

Schlussbericht zum Leitprojekt
„Diagnose und Therapie mit den Mitteln der Molekularen Medizin“
VaLeTa-1: Suchmaschinen-Technologie (EVOscreen®)
Förderkennzeichen: 01GG9801

I. Aufgabenstellung, Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

Das übergeordnete Ziel des Teilprojektes war eine Effizienzsteigerung des gesamten Wirkstoff-Entwicklungsprozesses auf dem Weg vom Target zum Wirkstoffkandidaten. Basierend auf einem neuartigen, optischen Nachweisverfahren wurde eine „Suchmaschine“ für neue Arzneimittel weiterentwickelt und eingesetzt. Das Teilprojekt gliederte sich in verschiedene Bereiche, die einerseits die technologische Weiterentwicklung des EVOscreen® Systems, der „Suchmaschine“ für neue Wirkstoffe, und andererseits die Implementierung der Technologie im Rahmen konkreter „Drug Discovery“ Programme betrafen.

Während die zum Projektbeginn vorhandene Technologiebasis geeignet war, die Schritte des Primärscreening, Sekundärscreening und Tertiärscreening auf der Ebene miniaturisierter Assays zu integrieren, lag der Schwerpunkt der Weiterentwicklung insbesondere auf der Schaffung technologischer Voraussetzungen für wichtige technische Module des Sekundär- und Tertiärscreenings. Im Fokus stand somit nicht allein der initiale Schritt des ultra-Hochdurchsatzscreenings großer Substanzbibliotheken auf neuen Targets, sondern der gesamte präklinische Wirkstoff-Entwicklungsprozeß mit dem Ziel der Über-Alles-Effizienzsteigerung auf dem vielstufigen Weg zum Wirkstoffkandidaten. Mittels dieser Technologien sollen Flaschenhälse der präklinischen Wirkstoffentwicklung aufgeweitet werden und Voraussetzungen für weitere Anpassungen an die sich rasch verändernden technologischen Randbedingungen geschaffen werden.

Die technologische Weiterentwicklung bestand zum einen aus einer Verbesserung der Durchsatzgeschwindigkeit, der Robustheit und der Präzision des bis zum Start des Projektes bei Evotec entwickelten Screeningsystems und zum anderen aus der Schaffung wichtiger technischer Bausteine zur Erweiterung der zugänglichen Assay-Prinzipien und -Formate insbesondere für Sekundär- und Tertiärscreenings.

Die Implementierung der Technologie im Rahmen von Projekten der präklinischen Wirkstoffentwicklung zielte im wesentlichen auf die Schaffung einer für das Hochdurchsatz-Screening (HTS) notwendigen Infrastruktur und auf die Entwicklung

neuer HTS-tauglicher Assay-Prinzipien für unterschiedliche Targetklassen, die sich aus der Zusammenarbeit mit den anderen Teilprojekten erschlossen und die gesamte Prozesskette vom Primär-Assay bis hin zum Wirkstoffkandidaten betreffen. Hier spielte die Zusammenführung technischer Komponenten und zugrundeliegender physikalischer Verfahren mit komplexen biologischen Fragestellungen eine zentrale Rolle.

Die einzelnen Zielbereiche und Ergebnisse sind nachfolgend nach Arbeitspaketen aufgliedert. Eine umfassendere und detailliertere Darstellung der Ergebnisse ist den einzelnen Bewegungsdatenberichten zu entnehmen.

II. Erzielte Ergebnisse, Nutzen und Verwertbarkeit

Arbeitspakete 4.1 und 4.4

Assay-Entwicklung und Durchführung des Screenings

Über den Zeitraum des Projektes wurde eine Vielzahl neuer Assayverfahren auf der Basis EVOTEC's proprietärer Detektionstechnologien (Arbeitspaket 4.3) entwickelt und auf die von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Targets angewendet. Eine Vielzahl dieser Targets wurde im Anschluss an die Entwicklung eines HTS-tauglichen Assays auf den EVOscreen[®] Systemen gegen Substanzbibliotheken getestet. Die chemischen Verbindungen und Naturstoffextrakte aus den Teilprojekten VaLeTa-8, -9 und -10 wurden in das Lagersystem integriert (Arbeitspaket 4.6) und für das Hochdurchsatz-Screening vorbereitet.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-4

Proteinmodule von Signalkomplexen und deren Liganden als Ansatz für molekulare Intervention.

Ziel dieses Teilprojektes war es, Assay Entwicklung und Hochdurchsatz-Screening auf dem Gebiet der Protein-Protein-Interaktionen durchzuführen, einem für molekulare Intervention schwer zugänglichen Feld. Als Beispiel wurde das für die Signaltransduktion relevante Ras-bindende Protein AF-6 untersucht, welches eine PDZ-Domäne besitzt, die mit dem C-Terminus der Ryk-Rezeptortyrosinkinase interagiert.

In einem miniaturisierten 2D-FIDA-Anisotropie Assay wurde die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Peptidligand an die PDZ-Domäne eines GST-Fusionsproteins charakterisiert und die Inhibition dieser Interaktion durch Substanzen aus Evotec OAI's Bibliothek in einem Hochdurchsatz-Screening getestet. In dem Ansatz wurden

160 Hits bestätigt, die in Sekundär- und Tertiärtests näher charakterisiert wurden. Erste Ergebnisse aus Dosis-Wirkungstitrationen zeigten jedoch, dass die im HTS identifizierten Substanzen wahrscheinlich gleichermassen aktiv gegen PDZ-2 und gegen PDZ-AF6 und somit nicht selektiv sind. Dies muss allerdings noch weiter analysiert werden.

Die hohe Datenqualität (sehr guter mittlerer Z'-Faktor von 0.76 und sehr niedriger Hit-Schwellenwert von 21.2 % Inhibition) belegt, dass die EVOscreen[®] Technologie besonders gut geeignet ist Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen aufzuspüren, da hiermit Hochdurchsatz-Screening bei überdurchschnittlich guten Hit-Schwellenwerten durchgeführt werden kann. Ein niedriger Schwellenwert ermöglicht die Identifizierung schwach affiner Inhibitoren. Erfahrungsgemäss ist die Zahl von Substanzen in einer Substanzbibliothek, bei denen mit starker Inhibitionswirkung auf Protein-Protein-Wechselwirkungen gerechnet werden kann und die das typische physikochemische Profil von Wirkstoffen aufweisen (d.h. den sog. Lipinski-Regeln genügen), sehr gering. Insofern sind auch bereits schwache Inhibitoren eine sehr gute Ausgangsposition für Strukturoptimierungen in dieser Assayklasse und bieten ausserdem eine höhere Wahrscheinlichkeit, völlig neue Strukturklassen von Wirkstoffen zu erschliessen.

Die Bindungsaffinitäten der bisher untersuchten PDZ/Ligand-Paarungen bewegen sich im mikromolaren Bereich. Damit wurde das massgebliche Ziel (Targetfamilien-Assay) erreicht und weitere validierte PDZ-Domänen können nun nach diesem Vorbild mit sehr viel geringerem Entwicklungsaufwand dem Screening zugeführt werden.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-2

Entwicklung von Kaliumkanalassays zur Untersuchung von Substanzen in High-throughput-Verfahren.

Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle in vielen verschiedenen Zelltypen und werden mit verschiedenen Krankheitsbildern des zentralen Nervensystems, des Herzens und des Immunsystems in Zusammenhang gebracht. Im Rahmen dieses Teilprojektes wurden mehrere Assays zur Identifizierung von Kaliumkanal-modulierenden Substanzen entwickelt.

Ein Ansatz beschäftigte sich mit biochemischen Assays. Fluoreszenzmarkiertes Kaliotoxin (ein Skorpiontoxin) wurde als Kanal-Ligand verwendet und dessen selektive Bindung an KcsA-KV1.3 Hybride charakterisiert. Es konnten Assaybedingungen etabliert werden, unter denen die selektive Bindung von fluoreszenzmarkiertem Kaliotoxin an den KcsA-Kv1.3 Kanal gemessen werden

konnte. Mit diesem Verfahren lassen sich Substanzen identifizieren, die mit der Toxin-Bindung an den Kaliumkanal kompetieren.

In einem zweiten Ansatz wurde das beschriebene Prinzip auf ein Zellassay-Format übertragen, in welchem eine KcsA-KV1.3 produzierende Zelllinie verwendet wurde. Ein wichtiger Aspekt für den zellulären Assay ist die hohe Qualität der stabilen Zelllinien. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz konnten wir zeigen, dass - abgesehen von vereinzelt Ausnahmen – alle Zellen der Zelllinie den Kaliumkanal in der Membran tragen. Die Bindung des markierten Liganden an den Kanal wurde über die Gesamtfluoreszenz der Zellen mit Hilfe des Evotec Opera-Readers quantifiziert. Hiermit verfügt Evotec über ein Verfahren, welches ermöglicht, durch den Einsatz von konfokalen Meßmethoden zusammen mit Bildverarbeitungsprogrammen, die Fluoreszenzintensität individueller Zellen zu bestimmen. Ein kritischer Aspekt in Hinsicht auf höheren Durchsatz ist die Beibehaltung der Datenqualität trotz Reduzierung der Assaykomponenten. Im Gegensatz zu Gesamtfluoreszenz-Messungen hat eine Verringerung der Zelldichte nur geringen Einfluss auf den dynamischen Bereich der Messungen mit dem Opera-Reader. Die Übereinstimmung des experimentell ermittelten IC50-Wertes für Margatoxin mit den entsprechenden Literaturdaten belegte die Validität des Assay-Formats.

Mutationen im KCNQ2/KCNQ3 Kaliumionenkanal sind ursächlich mit verschiedenen Erkrankungen, wie z. B. Epilepsy, assoziiert. Wirkstoffe für dieses Target wären zur Behandlung dieser Erkrankungen von grossem Interesse. Als Voraussetzung für Screeningansätze haben wir eine stabile CHO Zelllinie für diesen Ionenkanal hergestellt und anschliessend elektrophysiologisch charakterisiert.

Für den Einsatz unter HTS Bedingungen wurde die Zelllinie mit Membranpotential sensitiven Farbstoffen und bekannten Kanal-interagierenden Substanzen getestet. Under HTS Bedingungen konnten die Effekte der Substanzen Retigabin und Linopirdin reproduzierbar bestimmt werden. Zellen, die den KCNQ2/KCNQ3 Kanal ausbilden, wurden mit dem Membranpotential sensitiven Farbstoff unter Aktivierungsbedingungen inkubiert. Abhängig vom Potential verteilt sich der Farbstoff über die Membran wobei die Fluoreszenzintensität direkt proportional zum Membranpotential ist. In der weiteren Validierung des Assays konnte bestätigt werden, dass Substanzen, die im Fluoreszenzassay als aktiv identifizierte wurden auch unter elektrophysiologischen Bedingungen mit Primärneuronen aktiv sind.

In der Anpassung der Ionenkanal Assayverfahren an die EVOscreen Plattform konnten wichtige Ziele erreicht werden. Der gegenwärtige Stand der Entwicklung erlaubt den Einsatz der zellulären Verfahren für Screeningansätze mit hohem Durchsatz. Die Weiterentwicklung der zellulären Technologien ist eine wichtige Voraussetzung für weitere signifikante Fortschritte bei der Wirkstoffsuche.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-7

Caspasen als Target pro- und antiapoptotischer Therapie.

Caspasen sind die Schlüsselmoleküle der Apoptose. Sie stellen ein vielversprechendes Target pro- und antiapoptotischer Therapie dar. Ziel dieses Teilprojektes war die Entwicklung von Assay-Systemen zur Identifizierung von anti- und pro-apoptotischen Substanzen für die Targetklasse der Caspasen. Im Anschluss an die Entwicklung eines miniaturisierten Assays (Format: 1 μ L) auf Basis von UV-Fluoreszenz im Jahr 2000, wurde im darauffolgenden Jahr eine Verbesserung des Assayformats erzielt. Durch Anwendung des Ausleseverfahrens 2D-FIDA-Anisotropie konnten die Vorteile der konfokalen Detektionsmethoden genutzt werden. Hierfür wurde ein Peptid-Substrat entwickelt, welches neben der Erkennungssequenz der Caspase eine Fluoreszenzmarkierung und eine Domäne mit hohem Molekulargewicht besitzt. Die enzymatische Reaktion und deren Inhibition wurden anhand der unterschiedlichen Polarisierung von Substrat und Produkt verfolgt.

Als Target für einen Hochdurchsatz-Screen wurde Caspase 3 ausgewählt. Nachdem mehrere Pilot-Screens und ein Prescreening von 915 Naturstoffextrakten durchgeführt worden waren, wurde in einem uHTS Ansatz Caspase 3 auf EVOscreen[®] Mark 2 gegen knapp 200.000 Substanzen der Evotec OAI Bibliothek getestet. Die sehr hohe Datenqualität wurde durch einen hohen mittleren Z'-Faktor von 0.79 und einen niedrigen Hit-Schwellenwert von 16.1 % Inhibition belegt. Insgesamt wurden in dieser Screening-Kampagne 229 bestätigte aktive Substanzen identifiziert. Die Ergebnisse der Assay-Entwicklung und des Hochdurchsatz-Screenings zeigen die sehr gute Eignung der EVOscreen[®] Technologie für die Targetklasse der Caspasen. Das beschriebene Assayformat ist auch auf andere Proteasen übertragbar und somit als generisch anzusehen.

In Ergänzung zu dem beschriebenen biochemischen Assay wurden Assays für 10 weitere Caspasen entwickelt, die kompatibel mit der EVOTEC NanoCarrier-Technologie sind und zum Teil hervorragende Screening-Fenster (dynamischer Bereich) aufweisen. Weiterhin wurde ein zellulärer Test entwickelt, durch welchen apoptotische von nicht-apoptotischen Zellen unterschieden und somit Caspase-Inhibitoren identifiziert werden können. Das nicht fluoreszierende Substrat Asp-Rh110-Asp wird in den Zellen (U937 Suspensionszellen) in Asp und fluoreszierendes Rh110 gespalten. Je höher das Niveau der beobachteten Fluoreszenz liegt, umso höher ist die Aktivität der zellulären Caspasen. Das zelluläre Testverfahren eignet sich insbesondere zur Hit-Charakterisierung.

Mit Hilfe des Caspase-3-Assays wurde auch das Evotec Nanostore-Konzept (s.u.) validiert. Abgesehen von generellen Verzögerungen konnten die gesteckten Ziele

erreicht werden. Weitere Caspasen und andere Proteasen können mit dem generischen Ansatz in der Folge mit hoher Effizienz bearbeitet werden.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-5

Entwicklung von Lead/Target Systemen für die Alzheimer Demenz.

Im Rahmen dieses Teilprojektes wurde ein homogener, zellulärer Assay entwickelt, mit dem Wirkstoffe identifiziert werden können, die die Bildung von sekretiertem Amyloid reduzieren. Darüberhinaus eignet sich das Verfahren für diagnostische Anwendungen und die Validierung von Targets, die für die A β -Genese von Bedeutung sind. Für die gleichzeitige Bestimmung von A β 40 und A β 42 wurde ein zellulärer homogener Assay auf der Basis von "Bead Based FIDA" entwickelt.

Entscheidend für die Sensitivität des Assays war die Spezifität und Affinität der hier eingesetzten Antikörper. Verschiedene monoklonale A β -spezifische Antikörper wurden entwickelt, optimiert und bezüglich ihrer Affinitäten und Spezifitäten charakterisiert.

Aufgrund der Komplexität zellulärer Anwendungen im HTS waren für das angestrebte Verfahren technologische Weiterentwicklungen (Mark 3/CellReader) notwendig, die erst gegen Ende des Projektes verwirklicht werden konnten. Die Entwicklung des Assayverfahrens ist weit fortgeschritten und hat generisches Potential in Bezug auf Messungen zellulärer löslicher (sekretorischer) Proteine und Peptide. Für die Charakterisierung von aufgereinigten Antikörpern wurden FCS-Assays entwickelt, während für die Charakterisierung von Antikörpern in Hybridoma-Überständen Bacteria-Based FIDA-Assays etabliert wurden. Alle diese Verfahren haben wichtige generische Bedeutung und finden auf der EVOscreen[®] Plattform eine breite Anwendung. Damit wurden die gesteckten Ziele partiell erreicht bzw. in einigen Punkten übertroffen.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-3

Validierung der therapeutischen Targets bei *Staphylococcus aureus*: Analyse von Funktion und infektionsbiologischer Relevanz.

Die Virulenz pathogener Bakterien und ihr Wirtsspektrum hängen wesentlich von ihrer Fähigkeit ab, an die Wirtszellen zu adhären. Bei der Adhärenz kommt der bakteriellen Zellwand eine essentielle Bedeutung zu, die insbesondere vor dem Hintergrund zunehmender Infektionen durch multi-resistente Gram-positive Bakterien einen interessanten Angriffspunkt für neuartige antimikrobielle Wirkstoffe darstellt. Ein mögliches Target bildet hierbei die erst kürzlich klonierte und beschriebene Sortase von *Staphylococcus aureus*, welche die Oberflächenverankerung einer Reihe von Virulenzfaktoren über ein carboxyterminales LPXTG-Motiv an das

Peptidoglycan katalysiert. Für die Entwicklung eines molekularen Sortase-Assays wurden Substrate hergestellt, die das LPXTG-Motiv und verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe enthalten. Proteolytische Aktivität wurde mit Proteinase K als Modellprotease unter Verwendung von drei verschiedenen Detektionsmethoden untersucht: FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis), Kreuzkorrelation oder FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Neben der Sortase wurde für das Target Carboxypeptidase (pepC) ein Fluoreszenz-basierendes Testverfahren aufgebaut.

Der entwickelte Zellwand Reporter Assay basiert auf der Verankerung eines Lipase-LPXTG Fusionsproteins auf der Zelloberfläche, das nur im freigesetzten Zustand die volle enzymatische Lipase Aktivität zeigt. Die im Peptidoglycan verankerte Lipase weist demgegenüber nur eine residuale - aber immer noch messbare - Aktivität auf. Die Freisetzung des Reporters kann durch Hydrolyse der Peptidoglykan-Schicht, Inhibition des Verankerungsmechanismus oder Defekte im Aufbau der Peptidoglykan-Schicht verursacht werden. Dieses Testsystem wird gleichermassen für die Suche nach neuen Targets und für das Primär- und Sekundärscreening von Substanzlibraries eingesetzt.

Diese Besonderheit des Zellwand Reporter Assays ermöglicht beim Screening nach Wirkstoffen die parallele Messung unterschiedlicher Wirkmechanismen: i) die generelle Zytotoxizität (Wachstumsrate), ii) die Target-gerichtete Wirkung (spezifische Inhibition der Lipase Verankerung) sowie iii) die Inhibition der residualen Lipase Aktivität ohne vorherige Kenntnis über den genauen Wirkort (z.B. generelle Protein Sekretion oder Protein Biosynthese). Diese relativ detaillierten Informationen ermöglichen bereits nach dem Primär-Screening die Einteilung potentieller Hits in verschiedene Wirkstoff-Kategorien.

Zur Validierung und Prüfung der Robustheit des Zellwand Reporter Assays wurde ein Pilotscreening gegen ca. 10.000 Substanzen durchgeführt. Die dabei identifizierten Hits wurden anschliessend im Sekundär-Screening zunächst verifiziert. Zusätzlich wurde die Wirkspezifität gegen Gram-negative Bakterien sowie die Zytotoxizität gegen Leberhepatozyten analysiert. Als Resultat wurden mehrere Substanzen identifiziert die einen stark inhibitorischen Effekt auf die Proteinsekretion und das Wachstum von *S. carnosus* Bakterien zeigten.

Neben der Bestimmung der Reporterenzymaktivität ist die gleichzeitige Bestimmung der Zellzahl ein wichtiger Parameter. Zur Durchführung des Assays im EVOscreen® uHTS-Format werden verschiedene Methoden zur Zellzahlbestimmung in Nanocarriern entwickelt, die auf Streulichtanalyse, Signalabschwächung oder Messung einer physiologischen Aktivität beruhen. Die gesteckten Ziele konnten zum Teil erreicht werden. Verzögerungen resultieren hauptsächlich aus der Komplexität

der Targetvalidierung (molekulare Targets) und der notwendigen technologischen Weiterentwicklung für die Einpassung der zellulären Verfahren.

Assay-Entwicklung in Zusammenarbeit mit VaLeTa-6

Entwicklung von Systemen zur Charakterisierung von Hormonantagonisten und potentiellen Liganden für Orphan-Rezeptoren sowie einer diagnostischen Nachweismethode für nukleäre Rezeptoren.

Die Entwicklung zweier unterschiedlicher Assays für das Screening von funktionellen Steroidhormonrezeptoren wurde, wie vorgesehen, maßgeblich beim Kooperationspartner durchgeführt. Im ersten Assay wurde die direkte Interaktion von rekombinatem alpha-Östrogenrezeptor mit fluoreszenzmarkiertem Östrogen betrachtet. Hierzu wurden drei verschiedene Östrogen-Konjugate hergestellt. Bisher ist es mit den Konjugaten nicht gelungen, Bindung an den rekombinanten Rezeptor zu detektieren. Daher wurde ein zweites Assayverfahren als alternative Strategie begonnen.

Der zweite Assay wird vom Verbundpartner entwickelt und betrachtet die Interaktion zwischen rekombinatem Östrogen-Rezeptor und fluoreszenzmarkierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden, die eine DNA-Bindungsstelle für den Rezeptor enthalten (ERE, "estrogen responsive element"). Das angestrebte neue Verfahren besitzt generisches Potential für die Targetfamilie der nukleären Rezeptoren. Ein Erreichen dieses Zieles würde durch die Übertragbarkeit des Assayprinzips auf weitere Targets die durch die notwendige Neuorientierung bedingte Verzögerung rasch ausgleichen.

Arbeitspaket 4.2

Technologieentwicklung

Bestimmung von logP-Werten und der relativen Reinheit von unbekanntem Substanzen

Die ursprünglich geplante und angelaufene Entwicklung technologischer Komponenten zur Bestimmung der Löslichkeit von Substanzen wurde im ersten Halbjahr 1999 einer kritischen Kosten/Nutzen Betrachtung unterworfen. Daraus ergab sich, daß die fortschreitenden Entwicklungen im Bereich der Cheminformatik insbesondere Struktur-basierenden Vorhersagemethoden die Vorteile von experimentellen Analysen in absehbarer Zeit ausgleichen werden.

Da der Bereich der Cheminformatik sich auch bei Evotec stark entwickeln sollte wurde beschlossen, die geplanten Entwicklungen vorerst zurückzustellen und zu gegebener Zeit evtl. neu zu evaluieren. Die dadurch frei werdenden Kapazitäten

wurden vollständig auf die technischen Entwicklungen zur Durchsatz- und Qualitätssteigerung der Bioverfügbarkeitsanalytik und auf die technischen Entwicklungen zur Handhabung zellulärer Systeme fokussiert.

Bioverfügbarkeit / ADME/tox

Die in einem primären Hochdurchsatz-Screening identifizierten aktiven Substanzen (Hits) werden in anschliessenden Sekundär- und Tertiärassays daraufhin getestet, ob sie geeignete pharmakologische Voraussetzungen für die kostenträchtige Weiterentwicklung zu Leitstrukturen und Wirkstoffkandidaten besitzen. Da in HTS-Kampagnen üblicherweise eine grosse Zahl an Hits (ca 500 bis 5.000) identifiziert werden, sollten die Folgeassays idealerweise ebenfalls in einem miniaturisierten und für hohe Durchsätze geeigneten Format vorliegen.

Neben Selektivitäts- und Wirkmechanismus-Studien werden sog. ADME/Tox-Tests durchgeführt, die Fragestellungen der Wirkstoffaufnahme (**A**dministration), der Verteilung im Körper (**D**istribution), des **M**etabolismus, der Ausscheidung (**E**xkretion) und der Substanz-**T**oxizität zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der Wirkstoffentwicklung beantworten sollen.

Die Entwicklung eines automatisierten und auf 96 well-Format miniaturisierten Assays zur Messung der gastrointestinalen Bioverfügbarkeit von Substanzen unter Verwendung des CaCo-2 Zellsystems wurde im Verlauf des Leitprojekts unterbrochen. Stattdessen steht heute ein Standard-CaCo-2 Assay im 24 well-Format für Routineuntersuchungen der Bioverfügbarkeit zur Verfügung.

Wirkstoff-Distribution: P-Glycoprotein (PgP) Assay

Das Phänomen der „Multidrug Resistance“ (MDR) ist ein komplexer biologischer Prozess, der insbesondere in der Krebsforschung eine wichtige Rolle spielt. Während der Applikation chemotherapeutischer Medikamente ist oft eine steigende Resistenz der Krebszellen über die Zeit der Therapie zu beobachten, die unabhängig von der Struktur und der Funktion des Wirkstoffs ist. Diese Resistenz wird u.a. auf die Aktivität des P-Glycoproteins, eines ATP-abhängigen, membranständigen Proteins zurückgeführt, das zytotoxische Verbindungen aktiv aus der Zelle herauspumpt.

Im Rahmen des ADME/Tox-Programms wurde ein zellulärer Assay entwickelt, der die Aktivität des P-Glycoproteins in Bezug auf die in einem Primär-HTS identifizierten Substanzen charakterisiert. Das nicht-fluoreszierende Substrat Calcein-AM, welches passiv in die die molekulare Pumpe überexprimierenden Zellen diffundiert, wird vom P-Glycoprotein unmittelbar wieder aus der Zelle herausgepumpt. Wird das P-Glycoprotein jedoch durch eine zugegebene chemische Substanz blockiert,

akkumuliert Calcein-AM in der Zelle und wird von intrazellulären Esterasen zu fluoreszierendem Calcein umgesetzt. Der Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz wird mit Hilfe des Opera-Readers quantifiziert.

53.000 Substanzen aus Evotec OAI's Substanzbibliothek wurden im PgP-Assay bei einer Konzentration von 1.25 μM in einer Doppelbestimmung auf EVOscreen[®] Mark 3 getestet. Die sehr gute Korrelation der Ergebnisse der beiden unabhängigen HTS-Läufe und die gute Datenstatistik (mittlerer Z' = 0.6, Hit-Schwellenwert = 15 %) belegen, dass die dritte Generation der EVOscreen[®] Systeme inkl. Opera hervorragend für die Durchführung zellulärer Assays geeignet ist. Dies wurde ebenfalls durch die anschließende Charakterisierung von 180 ausgewählten Substanzen des Primärscreens mittels IC₅₀-Titrations auf der Screeninganlage belegt, deren Ergebnisse sehr gut mit denen des Primärscreens korrelieren.

Wirkstoff-Metabolismus: Inhibition von Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4)

Die Cytochrom P450 Monooxygenasen bilden die wichtigste Enzymklasse des Phase I Metabolismus. In menschlichen Zellen werden mehr als 30 verschiedene P450-Isoenzyme exprimiert, unter denen das Isoenzym 3A4 das bedeutendste ist, da es ca. 40-50% aller Xenobiotika metabolisiert. Die Untersuchung des Metabolismus' von Substanzen spielt eine wichtige Rolle in der Wirkstoffentwicklung. Adverse „Drug-Drug“-Interaktionen an P450 können bei Co-Administration von Medikamenten zu erhöhten und dadurch toxischen Konzentrationen eines Wirkstoffs führen.

Für die 5 wichtigsten P450 Isoenzyme des Menschen (3A4, 2D6, 2C9, 2C19 und 1A2) wurden Inhibitionsassays etabliert, die im 384 well-Format für Wirkstoff-Profilierung mit mittleren Durchsätzen zur Verfügung stehen. Der CYP3A4-Assay wurde darüberhinaus miniaturisiert (Format: 1 μL) und auf das EVOscreen[®] System Mark 2 adaptiert. 110.000 Substanzen der Evotec OAI-Bibliothek wurden gegen CYP3A4 getestet, von denen 1.450 (= 1.3 %) als Inhibitoren identifiziert wurden. Der Assay basiert auf der Verwendung von Insektenzellen-Mikrosomen, in denen humanes CYP3A4 exprimiert wird. In Gegenwart von NADPH und der co-exprimierten NADPH-Cytochrom P450 Reduktase oxidiert CYP3A4 das fluorogene Substrat Benzyloxyresorufinether. Der Verlauf der Reaktion wird anhand des Anstiegs der Fluoreszenz über die Zeit verfolgt.

Wirkstoff-Zytotoxizität

Die Bewertung der potentiellen zytotoxischen Eigenschaften einer Substanz spielt eine wichtige Rolle bei der Auswahl und Optimierung von Leitstrukturen. Hepatotoxizität ist der am häufigsten beobachtete Target-unabhängige toxische Nebeneffekt von Entwicklungskandidaten. Aus diesem Grund werden auf

Leberzellen basierende Assays möglichst unmittelbar im Anschluss an die Identifizierung Target-gerichteter Aktivität angewendet. Im Rahmen dieses Teilprojektes wurde daher ein Assay entwickelt, der die Wirkung von Substanzen auf die Viabilität der Hepatokarzinoma Zelllinie HepG2 quantifiziert. Das Assay-Prinzip beruht auf der Messung der mitochondrialen Aktivität der Zelle, indem die Reduktion von Rezazurin zu Resorufin anhand der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm bestimmt wird. Die Kultivierung der HepG2 Zellen in Probenträgern des 1536 well-Formats wurde mit Hilfe des sog. CultiLids erreicht, eines von EVOTEC entwickelten Kultivierungssystems für adherente Zellen im miniaturisierten HTS. 4.150 Substanzen aus EVOTEC OAI's Bibliothek wurden in Doppelbestimmung sowohl bei einer Konzentration von 5,7 μM als auch bei 40 μM auf EVOscreen[®] Mark 3 getestet. Insgesamt wurden in dieser HTS-Kampagne ca. 20.000 Datenpunkte mit sehr guter Datenqualität (mittlerer Z' = 0.74) generiert. Der Schwellenwert zur Definition von Zytotoxizität wurde bei 50 % Inhibition festgelegt. Bei 5,7 μM wurden nahezu keine Verbindungen als zytotoxisch identifiziert (0.1 % der Substanzen), bei 40 μM liegt die Zahl erwartungsgemäss höher (4 % der Substanzen).

Parallel zu den Entwicklungen von Assaytechnologien wurde die Palette der erforderlichen technischen Module kontinuierlich erweitert. Die in diesem Arbeitspaket angestrebten Ziele konnten mit Ausnahme der Entwicklung von CESCO (Messung der Bioverfügbarkeit) erreicht und in mehreren Punkten übertroffen werden.

Arbeitspaket 4.3

Aufbau der automatisierten EVOscreen[®]-Einheit

Aufbau des Mark 2 und des Mark 3 Systems

Evotec OAI hat seine Screening-Technologie soweit weiterentwickelt, dass die Systeme in der Routine sowohl bei den Technologie-Vertragspartnern als auch intern innerhalb Evotec's Drug Discovery Process eingesetzt werden. Weltweit ist EVOscreen[®] das erste funktionsfähige, voll automatisierte System für Hochdurchsatz-Screening, das eine Wirkstoffsuche im miniaturisierten Massstab (bis zu 1 μL) ermöglicht. Über den gesamten Zeitraum des Leitprojekts wurde Evotec OAI's Screening-Technologie entscheidend weiterentwickelt. Heute werden die Systeme der 2. und 3. Generation (Mark 2 und Mark 3) in der Routine sowohl bei den Technologie-Vertragspartnern als auch innerhalb von Evotec OAI im Prozess der Wirkstoffsuche erfolgreich eingesetzt. Insgesamt wurden bisher sechs Mark 2 Anlagen und drei Mark 3 Anlagen bei drei Pharmaindustriekunden installiert. Für alle

drei Vertragspartner stellen diese Systeme eine sogenannte „enabling technology“ dar, die es ihnen ermöglicht durch Miniaturisierung, Automatisierung und Evotec OAI's proprietärer Einzelmoleküldetektion eine neue Dimension in der Effizienzsteigerung der Wirkstoffsuche zu erreichen.

Die konfokale Detektionstechnologie stellt eine wichtige Kernkompetenz von Evotec OAI dar. Ausgehend von konfokaler Fluoreszenzspektroskopie (FCS) wurden über den gesamten Zeitraum des Leitprojekts weitere konfokale Readout-Methoden entwickelt. 1D-FIDA ermöglicht die Unterscheidung der molekularen Helligkeiten verschiedener fluoreszierender Spezies in einer Probe. Bei 2D-FIDA-Anisotropie wird darüberhinaus zusätzliche Information durch die Analyse der rotationalen Diffusion generiert. Zur Bestimmung unterschiedlicher Fluoreszenzlebenszeiten durch die konfokale Methode „cFLA“ wurden die Evotec-Reader mit gepulsten Laserquellen ausgerüstet. Durch Kombination der eindimensionalen Methoden FCS und 1D-FIDA (= FIMDA) bzw. cFLA und 1D-FIDA (= FILDA) stehen neben 2D-FIDA-Anisotropie heute weitere zweidimensionale konfokale Methoden zur Verfügung.

Die gleichzeitige Anwendung verschiedener Readouts während einer Messung ermöglicht die schnelle Auswahl der optimalen Methode für jeden individuellen Assay in Bezug auf Datenqualität und Sensitivität. Ausserdem wird hierdurch die Reduktion sogenannter „Falsch Positiver“ und „Falsch Negativer“ Screeningergebnisse ermöglicht. Ersteres ist durch Multireadout-Technologie bzw. spezifische Intensitäts-Filtergrenzen möglich, die automatisiert in der Daten-Auswerte-Umgebung ablaufen. Das Konzept der Eintrocknung der Screening-Compounds mit spezifischen solubilisierenden Additiven führt zu einer Verringerung der Rate an falsch-negativen Ergebnissen und hat außerdem den Vorteil, dass es das organische Lösungsmittel DMSO, in welchem die Testsubstanzen prinzipiell gelöst sind, was aber viele (zelluläre) Assays stört, eliminiert.

Ergänzt wird die Familie der EVOscreen[®] Systeme durch die „NACONA“, ein Modul das zur Nano-Fraktionierung von komplexen Naturstoffextrakten in NanoCarrier verwendet wird. Zur Identifizierung biologisch aktiver Naturstofffraktionen werden HPLC-Chromatogramm-Daten mit den zugehörigen Screeningdaten synchronisiert. Die parallele Herstellung von 4 NanoCarriern ermöglicht die Verwendung mehrerer Kopien derselben Fraktionierung in verschiedenen nachgeschalteten Assays. Das beschriebene Verfahren wurde auf Substanzen aus VaLeTa-9 angewendet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind unter „Arbeitspakete 4.1 und 4.4“ beschrieben.

Die entscheidenden Verbesserungen der EVOscreen[®] Systeme durch die Entwicklung der Mark 2 waren die Erhöhung des Probandurchsatzes um den Faktor 5 und eine deutliche Verbesserung der „liquid handling“ Präzision und der gesamten Anlagen-Robustheit im Vergleich zur ersten Generation der Technologie. Belegt

werden diese Fortschritte durch eine sehr hohe Datenqualität, die sich in geringen sog. Hit-Schwellenwerten („threshold“) und hohen Z'-Faktoren widerspiegelt.

Die Fertigstellung dieser zentralen technologischen Komponenten hatte sich aus verschiedenen Gründen (Hightech, Kapazitätsengpässe, Lieferantenprobleme, etc.) gegenüber der ursprünglichen Planung um ca. 1 Jahr verschoben. Damit rückten insbesondere die Screeningansätze im Ablauf des Gesamtprojektes nach hinten. Aufgrund der parallelen Verzögerungen auf der Targetseite stellt dieser Umstand kein Problem für den Verlauf und Erfolg des Gesamtprojekts dar.

Aufbau zelluläre Systeme

Die Entwicklung der technischen Komponenten für die Durchführung von Highthroughput-Screening mit zellulären Systemen wurde nach Abbruch der logP Thematik in das Programm aufgenommen. Im Mittelpunkt der Entwicklung standen Einrichtungen zum schonenden Dispensieren von Zellen sowie ein Reader für zelluläre Systeme als Bestandteil der Mark 3-Einheit.

Durch die Entwicklung der Mark 3, die Ende 2001 erstmals an einen Industriekunden ausgeliefert wurde, stand dann ein Screeningsystem zur Verfügung, das neben den beschriebenen Vorzügen der Mark 2 die Durchführung von Hochdurchsatz-Screening mit zellulären Assay-Systemen im miniaturisierten Massstab ermöglicht. Mit Hilfe eines speziell konstruierten Moduls können Zellen bei hoher Viabilität schnell und präzise in NanoCarrier verteilt werden. Darüberhinaus wurde der Opera Zell-Reader entwickelt, der die Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten auf Einzelzellebene mit subzellulärer Auflösung durch konfokale Messmethoden unter Hochdurchsatz-Screening Bedingungen ermöglicht. So kann beispielsweise mit Hilfe des Opera-Readers Fluoreszenz an der Zellmembran von Fluoreszenz im Cytoplasma einer Zelle unterschieden und quantifiziert werden, wie die Anwendung zur Beobachtung von Rezeptor-Internalisierungsvorgängen zeigt. Die Generierung eines hohen Informationsgehalts in der Wirkstoffsuche, wie bei Beobachtung von intrazellulären Vorgängen der Fall, bezeichnet man auch als „high content screening“.

Der Opera-Reader wird auch als Laborgerät ausserhalb des Hochdurchsatz-Screenings erfolgreich zur Charakterisierung von Leitstrukturen in Sekundär- und Tertiärtests in den dem Hochdurchsatz Screening nachgeschalteten Prozessschritten der Wirkstoffsuche eingesetzt.

Eine weitere Stärke des Mark 3 Systems ist die offene Architektur, die die Implementierung von alternativen Readern und liquid handling Geräten und die Anbindung an handelsübliche Substanzlager ermöglicht. Insgesamt stellt das EVOscreen[®] System Mark 3 somit eine Technologie-Plattform dar, die

miniaturisiertes Hochdurchsatz-Screening mit „high content screening“ in weltweit einzigartiger Art und Weise verknüpft. Auf diese Weise konnte eine Lücke geschlossen werden, die nicht nur bei Evotec OAI bestand sondern bisher generell den Einsatz zellulärer Systeme in der Wirkstofffindung limitierte.

Zu Beginn des 3. Quartals 2000 wurde der Routine-HTS-Betrieb bei Evotec OAI aufgenommen und in einer eigenen operativen Einheit organisiert. Bis dato wurden mehr als 50 HTS-Kampagnen auf den eigenen EVOscreen[®] Systemen durchgeführt und mehr als 18 Millionen Datenpunkte, was ca. 13 Millionen getesteten Substanzen entspricht, generiert. HTS-Kampagnen zellulärer Assayformate werden seit Inbetriebnahme der EVOscreen[®] Mark 3 durchgeführt und haben heute bereits einen Anteil von 30% an der Gesamtheit aller jährlichen HTS-Kampagnen.

Arbeitspaket 4.5

Informatik zur Organisation der Datenbank und Datenanalyse

Die Datenbankstruktur wurde und wird in Zukunft kontinuierlich für die Erfordernisse der Mark 2- und Mark 3-Anlagen erweitert. Die Prozesssteuerdaten wurden so strukturiert, dass sie allgemein aufgebaut sind und einheitlich für alle Teile der Mark-Anlagen verwendet werden können. Es wurden Kontrollstrukturen eingebaut, die die komplette Rekonstruktion der Prozessierung ermöglichen.

Es wurde eine Software-Umgebung („A+“) konzipiert und entwickelt, die die Hochdurchsatz-Screening Ergebnisse und die Daten zur Verwaltung der Substanzbibliotheken miteinander verknüpft und weiterverarbeitet. A+ ermöglicht ausserdem die automatisierte, statistische Analyse der Screeningdaten, die Berechnung und Klassifizierung von IC50-Daten und die automatisierte Erstellung von Berichten über Screeningergebnisse. Darüberhinaus unterstützt A+ die Identifizierung von autofluoreszierenden und Fluoreszenz-löschenden Substanzen, die ansonsten zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen könnten. Alle gesteckten Ziele wurden erreicht.

Arbeitspaket 4.6

Aufbau und Formatierung der Substanzbibliothek

Im operativen Geschäft von Evotec OAI werden derzeit zwei Mark 2-, eine Mark 3- und eine sogenannte MTS-Anlage im Hochdurchsatz-Screening betrieben. Da diese Systeme zusammen einen Durchsatz von bis zu 300.000 Proben pro 24h erzielen, müssen entsprechend im Vorfeld bis zu 3.000 Probenträger im 96 well- oder 384 well-Format bewegt und für den Screeningbetrieb vorbereitet werden. Darüberhinaus werden täglich bis zu 1.000 Substanzen als biologisch/biochemisch aktiv („Hit“) identifiziert und im Anschluss an den Primärscreen für weitere Tests aus der

Substanzbibliothek herausgepickt. Diese gesamte Substanzlogistik wird mit Hilfe eines Compound Storage Systems (CSS) ermöglicht, welches im Verlauf der letzten 5 Jahre systematisch aufgebaut wurde und aus drei Teilen besteht: Substanzlagerung, Reformattiereinheiten und Software. Die zentrale Reformattiereinheit bildet das „BasePlate“-Modul der Firma „The Automation Partnership“, das Ende 2001 in Betrieb genommen wurde und das automatisierte Reformattieren von Proben und Picken von Hits durchführt. Zur Lagerung von derzeit ca. 6,5 Millionen Substanzproben (Evotec OAI und Kunden) wurden insgesamt 20 Kühl- und Gefrierschränke angeschafft. EVOTEC OAI's eigene Substanzbibliothek umfasst derzeit ungefähr 300.000 Verbindungen.

Über den gesamten Zeitraum des Leitprojekts wurden die Substanzen aus den Teilprojekten VaLeTa-8, -9 und -10 in das Lagersystem integriert. Aus Teilprojekt VaLeTa-8 wurden 1.536 Substanzen in Evotec OAI's Substanzbibliothek integriert und für das Hochdurchsatz-Screening vorbereitet. Im Anschluss wurden diese Substanzen in vier verschiedenen EVOTEC-internen HTS-Kampagnen aus zwei verschiedenen Targetklassen und dem ADME/Tox-Gebiet auf EVOscreen[®] Mark 2 getestet. In keinem der aufgeführten Screenings wurden bestätigte aktive Substanzen aus VaLeTa-8 identifiziert. Aus Teilprojekt VaLeTa-9 wurden 15 Naturstoffextrakt in Evotec OAI's Substanzbibliothek integriert und für die Nanofraktionierung mit dem EVOscreen[®] Modul NACONA vorbereitet. 12 der 15 Extrakte wurden mit Hilfe der NACONA in jeweils 336 1µL-Fractionen auf NanoCarrier fraktioniert. Anschliessend wurden diese 12 x 336 Naturstoff-Fractionen auf EVOscreen[®] Mark 2 in einem Hochdurchsatz-Screen zur Suche von Substanzen, die aktivierend auf das Target „Humane Insulin Rezeptor Kinase“ wirken, getestet. Dabei wurden zwei potentiell aktive Fractionen identifiziert, die einer näheren Charakterisierung unterzogen werden können. Im Rahmen des Teilprojektes VaLeTa-10 wurden insgesamt 160 chemische Verbindungen in Evotec OAI's Substanzbibliothek integriert und für das Hochdurchsatz-Screening auf EVOscreen[®] Systemen vorbereitet. Diese Substanzen werden in den nächsten Evotec OAI-internen HTS-Kampagnen auf ihre biologische Aktivität getestet werden.

Zusammen mit der Firma Titian Software Ltd. wurde ein „Plate Storage and Preparation System“ entwickelt, das zum einen alle Informationen über den aktuellen Standort, die Konzentration, Menge und Lagerbedingungen einer jeden einzelnen Substanz zentral speichert und darüberhinaus die automatisierte Durchführung von Reformattieraufträgen ermöglicht. Ausserdem wurde ein Verfahren zur DMSO-freien Lagerung von Substanzen in NanoCarriern entwickelt, das sogenannte „NanoStore“ Konzept. Mit Hilfe eines lösungsvermittelnden Additivs werden auf NanoCarriern eingetrocknete Substanzen bei Zugabe von Assay-

Reagenzien wieder in Lösung gebracht. Im Gegensatz zu DMSO erweist sich dieses Additiv in >90% aller biochemischen Assays als biologisch inert. Das Eintrocknen ermöglicht ausserdem eine langfristige Lagerung über mehrere Monate ohne signifikante Degradation der Substanzen und verleiht mehr Flexibilität im Abauf der logistischen Prozesse.

Für den Aufbau und Formattierung der Substanzbibliothek wurden die gesteckten Ziele erreicht.

Veröffentlichungen (im Projektzeitraum und mit Bezug zu VaLeTa-1)

1. Kask, P.; Palo, K.; Ullmann, D. & Gall, K. (1999) Fluorescence-intensity Distribution Analysis and its Application in Biomolecular Detection Technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (24) 13756-13761.
2. Kask, P.; Palo, K.; Fay, N.; Brand, L.; Mets, Ü.; Ullmann, D.; Jungmann, J.; Pschorr, J. & Gall, K. (2000) Two-Dimensional Fluorescence Intensity Distribution Analysis: Theory and Applications. *Biophys. J.* 78, 1703-1713.
3. Ullmann, D.; Busch, M. & Mander, T. (2000) Fluorescence Correlation Spectroscopy-based Screening Technology. *Inn. Pharm. Tech.* 99, 30-40.
4. Schaertl, S.; Meyer-Almes, FJ.; Lopez-Calle, E.; Siemers, A.; Kramer, J. (2000) A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. *J. Biomol. Screen.* 5(4):227-237.
5. Turner, R., Ullmann, D. & Sterrer, S. (2001) Screening in the NanoWorld: Single-Molecule Spectroscopy and Miniaturized HTS, In: *Handbook of Drug Screening* (Seethala, R. & Fernandes, P., Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., pp.589-608.
6. Scheel, AA.; Funsch, B.; Busch, M.; Gradl, G.; Pschorr, J.; Lohse, MJ. (2001) Receptor-ligand interactions studied with homogeneous fluorescence-based assays suitable for miniaturized screening. *Journal of Biomolecular Screening* 6(1):11-18.
7. Wölcke, J. & Ullmann, D. (2001) Miniaturized HTS Technologies – uHTS. *Drug Discov. Today* 6 (12), 637-646.
8. Ullmann, D. (2001) Shifting the Bottlenecks: HTS Matures. *Drug Discov. Today (HTS Suppl.)* 6 (12) S119-S120.
9. Klumpp, M.; Scheel, A.; Lopez-Calle, E.; Busch, M.; Murray, K.; Pope, A. (2001) Ligand binding to transmembrane receptors on intact cells or membrane vesicles measured in a homogeneous 1 µl assay format. *Journal of Biomolecular Screening* 6 (3) pp159-170.
10. Fay, N. & Ullmann, D. (2002) Leveraging Process Integration in Early Drug Discovery. *Drug Discov. Today (Inf. Biotech. Suppl.)* 7(20), 181-S186.

11. Eggeling, C.; Brand, L.; Ullmann, D. & Jäger, S. (2003) Highly Sensitive Fluorescence Detection Technology Currently Available for HTS. *Drug Discov. Today* 8 (14), 632-641.
12. Wright, PA.; Boyd, HF.; Bethell RC.; Busch M.; Gribbon P.; Kraemer J.; Lopez-Calle E.; Mander TH.; Winkler D.; Benson, N. (2002) Development of a 1- μ l scale assay for mitogen-activated kinase kinase 7 using 2-D fluorescence intensity distribution analysis anisotropy. *Journal of Biomolecular Screening* 7(5):419-428.
13. Palo, K.; Brand, L.; Eggeling, C.; Jager, S.; Kask, P.; Gall K. (2002) Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis: Toward higher accuracy in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 83(2):605-618.
14. Netzer, R.; Bischoff, U.; Ebneith, A. (2003) HTS techniques to investigate the potential effects of compounds on cardiac ion channels at early-stages of drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 6 (4) : 462-469

Anlage

III. Erfolgskontrollbericht

IV. Berichtsblatt und Document Control Sheet

III. Erfolgskontrollbericht

Förderkennzeichen 01GG9801

1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Das abgeschlossene Teilprojekt im Leitprojekt „Validierte Lead/Target Systeme“ entsprach strategisch und inhaltlich den Ausschreibungsleitlinien und damit den förderpolitischen Zielen. VaLeTa-1 bildete im Zentrum des Projektverbundes die Basis für die Zusammenführung von Innovationen aus der gewerblichen Wirtschaft, aus Hochschulen und außeruniversitären Forschungseinrichtungen. Dadurch konnte in einem sehr frühen Stadium interdisziplinäres Wissen aus den Forschungseinrichtungen und der Industrie zu anwendungsorientierter Forschung gebündelt werden und in innovative Produkte, Verfahren und Dienstleistungen überführt werden. Im Hinblick auf Kooperationsstrukturen zwischen Wissenschaft und Industrie sowie den Arbeitsmarkt im Biotechnologiesektor konnten in diesem Projekt nachhaltige Erfolge erzielt werden.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens

Siehe eingehende Darstellung unter II.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Mit verschiedenen Partnern der Pharma- und Biotechnologiebranche bestehen sehr enge Kontakte. Neben Technologieentwicklungs- und Dienstleistungsprojekten, in die Resultate dieses Projektes einfließen werden in zunehmendem Maße Wirkstoffentwicklungsprojekte angegangen, die auf den erzielten Erkenntnissen aufbauen. Es steht zu erwarten, dass in naher Zukunft Industriekooperationen auf der Basis der erfolgreichen Vorarbeiten entstehen werden. Ein detaillierter Verwertungsplan wurde erstellt.

Die Ausgründung der EVOTEC NeuroSciences GmbH im Mai 1999 ist ein direktes Resultat der Zusammenarbeit im Leitprojektverbund zwischen VaLeTa-1 und VaLeTa-5. Weitere Ausgründungen bzw. Joint Ventures, die direkt oder indirekt mit Themen im Leitprojekt verknüpft sind, wurden realisiert bzw. befinden sich in z. T. fortgeschrittenem Stadium und werden in naher Zukunft realisiert.

4. Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben

Entfällt

5. Präsentationsmöglichkeiten

Die erzielten Ergebnisse werden im Rahmen der „Business & Development“ Aktivitäten der Evotec OAI AG potentiellen Anwendern in vielfältiger Weise (Konferenzen, Broschüren, etc.) vorgestellt.

6. Einhaltung des Kosten und Zeitplans

Der Kostenplan ist eingehalten worden. Alle Änderung der Kostenstruktur sind kostenneutral durchgeführt worden. Änderungen im Zeitplan sind im Verlauf der vierjährigen Projektes mit dem Projektverbund und dem Projektträger abgestimmt worden.