jährlich weltweit gestellt. In Deutschland liegt die Anzahl der Krebsfälle mit 400.000 neu diagnostizierten Fällen in 2000 auf einem neuen Höchststand⁷. Krebs entsteht durch eine schrittweise Anhäufung genetischer Veränderungen, die neoplastische Zellen aus der zellulären Homöostase, die das normale Zellwachstum steuert, freisetzen. Im Menschen sind 4-6 Mutationen notwendig, um dieses Stadium zu erreichen⁸. Der Phänotyp Krebs beinhaltet eine breite Ansammlung verschiedener Charakteristika, die zusammen das klinische Erscheinungsbild ergeben. Weltweit sind unterschiedliche Muster der Erkrankung zu beobachten. Während in den Entwicklungsländern in Afrika, Latein Amerika und Asien eine Tendenz zu Krebsformen im Bereich von Mund, Rachen, Kehlkopf, Speiseröhre, genauso wie im Bereich von Magen, Leber und Zervix zu beobachten ist, kommen in den entwickelten Ländern (Europa, Nord Amerika, Japan) überwiegend Krebsformen im Bereich von Darm, der weiblichen Brust, Endometrium und Prostata vor. Interessanterweise findet man dieses Muster auch in urbanen Gegenden in Entwicklungsländern wieder. Die weltweit am häufigsten auftretende Krebsform ist das Bronchialkarzinom, das vor allem durch Tabakrauch verursacht wird. In Deutschland steigen die Raten von malignen Melanomen, Darmkrebs und Prostatakrebs an, während die Raten von Magen-, Uterus- und Zervixkarzinomen eher rückläufig sind.

Da für viele Krebsformen keine heilende Therapie verfügbar ist, ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten weiterhin zwingend notwendig. Dies beinhaltet neben Ansätzen in der Immuntherapie, Chirurgie, Bestrahlungstherapie auch weiterhin die Suche nach neuen Wirkstoffen für chemotherapeutische Ansätze. Auch Heute noch spielt die Natur als Quelle für Antitumorsubstanzen eine wichtige Rolle. Ungefähr 62% der kommerziell erhältlichen Antikrebsmittel in Europa und den USA sind Naturstoffe, isoliert aus natürlichen Quellen wie Mikroorganismen (z.B. Doxorubicin, Mitomycin C) oder Pflanzen (z.B. Paclitaxel, Docetaxel)⁹. Auch unter den neuen Substanzen, die sich in verschiedenen Stufen der präklinischen und klinischen Entwicklung befinden, sind viele Naturstoffe. Beispiele hierfür sind die DNA bindende Substanz Ecteinascidin, die Proteinkinase C-Modulatoren Bryostatin-1 und UCN-01, die Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren Marimastat und Batimastat, der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin, sowie die mit Tubulin interagierenden Verbindungen Combrestatin A4 und Etoposid B.

2. Aufgabenstellung

Das Teilprojekt B gehörte zu einem 2+2 Verbundvorhaben, das in Kooperation mit Partnern in Deutschland und in der V.R. China, u.a. der Yunnan University (YIM), Kunming, durchgeführt wurde. Auf deutscher Seite war neben der Oncotest GmbH das Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena beteiligt, das in diesem Projekt federführend tätig war. Ziel des Vorhabens war die Identifizierung neuer Naturstoffe für die Tumortherapie. Als Naturstoff-Quellen fanden dabei neben seltenen Sporactinomyceten auch Pilze Berücksichtigung. Die Isolate stammen aus extremen Habitaten (alkalophil, halophil), aus immergrünen Regenwaldregionen Yunnans, und umfassten zum Teil sehr seltene Gattungen, sowie Endophyten von Pflanzen, die in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung finden.

⁷ Krebs in Deutschland. 4th revised and up-dated Edition. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004 (in cooperation with the Robert-Koch-Institute)

⁸ Hahn, Weinberg: Nature Rev. Cancer 2, 331-341 (2002)

⁹ Newman *et al.* J. Nat. Prod. 66, 1022-1037 (2003)

Aufgabe des Teilprojektes B war es, Proben von Mikroorganismen, welche vom YIM als Reinkulturen nach Deutschland an das HKI transferiert und dort kultiviert und aufgearbeitet wurden, auf ihre Antitumor-Wirkung zu untersuchen. Auf diese Weise sollten neuartige Wirkstoffe für die Tumorthherapie identifiziert werden. Im Einzelnen sollten bei der Oncotest komplexe Proben, d.h. Extrakte aus Kultivierungen von Mikroorganismen, und später daraus isolierte Einzelverbindungen in speziellen Testsystemen an humanen Tumor-Zelllinien und Tumor-Xenografts getestet werden. Durch die Testung von Gesamt-Extrakten aus Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab (Screening-Proben) sollte es möglich sein, frühzeitig Erkenntnis über die Produktion von Verbindungen mit Antitumoraktivität in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen zu gewinnen. Später sollten durch die Testung fraktionierter Extrakte aus Fermentationen im Produktionsmaßstab (Fermentations-Proben) Hinweise im Hinblick auf eine produkt-orientierte Aufarbeitung gewonnen werden. Isolierte Reinsubstanzen sollten in ihrer Wirkung an humanen Tumor-Modellen profiliert werden. Für jeden Teilschritt innerhalb der Testung war es notwendig, geeignete Testroutinen zu etablieren, sowohl die Anzahl und Auswahl der verwendeten Tumormodelle, als auch den Probendurchsatz betreffend. Dazu musste auf Deutscher Seite eine Logistik bezüglich Proben transfer, Testung und Ergebnistransfer zwischen dem HKI und der Oncotest GmbH etabliert werden. Dies war Voraussetzung für einen schnellen Ergebnisrücklauf, der für eine produkt-orientierten Aufarbeitung unabdingbar ist.

3. Rahmenbedingungen

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“, Abschnitt 1.

4. Planung und Ablauf

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“, Abschnitt 2.

5. Stand der Wissenschaft und Technik

Die Oncotest GmbH ist ein kleines, mittelständisches Biotechnologie-Unternehmen mit Sitz in Freiburg. Nach der Ausgründung aus der Universität Freiburg 1992 hat sich das Unternehmen durch seine Expertise in der Antitumor-Testung schnell einen guten Bekanntheitsgrad erarbeitet. Die Oncotest GmbH hat langjährige Erfahrung in der Entwicklung, Charakterisierung und Handhabung von Patienten-abgeleiteten, humanen Tumormodellen. Für die Testung werden überwiegend humane Tumoren eingesetzt, die direkt vom Patienten abgeleitet sind. Diese können als Xenograft, d.h. als solider Tumor mit Stroma und Gefäßsystem, auf immundefizienten Nacktmäusen kultiviert werden und stehen somit wiederholt für Testungen zur Verfügung. Die Tumoren haben sich im Hinblick auf Histologie und Chemosensitivität als sehr viel konstanter erwiesen im Vergleich zu Tumoren, die von kommerziellen, permanenten Tumor-Zelllinien abgeleitet sind. Bei *in vivo* Testungen mit Patienten-abgeleiteten Xenografts in der Nacktmaus konnte eine hohe Übereinstimmung mit der Tumorantwort beim Patienten in der Klinik nachgewiesen werden. Reagierte der Tumor im Patienten mit einer Remission, so wurde in 90% der Vergleiche das gleiche Ergebnis in der Nacktmaus gefunden. Zeigte der Tumor im Patienten eine Progression, so wurde dies in 97% auch bei der Nacktmaus erzielt¹⁰. Die für Antitumor-Testungen eingesetzten, selbst entwickelten Testmodelle und Testverfahren haben eine große internationale Akzeptanz gefunden^{11,12}. Kooperationsprogramme bestehen seit über

¹⁰ Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumor xenografts: correlation of *in vitro* to *in vivo* activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J. Cancer* 40, 802–820 (2004)

¹¹ Fiebig HH, Berger DP, Dengler WA, Wallbrecher E, Winterhalter BR. Combined *in vitro/in vivo* test procedure with

10 Jahren mit dem National Cancer Institut der USA (NCI) sowie der European Organisation on Research and Treatment of Cancer (EORTC), zwei Organisationen, die weltweit führend bei der Substanzentwicklung in der Onkologie sind. In den letzten Jahren wurden mehrere Substanzen bei der Oncotest als wirksam getestet, die sich heute in der klinischen Prüfung befinden.

6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit mit dem Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena, hat sich als sehr fruchtbar erwiesen. Durch die Zusammenführung der Kernkompetenzen Naturstoffisolierung und Strukturaufklärung seitens des HKI, sowie der Testung der Proben bei der Oncotest GmbH, konnte die Gesamtstrategie der Produkt-orientierten Aufarbeitung optimal umgesetzt werden. Dadurch war es möglich, schon in frühen Stadien im Primärscreening Mikroorganismen zu identifizieren, die antitumoral wirksame Verbindungen produzieren, und dann gezielt Aufarbeitungsstrategien zu wählen, die zur Darstellung aktiver Reinsubstanzen führten.

7. Erzielte Ergebnisse

7.1 Etablierung von Testroutinen

Die unterschiedlichen Testabschnitte innerhalb des Projektes machten es notwendig, geeignete Testabläufe zu etablieren, um möglichst effizient Informationen aus den unterschiedlichen Proben zu erzielen (Abb. 1). Da die bereits vorhandene, technologische Testplattform bei Oncotest verwendet werden konnte, lag der Schwerpunkt in der Auswahl geeigneter Tumormodelle für die Testung in den einzelnen Testabschnitten.

Im ersten Abschnitt des Projektes wurden in einem Primärscreen Gesamtextrakte aus Mikroorganismen auf Antitumoraktivität charakterisiert, indem die Hemmung des Wachstums von Tumorzellen in einem Propidiumjodid-Assay untersucht wurde¹³. Da durch Variation der Kulturbedingungen und getrennter Extraktion von Kulturfiltrat und Biomasse am HKI eine Vielzahl von Gesamtextrakten generiert wurde, war es wichtig, einen hohen Durchsatz zu erzielen und gleichzeitig möglichst selektive Ergebnisse zu generieren. Für den Primärscreen wurde ein Screening-Panel von 6 Tumor-Zelllinien bestimmt, die sich in ihrer Chemosensitivität gegenüber Standardverbindungen unterscheiden. Die Zelllinien von Bronchialkarzinom (LXFL529L) und Mammakarzinom (MAXF 401NL) waren durchschnittlich eher sensitiv, Zelllinien von Melanom (MEXF 462NL) und Uteruskarzinom (UXF 1138L) waren mittelgradig sensitiv, und Zelllinien von Magenkarzinom (GXF 251L) und Nierenkarzinom (RXF 486L) waren eher resistent (Abb. 2). Weiter wurde in Vorversuchen die optimale Testkonzentration für die Extrakte ermittelt. Diese lagen standardisiert, 50-fach konzentriert bezogen auf das Kulturvolumen vor. Durch Titrationsexperimente konnte eine Endverdünnung von 1:1000 im Assay ermittelt werden, bei der eine sinnvolle Anzahl an aktiven Proben (Hitrate ca. 15%) gefunden werden konnte. Extrakte mit genereller Zytotoxizität hemmten alle Zelllinien in gleichem Maße, Extrakte mit selektiver Aktivität waren in sensitiven Zelllinien aktiver als in resistenten Zelllinien. Das Screening-Panel wurde für alle Fragestellungen mit komplexen

human tumor xenografts. In: Fiebig HH, Berger DP (eds). Immunodeficient Mice in Oncology. Karger, Basel, *Contrib. Oncol.* 42, 321-351 (1992)

¹² Fiebig HH, Burger AM. Human tumor xenografts and explants. In Teicher BA, ed. Tumor Models in Cancer Research. Totowa, Humana Press, 113–137 (2001)

¹³ Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs* 6, 522-532 (1995)

Proben, d.h. Gesamtextrakte und fraktionierte Extrakte, aus Kultivierungen im Schüttelkolben bzw. Fermenter verwendet.

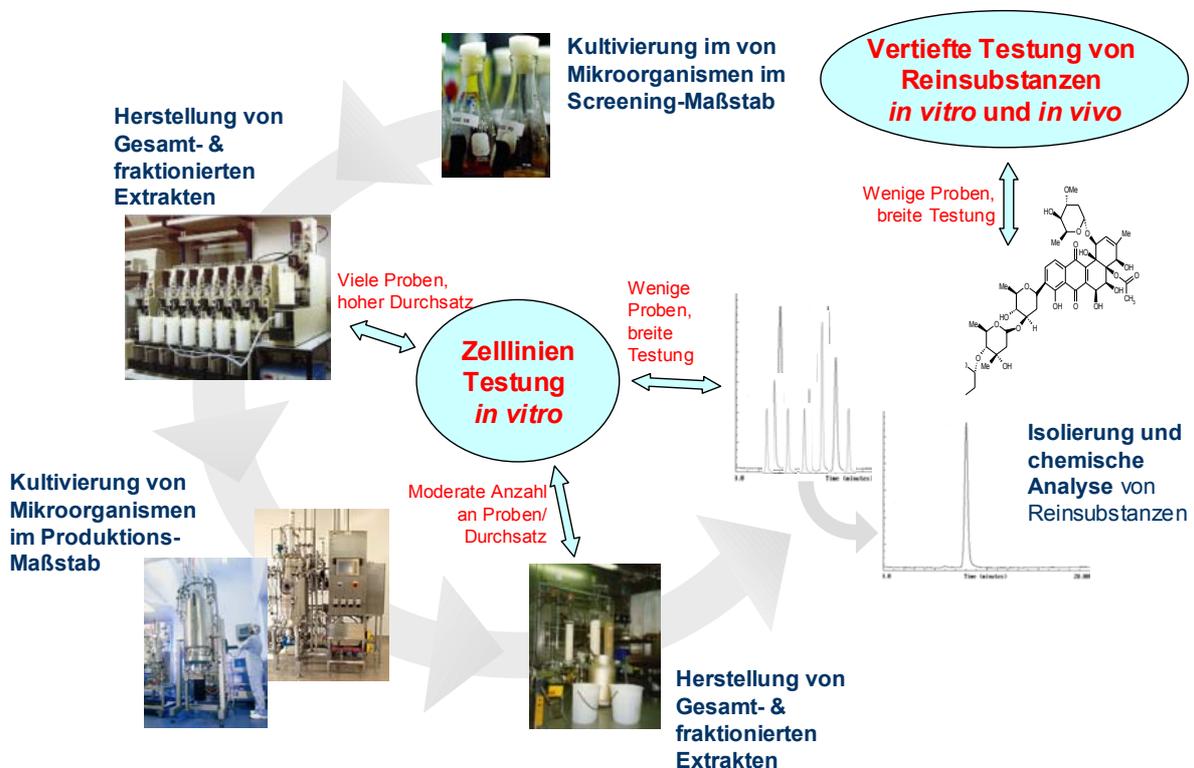


Abbildung 1: Übersicht Testabschnitte, Testabläufe (blau: Arbeiten am HKI, rot: Arbeiten bei Oncotest).

Für detailliertere Fragestellungen mit isolierten Reinsubstanzen, von denen nicht so viele Proben wie im Vergleich zu den Extrakten zu erwarten waren, wurde zunächst das Tumorzell-Panel im Propidiumjodid-Assay auf bis zu 37 Tumorzelllinien erweitert. Damit war es möglich einen repräsentativen Querschnitt an unterschiedlichen Tumortypen auf Sensitivität gegenüber Testsubstanzen zu untersuchen. Die 37 Zelllinien umfassten insgesamt 14 verschiedene Tumortypen, wie Karzinome von Blase, Darm, Magen, Kopf/Hals, Lunge, Brust, Ovar, Pancreas, Prostata, Niere und Uterus, sowie Glioblastome, Melanome und Pleuramesotheliome. 24 der 37 Zelllinien wurden von Xenografts der Oncotest Tumorsammlung abgeleitet, 13 Zelllinien wurden von Zellbanken bezogen. Eine Übersicht über alle verwendeten Zelllinien gibt Tabelle 1. Als wichtige Parameter für Antitumoraktivität wurden die Antitumorpotenz, d.h. die allgemeine Hemmstärke, sowie die Antitumorselektivität (besondere Wirkung an einzelnen Zelllinien = Aktivitätsmuster) bestimmt. Während der Projektlaufzeit wurde bei Oncotest eine Datenbank generiert, in der die Testdaten von ca. 100 unterschiedlichen Standardverbindungen mit verschiedenen, bekannten Wirkmechanismen an diesen 37 Zelllinien abgelegt sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivitätsmuster von Verbindungen mit gleichem Wirkmechanismus sehr ähnlich sind. Daher konnte durch Vergleiche der Aktivitätsmuster von Substanzen, die im Laufe des Projektes isoliert wurden, mit diesen Standardsubstanzen ein Rückschluss auf einen wahrscheinlichen Wirkmechanismus gezogen werden (COMPARE-Analyse).

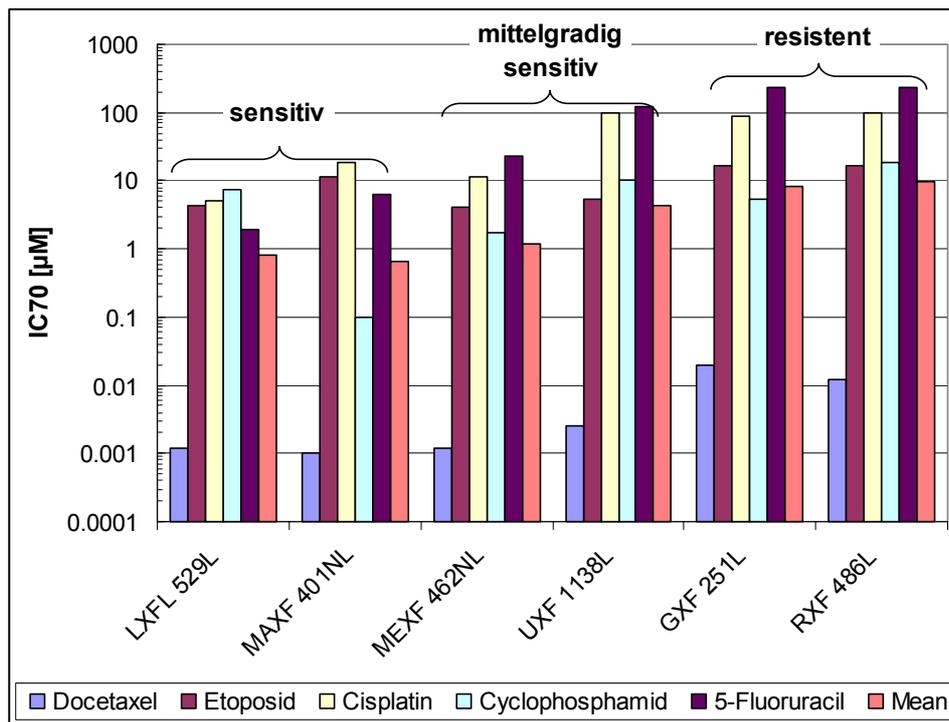


Abbildung 2: Übersicht der humanen Tumor-Zelllinien im Screening-Panel und ihre Empfindlichkeit gegenüber 5 ausgewählten Standardsubstanzen.

Reinsubstanzen, die in ihrer Wirkung an Tumor-Zelllinien potent und selektiv waren wurden in einem zweiten *in vitro* Testsystem untersucht, dem Kolonie-Assay, in dem die Hemmung der Koloniebildung von Tumorstammzellen gemessen wird. In diesem Testsystem werden nicht permanente Zelllinien, sondern Zellsuspensionen verwendet, die frisch aus soliden Tumor-Xenografts hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial können theoretisch alle Tumoren verwendet werden, die *in vivo* kultiviert werden können, was die Testung an einer grossen Anzahl verschiedener Tumore ermöglicht. Der Kolonie-Assay spiegelt die *in vivo* Situation gut wieder und es hat sich gezeigt, dass der Test eine gute Vorhersagekraft für Sensitivität oder Resistenz *in vivo* besitzt^{10,14,15,16}. Die korrekte Vorhersage für Resistenz liegt bei 90%, die korrekte Vorhersage für Sensitivität zwischen 60 und 70%. Der Test dient dazu, sensitive Tumormodelle für nachfolgende *in vivo* Untersuchungen zu identifizieren, und resistente Tumormodelle von der Testung auszuschliessen. Ausserdem wurden Reinsubstanzen *in vitro* in ihrer Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen und auf Induktion von Apoptose mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Im letzten Schritt wurden Verbindungen im Tierversuch an Tumor-tragenden Tieren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Wachstum von soliden Tumoren zu hemmen. Die Kandidatentumoren wurden im Kolonie-Assay identifiziert. Diese Tierversuche spiegeln die Situation in der Klinik sehr gut wieder. Die korrekte Vorhersage für Resistenz beim Patienten liegt hier bei 97%, die korrekte Vorhersage für Sensitivität bei 90%¹⁰. Für Verbindungen, die im Tierversuch aktiv sind, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche klinische Weiterentwicklung.

¹⁴ Von Hoff DD. Human tumor cloning assays: application in clinical oncology and new antineoplastic agent development. *Cancer Met. Rev.* 7, 357–371 (1988)

¹⁵ Berger DP, Henß H, Winterhalter BR, Fiebig HH. The clonogenic assay with human tumor xenografts: evaluation, predictive value and application for drug screening. *Ann. Oncol.* 1, 333–341 (1990)

¹⁶ Scholz CC, Berger DP, Winterhalter BR, Henß H, Fiebig HH. Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumor xenografts. *Eur. J. Cancer* 26, 901–905 (1990)

Tabelle 1: Übersicht Zelllinien.

Tumortyp	Name	Herkunft *)	Primärscreen (n = 6)	Testung von Reinsubstanzen (n = 37)
Blase	BXF 1218L	Xenograft		X
	BXF T24	ATCC		X
Glioblastom	CNXF 498NL	Xenograft		X
Colon	CXF HCT116	NCI		X
	CXF HT29	NCI		X
Magen	GXF 251L	Xenograft	X	X
Kopf/Hals	HNXF 536L	Xenograft		X
Lunge	LXF 1121L	Xenograft		X
	LXF 289L	Xenograft		X
	LXF 526L	Xenograft		X
	LXF 529L	Xenograft	X	X
	LXF 629L	Xenograft		X
	LXF H460	NCI		X
Brust	MAXF 401NL	Xenograft	X	X
	MAXF MCF7	NCI		X
	MAXF MDAMB231	ATCC		X
	MAXF MDAMB468	NCI		X
Melanom	MEXF 276L	Xenograft		X
	MEXF 394NL	Xenograft		X
	MEXF 462NL	Xenograft	X	X
	MEXF 514L	Xenograft		X
	MEXF 520L	Xenograft		X
Ovar	OVXF 1619L	Xenograft		X
	OVXF 899L	Xenograft		X
	OVXF OVCAR3	NCI		X
Pancreas	PAXF 1657L	Xenograft		X
	PAXF PANC1	ATCC		X
Prostata	PRXF 22RV1	ATCC		X
	PRXF DU145	NCI		X
	PRXF LNCAP	DSMZ		X
	PRXF PC3M	NCI		X
Pleuramesotheliom	PXF 1752L	Xenograft		X
Niere	RXF 1781L	Xenograft		X
	RXF 393NL	Xenograft		X
	RXF 486L	Xenograft	X	X
	RXF 944L	Xenograft		X
Uterus	UXF 1138L	Xenograft	X	X

*) ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

NCI: National cancer Institute, Bethesda, MD, USA

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

7.2 Testergebnisse des Primärscreen

Im *in vitro* Primärscreen auf antitumorale Aktivität wurden bei der Oncotest während der Projektlaufzeit 5640 Extrakte aus Kultivierungen im Schüttelkolben am Screening-Panel mit 6 Tumor-Zelllinien getestet. Bei den Proben handelte es sich um Extrakte aus Kultivierungen von Mikroorganismen in unterschiedlichen Medien, als Myzel- oder Kulturfiltratprobe, die mittels Festphasenextraktion gewonnen wurden.

In vitro antitumor activity of extracts 1-96 from plate 00EX000010 in a panel of 6 human tumor cell lines

source rack: 00EX000 010				source rack: 00EX000 010												
plate ID: CS201k-CS206k/CS2011-CS206l				plate ID: CS221k-CS226k/CS2211-CS226l												
reader ID: OCT16_75/OCT16_81				reader ID: OCT23_62/OCT23_68												
compound	% act.*	No. of cell lines T/C<30%	mean T/C [%]	s.d. [%]	compound	% act.*	No. of cell lines T/C<30%	mean T/C [%]	s.d. [%]	1. + 2. Run mean T/C [%]	total act.*	% act.*	HKI No.	YIM No.	Strain No.	Medium
1	00EX000010 A06	83	10	13	00EX000010 A06	100	0	2	5	11	92	11016	8453	GT20021183	M01	
2	00EX000010 F11	83	12	13	00EX000010 F11	100	4	3	8	11	92	11061	8579	GT20021010	M01	
3	00EX000010 A02	83	15	23	00EX000010 A02	83	6	12	10	10	83	10984	8503	GT20021094	M01	
4	00EX000010 B02	83	17	33	00EX000010 B02	83	11	22	14	10	83	10985	8502	GT20021094	M10	
5	00EX000010 B06	83	17	10	00EX000010 B06	83	15	13	16	10	83	11017	8455	GT20021177	M01	
6	00EX000010 E02	83	16	12	00EX000010 E02	83	19	13	17	10	83	10988	8506	GT20021106	M02	
7	00EX000010 E05	83	17	14	00EX000010 E05	67	24	19	20	9	75	11012	8433	GT20021123	M01	
8	00EX000010 E11	83	22	35	00EX000010 E11	67	21	27	21	9	75	11060	8578	GT20021009	M10	
9	00EX000010 G07	100	1	2	00EX000010 G07	50	26	8	14	9	75	11030	8423	GT20021120	M02	
10	00EX000010 B11	67	22	23	00EX000010 B11	67	24	28	23	8	67	11057	8575	GT20021008	M10	
23	00EX000010 F12	17	80	26	00EX000010 F12	0	85	20	82	1	8	11069	8587	GT20021013	M10	
24	00EX000010 G11	17	62	22	00EX000010 G11	0	69	22	66	1	8	11062	8580	GT20021010	M02	
25	00EX000010 A01	0	93	11	00EX000010 A01	0	112	11	102	0	0	10976	8494	GT20021089	M01	
26	00EX000010 A04	0	98	16	00EX000010 A04	0	98	16	94	0	0	10992	7690	GT20021088	M02	

Abbildung 3: Primär-Screen. Antitumoraktivität von Gesamtextrakten aus Kultivierungen von Mikroorganismen im Schüttelkolben (Aktivität an Tumorzellen ist in den Spalten links graphisch durch einen Punkt gekennzeichnet).

Ein Extrakt wurde als potent oder aktiv bezeichnet, wenn das Wachstum von mehr als 3 der 6 Tumor-Zelllinien um mehr als 70% gehemmt wurde (T/C-Werte <30%). Eine besonders selektive Hemmwirkung (d.h. Wachstumshemmung einzelner, resistenter Zelllinien) wurde ebenfalls berücksichtigt. Insgesamt wurden im Primärscreen 808 aktive Proben gefunden, was einer Hitrate von 14,3% entspricht. Die aktiven Proben repräsentierten mehr als 200 verschiedene Stämme von Mikroorganismen.

Als Beispiel ist in Abbildung 3 das Ergebnis der Testung von Screeningplatte 10 gezeigt, bei der u.a. Extrakte von Stamm GT20021094, kultiviert in 2 verschiedenen Medien (M01 und M10), eine gute Antitumoraktivität zeigten.

Im zweiten Teil der Projektlaufzeit wurden im Rahmen einer Zusatzvereinbarung mit dem chinesischen Projektpartner (YIM) nochmals 4600 Extrakte am Screening-Panel getestet, von denen 494 Proben (= Stämme) Antitumoraktivität zeigten (Hitrate = 10,7%). Die Sondervereinbarung sah vor, dass aktive Stämme zu je ca. 1/3 zwischen den beteiligten Partnern YIM, HKI und Oncotest aufgeteilt werden.

7.3 Testergebnisse der Produkt-orientierten Aufarbeitung

Stämme, die im Primärscreen durch ihre aktiven Extrakte aufgefallen waren, wurden dann im nächst grösseren Massstab in Rührfermentern (20 L) kultiviert. Fraktionierte Extrakte aus Proben dieser Kultivierungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen wurden, wurden wiederum am Screening-Panel mit 6 Tumor-Zelllinien getestet um zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen die antitumorale Aktivität in Extrakten wieder zu finden ist.

In vitro antitumor activity of extracts 1-96 from plate 00EX000 016 in 6 human tumor cell lines

source rack: 00EX000 016		dose level: extract 1:330								
plate ID		No. of cell lines: 6								
reader ID		1. run								
compound	% act.*	No. of cell lines T/C<30%	mean T/C [%]	s.d. [%]	cell line: Tumor Typ / Name / FU control					
					LXFA 629L	LXFL 529L	MAXF 401NL	MEXF 462NL	RXF 944L	UXF 1138L
1 00EX000016 A01	100	••••••	3	2	2	2	4	2	6	2
2 00EX000016 F01	100	••••••	7	6	2	17	2	3	7	10
3 00EX000016 C01	100	••••••	7	8	5	23	3	3	4	7
4 00EX000016 D01	100	••••••	9	9	3	22	1	4	4	19
5 00EX000016 B01	67	•••••	27	38	5	63	3	3	3	88
6 00EX000016 E01	67	•••••	32	37	16	67	4	6	10	89
7 00EX000016 A04	0		94	12	106	107	87	86	79	98
8 00EX000016 B04	0		104	14	129	97	95	91	107	101
9 00EX000016 E04	0		106	16	93	87	123	127	101	104
10 00EX000016 F04	0		107	13	111	105	85	126	112	104
11 00EX000016 C04	0		110	33	103	116	170	73	109	88
12 00EX000016 D04	0		110	25	104	109	158	108	92	89
13 00EX000016 B02	100	••••••	2	1	1	1	2	3	4	2
14 00EX000016 G01	100	••••••	3	2	2	2	3	4	7	3
15 00EX000016 A02	100	••••••	5	4	1	11	3	3	7	4
16 00EX000016 C02	67	•••••	14	16	3	36	3	4	3	33
17 00EX000016 D02	83	••••••	15	14	41	17	3	7	4	16
18 00EX000016 H01	50	•••••	43	44	63	92	2	5	6	92
19 00EX000016 D05	0		88	17	111	95	101	69	70	81
20 00EX000016 B05	0		94	9	83	98	85	92	102	104
21 00EX000016 C05	0		102	14	125	100	108	85	91	105
22 00EX000016 H04	0		105	21	89	118	141	95	98	88
23 00EX000016 A05	0		108	3	108	109	110	113	104	109
24 00EX000016 G04	0		122	28	100	122	176	99	120	115

Fraktion

Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
100% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
60% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
70% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
40% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
80% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M01
Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
40% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
80% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
100% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
60% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
70% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 4. Tag	GT20021094 M10
80% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
60% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
100% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
Mycel	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
40% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M01
Mycel	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10
80% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10
100% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10
40% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10
60% Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10
Kulturfiltrat	Fermenterprobe, 5. Tag	GT20021094 M10

Abbildung 4: Antitumoraktivität von fraktionierten Extrakten aus Kultivierungen von Mikroorganismen im 20 L-Fermenter (Aktivität an Tumorzellen ist in den Spalten links graphisch durch einen Punkt gekennzeichnet).

Während der Projektlaufzeit wurden 672 Extrakte aus Kultivierungen im 20 L-Fermenter am Screening-Panel mit 6 Tumor-Zelllinien getestet.

In Abbildung 4 ist beispielhaft das Ergebnis der Testung von fraktionierten Extrakten des Stammes GT20021094 gezeigt, der in 2 verschiedenen Medien (M01 und M10) im Fermenter kultiviert wurde. Die Proben wurden nach 4 bzw. 5 Tagen genommen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Produktion antitumoral wirksamer Verbindungen im 20 L-Fermenter in Medium M01, nicht aber in Medium M10 stattgefunden hat. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse aus dem Screening bestätigt und Bedingungen für die nachfolgende Fermentation im Produktions-Fermenter (300 L) identifiziert werden.

Kandidaten-Stämme, deren Extrakte aus Kultivierungen im 20 L-Fermenter Antitumoraktivität zeigten, wurden dann am HKI unter den gefundenen Bedingungen im Produktionsmassstab für die Substanzisolierung in Fermentern mit bis zu 300 L Kulturvolumen kultiviert. 89 gefriergetrocknete Proben (Kulturfiltrat- oder Myzelfraktionen) aus insgesamt 21 unterschiedlichen Fermentationen im Produktionsmassstab wurden auf Antitumoraktivität überprüft. Dies ermöglichte eine Qualitätskontrolle der Fermentation und es wurden Hinweise gesammelt für effiziente Aufarbeitungsstrategien, z.B. Lokalisation des aktiven Prinzips im Myzel oder Kulturfiltrat, sowie Extraktion/Chromatographie des aktiven Prinzips mit unterschiedlichen Methanolanteilen.

no. Stamm Nr.	Proben Nr.	Testcode	Antitumor-Aktivität*		interessante Fraktionen	
			6.0 µg/ml	60.0 µg/ml		
1	GT 2002 1094	EX 36 / 1-3	EXF3613	0/6	0/6	
2	GT 2002 1094	EX 36 / 4	EXF364	0/6	0/6	
3	GT 2002 1094	EX 36 / 5	EXF365	0/6	3/6	x
4	GT 2002 1094	EX 36 / 6	EXF366	0/6	4/6	x
5	GT 2002 1094	EX 36 / 7	EXF367	1/6	6/6	x

* - (T/C > 50%), + (30% < T/C < 50%), ++ (10% < T/C < 30%), +++ (T/C < 10%), see individual test results, Antitumor activity: Active (++, +++) / Total tumor models tested.

Abbildung 5: Antitumoraktivität von fraktionierten Extrakten aus der Kultivierung von Stamm GT20021094 im 300 L-Fermenter.

Abbildung 5 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Testung von fraktionierten Extrakten des Stammes GT20021094. Die Antitumoraktivität konnte in bestimmten Fraktionen gefunden werden. Damit konnte die Isolierung des aktiven Prinzips mittels chromatographischer Methoden am HKI gezielt erfolgen.

7.4 Testergebnisse von Reinsubstanzen

Im Rahmen des Projektes wurden vom HKI 103 Substanzproben bereitgestellt, von denen 83 Verbindungen in der chemischen Struktur bestimmt wurden (dies schloss fünf doppelt isolierte Substanzen ein). Für 24 der 83 Verbindungen konnte am HKI eine chemisch noch nicht beschriebene Struktur bestimmt werden. 6 dieser 24 neuen Strukturen zeigten Antitumorwirkung *in vitro* an humanen Tumorzelllinien (Abb. 6). Zehn Verbindungen zeigten Antitumoraktivität, die bereits beschrieben war (Abb. 6).

Zusätzlich zu den 103 Substanzen wurden nach dem offiziellen Ende der Projektlaufzeit noch 24 weitere Verbindungen zur Testung übergeben. Die biologische Charakterisierung dieser Verbindungen dauert momentan noch an.

	Verbindung inaktiv	Verbindung aktiv
Verbindung bekannt	44	10
Verbindung neu	18	6

Total: n = 78

Abbildung 6: Übersicht über Neuartigkeit und Antitumoraktivität von 78 Reinsubstanzen (doppelt isolierte Verbindungen sind nur einfach gezählt).

7.4.1 Griseusinderivate (EXS035-EXS038, EXS082-EXS085)

Drei der 6 neuen, Verbindungen mit Antitumoraktivität gehörten zu einer chemischen Strukturklasse, den Griseusinen. Sie wurden aus Stamm GT20021094 durch Produkt-orientierte

Aufarbeitung isoliert (s.a. Abb. 3-5). Für diese Verbindungen konnten IC₅₀-Werte zwischen 0,067 µM und 8,897 µM an Tumorzelllinien ermittelt werden (Tab. 2). Griseusine und ihre biologische Aktivität sind in der Literatur seit 1976 beschrieben^{17,18}. Im Rahmen des Projektes wurden neuartige Derivate mit Antitumoraktivität isoliert. Diese wurden während der Projektlaufzeit zum Patent angemeldet (Europäische Patentanmeldung unter dem Aktenzeichen 04 024779.3-2117: „Griseusin derivatives and their use as anticancer agents“). 3 weitere strukturell neuartige Griseusinderivate zeigten keine nennenswerte Antitumoraktivität (Tab. 2).

Tabelle 2: Antitumoraktivität von Griseusin-Derivaten an Tumor-Zelllinien.

Name der Verbindung*	IC ₅₀ [µM]					
	GXF 251L	LXFL 529L	MAXF 401NL	MEXF 462NL	RXF 486L	UXF 1138L
Deacetylgriseusin A (EXS035)	7.615	22.231	0.857	2.798	2.769	20.091
4'-Dehydrodeacetylgriseusin A (EXS036)	0.265	2.668	0.225	0.215	0.195	0.540
<i>4a,10a-Epoxy-deacetylgriseusin B (EXS037)</i>	64.147	71.365	57.986	51.530	64.604	71.365
<i>Deacetylgriseusin B (EXS038)</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Hydroxy-deacetylgriseusin B methylester (EXS082)	0.905	8.897	0.106	0.216	0.663	0.868
4'-Dehydro-4-hydroxy-deacetylgriseusin B methylester (EXS083)	0.085	0.364	0.078	0.067	0.122	0.695
<i>4'-Dehydro-4a,10a-Epoxy-deacetylgriseusin B (EXS084)</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Griseusin A (EXS085)	0.889	6.503	2.149	1.148	1.919	8.060

* Strukturell neue Verbindungen sind kursiv, Verbindungen mit Antitumoraktivität zusätzlich fett markiert; n.d. keine Antitumoraktivität gemessen.

4'-Dehydro-4-hydroxy-deacetylgriseusin B methylester (EXS083) war zwar im Vergleich zu 4'-Dehydro-deacetylgriseusin A (EXS036) an Tumorzelllinien potenter (Tab. 2), bei der Testung im nachfolgenden Kolonie-Assay waren beide Verbindungen jedoch gleich potent und selektiv.

4'-Dehydrodeacetylgriseusin A (EXS036) stellte sich als aussichtsreichste Verbindung heraus. Die weitere Charakterisierung der Substanz an bis zu 37 Tumor-Zelllinien im Propidiumjodid-Assay ergab eine Tumorselektivität für Brustkarzinome, Melanome und Nierenkarzinome bei einer guten Gesamtwirkung (mittlere IC₅₀ = 0,172 µg/ml) (Abb. 7). Ausserdem wurde gefunden, dass die Verbindung ab einer Konzentration von 100 nM Apoptose bei Jurkat-Zellen auslöst.

Die COMPARE-Analyse ergab keine ausreichend gute Korrelation (ρ=0,4) mit dem Aktivitätsmuster bekannter Standardsubstanzen, so dass auf Grund der erhobenen Daten nicht auf einen Wirkmechanismus geschlossen werden konnte.

¹⁷ Tsuji N, Kobayashi M, Wakisaka Y, Kawamura Y, Mayama M. New antibiotics, griseusin A and B. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* 29, 7-9 (1976)

¹⁸ Igarashi M, Chen W, Tsuchida T, Umekita M, Sawa T, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T. 4'-Deacetyl(-)-griseusins A and B, new naphthoquinone antibiotics from an actinomycete. *J. Antibiot.* 48, 1502-1505 (1995)

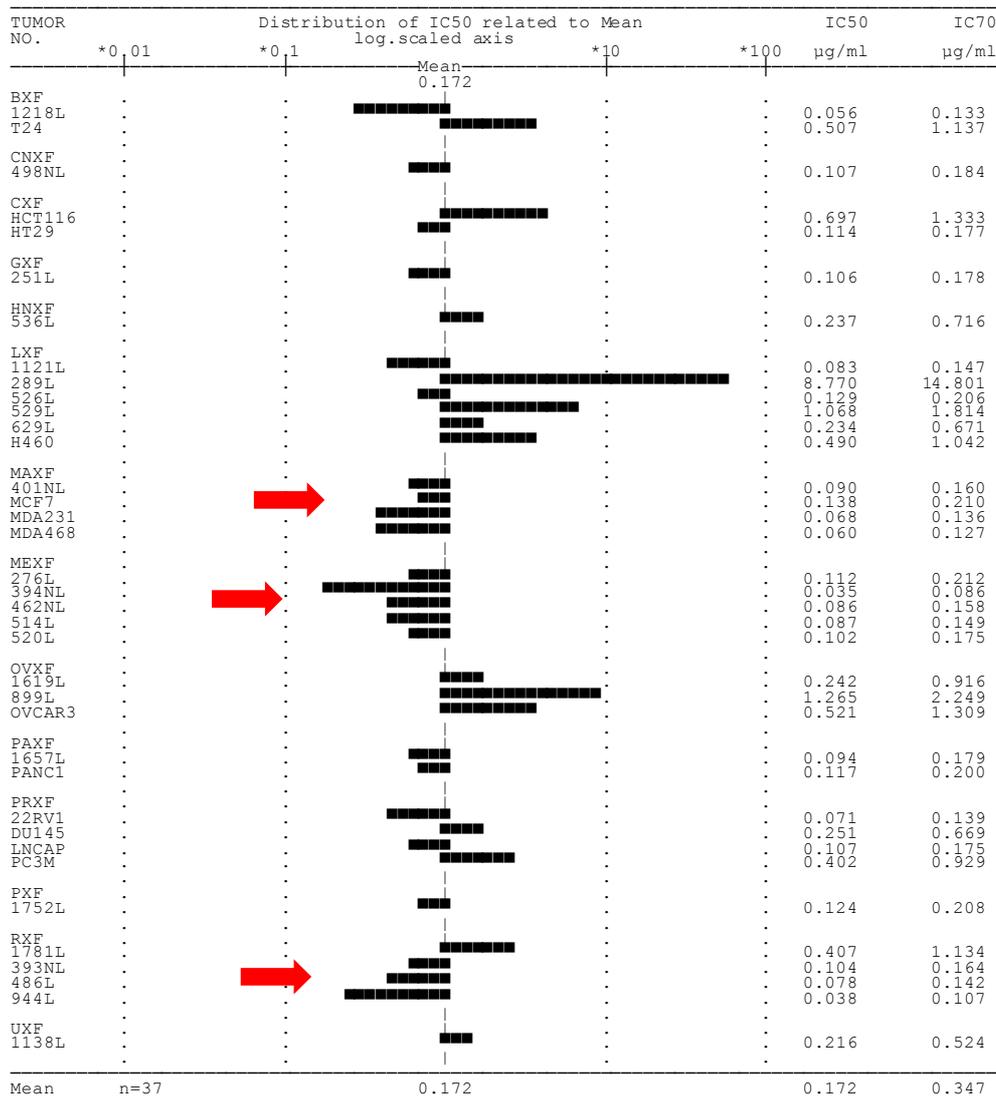


Abbildung 7: Mean Graph Analyse von 4'-Dehydrodeacetylgriseusin A, getestet an 37 Tumorzelllinien *in vitro* im Propidiumjodid-Assay.

Die Testung im Kolonie-Assay bestätigte die gefundene Selektivität von 4'-Dehydrodeacetylgriseusin A für Brustkarzinome, Melanome und Nierenkarzinome aus dem Propidiumjodid-Assay. Zusätzlich zeigte sich eine Selektivität bei Kolon- und Pankreaskarzinomen, sowie bei einem Modell von akuter lymphoblastischer Leukämie (Abb. 8).

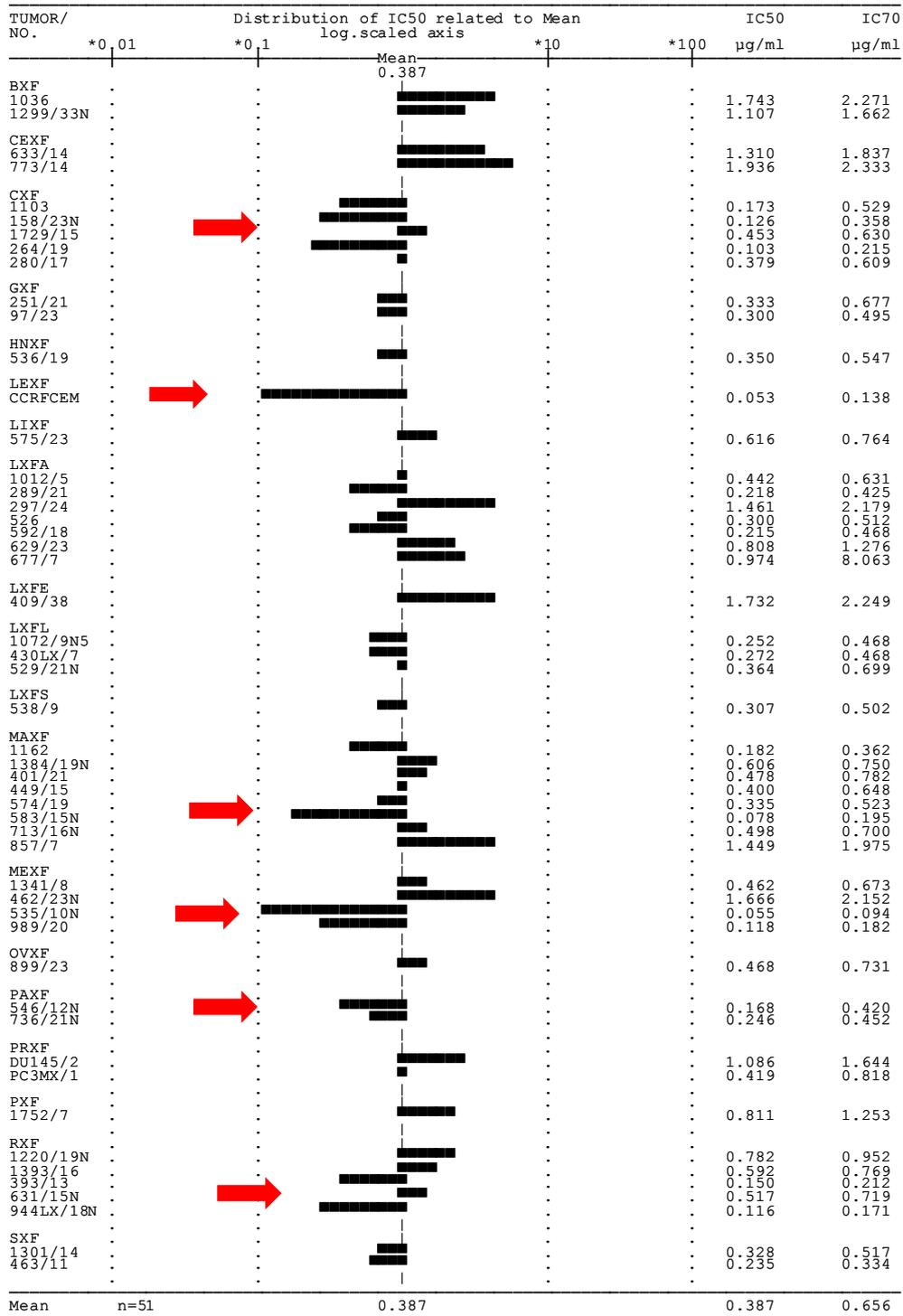


Abbildung 8: Mean Graph Analyse von 4'-Dehydrodeacetylgriseusin A, getestet an 51 Xenografts *in vitro* im Kolonie-Assay.

Die maximal tolerable Dosis von 4'-Dehydrodeacetylgriseusin A bei ip-Applikation in Mäusen wurde mit 10 mg/kg/d bestimmt. Bei dieser Dosis konnte das *in vivo* Tumorwachstum beim Melanom MEXF 989 (T/C = 76%), und beim Kolonkarzinom CXF 1103 (T/C = 67%) leicht gehemmt werden. Optimierungen in der Applikationsroute sowie beim Verabreichungsschema werden zeigen, ob sich dieser Antitumoreffekt noch verbessern lässt.

[TEXT entfernt]

Die Darstellung weiterer Detailergebnisse ist aus Gründen des nicht abschließend bewerteten Stoffschutzes vertraulich.

8. Ergebnisverwertung

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“, Abschnitt 3.

Alle im Bericht aufgeführten Ergebnisse und Informationen sind vertraulich zu behandeln.

9. Veröffentlichung der Ergebnisse

Siehe Teil I „Zusammenfassung des Verbundvorhabens“, Kapitel 4.

Freiburg, den

(Prof. Dr. H.H. Fiebig)