

Abschlussbericht

Pilotprojekt:

***Systematische Modifizierung von
Arzneimitteln auf Basis
nachwachsender Rohstoffe als ein
Konzept für eine nachhaltige Chemie***

Az. 22597-31

Freiburg
2008

Verfasser:
Dipl. Biol. Andreas Längin
Prof. Dr. rer. nat. Klaus Kümmerer



Institut für
Umweltmedizin und
Krankenhaushygiene

Sektion Angewandte Umweltforschung

Projektnehmer:

Universitätsklinikum Freiburg
Sektion Angewandte Umweltforschung
Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene
Breisacherstr. 115
79106 Freiburg
<http://www.uniklinik-freiburg.de/iuk/live/index.html>

Ansprechpartner und Bearbeiter:

Prof. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Klaus Kümmerer
Telefon: 0761/270-8235
Fax: 761/270-8213
E-Mail: Klaus.Kuemmerer@uniklink-freiburg.de

Dipl. Biol. Andreas Längin

Telefon: 0761/270-8243
E-Mail: andreas.laengin@uniklinik-freiburg.de

Projektpartner:

Deutsches Krebsforschungszentrum
Postfach 101949
D-69009 Heidelberg
Abteilung Molekulare Toxikologie
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Wießler / Dr. Eva Frei

Projektbearbeiterin: Diplomchemikerin Grazia Marano
Dr. Martin Frank (Abteilung Zentrale Spektroskopie DKFZ)
Telefon: 06221 42-3311/3308/3341
Telefax: 06221 42-3375
E-Mail: m.wiessler/e.frei/g.marano@dkfz.de
<http://www.dkfz.de>

ChemCon GmbH
Engesserstr. 4 B
79108 Freiburg i. Br.
Geschäftsführer: Dr. Raphael Vogler, Dr. Peter Gockel

Projektbearbeiter Dr. Andreas Stadelmaier / Malte Thoms
Tel.: +49 (0)761-5597-440
Fax.: +49 (0)761-5597-449
E-Mail: info@chemcon.com
<http://www.chemcon.com>

| | | | | | |
|---|--------------|---|-------------------|---|---------------------|
| 06/02 | |  | | | |
| 1 Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt | | | | | |
| Az | 22597 | Referat | 31 | Fördersumme | 236.240,00 € |
| Antragstitel | | Systematische Modifizierung von Arzneimitteln auf Basis nachwachsender Rohstoffe als ein Konzept für eine nachhaltige Chemie | | | |
| Stichworte | | Umweltchemikalien Green Chemistry , nachwachsende Rohstoffe , Medizin | | | |
| Laufzeit | | Projektbeginn | Projektende | Projektphase(n) | |
| | | 1.1.2006 | 30.06.2008 | | |
| Zwischenberichte | | 19.12.2006 | 29.10.2007 | | |
| Bewilligungsempfänger | | Universitätsklinikum Freiburg Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene Sektion Angewandte Umweltforschung Breisacherstr. 115B 79106 Freiburg | | Tel 07 61/2 70-8235 Fax 07 61/2 70-82131 Projektleitung Prof. Dr. Kümmerer Bearbeiter | |
| Kooperationspartner | | Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Abteilung Molekulare Toxikologie, 69120 Heidelberg ChemCon GmbH, 79108 Freiburg | | | |
| <p>Zielsetzung und Anlass des Vorhabens</p> <p>Wirksame Arzneimittel sind unverzichtbarer Bestandteil unseres Bemühens um eine möglichst hohe Gesundheit und Lebenserwartung. Arzneimittel rückten in der letzten Dekade zunehmend auch als in der Umwelt nachgewiesene Schadstoffe ins Zentrum des wissenschaftlichen, aber auch des öffentlichen Interesses. Im Sinne einer nachhaltigen Entwicklung ist auch bei Arzneimittelwirkstoffen künftig ihre Umweltverträglichkeit sowie eine möglichst geringe Belastung der Umwelt durch ihre Herstellung und der dazu notwendigen Rohstoffe zu beachten. Die Verknüpfung von guter Wirkung bei möglichst geringen Nebenwirkungen für Patient und Umwelt als zu erfüllende Kriterien für einen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung ist das Ziel des hier beantragten Vorhabens. Das Vorhaben hat das Ziel die grundsätzliche Machbarkeit des gewählten innovativen Konzepts zu demonstrieren.</p> | | | | | |

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Es wurde eine neue Verbindungsklasse synthetisiert und hinsichtlich der zu fordernden Eigenschaften für Anwendung und Umwelt geprüft. Eine bekannte, wirksame, in der Umwelt nicht leicht abbaubare Leitstruktur wurde zunächst auf dem Papier modifiziert. Mittels computerbasierter Methoden (Struktureigenschaftsbeziehungen, Blind Docking) werden wichtige Anwendungseigenschaften dieser neuen, hypothetischen Stoffe und ihre biologische Abbaubarkeit in der Umwelt als zentrale Eigenschaften evaluiert. Die hinsichtlich beider Forderungen günstigsten Kandidaten wurden synthetisiert. Ausgangsstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen wurden verwendet.

An allen Bausteinen waren alle 3 Partner je nach Expertise in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt. Der oben beschriebene Kreislauf der Optimierung wurde mehrmals durchlaufen.

Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten neuen Saccharidmimetika zeigen teilweise nicht nur eine verbesserte biologische Wirksamkeit (Inhibition der Zellmigration und –adhäsion, Inhibition der Matrixmetalloprotease-Expression), sondern geben auch Aufschluss über den Wirkungsmechanismus. Mit Hilfe des Blind Dockings am Integrin $\alpha_v\beta_3$ und durch die Synthese zahlreicher neuer Verbindungen wird deutlich, dass nicht alleine die negativ geladene Sulfatgruppe des (3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfato-oxymethyl-furan (GSF) für den inhibitorischen Effekt bez. der Zelladhäsion und –migration verantwortlich ist, sondern dass auch die Auswahl des entsprechenden Mono- oder Disaccharids eine entscheidende Rolle spielt. Das neue Saccharidmimetikum DBU 133 zeigt eine Verbesserung der biologischen Wirksamkeit um den Faktor 50 im Vergleich zur Leitstruktur GSF. Basierend auf den Ergebnissen des Blind Dockings erfolgt zurzeit eine weitere Optimierung von DBU 133.

Nicht nur die Verbesserung der Wirksamkeit war im Rahmen des Projekts erfolgreich. Auch die biologische Abbaubarkeit neuer Zielstrukturen konnte verbessert werden. Damit wurde gezeigt, dass die Optimierung der Umwelteigenschaften und der Wirksamkeit nicht notwendigerweise einen unlösbaren Zielkonflikt darstellen. Die entwickelten Strukturvorschläge konnten hinsichtlich ihrer biologischen Abbaubarkeit vor der Synthese computerbasiert und nach der Synthese im Labor untersucht werden. Bei den computerbasierten Abbaumodellen kristallisierte sich heraus, dass sich die bestehende Datenlage und damit die Qualität der Modelle durch kontinuierlichen Hinzugewinn neuer Daten gezielt verbessern lassen. Die Qualität der Eingangsdaten von unterschiedlichen Datenquellen (Labors) sowie die starken Schwankungen der nach OECD durchgeführten Abbaubarkeitstests verringern jedoch die quantitative Aussagekraft der am Computer berechneten Modelle. Wünschenswert wäre hier das Generieren eines Datensatzes mit mindestens 500 verschiedenen Chemikalien aus einer Quelle (Labor) mit einer vom Aufwand geringeren, vereinfachten und verbesserten Meßmethode (geringere Schwankungen), wie sie sich im Moment im IUK in der Entwicklung befindet. Die genaue Kenntnis der Datenqualität sowie Kenntnisse über die Stärken und Schwächen eines Modells (z.B. Domain/Features) sind mit ergänzendem Expertenwissen (genaue Kenntnisse um und über die Abbautests) notwendige Voraussetzungen für den Erfolg des „sekundären“ Teilaspekts (biologische Abbaubarkeit).

Das gesteckte Hauptziel, die **grundsätzliche Machbarkeit** des gewählten innovativen Konzepts zu **demonstrieren**, wurde erreicht. Es wurden unterschiedliche Modifikationen der Leitstruktur wie wie eine Vielzahl von Zwischenstufen synthetisiert und das Syntheseverfahren verbessert. Die synthetisierten Stoffe (auch Zwischenstufen konnten u.a. zur Verbesserung der QSAR Modelle für die biologische Abbaubarkeit und des Dockings verwendet werden. Es konnte u.a. eine neue Zielstruktur erhalten werden, die sowohl hinsichtlich der Wirksamkeit als auch der biologischen Abbaubarkeit in Kläranlagen gegenüber der Ausgangsstruktur GSF deutlich bessere Eigenschaften aufweist. Allerdings, wird nicht weiteres Optimierungspotential gesehen, das aber aufgrund der zeitlichen und finanziellen Ressourcen, die zur Verfügung standen, nicht mehr im Rahmen des Vorhabens realisiert werden konnte. Darüber hinaus ist zu beachten, dass nach dem Vorliegen eines Wirkstoffes weitere Untersuchungen zu Nebenwirkungen, Darreichungsform etc. notwendig sind (eigentliche Arzneimittelentwicklung), die wahrscheinlich nur in Kooperation mit einem Arzneimittelhersteller geleistet werden kann.

Fazit - Perspektiven nach Ende der Förderung durch die DBU

Die Vorgehensweise war nicht ohne Risiko, beinhaltet aber ein großes Innovationspotential. Die im Projekt realisierte Vorgehensweise wird sicher nicht sofort und für alle (Wirk-)Stoffe anwendbar sein. Sie kann mit den im Projekt erarbeiteten Kenntnissen und Erfahrungen künftig auf weitere Ausgangsstoffe und Wirkstoffe erweitert werden. Hierin liegt auch eine ökonomische Chance. Das erarbeitete Know-how und die Erfahrungen können und sollen einerseits für die Weiterentwicklung der im Projekt verbesserten Leitstruktur dienen, andererseits sollen sie auch auf andere Stoffe und Stoffgruppen übertragen werden. Nach Abschluss der Förderung durch die DBU soll das Projekt mit den bis dahin verfügbaren Stoffen dahingehend weitergeführt werden, dass entweder über eine weitere Förderung an anderer Stelle (EU) oder falls möglich, direkt durch Kooperationen mit Wirkstoffherstellern die Stoffe weiter entwickelt werden und auch das Konzept weiter verbreitet wird.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Bei den nachfolgend genannten Aktivitäten handelt es sich einerseits um solche, bei denen Das Konzept des Projektes und/oder Ergebnisse und Erfahrungen alleine oder im Kontext der Nachhaltigen Pharmazie und Chemie in der (Fach-)Öffentlichkeit verbreitet wurden. Andererseits sind auch solche Aktivitäten enthalten, die auch aus dem Projekt

resultierten wie z.B. das „1rst International Symposium in Sustainable Pharmacy“.

1. K. Kümmerer, F. Keil, M. Hempel, H.C. Schaefer: *Sustainable pharmacy*. UWSF 21(1), 115-117, 2009
2. KK. Kümmerer: *Nachhaltige Chemie von Anfang an: Nachhaltige Chemikalien*, <http://www.aktuelle-wochenschau.de/woche15/woche15.html>
3. K. Kümmerer, E. Schramm: *Arzneimittelentwicklung: Die Reduzierung von Gewässerbelastungen durch gezieltes Moleküldesign*. UWSF 20(4), 249-263, 2008
4. K. Kümmerer: *Pharmaceuticals and health – greening pharmacy*. International Symposium on Green Chemistry for Environment and Health, München, 13.-16.10.2008
5. K. Kümmerer: *The Environmental Impact of Pharmaceuticals: From the Problem to the Solution – Green Pharmacy*. Knappe-Tagung, Nîmes, 19.-20.02.2008
6. K. Kümmerer: *Pharmaceuticals in Water Supplies*. In: Stanley W. Trimple: *Encyclopedia of Water Science*. CRC Press, 2nd edition, 1-4, 2008
7. K. Kümmerer: *Strategies for Reducing the Input of Pharmaceuticals into the Environment*. In: K. Kümmerer (Ed.): *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer, 3rd edition, 2008
8. K. Kümmerer, V. Cunnigham: *Summary of Workshop on Fate of Pharmaceuticals in the Environment*. Drug Inf. J. 41 (2), 193-194, 2007
9. K. Kümmerer: *Sustainable from the very beginning: Rational design of molecules by life cycle engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry*. Green Chem. 9, 899-907, 2007
10. A. Längin: *Wastewater treatment and detoxification: Biodegradability (testing)*. Alumni-Net-Live Seminar, Brasilien, Santa Maria, 19.-23.11.2007
11. K. Kümmerer: *Arzneimittel in Abwasserbehandlungsanlagen*. 82. Darmstädter Seminar Abwassertechnik, Darmstadt, 15.11.2007
12. K. Kümmerer: *Wasser und nachhaltige Chemie: Welchen Beitrag sollte die industrielle Chemie künftig für den Schutz der Wasserressourcen leisten?* Zentrum f. Wasserforschung und des Instituts für Hydrologie ZWF, Kolloquium Freiburg, 08.11.2007
13. K. Kümmerer: *Arzneimittel in der aquatischen Umwelt*. 21. Wasserkolloquium Badenova AG, Lahr, 18.10.2007
14. K. Kümmerer: *Product Stewardship in the pharmaceutical industry taken serious: green pharmacy*. International Conference: *Pharmaceuticals in the Environment*, York (U.K.), 19.-21.09.2007
15. K.Kümmerer: *Pharmaceuticals in the Environment. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Beijing (China), 31.08.-06.09.2007
16. K. Kümmerer: *Diagnostika, Medikation und Ökologie – Zukunftsperspektiven*, Tagung „Das moderne Spital – Chancen und Risiken für unsere Umwelt“, Bern, 05.-06.06.2007
17. K. Kümmerer: *Arzneimittel in der Umwelt*. -Treffen des DAAD der Stipendiaten in Deutschland. Freiburg, 12.05.2007
18. K. Kümmerer: *Arzneimittel (-Metabolite) im Abwasser*. AK-Wasser, Freiburg, 08.05.2007
19. K. Kümmerer: *Arzneimittel in der Abwasserreinigung*. Institut WAR, TU Darmstadt, Darmstadt, 05.02.2007

20. K. Kümmerer, G. Velo: *A new topic of importance in pharmacovigilance*. Drug Safety 29, 371-373, 2006
21. K. Kümmerer: *Vorausschauend Kriterien Nachhaltiger Chemie integrieren: Von Anfang an – Stoffdesign*. Tagung Nachhaltige Chemie: Erfahrungen und Perspektiven, Tutzing, 30.-31.01.2006
22. M. Angrik, K. Kümmerer L. Mainzer (Hrsg.): *Nachhaltige Chemie – Erfahrungen und Perspektiven*. Tutzing, 30.-31.01.2006
23. K. Kümmerer: *Arzneimittel in Kläranlagen und deren Umweltrelevanz in Gewässern*. Essener Tagung f. Wasser- und Abfallwirtschaft, 29.-31.03.2006
24. K. Kümmerer, M. Wießler: *Life Cycle engineering (LCE) of Pharmaceuticals: Systematic Optimization for Use as well as the Environment*. DIA-Meeting, Stockholm, 22.-23.05.2006
25. K. Kümmerer: *Fate of Pharmaceuticals in the Environment*. DIA-Meeting, Stockholm, 22.-23.05.2006.
26. K. Kümmerer: *Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment*. CleanMed, Stockholm, 29.-31.05.2006
27. F. Keil, K. Kümmerer: *Strengthening the Coping Capacity for Pharmaceuticals in Drinking Water*. Poster, CleanMed, Stockholm, 29.-31.05.2006
28. K. Kümmerer: *Arzneimittel in Kläranlagen und deren Umweltrelevanz in Gewässern*. 29. Wassertechnisches Seminar, München, 04.10.2006
29. K. Kümmerer: *Nachhaltige Chemie: Benign by Design – Life Cycle Engineering von Arzneimitteln und Chemikalien*. GDCh Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jahrestagung, Halle, 04.-06.10.2006
30. F. Keil, K. Kümmerer: *Strategien zum Umgang mit Arzneimittelwirkstoffen im Trinkwasser. Nachhaltiges Stoffdesign*, GDCh Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jahrestagung, Halle, 04.-06.10.2006
31. K. Kümmerer: *Pharmaceuticals in the Environment*, RCC, Basel, 19.10.2006

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Projektkennblatt | 3 |
| 2 | Allgemeiner Teil | 13 |
| 2.1 | Einleitung | 13 |
| 2.1.1 | Hintergrund | 13 |
| 2.1.2 | Die Problematik gut wasserlöslicher, aber schwer abbaubarer Stoffe | 15 |
| 2.2 | Ziele..... | 16 |
| 2.2.1 | Generelle Vorgehensweise | 17 |
| 2.2.2 | Vorgehensweise - Verknüpfung von Wirksamkeit, umweltfreundlicher Synthese und umweltfreundlicher Struktur | 18 |
| 2.2.2.1 | Die vier Phasen des Projektes | 18 |
| 2.2.3 | Arbeitspakete..... | 23 |
| 2.2.4 | Zusammenarbeit der Antragsteller | 26 |
| 2.2.5 | Die Bedeutung der Integrine | 27 |
| 2.3 | Eigene Vorarbeiten..... | 28 |
| 2.3.1 | Optimierung der Leitstruktur GSF | 30 |
| 3 | Material und Methoden | 30 |
| 3.1 | Allgemeines..... | 30 |
| 3.2 | Zellkultur | 31 |
| 3.2.1 | Allgemeines..... | 31 |
| 3.2.2 | Zellzahlbestimmung | 31 |
| 3.2.3 | Kultivierung der Zelllinien WM-115 und WM 266-4..... | 33 |
| 3.2.4 | Migrations-Assay | 33 |
| 3.2.5 | Zytotoxizität | 34 |
| 3.2.6 | Adhäsions-Assay | 34 |
| 3.2.7 | Zymographie zum Nachweis von MMP-Aktivität..... | 35 |
| 3.3 | Implementierung der SAR Module | 36 |
| 3.4 | Durchführung von Abbautests zur biol. Abbaubarkeit nach OECD | 38 |
| 3.4.1 | Closed Bottle Test (CBT nach OECD 301 D: 1992) | 38 |
| 3.4.2 | Manometrischer Respirationstest (MRT nach OECD 301 F: 1992) | 40 |
| 4 | Ergebnisse | 42 |
| 4.1 | Patent-/Literaturrecherche | 42 |
| 4.2 | Synthese | 43 |
| 4.3 | Molecular Modeling – Blind Docking | 44 |
| 4.3.1 | Erklärung der Wirkungsweise der Leitstruktur GSF via Molecular Modeling.. | 44 |
| 4.3.2 | Migrationassay | 45 |
| 4.4 | Adhäsionsassay | 48 |
| 4.5 | Ergebnisse der Abbautests nach OECD | 49 |
| 4.5.1 | Closed Bottle Test (CBT)..... | 49 |
| 4.5.2 | Manometrischer Respirationstest (MRT)..... | 49 |
| 4.6 | LC-MS/MS Analytik der Testsubstanzen in den Abbautests..... | 51 |
| 4.6.1 | Analytikergebnisse zum Closed Bottle Test OECD 301D..... | 52 |
| 4.6.2 | Analytikergebnisse zum Manometrischen Respirationstest OECD 301 | 58 |
| 4.7 | Molecular Modelling - Quantitative Struktur Eigenschaftsbeziehungen (QSAR)... | 64 |
| 4.7.1 | Zusätzliche Berechnungen toxikologischer Endpunkte mit der Software Multibase | 64 |
| 4.7.2 | Berechnung der Abbaubarkeit und Vergleich mit den experimentellen Werten | 65 |
| 4.8 | Vergleich der Daten von verschiedenen OECD 301 Tests | 67 |
| 5 | Öffentlichkeitsarbeit und Veröffentlichungen | 68 |

| | | |
|---|---|----|
| 6 | Zusammenfassung, Ausblick und Perspektiven nach Ende der Förderung durch die DBU..... | 68 |
| 7 | Literatur..... | 68 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|--------------|--|----|
| Tabelle 4-1 | Übersicht der untersuchten Saccharidmimetika bzgl. der Inhibition der Zellmigration von WM-115-Zellen..... | 47 |
| Tabelle 4-2 | Ergebnisse der biologischen Abbautests (Testergebnisse, die eine Einstufung der Substanz als leicht biologisch abbaubar erlauben, sind gelb hinterlegt).50 | |
| Tabelle 4-3 | Ergebnisse CBT der 2,3 substituierten Furane..... | 55 |
| Tabelle 4-4 | Ergebnisse CBT der 1,4 substituierten Furane..... | 56 |
| Tabelle 4-5 | Ergebnisse CBT der 1,2 und 1,3 substituierten Furane..... | 56 |
| Tabelle 4-6 | Ergebnisse CBT der einfach substituierten Furane | 57 |
| Tabelle 4-7 | Ergebnisse CBT der weiteren Furane..... | 57 |
| Tabelle 4-8 | Ergebnisse CBT der anderen Substanzen..... | 57 |
| Tabelle 4-9 | Ergebnisse MRT der 2,3 substituierten Furane | 61 |
| Tabelle 4-10 | Ergebnisse MRT der 1,4 substituierten Furane | 62 |
| Tabelle 4-11 | Ergebnisse MRT der 1,2- und 1,3- substituierten Furane | 62 |
| Tabelle 4-12 | Ergebnisse MRT der einfach substituierten Furane | 63 |
| Tabelle 4-13 | Ergebnisse MRT der weiteren Furane..... | 63 |
| Tabelle 4-14 | Ergebnisse MRT der anderen Substanzen..... | 64 |
| Tabelle 4-15 | Modellvergleich unterschiedlicher Daten und Software | 66 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------------------|--|
| (C _T) | Konzentration der Testsubstanz in mg/l. |
| (O ₂) _{B,n} | Sauerstoffzehrung am Tag n im Blindansatz, |
| (O ₂) _{T,n} | Sauerstoffzehrung am Tag n im Ansatz mit Testsubstanz, |
| ¹³ C-NMR | 13-Kohlenstoff-Kern Magnetresonanz Spektroskopie |
| ¹ H-NMR | Protonen-Kern Magnetresonanz Spektroskopie |
| APS | <u>Ammoniumperoxidisulfat</u> |
| Arg | Arginin |
| Asp | Aspargin |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BSB | Biologischer Sauerstoff Bedarf |
| CAM | Zelladhäsionsmoleküle |
| CASY® | Eigenname eines Geräts zur Zellzahlbestimmung |

| | |
|--------------------|--|
| CBT | Closed Bottle Test |
| CC | ChemCon |
| DA | Diels-Alder |
| DBU | Deutsche Bundesstiftung Umwelt |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DOC | gelöster organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon) |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| Fn | Fibronectin |
| Gly | Glycin |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| GSF | (3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfato-oxymethyl-furan) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-3-Propansulfonsäure |
| HPLC | high Performance liquid Chromatographie |
| IUK | Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene |
| LC | Flüssigchromatographie |
| LD ₅₀ | letale Dosis 50 |
| logP _{ow} | logarithmischer Oktanol/ Wasser Verteilungskoeffizient |
| m/z | Masse/Ladung |
| MITI | Ministry of International Trade and Industrie (Japan) |
| MMP-2 | Matrixmetalloprotease-2 |
| MMP-9 | Matrixmetalloprotease-9 |
| MRT | Manometrischer Respirationstest |
| MS | Massenspektroskopie |
| NPOC | Non Purgeable Organic Carbon |

| | |
|-------------|--|
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| P | Pearson Produkt Moment Korrelation |
| PBS | Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung |
| QSAR | Quantitative Structure and Activity Relationship |
| rel. | relative |
| RGD | Arginin-Glycin-Asparaginsäure |
| RGDf-N{Me}V | Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Methylvalin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SCFM | Serumfreies Kulturmedium |
| SRB | Sulforhodamin-B |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin |
| ThSB | theoretischen Sauerstoffbedarf |
| Tox | Toxizitätskontrolle |
| Trafo | Transformationsprodukt |
| TRIS | <i>Tris</i> -(Hydroxymethyl)aminomethan |
| USEPA | United States Environmental Protection Agency |
| VE | vollentsalzt |
| VER | Vermont |
| Vis | sichtbar (visible) |
| Vol | Volumen |
| WM | Wistar Melanom |

2 Allgemeiner Teil

2.1 Einleitung

2.1.1 Hintergrund

Wirksame Arzneimittel sind unverzichtbarer Bestandteil unseres Bemühens um eine möglichst hohe Gesundheit und Lebenserwartung. Dies scheint jedoch z. B. im Fall der Antibiotika aufgrund der zunehmend beobachteten Resistenzen nicht mehr der Fall zu sein. Im Fall von Zytostatika sind die Nebenwirkungen oft so groß, dass eine chemotherapeutische Krebstherapie dem „Austreiben des Teufels mit dem Belzebub“ nahe kommt. Neue Wirkstoffe werden dringend benötigt. Diese sollten möglichst wirksam und verträglich für die Patienten sein. Ziel dieses Projektes war es auf der Basis von Furanen Saccharidmimetika mit antimetastatischer Wirkung herzustellen.

Arzneimittel rückten in der letzten Dekade allerdings auch zunehmend als in der Umwelt nachgewiesene Schadstoffe ins Zentrum des wissenschaftlichen und des öffentlichen Interesses. Arzneimittel waren in der Vergangenheit von der Prüfung ihrer Umweltverträglichkeit ausgenommen, wie sie für andere Stoffe durch das Chemikaliengesetz vor ihrer Vermarktung gefordert wird. Im Sinne einer nachhaltigen Entwicklung ist daher auch bei Arzneimittelwirkstoffen künftig ihre Umweltverträglichkeit sowie eine möglichst geringe Belastung der Umwelt durch ihre Herstellung und der dazu notwendigen Rohstoffe zu beachten.

Umfassendere Strategien für die Konzeption von Arzneimitteln sind daher längerfristig von großer Bedeutung. Diese Bemühungen werden insgesamt unter dem Schlagwort „Nachhaltige Chemie“ zusammengefasst [1] und werden in der Arzneimittelindustrie als „Green Pharmacy“ diskutiert [2]. Das Konzept der nachhaltigen Chemie erfährt seit kurzem bei der chemischen Industrie aber auch bei Arzneimittelherstellern daher zunehmendes Interesse. U. a. beinhaltet es die Schonung natürlicher Ressourcen, die Verminderung von Abfällen, die Erhöhung der Wirksamkeit und eine gute Abbaubarkeit in der Umwelt. Ein generelles Anliegen der internationalen Diskussion über Nachhaltigkeit in der Chemie ist demzufolge u. a. die Forderung, dass Chemikalien künftig umweltfreundlicher sein müssen, indem sie ihren Anwendungszweck möglichst gut erfüllen und gleichzeitig umweltverträglich sind, z. B. indem sie gut biologisch oder photochemisch abbaubar in Kläranlagen

und/oder der Umwelt sind. Eine Möglichkeit dazu ist es, bekannte Stoffe zu modifizieren. Um dies erfolgreich tun zu können, müssen für die jeweilige Anwendung relevante Teilstrukturen der Moleküle und die für eine gute Abbaubarkeit notwendigen Teilstrukturen bekannt sein. Beide können dann in einem neuen Molekül zielgerichtet berücksichtigt werden, das dann bessere Anwendungseigenschaften aufweist, aber auch umweltfreundlicher ist („benign by design“). Der Ansatz lässt sich auf weitere Stoffgruppen (Feinchemikalien, Massenchemikalien, Pflanzenschutzmittel etc.) übertragen und beinhaltet damit auch ein enormes ökonomisches Potential.

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist daher neben dem Ziel einer Synthesestrategie und -technologie, die mit möglichst wenig Umweltbelastung einher geht, auch die Umweltrelevanz der Wirkstoffe selbst in Betracht zu ziehen und schon möglichst frühzeitig ihre (biologische) Abbaubarkeit zu verbessern. Aus ökonomischen Gründen (Marktfähigkeit des neuen Wirkstoffs) muss eine auf Nachhaltigkeit abzielende Strategie schon bei der Wirkstoffentwicklung in Betracht ziehen, dass die Wirkstoffe genauso gut oder besser wirksam sind als die bisher verwendeten Alternativen und dass sie verträglicher für den Patienten sind. Auch die sehr frühe Beurteilung einer möglichen toxischen Belastung der Patienten wird immer wichtiger. Hier liegen bereits Analysen auf der Grundlage erfolgreicher Medikamente vor, die zur Definition pharmakophorer funktioneller Gruppen und Ringsysteme geführt hat.

Wir konnten zeigen, dass ein nicht biologisch abbaubares und cancerogenes Zytostatikum zur Krebsbehandlung durch die Modifikation seiner Struktur nicht nur umweltverträglicher wird, sondern sehr viel besser verträglich für den Patienten (Abbildung 2-1). D. h. auch die Anwendungseigenschaften konnten verbessert werden, was wesentlich dazu beiträgt, neue Stoffe auch zu verwenden. Das Glufosamid befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phase III).

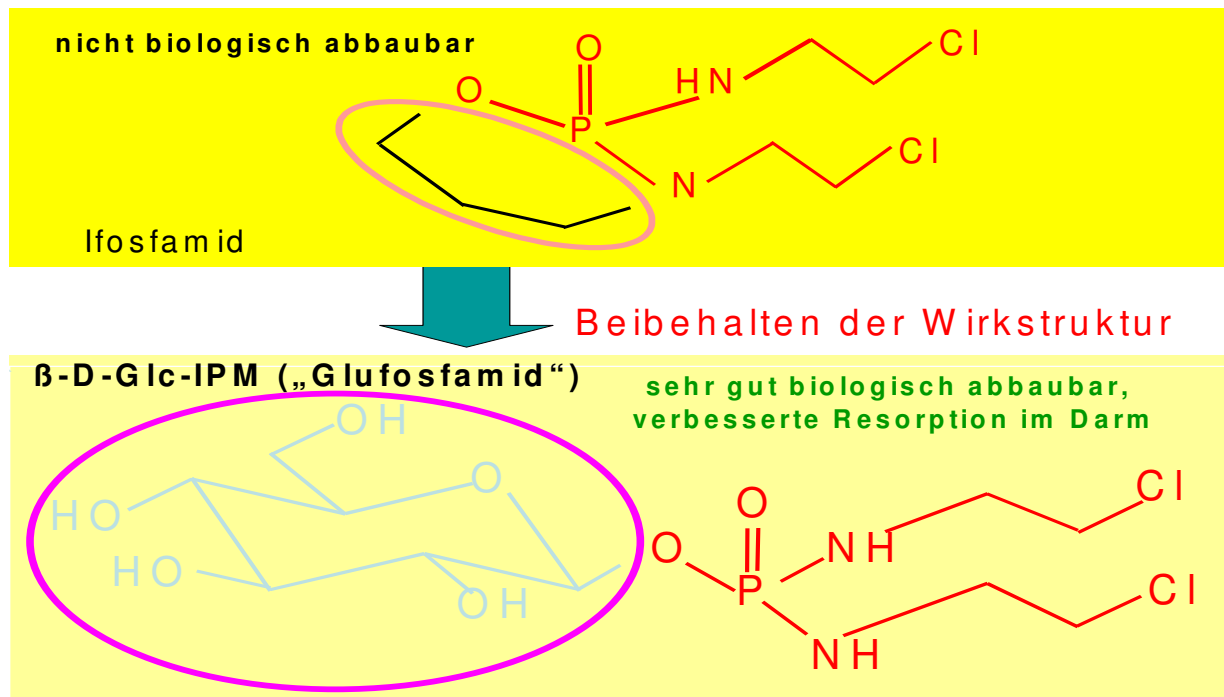


Abbildung 2-1 Verbesserung der pharmakologischen Umwelteigenschaften des Zytostatikums Ifosfamid durch chemische Modifikation unter Beibehaltung der für die Wirkung verantwortlichen Teilstruktur [3]

Beide Beispiele wurden mehr oder weniger zufällig gefunden. Ein systematischer Ansatz wird in der Arzneistoffentwicklung angewandt [4]. Einen systematischen Ansatz zur Suche umweltfreundlicher Leitstrukturen gibt es jedoch bisher nicht. Diese Lücke wurde mit dem hier beschriebenen Vorhaben geschlossen. Die meisten Tumorpatienten sterben nicht an ihrem Primärtumor, sondern an den Metastasen, den Tochtergeschwülsten. Daher erscheint es sinnvoll den Prozess der Metastasierung zu unterbinden. Inzwischen ist bekannt, dass an diesem Prozess Saccharidstrukturen beteiligt sind. Es erscheint daher sinnvoll nach Saccharidmimetika zu suchen, die diesen Prozess unterbinden können.

2.1.2 Die Problematik gut wasserlöslicher, aber schwer abbaubarer Stoffe

Die in der Literatur dokumentierten Daten weisen auf ein deutliches Risiko des Vordringens verschiedener pharmazeutischer Wirkstoffe und ihrer Metabolite bis ins Trinkwasser hin, da sich viele der bisher nachgewiesenen Wirkstoffe als persistent und Grundwasser gängig bzw. Trinkwasser relevant erwiesen haben. Nicht zuletzt aus umwelthygienischer Sicht sind alle Fremdstoffe im Trinkwasser unerwünscht und ein Eintrag soweit als möglich zu vermeiden oder zu vermindern. Grundwasser bzw. Trinkwasser gängige Schadstoffe zeichnen sich i. a. durch eine gute Wasserlöslichkeit und schlechte biologische Abbaubarkeit aus und können nur mit

großem technischen wie finanziellem Aufwand bei der Trinkwasseraufbereitung entfernt werden. Die Eigenschaft „Wasserlöslichkeit“ muss daher sehr sorgfältig betrachtet werden.

2.2 Ziele

Im Vorhaben wurde das Potential des oben skizzierten Ansatzes „benign by design“ systematisch am Beispiel ausgewählter Wirkstrukturen demonstriert. Wir tragen damit auf mehreren Stufen zur Entwicklung von umweltverträglicheren und wirksamen Arzneimittelwirksubstanzen und damit zu einer Verminderung der Umweltbelastung durch Arzneimittel bei.

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist neben dem Ziel einer Synthesestrategie und -technologie, die mit möglichst wenig Umweltbelastung einher geht, auch die Umweltrelevanz der Wirkstoffe selbst in Betracht zu ziehen und schon möglichst frühzeitig ihre (biologische) Abbaubarkeit zu verbessern.

Ein Auffinden von Wirkstoffen mit neuen Wirkstrukturtypen war im Rahmen des Projektes nicht beabsichtigt. Es wurde allerdings exemplarisch gezeigt, dass ausgehend von bekannten wirksamen Wirkstoffen durch ihre gezielte Modifikation die oben genannten Anforderungen erfüllbar sind, d. h. dass sie umweltfreundlicher und Ressourcen schonender synthetisiert werden können und sie mindestens genauso gut wirksam und verträglich für die Patienten sind. Ausgehend von krebshemmenden Wirkstoffen (Tumorinhibitoren) wurden dazu bekannte wirksame, aber in der Umwelt nicht leicht abbaubare Leitstrukturen zunächst auf dem Papier modifiziert. Mittels computerbasierter Methoden (Struktureigenschaftsbeziehungen) wurden wichtige Anwendungseigenschaften dieser neuen, hypothetischen Stoffe und ihre biologische Abbaubarkeit in der aquatischen Umwelt als zentrale Eigenschaften evaluiert. Die hinsichtlich beider Forderungen günstigsten Kandidaten wurden mittels innovativer kombinatorischer Synthese umweltfreundlich synthetisiert und dann experimentell geprüft.

Der hier vorgestellte Ansatz wird sicher noch nicht die endgültige Lösung der geschilderten Problematik darstellen. Wir wollen mit diesem Projekt aber das Potential eines solchen Ansatzes aufzeigen und die Durchführbarkeit eines solchen Ansatzes demonstrieren, aber auch die auftretenden Probleme und mögliche Lösungswege beschreiben.

2.2.1 Generelle Vorgehensweise

Die im Vorhaben gewonnenen Erfahrungen, Kenntnisse und erarbeiteten Daten sind Grundlage für die Anwendung dieses Konzepts auf breiterer Basis - auch über den Bereich der Arzneimittel hinaus. Die Integration von guter Wirkung bei geringer Nebenwirkung für Patient und Umwelt als zu erfüllende Kriterien für einen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung, insbesondere auch einer nachhaltigen Pharmazie war das Ziel dieses Vorhabens. Es sollte gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist Wirksamkeit und Umweltverträglichkeit von Leitstrukturen zu verbessern, d.h. dass Wirksamkeit und Umweltverträglichkeit kein grundsätzlicher Widerspruch sind. Dazu wurden neue Stoffe synthetisiert und bzgl. der zu fordernden Eigenschaften geprüft. Am Beispiel von krebshemmenden Wirkstoffen (Zytostatika) wurden dazu bekannte wirksame, aber in der Umwelt nicht leicht abbaubare Leitstrukturen zunächst „auf dem Papier“ modifiziert d.h. ohne sie zunächst zu synthetisieren. Mittels computerbasierter Methoden (Struktureigenschaftsbeziehungen, Docking) wurden wichtige Anwendungseigenschaften dieser neuen, hypothetischen Stoffe und ihre biologische Abbaubarkeit in der Umwelt als zentrale Eigenschaften evaluiert. Die hinsichtlich beider Forderungen günstigsten Kandidaten wurden mittels innovativer kombinatorischer Synthese umweltfreundlich synthetisiert. Nachwachsende Rohstoffe (z. B. Furanderivate aus der Zuckergewinnung als Ausgangsstoffe) wurden verwendet.

Es war auch Aufgabe dieses Projektes festzustellen, welche Gemeinsamkeiten sich zwischen den Definitionen der pharmacophoren funktionellen Gruppe und der umweltfreundlichen funktionellen Gruppe herstellen lassen und ob es Gegensätze oder gegenläufige Tendenzen zu beobachten gibt. Für die zukünftige Entwicklung neuer Therapeutika wird es darauf ankommen, diese Eigenschaften funktioneller Gruppen zu optimieren. Bereits mit der Auswahl der Bausteine im Rahmen eines kombinatorischen Ansatzes kann ein wichtiger Schritt in Richtung wirksamer, sowie patienten- und umweltverträglicher Therapeutika besritten werden.

Im hier beschriebenen Projekt wurde daher das Potential des oben skizzierten Ansatzes „benign by design“ systematisch am Beispiel ausgewählter Wirkstrukturen demonstriert. Die Ergebnisse werden die Diskussion über die Möglichkeiten und Bedeutung einer nachhaltigen Pharmazie stimulieren. Wir tragen damit auf mehreren Stufen zur Entwicklung von umweltverträglicheren und wirksamen

Arzneimittelwirksubstanzen und damit zu einer Verminderung der Umweltbelastung durch Arzneimittel bei.

Ein Auffinden von Wirkstoffen mit neuen Wirkstrukturtypen ist im Rahmen des Projektes nicht beabsichtigt. Der hier vorgestellte Ansatz wird sicher noch nicht die endgültige Lösung der geschilderten Problematik darstellen. Es konnte mit diesem Projekt aber das Potential eines solchen innovativen Ansatzes aufgezeigt werden und die Durchführbarkeit eines solchen Ansatzes demonstriert werden. Die auftretenden Probleme und mögliche Lösungswege wurden beschrieben. Nicht zuletzt hat sich im Rahmen einer für das Umweltbundesamt durchgeführten Studie gezeigt, dass einige Wirkstoffe aus der Gruppe der Zytostatika von besonderer Bedeutung in der Umwelt sind, so dass sich auch in dieser Hinsicht das hier beschriebene Projekt als wertvoll und in die richtige Richtung zielend erwiesen hat.

2.2.2 Vorgehensweise - Verknüpfung von Wirksamkeit, umweltfreundlicher Synthese und umweltfreundlicher Struktur

2.2.2.1 Die vier Phasen des Projektes

Die Vorhersage von Eigenschaften und der umweltfreundlichen Synthese von Wirkstoffen ausgehend von bekannten und wirksamen Leitstrukturen aus der Gruppe der Zytostatika wurden verknüpft, um sowohl wirksame und möglichst nebenwirkungsarme wie auch umweltfreundliche Wirkstoffe gezielt synthetisieren zu können. Die Verwendung von Edukten auf Basis nachwachsender Rohstoffe (furan- und saccharidhaltige Abfälle aus der Zuckergewinnung) stellte einen zusätzlichen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung in diesem Bereich dar. Nach der Synthese der Stoffe wurden ausgewählte relevante Eigenschaften experimentell überprüft. Dies geschah in mehreren z.T. parallel verlaufenden Phasen, um den größtmöglichen Nutzen aus dem Wechselspiel von Vorhersage und Experiment zu gewährleisten. Die einzelnen Phasen des Projekts sind in Abbildung 2-2 dargestellt.

Optimierung der Leitstrukturen

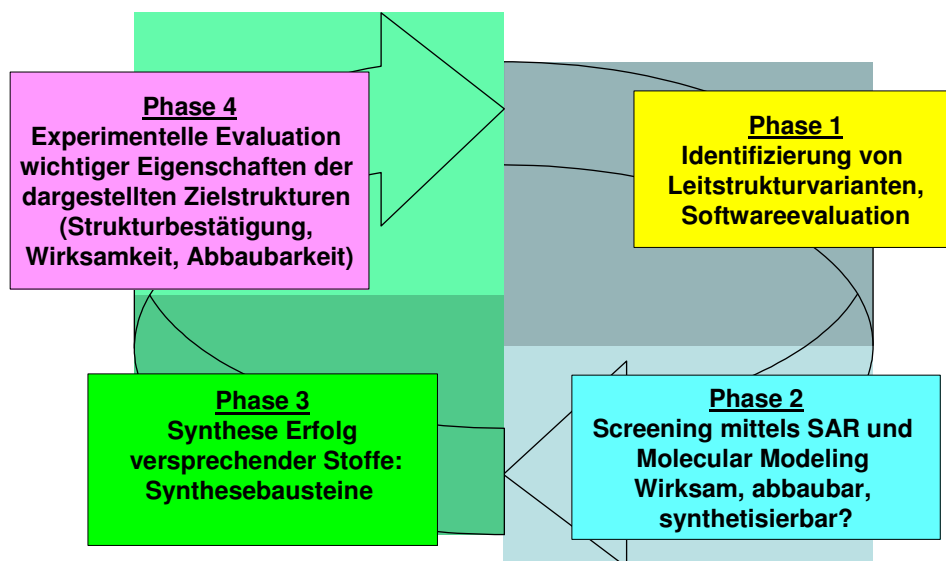


Abbildung 2-2 Projektphasen

Das Projekt weist einen hohen Innovationscharakter auf und seine Durchführung ist nicht ohne Risiko. Es wurden daher zu jeder Phase Ziele angegeben, die die schrittweise Prüfung der Erfolgsaussichten erlaubte. Jede Phase stellte einen Meilenstein des Projektes dar und diente der Erfolgskontrolle. Gegebenenfalls hätte das Vorhaben bei Nichterreichen der Ziele abgebrochen werden können. Dazu wurden Abbruchkriterien benannt.

Phase 1: Vorarbeiten

Es wurden vor der eigentlichen Anwendung von QSAR Module zur Vorhersage der biologischen Abbaubarkeit und der Wirksamkeit erarbeitet und implementiert. Module des Software-Herstellers z.B. zur Identifizierung von unerwünschten Eigenschaften wie Kanzerogenität oder Neurotoxizität, der Wasserlöslichkeit und/oder des Octanol-Wasserverteilungskoeffizienten sowie der Resorbierbarkeit im Darm wurden implementiert. Ziel dieser Phase war es, die Arbeitsfähigkeit der Softwaremodule zu ergänzen. Als Abbruchkriterium galt: Softwaremodule sind nicht einsatzfähig.

Phase 2: Screening mittels SAR und Molecular Modelling

Eine chemische Leitstruktur wurde ausgehend von bekannten Tumorinhibitoren ausgewählt. Von dieser Struktur wurden unter Zugrundelegung des empirischen

Wissens über die Wirksamkeit, die Verträglichkeit, ihrer Umweltverträglichkeit sowie ihrer Synthetisierbarkeit auf dem Papier neue Zielstrukturen entworfen, falls notwendig unter Hinzuziehung externe Experten. Eine Patentrecherche wurde durchgeführt, um zu vermeiden, dass Strukturen ausgewählt werden, die bereits patentiert sind. Aus diesen wurden mittels QSAR Erfolg versprechende Kandidaten ausgewählt (Screening). Diese wiederum wurden, soweit möglich auf zu erwartende Metabolite und deren umweltrelevante Eigenschaften untersucht. Ausgewählte Zielstrukturen wurden mittels Molecular Modelling hinsichtlich ihrer Fähigkeit an die entscheidenden Rezeptoren zu binden, überprüft. Daraus wurde letztlich die Liste von prioritär zu synthetisierenden Substanzen erstellt. Abbruchkriterium war: alle Substanzen sind patentgeschützt oder nicht synthetisierbar.

Phase 3: Synthese der ausgewählten Erfolg versprechenden Stoffe

Basierend auf Schmidt's Imidat Synthesestrategie entwickelten wir eine Methode zur Erstellung von Saccharid-Mimetika enthaltenden Substanzbibliotheken, die Furan als Kern enthalten (siehe Abbildung 2-5). Furan wurde aus dem Grund als Kernmolekül gewählt, weil es als Furanose betrachtet werden kann, jedoch eine definierte Stereochemie zeigt. Die Furane, besonders das 3,4-Bishydroxymethylfuran sind synthetisch einfach zugänglich und es ist ein Dienophil, welches über eine Diels-Alder-Reaktion mit Biotin Abbildung 2-6 oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden kann.

Das Synthesekonzept basiert auf der von uns entwickelten Synthese von Saccharidmimetika unter Ausnutzung der Diels-Alder-Reaktion (DAR) von Furanen mit Maleinimiden bei höheren Temperaturen. Zur Unterstützung kann bei der Synthese die Mikrowelle eingesetzt werden, deren reaktionsbeschleunigender Einfluss auf die Diels-Alder-Reaktion (DAR) vielfältig belegt ist. Unter Ausnutzung von Nachbargruppeneffekten und einer minimalen Schutzgruppenstrategie können mehrere modifizierte Saccharide nacheinander mit den Furanen verknüpft werden. Nach der erfolgten Freisetzung des neuen Furanderivates und der Abspaltung von Schutzgruppen wird das jeweilige Furan an das Maleinimid bei einer Temperatur von 40°C mittels der DAR gebunden. Auf diese Weise können gezielt Substanzbibliotheken aufgebaut werden. Als Ausgangsstrukturen benutzten wir die von uns kürzlich beschriebenen auf Furanmethanolen basierenden Saccharide.

Phase 4: Experimentelle Prüfung wichtiger Eigenschaften der experimentell dargestellten Zielstrukturen

Ziel dieser Phase war die Charakterisierung der in Phase 3 gewonnenen neuen Verbindungen hinsichtlich der oben genannten Eigenschaften. Die neu dargestellten Saccharidmimetika wurden zunächst chemisch charakterisiert (u.a. Wasserlöslichkeit, Strukturbestätigung). Sie wurden dann in entsprechenden Assay-Systemen (Kanzerogenität, Neurotoxizität) auf ihre Wirksamkeit getestet. An verschiedenen humanen Tumorzelllinien, die bei uns vorhanden waren, wurde die Zytotoxizität bestimmt. Auch zur Ermittlung der Inhibition der Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix wurden die entsprechenden Assaysysteme angewandt.

Die cytotoxische Wirksamkeit der neuen Verbindungen wurde an verschiedenen humanen Tumorzelllinien untersucht sowie der Einfluss der Saccharidmimetika auf die Zelladhäsion und Migration.

1. Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen über 24-96 h in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurden in ersten Versuchen die humanen Melanomzelllinien WM-115 aus dem Primärtumor und WM-266-4 aus der Metastase verwendet. Die Zytotoxizität wurde mit dem Sulforhodamin Assay bestimmt. Der Farbstoff bindet an das Protein von fixierten Zellen im sauren Milieu und kann basisch wieder abgelöst und in einem Elisa Reader vermessen werden.
2. Adhäsionsassay auf verschiedenen Extrazelluläre Matrixproteinen. In diesem Assay wurden nur Zellen der Linie WM-115 verwendet, da WM-266-4 Zellen schlecht adhären und in den Waschschritten abgelöst werden.
Die Wells einer 96-Well-Platte werden mit je 50 µl Fibronectin (human, je 0,5 µg pro 50 µl befüllt) und abgedeckt über Nacht bei 4° C gelagert. Am nächsten Tag wird die Platte vorsichtig auf einem Stück Haushaltspapier ausgeklopft. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen werden die Wells mit 200 µl Adhäsionspuffer befüllt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wäscht man mit jeweils 200 µl PBS, um nicht anhaftende Zellen abzulösen. Die adhären Zellen werden trypsiniert. Je 50 µl werden $2 \cdot 10^4$ Zellen benötigt. Die Zellen werden in SCFM mit dem zu untersuchenden Saccharidmimetikum aufgenommen und 30 Minuten im Schüttler (500 rpm) bei der typischen Wachstumstemperatur inkubiert. Nach dieser kurzen Inkubationszeit werden

die Zellen in die Wells der Kulturplatte pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird vorsichtig abgenommen. In jedes Well gibt man jeweils 100 µl der Fixierlösung Formalin und fixiert die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lösung wird vorsichtig abgekippt und bei RT an der Luft trocknen lassen. Nach dem Waschen mit dem Boratpuffer gibt man 50 µl der Methyleneblau-Lösung hinzu und lässt die Kulturplatte 10 Minuten bei RT stehen. Nach der Anfärbung der Zellen mit dem Vitalfarbstoff wäscht man mehrmals mit Leitungswasser den überschüssigen Farbstoff weg, klopft die Platte vorsichtig auf Haushaltspapier aus und lässt jene an der Luft trocknen. Danach wird der Farbstoff durch Zugabe von 200 µl Extraktionsmittel 30 Minuten extrahiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 651 nm mittels Spektralphotometrie (µQuant, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VER, USA).

3. Migrationsassay (wound healing). Hier wurden beide Zelllinien eingesetzt. Dazu wurde in ein Zellrasen in einer 12-Well Platte mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Abgelöste Zellen wurden gewaschen und neues Medium mit den zu testenden Substanzen zugesetzt. Die Zellen wurden weiter inkubiert und nach 2, 4, 8 und 20 Stunden immer das gleiche Areal unter dem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Die unbehandelten Zellen haben die Wunde nach 20-24 h vollständig geschlossen.
4. Einfluss der Substanzen auf die sezernierte Matrixmetalloprotease (MMP) Aktivität. Sowohl WM-115 als auch WM-266-4 sezernieren MMP-2 und aktivieren die Proform. Zellen wurden dazu in serumfreiem Medium unter Zusatz der zu untersuchenden Substanzen 24-48 h kultiviert. Das konditionierte Medium abgenommen, zentrifugiert und der Proteingehalt bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden auf einem Gelatine-haltigen SDS-Polyacrylamid Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Auswaschen des SDS wurde das Gel inkubiert und die Gelatinolytische Aktivität nach Anfärben mit Coomassie Blau als weiße Banden in einem blauen Gel sichtbar gemacht. Western Blot Analyse kann die Identität der MMP bestätigen falls neue Banden auftauchen.

Wurde in zwei Konzentrationen getestet, so konnten einschließlich der Zytotoxizität etwa 4 Substanzgemische pro Monat getestet werden, also etwa 20 verschiedene

Verbindungen. Wurde in einem der Gemische ein positives Signal in einem der Tests beobachtet, so mussten zur weiteren Identifikation die darin enthaltenen Verbindungen einzeln dargestellt und getestet werden.

An dieser Stelle setzte dann das Molecular Modelling ein. Herr Dr. von der Lieth vom DKFZ bietet mit seiner Gruppe derartige Berechnungen als Dienstleistung an. Herr Dr. von der Lieth ist ein ausgewiesener Fachmann auf dem Gebiet der Saccharide und arbeitet am Aufbau von Glyco-Datenbanken. Seine Ergebnisse sollten dazu dienen die weiteren Synthesepfanungen effizienter zu gestalten um schneller zu aktiven Verbindungen zu gelangen.

Die biologische Abbaubarkeit wurde in standardisierten OECD-Tests (301 D, 302 B) untersucht, die den verwendeten SAR-Modulen entsprechen.

Abbruchkriterien waren: Die Wirkstoffe sind nicht in ausreichender Menge darstellbar und/oder weisen entgegen der Vorhersage nicht die hinsichtlich der Anwendung erforderlichen Eigenschaften auf.

Es war vorgesehen nach einem ersten Durchlauf durch alle 4 Phasen mit Arzneimittelherstellern Kontakt aufzunehmen und mindestens einen bei den weiteren Arbeiten einzubinden. Bisher wurde jedoch kein Partner gefunden. Es werden dazu nach Abschluss des Vorhabens nochmals Anstrengungen unternommen.

2.2.3 Arbeitspakete

Die Arbeitspakete des Vorhabens entsprechen den oben beschriebenen Phasen.

Arbeitspaket 1.1: Implementierung der Module

Mit verfügbaren, bereits vorhandenen Daten aus Stoffberichten wurden Datensätze zusammengestellt und soweit notwendig und möglich ergänzt (u.a. Internetrecherchen), um daraus das Modul zur biologischen Abbaubarkeit zu erarbeiten und zu validieren. In dieser Phase wurden auch die weiteren benötigten Module (Mutagenität, Kanzerogenität, Neurotoxizität,) installiert, und die Auswahl der externen Experten und deren Einbindung getroffen.

Arbeitspaket 1.2: Auswahl der Synthesestrategien für die Zuckerbausteine

Es wurden die aussichtsreichsten Zucker ausgewählt, wobei sowohl Mono- als auch Disaccharide berücksichtigt wurden. Die möglichen funktionellen Gruppen wurden benannt und effiziente Synthesewege ausgewählt und formuliert.

Arbeitspaket 2.: Durchführung der Screenings

Eine chemische Leitstruktur wurde ausgewählt, die nach dem Erfahrungswissen der Antragsteller und weiterer Experten interessant für den Markt ist, als wirksam und synthetisierbar eingeschätzt wurde. Von dieser Struktur wurden unter Zugrundelegung des empirischen Wissens über die Wirksamkeit, die Verträglichkeit, ihrer Umweltverträglichkeit sowie ihrer Synthetisierbarkeit auf dem Papier über 100 neue Zielstrukturen entworfen. Nach Durchführung einer Patentrecherche wurden aus diesen bezüglich Wirksamkeit, Kanzerogenität und Neurotoxizität, Wasserlöslichkeit, Adsorption im Darm und biologischer Abbaubarkeit mittels QSAR 10-20 Erfolg versprechende Kandidaten identifiziert. Diese wurden, um die erwartete Wirksamkeit nochmals abzusichern, mittels Computer basierendem Molecular Modeling bzgl. der Bindungsfähigkeit an den Rezeptor geprüft und ggf. modifiziert, bevor sie realiter synthetisiert wurden. QSAR-basierte Datenbanken für Strukturelemente und Stoffe wurden etabliert und laufend ergänzt. Im Fall der Bildung schwer abbaubarer Metabolite (Vorhersage mittels SAR) wurde geprüft, ob diese mittels moderner analytischer Methoden fassbar sind und identifiziert werden können, um die Kenntnisse über die dem Abbau widerstehenden Strukturen ebenfalls für die Vorhersage nutzen zu können. Damit konnten umweltverträgliche und zugleich wirksame Leitstrukturen ermittelt werden.¹

Arbeitspaket 3.1: Synthese der Zuckerbausteine

Herstellung verschiedener Glycosylkomponenten auf der Basis der ausgewählten Mono- und Disaccharide. Es wurde pro Substanz ca. 1 g bereitgestellt. Die Bausteine trugen unterschiedliche funktionelle Gruppen (z. B. Methylgruppe, Halogen-

¹ Viele (Q)SAR-Modelle erlauben es nicht die für eine Moleküleigenschaft maßgeblichen chemischen Teilstrukturen abzufragen, zu bewerten und im Sinne des hier dargestellten prospektiven Ansatzes nutzbar zu machen. Auch können oft keine eigenen Module für bisher nicht darin enthaltene Parameter wie z.B. unterschiedliche Abbautests aufgebaut werden. Dies ist als ein gravierender Nachteil solcher Software für die hier vorgeschlagene Vorgehensweise anzusehen. Außerdem ist der der Modellierung zugrunde liegende Datensatz oft nicht bekannt. Daher kann die Qualität der Modellierung/Vorhersage vom Anwender nicht eingeschätzt oder selbst validiert werden [5][6]. Im Gegensatz dazu können die Lerndatensätze von Multicase laufend mit experimentellen Daten ergänzt und validiert, d. h. dem Erkenntnisfortschritt angepasst und durch experimentelle Untersuchungen die Datenbasis vergrößert werden. Mit dem Entwickler dieser Software besteht außerdem eine Kooperation, so dass diese Software angewendet werden soll.

substituenten). Hydroxylgruppen wurden als Benzoate geschützt. Analyse und Charakterisierung der Bausteine.

Arbeitspaket 3.2: Synthese der Saccharidmimetika

Umsetzung der Zuckerbausteine mit den Hydroxylgruppen der Furane; Durchführung der Diels-Alder-Reaktion; Gewinnung der Saccharidmimetika und Charakterisierung der Produkte.

Arbeitspaket 4.1: Test zur biologischen Abbaubarkeit

Es wurde die biologische Abbaubarkeit der synthetisierten Stoffe experimentell in zwei Tests geprüft, die auch als SAR-Module vorhanden sind (OECD 302B, OECD 301D).

Arbeitspaket 4.2.: Tests auf Zelladhäsion und Zellmigration

Analyse der Einflüsse der Saccharidmimetika auf die Zelladhäsion und Migration.

Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen über 24-96 h in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurden in ersten Versuchen die humanen Melanomzelllinien WM-115 aus dem Primärtumor und WM-266-4 aus der Metastase verwendet. Die Zytotoxizität wurde mit dem Sulforhodamin Assay bestimmt. Der Farbstoff bindet an das Protein von fixierten Zellen im sauren Milieu und kann basisch wieder abgelöst und in einem Elisa Reader vermessen werden.

Adhäsionsassay auf verschiedenen Extrazelluläre Matrixproteinen. In diesem Assay wurden nur Zellen der Linie WM-115 verwendet, da WM-266-4 Zellen schlecht adhäreren und in den Waschschrinen abgelöst werden. Flexible 96 Well Platten wurden mit Fibronectin beschichtet. Dieses ECM Protein hat sich als die optimale Matrix für diese Zellen etabliert, d.h. die Bindung ist gut und reproduzierbar. Die Zellen wurden 30 Minuten mit der zu testenden Substanz inkubiert, $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well ausgesät, eine weitere Stunde inkubiert, nicht adhärerende Zellen gewaschen. Nach Fixierung und Anfärbung der Zellen mit dem Vitalfarbstoff Methyleneblau erfolgte die Messung der Extinktion bei 651 nm mittels Spektralphotometrie.

Migrationsassay (wound healing). Hier wurden beide Zelllinien eingesetzt. Dazu wurde in ein Zellrasen in einer 12-Well Platte mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Abgelöste Zellen wurden gewaschen und neues Medium mit den zu testenden Substanzen zugesetzt. Die Zellen wurden weiter inkubiert und nach 2, 4, 8

und 20 Stunden immer das gleiche Areal unter dem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Die unbehandelten Zellen haben die Wunde nach 20- 24h vollständig geschlossen.

Einfluss der Substanzen auf die sezernierte Matrixmetalloprotease (MMP) Aktivität. Sowohl WM-115 als auch WM-266-4 sezernieren MMP-2 und aktivieren die Proform. Zellen wurden dazu in serumfreien Medium unter Zusatz der zu untersuchenden Substanzen 24- 48h kultiviert. Das konditionierte Medium abgenommen, zentrifugiert und der Proteingehalt bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden auf einem Gelatinehaltigen SDS-Polyacrylamid Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Auswaschen des SDS wurde das Gel inkubiert und die Gelatinolytische Aktivität nach Anfärben mit Coomassie Blau als weiße Banden in einem blauen Gel sichtbar gemacht. Western Blot Analyse kann die Identität der MMP bestätigen falls neue Banden auftauchen.

2.2.4 Zusammenarbeit der Antragsteller

Die Zusammenarbeit der Antragsteller, die sich seit längerem kennen und schon miteinander kooperiert haben, ist in Abbildung 2-3 dargestellt.

Projektstruktur

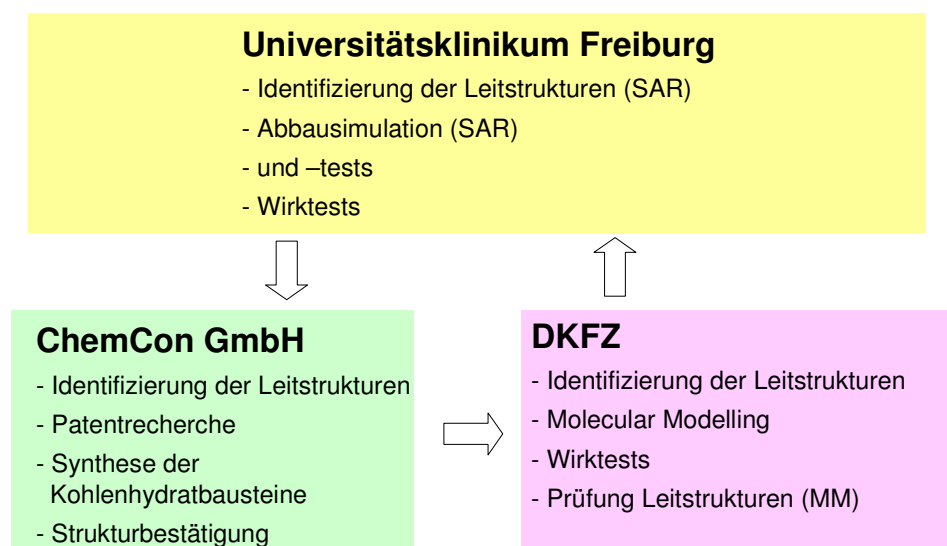


Abbildung 2-3 Projektstruktur, Aufgaben und Zusammenarbeit der Antragsteller

Alle Partner waren die ganze Zeit in das Projekt involviert. Die Auswahl von Leitsubstanzen wie auch der letztendlich zu synthetisierenden und zu prüfenden Substanzen wurde von allen Partnern gemeinsam durchgeführt. Die Arbeiten liefen für einzelne Substanzen in Phase 2-4 zum Teil zeitversetzt und zum Teil parallel (s. Zeitplan). Der Austausch der Ergebnisse erfolgte regelmäßig. Alle 4 Monate wurden routinemäßige Treffen durchgeführt, dazwischen erfolgte die Kommunikation mittels elektronischer Medien.

2.2.5 Die Bedeutung der Integrine

Integrine sind an vielen biologischen Prozessen wie Zell-Matrix-Adhäsion, Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt. Sie gehören zu den vier verschiedenen Klassen von Zelladäsionsmolekülen (CAMs), über die Zellen an die Extrazellulärmatrix oder an benachbarte Zellen binden können. Integrine sind transmembrane, heterodimere Proteine, welche aus einer α - und β -Untereinheit bestehen.

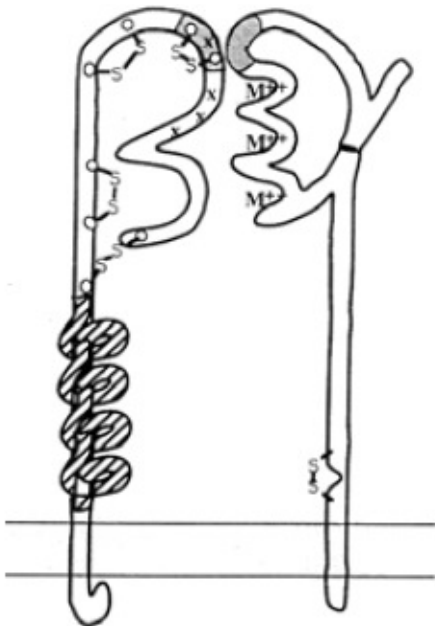


Abbildung 2-4 Schematischer Aufbau eines Integrin-Rezeptors.

Die beiden Untereinheiten des Integrins $\alpha_v\beta_3$ bilden eine sogenannte Kopf- und Stelzenregion (s. Abbildung 2-4). Die Stelzen durchdringen die Plasmamembran und enden in der intrazellulären Region, wobei die gemeinsame Kopfgregion die spezifische Bindungsstelle für ein Tripeptid mit der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz) bildet. Genau an dieser Bindungsstelle können Liganden wie z.B.

Fibronectin, Vitronectin oder Collagen binden, die allesamt Proteine der ECM sind und durch die Bindung an das Integrin eine Signaltransduktion induzieren. Da Integrine eine große Rolle bei vielen entzündlichen Prozessen, aber auch bei der Krebsmetastasierung spielen, kann die Veränderung der Bindung zwischen jenen und an sie bindenden Proteine wie z.B. Fibronectin die Entwicklung neuer Arzneistoffe fördern, wie z.B. Tumortherapeutika.

2.3 Eigene Vorarbeiten

Oligosaccharid-Mimetika, die eine definierte Struktur und leichte synthetische Zugänglichkeit aufweisen, sind ein gutes Mittel um Protein-Saccharid-Interaktionen zu untersuchen. Basierend auf Schmidt's Imidat Synthesestrategie entwickelte das DKFZ eine Methode zur Erstellung von Saccharid-Mimetika enthaltenden Substanzbibliotheken, die Furan als Kern enthalten (Abbildung 2-5) [1]. Furan wurde aus dem Grund als Kernmolekül gewählt, weil es als Furanose betrachtet werden kann, jedoch eine definierte Stereochemie zeigt. Die Furane, besonders das 3,4-Bishydroxymethylfuran, sind synthetisch einfach zugänglich und es ist ein Dienophil, welches über eine Diels-Alder-Reaktion mit Biotin (Abbildung 2-6) oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden kann.

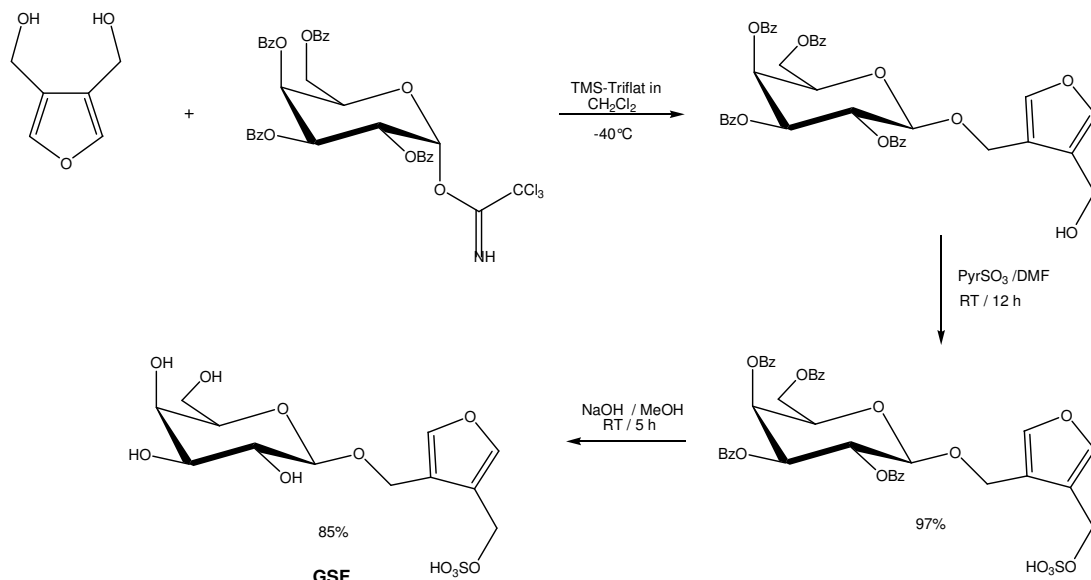


Abbildung 2-5 Synthese GSF (3-O-D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfato-oxymethyl-furan)

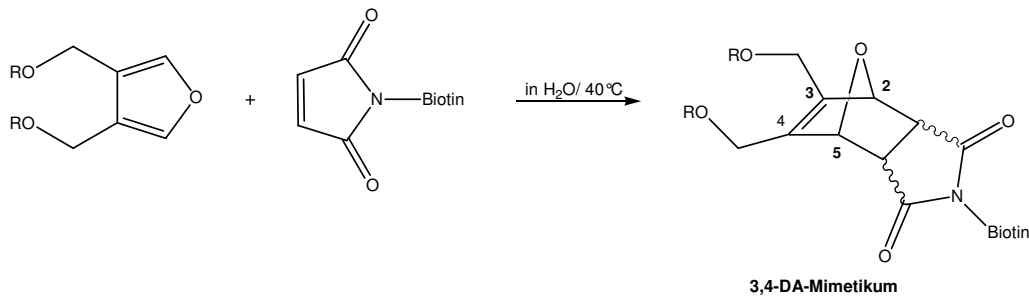


Abbildung 2-6 Schematische Darstellung einer Diels-Alder-Reaktion mit 3,4-Bishydroxymethyl glycosidierten Furan (Dien) und biotinylierten Maleinimid (Dienophil) zum biotinylierten 3,4 DA-Mimetikum. R= Monosaccharid.

In diesem Projekt wurde das Potential weiterer neu synthetisierter Saccharidmimetika getestet, verschiedene Schritte der metastatischen Kaskade *in vitro* zu hemmen. Dabei wurden an humanen Melanomzellen (WM-115 und WM-266-4) einige ausgewählte Strukturen auf ihre Wirkung gegenüber der Zell-Adhäsion und -Migration sowie der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen untersucht. Wie Claas Gronewold am DKFZ kürzlich zeigen konnte, wird die biologische Wirksamkeit durch die Einführung eines Sulfatrestes deutlich verbessert^[2]. Mit der Einführung der Sulfatgruppe am furanoiden Grundgerüst ist es gelungen, eine Bifunktionalität zu schaffen, die ebenfalls in der Lage ist Oberflächenmoleküle zu adressieren und damit die von ihnen gesteuerten biologischen Prozesse signifikant zu beeinflussen. GSF inhibiert *in vitro* sowohl die Zell-Adhäsion und -Migration als auch die Aktivierung von MMP-2, ohne dabei cytotoxisch zu sein. Der Sulfatrest scheint für die inhibitorischen Effekte das entscheidende Pharmakophor zu sein. Ein großer Nachteil des GSF besteht in den relativ hohen Konzentrationen, die benötigt werden, um die gewünschten biologischen Effekte zu erzielen. Wie anhand zahlreicher Beispiele belegt, ist der *in vitro* Einsatz von Saccharidmimetika in mM Konzentrationen zwar wirksam, ohne dass sich akut cytotoxische Effekte zeigen, aber zur Durchführung sinnvoller *in vivo* Studien ist eine Verbesserung der Aktivität unbedingt notwendig. Als Modifikation des GSF, unter Erhalt seiner bisherigen Eigenschaften, ist eine Substitution der Sulfatgruppe durch eine Phosphat-, Phosphonat- oder Acetat-Gruppe denkbar, sowie eine Verlängerung der Saccharideinheit am Furanring. Aus Kombinationsversuchen mit Liganden von Integrinen und GSF schloss Gronewold, dass eine Inkubation von GSF auf Integrinen und nicht mit Lektinen auf der Zelloberfläche für die beobachtete Wirkung verantwortlich sein könnte. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse des Blind Dockings am Integrin $\alpha_v\beta_3$ bestätigt.

2.3.1 Optimierung der Leitstruktur GSF

Gronewold et al. zeigten, dass GSF in vitro die Zelladhäsion und –migration als auch die Aktivierung von MMP-2 inhibieren kann, ohne dabei cytotoxisch zu sein. Ein großer Nachteil des Saccharidmimetikums GSF liegt jedoch darin, dass zu hohe Konzentrationen (5 mM) benötigt werden, um diese o.g. inhibitorischen Effekte zu erzielen. Eine Optimierung der Struktur soll dazu führen, dass man die gleichen Effekte auf Zelladhäsion und –migration mit einer weitaus geringeren Konzentration erzielen kann. Die Optimierung der Leitstruktur GSF erfolgte u.a. mit Hilfe von Molecular Modeling (Docking) und durch Synthese einer Vielzahl von neuen, Verbindungen, die in einem einfachen biologischen Test, dem Migrationsassay, untersucht wurden. Zeigte eine Verbindung eine Inhibition der Migration von humanen Melanomzelllinien in einem Konzentrationsbereich kleiner als 5 mM, wurde sie in weiteren Assays auf ihre Wirksamkeit hin geprüft. Sowohl negative als auch positive Ergebnisse der chemischen Modifikationen wurden für die nächsten Syntheseschritte berücksichtigt. Durch diese Art von Drug Development, welches Molecular Modeling, Synthese und biologisches Screening umfasst, konnten weitere Rückschlüsse auf die Art der Wechselwirkungen des Saccharidmimetikums mit der ECM der untersuchten humanen Melanomzelllinien gemacht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Alle chemischen Reaktionen wurden in wasserfreien, käuflich erworbenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die für die Synthese notwendigen Reagenzien und Edukte wurden, falls nicht anders angegeben, über folgende Firmen erworben: Sigma-Aldrich (Deisenhof, D), Merck (Darmstadt, D), Fluka (Neu-Ulm, D).

Dünnschichtchromatographie und Sprühreagenzien

- Aluminiumfolien „Kieselgel 60 F254“ der Firma Merck
- „Polygram Sil G/UV254“-Platten der Firma Macherey&Nagel

Die Detektion erfolgte im UV, nach Entwicklung durch Besprühen und anschließender Wärmbehandlung mit einem der folgenden Färbereagenzien:

- Cer-Molybdän-Sprühreagenz: Ammoniummolybdat (20 g) und Cer(IV)sulfat (0.4 g) in 10%iger Schwefelsäure (400 ml)

- Vanillin-Schwefelsäure-Sprühreagenz: 1% Vanillin in 15%iger Schwefelsäure.

Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR: Bruker AM 250 (250 MHz) [Bruker, Rheinstetten, D]

Bruker AM 500 (500 MHz) [Bruker, Rheinstetten, D]

¹³C-NMR: Bruker AM 250 (63 MHz) [Bruker, Rheinstetten, D]

Bruker AM 500 (125 MHz) [Bruker, Rheinstetten, D]

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Massenspektroskopie

Elektrospray-Ionisation (ESI) [Finnigan MAT TSQ 7000]

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden anhand ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und massenspektrometrischen Daten vollständig identifiziert und charakterisiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Allgemeines

Die adhärent wachsenden Zellen WM-115 und WM 266-4 wurden alle fünf Tage mit Hilfe von Trypsin abgelöst, verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Hierfür wurde zuerst das Medium abgezogen, mit 8 ml PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 2 ml Trypsin, welches sofort wieder abgezogen wurde, die Zellen nach 5 Minuten abgelöst. Nach Zugabe von 10 ml frischen Medium wurde die Zellzahl mittels des CASY® Geräts (innovatis AG, Reutlingen) bestimmt. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und in ein CASY-Röhrchen überführt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

a.) Mittels CASY

Die Bestimmung der Zellzahl von den adhärent wachsenden Zelllinien WM-115 und WM 266-4 erfolgte mit einem Casy® Zellzählgerät. Zur Messung wurden die Zellen in einem Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare mit definiertem Querschnitt gesaugt. Während der Messung wurde

über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängt die Zelle eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass die Zellen die Messpore einzeln passieren. Aus den Einzelmessungen, die durch Zellen hervorgerufen werden, die beim Durchtritt durch die Messpore ein Signal mit entsprechender Pulsfläche erzeugen, berechnet Casy® das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse). Aus der volumenlinearen Originalverteilung wird eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet. Alle weiteren Messparameter wurden auf der Basis dieser Größenverteilung ermittelt.

b.) Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot der Zellsubstanz wurde mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und unter das Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer pipettiert.

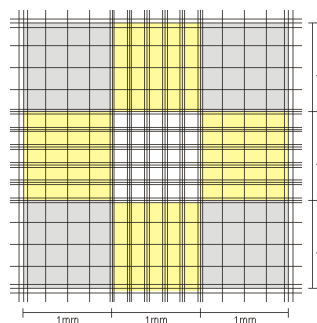


Abbildung 3-1 Neubauer-Zählkammer

Die Zellen in den jeweiligen Quadranten wurden gezählt, wobei zwischen lebenden Zellen, die ungefärbt sind, und toten Zellen, die anhand der Blaufärbung durch den Farbstoff erkennbar sind, unterschieden wurde.

$$\text{Zellen/ml} = m' \cdot v \cdot k$$

m' = Mittelwert

v = Verdünnungsfaktor

$k = 1 \cdot 10^4$ (Volumen der Zählkammer)

Gleichung 1 Bestimmung der Zellzahl pro ml

3.2.3 Kultivierung der Zelllinien WM-115 und WM 266-4

- Medium für WM-115 und WM-266-4: RMPI 1640 w/o Phenolred (Biochrom Berlin)
- 2 mM sterilfiltriertes L-Glutamin (5 ml einer 200 mM Stammlösung)
- 10 ml HEPES
- 10% FCS (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach)

Nach Zugabe von 5 ml L-Glutamin und 10 ml Hepes in das RMPI-Medium wurde dieses gut durchmischt, 50 ml Medium abgezogen und 50 ml FCS zugegeben, welches vorher durch Hitze inaktiviert wurde.

Die humanen Melanomzelllinien stammen von ATCC® (USA). Sie wurden auf Mykoplasmen getestet. Beide Linien wurden alle fünf Tage trypsinisiert und 2 Millionen Zellen in 30 ml Medium in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche gegeben. Alle 48 h wurde 2/3 des Mediums abgezogen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Wachstumsbedingungen:

WM 115: 34,5 °C, 5% CO₂

WM 266-4: 37 °C, 5% CO₂

3.2.4 Migrations-Assay

Für den Migrations-Assay wurden die humanen Melanom-Zelllinien WM-115 aus dem Primärtumor und WM-266-4 aus der Metastase verwendet. Dazu wurden 2x10⁵ Zellen in ein Well einer 12-Well-Platte ausgesät und unter zellkulturspezifischen Bedingungen wachsen gelassen. Nach 24 h wurde mit einer Spitze einer 100 µl Eppendorf-Tip in den konfluent gewachsenen Zellrasen eine Wunde geritzt. Abgelöste Zellen wurden mit serumfreien Medium gewaschen und neues Medium mit den zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Zellen wurden weiter inkubiert und nach 2, 4, 8 und 20 Stunden immer das gleiche Areal unter dem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Die unbehandelten Zellen hatten die Wunde nach 20-24 h vollständig geschlossen.

3.2.5 Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Toxizität der Saccharidmimetika wurde ein Sulforhodamin-Assay durchgeführt. Dieser färbt zuvor fixierte Proteine adhärent wachsender Zellen an und kann, nach alkalischem Wiederablösen des Farbstoffs bei 561 nm direkt im Photometer vermessen werden.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen in die Wells einer 96-well Platte pipettiert und 24 h unter den zellspezifischen Kulturbedingungen inkubiert. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde das Medium gegen Medium ausgetauscht, in welchem die zu untersuchenden Saccharidmimetika in verschiedenen Konzentrationen gelöst waren. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium (200 µl) mitsamt nicht-adhären Zellen vorsichtig abgezogen. Die adhären Zellen wurden nach Zugabe von 100 µl Fixierlösung innerhalb von 5 min bei -20 °C am Boden der Wells fixiert. Nach der Fixierung wurden die 100 µl abgezogen und die Platte sehr vorsichtig fünfmal mit Leitungswasser gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurden 100 µl SRB-Lösung auf die fixierten Zellen gegeben und die Platte 30 Min im Dunkeln stehen gelassen. Der Überstand wurde abgezogen und es wurde mehrere Male mit 1%iger Essigsäure gewaschen, bis die Lösung völlig klar war. Die 96-Well Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft und an der Luft getrocknet. Nach der Zugabe von 100 µl TRIS wurde der Proteinfarbstoff unter Schütteln (5 Minuten) herausgelöst. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 561 nm mittels Spektralphotometrie (µQuant, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VER, USA).

3.2.6 Adhäsions-Assay

Die Wells einer 96-Well-Platte wurden mit je 50 µl Fibronectin (human, je 0,5 µg pro 50 µl befüllt) versetzt und abgedeckt über Nacht bei 4° C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte vorsichtig auf einem Stück Haushaltspapier ausgeklopft. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Wells mit 200 µl Adhäsionspuffer befüllt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wurde mit jeweils 200 µl PBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen abzulösen.

Die adhären Zellen wurden trypsiniert. Je 50 µl wurden für $2 \cdot 10^4$ Zellen benötigt. Die Zellen wurden in SCFM mit dem zu untersuchenden Saccharidmimetikum aufgenommen und 15 Minuten im Schüttler (500 rpm) bei der typischen Wachstumstemperatur inkubiert. Nach dieser kurzen Inkubationszeit wurden die

Zellen in die Wells der Kulturplatte pipettiert und 1 h bei 37° C inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig abgenommen. In jedes Well wurden jeweils 100 µl der Fixierlösung Formalin gegeben und die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Lösung wurde vorsichtig abgekippt und bei RT an der Luft trocknen gelassen. Nach dem waschen mit dem Boratpuffer wurden 50 µl der Methylenblau-Lösung hinzu gegeben und die Kulturplatte 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach der Anfärbung der Zellen mit dem Vitalfarbstoff wurde mehrmals mit Leitungswasser der überschüssige Farbstoff weg gewaschen, die Platte vorsichtig auf Haushaltspapier ausgeklopft und jene an der Luft getrocknet. Danach wurde der Farbstoff durch Zugabe von 200 µl Extraktionsmittel 30 Minuten extrahiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 651 nm mittels Spektralphotometrie (µQuant, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VER, USA).

3.2.7 Zymographie zum Nachweis von MMP-Aktivität

Mittels Zymographie kann die Gelatinase-Aktivität in serumfreiem Zellkulturmedium (SCFM) nachgewiesen werden. Gelatinehaltige Gele zeigen MMP-2 und MMP-9 Aktivität durch Abbau der Gelatine.

Durchführung:

In einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden die adhärennten Zellen (WM-115 oder WM-226-4) ausgesät, wobei die Zellzahl bei $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well liegen sollte. Die Zellen wurden unter den jeweiligen zellkulturspezifischen Bedingungen für 72 h wachsen gelassen, wobei der Zellrasen zu 90% konfluent sein sollte. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und jedes Well mit je 5 ml SCFM dreimal gewaschen. In jedes Well wurde nun 1 ml SCFM gegeben und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Das serumfreie Medium wurde abgenommen und wieder mit jeweils 2 ml SCFM gewaschen. In jedes Well wurden 1 ml SCFM gegeben (sowohl in der Kontrolle als auch mit den Analoga). Das zu untersuchende Saccharidmimetikum wurde in SCFM gelöst, in das Well pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Zellen mit jeweils 50 µl Fibronectin stimuliert wurden. Nach der Inkubation der Zellen bei 37° C für 4 h wurde das Medium abgezogen, in ein Eppendorf-Tube überführt und bei -80° C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 37° C schnell aufgetaut und sofort in Eis gestellt. Nun wurden in jedes Eppendorf-Tube 50 µl Gelatine-Seferase-4B bead

suspension gegeben, die Tubes mit Parafilm abgedichtet und bei einer Temperatur von 4° C für 2 h rotieren gelassen. Danach wurden sie bei 3000 U/min und 4° C für 5 Minuten in einer Hettich-Fuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet 2 x mit je 1 ml TRIS-Puffer mit 20 µl Tween 20 gewaschen. Nach Zugabe von 30 µl Sample Buffer wurden die Proben für 30 min bei 37° C in einen Schüttler gegeben. Von dem Marker wurden 10 µl bei 95° C für 10 min in den Schüttler gegeben. Alle Proben wurden bei 4000 U/min für 5 Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand abgezogen und in ein 500 µl Tube überführt.

Das Trenngel wurde nach Zugabe von APS und TEMED zügig zwischen die zwei senkrecht stehenden Glasplatten der Gelapparatur pipettiert und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde nach Entfernen des Wassers das Sammelgel gegossen und ein Kamm geschoben, der für die Bildung der Probenaschen benötigt wird.

Nach 30 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Wasser gespült. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer befüllt. Nachdem die Proben in die Taschen des Gels pipettiert wurden, wurde eine Spannung von 120 bis 150 V angelegt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der Markerfarbstoff etwa 1 mm vor dem unteren Rand der Glasplatten angekommen war. Danach wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten getrennt und zwei Mal für jeweils 15 Minuten mit Waschpuffer auf einem Taumler gewaschen. Nach weiterem Waschen mit VE-Wasser wurden die Gele bei 37° C im Brutschrank für 48 h in Entwicklungspuffer inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie mit der Coomassie-Lösung für 20 Minuten gefärbt. Schließlich wurden die Gele mit Methanol:Essigsäure:Wasser im Verhältnis 1:1:8 entfärbt. Die Aktivität der Gelatinasen wurde nun anhand farbloser Banden auf dem blaugefärbten Gel sichtbar. Die Gele können nach dem Einscannen zur Aufbewahrung getrocknet werden.

3.3 Implementierung der SAR Module

Die verfügbaren Daten aus Stoffberichten, die beim Projektnehmer vorhanden waren, wurden zusammengestellt und soweit notwendig und möglich ergänzt (u. a. via Internetrecherchen). Module zur biologischen Abbaubarkeit wurden erarbeitet und erfolgreich validiert. Bei der Modulerstellung wurden verschiedene Software und Module nebeneinander eingesetzt und verglichen (s. Tabelle Seite 66). Zu den in den

Softwaresystemen direkt verfügbaren Parameter sind zusätzlich quantenchemische und physikochemische Parameter berechnet und deren Eignung für die Modulbildung getestet worden. Die Datenauswahl für die einzelnen Module sowie die Parameterauswahl wurden hierfür angepasst und variiert. Dabei sind nahezu 150 Module zur biologischen Abbaubarkeit erstellt und getestet worden. Mit Hilfe der Validierungsergebnisse (interne, externe und Crossvalidierung) wurde das beste Modul, basierend auf Daten zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit gem. OECD 301F Tests („MITI Daten“), ausgewählt. Im Weiteren wurden damit die Vorhersagen zur biologischen Abbaubarkeit durchgeführt. Gemeinsam wurden von allen Projektpartnern mögliche Kandidaten, die als Zielstruktur in Frage kamen, bei zwei Projekttreffen gemeinsam diskutiert. Mit dem besten Modul zur Prädikation der biologischen Abbaubarkeit in Kläranlagen wurden von den über 100 möglichen Zielstrukturen diejenigen identifiziert, welche bezüglich der biologischen Abbaubarkeit und des $\log P_{OW}$, die erfolgversprechendsten Kandidaten waren. Zudem wurde eine weitere öffentlich zugängliche Software (BioWin) eingesetzt, mit der eine Vorhersage der biologischen Abbaubarkeit der Zielstrukturen in der Kläranlage durchgeführt wurde. Die verschiedenen Daten wurden im nächsten Schritt untereinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass jedes Modul seine individuellen Schwächen besitzt. Das von uns mit Hilfe einer kommerziellen QSAR-Software erstellte Modul besitzt im Vergleich zur BioWin Software den Vorteil, dass es durch Hinzufügen von zusätzlichen Daten weiter verbessert werden kann und dass der interne im Modul verwendete Datenbestand bekannt ist. Dabei aufgetretene Schwierigkeiten sind z.B., dass bei Stellungsisomeren alle verwendeten Programme (s. 4.7.2) zwischen den Isomeren gleiche oder sehr ähnliche Abbaubarkeiten voraussagen. Dies ist so aber nicht zu erwarten. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Datenlage.

Mit den vorhandenen Daten konnten Module erstellt werden, die eine gute Vorhersage der Abbaubarkeit für viele Chemikalien erlauben. In diesen Modulen konnten wir durch Erhöhung der Parameteranzahl eine verbesserte Vorhersage auf die Chemikalien, mit denen das Modul selbst erstellt wurde, erreichen, verloren dadurch aber wieder an Allgemeingültigkeit und somit evtl. an Aussagekraft (Overfitting). Eine bessere Datenlage (größere und spezifischere Datenmenge) wiederum dürften die Module verbessern. Die Erfahrung zeigte bisher, dass Abbaubarkeitsdaten von verschiedenen Abbautests nicht in einem Modul sinnvoll

zusammengefasst werden können. Unsere QSAR-basierte Datenbank für Strukturelemente und Stoffe wurde und wird laufend weiter ergänzt, damit werden zukünftige Module noch besser in ihrer Aussagekraft. Dafür wurden experimentelle Daten in weiteren Abbautests erzeugt, z.B. Closed Bottle Test, und die dazugehörigen SAR – Module implementiert.

3.4 Durchführung von Abbautests zur biol. Abbaubarkeit nach OECD

3.4.1 Closed Bottle Test (CBT nach OECD 301 D: 1992)

Testprinzip:

Der Closed Bottle Test (CBT) ist ein Abbautest, mit dem organische Stoffe auf leichte biologische Abbaubarkeit (ready biodegradability) untersucht werden. Er zählt zur Stufe 0 der OECD-Testhierarchie (Organisation for Economic Co-operation and Development), d.h. erweist sich ein Stoff im Test der Stufe 0 als leicht biologisch abbaubar, gilt diese Substanz auch in der aquatischen Umwelt als leicht biologisch abbaubar [13][14][15]. Der CBT gehört zur Gruppe der diskontinuierlichen Testverfahren (die-away-Tests) im geschlossenen System mit relativ niedriger Bakteriendichte und niedriger Testsubstanzkonzentration[16].

Durchführung:

Die Durchführung des Closed Bottle Tests erfolgte anhand der OECD-Richtlinie 301 D [13]. Es wurden der Sauerstoffgehalt, Die Bestimmung des Sauerstoffgehalts erfolgte mittels Messung mit einer Sauerstoffelektrode. Zusätzlich wurde die Temperatur sowie der pH-Wert bestimmt.

Herkunft des Inokulums:

Zur Beimpfung der Testansätze wurde als Inokulum Ablauf aus der kommunalen Kläranlage Kenzingen verwendet.

Ergänzungen zur Testnorm:

Reinigung der Flaschen:

Vor Testbeginn wurden die verwendeten Flaschen mit 10% (v/v) ethanolischer HCl-Lösung gereinigt, anschließend zweimal mit VE-Wasser und einmal mit hochreinen Wasser (Millipore-Wasser) gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Behandlung des Inokulums:

Die Entnahme erfolgte maximal 24 h vor Testbeginn, wobei das Inokulum bis zum Gebrauch belüftet wurde.

Sauerstoffsättigung:

Aus praktischen Gründen erfolgte die Sauerstoffsättigung des Wassers vor Zugabe der Mineralstammlösungen.

Flaschenanzahl:

Für jeden Messtag (Tag 0, 1, 7, 14, 21, 28) wurden Doppelansätze des Blindwerts, der Qualitätskontrolle, des Testansatzes und dessen Toxizitätskontrolle angesetzt.

Insgesamt wurden acht Substanzen parallel getestet.

Gültigkeit:

Der Test kann gemäß der Testvorschrift als valide betrachtet werden, wenn:

- innerhalb von 14 Tagen ein mindestens 60%iger Abbau der Referenzsubstanz Natriumacetat erfolgt,
- die Abbauwerte in den Parallelansätzen um weniger als 20% voneinander abweichen (im Plateau, am Testende oder am Ende des 10-Tage-Fensters (wahlweise 14d) in dem um mindestens 60% Abbau der Testsubstanz stattgefunden hat),
- in der Toxizitätskontrolle die Referenzsubstanz zu mehr als 25% abgebaut wird (bei Werten unter 25% gilt die Substanz als Inhibitor),
- im Blindansatz die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht mehr als um 1,5 mg nach 28 Tagen abnimmt,
- die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in den Testansätzen nicht unter 0,5 mg/l fällt.

Berechnung der Ergebnisse:

Der Abbau einer Testsubstanz wurde nach OECD 301 D [13] über deren Sauerstoffzehrung (BSB) ermittelt, von der die Zehrung eines mitgeführten Blindansatzes, der nur aus Mineralmedium und Inokulum besteht, abzuziehen ist (Gleichung 2).

Diese Differenz wird als prozentualer Anteil am theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) bzw. im Falle der Toxizitätskontrolle als ThSB des Gemisches aus beiden Komponenten als Abbauwert angegeben (Gleichung 3).

$$\text{BSB [mg O}_2\text{/mg Testsubstanz]} = \frac{(\text{O}_2)_{\text{T,n}} - (\text{O}_2)_{\text{B,n}}}{(\text{C}_\text{T})}$$

Gleichung 2 Berechnung des Biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB)

$$\text{Abbau [\%]} = \frac{\text{BSB}}{\text{ThSB}} \cdot 100$$

Gleichung 3 Berechnung des Abbaus in Prozent

Als leicht biologisch abbaubar gilt eine Testsubstanz dann, wenn sie innerhalb eines „10 Tage-Fensters“, das ab dem Zeitpunkt eines 10%igen Abbaus beginnt, zu mindestens 60% abgebaut wird.

3.4.2 Manometrischer Respirationstest (MRT nach OECD 301 F: 1992)

Testprinzip:

Der manometrische Respirationstest dient zur Untersuchung der leichten biologischen Abbaubarkeit von organischen Substanzen mittels Sauerstoffbedarfsmessung. Die Testsubstanz wird als Kohlenstoffquelle zu einem bestimmtem Volumen Mineralmedium gegeben, das mit Inokulum beimpft wurde. Der Ansatz wird in einem geschlossenen Gefäß (OxiTop[®] Flasche) (Abbildung 3-2) bei konstanter Temperatur (+/- 1 °C) für 28 Tage gerührt. Der Verbrauch an Sauerstoff durch den aeroben Abbau der Substanz wird über die entstehende Druckdifferenz in den OxiTop[®]-Köpfen gemessen. Das durch den Abbau entstehende Kohlenstoffdioxid wird durch Natriumhydroxid gebunden, so dass ein Unterdruck durch Sauerstoffzehrung entsteht, welcher durch die Messköpfe registriert wird. Die Menge des während des biologischen Abbaus aufgenommenen Sauerstoffs wird als Prozent des ThSB ausgedrückt und liefert Angaben zur aeroben Abbaubarkeit der Testsubstanz.



Abbildung 3-2 Messsystem von WTW für den Manometrischen Respirationstest

Durchführung:

Die Durchführung des Manometrischen Respirationstests erfolgte anhand der Richtlinien der OECD 301F [17].

Herkunft des Inokulums:

Zur Beimpfung der Testansätze wurde als Inokulum Ablauf aus der kommunalen Kläranlage Kenzingen verwendet. Die Entnahme erfolgte maximal 24h vor Testbeginn.

Abweichungen von der Testnorm:

Ansätze:

Der Blindwert sowie die Qualitätskontrolle wurden im Dreifachansatz gemessen. Für jede Substanz wurden zwei Testansätze, eine Sterilkontrolle (abiotische Effekte), sowie eine Toxizitätskontrolle angesetzt.

Insgesamt wurden jeweils 10 Substanzen parallel getestet.

Kohlenstoffelimination:

Zusätzlich wurde die Kohlenstoffelimination mittels DOC-Analyse bestimmt.

Datenerfassung:

Die Datenerfassung erfolgte automatisch und kontinuierlich über das Respirometer.

Behandlung des Inokulums:

Das Inokulum wurde bis zum Gebrauch belüftet (maximal 4h). Es erfolgte keine Vorkonditionierung.

Gültigkeit des Tests:

Der Test kann als valide betrachtet werden, wenn

- innerhalb von 14 Tagen ein mindestens 60%iger Abbau der Referenzsubstanz Natriumacetat erfolgt,
- die Abbauwerte in den Parallelansätzen um weniger als 20% voneinander abweichen (im Plateau am Testende oder am Ende des 10-Tages-Fensters),
- in der Toxizitätskontrolle die Referenzsubstanz zu mehr als 25% abgebaut wird (bei Werten unter 25% gilt die Substanz als Inhibitor),
- im Blindansatz der Sauerstoffverbrauch nach 28 Tagen nicht 60 mg/l übersteigt,
- bei einem Abbau der Testsubstanz von unter 60% der pH – Wert zwischen 6 und 8,5 liegt.

Berechnung der Ergebnisse:

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt analog der Berechnungen für den CBT.

4 Ergebnisse

4.1 Patent-/Literaturrecherche

Zu Beginn des Projektes wurde eine intensive Patent- und Literaturrecherche durchgeführt, um projektspezifisch bekannte bzw. ähnliche Strukturen aufzufinden. Die Suche nach den angestrebten Furan-Sacchariden bzw. engen strukturverwandten Derivaten ergab keine direkten Treffer. Hauptsächlich konnten die für das Projekt als Ausgangspunkt verwendeten Patente des DKFZ ausfindig gemacht werden. Publikationen, die im weiteren Zusammenhang mit unserem Forschungsprojekt standen, wurden auf eventuelle Relevanz durchgesehen. Es wurde nach Verbindungen gesucht, die eine bis zu 70%ige strukturelle Übereinstimmung mit dem Zielmolekül haben. Das Ergebnis waren 144 Referenzen. Bei der Sichtung dieser Literaturstellen konnten als relevante Strukturen

hauptsächlich Furan-Saccharid-Dimere, d.h. Moleküle die ein 2,5-Furan-Gerüst bzw. geschützte Vorstufen besitzen, gefunden werden. Verbindung DBU 103 konnte als Anomerengemisch identifiziert werden. Die wichtigsten Literaturstellen sind im Literaturverzeichnis zu finden [12]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass diese neue Substanzklasse (ausgenommen der Patente des DKFZ) nicht patentiert / publiziert ist.

4.2 Synthese

Von der Firma ChemCon GmbH wurden folgende Substanzen synthetisiert:

DBU 130, DBU 131, DBU 132, DBU 122, DBU 113, DBU 108, (CC-2064), (CC-2065), (CC-2160), (CC-2063), (CC-2104).und DBU 107

Probleme:

Die Verbindungen sind Derivate des GSF, teils mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen am Furan-Grundgerüst, teils Derivate des Cyclohexens. Ziel der Synthesen war es einerseits geeignete Vor- und Zwischenstufen herzustellen, um weitere Stoffe einerseits als Synthesebausteine und andererseits für die Verbesserung der Datenlage für QSAR zur Verfügung zu haben. Diese Zwischenprodukte wurden aufgrund ihrer strukturellen Eignung teilweise auch experimentell auf ihre Abbaubarkeit in der aquatischen Umwelt untersucht. Damit konnte die Datenbasis für die Modellierung erweitert und verbessert werden. Das eigentliche Ziel der Synthesen war jedoch die zuvor als Erfolg versprechend identifizierten Zielstrukturen herzustellen, um ihre Wirksamkeit und ihre biologische Abbaubarkeit experimentell überprüfen zu können.

Nach der Synthese zersetzte sich die Verbindung DBU 107 zunächst innerhalb einiger Stunden. Als eine mögliche Ursache kommen Säurespuren aus der Entschützungsreaktion in Betracht, die das Produkt katalytisch zersetzen können. Die Verbindung wurde daher erneut synthetisiert und nach einer modifizierten Vorschrift entschützt. Nach genauer pH-Kontrolle, Chromatographie und Gefriertrocknung konnte nun die gewünschte Substanz in ausreichender Menge erhalten werden.

Am DKFZ (Projektbearbeiterin Dipl.-Chem. Grazia Marano) wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, basierend auf der o.g. Schmidt's Imidatstrategie. Zahlreiche Core-Moleküle wurden glycosidiert. Der Einsatz verschiedener Kerne

bietet nicht nur eine Vielfalt von Strukturen, sondern gibt auch Aufschluss darüber, ob der Kern für die biologische Wirksamkeit der Saccharidmimetika eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin wurden Umfunktionalisierungen am Kern des Mimetikums vorgenommen, z.B. indem die Sulfatgruppe der Leitstruktur durch andere funktionelle Gruppen ersetzt wurde. Dies führte z.B. zur Struktur DBU 126, die eine entscheidende Optimierung der Leitstruktur mit sich brachte.

Durch gezielte Umfunktionalisierung verschiedener Saccharide unter Anwendung einer Schutzgruppenstrategie wurden weitere Verbindungen erhalten, deren biologische Wirksamkeit deutlich besser war (u.a. DBU 133).

4.3 Molecular Modeling – Blind Docking

4.3.1 Erklärung der Wirkungsweise der Leitstruktur GSF via Molecular Modeling

Um die Wirkungsweise des GSF erklären zu können, wurde von Martin Frank (Arbeitsgruppe C.W. von der Lieth / DKFZ) computerbasiertes Molecular Modeling durchgeführt [9]. Hierfür wurde die von Xiong et al. [10] entdeckte Kristallstruktur des Integrins $\alpha_v\beta_3$ verwendet:

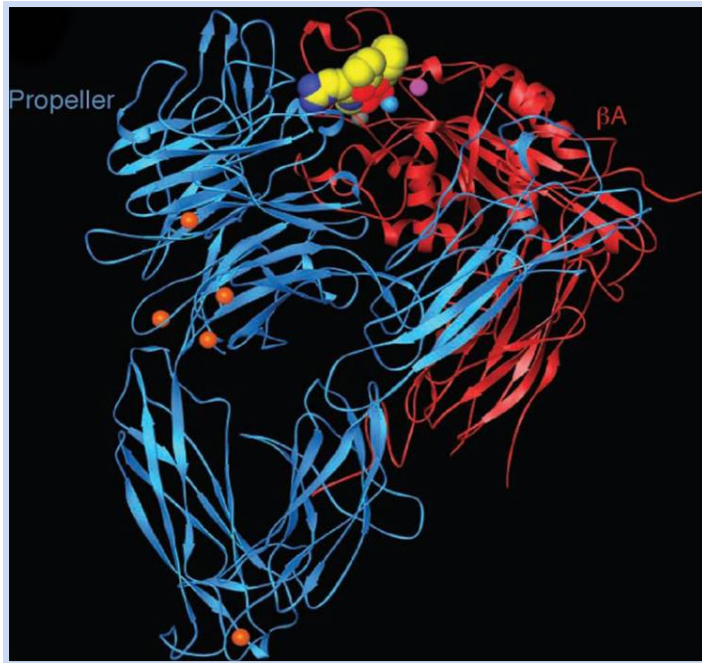


Abbildung 4-1 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Komplex mit dem nativen Liganden mit der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp. α_v und β_3 sind in blau und rot gezeichnet. Das cyclo(RGDf-N{Me}V) ist an der Propeller α_v Domäne gebunden. Die Mn^{2+} Ionen sind mit Orange gekennzeichnet [10]

Für das Molecular Modeling wurde jedoch nur ein bestimmter Bereich des Integrins verwendet. Anhand eines so genannten Blind-Dockings an dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ konnte gezeigt werden, dass GSF zusätzlich zur RGD-Bindungsstelle in einer alternativen Bindungstasche mit einer relativ hohen Wechselwirkungsenergie andockt.

Aufgrund der Ergebnisse des Blind Dockings wurden weitere GSF-analoge Verbindungen synthetisiert, die zur Optimierung der Leitstruktur führten. Das neue Saccharidmimetikum DBU 133 zeigt im Vergleich zum GSF eine um den Faktor 50 bessere biologische Wirksamkeit.

4.3.2 Migrationassay

Die Zellwanderung innerhalb von Organismen spielt in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So stellt z.B. Migration von Zellen bei der Einwanderung von Gefäßendothel-Zellen und Fibroblasten bei der Wundheilung einen essentiellen biologischen Vorgang dar, durch welche u.a. die Unversehrtheit des Organismus gewährleistet wird.

In dem in dieser Arbeit angewandten „wound-healing“-Assay soll die Wirkung der neuen Saccharidmimetika auf die Zellwanderung von humanen Melanomzellen

untersucht werden. Hierfür wird in einem intakten Zellrasen mit Hilfe einer Pipettenspitze künstlich eine Wunde zugefügt, um das um das Migrationsverhalten der Zellen über einen gewissen Zeitraum zu beobachten.

Dieser Assay ist ein stark vereinfachtes Modell für eine Zellwanderung *in vivo*, wobei die Zellen nur in zwei Dimensionen wandern können. *In vivo* erfolgt eine Wanderung von Zellen stets in einem dreidimensionalen System. Dennoch können anhand der Versuchsergebnisse Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Zellen gezogen und Aussagen darüber gemacht werden, ob das Migrationspotential der Zellen durch eine Inkubation mit Saccharidmimetika beeinflusst werden kann.

Die folgende Fotoserie zeigt die Ergebnisse der Migration der Zelllinie WM-115 in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von DBU126 innerhalb von 24h. Die Inkubation mit DBU126 zeigte eine Inhibition der Zellmigration bei einer Konzentration von 2.5 mM bis 1 mM. Durch diese Modifikation der Leitstruktur GSF konnte eine Verbesserung des biologischen Wirkungsbereiches erzielt werden.

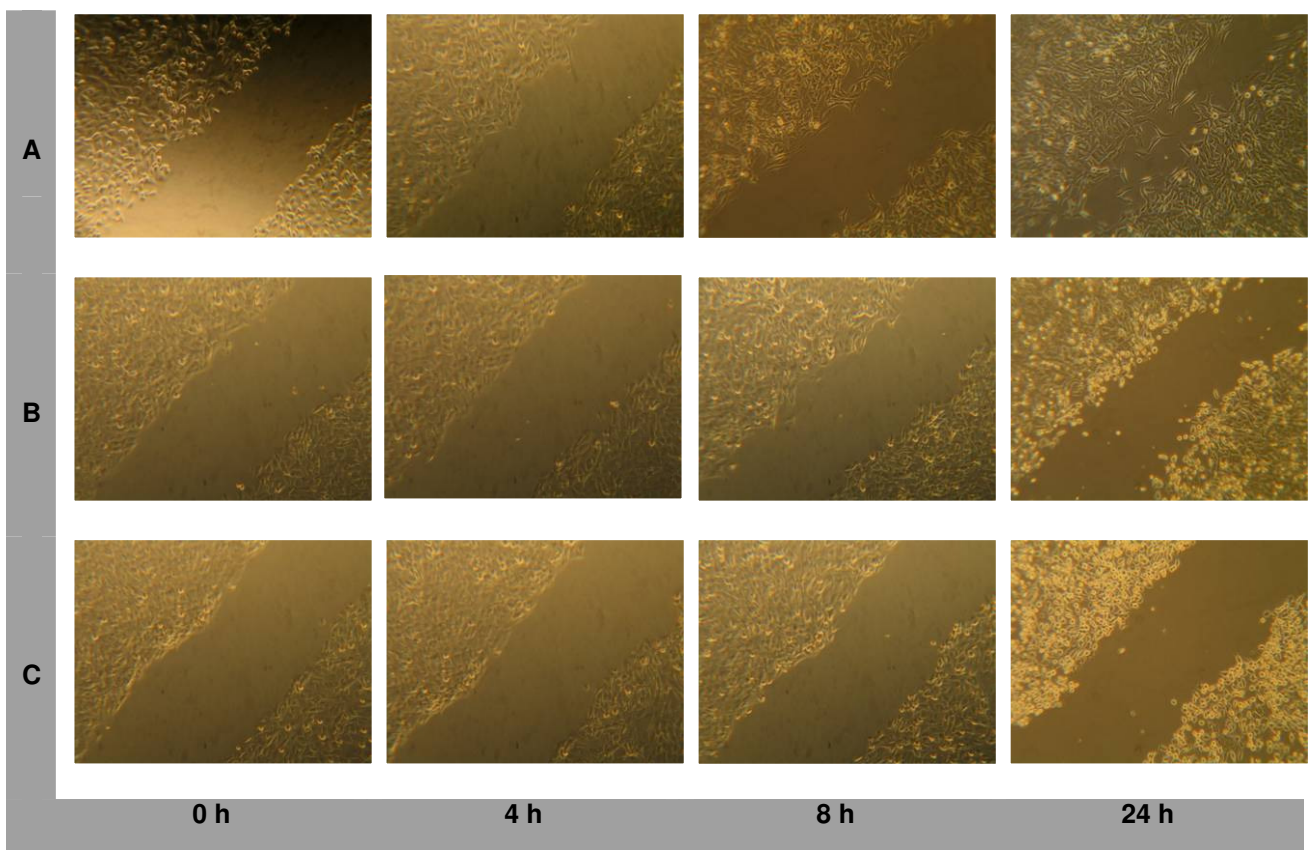


Abbildung 4-2 Migration von WM-115 Zellen in die künstlich zugefügte Verletzung eines ansonsten intakten Zell-Monolayers. A: 1 mM, B: 2.5 mM, C: 5 mM Substanz DBU126.

Tabelle 4-1 zeigt eine Übersicht der untersuchten Saccharidmimetika bzgl. der Inhibition der Zellmigration von WM-115-Zellen.

Die Aktivität dieser beiden Matrixmetalloproteinasen lässt sich durch den Abbau von Gelatine in einem Zymogramm nachweisen. Durch elektrophoretische Auftrennung und Renaturierung der in der Probe befindlichen Proteine können jene ihre enzymatische Aktivität wiedererlangen.

Nach Inkubation in der verwendeten Pufferlösung degradieren die Gelatinasen nun die im Gel befindliche Gelatine und nach Anfärben der Gels mit Coomassie-Blue werden die gelatinefreien Bereiche des Gels als farblose Banden in einem blauen Gel sichtbar.

Tabelle 4-1 Übersicht der untersuchten Saccharidmimetika bzgl. der Inhibition der Zellmigration von WM-115-Zellen.

| Struktur | Konzentration | | | |
|----------|---------------|------|--------|------|
| | 0.1 mM | 1 mM | 2.5 mM | 5 mM |
| DBU 107 | - | - | + | +++ |
| DBU 113 | | | + | +++ |
| DBU 114 | | | - | - |
| DBU 135 | | | - | + |
| DBU 129 | | | - | - |
| DBU 108 | | | + | + |
| DBU 136 | | | - | - |
| DBU 137 | | | - | - |
| DBU 138 | | | + | + |
| DBU 126 | | + | +++ | +++ |
| DBU 118 | | | - | - |
| DBU 116 | | | - | - |
| DBU 121 | | | - | + |
| DBU 133 | ++ | ++ | +++ | +++ |

a.) Inhibition der MMP-Aktivität durch GSF

Das Zymogramm in Abbildung 4-3 zeigt, dass GSF in einer Konzentration von 5 mM die Fibronectin induzierte MMP-9-Aktivität inhibiert.

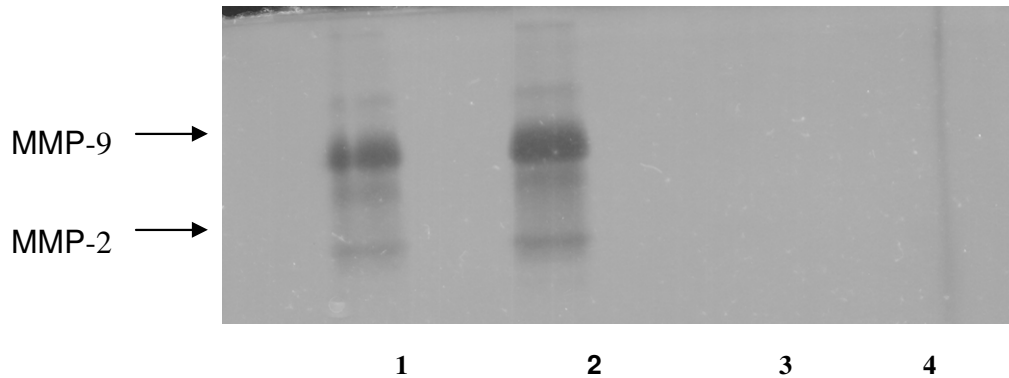


Abbildung 4-3 MMP-Aktivität des konditionierten serumfreien Mediums einer WM-115 Kultur in Anwesenheit von 5 mM GSF. 1: +Fn, +GSF; 2 +Fn, -GSF; 3 -Fn, +GSF; 4 -Fn, -GSF.

b.) Inhibition der MMP-Aktivität durch Substanz DBU126

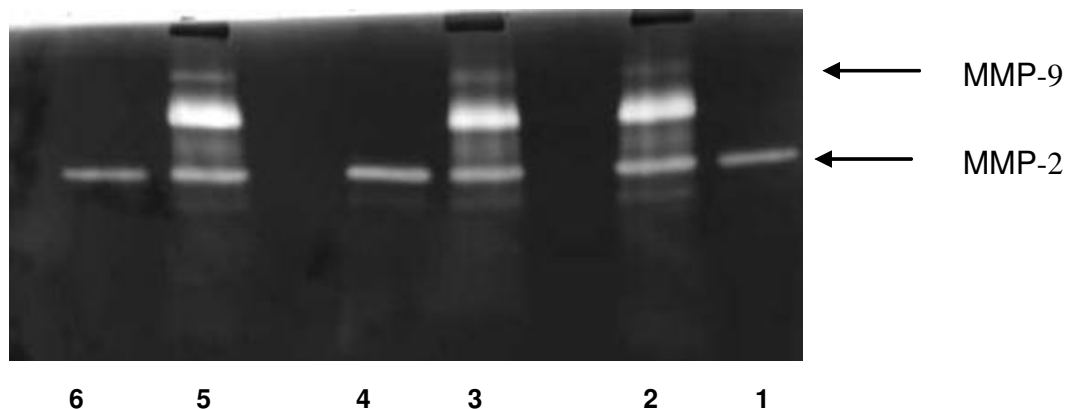


Abbildung 4-4 MMP-Aktivität des konditionierten serumfreien Mediums einer WM-115 - Kultur in Anwesenheit von 1 mM DBU126. 1: -Fn, +DBU126; 2 +Fn, +DBU126; 3 +Fn, +DBU126; 4 -Fn, +DBU126; 5 +Fn, -DBU126; 6 -Fn, -DBU126.

Die Inkubation der WM-115 mit 1 mM DBU126 zeigte im Zymogramm keine Inhibition der durch Fibronectin induzierten MMP-9-Aktivität.

4.4 Adhäsionsassay

Einfluss von Substanz DBU126 auf die Adhäsion der humanen Zelllinie WM-115: Substanz DBU126 zeigte keine Inhibition der Zelladhäsion an Fibronectin in den

Konzentrationen 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM und 5 mM. Somit zeigte diese Modifikation der Leitstruktur GSF keine Verbesserung der biologischen Wirksamkeit.

4.5 Ergebnisse der Abbautests nach OECD

Die vom DKFZ und Chemcon an das IUK übergebenen Proben wurden mit zwei verschiedenen OECD Tests auf Ihre biologische Abbaubarkeit hin untersucht. Neben dem Sauerstoffverbrauch wurde die Kohlenstoffelimination gemessen. Die Resultate sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Proben aus den Abbautests wurden bei -85°C tief gefroren und später auf Zerfallsprodukte mittels LC-MS/MS analysiert (.s. 4.6.)

4.5.1 Closed Bottle Test (CBT)

Die in Tabelle 4-2 aufgeführten Ergebnisse der Closed Bottle Tests beziehen sich auf den Sauerstoffbedarf in Prozent bezogen auf den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB; s. Methodenteil 3.4.1). Es ist die unterschiedliche Abbaubarkeit der einzelnen Stoffe ersichtlich, die sich zwischen 0 und 92% bewegt.

4.5.2 Manometrischer Respirationstest (MRT)

Die Ergebnisse des MRT, wie sie in Tabelle 4-2 zusammengefasst sind, umfassen zwei Parameter: Zum einen den Sauerstoffbedarf in Prozent bezogen auf den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) und die Kohlenstoffelimination in Bezug auf den gebundenen Kohlenstoff (Non Purgeable Organic Carbon (NPOC)). Beide Parameter im Vergleich liefern wertvolle Hinweise auf das mögliche Schicksal der Substanz. Es lassen sich dadurch Rückschlüsse auf den tatsächlichen Umfang des Abbaus ziehen und Hinweise erhalten ob ggf. abbaustabile Zwischenprodukte entstanden sind. Ähnliche Ergebnisse wie für den Manometrischen Respirationstest wurden für den Closed Bottle Test erhalten (s. unten), jedoch waren die Ergebnisse für einzelne Substanzen z. T. stark unterschiedlich. Dies liegt an der unterschiedlichen Bakteriendichte und -diversität, in den beiden Tests.

Tabelle 4-2 Ergebnisse der biologischen Abbautests (biologischer Abbau in Prozent, beim Manometrischen Respirationstest zusätzlich Elimination des organischen Kohlenstoffs; Testergebnisse, die eine Einstufung der Substanz als leicht biologisch abbaubar erlauben, sind gelb hinterlegt).

| Interne Bezeichnung | Closed Bottle Test | Manometrischer Respirationstest | Manometrischer Respirationstest Kohlenstoffelimination |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|--|
| DBU095 | 59,9 | 77,8 | 94,9 |
| DBU096 | 62,1 | 82,1 | 92,6 |
| DBU097 | 51,3 | 84,3 | 94,4 |
| DBU098 | -2,9 | 2,9 | 18,3 |
| DBU099 | 36,1 | 9,9 | 81,4 |
| DBU100 | -1,9 | 5,6 | 7,5 |
| DBU101 | 48,5 | 72,3 | 92,9 |
| DBU102 | 6 | -6,1 | 21,0 |
| DBU103 | 37,4 | 63,7 | 97,0 |
| DBU104 | 15,8 | 52,5 / 42,22 | 90,9/52,9 |
| DBU105 | 24,7 | 26,3 | 55,6 |
| DBU106 | 23 | 15,5 | 90,1 |
| DBU107 | 19,5 | 9,5 | 66,8 |
| DBU108 | 29,7 | 58,7 | 90,7 |
| DBU109 | -5,3 | 24,4 | 68,2 |
| DBU111 | 43,1 | 72,7 | 79,3 |
| DBU112 | -6,2 | 78,7 | 77,6 |
| DBU113 | 46,9 | 20,7 | 31,1 |
| DBU114 | - | 1,5 | 11,7 |
| DBU115 | - | 18,5 | 25,5 |

Fortsetzung Tabelle 4-2

| Interne Bezeichnung | Closed Bottle Test | Manometrischer Respirationstest | Manometrischer Respirationstest Kohlenstoffelimination |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|--|
| DBU116 | - | 31,0 | 33,1 |
| DBU117 | - | 62,3 | 75,8 |
| DBU118 | - | 20,3 | 35,4 |
| DBU119 | - | 13,2 | 2,3 |
| DBU120 | - | 27,3 | 49,7 |
| DBU121 | - | 19,3 | 63,5 |
| DBU122 | 49,8 | 73,5 | 72,7 |
| DBU123 | 21,7 | 61,6 | 60,4 |
| DBU124 | 19,7 | 34,9 | 20,1 |
| DBU125 | 13,5 | 18,4 | 12,1 |
| DBU126 | 36,3 | 28,4 | 34,8 |
| DBU127 | 92 | 24,6 | 85,5 |
| DBU128 | 46,9 | 84,9 | 85,0 |
| DBU134 | 16,9 | - | - |

4.6 LC-MS/MS Analytik der Testsubstanzen in den Abbautests

Für die Analytik standen Proben aus den Closed Bottle Tests (OECD 301D) und den manometrischen Respirationstests (OECD 301F) zur Verfügung. Die Ausgangssubstanzen für die Abbautests und Standards waren Syntheseendstufen vom DKFZ Heidelberg und der Chemcon GmbH. Eine vollständige Reinheit der Substanzen war nicht immer gegeben da sie nicht immer nach der Synthese entsprechend aufgereinigt wurden. Bei mehreren Peaks im Chromatogramm der Substanz wurde immer der größte Peak mit passendem Massenspektrum als Substanzpeak angesehen.

Alle Proben wurden mit HPLC in Kopplung mit UV/Vis-Detektion und Massenspektrometrie untersucht. Es wurde eine Agilent 1100 HPLC Anlage bestehend aus zwei Agilent G1312A Pumpen mit einem G1322A Degasser, einem Agilent G1329A Autosampler mit G1330A Thermostat, einem Agilent G1316A Säulenofen und einem Agilent G1321 UV/Vis Detektor in Kopplung mit einer Bruker Esquire 3000+ Ionenfalle verwendet. Die Analysen wurden mit einer C18ec Säule der Firma Macherey-Nagel (Düren) mit den Dimensionen 125/4 100-5 durchgeführt. Als Lösemittel wurde Ameisensäure (0,1Vol% in MilliQ) und Acetonitril (J. T. Baker, HPLC Grade) verwendet.

Es wurde bei einem Fluss von 0,5 ml/min mit einem Gradienten (A: Ameisensäure, B: Acetonitril; 0 min 1%B; 20 min 45%B, 22,5 min 55%B, 25 min 80%B, 26 min 1%B isokratisch bis 30 min) gemessen. Die Wellenlängen des UV/Vis Detektors wurden auf die jeweilige Substanz angepasst. Die Ionenfalle hatte eine Scanzeit von 0,2 s, es wurden 40 000 Ionen gesammelt, der Scanbereich lief von 50 m/z bis 1000 m/z positiv/negativ alternierend. Es wurde mit ESI bei 350°C mit 12 l/min Stickstoff ionisiert.

Für eine bessere Übersicht wurden die Ergebnisse strukturbezogen in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Dabei steht das Kürzel „Trafo“ für abbaustabiles Transformationsprodukt und das Kürzel „Tox“ für Toxizitätskontrolle.

4.6.1 Analytikergebnisse zum Closed Bottle Test OECD 301D

Exemplarisch wird die Auswertung mit der Substanz DBU 102 dargestellt. Die Substanz DBU 102 konnte in der eingesetzten Konzentration nicht massenspektrometrisch erfasst werden, es wurden die UVChromatogramme zur Auswertung herangezogen. In Abbildung 4-5 sind die Chromatogramme der Proben von Tag 0 und Tag 28 im Vergleich dargestellt. Die ursprüngliche Substanz (Retentionszeit 17,5 min) war nach 28 Tagen fast vollständig abgebaut, dafür bildete sich ein neuer Peak bei der Retentionszeit 20,8 min. Dieser neue Peak war ebenfalls in der Toxizitätskontrolle, nicht aber im Blindwert oder der Qualitätskontrolle zu sehen und ist als Folge eines Substanzabbaus zu deuten. Dieser Abbau erfolgte somit biotisch und ist kein Produkt, das aus der Biomasse oder ihrer Aktivität herrührte.

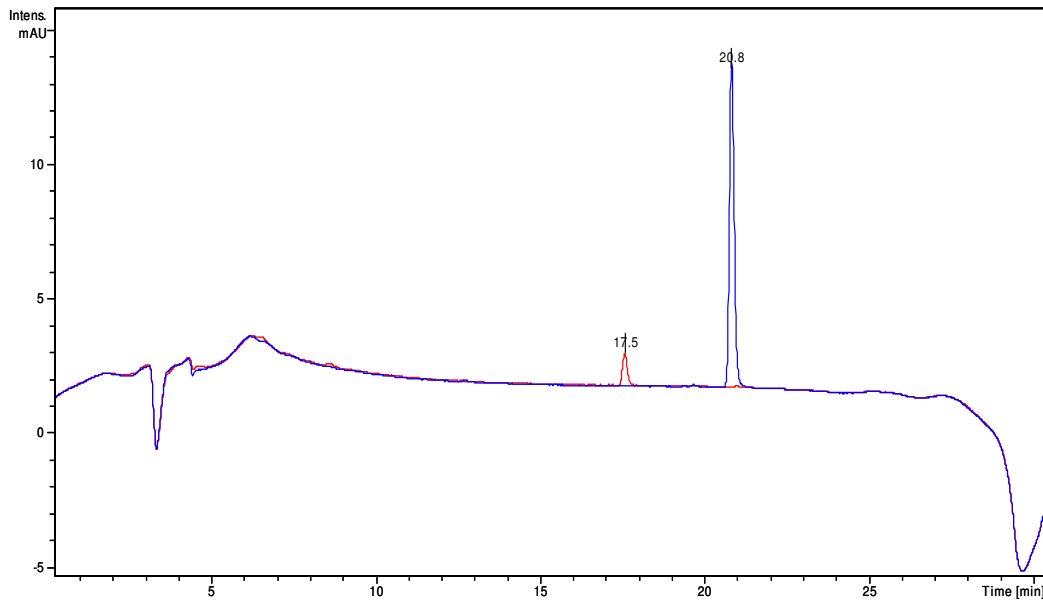


Abbildung 4-5 UV Chromatogramme der Proben von Tag 0 (rot) und Tag 28 (blau) der Substanz DBU 102

Das Transformationsprodukt war massenspektrometrisch erfassbar und ist in folgender Abbildung dargestellt.

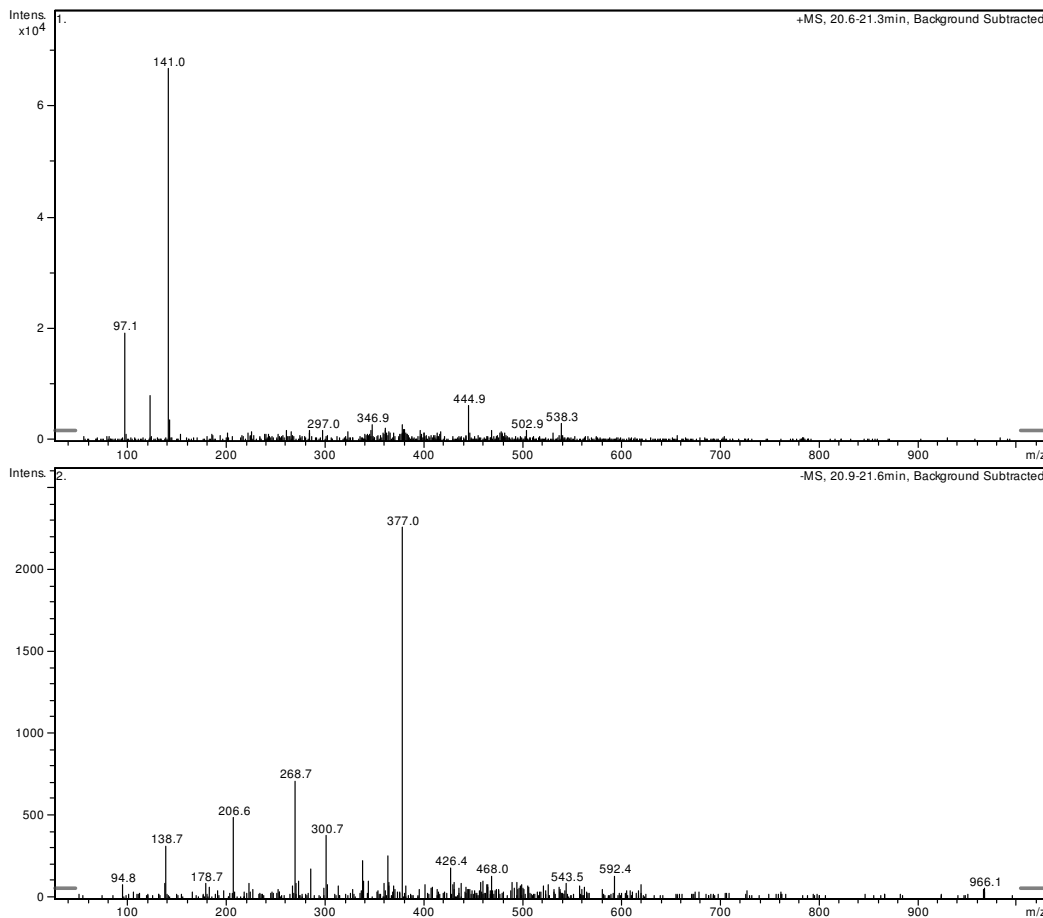


Abbildung 4-6 Massenspektren des Transformationsproduktes im positiven Modus (oben) und im negativen Modus (unten)

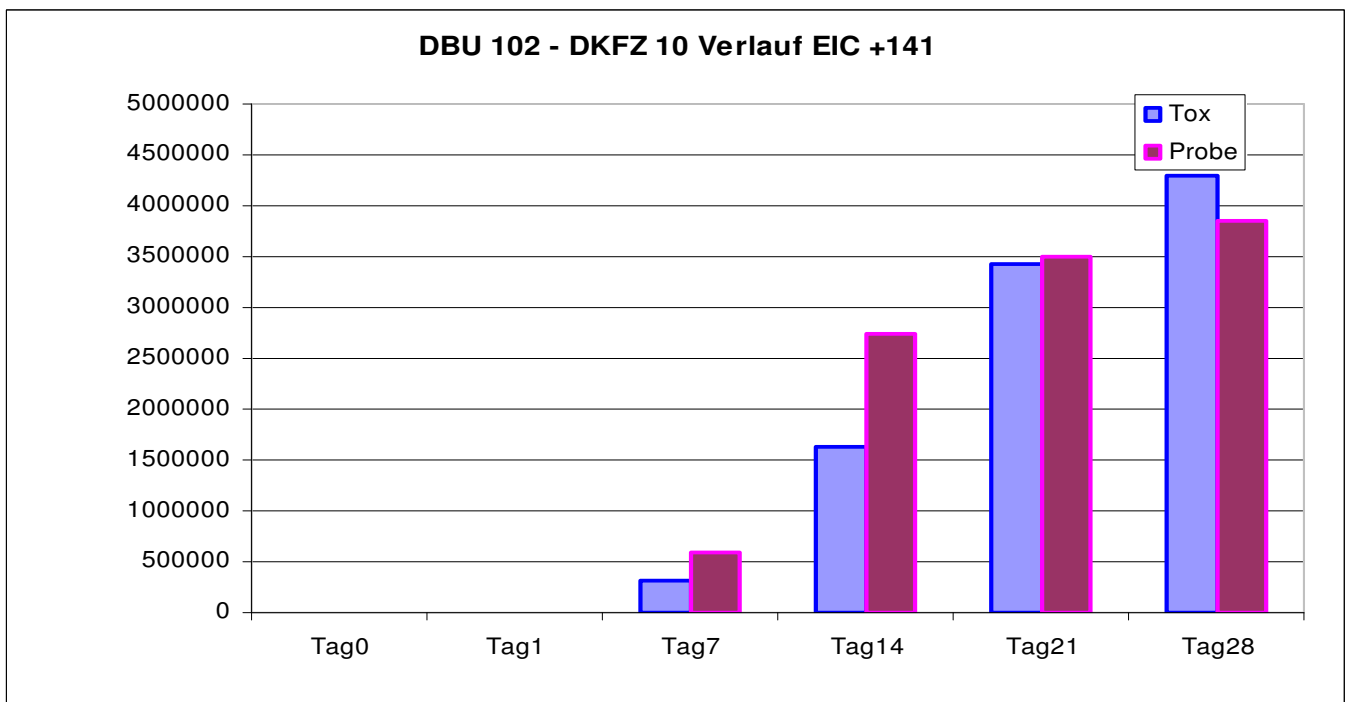
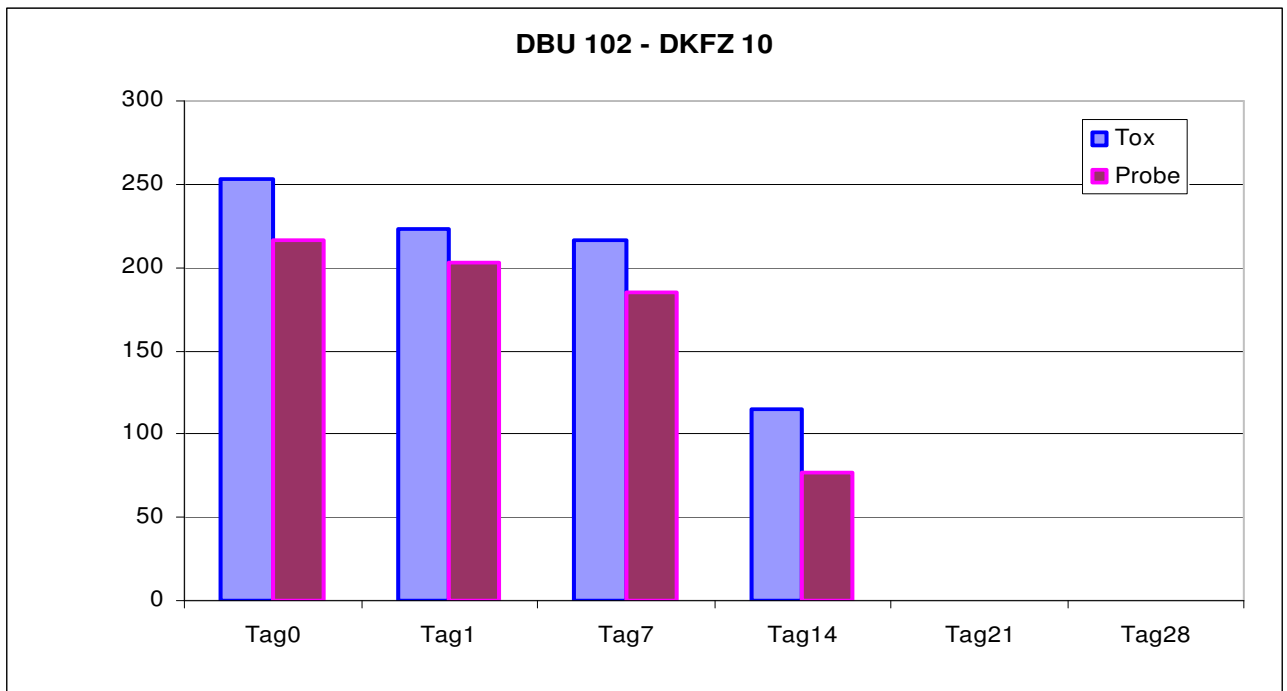


Abbildung 4-7 Verläufe des Abbaus der Substanz DBU 102 (links) und der Bildung des Transformationsproduktes (rechts).

Durch die Probennahme alle 7 Tage lässt sich der Abbau der Muttersubstanz bzw. die Bildung des Transformationsproduktes im zeitlichen Verlauf verfolgen. Für die Substanz DBU 102 ist dies in Abbildung 4-7 dargestellt, wobei für die Ausgangssubstanz das UV-Chromatogramm, für das Transformationsprodukt eine extrahierte Ionenspur aus dem Massenspektrometer zugrunde gelegt wurde.

Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Closed Bottle Tests ist für die unterschiedlichen Stoffe in Tabelle 4-3 bis Tabelle 4-7 gegeben. Dabei zeigt sich, dass einfach und 1,4- substituierte Furane im Gegensatz zu 1,2-, 2,3- und 1,3- substituierten Furanen einem biologischen Abbau gut zugänglich sind und keine Transformationsprodukte in höherer Konzentration zur Folge haben - bei unterschiedlicher Primärabbaubarkeit. Diese Daten wurden in die Modellierung des biologischen Abbaus miteinbezogen.

Tabelle 4-3 Ergebnisse CBT der 2,3 substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent)

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 107 | 100% | 19,5 | Nein | |
| 108 | 100% | 29,7 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |
| 111 | 100% | 43,1 | Nein | |
| 112 | 100% | -6,2 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |
| 113 | 100% | 46,9 | Nein | |
| 122 | 100% | 49,8 | Nein | |
| 125 | 0% | 13,5 | Nein | |
| 126 | 100% | 36,3 | Ja | Trafo nur UV aktiv |

Tabelle 4-4 Ergebnisse CBT der 1,4 substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------|
| 96 | 100% | 62,1 | Nein | |
| 101 | 95% | 48,5 | Nein | |
| 103 | 100% | 37,4 | Nein | |

Hier konnten keine abbaustabilen Transformationsprodukte erfasst werden.

Tabelle 4-5 Ergebnisse CBT der 1,2 und 1,3 substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|---|
| 104 | 100% | 15,8 | Ja | |
| 105 | 100% | 24,7 | Ja | |
| 109 | 100% | -5,3 | Ja | |
| 127 | 100% | 92 | Nein | |
| 128 | 10% | 46,9 | Ja | In Tox Primärelimi-nation von 40% |

Es konnten für fast alle Substanzen nur abbaustabile Transformationsprodukte nachgewiesen werden.

Tabelle 4-6 Ergebnisse CBT der einfach substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------|
| 95 | 100% | 59,9 | Nein | |
| 97 | 100% | 51,3 | Nein | |
| 99 | 100% | 36,1 | Nein | |

Es konnten keine abbaustabilen Transformationsprodukte nachgewiesen werden.

Tabelle 4-7 Ergebnisse CBT der weiteren Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|---|
| 100 | 0% | -1,9 | Ja | Es entstand eine neue Substanz ohne messbare Abnahme der Muttersubstanz |
| 102 | 100% | 6 | Ja | |

Substanz DBU 100 konnte nicht abgebaut werden, es bildete sich aber eine neue Substanz, deren Herkunft unklar ist. Für Substanz DBU 102 ergab sich eine vollständige Primärelimination mit der Bildung von abbaustabilen Transformationsprodukten.

Tabelle 4-8 Ergebnisse CBT der anderen Substanzen (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------|
| 98 | 0% | -2,9 | Nein | |
| 106 | 100% | 23 | Nein | |
| 123 | 0% | 21,7 | Nein | |
| 124 | 0% | 19,7 | Nein | |

Substanzen DBU 98 und 106 enthielten als Zentralstruktur anstatt des Furanringes einen Cyclohexenring, die Substanzen DBU 123 und 124 einen Cyclohexanring. Es ist bekannt, dass Cyclohexan schlecht biologisch abbaubar ist. Die Seitenketten der untersuchten Stoffe DBU 123 und 124 scheinen daran nichts zu ändern.

4.6.2 Analytikergebnisse zum Manometrischen Respirationstest OECD 301

Exemplarisch wird die Auswertung anhand der Substanz DBU 113 gezeigt.

Die Probe am Tag 0 ergab folgendes Chromatogramm.

Der Substanzpeak liegt bei einer Retentionszeit von 9,4 Minuten. Die Substanz wird durch die Massen 368,8 im negativen Modus (Molekülion- H^+) und 394 im positiven Modus als Natriumaddukt ($M+Na^+$) charakterisiert. Dieser Peak war ebenfalls in der Sterilkontrolle und der Toxizitätskontrolle vorhanden, also in allen Ansätzen, welche die Testsubstanz enthielten. Im Blindwert und der Qualitätskontrolle fehlte der Peak, er ist also Substanz-spezifisch und zeigt eine abiotische Zersetzung der Substanz an.

Ab Minute 22,5 begann die Spülung der Säule. Daher stieg das Signal im Chromatogramm des Spektrums an, da sich hier lipophile Substanzen aus der Testmatrix von der Säule lösten.

Für die Probe von Tag 28 ergibt sich das in Abbildung 4-9 dargestellte Chromatogramm. Der ursprüngliche Peak bei der Retentionszeit 9,4 min war nach 28 Tagen vollständig verschwunden (dies entspricht einer 100%igen Primärelimination). Dafür entstand ein neuer Peak bei der Retentionszeit 10,9 min, der durch eine starke Absorption bei der Wellenlänge 260 nm und eine schwächere Absorption bei den Wellenlängen 210 nm und 275 nm und durch die spezifischen Massen m/z 140,8 (rel. Intensität 100%); 304,9 (44%) und 320,8 (29%) im negativen Modus und m/z 125 (100%); 309 (58%) und 283 (23%) im positiven Modus charakterisiert wird.

Das Fragment mit m/z 125 ist auch in anderen Transformationsprodukten der 2,3-substituierten Furane enthalten, es könnte sich um Furan-3,4 dicarbaldehyd (CAS Nr. 7040-25-7) handeln. Das Transformationsprodukt wurde nur in der Probe und nicht in Toxizitätskontrolle, Blindwert oder Qualitätskontrolle nachgewiesen, und ist damit ein Produkt des biologischen Abbaus. Bei ähnlichen Retentionszeiten sind mit der UV-Detektion weitere Substanzen auszumachen, die sich aber nicht

massenspektrometrisch charakterisieren ließen und daher nicht weiter untersucht werden konnten.

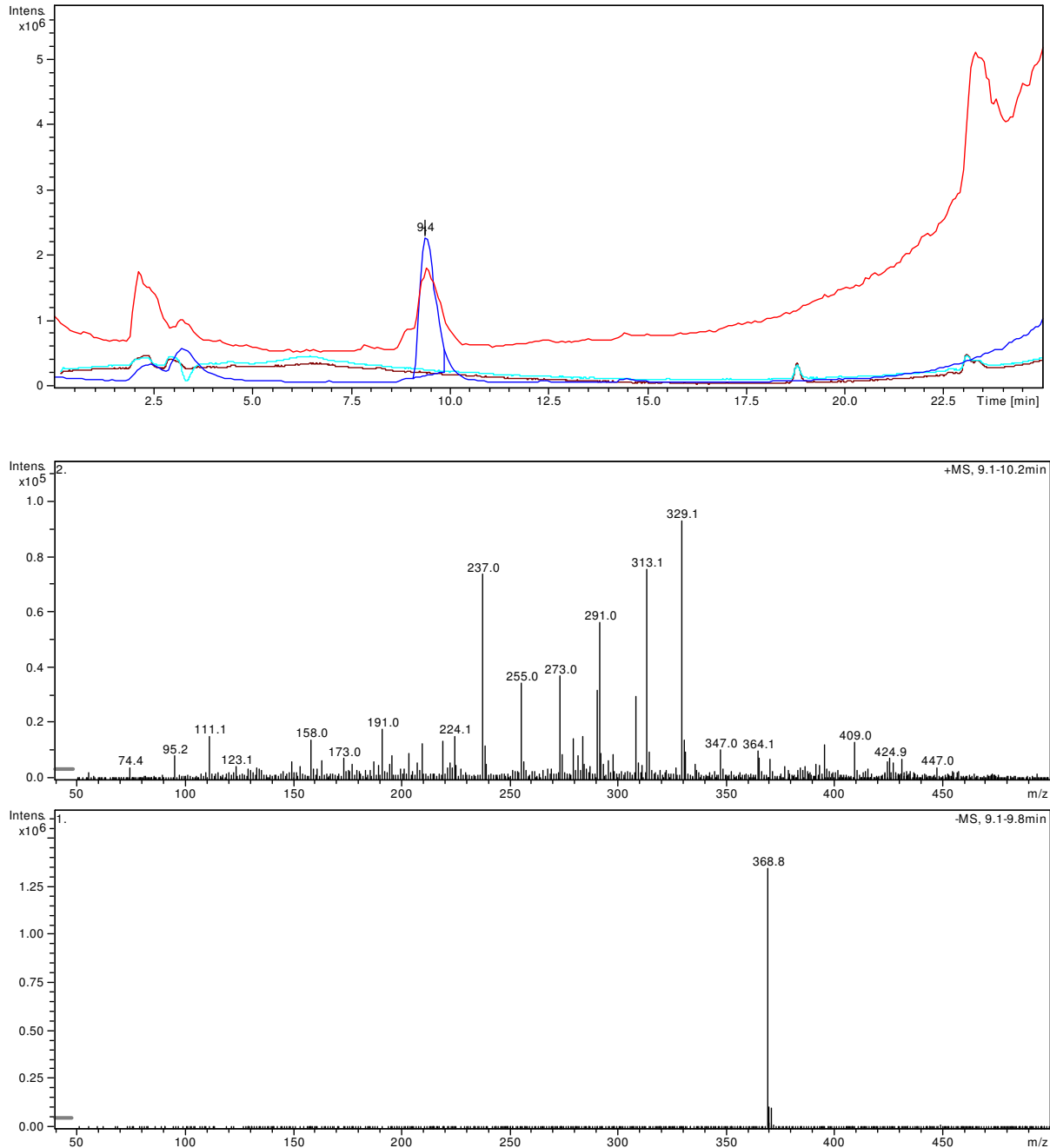


Abbildung 4-8 Chromatogramme (rot: Signal Massenspektrometer pos. Modus; blau: Signal Massenspektrometer neg. Modus; türkis: UV Signal bei 260 nm; braun: UV Signal bei 275 nm) der Probe vom Tag 0 aus dem Manometrischen Respirationstest mit der Substanz DBU 113 und den Massenspektren der Substanz bei Retentionszeit 9,4 min (mitte positiver Modus, unten negativer Modus).

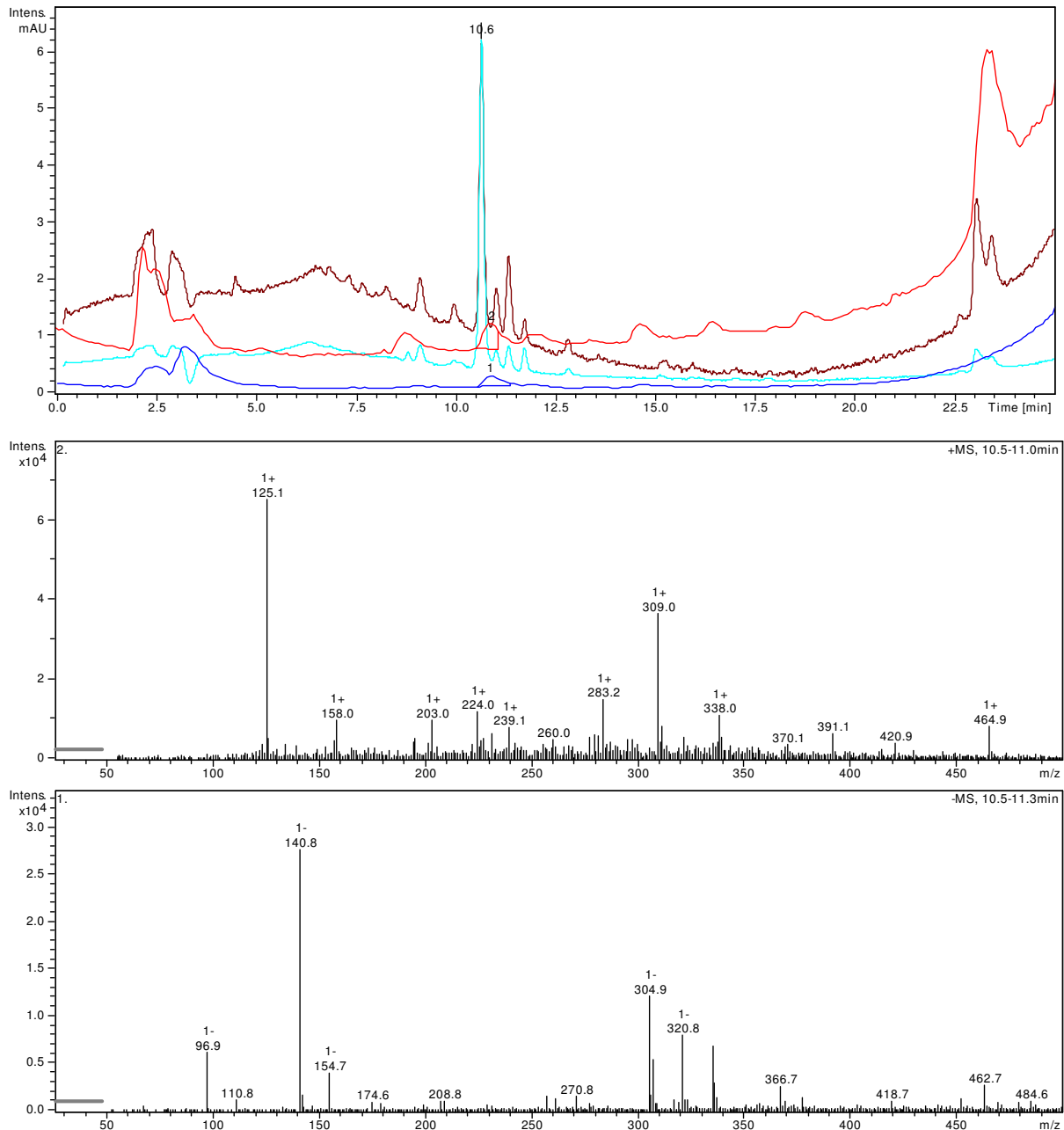


Abbildung 4-9 Chromatogramm oben: Signal Massenspektrometer pos. Modus; blau: Signal Massenspektrometer neg. Modus; türkis: UV Signal bei 260 nm; braun: UV Signal bei 275 nm) der Probe von Tag 28 des Manometrischen Respirationstests mit der Substanz DBU 113 und Massenspektren des Hauptpeaks bei der Retentionszeit 10,9 min (mitte positiver Modus, unten negativer Modus).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertungen aller Substanzen im Manometrischen Respirationstest aufgeführt (MRT).

Tabelle 4-9 Ergebnisse MRT der 2,3 substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|--|
| 107 | 100% | 19,5 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |
| 108 | 100% | 29,7 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |
| 111 | 100% | 43,1 | Nein | |
| 112 | 100% | -6,2 | Ja | Trafo nur UV aktiv, kein MS |
| 113 | 100% | 46,9 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo Trafo nicht in Tox |
| 114 | 100% | - | Ja | |
| 115 | 0% A; 100% B | - | Nein | |
| 117 | 100% | - | Ja | Trafo nur UV aktiv |
| 120 | 100% | - | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |
| 122 | 100% | 49,8 | Ja | |
| 125 | 30%. | 13,5 | Nein | 100% Primärelimination in Toxkontrolle und Sterilkontrolle, dort auch Trafos |
| 126 | 100% | 36,3 | Ja | Fragment mit m/z 125 im Trafo |

Ein Großteil der Substanzen wies eine vollständige Primärelimination mit abbaustabilen Transformationsprodukten auf.

Tabelle 4-10 Ergebnisse MRT der 1,4 substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|
| 96 | 100% | 62,1 | Ja | Trafos nur im UV |
| 101 | 100% | 48,5 | Nein | |
| 103 | 100% | 37,4 | Ja | 6 verschiedene Trafos |

Auch hier konnten abbaustabile Transformationsprodukte nachgewiesen werden.

Tabelle 4-11 Ergebnisse MRT der 1,2- und 1,3- substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|
| 104 | 100% | 15,8 | Nein | |
| 105 | 100% | 24,7 | Ja | 4 verschiedene Trafos |
| 109 | 100% | -5,3 | Ja | |
| 127 | 100% | 92 | Nein | |
| 128 | 100% | 46,9 | Nein | |

Es konnten nur für zwei Substanzen abbaustabile Transformationsprodukte nachgewiesen werden.

Tabelle 4-12 Ergebnisse MRT der einfach substituierten Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|---------------|
| 95 | 100% | 59,9 | Ja | Trafos nur UV |
| 97 | 100% | 51,3 | Ja | Trafos nur UV |
| 99 | 100% | 36,1 | Nein | |

Es konnten für zwei Substanzen abbaustabile Transformationsprodukte nachgewiesen werden. Insgesamt ergibt sich keine systematischer Zusammenhang zwischen dem Substitutionsgrad der Grundstruktur und der Bildung von abbaustabilen Transformationsprodukten.

Tabelle 4-13 Ergebnisse MRT der weiteren Furane (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination [%] | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-----------------------|--------------------|-------------------------|-----------|
| 100 | 0 | -1,9 | Nein | |
| 102 | 100 | 6 | Ja | |

Während Substanz DBU 100 nicht abgebaut wurde, ergab sich für die Substanz DBU 102 eine vollständige Primärelimination mit der Bildung von abbaustabilen Transformationsprodukten.

Tabelle 4-14 Ergebnisse MRT der anderen Substanzen (biologischer Abbau in Prozent).

| Substanz | Primärelimination | Biologischer Abbau | Transformationsprodukte | Sonstiges |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 98 | 0% | -2,9 | Nein | |
| 106 | 100% | 23 | Ja | |
| 116 | 100% | - | Ja | |
| 118 | 100% | - | Ja | |
| 119 | 100% | - | Ja | Substanz Fragment mit m/z 125 |
| 121 | 100% | - | Ja | Trafo nicht in Tox |
| 123 | 100% | 21,7 | Nein | |
| 124 | 100% | 19,7 | Nein | |

Neben den Furanen wurden auch Substanzen getestet, deren zentrales Strukturelement kein Furan sondern ein Cyclohexan oder Cyclohexen ist. Der überwiegende Teil wurde vollständig eliminiert, es bildeten sich aber abbaustabile Transformationsprodukte.

4.7 Molecular Modelling - Quantitative Struktur Eigenschaftsbeziehungen (QSAR)

4.7.1 Zusätzliche Berechnungen toxikologischer Endpunkte mit der Software Multicase

Es wurden vom DKFZ im Projektverlauf zu verschiedenen Zielstrukturen unterschiedliche Endpunktberechnungen mit der Software Multicase beim IUK angefordert, um vorab erste, orientierende Informationen über anwendungsrelevante Eigenschaften zu erhalten. Es handelte sich u.a. um: Wasserlöslichkeit, log P_{OW}, Intestinale Adsorption im Menschen, Ratte LD₅₀, Hautreizung und allergische Kontaktdermatitis.

4.7.2 Berechnung der Abbaubarkeit und Vergleich mit den experimentellen Werten

Die Abbaubarkeit der Zielsubstanzen wurde mit verschiedenen Programmen und unterschiedlichen Modellen berechnet. Unter anderem mit den Biowin Modellen der USEPA und eigenen Modellen, die mit den kommerziellen Softwarepaketen Leadscope und Multicase erstellt wurden.

Tabelle 4-15 zeigt einen Auszug aus den Modellvergleichen. Das Biowin7 Modell, welches ein ja-nein-Modell für die Vorhersage von anaerobem Abbau darstellt, sagt die aerobe Abbaubarkeit der Zielstrukturen noch mit am besten vorher im Gegensatz zu den eigentlichen aeroben Biowin Modellen 1 bis 6, die für den aeroben Abbau gedacht sind. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, das die Berechnungsergebnisse mit dieser Software mehr als zweifelhaft erscheinen lässt. Dies veranlasste uns mit den CBT Daten ebenfalls ja-nein-Modelle zu testen. Dabei wurde die Grenze von 60% aus den Testvorschriften übernommen. Wie erwartet zeigte sich, dass MITI-Daten trotz Ihrer besseren Verfügbarkeit zur Vorhersage z.B. von CBT Daten nur bedingt geeignet sind (siehe Kapitel 4.8). Die CBT Modelle, die mit der Software von Leadscope erstellt wurden und welche sich in Ihrer Selbst- und Crossvalidierung als gute und stabile Modelle darstellten, zeigten bei der externen Validierung mit den Abbaudaten der Zielstrukturen aufgrund der unterschiedlichen chemischen Domain sehr variable Ergebnisse. Diese Variabilität der Modelle zeigt u.a. dass die Anzahl der für die einzelnen Parameter vorhandenen Laborergebnisse zu niedrig ist. Je nach Auswahl, welche Laborergebnisse in das Modell hineingenommen wurden, um die chemische Domain zu verbessern, veränderten sich die Modelle stark. Dies bestätigte die zuvor gemachte Vermutung. Als Werkzeug, um die Abbaubarkeit *abzuschätzen*, sind die Leadscope Modelle jedoch geeignet und hilfreich. Diese Modelle können zudem nach vorhandenen Strukturelementen untersucht werden, die einen positiven Beitrag zur besseren Abbaubarkeit zeigen. Der Einsatz von zusätzlichen quantenchemischen Parametern im CBT Modell zur Verbesserung der Vorhersagefähigkeit erscheint viel versprechend, bedarf aber noch weiteren Untersuchungen. Das Entfernen der Substanzen aus dem Modell, die keinen Nachbar oder nur einen haben (bezogen auf Strukturähnlichkeit) brachte keine Verbesserung.

Die

Tabelle 4-15 zeigt einen Auszug aus dem Vergleich von verschiedenen Modellen mit den Laborabbaustestdaten (blau hinterlegt). Die erste Zeile (blaugrün) gibt jeweils den Pearsonschen Korrelationskoeffizienten an, die zweite Zeile (grün) den P-Wert. Liegt dieser unter 0.05 spricht man von Signifikanz. Die jeweils dritte Zeile (gelb) gibt die Anzahl der im Test befindlichen Werte an.

Tabelle 4-15 Modellvergleich unterschiedlicher Daten und Software.

| | Oxitop Test [%] ThOD (NH3) | Oxitop Test Kohlenstoffelimination [%] | Altes Leadscope Model | Biowin1 (Linear Model): | Biowin2 (Non-Linear Model): | Biowin3 (Ultimate Survey Model): | Biowin4 (Primary Survey Model): | Biowin5 (MITI Linear Model): |
|---|----------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| Closed Bottel Test [%] ThOD (NH3) | 0.45 | 0.53 | -0.19 | 0.19 | 0.04 | 0.17 | 0.07 | 0.18 |
| | 0.024 | 5.9E-03 | 3.7E-01 | 3.7E-01 | 8.4E-01 | 4.1E-01 | 7.5E-01 | 3.8E-01 |
| | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Oxitop Test [%] ThOD (NH3) | | 0.71 | -0.04 | 0.23 | 0.15 | 0.37 | 0.28 | 0.53 |
| | | 3.8E-06 | 8.1E-01 | 2.0E-01 | 4.2E-01 | 3.5E-02 | 1.1E-01 | 1.7E-03 |
| | | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| Oxitop Test Kohlenstoffelimination [%] | | | 0.03 | 0.33 | 0.22 | 0.09 | 0.08 | 0.32 |
| | | | 8.7E-01 | 6.1E-02 | 2.2E-01 | 6.2E-01 | 6.7E-01 | 7.3E-02 |
| | | | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| | Biowin6 (MITI Non-Linear Model): | Biowin7 (Anaerobic Linear Model) | Leadscope Quant >7,5 (MITI Daten) | Leadscope ja nein >7,5 (MITI Daten) | Leadscope CBT ohne Quant Ohne DBU | Leadscope CBT ohne DBU 60% Modell | Leadscope CBT mit allen DBU 60% Modell | Leadscope CBT mit halb DBU 60% sebst |
| Closed Bottel Test [%] ThOD (NH3) | 0.21 | 0.42 | 0.08 | -0.04 | 0.30 | 0.06 | 0.33 | 0.56 |
| | 3.1E-01 | 3.9E-02 | 7.0E-01 | 8.4E-01 | 1.4E-01 | 7.9E-01 | 1.0E-01 | 5.7E-02 |
| | 25 | 25 | 24 | 24 | 25 | 25 | 25 | 12 |
| Oxitop Test [%] ThOD (NH3) | 0.27 | 0.45 | 0.22 | -0.09 | 0.22 | -0.16 | 0.34 | 0.57 |
| | 1.3E-01 | 8.5E-03 | 2.4E-01 | 6.1E-01 | 2.2E-01 | 4.4E-01 | 9.5E-02 | 5.3E-02 |
| | 33 | 33 | 32 | 32 | 33 | 25 | 25 | 12 |
| Oxitop Test Kohlenstoffelimination [%] | 0.32 | 0.46 | 0.33 | 0.07 | 0.26 | 0.06 | 0.14 | 0.31 |
| | 6.9E-02 | 6.8E-03 | 6.6E-02 | 7.0E-01 | 1.4E-01 | 7.7E-01 | 4.9E-01 | 3.3E-01 |
| | 33 | 33 | 32 | 32 | 33 | 25 | 25 | 12 |

Fortsetzung der
Tabelle 4-15

| | Leadscope CBT mit halb DBU 60% | Leadscope CBT mit halb DBU 60% (2) selbst | Leadscope CBT mit halb DBU 60% (2) | Leadscope CBT mit halb DBU 60% (3) selbst | Leadscope CBT mit halb DBU 60% (3) | CBT mit halb DBU 60% ohne 1Nachbarn selbst | Leadscope CBT mit halb DBU 60% ohne 1Nachbarn | Leadscope CBT mit halb DBU 60% ohne 1u2Nachbarn |
|---|---|---|---|---|---|--|---|---|
| Closed Bottel Test [%] ThOD (NH3) | 0.13 | 0.02 | -0.17 | 0.17 | 0.00 | 0.44 | 0.19 | 0.05 |
| | 6.8E-01 | 9.5E-01 | 6.0E-01 | 6.0E-01 | 1.0E+00 | 2.1E-01 | 5.1E-01 | 8.6E-01 |
| | 13 | 13 | 12 | 12 | 13 | 10 | 15 | 18 |
| Oxitop Test [%] ThOD (NH3) | -0.26 | -0.27 | -0.17 | 0.03 | -0.08 | 0.27 | 0.07 | -0.10 |
| | 3.9E-01 | 3.7E-01 | 6.0E-01 | 9.2E-01 | 7.9E-01 | 4.4E-01 | 8.0E-01 | 7.0E-01 |
| | 13 | 13 | 12 | 12 | 13 | 10 | 15 | 18 |
| Oxitop Test Kohlenstoffelimination [%] | 0.14 | -0.45 | 0.00 | -0.05 | -0.28 | 0.26 | 0.31 | 0.20 |
| | 6.4E-01 | 1.3E-01 | 9.9E-01 | 8.7E-01 | 3.5E-01 | 4.7E-01 | 2.7E-01 | 4.3E-01 |
| | 13 | 13 | 12 | 12 | 13 | 10 | 15 | 18 |

4.8 Vergleich der Daten von verschiedenen OECD 301 Tests

Seit einigen Jahren werden am IUK verfügbare Daten über das Internet und in Veröffentlichungen über die Abbaubarkeit von verschiedenen Chemikalien gesammelt sowie eigene Tests durchgeführt. Die größte vorhandene Datenmenge betrifft die beiden OECD 301 Tests D und C (Closed Bottle Test und MITI I Test). Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden 118 Substanzen ermittelt, zu denen es Daten für beide Abbautests gab. Ein Vergleich der Abbaubarkeitswerte ergab eine Pearson Produkt Moment Korrelation von 0,615 mit einem P-Wert von 1,281E-013. Dies bedeutet eine hohe Signifikanz für eine Beziehung zwischen den Abbauwerten (kleiner 0.05 ist signifikant), die Werte können damit aber nur zu 61,5 % erklärt werden. Folgende Erklärung für diese geringe Pearson Produkt Moment Korrelation kommt in Frage:

Da es sich um biologische Testsysteme handelt und die OECD 301 Tests innerhalb der Testhierarchie mit der geringsten Inokulumdichte und Substanzkonzentration durchgeführt werden, ist mit einer hohen Variabilität der Daten zu rechnen.

Gleichzeitig unterscheiden sich die beiden Tests stark in ihrer Inokulumdichte und damit auch der bakteriellen und metabolischen Diversität. Dies trägt zusätzlich dazu

bei, dass unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden. Bei Daten, die zudem noch aus unterschiedlichen Quellen (Labors) stammen, verstärkt sich die Streuung erfahrungsgemäß. Ein Beleg für diese Aussage findet sich in den Daten für einen Ringversuch [11], in dem die gleiche Chemikalie in verschiedenen Laboren auf ihre Abbaubarkeit nach OECD getestet wurde, mit Standardabweichungen von teilweise über 20%. Die verwandte Software ist auf diese Schwankungen sensitiv.

5 Öffentlichkeitsarbeit und Veröffentlichungen

Zu Öffentlichkeitsarbeit und Publikationen siehe Datenblatt am Anfang des Berichts. Darüber hinaus führten u.a. die Aktivitäten im Projekt zur Konzeption der Tagung „Sustainable Pharmacy“, die von der DBU zusammen mit dem start-Projekt (www.start-project.de) und dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene im April 2008 in Osnabrück durchgeführt wurde. In diesem Kontext wurde das Vorhaben einer internationalen Fachöffentlichkeit vorgestellt.

6 Zusammenfassung, Ausblick und Perspektiven nach Ende der Förderung durch die DBU

s. Projektdatenblatt am Anfang des Berichts

7 Literatur

- [1] Anastas P., Warner J. C. (1998): Green Chemistry. Theory and Practice. Oxford University Press, New York
- [2] Daughton C. G. (2003): Cradle-to-Cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. rationale for and avenues toward a green pharmacy. Environmental Health Perspectives 111, 757
- [3] Kümmerer K., Al-Ahmad A., Bertram B., Wießler M. (2000): Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: improvement by glucosidation and influence of stereo-chemistry. Chemosphere 40, 767-773
- [4] Hillisch A., Hilgenfeld R. (Ed) (2003): Modern Methods of Drug Discovery. Birkhäuser, Basel
- [5] Eriksson L., Jaworska J., Worth A.P., Cronin M.T.D., McDowell R.M., Gramatica P. (2003): Methods for reliability and uncertainty

- assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environmental Health Perspectives* 111, 1361-1375.
- [6] Walker J.D., Jaworska J., Comber M.H.I., Schultz T.W., Dearden J.C. (2003) : Guidelines for developing and using quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1653-1665.
- [7] Kim E. et al. (2005), *Chembiochem* 6, 422-431
- [8] Gronewold C. (2005), Dissertation Heidelberg
- [9] Conformational Analysis Tools CAT
- [10] Xiong et al. (2002), *Science* 296, 151-155
- [11] Painter H.A., King E.F.,(1985), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9, 6-16
- [12] *Plant Physiology* 1993, 101(1), 187-91 ISSN 0032-889
Plant Physiology 1992, 98(2), 708 – 15
Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(21), 13742-5, ISSN 0021-9258
Chemical & Pharm. Bull. 1983, 31(2) 664-73, ISSN 0009-2363
J. Biol. Chem. 1991, 266 (21), 13742-5
ChemBioChem 2005, 6(2), 422-431, ISSN 1439-4227
WO 2002016378A1 200220228
Journal of Organic Chemistry 1990, 55(3), 902-6
Carbohydrate Research, 1970, 15(1), 57-63
Carbohydrate Research, 1970, 15(1), 51-6
Liebigs Annalen 1993, 9, 967-74
EP 426176A219910508
Chem. Pharm. Bull. 2004, 52(2), 270-275
Biotechnology and Bioengineering 2002, 80(2), 222-227, ISSN0006-3592
Plant Physiology 1992, 98(2), 708-15, ISSN 0032-0889
DE 4307388A119940915
Food Chemistry 1988, 29(1), 7-17, ISSN 0308-8146
Food Chemistry 2006, 97(1), 56-64
JP 2004002241A220001227
Green Chemistry 2001, 3(5), 201-209, ISSN 1463-9262
EP 1062941A220001227

- T 1998, 54(36), 10703-10712
EP 426176A219910508
- [13] OECD (1992): OECD Guideline for Testing of Chemicals (301D). Closed Bottle Test. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.
- [14] Pagga U., Strotmann U. (1999): Bakterientoxizität – standardisierte Testmethoden und Erfahrungen. Gwf Wasser Abwasser 140, 827-835
- [15] Nyholm, N. (1991): The European system of standardised legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 10, 1237–1246
- [16] Wagner R., Fischer W.K., Fleming H.C., Gerike P., Lingens F., Müller D., Reinarth G., Robra K.H., Schlimme E., Steber J., Trenel J., Wilderer P., Wunderlich M. (1988): Methoden zur Prüfung der biochemischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [17] OECD (1992): OECD Guideline for Testing of Chemicals (301F). Manometric Respirometry. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris