

Schlussbericht:

Projekträger	Jülich (PTJ); c/o VDI/VDE Innovation + Technik GmbH
Förderkennzeichen	03VP08790
Thema:	innovativer dualer Topoisomerase-Inhibitor P8-D6 zur Testung im <i>in vivo</i> Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell
Kurzwort des Vorhabens	P8-D6_invivo_OC
Zuwendungsempfänger	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Kiel - Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Frauenheilkunde)
Laufzeit	01.04.2021 – 31.03.2024
Monat der Erstellung	10/2024

Teil I: Kurzbericht

Keine Diagnose erschreckt die Menschen so sehr wie Krebs. Diese Angst ist berechtigt, wenn man sich die alarmierenden Daten zur weltweiten Entwicklung ansieht. Im Jahr 2022 lag die weltweite Inzidenz für Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) bei 325.000 Neuerkrankungen pro Jahr, eine Zahl, die bis 2045 auf 477.000 Neuerkrankungen ansteigen könnte [1]. Derzeit Überleben nur fünf von zehn Patientinnen mit Eierstockkrebs die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [2]. Sowohl die Rezidiventwicklung, als auch therapielimitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind eine große Herausforderung in der Therapie. Entsprechend bewegt dieser Verlauf uns Wissenschaftler wie Ärzte und zeigt den extrem großen klinische Bedarf an der Entwicklung effektiver, verträglicher und zielgerichteter Wirkstoffe.

Ein vielversprechender Wirkstoff ist der duale Topoisomerase Inhibitor „P8-D6“, ein „small molecule“, der in Kiel entwickelt wurde und von unserem Team im Rahmen dieses Projekts präklinisch intensiv untersucht wurde. Mittels zweistufiger Synthese ist P8-D6 einfach herstellbar und besitzt außerordentlich gute Löslichkeits- sowie Stabilitätseigenschaften (Langzeit-Stabilitätsstudie ICH Q1A (R2)) [3]. Der Wirkstoff P8-D6 induziert in gynäkologischen Tumoren verglichen zu Standardtherapeutika signifikant (bis zu 10-fach) höher Apoptose, indem es den Enzym-DNA-Komplex beider Topoisomerasen (I/II) kovalent stabilisiert [3,4]. Topoisomerasen regulieren den Torsionsstress in der DNA, indem sie Einzel- und Doppelstrangbrüche induzieren, um wesentliche Genomfunktionen (z. B. Transkription, Replikation oder Rekombination) zu ermöglichen [5]. Aufgrund ihrer relevanten Funktion in Proliferationsprozessen stellt diese Enzymklasse ein wichtiges Target in der Krebstherapie dar. Beispielsweise ist Topotecan fest in der Therapie des Ovarialkarzinoms verankert, hemmt allerdings nur Topoisomerase I [6]. Ferner trägt die simultane Inhibition beider Topoisomerasen zur geringeren Resistenzentstehung, durch z.B. Hochregulation des Zielenzym bei und bietet durch die erhöhte Effizienz wesentliche Vorteile in der Therapie [7–9].

Mittels *in vitro* und *ex vivo* Zellkulturmodellen konnte für P8-D6 bereits tumorzellübergreifend eine beeindruckende antitumorale Wirkung bei geringen Effekten auf gesunde Zellen nachwiesen werden [10–12]. Zusätzlich durchgeführte Studien am National Cancer Institute bestätigten die hohe antitumorale Aktivität [3]. Eine Therapieerweiterung stellt die Kombination mit etablierten Wirkstoffen dar, die durch geeignete Auswahl von Wirkmechanismus zu Synergien führt. So sind seit 2019 PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inhibitoren zur Behandlung des rezidierten Ovarialkarzinoms zugelassen und dienen der Erhaltungstherapie [13]. PARP-Enzyme sind an der Reparatur von Topoisomerase-Giften bedingter DNA-Schäden beteiligt [14]. Unsere Untersuchungen konnten nachweisen, dass eine Kombination mit P8-D6 zur Akkumulation von DNA-Schäden und zu einer Sensibilisierung der Krebszellen für PARP-Inhibitoren führt [12].

Ziel dieses Projekts war es mithilfe von *in vitro* und *in vivo*-„proof of concept“(PoC)-Studien zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, das therapeutische Potential von P8-D6 und seiner Metabolite nachzuweisen und weiterzuentwickeln. Folglich wurde im Rahmen dieses Projekts stetig P8-D6 mithilfe der

CLEMENT und WEIDE Synthese, einer effizienter Eintopf-Synthese, in einer Reinheit von > 97 % synthetisiert. Ein wesentlicher Teil der präklinischen Arzneimittelentwicklung sind die *in vivo* Tiermodelle zur Untersuchung von Wirksamkeit und Toxizität, aber auch der Prozesse der Verstoffwechslung und Verteilung eines Wirkstoffs in einem Multiorgansystem. Studien zur Sicherheitspharmakologie bzw. Toxizität in Mäusen ergaben eine maximal tolerierbare Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht für die Einfach- und Mehrfachgabe [3,15]. Mithilfe eines im Rahmen dieses Projekts etablierten Mausmodells konnte die *in vivo*-Wirksamkeit von P8-D6 bei Mehrfachgabe bestätigt werden. P8-D6 konnte im Vergleich zur Negativkontrolle (NaCl) einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum hervorrufen, der in seiner Stärke mit Topotecan vergleichbar war. Bei der Behandlung mit P8-D6 wurde jedoch leichte Nebenwirkungen beobachtet.

Des Weiteren sind im Rahmen dieses Projekts die Bestimmung der Bioverfügbarkeit, Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Eliminierung, d.h. die sogenannte Pharmakokinetik, auf *in vitro*- und *in vivo*-Ebene unter Einhaltung der FDA „Guidance for industry“ erfolgt [16–18]. Dafür wurden Proben von Plasma, verschiedenen Geweben, Urin, Fäkalien und Zellkulturüberständen nach Applikation von P8-D6 mittels HPLC untersucht. In den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bildeten sich drei Phase-I-Metabolite und ein Phase-II-Metabolit, wobei sich das *N*-dealkylierte P8-D6 als besonders wirksam erwies. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit der Metaboliten gegen Eierstockkrebs *in vitro* bestimmt. Untersuchungen des Metabolismus können neben der Aufklärung der Pharmakokinetik auch zur Entdeckung weitere potenzielle Wirkstoffkandidaten beitragen. Außerdem zeigte P8-D6 eine Hemmwirkung auf die Effluxpumpen P-Glykoprotein (IC₅₀: 20,63 µM) und Breast Cancer Resistance Protein (IC₅₀: 16,32 µM). Generell kann eine ungewollte Inhibition von Transportern wie Breast Cancer Resistance Protein und P-Glykoprotein zu pharmakokinetischen Interaktionen mit anderen Wirkstoffen führen. Trotzdem sind eine Reihe von inhibierenden Arzneimitteln zugelassen. Ein Vorteil könnte ein, dass eine gezielte Inhibition der Effluxtransporter als sogenannten Chemosensitizer genutzt werden kann und so zur Umgehung des tumoralen Resistenzmechanismus der Hochregulation der Expression dieser Proteine beitragen kann. So wurde beispielsweise unsere Postivkontrolle, das KO143, schon erfolgreich als Chemosensitizer eingesetzt [19–27]. Relevante Wirkstoff-Interaktionen zeigten sich nicht. Weiter konnte eine orale Bioverfügbarkeit von 21,5% für P8-D6 in Sprague-Dawley-Ratten bei gleichzeitig relativ hoher Plasmaproteinbindung und einer umfangreichen Gewebeverteilung mit einem scheinbaren Verteilungsvolumen von 57,69 (intravenös) und 82,92 (per oral) L/m² ermittelt werden.

Ein wesentliches Ziel unserer zukünftigen Forschung ist es, P8-D6 so zu optimieren, dass es patientenspezifisch und zielgerichtet wirkt, um den hochwirksamen Wirkstoff präziser zum Tumor zu transportieren und Nebenwirkungen zu reduzieren. Zudem sollen weitere geplante Vorhaben das „target product profile“ (TPP) konkretisieren und die „IND application“ vorbereiten. Momentan ist kein dualer Topoisomerase-Inhibitor in der Krebstherapie oder für andere Indikationen etabliert, obwohl diese Wirkmechanismus-Klasse ein hohes Potential in der Onkologie besitzt, was P8-D6 ein Alleinstellung („first in class“) gegenüber dem Stand der Technik beschert und die Verwertungschancen deutlich erhöht. Aufgrund der Aggressivität von gynäkologischen Tumoren bei gleichzeitigem Fehlen adäquater Behandlungsoptionen ist die Entwicklung neuer Therapieansätze essenziell für die klinische Praxis. Unser P8-D6 könnte diese Lücke im Erfolgsfall schließen, die Therapie von gynäkologischen Tumoren, wie Eierstockkrebs, verbessern und hierdurch wesentlich zur Lebensqualität und Lebenserwartung unserer Tumorpatientinnen beitragen.

Teil II: Vorhabensbeschreibung

Allgemein (AP 0):

Im Fokus des Projekts „03VP08790“ lag die Untersuchung der Substanz P8-D6 und seiner Metabolite. Als „small molecule“ ist der in Kiel entwickelte Wirkstoff P8-D6 mittels einer zweistufigen Synthese modifiziert nach CLEMENT und WEIDE einfach herstellbar. Für die gesamte Projektlaufzeit wurde daher stetig P8-D6 mithilfe dieser Synthese in einer Reinheit von etwa 97 % synthetisiert (Abb. 1). Anschließend erfolgte die Charakterisierung mittels NMR (Kernspinresonanz), HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und LC-MS (Flüssigchromatographie- Massenspektrometrie) zur Bestimmung der Identität und Reinheit (Abb. 2., AP0).

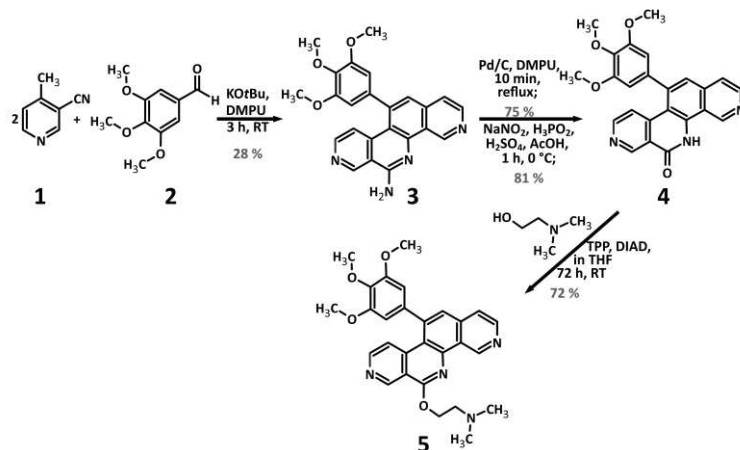


Abb. 1: Synthese von P8-D6 (5). Durch den Einsatz von 4-Methylpyridin-3-carbonitril (1) mit 3,4,5,-Trimethoxybenzaldehyd (2) in einer Eintopfreaktion konnte die Substanzklasse der Pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline (3) hergestellt werden. Anschließend erfolgte die Dehydrierung an der 11,12-Position und die Einführung eines Lactam an der 6-Position, welche eine basischen Seitenkette (*N,N*-Dimethylaminoethanol) erhielt [3,28].

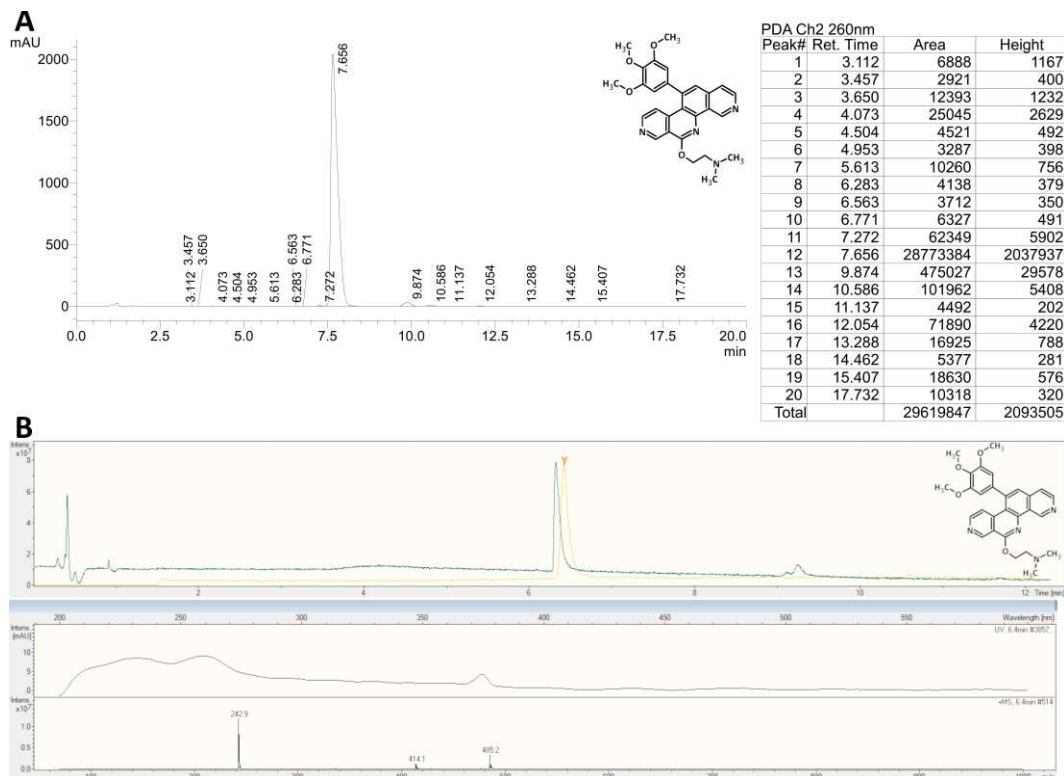


Abb. 2: HPLC- Chromatogramm (A) und LC-MS Spektrum von P8-D6 (5). Repräsentatives HPLC-Chromatogramme (A) und LC-MS Spektrum (B) von P8-D6 mit einer Reinheit von 97,14%. P8-D6 (IUPAC: 6-(*N,N*-dimethyl-2-aminoethoxy)-11-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline. SMILES: COc5cc(c3cc1ccncc1c4nc(OCCN(C)C)c2cnccc2c34)cc(OC)c5OC).

Pharmakodynamik (AP 1):

P8-D6 ist ein dualer Topoisomerase Inhibitor, der in Kiel entwickelt wurde und von unserem Team derzeit im translationalen Ansatz präklinisch intensiv untersucht wird [6]. Der Wirkstoff P8-D6 induziert in gynäkologischen Tumoren verglichen zu Standardtherapeutika signifikant (bis zu 10-fach) höhere Apoptoseraten, indem es den Enzym-DNA-Komplex beider Topoisomerasen (I/II) kovalent stabilisiert [6,7]. Topoisomerasen regulieren den Torsionsstress in der DNA, indem sie Einzel- und Doppelstrangbrüche induzieren, um wesentliche Genomfunktionen zu ermöglichen [8]. Aufgrund ihrer relevanten Funktion in Proliferationsprozessen stellt diese Enzymklasse ein wichtiges Target in der Krebstherapie dar. Beispielsweise ist Topotecan fest in der Therapie des Ovarialkarzinoms verankert, hemmt allerdings nur Topoisomerase I [6]. Ferner trägt die simultane Inhibition beider Topoisomerasen zur geringeren Resistenzentstehung, durch z.B. Hochregulation des Zielenzym bei und bietet durch die erhöhte Effizienz wesentliche Vorteile in der Therapie [9–11].

In der präklinischen Arzneimittelentwicklung stellt die *in vivo* Testung in lebenden Systemen einen wesentlichen und unverzichtbaren Teil dar. Diese Untersuchungen bilden die Wirksamkeit, Toxizität, Verstoffwechslung und Verteilung eines Wirkstoffs in einem Multiorgansystem ab und bildet eine Annäherung der Therapiesituation im menschlichen Körper nach, die in dieser vielseitigen Weise nicht durch Zellkulturmodelle ersetzt werden kann [29]. Zudem sind Tierversuche rechtlich vorgeschrieben, bevor neue Substanzen klinisch an Patienten getestet werden dürfen. Neue valide Alternativmethoden zum Tierversuch, die dem Replacement aus dem 3R- Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) folgen und die Tumormodelle und Nebenwirkungen neuer Substanzen auf verschiedene Organe im lebenden Organismus adäquat abbilden, sind derzeit noch nicht verfügbar.

Die meisten präklinischen Modelle sind dadurch eingeschränkt, dass die Wirkungen von Wirkstoffen an Krebszellen getestet werden, ohne dass die unterstützende Mikroumgebung des Tumors vorhanden ist, die für das Fortschreiten des Krebses *in vivo* unerlässlich ist. Aus diesem Grund haben wir ein syngenes Mausmodell mit immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen für unsere Testungen gewählt. In diesem neuen Mausmodell werden murinen ID8 Ovarialkarzinomzellen, die intraperitoneal in C57Bl/6-Mäusen gezüchtet wurden, in syngene C57Bl/6 Mäuse injiziert und bilden Tumore aus. Diese Tumore werden anschließend behandelt. Ein Vorteil dieses Systems liegt in der Verwendung immunkompetenter Mäuse. Diese besitzen ein funktionierendes Immunsystem, welches auch für eine Tumorabwehr verantwortlich ist und durch Eigenantwort das Tumorwachstum destruktiv beeinflussen kann. Dies ist realitätsnäher bezogen auf die Situation im Menschen und ermöglicht die Auswirkungen des Wirkstoffs auf die Tumorentwicklung im Zusammenhang mit dem vollständigen Immunrepertoire zu bestimmen. Zudem ist das Tumormodell als einfach in der Handhabung und als gut reproduzierbar beschrieben. Die Nutzung von Wildtyp C57Bl/6-Mäusen bietet zudem den Vorteil, dass diese Mäuse verglichen zu anderen Mäusen von Geburt an ausgeprägtere Organe und Zellen, wie Milz und Lymphozyten besitzen [30,31]. Dieses syngene Mausmodell ist zudem in mehreren Publikationen als ein geeignetes Modell für die Testung neuer Wirkstoffe und die Untersuchung physiologischer Prozesse beim Ovarialkarzinom beschrieben und stellt ein aussagekräftigeres und geeigneteres Modell dar [32–41].

Für dieses *in vivo* Studie wurden die murinen Ovarialkarzinomzellen ID8 in die Maus injiziert. Um zuvor die Wirksamkeit von P8-D6 *in vitro* für diese Zellen nachzuweisen, wurden 2D und 3D Versuche mit murinen ID8 Ovarialkarzinomzellen und murinen BR5 Ovarialkarzinomzellen durchgeführt. Die Behandlung mit P8-D6 induzierte eine signifikant höhere Apoptoserate in 2D Zellmonolayern und 3D Sphäroiden verglichen zu Cisplatin, Etoposid und Topotecan und PBS (negativ Kontrolle) (Abb. 3/AP1.1.1). Diese Ergebnisse waren vergleichbar zu den zuvor generierten Daten mit humanen Ovarialkarzinomzellen.

Des Weiteren wurden die ID8 Zellen zur Nutzung im Tierversuch stabil mit einem Luziferase-Gens transfiziert. Das exprimierte Luziferase-Enzym ist fähig appliziertes Luciferin zu einem Lumineszenz-Signal umzusetzen. So kann das Tumorwachstums im Verlauf ohne große Belastung der Tiere mittels molekularer Bildgebung longitudinal verfolgt werden (AP1.1.2).

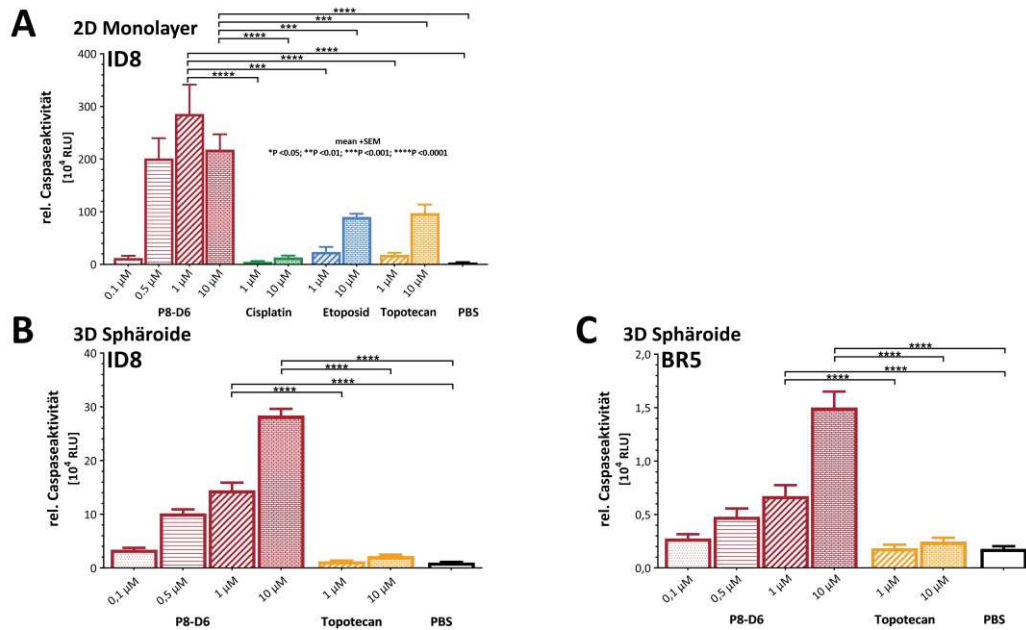


Abb. 3: Apoptose-Induktion durch P8-D6 in murinen Ovarialkarzinomzellen. ID8 Zellen (A, B) und BR5 (C) wurden in 2D für 24h (A) und 3D in ULA Platten für 96 h (B, C) kultiviert und für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Viabilität und die Caspase3/7-Aktivität bestimmt.

Neben dem beschriebenen syngene Mausmodell ist auch die orthotop Applikation von Tumorzellen in den linken Ovarialschleimbeutel unter Narkose beschrieben [42]. Die orthotopische Tumorentstehung soll eine charakteristischere, metastatische Ausbreitung der Krankheit sowie eine therapeutische Reaktion verbessert reproduzieren können, da die Wechselwirkung mit der Mikroumgebung ähnlicher zum Ursprungsgewebe sind [43].

Grundlage für die *in vivo* Behandlungsstudie waren die in die Etablierungsstudien, die ein Anwachsen der ID8 luc Zellen in C57BL/6 albino Mäusen zeigten (Studiendesign Abb. 4, Tierversuchsantrag: IX 552-79308/2022 (71-8/22), AP), (AP1.3)). Zur Untersuchung des therapeutischen Potentials des dualen Topoisomerase-Inhibitor „P8-D6“ (Behandlungsstudie) wurde 42 weibliche C57BL/6 albino Mäusen orthotop $1,5 \times 10^7$ murine ID8 luc Zellen in Matrigel injiziert (AP1.3). Die Operation erfolgte in Narkose. Zur Kontrolle der erfolgreichen Applikation und des erfolgreichen Anwachsens wurden an Tag 0 und Tag 7 Biolumineszenzmessungen mithilfe des IVIS (Revvity Diagnostics) durchgeführt. Die Mäuse wurden anschließend in drei Behandlungsgruppen (P8-D6 16 Mäuse; Topotecan 13 Mäuse; NaCl 13 Mäuse) aufgeteilt. Ab Tag 7 begann die Behandlung nach vorheriger Tumorvermessung mittels Biolumineszenz. Hierfür wurde den Mäusen je 1mg/kg Körpergewicht des Wirkstoffs P8-D6, Topotecan oder als Negativkontrolle dasselbe Volumen NaCl intravenös verabreicht. Wie dem Behandlungsschema (Abb. 4) zu entnehmen ist, wurden die Tiere zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sieben Wochen behandelt. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde regelmäßig (\geq dreimal wochenttäglich) nach Tumorinduktion kontrolliert. Die weitere Tumorwachstumskontrolle der Tiere erfolgte einmal wöchentlich in Narkose (Ketamin 75mg/kg KG und Medetomidin 0,5 mg/kg KG) mittels Ultraschall- und Lumineszenzmessung. Die Befunde wurden dokumentiert. Außerdem wurde wöchentlich eine Gewichtskontrolle durchgeführt.

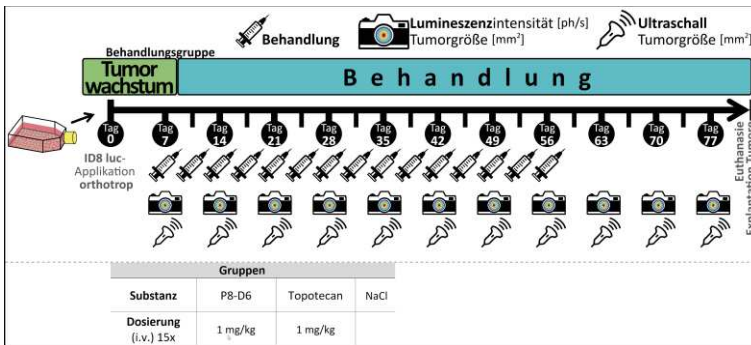


Abb. 4: geplantes Schema zur Behandlungsstudie

In Abb. 5 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass die P8-D6 Behandlung eine Tumorreduktion führte (Abb. 5 A, B). Exemplarisch ist die Tumorgöße gemessen durch Biolumineszenz an Tag 42 für drei Tiere (Abb. 5 A), sowie die mittels Ultraschall bestimmte Tumorgöße aller Tiere (Abb. 5 B) dargestellt. Neben der Tumorzustandskontrolle wurden Gewichtsveränderungen über den gesamten Verlauf des Tierversuchs dokumentiert (Abb. 5C). Trotz der guten Wirksamkeit von P8-D6 entwickelten die mit P8-D6 behandelten Tiere im Versuchsverlauf eine intestinale Motilitätsstörung /mangelnde Darmperistaltik, die zum Versuchsabbruch für diese Tiere (Abbruchkriterien) führte. Die aufgetretenen Nebenwirkungen werden im Näheren weiter untersucht. Anpassungen der Dosis, sowie ein verändertes Studiendesign und Optimierungen von P8-D6 im Bereich der Pharmakokinetik sind geplant, da auch die erhöhte Plasmaproteinbindung (Abb. 14 A) zur Akkumulation des Wirkstoffs geführt haben kann. Die Tumorreduktion macht dennoch deutlich, dass P8-D6 ein großes therapeutisches Potential besitzt und nach Optimierungen von P8-D6 und nach Optimierungen im Studiendesign weitere Untersuchungen folgen.

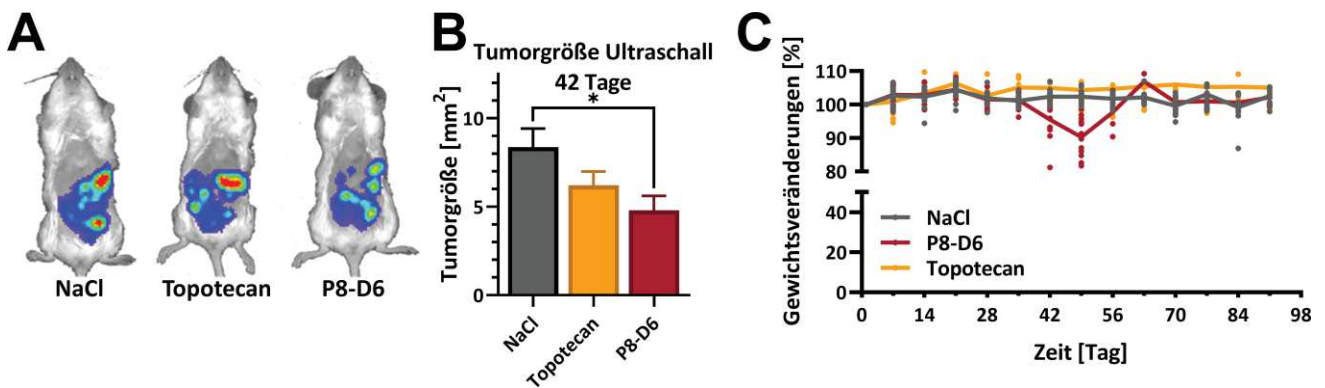


Abb. 5: *In vivo* Behandlung von P8-D6 zur Bestimmung der Wirksamkeit. Für diesen Versuch wurde 42 Tiere je ID8-luc Tumorzellen appliziert, um diese anschließend über sieben Wochen je zweimal-wöchentlich mit P8-D6, Topotecan oder NaCl zu behandeln. Die Vermessung des Tumorzustands erfolgte mittel Biolumineszenz und Ultraschall. Exemplarisch ist die Tumorgöße gemessen durch Biolumineszenz an Tag 42 für drei Tiere dargestellt (A) und die für alle Tiere quantifiziert (B). Gewichtsveränderungen über den gesamten Verlauf des Tierversuchs wurden dokumentiert (C). Mittelwerte + SEM one-way ANOVA, * ($p < 0,05$)

Pharmakokinetik: Metabolismus von P8-D6 (AP 2):

Im Rahmen dieser Arbeit wurden

umfangreiche *in vitro* und *in vivo* Pharmakokinetik-Studien zum dualen Topoisomerase-Inhibitors P8-D6 angefertigt. Diese dienen der Einschätzung der Pharmakokinetik eines Wirkstoffs zum Vergleich mit anderen Substanzen sowie der Ableitung erster Dosierungen und des Nebenwirkungs-/Interaktionspotentials. [44–49] Die Relevanz pharmakokinetischer Untersuchungen während Entwicklung wird, neben Zulassungsvoraussetzungen für die klinischen Studien, auch dadurch verdeutlicht, dass ein großer Teil der Wirkstoffkandidaten aufgrund unzureichender Pharmakokinetik bereits in der präklinischen Phase scheitern. Die Pharmakokinetik kann als zeitlicher Verlauf der Arzneistoffkonzentration im Organismus definiert werden. [45,47] Einfluss auf diese Konzentration haben die Invasion (Anstieg der Plasmakonzentration nach Applikation des Wirkstoffs) und die Elimination (Metabolismus und Ausscheidung), die gleichzeitig ablaufen und sich überlagern. [45] Die zugrundeliegenden Prozesse können als Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (bzw. ADME-Schema) beschrieben werden (Abb. 6).

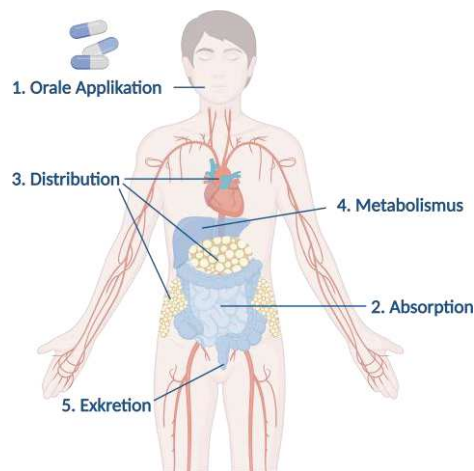


Abb. 6: Nach der Absorption unterliegt der Wirkstoffs der Distribution (in Organe und Gewebe), dem Metabolismus (v.a. in der Leber) und der Exkretion (Urin und Kot). Erstellt mit Biorender. Modifiziert nach: [50,51]

Von weitere Relevanz sind außerdem Interaktionen zwischen Arzneistoffen (engl. drug-drug-interaction), die zu einer gegenseitigen Beeinflussung und Veränderung der jeweiligen Wirkung (z.B. Abschwächung, Verstärkung, Toxifizierung) führen können. [45,48,52]

Validierung der Methoden (AP 2.2, AP2.3)

Um all diese Parameter exakt bestimmen zu können, wurden unter Verwendung von HPLC, LC-MS und NMR analytische Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von P8-D6 und seinen Metaboliten entwickelt. Die Methoden wurden in Bezug auf den Detektionsbereich (0,5 - 25 μ M, 1,29 - 88 nmol/g), die Linearität ($R^2 > 0,999$) und die durchschnittliche Genauigkeit (99,37 %), Präzision ($\pm 2,29$ %) und Wiederfindung (97,7 %) validiert. Die Nachweisgrenze (LoD) für humanes Plasma betrug beispielweise 0,05, die Bestimmungsgrenze (LoQ) für das gleiche Material 0,05. Neben den analytischen Methoden wurden auch biochemische Methoden, wie die Inkubationsstudien zur Biotransformation oder Probenaufarbeitung unterschiedliche Spenderarten mithilfe von Vergleichsstandards validiert.

In vitro Biotransformationsstudie/Inkubationsstudie (AP2.4, AP2.5)

Zur Identifizierung möglicher Metabolite wurde P8-D6 (1 mM) 150 min mit dem postnuclearen Überstand (PNS), den Mikrosomen oder dem S9-Reaktionsgemisch verschiedener Gewebeproben (Leber, Niere, Lunge, Milz und Dickdarm) unterschiedlicher Spezies (Schwein, Maus, Ratte oder Mensch) inkubiert. Im Zuge dieser Studien wurden drei Phase-I-Metaboliten identifiziert. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm und die Strukturen von P8-D6 und seinen nachgewiesenen Metaboliten sind in Abb. 7 dargestellt. Die LC-MS- und NMR-spektroskopischen Daten für die Metaboliten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Auf der Grundlage der strukturellen Merkmale wurden die Metaboliten wie folgt benannt: P8-D0 (4), P8-D6 N-Oxid (6), P8-D6 Mono (8).

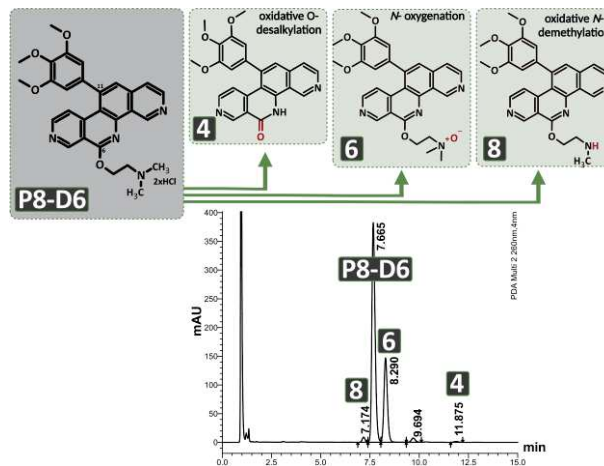


Abb. 7: P8-D6 und seine nachgewiesenen Metaboliten sowie ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm nach einer Inkubation, das alle Derivate zeigt. P8-D0 (4), P8-D6 *N*-Oxid (6), P8-D6 Mono (8).

Tabelle 1: Spektroskopische Daten von P8-D6-Metaboliten.

Metabolite	IUPAC + SMILES	¹ H-NMR	ESI-MS
P8-D6 Mono (8)	IUPAC: 6-(2-Methylaminoethoxy)-11-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline hydrochloride SMILES: CNCCOC1c2cncc2c3c(cc4cncc4c3n1)-c5cc(c(c(c5)OC)OC)OC	DMSO: 2.70 (t, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.76 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 5.28 (m, 2 H), 6.88 (s, 2H), 7.36 (d, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.56 (d, 1H), 8.75 (d, 1H), 8.94 (d, 1H), 9.57 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 11.46 (s, 1H)	m/z = 471.2
P8-D6 <i>N</i> -Oxid (6)	IUPAC: 6-(2-Dimethylaminoethoxy)-11-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline <i>N</i> -Oxide SMILES: C[N@@+](COC)(C)OC1c2cncc2c3c(cc4cncc4c3n1)-c5cc(c(c(c5)OC)OC)OC	DMSO: 3.30 (s, 6H), 3.72 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.98 (m, 2H), 5.38 (m, 2 H), 6.79 (s, 2H), 7.26 (d, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.94 (d, 1H), 8.59 (d, 1H), 8.76 (d, 1H), 9.69 (s, 1H), 10.46 (s, 1H)	m/z = 501.2
P8-D0 (4)	IUPAC: 11-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-5,6-dihydropyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline-6-one SMILES: CO1cc(cc(c1OC)OC)c2cc3cncc3c4c2c5cncc5c(=O)[nH]4	CDCl ₃ : 3.76 (s, 6H), 3.85 (s, 3H), 6.62 (s, 2H), 7.07 (d, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.72 (d, 1H), 8.47 (d, 1H), 8.73 (d, 1H), 9.62 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 12.34 (s, 1H)	m/z = 414.2

Das Ausmaß des Metabolismus während der *in vitro* Inkubation war stark von der Speziesart abhängig (Schwein > Maus > Ratte > Mensch) (Abb. 8). P8-D6-*N*-Oxid (6) war bei allen Inkubationen mit subzellulären Fraktionen aus homogenisiertem Gewebe der häufigste Metabolit. Es entstand durch eine *N*-Oxygenierung des Stickstoffs an der Seitenkette. Das insgesamt größte Ausmaß des Metabolismus wurde in der Schweineleber beobachtet (Schwein > Maus > Ratte > Mensch). Unter den subzellulären Fraktionen erbrachten die Lebermikrosomen mit 28,67 % P8-D6-*N*-Oxid (6) die meiste Bildung, deutlich mehr als die S9-Fraktion (7,58 %) und PNS (6,88 %) (Abb. 8 A). Eine Analyse der PNS-Fraktion in verschiedenen Stoffwechselorganen der Ratte ergab die höchste Stoffwechselrate in der Lunge (1,37 %), gefolgt von den Nieren und der Leber und einem geringen Anteil in Milz und Darm (Abb. 8 C). Um festzustellen, welche Enzyme für die Umwandlung verantwortlich sind, wurden die sieben von der FDA (Guidance for industry) empfohlenen rekombinante CYP 450-Isoenzyme und humanes FMO3 verwendet. Bei diesen Inkubationsstudien mit rekombinanten Enzymen wurde P8-D6 ausschließlich von FMO3 zu P8-D6 *N*-Oxid metabolisiert (Abb. 8 E). Der zweithäufigste *in vitro* Metabolit von P8-D6 war P8-D6 Mono (8). Dieser entstand durch eine oxidative *N*-Demethylierung einer der beiden Methylgruppen an der Seitenkette. Das Ausmaß der Bildung von P8-D6 Mono war 21,9-mal geringer als P8-D6 *N*-Oxid und erreichte ein Maximum von nur 1,31 % in Lebermikrosomen von Schweinen (Abb. 8 A). Ähnlich wie bei P8-D6 *N*-Oxid war die Bildung von P8-D6 Mono bei allen Tierarten in Lebermikrosomen am höchsten (Abb. 8 D). Von allen Spezies und Organen trat P8-D6 Mono jedoch relativ am häufigsten in der menschlichen Leber auf. Beim Vergleich der Organe war die Leber das stärkste Stoffwechselorgan (Abb. 8 B, C). Unter den rekombinanten Enzymen wurde P8-D6 am meisten durch CYP3A4 (0,34 %, signifikant zu jedem anderen Enzym, $p < 0,0001$) und 2D6 (0,17 %, signifikant zu 2C8, 1A2, 2C19 und 2C9, $p < 0,005$) zu P8-D6 Mono metabolisiert (Abb. 8 E).

Der dritte und letzte *in vitro* Metabolit P8-D0 (4) ist ein direkter Synthesevorläufer von P8-D6 und entstand durch oxidative O-Desalkylierung der gesamten Seitenkette. Dieser Metabolit spielt jedoch keine herausragende

Rolle bei der *in vitro* Biotransformation, da er nur zu einer maximalen Bildung von 0,13 % mit Schweineleber-Mikrosomen führte (Abb. 8 A). Die Bildung von P8-D0 wurde hauptsächlich durch CYP2C9 (0,10 %) und 2D6 (0,09 %) katalysiert (Abb. 8 E).

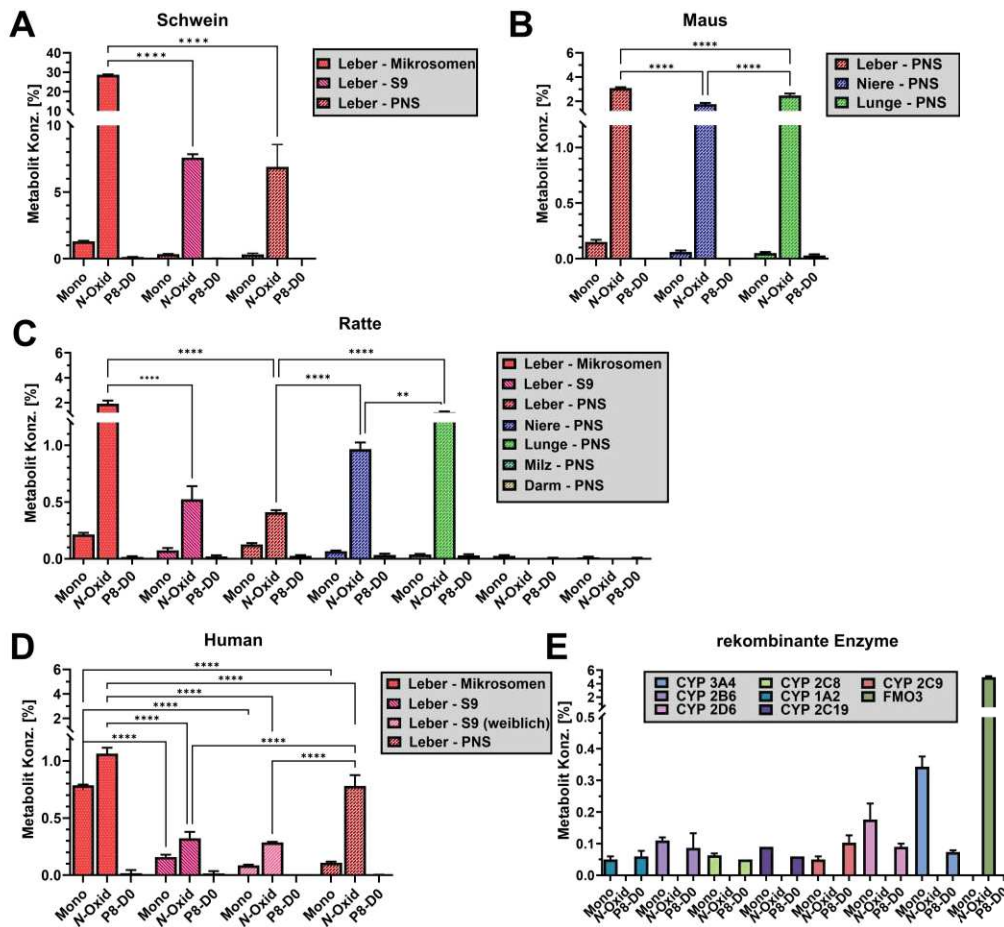


Abb. 8: *In vitro* Biotransformation von P8-D6 in homogenisierten Geweben von Leber, Niere, Lunge, Milz und/oder Darm. Die Gewebe der verschiedenen Spezies Schwein (A), Maus (B), Ratte (C) und Mensch (D) wurden in PNS, S9-Fraktion und mikrosomale Fraktion fraktioniert und mit P8-D6 inkubiert. Der Nachweis der verantwortlichen Enzyme erfolgte durch enzymatische Umwandlung von P8-D6 mit rekombinanten Stoffwechselenzymen (E). Die Quantifizierung wurde mittels HPLC durchgeführt. Daten sind Mittelwerte + SD one-way ANOVA, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Synthese der Metabolite (AP2.6)

P8-D0 (4), P8-D6 N-oxid (6) und P8-D6 Mono (8) wurden nach folgendem Schema synthetisiert Abb. 9. P8-D6 (5) wurde mit Hilfe eines einfachen und optimierten vierstufigen Verfahrens nach Meier et. al. [3] synthetisiert. Da P8-D0 (4) ein Synthesevorläufer von P8-D6 (5) ist, konnte es während der Synthese leicht gewonnen werden. Auch die Synthese von P8-D6 Mono (8) begann mit P8-D0 (4). Die abschließende Mitsunobu-Reaktion erforderte den Einsatz einer Methylaminoethanol-N-Boc-Schutzgruppe, da sich sonst ein reaktives sekundäres Amin gebildet hätte. Die Schutzgruppe wurde mit 2 M HCl in Diethylether wieder entfernt, was zur Ausfällung des protonierten Endprodukts führte.

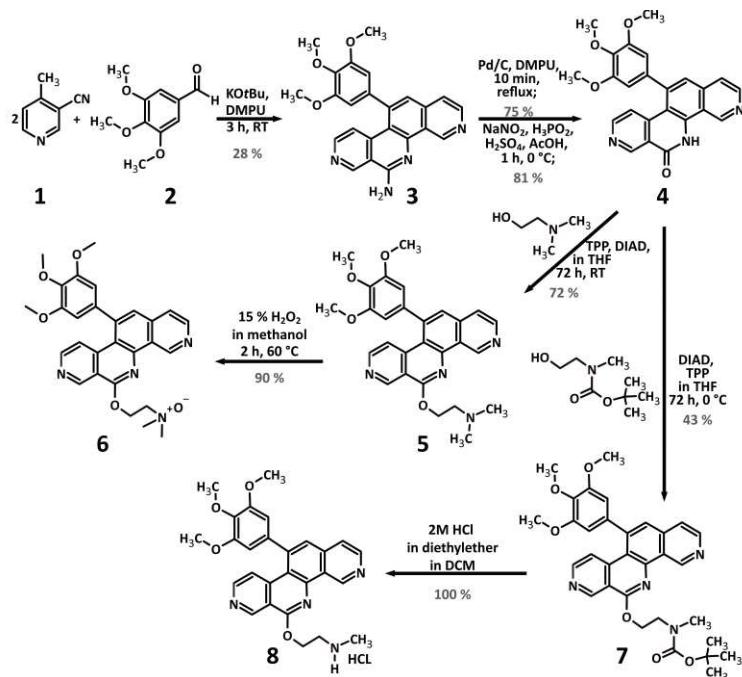


Abb. 9: Synthese von P8-D0 (4), P8-D6 N-Oxid (6) und P8-D6 Mono (8). KOtBu (Kalium-tert-Butoxid), DMPU (N,N'-Dimethylpropylenharnstoff), RT (Raumtemperatur), Pd/C (Palladium auf Kohlenstoff), NaNO₂ (Natriumnitrit), H₃PO₂ (hypophosphorige Säure), H₂SO₄ (Schwefelsäure), AcOH (Essigsäure), TPP (Tri-Phenylphosphin), DIAD (Diisopropyl-Azodicarboxylat), THF (Tetrahydrofuran), H₂O₂ (Wasserstoffperoxid), HCl (Salzsäure), DCM (Dichlormethan)

Die Struktur von P8-D6 bietet im Allgemeinen mehrere Stickstoffatome für die N-Oxygenierung. Anhand von MS-MS-Fragmenten von P8-D6 N-Oxid (6) wurde das N-oxygenierte Stickstoffatom jedoch als der Stickstoff der Seitenkette identifiziert. Ausgehend von einer Lösung der freien Base von P8-D6 in Methanol wurde die Synthese von P8-D6 N-Oxid (6) durch Zugabe von 15 % H₂O₂ erreicht.

In vitro Charakterisierung der Wirksamkeit und Toxizität der Metabolite (AP2.7)

Die Wirksamkeit von Metaboliten kann einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit des Arzneimittels haben. Aufgrund der geringen *in vitro* Bildung von P8-D0 und basierend auf dem NCI 60 Cell Screening erwies es sich als unwirksam gegen Krebs (Proliferation Tumorzellen: P8-D0 85,32 % vs P8-D6 -33,46 %) und wurde deshalb nicht weiter in Zellkulturexperimenten getestet. Die therapeutische Wirkung von P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid wurde *in vitro* an humaner Ovarialkarzinom 2D- und 3D-Zellkultur untersucht (Abb. 10, Abb. 11). Dafür wurden die Zellen für 48 h mit P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid, sowie als Vergleich mit P8-D6 und Cisplatin behandelt. Beide Metaboliten verringerten die Viabilität von Ovarialkarzinomzellen in 2D-Kultur verglichen zur Negativkontrolle (PBS) (Abb. 10 A, C, E). P8-D6 Mono (OvCar8: IC₅₀ 0,31 µM) war dabei ähnlich wirksam wie P8-D6 (OvCar8: IC₅₀ 0,27 µM). P8-D6 N-Oxid erreichte in OvCar8 Zellen einen IC₅₀-Wert von 1,98 µM. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀), ist ein Maß für die Wirkstärke, mit der eine Wirkstoff sein Zielenzymen hemmen kann. Außerdem war die Apoptose-Induktion von P8-D6 Mono mit der von P8-D6 vergleichbar (Abb. 10B,D,F). P8-D6 N-Oxid hingegen unterschied sich nur bei einer Konzentration von 10 µM signifikant (3,5-fach höhere Apoptoserate) von Cisplatin.

Nach der Behandlung wurden die Überstände der 2D Zellkulturen gesammelt, um mögliche entstandene Metabolite mittels HPLC zu quantifizieren. In Abb. 10G ist der Gesamtmetabolismus in % (Summe aller Metaboliten) in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung dargestellt. Insgesamt ist P8-D6 mit ~ 5 % das am meisten metabolisierte Substrat, gefolgt von P8-D6 N-Oxid mit ~ 2,6 % und P8-D6 Mono mit ~ 1 %. Da sich alle drei Zelllinien ähnlich verhalten, zeigt Abb. 10H den detaillierten Metabolismus von OvCar8. Im Gegensatz zu früheren Inkubationsstudien mit homogenisiertem Gewebe wurde P8-D6 in Tumorzellen hauptsächlich zu P8-D0 (2,05 %) und in geringerem Maße zu P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid metabolisiert. P8-D6 Mono wurde in P8-D0 umgewandelt und in geringerem Umfang zu P8-D6 und einem neuen unbekanntem Metaboliten (0,10 %) metabolisiert. Aufgrund der erhöhten Polarität wäre ein Nitron erklärbar. Aufgrund des sehr geringen Ausmaßes der Bildung war dieser Metabolit jedoch nicht identifizierbar. Von den drei Substraten besitzt P8-D6 somit die geringste metabolische Stabilität, gefolgt von P8-D6 N-Oxid und P8-D6 Mono mit der höchsten metabolischen

Stabilität (nur etwa 1 % Metabolisierung). Über die metabolische Stabilität, die idealerweise dem Anteil der metabolischen Clearance von der gesamten Clearance entspricht, lassen sich z.B. Informationen zur Zieldosis und dem Dosierungsintervall ableiten. Die hohe metabolische Stabilität von P8-D6 Mono macht dieses Derivat daher zu einem interessanten Kandidaten für die weitere Arzneistoffentwicklung.

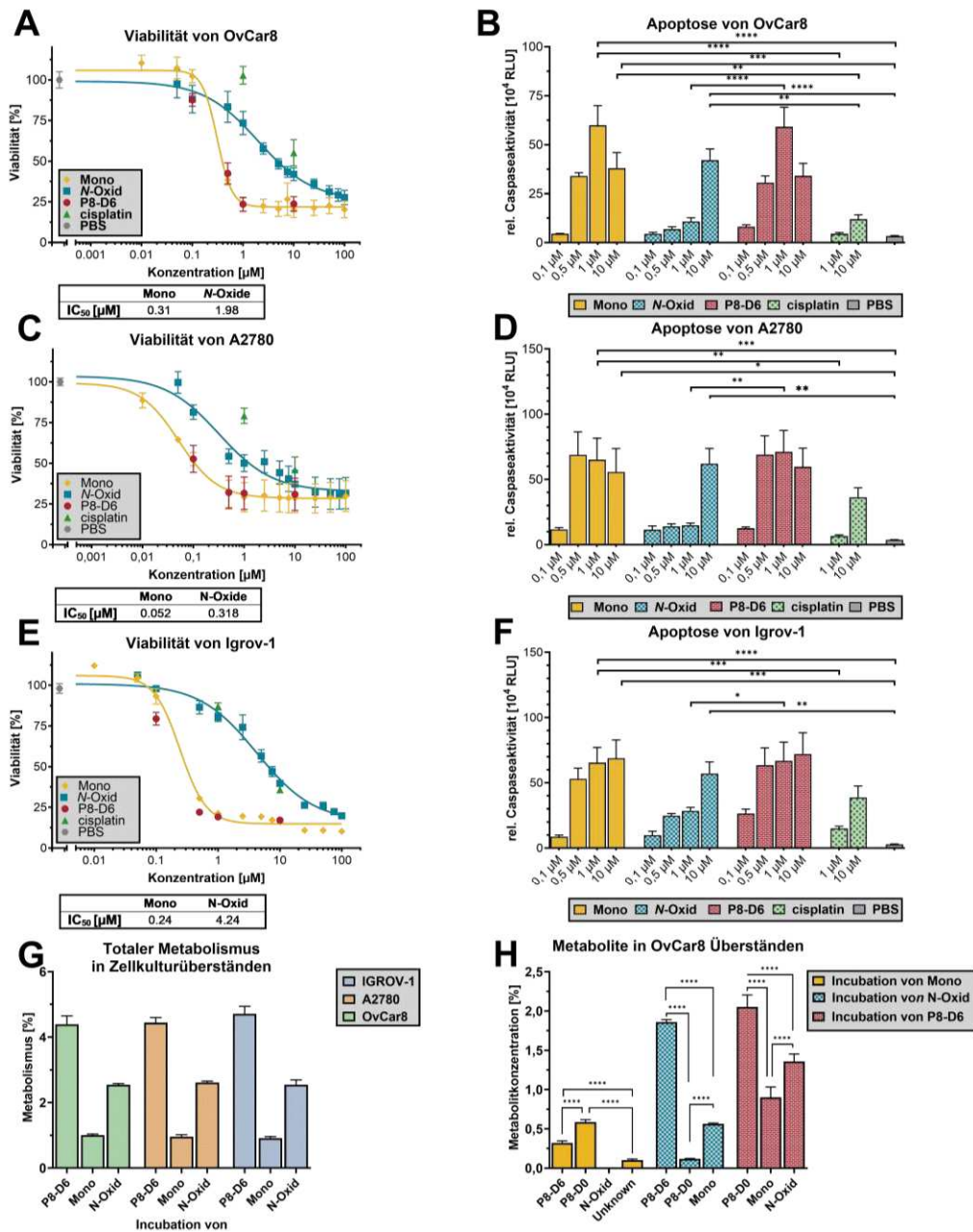


Abb. 10: Antitumorwirkung von P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid in 2D-Ovarialkarzinomzellen. OvCar8, Igrov-1, A2780 wurden 48 h mit P8-D6 Mono, P8-D6 N-Oxid, P8-D6, Cisplatin und PBS behandelt. Anschließend wurden die Viabilität (A,C, E) und die Caspase-Aktivität (B,D,F) gemessen. Der IC₅₀-Wert von P8-D6 Mono, P8-D6 N-Oxid wurde anhand der Viabilitätsdaten berechnet. Die enzymatische Umwandlung von P8-D6 in seine Metaboliten wurde auch in OvCar8, Igrov-1, A2780 analysiert, indem der Überstand dieser Zellkultur auf die gebildeten Metaboliten untersucht wurde. Der Gesamtstoffwechsel (Summe aller Metaboliten) nach Inkubation mit P8-D6, P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid (ohne Identifizierung der Metaboliten) ist dargestellt (G). Für OvCar8-Überstände wurden die resultierenden Metaboliten nach Inkubation mit P8-D6, P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid identifiziert und quantifiziert (H). Daten sind Mittelwerte + SEM (n = 3) oneway-ANOVA; **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Biologische Tumorstrukturen werden in 3D-Sphäroidmodellen realistischer dargestellt als in 2D-Monolayermodellen. Um die Wirksamkeit weiter zu bewerten, wurde zusätzlich die Viabilität, Caspase und Zytotoxizität in OvCar8-Sphäroiden nach der Behandlung analysiert. Die CellTox™ Green-Färbung zeigte einen deutlichen Anstieg der Zelltoxizität durch die Behandlung mit P8-D6 (IC₅₀ 1,11 μM), P8-D6 Mono (IC₅₀ 2,22 μM) und P8-D6 N-Oxid (IC₅₀ 0,31 μM) (Abb. 11A, B). P8-D6 Mono erwies sich als starker Apoptose-Induktor in 3D-Sphäroiden und erreichte einen IC₅₀-Wert von 0,24 μM (Abb. 11 C,D). Weitere Zytotoxizitätsstudien umfassten

Färbungen mit Calcein AM/Propidiumiodid, die erneut eine deutlich effektivere Zytotoxizität der Zielzellen und Veränderungen der Membranintegrität in den mit P8-D6 und P8-D6 Mono behandelten Sphäroiden zeigten (Abb. 11 E).

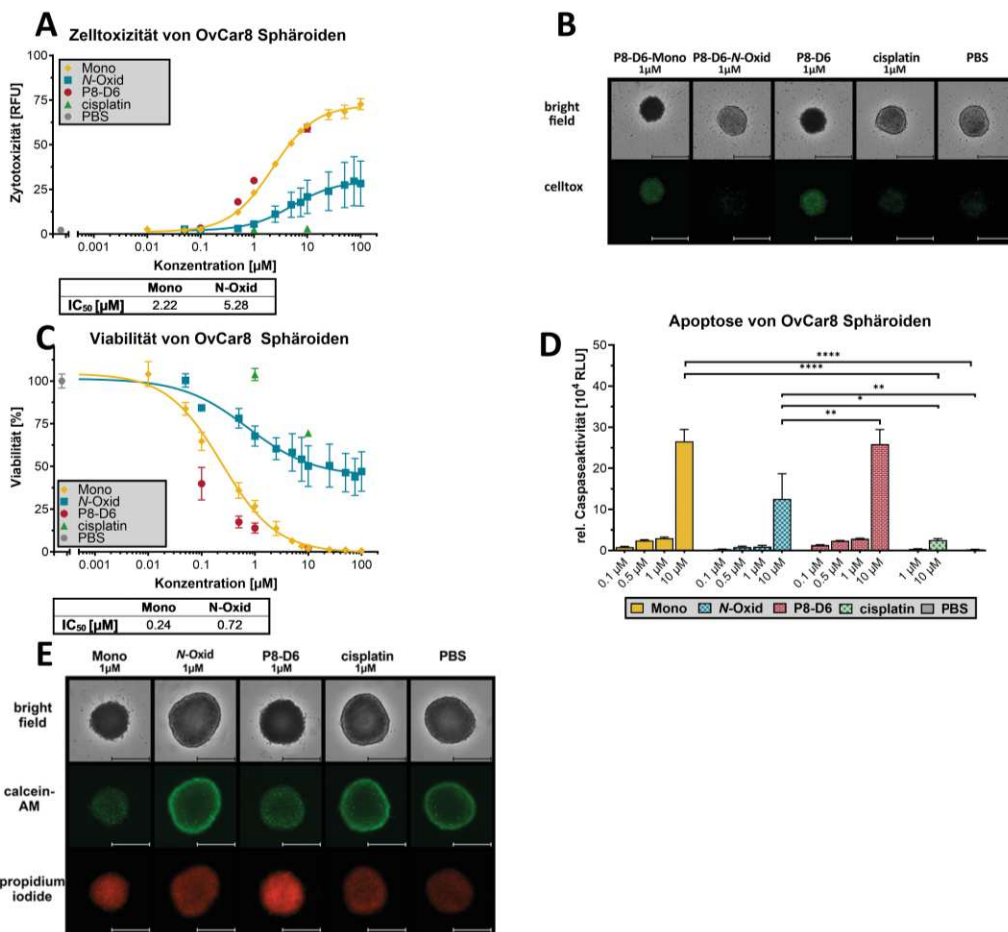


Abb. 11: Antitumorwirkung von P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid in 3D-Sphäroiden. OvCar8 wurden mit P8-D6 Mono, P8-D6 N-Oxid, P8-D6, Cisplatin und PBS behandelt. Während der Behandlung wurde die Zelltoxizität mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung von CellTox™ Green gemessen (A, B). Maßstab 500 µm. Die Fluoreszenzsignale für 48 h Behandlung wurden quantifiziert und in einer IC₅₀-Kurve (A) dargestellt. Nach 48h Behandlung wurden die Viabilität (C) und die Caspase-Aktivität (D) gemessen. Der IC₅₀-Wert von P8-D6 Mono, P8-D6 N-Oxid wurde anhand der Viabilität (C) berechnet. OvCar8-Sphäroide wurden nach Behandlung mit PI (rot), Calcein-AM (grün) angefärbt und mikroskopisch vermessen. Maßstab 500 µm. Daten sind Mittelwerte ± SEM (n = 3) oneway-ANOVA; **p < 0,01, ****p < 0,0001.

CYP-Inhibition

Ableitend von den FDA Guidance for Industry „*In Vitro* Drug Interaction Studies“ wurde das Interaktionspotential von P8-D6 mit den CYP-Isoenzymen 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 anhand von CYP-Referenzsubstraten *in vitro* untersucht. [17] Die Inkubation erfolgte mit rekombinanten CYP und humanen Lebermikrosomen zum Vergleich.

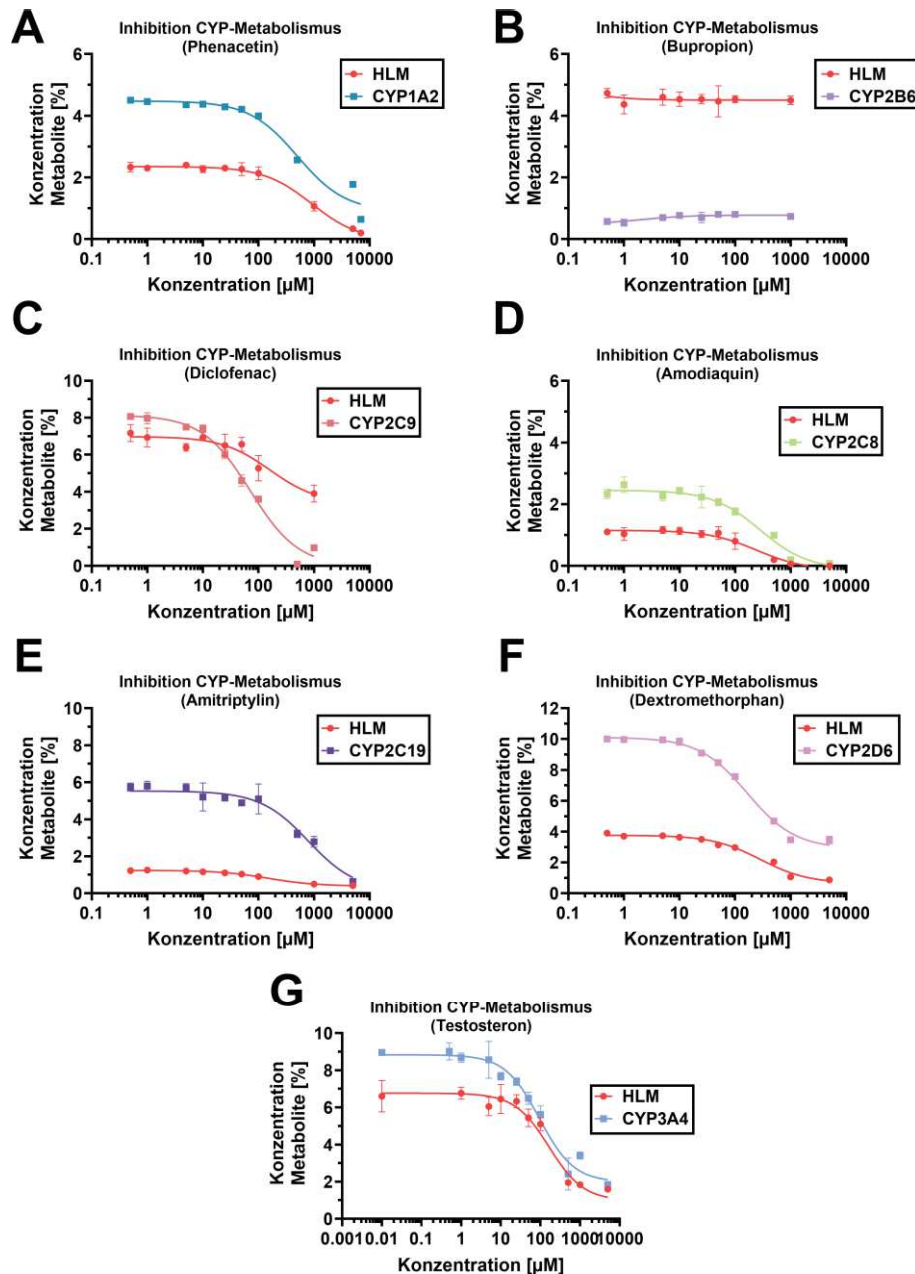


Abb. 12: CYP-Inhibition. Beobachtete Inhibition verschiedener CYP-Markerreaktionen durch P8-D6. Die untersuchten CYP-Isoenzyme umfassen 1A2 (A), 2B6 (B), 2C9 (C), 2C8 (D), 2C19 (E), 2D6 (F) und 3A4 (G).

Der stärkste Einfluss auf die CYP-Aktivität wurde für CYP 3A4 und 2C9 sowohl für HLM als auch für rekombinantes CYP sowie für 2C19 (HLM) und 2D6 (rekombinantes Enzym) beobachtet (Abb. 12, Tabelle 2). Da der HLM eine geringere CYP-Konzentration als das entsprechende rekombinante Enzym aufwies, waren die Umwandlungsraten niedriger. Da jedoch einige Umsetzungen von mehreren Enzymen katalysiert wurden, stiegen die Umsetzungsraten in HLM (z. B. Bu-Propion und Diclofenac). Bei CYP2B6 war keine Inhibition durch P8-D6 feststellbar. Allgemein liegen die IC_{50} Werte allerdings nicht in einem klinisch relevanten Bereich.

Tabelle 2: IC_{50} -Werte der CYP-Inhibition durch P8-D6

	HLM (IC_{50} in μ M)	CYP-Isoenzym (IC_{50} in μ M)
Phenacetin (CYP1A2)	912,5	503,1
Bupropion (CYP2B6)	Keine Inhibition	Keine Inhibition
Amodiaquin (CYP2C8)	245,5	282,1
Diclofenac (CYP2C9)	162,1	71,44
Amitriptylin (CYP2C19)	148,7	792,8
Dextromethorphan (CYP2D6)	285,0	166,1
Testosteron (CYP3A4)	164,8	94,03

Neben der Testung auf eine CYP-Inhibition schreibt die FDA Guidance for Industry „*In Vitro* Drug Interaction Studies“ während der Arzneistoffentwicklung auch ein Interaktionsscreening mit Transporterproteinen vor. [17] Eine mögliche Inhibition der beiden Efflux-Transporter P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1) und „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP, ABCG2) durch P8-D6 wurde jeweils mit humanen P-gp- überexprimierenden MDCK- oder BCRP-überexprimierenden MDCK II-Zellen nach der Methode von Bauer et al. untersucht. [53] Bei diesem Assay erfolgt die Bestimmung der intrazellulären Konzentration des fluoreszierenden Calceins, welches als Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) appliziert wird und intrazellulär durch Esterasen gespalten wird. Da nur Calcein-AM ein Substrat von P-gp und BCRP darstellt, steigt das Fluoreszenz-Signal durch Calcein bei einer Inhibition der Transporter. Als Positivkontrolle diente dabei KO143.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, weist P8-D6 somit einen inhibitorischen Effekt auf beide Transportproteine auf. Dabei wurden für P8-D6 eine IC_{50} von 16,32 μ M für BCRP und 20,63 μ M für P-gp ermittelt und war damit um den Faktor 5 – 8 größer als bei der Positivkontrolle KO143.

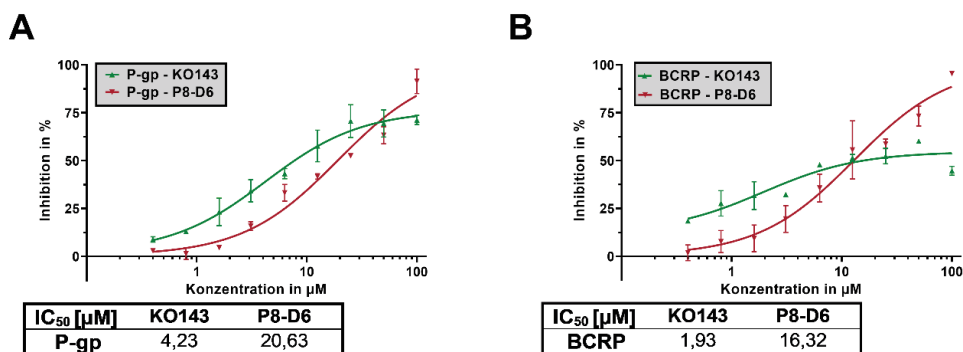


Abb. 13: Transporter-inhibition (A) Inhibition von P-gp. (B) Inhibition von BCRP. KO143 diente als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Pharmakokinetik: Bioverfügbarkeit (AP3):

Weiteres Ziel war es die *in vivo* pharmakokinetische Parameter zur Bioverfügbarkeit, Distribution und Elimination von P8-D6 sowie der Identifizierung der Phase I- und Phase II-Metaboliten nach oraler und intravenöser Gabe zu bestimmen. Nach der Methodenentwicklungsphase (AP3.1, AP3.2), wurde Sprague-Dawley Ratten sterile P8-D6-Lösung entweder oral oder intravenös appliziert.

In vivo Bioverfügbarkeit (AP3.3, AP3.4, AP3.6)

Um die Auswirkung der P8-D6-Plasmaproteinbindung auf die *in vivo* Bioverfügbarkeit zu untersuchen, wurde humanes und Rattenplasma *in vitro* mit P8-D6 inkubiert und analysiert. Durch Ultrafiltration zur Abtrennung des freien P8-D6 von der proteingebundenen Fraktion wurde eine Plasmaproteinbindung von 99 % geschätzt (Abb. 14A). Keine signifikante Plasmaproteinbindung konnte hingegen an (Rinderserum-)Albumin und humanem α 1-saurem Glycoprotein (A1G) festgestellt werden (Abb. 14A).

Zur Bestimmung der absoluten oralen Bioverfügbarkeit wurde P8-D6 *in vivo* männlichen Sprague-Dawley-Ratten per oral (50 mg/kg Körpergewicht) und i.v. (10 mg/kg Körpergewicht) verabreicht (AP3.3). Obwohl die applizierten Dosen die maximal tolerierte Dosis im Mausmodell von 5 mg/kg Körpergewicht deutlich überstiegen, waren keine Anzeichen für Toxizität, wie Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit oder Lethargie, feststellbar. [3] Während des Versuchs erfolgten Blutentnahmen (intravenös: 5, 15, 30, 60, 120, 180, 300, 360, 600 min/per oral: 30, 60, 90, 120, 240, 600 min) zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit. Durch HPLC wurden die freien Plasmakonzentrationen von P8-D6 und möglicher Metaboliten bestimmt. Außerdem wurden Urin- und Kotproben gesammelt und ebenfalls analysiert. Zudem erfolgte bei Versuchsende (24 h) die Entnahme von Leber, Lunge, Niere, Milz und Colon, um diese auf eine mögliche Akkumulierung von P8-D6 und der Metaboliten sowie einer möglicher Toxizität zu untersuchen (Abb. 14E). Die Plasmakonzentrations-Zeit-Profile und pharmakokinetischen Parameter von P8-D6 nach per oraler und intravenöser Verabreichung sind in Abb. 14B und Tabelle 3 dargestellt.

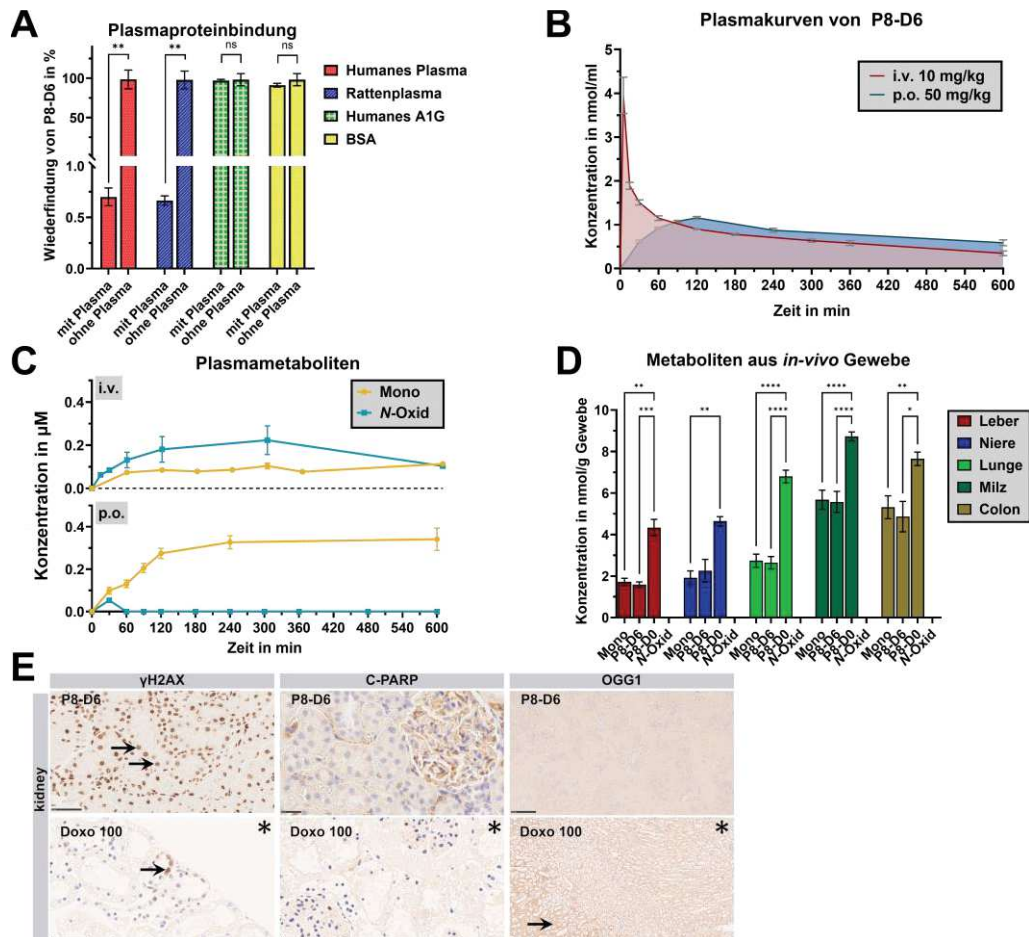


Abb. 14: Abschätzung der P8-D6-Plasmaproteinbindung als Wiederfindung von P8-D6 (in %) nach Inkubation mit und ohne Human- und Rattenplasma (A). *in vivo* Plasmakurven von P8-D6 nach per oraler und intravenöser Verabreichung (n = 6 Ratten) (B). Nachweis der P8-D6 *in vivo* Metaboliten P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid im Plasma nach per oral- und intravenös-Verabreichung (C). Nachweis von P8-D6 und seinen Metaboliten im Gewebe nach dem *in vivo* Versuch (D). Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM bei oneway-ANOVA; **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Nach intravenöser Injektion wurde die anfängliche P8-D6-Plasmakonzentration $c_{\max/\text{intravenös}}$ (3,95 μM) nach 5 min gemessen, die während der Verteilungsphase innerhalb der ersten Stunde rasch abnahm, bevor sie in der terminalen Eliminationsphase einen $c_{\min/\text{intravenös}}$ von 0,35 μM erreichte. Nach per oral-Verabreichung und einer anfänglichen Resorptionsphase wurde ein $c_{\max/\text{per oral}}$ von 1,16 μM nach 120 min (t_{\max}) beobachtet. Danach dominierte die Eliminationsphase und die Plasmakonzentration ab, bis sie ihren $c_{\min/\text{per oral}}$ bei 0,59 μM erreichte. Für P8-D6 wurde eine absolute orale Bioverfügbarkeit von 21,5 % ermittelt.

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter von P8-D6 nach oraler oder intravenöser Applikation an Sprague-Dawley-Ratten

	P8-D6	
	intravenös	per oral
Applikationsart	intravenös	per oral
Dosis (mg/kg BW)	10.0	50.0
AUC _{0-10h} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)	449.3	481.7
Bioverfügbarkeit (%)	100 %	21.5 %
C_{\max} (μM)	3.95 \pm 0.42	1.16 (measured) 1.25 (calculated)
C_{\min} (μM)	0.35 \pm 0.05	0.59 \pm 0.06
t_{\max} (min)	0 (at injection)	120 (measured) 105.9 (calculated)
macro rate constants (min^{-1})	$\alpha = 0.073$ $\beta = 0.002$	$k_e = 0.0013$ $k_a = 0.031$
initial $t_{1/2}$ (min)	9.50	--
terminal $t_{1/2}$ (min)	347.05	518.3
V_d	2.06 l (9.36 l/kg)	2.96 l (13.46 l/kg)
V_c	0.89 l (4.06 l/kg)	--
V_{ss}	2.95 l (13.42 l/kg)	--
CL (l/h)	0.38 (6.34 ml/min)	0.24 (3.96 ml/min)

Für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter und die Beschreibung der Plasmakurven wurden Kompartimentmodelle verwendet. Ausgehend von der intravenösen Verabreichung wurde ein Zwei-Kompartiment-Pharmakokinetikmodell gewählt. Mit dieser Methode wurde eine fiktive initiale P8-D6-Plasmakonzentration $c_{0/intravenös}$ von 4,43 μM zum Zeitpunkt der Injektion berechnet (A (3,27 μM) + B (1,16 μM)). Diese fiktive Plasmakonzentration entspricht $\sim 1\%$ (3,95 μmol in 8,8 ml) der theoretischen Plasmakonzentration und entspricht der Plasmaproteinbindung von P8-D6 von etwa 99 % (Abb. 14 A). Ausgehend von der Dosis und c_0 wurde eine zentrale V_c von 0,891 l berechnet. Da die Makroratenkonstante für die Verteilung wesentlich größer ist (37-fach) als die für die Eliminierung, ist die Eliminierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt gemäß einer Kinetik erster Ordnung.

Um den sich überlappenden Kurven von Resorption und Elimination nach per oral-Verabreichung gerecht zu werden, werden Kompartimentmodelle verwendet. So wurde eine Plasmahalbwertszeit von 518,3 min berechnet. Es wurde zudem eine fiktive initiale Plasmakonzentration $c_{0/per\ oral}$ von 2,21 μM berechnet.

In vivo Verteilung (AP3.5, AP3.7)

Ein weiterer Teil dieser *in vivo* Studie bestand darin, *in vivo* Metaboliten zu identifizieren und die Gewebeverteilung von P8-D6 zu bestimmen. Unter den Plasmametaboliten wurde kein P8-D0 nachgewiesen. Nach per oral-Verabreichung von P8-D6 wurde P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid entdeckt (Abb. 14C). Im Gewebematerial wurde überhaupt kein P8-D6-N-Oxid festgestellt, während P8-D0 mit etwa 50 % des Gesamtanteils aller Derivate das wichtigste Gewebederivat war (Abb. 14D). Das Ausmaß des Metabolismus war bis zu einem gewissen Grad organabhängig (Milz > Dickdarm > Lunge > Niere > Leber).

In vivo Elimination (AP3.7)

Um die Ausscheidung von P8-D6 und seinen Phase-I- und Phase-II-Metaboliten zu untersuchen, wurden Urin- und Stuhlproben über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt und untersucht. Phase-II-Metaboliten wie Sulfate und Glucuronide sind hochgradig hydrophil und polar und daher aufgrund ihrer schnellen Elution schwer direkt mittels HPLC zu analysieren. Daher wurde zur Untersuchung möglicher *in vivo* Phase-II-Metaboliten eine enzymatische Hydrolyse mit Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix pomatia* sowohl mit Urin- als auch mit Kotproben durchgeführt. Beim Vergleich der P8-D6-Wiederfindung vor und nach der Inkubation wurde sowohl im Urin (+ 15,47 % P8-D6 nach der Inkubation) als auch in den Fäzes (+ 41,57 % P8-D6) ein P8-D6-Glucuronid identifiziert (Abb. 15C,D). Es wurden keine Sulfatphase-II-Metaboliten beobachtet. Die Ergebnisse der kumulierten Ausscheidung über den Urin und die Fäzes sind in Abb. 15A und B dargestellt. Von den bekannten Phase-I-Metaboliten wurden nur P8-D6 Mono und P8-D6 N-Oxid beobachtet, während P8-D0 nicht vorhanden war.

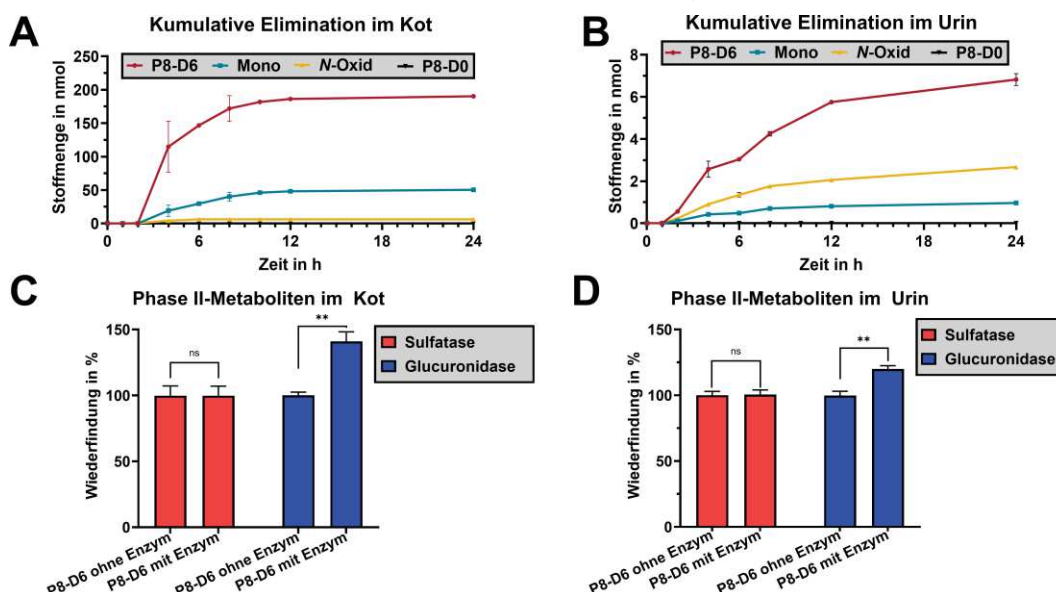


Abb. 15: Kumulative Ausscheidung von P8-D6 (als Summe von P8-D6 und seinem Glucuronid) und seinen Phase-I-Metaboliten über die Fäzes (A) und den Urin (B) über 24 h. Nachweis von Phase-II-Metaboliten in den Fäzes (C) und im Urin (D). Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM bei oneway ANOVA; ** $p < 0,01$ ns nicht signifikant.

Physikochemische Eigenschaften von P8-D6 (AP4)

Lagerstabilität (AP4.1)

Zur offiziellen Ermittlung der Lagerstabilität von P8-D6 wurde eine industriebasierte Stabilitätsprüfung gemäß ICH Q1A (Industrienorm) des Feststoffs durchgeführt. Die Prüfung erfolgt sowohl unter beschleunigten Studien-Bedingungen, Routinebedingungen als Langzeittestung und unter Lagerung im Kühlschrank. Erste Ergebnisse zeigen bislang eine geringe Adsorption von Wasser und eine hohe Reinheit bei Kühlschranklagerung. Eine Zersetzung des Wirkstoffs ist somit nicht zu erkennen.

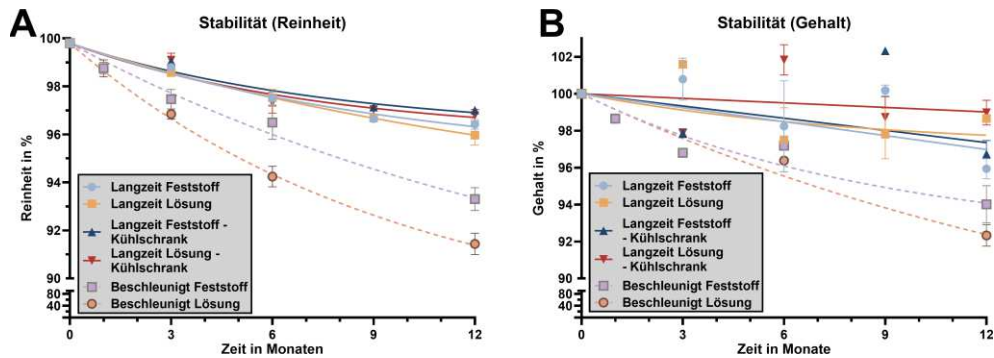


Abb. 16: Stabilitätsprüfung bei Lagerung. P8-D6 wurde auf dessen Lagerstabilität geprüft, indem bei unterschiedlichen Lagerbedingungen die Reinheit und der Wirkstoffgehalt gemessen wurde. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD

Verbesserung der Galenik (AP4.1)

Eine Lösung zur Verbesserung der Therapie maligner Erkrankungen ist der gezielte Transport und die lokale Freisetzung der Wirkstoffe, um therapielimitierende unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei gleichbleibender Wirksamkeit zu reduzieren. Moderne Prodrug oder Deliverysysteme können beispielsweise hochaktive Wirkstoffe, wie P8-D6, zielgerichtet zu ihrem Wirkort transportieren, die Pharmakokinetik im Blut verbessern und mögliche Nebenwirkungen zu verringern. Im Rahmen dieser galenischen Untersuchung wurden Überlegungen durchgeführt durch Optimierung die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von P8-D6 weiter zu verbessern.

Eine weitere Alternative in der Tumorbehandlung stellt die Kombinationstherapie mit etablierten Wirkstoffen, wie dem PARP-Inhibitor Olaparib, dar. Durch die geeignete Auswahl des Wirkmechanismus können Synergien erzeugt werden. So sind seit 2019 PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inhibitoren zur Behandlung des rezidivierten Ovarialkarzinom zugelassen Ovarialkarzinom zugelassen und dienen der Erhaltungstherapie. PARP-Enzyme sind an der Reparatur von Topoisomerase-Giften bedingter DNA-Schäden beteiligt, sodass eine Inhibition zur Verstärkung der antitumoralen Wirkung führen kann. Unsere Untersuchungen konnten nachweisen, dass eine Kombination mit P8-D6 zur Akkumulation von DNA-Schäden und zu einer Sensibilisierung der Krebszellen für PARP-Inhibitoren führt.

Veröffentlichungen (AP4.2)

Im Bereich der wissenschaftlichen Verwertung ist geplant, die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse in Fachjournals sowie in Form von Fachbeiträgen auf nationalen und internationalen Tagungen zu veröffentlichen. Eine Publikation zur Kombinationstherapie von P8-D6 mit PARP-Inhibitoren wurde bereits veröffentlicht (DOI: 10.3390/ijms231810503). Eine Publikation zur Pharmakokinetik von P8-D6 und der Untersuchung der Wirksamkeit der Metabolite ist eingereicht. Für eine Publikation der *in vivo* Wirksamkeit von P8-D6 sind weitere Versuche notwendig und in Planung. Nach Abschluss dieser Versuche wird auch hier eine Publikation angestrebt. Außerdem dient diese Forschung der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses (medizinische und naturwissenschaftliche Promotion, Habilitation). Deshalb werden diese Forschungsergebnisse in detaillierter Form Einzug in die Dissertationsarbeiten der Doktoranden nehmen.

- Hildebrandt, J.; Bauerschlag, D.O.; Fricker, G.; Girreser, U.; Konukiewitz, B; Keller, F.; Maass, N.; Clement, B.; Flörkemeier, I.; *In vivo* and *in vitro* pharmacokinetic studies of the novel dual topoi-somerase I/II inhibitor P8-D6; 2024 Manuskript eingereicht.

Arbeitsplan

AP	Titel	AP	Titel Unter-AP	Ziele
AP 0	Allgemein	AP0.1	Synthese von P8-D6	200 mg
		AP0.2	Charakterisierung Identität	Bestätigung der Identität
		AP0.3	Charakterisierung Reinheit	Bestätigung der Reinheit 97%
AP	Titel	AP	Titel Unter-AP	Ziele
AP 1	in vivo Maus-versuch	AP 1.1.1	<i>In vitro</i> Wirksamkeit in ID8 und BR5	Signifikant höhere Wirksamkeit von P8-D6 versus Kontrollen
		AP 1.1.2	Stabile Transfektion der ID8 luc Zellen	Generierung von ID8 Luziferase aktiven Zellen
		AP 1.2/1.3	Tierversuchsantrag Behörde	Genehmigung des TV-Antrag
		AP1.2	Etablierung des Tierversuchs	Ermittlung der geeigneten Zellzahl und den optimalen, initialen Behandlungszeitpunkt für die Behandlungsstudie bei min. 90% der Tiere wächst der Tumor an/ detektierbarer Tumor Charakterisierung des Tumorwachstum von ID8 luc in C57BL/6 albino Mäusen, Etablierung der immunhistologischen Untersuchung mit geeignetem Material, Genehmigung der Behandlungsstudie durch Behörde
		AP 1.3	Wirksamkeits- und Toxizitätstestungen in einem <i>in vivo</i> Modell	Anwachsen des Tumors in > 80 % der Tiere am 1. Messtag via BL/UL 10 Tage Lebenszeitverlängerung vs. PBS Tumorreduktion > 15% vs. PBS, gleichwertige Wirksamkeit vs. Topotecan Gewichtsreduktion < 20% keine starken Gewebsveränderungen, kein Verlust des soliden Allgemeinzustands an > 10% der P8-D6 Mäuse. Detektion von Gewebsveränderungen
		AP1.4	Immunhistologie Antikörperfärbung der Gewebe, Tumore	Detektion von möglichen toxischen Gewebs-, Tumorveränderungen durch Behandlung
AP	Titel	AP	Titel Unter-AP	Ziele
AP 2	Metabolismustudie	AP2	Bestimmung der Metabolite	Metabolisierungsschemas von P8-D6
		AP2.1	Beschaffung der Enzymquellen	
		AP2.2	Methodenetablierung Inkubationsstudie	validierte Methode
		AP2.3	Etablierung der Vermessungsmethode	Detektion aller Metabolite validiert (Nachweisgr.: dreifache S/N; Bestimmungsgr.: zehnfache S/N; Kalibrierung (0,1 - 500 µM); mittleren Richtigkeit (90 - 110 %)
		AP2.4	Biotransformation von P8-D6	Reaktion der Enzyme mit P8-D6 zu Metaboliten
		AP2.5	Detektion der Metabolite	Qualitative u. quantitative Charakterisierung der Metabolite
		AP2.6	Synthese der Haupt-Metabolite	Synthese von je 15 mg der postulierten Metabolite
		AP2.7	<i>in vitro</i> Charakterisierung der Wirksamkeit/Toxizität der Metabolite	Testung der Wirksamkeit der Metabolite an drei Krebszelllinien
AP	Titel	AP	Titel Unter-AP	Ziele
AP 3	Bioverfügbarkeitsstudien	AP3	Bioverfügbarkeit im <i>in vivo</i> Rattenversuch	Plasmakonzentration, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion von P8-D6
		AP3.1	Methodenentwicklung Plasmakonz.	validiert (Nachweisgr.: dreifache S/N; Bestimmungsgr.: zehnfache S/N; Kalibrierung (0,1 - 100 µM), mittleren Richtigkeit (90 - 110 %)
		AP3.2	Methodenentwicklung Organhomogenate	Validierung der Homogenisierungs- und Aufreinigungsmethode
		AP3.3	<i>in vivo</i> Studie Ratte orale u. intravenöse Applikation von P8-D6	Informationen zu Plasmakonzentration, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion von P8-D6 (AP3.4 u. AP3.5)
		AP3.4	Detektion der Substratkonz. Serum	Probengröße: ≥90 % Tiere intravenös max ~ 40 µg/ml – abnehmend/ Zeit per oral max ~5 µg/ml - ansteigend → fallend /Zeit
		AP3.5	Verteilung von P8-D6 in die Organe/ Fäzes /Urin	min 80% der Tiere steuern Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit bei ~ nmol·mg Protein ⁻¹ ·min ⁻¹ Bereich
		AP3.6	Immunhistologie der Organe (Toxizitäten)	Detektion möglicher Toxizität; ≥ 50% der Tiere
		AP3.7	Analytik der Rattenorgane auf Metabolite	Detektion möglicher Metabolite, ≥30 % der Tiere (Leberhomog.)
AP	Titel	AP	Titel Unter-AP	Ziele
AP 4	Finalisierung	AP4		
		AP4.1	Galenische Untersuchungen	Verbesserung die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik
		AP4.2	Publikation	
		AP4.3	Abschlussbericht	

*Die Arbeitspakete sind mit den zugehörigen Ergebnissen im Text verknüpft.

wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel

- 1 Post-Doc Stelle/Projektleitung (E 13) für 36 Monate (AG Bauerschlag)
- 1 Doktorandenstelle (E13/50%) für 31 Monate (AG Clement)
- 1 Tierarzt (E13/50%) für 12 Monate (AG Bauerschlag)
- 1 Doktorandenstelle (E18/50%) für 13 Monate (AG Bauerschlag)
- 1 TA-Stelle (E9/62%) für 36 Monate (AG Bauerschlag)
- 1 TA-Stelle (E8/62%) für 26 Monate (AG Bauerschlag)
- 1 TA-Stelle (E9) für 18 Monate (AG Clement)

Sachmittel

Verbrauchsmittel (F0838)	Ausgaben [€]	Bewilligt [€]
Synthese	16.912,46	26.500
Pharmakokinetik	17.046,27	15.700
Zellkulturen (<i>in vitro</i> und Vorbereitung für <i>in vivo</i>)	52.457,60	35.000
Galenik	907,84	5.000
Tierversuche	12.121,19	21.820
Gesamt	99.445,36	104.020,00 €
Publikations- u. Reisekosten (F0846) (F0843)	Ausgaben [€]	Bewilligt [€]
Reisemittel/Fortbildung (F0846)	512,00	2000
Publikationsmittel (F0843)	2.057,15	5500
Geräte (F0850) (F0831)	Ausgaben [€]	Bewilligt [€]
Pipetten	3.456,81	3.339,44
Flash-Chromatographie	42.476,07	--- Umwidmung
HPLC-Anlage	67.473,00	67.456,34

Notwendigkeit, Angemessenheit und Nutzen des Forschungsvorhabens

Im Jahr 2022 lag die weltweite Inzidenz für Eierstockkrebs bei 325.000 Neuerkrankungen pro Jahr, eine Zahl, die bis 2045 auf 477.000 Neuerkrankungen ansteigen könnte [1]. Derzeit Überleben nur fünf von zehn Patientinnen mit Eierstockkrebs die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung. Diese weiterhin ungünstige Prognose für Patientinnen mit Eierstockkrebs erfordert dringend die Entwicklung neuer Therapieoptionen.

Durch die im Rahmen dieses Forschungsprojekts gewonnenen Erkenntnisse und durch den einzigartigen Wirkmechanismus besitzt der in Kiel entwickelte duale Topoisomerase-Inhibitor "P8-D6" weiterhin großes Potential, um ein erfolgreicher Arzneistoff für die Therapie des Eierstockkrebs zu werden. Die Ergebnisse zeigen, dass P8-D6 signifikant höhere Apoptoseraten in Tumorzellen induziert, indem P8-D6 den Enzym-DNA-Komplex beider Topoisomerasen (I/II) kovalent stabilisiert. Für P8-D6 konnte eine beeindruckende antitumorale Wirkung bei geringem Effekt auf gesunde Zellen *in vitro*, *ex vivo* (Zellkultur) und in ersten *in vivo* (Tiermodell) Studien nachgewiesen werden (Pharmakodynamik- und Toxizität-Studien). Zudem liegen mithilfe dieses Forschungsprojekts umfassende Daten zur Pharmakokinetik (*in vitro* und *in vivo*) vor. Momentan ist kein dualer Topoisomerase-Inhibitor in der Krebstherapie oder für andere Indikationen etabliert, obwohl diese Wirkmechanismus-Klasse ein hohes Potential in der Onkologie besitzt, was P8-D6 ein Alleinstellung („first in class“) gegenüber dem Stand der Technik beschert und die Verwertungschancen deutlich erhöht. Zudem zeichnet sich der Wirkstoff durch eine einfache Synthese und außerordentlich gute Löslichkeits- sowie Stabilitätseigenschaften aus.

Unser Vorhabenvorhaben konnte das therapeutische Potential von P8-D6 auf präklinischer (Investigational New Drug, IND) Ebene weiter analysiert („proof of principle“), um ferner durch weitere Optimierungen mit P8-D6 einen nachhaltigen Nutzen in der Therapie des Eierstockkrebses zu erzielen. Mithilfe dieses Vorhabens konnte das „target product profile“ (TPP) konkretisiert und die „IND application“ weiter vorbereitet werden. Hierbei sind präklinische *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik wesentliche Elemente. Während der gesamten Versuchsplanung wurde deshalb auf Einhaltung von FDA-Richtlinien geachtet. Dieses Forschungsvorhaben konnte somit Grundlagen schaffen, um zukünftig unter Einbeziehung von Optimierungen den Wirkstoff P8-D6 auf früher klinischer Ebene zu untersuchen.

Zwar ist aus diesem Forschungsvorhaben kein direkt marktfähiges Produkt hervorgegangen, allerdings sind die gewonnenen Erkenntnisse wertvoll, um die präklinische und frühe klinische Entwicklung von P8-D6 weiter voranzubringen und mithilfe von Optimierungen ein marktfähiges Produkt zu entwickeln. Des Weiteren konnte

im Rahmen dieser Arbeit mit P8-D6 Mono ein weiterer für die Tumorthherapie hochaktiver Wirkstoff identifiziert und charakterisiert werden. Ziel ist es nun auch diesen Wirkstoff als Arzneistoffkandidaten näher zu untersuchen. Weitere Ziele, die aus dieser Forschungsarbeit hervorgehen, sind (i) die weitere Optimierung von P8-D6 in Form von modernen Prodrug- oder Deliverysysteme-Konzepten, (ii) konfirmatorische präklinische *in vivo* Studien („proof of principle“), (iii) die Etablierung der GMP-konforme Herstellung des Wirkstoffs unter Einhaltung regulatorischer Anforderungen (z.B. EMA, FDA). Die Prozesse zur Genehmigung klinischer Studien erfordert eine große Expertise auf dem Gebiet der regulatorischen und behördlichen Anforderungen. Daher sind Beratungsgespräche mit der BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) und der EMA (European Medicines Agency) geplant. Zudem eröffnen die beschriebenen Ziele zusätzlich Möglichkeiten für Kooperationen und weitere Drittmittelprojekten, die in Form von Anträgen bei universitären Trägern, Stiftungen und Forschungsgemeinschaften eingereicht werden sollen.

Auf der Ebene der IP (Intellectual Property) Verwertung ergeben sich aus den bereits bestehenden Patenten unterschiedliche Optionen: i) Lizenzvergabe, ii) Ausgründung (Spin-off). Weiteres Ziel ist es, die geeignetste Form der Verwertung herauszuarbeiten und die vielversprechendste Verwertungsstrategien für P8-D6 weiterzuverfolgen. Da die erforderlichen klinischen Studien hohe Investitionen mit hohem Risiko vereinen, ist es wichtig in dieser Phase der Arzneistoffentwicklung geeigneten Partner zu finden. Kontakte bestehen hierfür bereits zu einigen Pharmaunternehmen und weitere Vernetzungen sind geplant. Außerdem bieten Stiftungen und Forschungsgemeinschaften explizite Förderlinien für präklinische und frühe klinische Studien an, mittels derer der Wirkstoff ggf. noch im universitären Umfeld in die frühe klinische Entwicklung gebracht und nachfolgend über eine Ausgründung verpartnert werden könnte.

Fortschritte auf dem Gebiet der Arzneistoffentwicklung für die Eierstockkrebstherapie

Durch das wirtschaftliche Potential und die ausweglose Situation der Patientinnen ist das Feld der Entwicklung neuer Krebstherapeutika groß. Individualisierte Medizin gewinnt zunehmend an Bedeutung. Die Entwicklung von zielgerichteten Molekülen in der Krebstherapie (targeted therapies), aber auch die zahlreichen Möglichkeiten der genetischen Analyse von Tumorzellen, erlauben es immer spezifischere Therapien zu entwickeln und das Therapieansprechen vorherzusagen. Dennoch zeigen Daten zu klinischen Studien häufig ein Scheitern neuer Therapien. Beispielsweise sprechen Eierstockkrebs-Patientinnen nicht auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren an, und Antikörpertherapien zeigen teilweise schwere Nebenwirkungen. Andererseits gab es in den letzten Jahrzehnten mit dem PARP-Inhibitor Olaparib und dem Antikörper-Drug-Konjugat (ADC) Mirvetuximab-Soravtansine auch zwei Erfolgsgeschichten im Bereich des Eierstockkrebs. In der SORAYA Studie [54] wird derzeit das Antikörper-Drug-Konjugat (ADC) Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853) in Patientinnen mit platinumresistenten Ovarialkarzinom und hoher Folatrezeptor α (FR α) Expression untersucht. Im November 2022 erhielt Mirvetuximab Soravtansine im beschleunigten Zulassungsverfahren die FDA-Zulassung [55]. Doch die derzeit zugelassenen Krebstherapeutika haben ihre Schwächen, u.a. in Form von Resistenzentwicklung und Nebenwirkungen. Kombinationstherapien sind eine interessante Alternative, um den vorgenannten Problemen (Resistenzentwicklung und Nebenwirkungen) zu begegnen. Aus diesem Grund erfolgt unsere Wirkstofftestung sowohl in Monotherapie, wie auch in Kombinationstherapie mit etablierten Wirkstoffen im translationalen Ansatz, um eine Brücke zwischen Forschung und Klinik zu schlagen.

Referenzen

1. Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. Global cancer observatory: cancer today. Available online: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>.
2. Webb, P.M.; Jordan, S.J. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2024**, *21*, 389–400, doi:10.1038/s41571-024-00881-3.
3. Meier, C.; Steinhauer, T.N.; Koczian, F.; Plitzko, B.; Jarolim, K.; Girreser, U.; Braig, S.; Marko, D.; Vollmar, A.M.; Clement, B. A Dual Topoisomerase Inhibitor of Intense Pro-Apoptotic and Antileukemic Nature for Cancer Treatment. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 347–352, doi:10.1002/cmdc.201700026.
4. Aichinger, G.; Lichtenberger, F.B.; Steinhauer, T.N.; Flörkemeier, I.; Del Favero, G.; Clement, B.; Marko, D. The Aza-Analogous Benzo[c]phenanthridine P8-D6 Acts as a Dual Topoisomerase I and II Poison, thus Exhibiting Potent Genotoxic Properties. *Molecules* **2020**, *25*, 1524, doi:10.3390/molecules25071524.
5. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421–433, doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.

6. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren: Langversion 5.0. AWMF-Registernummer: 032/035OL. Available online: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>, (accessed on 8 February 2022).
7. Aronson, J.K. *Side Effects of Drugs Annual 27: Cytostatic drugs*, 1st ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2004, ISBN 9780080474373.
8. Gijn, R. van; Lendfers, R.R.; Schellens, J.H.; Bult, A.; Beijnen, J.H. Dual topoisomerase I/II inhibitors. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* **2000**, *6*, 92–108, doi:10.1177/10781552000600303.
9. Lefevre, D.; Riou, J.-F.; Ahomadegbe, J.C.; Zhou, D.; Benard, J.; Riou, G. Study of molecular markers of resistance to m-AMSA in a human breast cancer cell line: Decrease of topoisomerase II and increase of both topoisomerase I and acidic glutathione S transferase. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 1967–1979, doi:10.1016/0006-2952(91)90138-U.
10. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T.N.; Hedemann, N.; Ölander, M.; Artursson, P.; Clement, B.; Bauerschlag, D.O. Newly developed dual topoisomerase inhibitor P8-D6 is highly active in ovarian cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **2021**, *13*, 175883592110598, doi:10.1177/17588359211059896.
11. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T.N.; Hedemann, N.; Weimer, J.P.; Rogmans, C.; van Mackelenbergh, M.T.; Maass, N.; Clement, B.; Bauerschlag, D.O. High Antitumor Activity of the Dual Topoisomerase Inhibitor P8-D6 in Breast Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 2, doi:10.3390/cancers14010002.
12. Flörkemeier, I.; Hillmann, J.S.; Weimer, J.P.; Hildebrandt, J.; Hedemann, N.; Rogmans, C.; Dempfle, A.; Arnold, N.; Clement, B.; Bauerschlag, D.O. Combined PARP and Dual Topoisomerase Inhibition Potentiates Genome Instability and Cell Death in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms231810503.
13. Moore, K.; Colombo, N.; Scambia, G.; Kim, B.-G.; Oaknin, A.; Friedlander, M.; Lisyanskaya, A.; Floquet, A.; Leary, A.; Sonke, G.S.; et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2495–2505, doi:10.1056/NEJMoa1810858.
14. Chowdhuri, S.P.; Das, B.B. Top1-PARP1 association and beyond: From DNA topology to break repair. *NAR Cancer* **2021**, *3*, zcab003, doi:10.1093/narcan/zcab003.
15. Klausz, K.; Kellner, C.; Gehlert, C.L.; Krohn, S.; Wilcken, H.; Flörkemeier, I.; Günther, A.; Bauerschlag, D.O.; Clement, B.; Gramatzki, M.; et al. The Novel Dual Topoisomerase Inhibitor P8-D6 Shows Anti-myeloma Activity In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Ther* **2022**, *21*, 70–78, doi:10.1158/1535-7163.MCT-21-0119.
16. Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions | Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers> (accessed on 30 November 2023).
17. Food and Drug Administration. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions: Guidance for Industry. Available online: <https://www.fda.gov/media/134582/download> (accessed on 11 October 2023).
18. Europäische Arzneimittel-Agentur. Guideline on the investigation of drug interactions. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf (accessed on 8 February 2024).
19. Binkhathlan, Z.; Lavasanifar, A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 326–346, doi:10.2174/15680096113139990076.
20. Bansal, T.; Jaggi, M.; Khar, R.K.; Talegaonkar, S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2009**, *12*, 46–78, doi:10.18433/J3RC77.
21. Amin, M.L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* **2013**, *7*, 27–34, doi:10.4137/DTI.S12519.
22. Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Macalou, S.; Pérez-Victoria, J.M.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer. Drugs* **2006**, *17*, 239–243, doi:10.1097/00001813-200603000-00001.
23. Mao, Q.; Unadkat, J.D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* **2005**, *7*, E118-33, doi:10.1208/aapsj070112.
24. Nagashima, S.; Soda, H.; Oka, M.; Kitazaki, T.; Shiozawa, K.; Nakamura, Y.; Takemura, M.; Yabuuchi, H.; Fukuda, M.; Tsukamoto, K.; et al. BCRP/ABCG2 levels account for the resistance to topoisomerase I inhibitors and reversal effects by gefitinib in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 594–600, doi:10.1007/s00280-006-0212-y.
25. Wtorek, K.; Długosz, A.; Janecka, A. Drug resistance in topoisomerase-targeting therapy. *Postepy Hig Med Dosw* **2018**, *72*, 1073–1083, doi:10.5604/01.3001.0012.8131.
26. Allen, J.D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J.M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J.H.M.; Koomen, G.-J.; Schinkel, A.H. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 417–425.
27. Nakanishi, T.; Ross, D.D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin. J. Cancer* **2012**, *31*, 73–99, doi:10.5732/cjc.011.10320.
28. Meier, C.; Clement, B. Zur Entwicklung neuer aza-analoger Benzo[c]phenanthridine mit antitumorale Wirkung. Dissertation; Christian-Albrechts-Universität; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, 2014.
29. Negi, S.; Kumar, S.; Singh, A. Preclinical In Vivo Drug Development Studies: Limitations, Model Organisms, and Techniques. In *Drugs and a Methodological Compendium*; Rajput, V.S., Runthala, A., Eds.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2023; pp 149–171, ISBN 978-981-19-7951-4.
30. The Jackson Laboratory. Organ Weight summary: C57BL/6J. Available online: https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjrvYOQuS1AhWRPEDHd3OAVoQFnoECAYQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.jax.org%2Fde%2F-%2Fmedia%2Fjaxweb%2Ffiles%2Fjax-mice-and-services%2Fb6j-data-summary.xlsx&usq=AOvVawOL6aTeCA9BE6GNw1_XnO6i (accessed on 20 January 2022).
31. The Jackson Laboratory. Physiological Data Summary – NOD.CB17-Prkdcscid /J (001303). Available online: http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/physiological_data_001303.pdf (accessed on 20 January 2022).
32. Wilkinson-Ryan, I.; Pham, M.M.; Sergent, P.; Tafe, L.J.; Berwin, B.L. A Syngeneic Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer Port Site Metastases. *Transl. Oncol.* **2019**, *12*, 62–68, doi:10.1016/j.tranon.2018.08.020.

33. Zhu, X.; Xu, J.; Cai, H.; Lang, J. Carboplatin and programmed death-ligand 1 blockade synergistically produce a similar antitumor effect to carboplatin alone in murine ID8 ovarian cancer model. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2018**, *44*, 303–311, doi:10.1111/jog.13521.
34. Padmakumar, S.; Parayath, N.N.; Nair, S.V.; Menon, D.; Amiji, M.M. Enhanced anti-tumor efficacy and safety with metronomic intraperitoneal chemotherapy for metastatic ovarian cancer using biodegradable nanotextile implants. *Journal of controlled release* **2019**, *305*, 29–40, doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.022.
35. Wilson, A.J.; Gupta, V.G.; Liu, Q.; Yull, F.; Crispens, M.A.; Khabele, D. Panobinostat enhances olaparib efficacy by modifying expression of homologous recombination repair and immune transcripts in ovarian cancer. *Neoplasia* **2022**, *24*, 63–75, doi:10.1016/j.neo.2021.12.002.
36. Gujar, S.A.; Clements, D.; Dielschneider, R.; Helson, E.; Marcato, P.; Lee, P.W.K. Gemcitabine enhances the efficacy of reovirus-based oncotherapy through anti-tumour immunological mechanisms. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 83–93, doi:10.1038/bjc.2013.695.
37. Smith, H.J.; McCaw, T.R.; Londono, A.I.; Katre, A.A.; Meza-Perez, S.; Yang, E.S.; Forero, A.; Buchsbaum, D.J.; Randall, T.D.; Straughn, J.J.M.; et al. The antitumor effects of entinostat in ovarian cancer require adaptive immunity. *Cancer* **2018**, *124*, 4657–4666, doi:10.1002/cncr.31761.
38. Wilson, A.J.; Saskowski, J.; Barham, W.; Khabele, D.; Yull, F. Microenvironmental effects limit efficacy of thymoquinone treatment in a mouse model of ovarian cancer. *Mol Cancer* **2015**, *14*, 5, doi:10.1186/s12943-015-0463-5.
39. Wilson, A.J.; Saskowski, J.; Barham, W.; Yull, F.; Khabele, D. Thymoquinone enhances cisplatin-response through direct tumor effects in a syngeneic mouse model of ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* **2015**, *8*, 5, doi:10.1186/s13048-015-0177-8.
40. Liao, J.B.; Ovenell, K.J.; Curtis, E.E.M.; Cecil, D.L.; Koehnlein, M.R.; Rastetter, L.R.; Gad, E.A.; Disis, M.L. Preservation of tumor-host immune interactions with luciferase-tagged imaging in a murine model of ovarian cancer. *J. Immunotherapy Cancer* **2015**, *3*, 1–9, doi:10.1186/s40425-015-0060-6.
41. Chambers, L.M.; Esakov, E.; Braley, C.; AlHilli, M.; Michener, C.; Reizes, O.; Hawkins, S.M. Use of Transabdominal Ultrasound for the detection of intra-peritoneal tumor engraftment and growth in mouse xenografts of epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228511, doi:10.1371/journal.pone.0228511.
42. Arauchi, A.; Yang, C.H.; Cho, S.; Jarboe, E.A.; Peterson, C.M.; Bae, Y.H.; Okano, T.; Janát-Amsbury, M.M. An Immunocompetent, Orthotopic Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer Utilizing Tissue Engineered Tumor Cell Sheets. *Tissue Engineering Part C: Methods* **2015**, *21*, 23–34, doi:10.1089/ten.tec.2014.0040.
43. Kamb, A. What's wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 161–165, doi:10.1038/nrd1635.
44. Freissmuth, M.; Offermanns, S.; Böhm, S. *Pharmakologie und Toxikologie*, 2nd ed.; Springer: Berlin, 2016, ISBN 9783662466889.
45. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*; Herdegen, T.; Böhm, R.; Gohlke, P.; Luippold, G., Eds., 3rd ed.; Thieme: Stuttgart, 2014, ISBN 978-3-13-142293-4.
46. Müller, K.; Prinz, H.; Lehr, M. *Pharmazeutische/Medizinische Chemie: Arzneistoffe - von der Struktur zur Wirkung*, 1. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2022, ISBN 978-3-8047-3925-3.
47. Geisslinger, G.; Menzel, S.; Gudermann, T.; Hinz, B.; Ruth, P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie*, 11., völlig neu bearbeitete Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2020, ISBN 978-3-8047-3663-4.
48. Becker, C. *Klinische Pharmazie: Grundlagen und Anwendung*, 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2017, ISBN 978-3-8047-3223-0.
49. Perlin, E.; Taylor, R.E.; Peck, C. Clinical pharmacokinetics: a simplified approach, Part 1. *J. Natl. Med. Assoc.* **1985**, *77*, 475–482.
50. Indogen. ADME-Tox (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion dan Toxicology). Available online: <https://indogen.id/adme-tox-absorption-distribution-metabolism-excretion-dan-toxicology/> (accessed on 18 March 2024).
51. Spektrum. Pharmakokinetik. Available online: <https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/pharmakokinetik/9774> (accessed on 18 March 2024).
52. Palleria, C.; Di Paolo, A.; Giofrè, C.; Caglioti, C.; Leuzzi, G.; Siniscalchi, A.; Sarro, G. de; Gallelli, L. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J. Res. Med. Sci.* **2013**, *18*, 601–610.
53. Bauer, B.; Miller, D.S.; Fricker, G. Compound profiling for P-glycoprotein at the blood-brain barrier using a microplate screening system. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1170–1176, doi:10.1023/a:1025040712857.
54. Matulonis, U.; Lorusso, D.; Oaknin, A.; Pignata, S.; Denys, H.; Colombo, N.; van Gorp, T.; Konner, J.; Marin, M.R.; Harter, P.; et al. Efficacy and Safety of Mirvetuximab Soravtansine in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer with High Folate Receptor Alpha Expression: Results from the SORAYA Study (LBA 4). *Gynecologic Oncology* **2022**, *166*, S50, doi:10.1016/S0090-8258(22)01297-5.
55. FDA grants accelerated approval to mirvetuximab soravtansine-gynx for FRα positive, platinum-resistant epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *FDA [Online]*, November 14, 2022. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-mirvetuximab-soravtansine-gynx-fra-positive-platinum-resistant> (accessed on 30 June 2023).
56. Straits Research. Ovarian Cancer Market to reach a market size of USD 19.92 Billion by 2030 growing at a CAGR of 23.8%: Straits Research: The global Ovarian Cancer Market was worth USD 1.54 billion in 2021 and is expected to grow at a 23.8% CAGR between 2022 and 2030 and reach around USD 19.92 billion. Available online: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2022/05/30/2452740/0/en/Ovarian-Cancer-Market-to-reach-a-market-size-of-USD-19-92-Billion-by-2030-growing-at-a-CAGR-of-23-8-Straits-Research.html> (accessed on 14 September 2024).
57. Statista. Global cancer drug market 2032 forecast | Statista. Available online: <https://www.statista.com/statistics/1257583/worldwide-cancer-drug-revenues/> (accessed on 15 September 2024).
58. Gemeinsamer Bundesausschuss. Beschluss. Olaparib (Neubewertung nach Fristablauf: Ovarialkarzinom, Eileiterkarzinom oder primäres Peritonealkarzinom; Erhaltungstherapie nach Erstlinientherapie; HRD-positiv; Kombination mit Bevacizumab) 20. April 2023.

Förderkennzeichen

03VP08790

CAU Kiel/UKSH Kiel

Innovativer dualer Topoisomerase-Inhibitor P8-D6 zur Testung im in vivo
Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell

Veröffentlichungen

- Flörkemeier, I.; Hillmann, J.S.; Weimer, J.P.; Hildebrandt, J.; Hedemann, N.; Rogmans, C.; Dempfle, A.; Arnold, N.; Clement, B.; Bauerschlag, D.O. Combined PARP and Dual Topoisomerase Inhibition Potentiates Genome Instability and Cell Death in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, doi:10.3390/ijms231810503.
- Hildebrandt, J.; Bauerschlag, D.O.; Fricker, G.; Girreser, U.; Konukiewitz, B.; Kellers, F.; Maass, N.; Clement, B.; Flörkemeier, I. In Vivo and In Vitro Pharmacokinetic Studies of a Dual Topoisomerase I/II Inhibitor. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2025, doi:10.1021/acsptsci.4c00596.