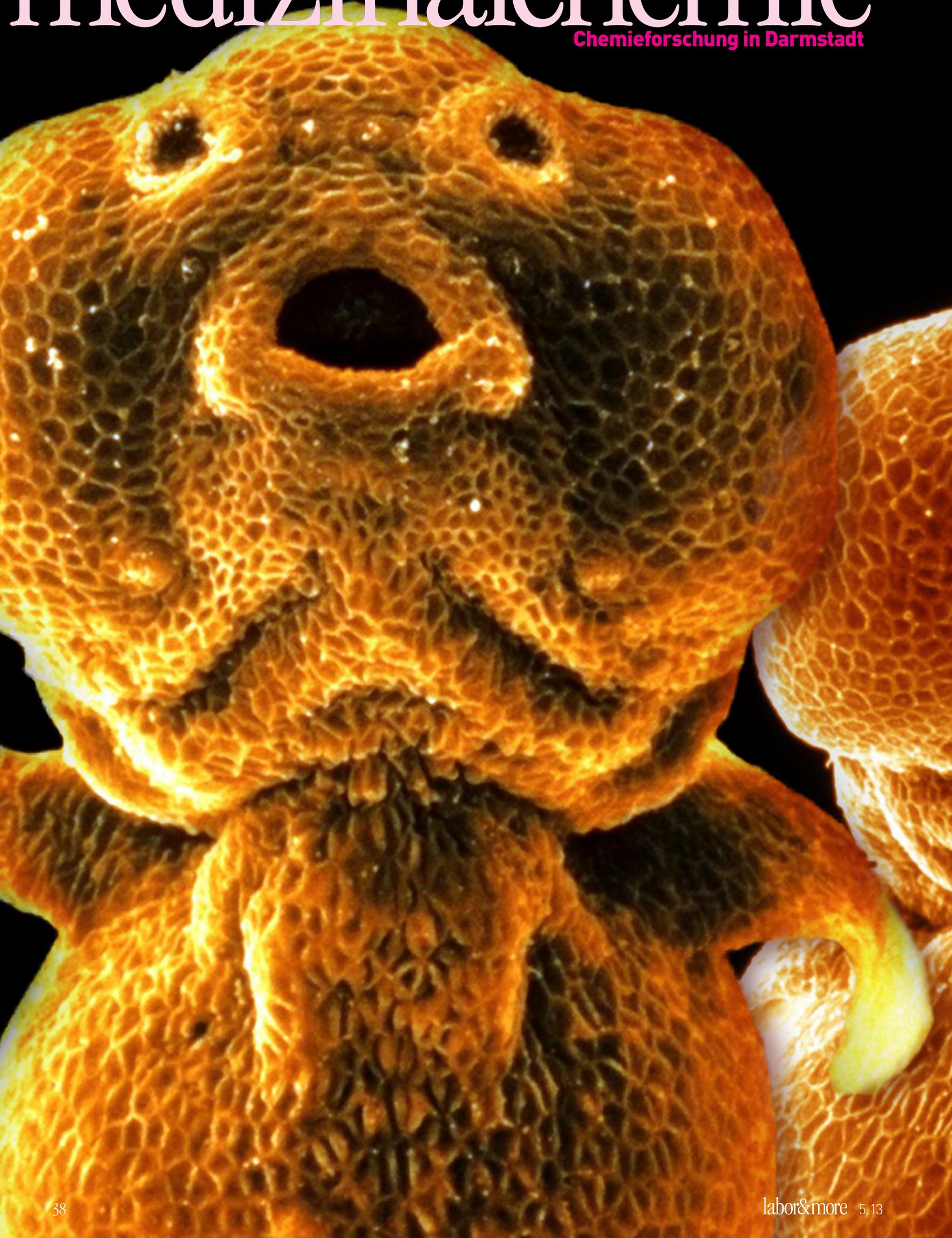


medizinalchemie

Chemieforschung in Darmstadt

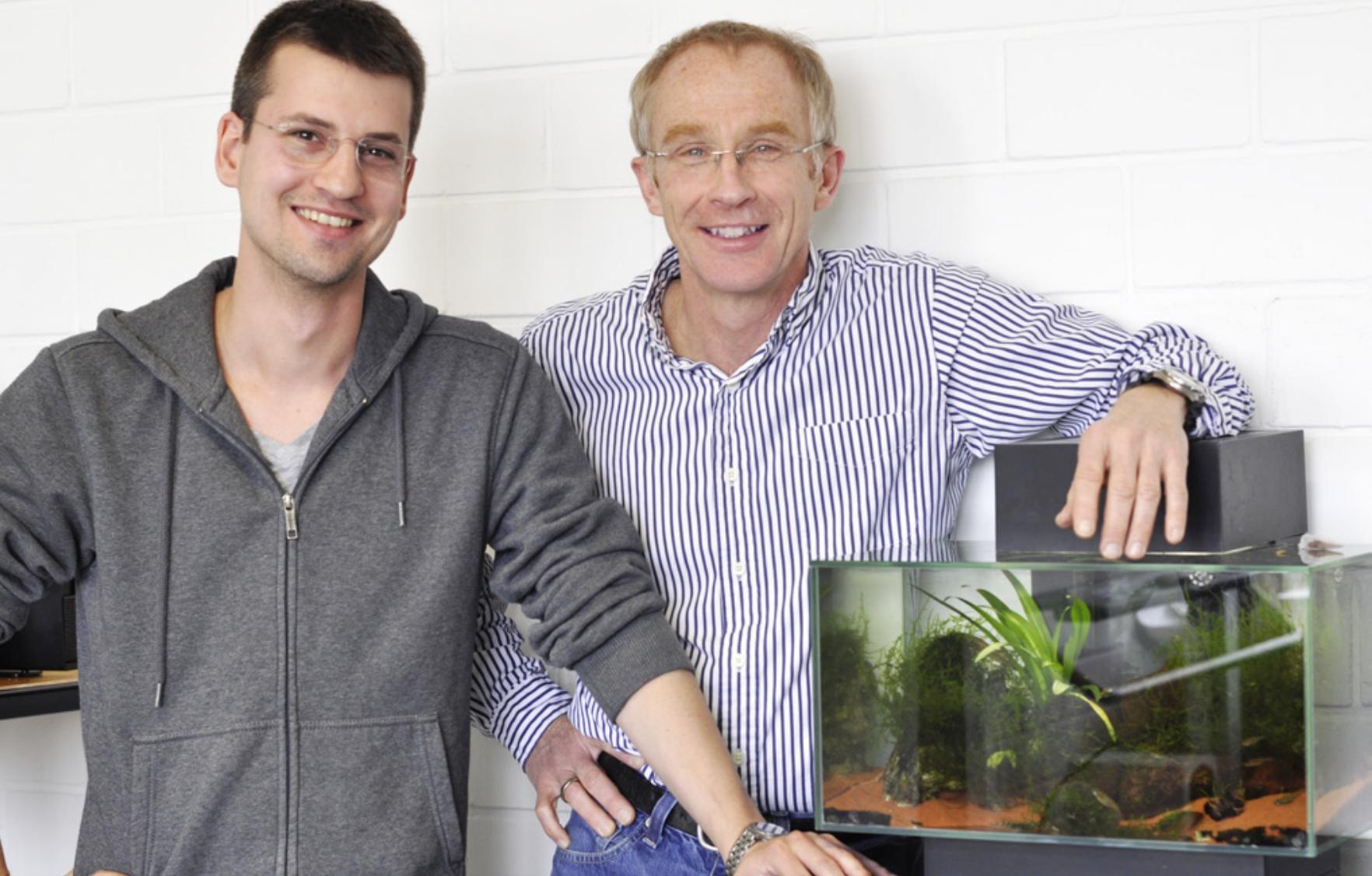


Die Wahl der Besten

Maßgeschneiderte In-vivo-Assays als tierschutzkonforme Alternative
in der Wirkstoffentwicklung

Prof. Dr. Boris Schmidt und Constantin Voss
Clemens-Schöpf-Institut für
Organische Chemie und Biochemie,
Technische Universität Darmstadt

Die chemische Industrie gilt traditionell als Großverschmutzer und Katastrophenverursacher. Um diesem schlechten Ruf entgegenzuwirken und immer strenger werdende gesetzliche Vorlagen zu erfüllen, werden seit nun mehr als zwei Jahrzehnten enorme Bemühungen in den Ausbau der „Grünen Chemie“ investiert. Dabei gelten bis heute folgende Prinzipien als Fundament einer nachhaltigen chemischen Produktion: Abfallvermeidung statt -entsorgung, Ressourcen wie Erdöl und Wasser schonen, erneuerbare Rohstoffe bevorzugen, gefährliche Chemikalien ersetzen und Großanlagen sicher betreiben. Auch wenn dieses Öko-Image der Industrie vor allem in den Köpfen der Bevölkerung nicht immer aufgeht, bleiben dennoch einige Fakten positiv hervorzuheben: Die Zahl an Chemieunfällen hat sich stark verringert, der Regen in Deutschland ist aufgrund besserer Schwefeldioxidfilter weniger sauer und das Wasser aus Flüssen wie Donau, Rhein und Oder fließt sauberer.



Constantin Voss, geb. 1985, studierte Chemie an der Technischen Universität Darmstadt mit dem Abschluss Diplom-Ingenieur. Seine Diplomarbeit mit dem Titel „Synthese von funktionalisierten Distyrylpyridazinen für die Fluoreszenzdiagnostik“ fertigte er 2011 im Arbeitskreis Prof. Boris Schmidt an. Diese Arbeit wurde durch die Darmstädter Stiftung für Technologietransfer mit einem Preis ausgezeichnet. Seit der Aufnahme als Stipendiat im DFG-geförderten Graduiertenkolleg 1657 „Molekulare und zelluläre Reaktionen auf ionisierende Strahlung“ promoviert er unter der Betreuung von Boris Schmidt am Clemens-Schöpf-Institut der TU Darmstadt.

Boris Schmidt, geb. 1962, studierte Chemie an der Universität Hannover und am Imperial College in London. Nach seiner Promotion 1991 an der Universität Hannover lehrte er bis 1994 am Uppsala Biomedical Centre und forschte zwischenzeitlich als DFG-Stipendiat im Rahmen eines Post-Doc-Aufenthalts am Scripps Institute in La Jolla in der Gruppe um Prof. K. B. Sharpless. Zurück an der Universität Hannover, habilitierte Boris Schmidt und sammelte im Anschluss Industrieerfahrung bei Novartis in Basel, bis er 2002 dem Ruf auf eine C3-Professur an der TU-Darmstadt folgte. Neben zahlreichen Auszeichnungen und Stipendien wurde ihm jüngst der Alzheimer-Forschungspreis der Hans und Ilse Breuer-Stiftung zusammen mit Prof. T. Misgeld verliehen.

Foto: Christoph Scholz

Verantwortung gegenüber Mensch und Tier

Was in der chemischen Produktion von Massenchemikalien die Verantwortung für Mensch und Umwelt bedeutet, ist im pharmazeutischen Industriezweig der Chemie gleichbedeutend mit der Verantwortung gegenüber Mensch und Tier. Die In-vitro-Technik gilt als Domäne der Biologie, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, der Wirkstoffaktivität und -toxizität an Zellen und Geweben tierischer und pflanzlicher Herkunft nachzugehen. Die gewonnenen Erkenntnisse werden dann bestmöglich auf den Menschen übertragen. Diese Methodik ist sowohl in den großen Pharmaunternehmen als auch in der Lehre an Universitäten fest verankert und gilt als Meilenstein in der Reduzierung von Säugetierversuchen. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe, deren

Synthese und Charakterisierung bleibt allerdings zentrale Aufgabe der Chemie, im Speziellen der Medizinalchemie. Das übliche Vorgehen eines Medizinalchemikers liegt dabei in der Erkennung biochemischer Mechanismen, die für ein bestimmtes Krankheitsbild charakteristisch wirken bzw. eine Wirkung induzieren. Wurde eine solche Zielstruktur identifiziert, was beispielsweise ein spezielles Enzym sein kann, so wird dieses durch charakteristische Wechselwirkungen mit Wirkstoffkandidaten beeinflusst, um den erwünschten Effekt auszulösen. Die „besten“ Kandidaten durchlaufen dann im Rahmen präklinischer Studien geeignete Tierversuche, um anschließend die klinischen Testphasen zu erreichen. Besteht ein Wirkstoff sämtliche Phasen und Prüfungen, so steht auf dem Weg zum Medikament nur noch die Zulassung. Was sich hier

wie eine Kausalkette anhört, ist tatsächlich ein mühseliger und langer Prozess, der immer enorme Kosten bis zur Registrierung und Markteinführung eines Wirkstoffes verursacht.

Die Rolle der Chemie in der Wirkstoffentwicklung

Bei der schematischen Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Wirkstoffevaluierung (Abb. 1) ist der Chemiker auf der ersten Säule anzusiedeln und stellt nach verrichteter Arbeit eine Vielzahl an potenziell geeigneten Wirkstoffkandidaten bereit. Auf diesem noch relativ niedrigen Wissensstand werden diese Kandidaten traditionell aus den Händen der Chemie an die Biologie und Medizin weitergereicht. Nun entscheiden pharmakokinetische und toxikologische Studien,

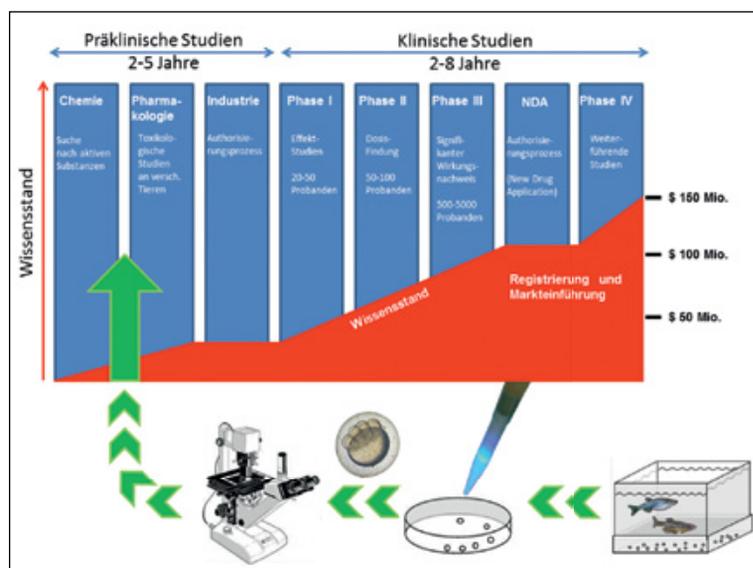


Abb.1 Verlauf der Wirkstoffentwicklung von Laborsynthese bis Markteinführung (oben) und die schematische Einordnung des neuen Forschungsschwerpunkts von Prof. Boris Schmidt in das Gesamtkonzept (unten).

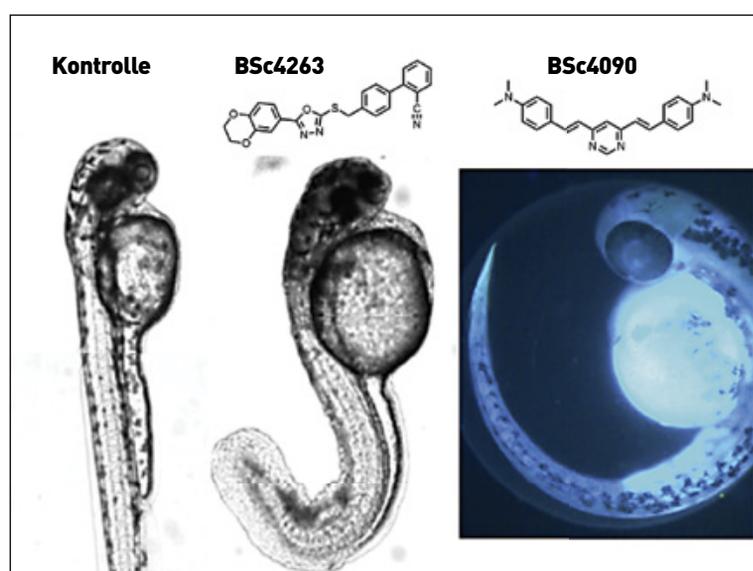


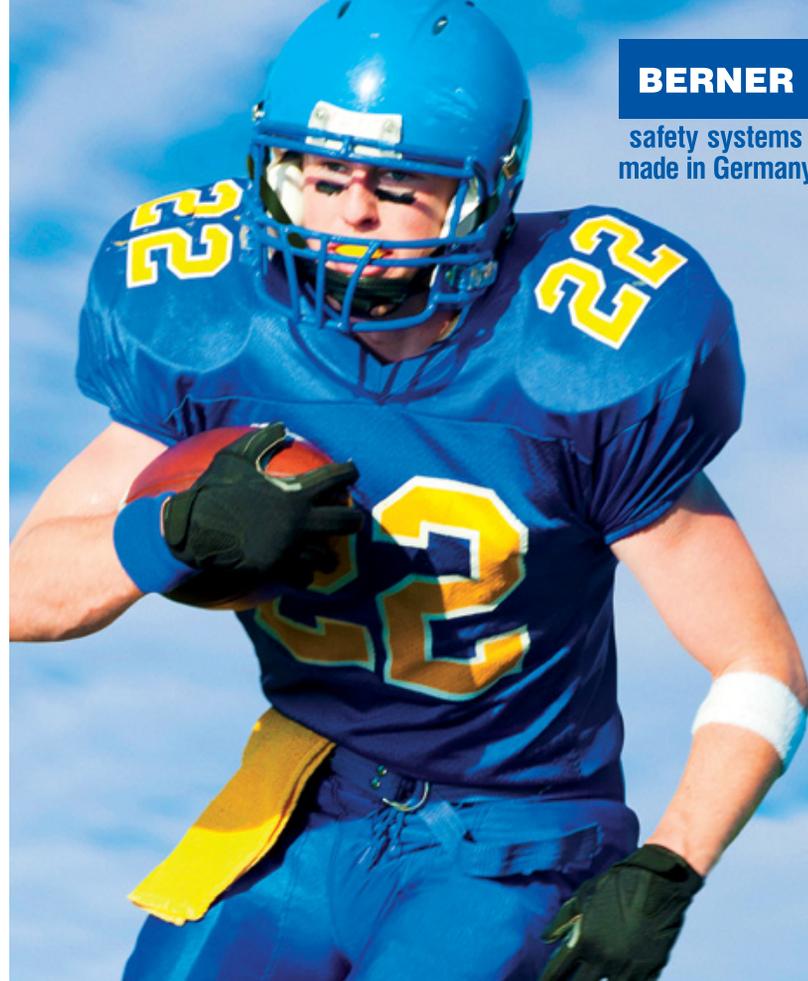
Abb.2 Normal entwickelte, dechorionierte Zebrafischlarve (2 Tage alt) (links). Fehlbildete, dechorionierte Zebrafischlarve (2 Tage alt). Die Inhibition von GSK-3 durch BSc4263 (2,5 µM) führt zu charakteristischen Phänotypen (mitte) [2]. Eingefärbte Zebrafischlarve im Chorion (2 Tage alt) (rechts). Verteilung und Anreicherung des Fluorophors BSc4090 (3 µM) lässt sich am Fluoreszenzmikroskop verfolgen [3].

welche Verbindungen sich besonders eignen. Sofern möglich, erfolgt diese Selektion durch zelluläre In-vitro-Assays. Viele Fragestellungen können jedoch trotz aller Fortschritte der In-vitro-Technik erst im Gesamtorganismus beantwortet werden. Aufgrund der Nähe zum Menschen kommen dazu typischerweise Säugetiere zum Einsatz, im Speziellen Mäuse, Ratten und Kaninchen zum Einsatz.

Die vollständige Verdrängung von Versuchen an Säugetieren im Zuge der Wirkstoffentwicklung wird in naher Zukunft kaum möglich sein. Motivation eines jeden Gliedes der Entwicklungsmaschinerie sollte dennoch die Reduzierung der für die Tiere oftmals qualvollen Praktiken durch den Ersatz durch tierschutzkonforme In-vivo-Systeme sein.

Frühe Testung der Wirkstoffkandidaten

Eine Literaturrecherche zu derartigen Assays führt schnell zum Zebrafischembryonenmodell. Aufgrund der neuen europäischen REACH-Bestimmungen, welche die Testung unzähliger Altchemikalien vorschreibt, erfährt der so genannte Fischembryontoxizitätstest (FET) eine Art Renaissance. Im FET werden toxi-



Persönliche Schutzausrüstung

Harter Einsatz braucht perfekten Schutz – Active Breath Z⁺ B⁺

Die perfekte Ergänzung für die Arbeit im Reinraum – unsere geprüften und zertifizierten Schutzoveralls und Schutzüberstiefel aus unserer Active Breath Z⁺ B⁺-Schutzbekleidungsreihe.

Besonderheiten der Schutzoveralls und Schutzüberstiefel

- Baumustergeprüft und zertifiziert als komplexe PSA der Kategorie III
- Für den Umgang mit CMR-Arzneimitteln (z.B. Zytostatika) und biologischen Arbeitsstoffen
- Chemikalienschutzanzug Typ PB[4] für CMR-Arzneimittel
- Flüssigkeitsundurchlässige Beschichtung und spraydichte Verbindungen gem. DIN EN ISO 17491-4 auf der Vorderseite und im Schulter- und Beinbereich
- Atmungsaktives Material im Rückenbereich des Overalls
- Ultraschallgeschweißte Nähte



PSA



Mehr Informationen unter:
Telefon +49(0) 41 21/43 56-0
www.berner-international.de

gische Daten anhand spezifischer Phänotypen am Zebrafischembryo erfasst, was sich bereits in automatisierten Screeningverfahren bewährt hat und 2007 vom Deutschen Institut für Normung als Methodik für Risikobewertung von Chemikalien in der Ökotoxikologie aufgenommen wurde (DIN 38 415-6, ISO 15088) [1].

In einem medizinisch ausgerichtetem Arbeitskreis werden stetig neue potenzielle Wirkstoffe produziert, die verschiedenste Wege in die Testung finden. Dies führt mittlerweile zu großen Verzögerungen und hohem Kostenaufwand und wird deshalb nicht selten zum Nadelöhr der Wirkstoffentwicklung. Die Möglichkeit, erste biologische Daten zur Aussortierung ungeeigneter Derivate im eigenen Labor erheben zu können, führt zu effizienteren Arbeiten und macht eine Vielzahl an weiterführenden externen Testungen hinfällig. Das Vorgehen, das nun seit bereits drei Jahren im AK Prof. Boris Schmidt verfolgt wird, knüpft am FET an, konzentriert sich allerdings auf die Entwicklung krankheitsspezifischer In-vivo-Assays an Zebrafischembryonen. Dies macht es möglich, einen gewünschten bzw. unerwünschten Effekt eines potenziellen Wirkstoffs direkt nach dessen Synthese im eigenen Labor zu verfolgen.

Im Falle neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer kann dies neben der rein toxikologischen Evaluation der Wirkstoffe zusätzlich der Wirknachweis durch spezifische Phänotypen früher Ent-

wicklungsstadien des Fisches sein. So führt beispielsweise die Inhibition der im Entstehungsprozess der Alzheimer-Demenz beteiligten Kinase GSK-3 in der Zebrafischlarve zu Entwicklungsstörungen, die unter dem Mikroskop anhand charakteristischer Rückgratverkrümmung bereits in einem Alter von zwei Tagen nachzuweisen sind (Abb. 2) [2]. Auch Fluoreszenzfarbstoffe, die zur selektiven Färbung der im Verlauf der Krankheit entstehenden Proteinablagerungen Tau und A β entwickelt werden, benötigen einen maßgeschneiderten Assay. Denn die Hürde, die ein solcher Farbstoff überwinden muss, um den Ort der Ablagerungen, das Gehirn, zu erreichen, ist die Blut-Hirn-Schranke (BBB) [3]. Obgleich bei einem Zebrafischembryo wohl kaum eine Alzheimer-Demenz zu erwarten ist, lässt sich dennoch der Transport des Fluorophors durch die Blutgefäße bis zum Gehirn beeindruckend am Fluoreszenzmikroskop verfolgen. Erst wenn ein solches Experiment positiv verläuft, erfolgt die weitere Testung an Säugetieren bis hin zur Entwicklung eines BBB-permeablen Wirkstoffs.

niedrigere Strahlendosen zu ermöglichen. Umliegendes, gesundes Gewebe nimmt dann weniger Schaden. Die übliche Vorgehensweise der Forschungsinstitute und pharmazeutischen Industrie ist die Evaluierung der Wirkstoffdosis in Kombination mit ionisierender Strahlung am Mausmodell. Im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1657 konnte jüngst ein In-vivo-Assay aufgebaut werden, das den synergistischen Effekt aus Röntgenstrahlung und Wirkstoff leicht zugänglich macht. Es wird kaum überraschen, dass unsere Wahl auch hier auf die Zebrafischlarve fiel. Nachdem die Eier ein Tag alt sind, erfolgt die Vergabe des Wirkstoffs in verschiedenen Konzentrationen und die Bestrahlung mit der hohen Dosis von 20 Gy. An den darauffolgenden Tagen wird das Überleben bestrahlter und nichtbestrahlter Embryonen verfolgt und am fünften Tag abgebrochen. Die erhaltenen Überlebenskurven erlauben neben der Identifikation radiosensibilisierender Wirkung auch eine Abschätzung der Toxizität (Abb. 3).

Radiosensibilisatoren für die Strahlentherapie

Ein weiterer Schwerpunkt des Arbeitskreises besteht in der Entwicklung und Evaluation von Radiosensibilisatoren. Dabei handelt es sich um Substanzen, die Tumore empfindlicher für ionisierende Strahlung machen mit der Absicht, in der Radiotherapie

Neue Proteasominhibitoren im Fokus

Neben der Fähigkeit, Zellen empfänglicher für ionisierende Strahlung zu machen, stehen Inhibitoren des 26S-Proteasoms als Initiatoren des programmierten Zelltods seit über 20 Jahren im Fokus der Krebsforschung. Diese Substanzklasse ermöglicht durch Ein-

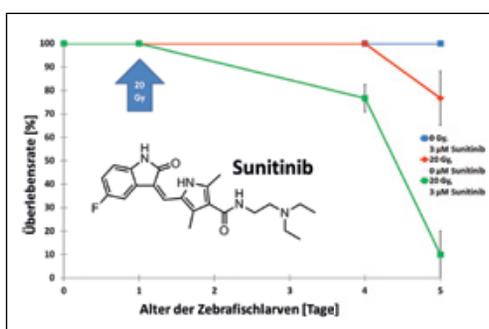


Abb. 3 Synergistischer Effekt aus ionisierender Strahlung und Wirkstoff, exemplarisch am Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib [4]. Der Wirkstoff ist in 3- μ M-Konzentration nicht toxisch (blaue Linie). Röntgenbestrahlung führt zum Sterben der Larven ab dem vierten Tag (rote Linie). Im Vergleich dazu hat die Kombination aus Sunitinib und ionisierender Strahlung eine signifikante Erhöhung der Toxizität zur Folge (grüne Linie). Wirkstoffzugabe und Bestrahlung erfolgt am ersten Tag. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Triplikat-Experimenten mit jeweils 10 Zebrafischeiern abgebildet.

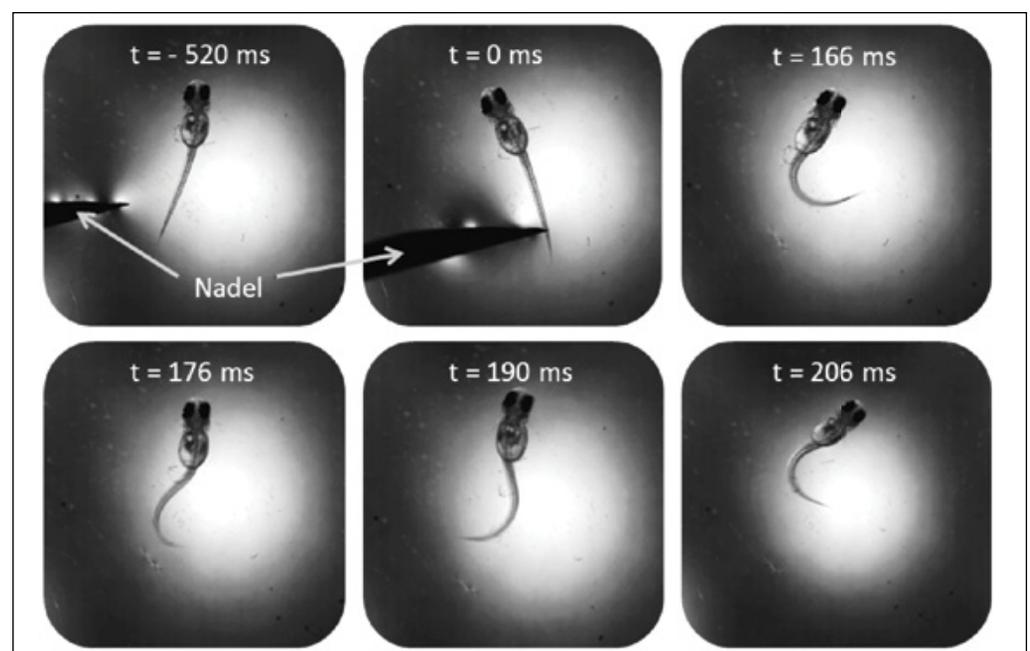


Abb. 4 Fluchreflex einer gesunden, zwei Tage alten Larve, ausgelöst durch äußeren Nadelreiz (Zeitpunkt $t = 0$ ms). Die Bilderfolge zeigt einen Schwanzschlag in einem Zeitintervall von 206 ms.

griff in den zellulären Stoffwechsel das Sterben der schnell wachsenden Krebszellen mit weitgehender Verschonung gesunder Zellen. Zwei Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib und Carfilzomib) sind bereits durch die FDA als Chemotherapeutika zur Behandlung des multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms zugelassen [5]. Beide Wirkstoffe lösen aufgrund mangelnder Selektivität als Nebenwirkung die schwere Nervenkrankheit „periphere Neuropathie“ aus [6]. Neu entwickelte Proteasom-Inhibitoren aus unserem Arbeitskreis sollen ohne diese Nebenwirkung auskommen. Üblicherweise wird die Penetration des Gehirns nach Injektion der Wirkstoffe in Mäusen und Ratten ermittelt. Unser Vorgehen nutzt den bereits im Embryonalstadium ausgebildeten Fluchtreflex des Zebrafischembryos als Maßstab für Neurotoxizität. Nach einem äußeren Reiz wird die Reaktion einer dechorionierten Larve mit einer Hochgeschwindigkeitsdigitalkamera (500 Bilder pro Sekunde) aufgezeichnet (Abb. 4). Spezielle Software misst den Winkel der Körperbiegung bzw. den Winkel der Auslenkung des Schwanzes. Diese Messdaten ermöglichen die Quantifizierung sensorischer Innervierung der Larve und erlauben den direkten Vergleich mit den zugelassenen Medikamenten als Referenzsubstanzen.

Mit dem neuen Forschungsschwerpunkt Assay-Entwicklung im Arbeitskreis Boris Schmidt werden tierschutzkonforme Alternativen zu Säugetierversuchen entwickelt und ausgebaut, zusätzlich wertvolle biologische Daten erhoben, die zur frühzeitigen Trennung der Spreu vom Weizen der Wirkstoffentwicklung führen.

→ schmidt_boris@t-online.de
 → voss.constantin@googlemail.com

Literatur

- [1] a) Lammer, E. et al. (2009), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149, 196–209; b) Sträble, U. et al. (2011), *Reprod. Toxicol.*, In Press, Corrected Proof; c) Alsbet, R. et al. (2011), *at - Automatisierungstechnik*, 59, 259–268
- [2] Monte, F. Loet et al. (2012), *J. Med. Chem.*, 55, 4407–4424
- [3] Kieser, D., *Dissertation thesis (2011), Technische Universität Darmstadt (Darmstadt)*
- [4] Cuneo, K. C. et al. (2008), *Int. J. Radiat. Oncol.* 71, 873–879
- [5] a) Borissenko, L. & Groll, M. (2007), *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, 107, 687–717; b) Rentsch, A. (2013), *Angew. Chem. Int. Ed.*, n/a-n/a
- [6] Siegel, D. S. et al. (2012), *Blood*, 120, 2817–2825

Foto: dpa Picture-Alliance GmbH

Abbildung 1: Constantin Voss,

Quelle: <http://www.linnaeus.uu.se/online/pbarm/lakemedelutveckling.html>

Zebrafisch: © mikbailg - Fotolia.com



Diabetes-Forschung mit Zebrafischen

Zebrafische sind beliebte Aquarienfische. Was kaum einer weiß: Auch Diabetesforscher interessieren sich für sie, weil die Gene der Tiere denen des Menschen sehr ähnlich sind. Auch die Zellstrukturen in der Bauchspeicheldrüse ähneln sich. Fische sind Wirbeltiere, also dem Menschen viel ähnlicher als andere beliebte „Haustiere“ der Gen-Forscher, etwa Taufliegen oder Plattwürmer. Viele ihrer Gene sind fast identisch, und auch die Zellstrukturen in der Bauchspeicheldrüse ähneln sich sehr.



Westfalen



Sonder-Bar.

Sondergase à la carte oder nach persönlichem Rezept.

Empfehlung vom Barkeeper: Ein nach modernsten Gesichtspunkten ausgestattetes Sondergasezentrum, ergänzt um das Know-how erfahrener Spezialisten. Im Ergebnis die Garantie, für jeden Zweck das perfekt kalibrierte Mess-, Prüf- oder Analyse-Gas zu bekommen. Ob individuelle Einzelfertigung oder bevorratete Qualitäten – zum Beispiel Reinstgase bis 6.0 in ECD-Standards. Das ist Perfektion für Genießer.

Womit treffen wir Ihren Geschmack? – Rufen Sie an, schreiben, faxen oder mailen Sie.

**Gase, Service
und Know-how**

**Westfalen AG · Technische Gase · 48136 Münster
 Fon 02 51/6 95-0 · Fax 02 51/6 95-1 29
www.westfalen-ag.de · info@westfalen-ag.de**