

Schlussbericht* **zum Forschungsvorhaben (Verbundprojekt)**

„In-vitro-Tests zur Photogenotoxizitätsprüfung als Ersatz von Photokanzerogenitätsstudien an Nagern“

**Der Schlussbericht umfasst die Gesamtergebnisse des Verbundvorhabens aus den Teilprojekten 1 – 4 (Förderkennzeichen 0312916 A/B/C/D) sowie den Projekten der nicht mit Mitteln des BMBF geförderten Kooperationspartner*

Förderkennzeichen: 0312916A

Laufzeit: 01.08.2002 – 30.11.2004

Zuwendungsempfänger: Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn

Projektleiter: Dr. Peter Kasper (Vertreter: Dr. Roland Frötschl)

**weitere Mitarbeiter: Dr. Claudia Elfgang
Fr. Elfi Schütz**

Liste der im Verbund beteiligten Partner:

Dr. Susanne Brendler-Schwaab, Fr. Christine Brauck, Fr. Brita Krämer-Bautz
Bayer HealthCare AG

Prof. Dr. Bernd Epe, Fr. Cynthia Hertel
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Pharmazie

Fr. Krista Meurer
RCC Cytotest Cell Research GmbH

Dr. Elmar Gocke, Dr. Stephan Kirchner
Hoffmann-La Roche Ltd

Dr. Ulla Plappert-Helbig
Novartis Pharma AG

Dr. Pierre Aeby
Cosmital SA (Wella AG Group)

Fr. Elisabeth Schmidt, Dr. Elke Genschow, Dr. Manfred Liebsch
ZEBET, Bundesinstitut für Risikobewertung

INHALT

I. EINLEITUNG	4
I.1. Aufgabenstellung	4
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	5
I.4. Kenntnisstand vor Beginn der Untersuchungen	6
I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	8
II. HAUPTTEIL	8
II.1 Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses.....	8
II.1.1 Vorexperimente zur Protokolletablierung in den beteiligten Labors	8
II.1.1.1 Vorexperimente mit Chlorpromazin und Chlorhexidin	8
II.1.2. Löslichkeit und Rangefinder für kodierte Testsubstanzen der Ringstudie...	9
II.1.2.1. Prüfung der Löslichkeit	9
II.1.2.2. Range-finding (Proliferationsindex) für Mikrokerntest +/-UV	10
II.1.2.3. Range-finding (Viabilität) für Cometassay +/-UV	10
II.1.3. Hauptexperimente zur Prüfung der Photogenotoxizität (Ringstudie)	11
II.1.3.1. Photo-Mikrokerntest.....	11
II.1.3.1.1. 8-Methoxy-psoralen.....	12
II.1.3.1.2. Chlorpromazin	12
II.1.3.1.3. Lomefloxazin	12
II.1.3.1.4. Ciprofloxacin	13
II.1.3.1.5. Methylen Blau	13
II.1.3.1.6. Proflavin	13
II.1.3.1.7. Dacarbazin	13
II.1.3.1.8. Doxycyclin	14
II.1.3.1.9. Promazin	14
II.1.3.1.10. Ketoprofen	14
II.1.3.1.11. Acridin	14
II.1.3.1.12. Octylmethoxycinnamat.....	14
II.1.3.1.13. Titandioxid.....	15
II.1.3.1.14. Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Mikrokerntest.....	15
II.1.3.2. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Mikrokerntest	15
II.1.3.3. Photo-Cometassay	18
II.1.3.3.1. 8-Methoxy-psoralen.....	19
II.1.3.3.2. Chlorpromazin	20
II.1.3.3.3. Lomefloxazin	20
II.1.3.3.4. Ciprofloxacin	20
II.1.3.3.5. Methylen Blau	20
II.1.3.3.6. Proflavin	20

II.1.3.3.7. <i>Dacarbazin</i>	21
II.1.3.3.8. <i>Doxycyclin</i>	21
II.1.3.3.9. <i>Promazin</i>	21
II.1.3.3.10. <i>Ketoprofen</i>	21
II.1.3.3.11. <i>Acridin</i>	21
II.1.3.3.12. <i>Octylmethoxycinnamat</i>	22
II.1.3.3.13. <i>Titandioxid</i>	22
II.1.3.3.14. <i>Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Cometassay</i>	22
II.1.3.4. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Cometassay	22
II.1.3.5. Vergleich der Testmodelle	24
II.1.3.6. Datenerfassung und biometrische Auswertung (Unterauftrag ZEBET)	26
II.1.3.6.1. <i>Erfassung der Daten</i>	26
II.1.3.6.2. <i>Kontrolle der Datenqualität</i>	26
II.1.3.6.3. <i>Berechnung potenzieller Endpunkte</i>	27
II.1.3.6.4. <i>Überprüfung auf Ausreißer und Intra- und Interlaborvergleich</i>	28
II.1.3.6.5. <i>Berechnung von Prädiktionsmodellen</i>	30
II.1.3.6.6. <i>Evaluation der Prädiktionsmodelle</i>	35
II.2. Voraussichtliche Nutzen	36
II.3. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	37
II.4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	37
 <u>Anlagen:</u>	
Anlage 1: Abbildungen 1 - 59	39
Anlage 2: Standard Operation Procedures (SOPs) für Photo-Mikrokerntest und Photo-Cometassay	99

I. EINLEITUNG

I.1. Aufgabenstellung

Stoffe, die unter dem Einfluss von Licht (insbesondere dem UV-Anteil d. Sonnenlichtes) zur Bildung reaktiver Zwischenprodukte photoaktiviert werden, können bei dermalen Exposition DNA-Schädigungen auslösen und somit das Risiko UV-bedingter Hauttumoren erhöhen. Eine Bewertung des photokanzerogenen Potenzials als Teil der Sicherheitsprüfung von bestimmten Arzneiwirkstoffen und Kosmetika ist daher unerlässlich. Gegenwärtig wird die experimentelle Prüfung auf Photokanzerogenität meist in einer mit erheblichen Belastungen für die Tiere verbundenen 1-Jahres-Studie an haarlosen Mäusen durchgeführt. Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, den Mikrokern- und den Cometassay als In-vitro-Photogenotoxizitätstests im Rahmen einer begrenzten Ringstudie als mögliche Alternativen zur Voraussage des photokanzerogenen Potenzials zu prävalidieren, um damit die Voraussetzungen für eine eigentliche Validierung zu schaffen. Die Tests werden an der für Prüfzwecke vielfach genutzten Zelllinie des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) durchgeführt. Als Testsubstanzen für die Ringstudie wurden Stoffe ausgewählt, die bereits in Photogenotoxizitätstests geprüft worden sind, wobei starke und schwache Photomutagene berücksichtigt wurden sowie Substanzen, die nicht photogenotoxisch, aber phototoxisch sind und solche, die UV absorbieren, aber keine phototoxische Aktivität aufweisen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: In der Ringstudie verwendete Testsubstanzen

Nr.	Testsubstanz	UV/Licht- absor- bierend	photo- toxisch	photo- geno- toxisch	photokanzerogen	
					Tier	Mensch
Gruppe 1: Positivsubstanzen (photogenotoxisch)						
1	8-MOP	+	+	+	+	+
2	Chlorpromazin	+	+	+	+	keine Daten
3	Lomefloxazin	+	+	+	+	keine Daten
4	Ciprofloxazin	+	+	+	+	keine Daten
5	Methylen Blau	+	+	+	keine Daten	keine Daten
6	Proflavin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
7	Dacarbazin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
8	Doxycyclin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
Gruppe 2: Negativsubstanzen (nicht-photogenotoxisch)						
2a: phototoxische Substanzen						
9	Promazin	+	+	-	keine Daten	keine Daten
10	Ketoprofen	+	+	-	keine Daten	keine Daten
11	Acridin	+	+	-	keine Daten	keine Daten
2b: nicht-phototoxische, UV-absorbierende Substanzen						
12	Octylmethoxycinnamat (OMC)	+	-	-	-	keine Daten
13	Titandioxid	+	-	-	keine Daten	keine Daten

An der Ringstudie haben sich neben dem BfArM sechs weitere Laboratorien aus dem Bereich der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, Auftragsforschung und Universität beteiligt. Die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) hat als

unabhängige Stelle die Verteilung der kodierten Testsubstanzen sowie die biostatistische Auswertung der Ergebnisse übernommen.

Zusätzlich zur Ringstudie wurden in zwei Teilprojekten (Förderkennzeichen 0312916 B und D) mechanistische Untersuchungen mit ausgewählten Substanzen der Ringstudie durchgeführt. Ziel war es, die Art des verursachten DNA-Schadens mit Hilfe von Reparaturenzymen als Sonden genauer zu charakterisieren und somit die Empfindlichkeit der untersuchten Photogenotoxizitätstests auf verschiedene Arten der DNA-Schädigung zu ermitteln. Desweiteren wurden zusätzliche Untersuchungen zur Phototoxizität im hierfür entwickelten Standardverfahren, dem Neutralrot-Assay, durchgeführt mit dem Ziel, die Kenntnis der Korrelation von Photo-Zytotoxizität und Photo-Genotoxizität zu verbessern. Die Ergebnisse dieser Zusatzuntersuchungen werden ausführlich in den Schlussberichten der beiden Teilprojekte beschrieben.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Wesentliche Vorarbeiten für die Ringstudie wurden in einem Vorläuferprojekt des BfArM und der Bayer AG durchgeführt. Auf diesen Studien basierte die Erstellung der „Standard Operation Procedures“ (SOPs), nach denen der Photo-Mikrokerntest und der Photo-Come-tassay einheitlich von allen Projektpartnern durchgeführt wurden. Eine weitgehende Standardisierung der Testdurchführungen in den verschiedenen Labors Auch die technische Ausrüstung (Bestrahlungsquelle, Messgeräte) sowie die verwendeten Zellkultur- und Laborchemikalien wurden zwecks Standardisierung weitgehend abgeglichen. Die Ergebnisse des Vorläuferprojektes bildeten auch die wesentliche Grundlage für die Auswahl der in der Ringstudie geprüften Testsubstanzen.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde als Verbund unter Beteiligung mehrerer Teilnehmer konzipiert, wobei nicht alle Teilnehmer Fördermittel beantragt hatten (siehe Tabelle 2). Die Zusammenarbeit der finanziell geförderten Partner wurde durch eine Kooperationsvereinbarung geregelt. Für die auf eigene Kosten mitwirkenden Teilnehmer wurde eine rechtsverbindliche Zusicherung über die durchzuführenden Arbeiten abgegeben.

Tabelle 2: Liste der am Vorhaben beteiligten Labors

Arbeitsgruppe	Projektleiter	Förderkennzeichen
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte	Dr. P. Kasper Dr. R. Frötschl	0312916A
Bayer HealthCare AG	Dr. S. Brendler-Schwaab	0312916B
RCC Cytotest Cell Research GmbH	Dr. K. Meurer	0312916C
Institut für Pharmazie Universität Mainz	Prof. Dr. B. Epe	0312916D
F.Hoffmann-La Roche AG	Dr. E. Gocke Dr. S. Kirchner	keine Förderung
Novartis Pharma AG	Dr. U. Plappert-Helbig	keine Förderung
Cosmital SA (Wella AG)	Dr. P. Aeby	keine Förderung
ZEBET d. BfR	Dr. E. Schmidt Dr. M. Liebsch	Unterauftrag in 0312916A