

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

KMU-innovativ-5: Algae Against Cancer (AAC)- Antitumorale Makroalgenextrakte: Spezifizierung von Wirkstoffen und Wirkmechanismen

Förderkennzeichen: 0315812C

Zuwendungsempfänger: CRM - Coastal Research & Management, Tiessenkai 12, 24159 Kiel

Projektleitung: Herr Dr. Piker

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 31.12.2013

Förderkennzeichen: 0315812D

Zuwendungsempfänger: numares AG, Josef-Engert-Str. 9, 93053 Regensburg

Projektleitung: Herr Dr. Huber

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 31.12.2013

Förderkennzeichen: 0315812E

Zuwendungsempfänger: ImaGenes GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

Projektleitung: Frau Genzel

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 31.12.2013

Förderkennzeichen: 0315812F

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

Ausführende Stelle: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Mathematisch-Naturwissenschaftl. Fakultät -
Sektion Pharmazie - Pharmazeutisches Institut, Gutenbergstr. 76, 24118 Kiel

Projektleitung: Frau Prof. Dr. Alban

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 30.06.2014

Förderkennzeichen: 0315812G

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

Ausführende Stelle: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Institut für Experimentelle Tumorforschung
- Sektion für Molekulare Onkologie, Arnold-Heller-Str. 3, Hs. 17, 24105 Kiel

Projektleitung: Herr Prof. Dr. Kalthoff

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 31.12.2013

Förderkennzeichen: 0315812H

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

Ausführende Stelle: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - II. Medizinische Klinik - Sektion für
Stammzell- und Immuntherapie, Arnold-Heller-Str. 3, Hs. 43, 24105 Kiel

Projektleitung: Herr Dr. rer. nat. Peipp

Projektlaufzeit: 01.07.2010 bis 31.12.2013

"Die diesem Bericht zugrundeliegenden Forschungsverbundvorhaben wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter den Förderkennzeichen [0315812C - H](#) gefördert. [Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren](#)".

Inhaltsverzeichnis

1. Kurze Darstellung.....	2
1.1. Aufgabenstellung.....	2
1.2. Voraussetzungen.....	2
1.3. Planung und Ablauf.....	3
1.4. Stand der Forschung und Technik.....	3
2. Eingehende Darstellung.....	5
2.1. Erzieltes Ergebnis.....	5
2.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	6
2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	6
2.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes.....	6
2.5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	7
2.6. Erfolge und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses.....	8
- Erfolgskontrollbericht (s. Extra-Dokument).....	8

1. Kurze Darstellung

1.1. Aufgabenstellung

Im Rahmen des Projektes sollten **Struktur und Wirkmechanismen neu definierter Inhaltsstoffe von Braunalgen** aufgeklärt werden. In jenem Projekt wurde eine Vorauswahl an vorgereinigten Braunalgen-Extrakten und -Fraktionen einem Screening für die Anwendung in der Onkologie unterzogen. Dabei wurde mit innovativen Methoden der Genom- und Metabonomanalyse die Korrelation zwischen Wirkstoffgabe und zellulärer Antwort untersucht. Eine Reihe von Tests mit präklinischer Relevanz sollte zur Beschreibung der Wirkung an verschiedenen Krebsarten (Zelllinien und primäre Zellen von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes und der Lunge sowie hämatologischer Tumoren wie z.B. Multiples Myelom; CLL; ALL) durchgeführt werden. Dabei lagen relevante molekulare Mechanismen der Tumorprogression, wie Angiogenese, Adhäsion und Tumorinvasion sowie (anti-)inflammatorische Aspekte bei der Tumorbehandlung und Resistenzen gegen Therapeutika im Fokus der Wirkungstests. Der iterative, mehrfach zu durchlaufende Entwicklungszyklus "Extraktion – Aufreinigung - Wirkungstests – chemische und mathematische Analyse – Aufklärung der Wirkmechanismen" beinhaltete auch pharmakologische, toxikologische und applikations-relevante Fragestellungen. Eine wirtschaftliche Verwertung der Projektergebnisse zielt auf den Verkauf von Patenten eines oder mehrerer Wirkstoffe, die sich als effiziente Krebs-Therapeutika eignen könnten.

1.2. Voraussetzungen

Das Projekt umfasste ein umfassendes Spektrum an Analysemethoden, die unabhängig voneinander vorhandene Wirkungsmechanismen aufschlüsseln können und in ihrer Summe ein einzigartiges Verfahren darstellten.

Mit umfassenden Analysen und präklinischen Tests konnten im Vorfeld des Projektes mehrere antitumoral wirksame Fraktionen beschrieben werden. Aus eigenen Vorarbeiten zeigten sieben von 21 Rohextrakten und vier Fraktionen aus verschiedenen in der Ostsee heimischen Makroalgen klare antitumorale Aktivitäten. Wir haben die vielversprechendste dieser Fraktionen ausgewählt (im Folgenden „AAC-A“ genannt), um deren aktive Substanzen hinsichtlich ihrer Struktur und Wirkmechanismen näher zu charakterisieren.

Durch (i) die Spezialisierung auf Makroalgen-Inhaltsstoffe, (ii) den Einsatz makroalgen-spezifischer Extraktions- und Aufreinigungstechniken, (iii) die Verwendung von standardisierten in-vitro Tests sowie von komplexen „second-generation“-Testungen mit klinischer Relevanz, (iv) den Einsatz aktueller Biosystemtechnik, (v) den Einsatz NMR-basierter Metabonomik und Bioinformatik in der Wirkstoff-Identifikation und eine breit gefächerte Produktperspektive erschien es zu Beginn des Projektes realistisch, die Ziele (s. 1.1.) zu erreichen. Diese Einschätzung hat sich als richtig erwiesen.

1.3. Planung und Ablauf

Der iterative, mehrfach zu durchlaufende Entwicklungszyklus "Extraktion – Aufreinigung - Wirkungstests – chemische und mathematische Analyse – Aufklärung der Wirkmechanismen" beinhaltete auch pharmakologische, toxikologische und applikations-relevante Fragestellungen. Der Ablauf entsprach damit im Wesentlichen den Planungen.

Das Projekt sollte im Gegensatz zu den meisten Vorhaben, die Screens auf molekularer Ebene durchführen, den **zellulären Kontext** mit all seinen Einflussfaktoren auf die Wirkstoffkomponente berücksichtigen. Aktuelle Wirkstoffscreenings der Pharmaindustrie basieren zumeist auf der Testung von Einzelsubstanzen aus chemisch hergestellten Molekülbanken. Naturstoff-Extrakte, insbesondere aus den bislang nur wenig erforschten Meeresorganismen, können somit den zu testenden „chemischen Raum“ deutlich erweitern.

1.4. Stand der Forschung und Technik

Das Potential von marinen Naturstoffen in der Therapie gegen Tumorerkrankungen ist groß: Erwin *et al.* (2010) errechneten, dass „unentdeckte Krebsmedikamente“ aus marinen Quellen einen Wert von 429 Mrd. - 4,33 Bill. Euro haben. Sie rechnen in ihrer Studie mit 253.120 bis 594.232 neuen Substanzen, die zu 55 bis 214 neuen Arzneimitteln gegen Tumorerkrankungen entwickelt werden könnten. Das gesamte medizinische Nutzungspotential liege noch um ein Vielfaches höher.

Insgesamt ist nur ein sehr geringer Anteil an Meeresalgen hinsichtlich ihres Wirkstoffgehaltes untersucht worden. Diese Pflanzen eignen sich aber aufgrund der Vielzahl an chemischen Strukturen besonders gut. Im Gegensatz zu chemischen Zufallsbanken könnten diese Substanzmischungen bereits angereichert sein mit Stoffen, die biologische Wirkungen hervorrufen.

Antitumorale Aktivitäten von **Algeninhaltsstoffen** sind schon seit mehreren Jahrzehnten beschrieben; in den meisten Fällen handelte es sich um die Aktivitäten von undefinierten Rohextrakten oder Stoffgruppen aus verschiedenen Einzelsubstanzen (Boopathy & Kathiresan, 2010). Die interessantesten Stoffgruppen in diesem Zusammenhang sind Polyphenole und Fucoide, von denen es zahlreiche Vertreter in den Algen gibt. Diese Substanzen und deren Wirkungen sind bislang in der Literatur nur recht grob beschrieben, obwohl es Hunderte von Publikationen, aber immer noch keinen Arzneistoff gibt. Die Problematik liegt in einer extremen strukturellen Variabilität; diese wird zusätzlich von Extraktions- und Aufreinigungsmethoden beeinflusst, wobei in den Publikationen meist weder die Standardisierung noch die Reproduzierbarkeit adressiert wird. Entsprechend vielfältig und zum Teil widersprüchlich sind die publizierten Daten zu biologischen Aktivitäten.

Eigenen Arbeiten zur **Dereplikation** und eine Analyse der **Literatur- und Patentlage** legen die Neuheit der gefundenen Substanzen nahe.

2. Eingehende Darstellung

2.1. Erzieltes Ergebnis

- a) es gibt mindestens drei wirksame Extraktkandidaten: einen „wässrigen“ und mind. zwei „acetonische“
- b) Für diese fortgeschritten aufgereinigten Kandidaten bzw. Fraktionen sind Standardprotokolle formuliert und etabliert worden.
- c) die EC50-Werte konnten durch Aufreinigung für den Extraktkandidaten AAC4CLL1516 gesenkt werden
- d) die antiproliferative Wirksamkeit mindestens eines aus der „acetonischen“ Extraktion stammenden Kandidaten (AAC4CLL1516) wurde sowohl bei hämatologischen als auch soliden Tumoren (Zelllinien) mit verschiedenen Batches von Rohextrakten und Algen mehrfach reproduziert
- e) Der Extraktkandidat AAC4CLL1516 enthält zwei schwer voneinander zu trennende, physikochemisch sehr ähnliche Substanzen mit identifizierten Molekulargewicht, die bislang in der Literatur wahrscheinlich noch nicht beschrieben wurden. Die antiproliferative Aktivität kann mit statistischer Signifikanz auf diese zwei Substanzen zurückgeführt werden. Die exakte Strukturaufklärung gestaltet sich aber weiterhin als Herausforderung, die nicht ohne einen weiteren signifikanten Forschungseinsatz auskommt. Dieser ist notwendig, um die konkrete wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse noch besser abschätzen zu können.
- f) die Wirkungsmechanismen dieser Substanzen lassen sich anhand von Genexpressions- und Proteom-basierten Analysen als antiproliferativ beschreiben
- g) eine Beteiligung von Caspasen ist nachgewiesen; relevante Gene werden durch diese Substanzen ebenfalls reguliert, z.B. diejenigen von wichtigen entzündlichen Prozessen
- h) Die Endotoxinkonzentration im Kandidaten AAC4CLL1516 lag weit unterhalb des FDA-Grenzwertes für Medizinprodukte (0,5 EU/ml) und ist als Ursache für die Proliferationsinhibition unwahrscheinlich
- i) Andere, Verunreinigungen, z.B. mit Schwermetallen, wie Blei, Cadmium, und Quecksilber, kommen ebenfalls nicht als Ursache für eine Hemmung der Proliferation in Betracht.
- j) Bislang wahrscheinlichste Anwendung dieser Wirksubstanzen als Cytostatikum mit einer massiven Wirkung auf sich teilende Zellen
- k) Die aufgereinigte Fraktion aus einem weiteren Extraktionszweig inhibiert Migration, aber keine Proliferation. Dies konnte im Scratchassay und in Migrationsexperimenten nachgewiesen werden. Auffällig war bei dieser aufgereinigten Fraktion, dass 1/3 aller regulierten Gene lincRNA war. Die Bedeutung ist noch unklar.
- l) Bislang wahrscheinlichste Anwendung der in i) genannten Substanz(en) als Antimetastatikum.

2.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Das Projekt wurde mit geringfügigen Abweichungen innerhalb des geplanten Kostenrahmens abgeschlossen. Die detaillierten Positionen sind dem Verwendungsnachweis zu entnehmen.

2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleisteten Aufwendungen in Form von Personal, Sachmitteln und Aufträgen an Dritte wurde entsprechend der gebotenen Verhältnismäßigkeit eingesetzt. Die erzielten Ergebnisse sind Ausdruck dieser Verhältnismäßigkeit.

Es gab keine Alternative zu den durchgeführten aufwendigen Analysen und Testverfahren. Um eine ausreichende Aussagekraft zu erzielen, war es notwendig, auch ressourcen-intensive Verfahren mehrmals durchzuführen. Aufgrund dieser reproduzierten Experimente ist es heute möglich, mit einer genügend hohen Sicherheit mindestens eine mögliche neue Leitstruktur zu prognostizieren. Insofern war die geleistetete Arbeit Grundlage für die Option zu einer weitreichenden Wertschöpfung aus den untersuchten Biomaterialien.

2.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Extrakte, deren spezifische Wirkung bereits in ersten präklinischen Tests an humanen Zellen, die direkt von Patienten stammen, belegt werden konnte, sind für die Pharmaindustrie von großem Interesse. Der Markt für Krebsmedikamente ist stark gewachsen, angetrieben durch steigende Patientenzahlen und technologische Fortschritte, vor allem in der biomolekularen Medizin, die zu besserer Verträglichkeit und Wirksamkeit führen. Weltweit erreichte der Umsatz von Krebsmedikamenten 2012 75-80 Mrd. USD (48 Mrd. USD in 2008). Kandidaten in einem mittleren Entwicklungsstadium erzeugen weiterhin eine hohe Nachfrage und würden bei Lizenzierungs- oder Akquisitionsgeschäften hoch bewertet (IMAP Report 2012).

Da wir mit diesem Projekt in einem zwar frühen, präklinischen Entwicklungsstadium sowohl konkrete Wirkstoffe, die sehr wahrscheinlich eine neue Leitstruktur abbilden, als auch klinisch relevante Informationen erzielt haben, sind die Aussichten auf eine wirtschaftliche Verwertbarkeit doch gegeben. Denn alle bisherigen Ergebnisse weisen auf spezifische Wirkmechanismen sowie auf medizinisch und damit wirtschaftlich/gesellschaftlich relevante Anwendungen hin.

Hürden auf dem Weg zu einer weiterführenden Arzneimittelentwicklung sind insbesondere die vollständige Identifizierung und Reindarstellung der aktiven Substanzen. Anhand des im Projekt erarbeiteten Wissens können weitere Aufreinigungsschritte und damit letztlich eine vollständige Strukturaufklärung gelingen. Z.Zt. wird nach einer Finanzierung für diese abschließenden Auftrennungs- und Reindarstellungsarbeiten gesucht. Zwei entsprechende Anträge beim BMBF (KMU-innovativ) wurden abgelehnt, so dass nun verstärkt im Stiftungssektor bzw. im venture-capital-Bereich akquiriert wird.

Auch die Validierung und genauere Beschreibung der Wirkmechanismen sowie die Ergebnisse aus den toxikologischen Untersuchungen sind entscheidende Hürden auf dem Weg zu den klinischen Phasen. Das toxikologische Profil der aufgereinigten Fraktion stellt sich anhand der bislang durchgeführten in vitro Untersuchungen (LDH-Freisetzung, Zytotoxizität bei langsam proliferierenden Zellen, Endotoxin- und Schwermetalltestung) als nicht besonders problematisch dar. Jedoch sind weitergehende Tox-Studien wichtige Bestandteile des Weges zu einer wirtschaftlichen Verwertung.

Ein möglicher Einsatz der Projektergebnisse ist die Therapie gegen Bauchspeicheldrüsenkrebs. Der Markt für die Behandlung dieser Krankheit dürfte 2015 1,2 Mrd. USD erreichen. In den USA erkranken jährlich 30.000 Menschen jährlich neu an dieser lebensbedrohenden, meist sehr spät diagnostizierten Krankheit, so dass eine operative Entfernung des Tumors nur in 12-15% der Fälle gelingt. Zwei Arzneimittel dominieren den Markt: Gemzar (Gemcitabin; Marktanteil 55%), ein Zytostatikum von Eli Lilly und Erlotinib, ein Tyrosinkinase-Hemmer von Genentech / OSI Pharmaceuticals / Roche Tarceva. Die weiteren, auf Fluorouracil und Mitomycin basierenden, Präparate spielen nur eine untergeordnete Rolle („Pancreatic Cancer Market 2012-18“, Transparency Market Research, 2012). Der Bedarf an weiteren Therapiemöglichkeiten ist evident.

Die bisherigen Ergebnisse deuten auch auf eine mögliche Anwendung beim Multiplen Myelom, die zweithäufigste Blutkrebserkrankung in Europa und den USA mit jährlich etwa 3.400 Neuerkrankungen in Deutschland. Das Europäische Krebsregister beziffert eine jährliche Anzahl von 21.000 Neuerkrankungen und 15.000 Todesfälle, sowie insgesamt 60.000 Erkrankte (Stand Januar 2013). Trotz steigender Überlebensraten durch die Stammzelltransplantation und die Einführung neuer Arzneimittel, wie dem Proteasomeninhibitor Bortezomib und den immunmodulatorischen Substanzen Thalidomid und Lenalidomid ist es bei vielen Patienten weiterhin problematisch, die Erkrankung langfristig zu kontrollieren. Die Identifizierung neuer Substanzen mit Myelom-hemmender Wirkung und die Aufklärung der zugrundeliegenden Wirkmechanismen ist daher gesellschaftlich relevant.

2.5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Erfolgsgeschichte, die zur Nachahmung anregt, ist diejenige des US-amerikanischen Biotechunternehmens Threshold Pharmaceuticals, das mit Merck Serono eine Lizenzvereinbarung getroffen hat, um TH-302, ein auf Hypoxia-Bedingungen gerichteter Wirkstoff zur Behandlung von Pankreas-tumoren, gemeinsam zu entwickeln und zu vermarkten. Über verschiedene Meilensteine beinhaltet die Vereinbarung Lizenzzahlungen von 525 Mio. USD (The Pharmaletter, 6.2.2012). TH-302 geht nach ermutigenden Ergebnissen aus Phase IIb in Phase III (<http://www.thresholdpharm.com>).

2.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Erfolgte Veröffentlichungen:

- Vortrag: "AAC – Algae Against Cancer: Preliminary data of a national research project", Zenthoefer, M. et al., SUBMARINER Blue Biotechnology Cooperation Event, Kiel, 2012
- Poster: "Anti-cancer Activities of Extracts from Baltic Sea Brown Seaweed: Preliminary Results from the German Research Project Algae Against Cancer", Zenthoefer, M. et al.; 21st International Seaweed Symposium, Bali, Indonesien, 2013

Geplante Veröffentlichungen:

- Dissertation von Marion Zenthoefer (TU Berlin) zum Thema „Antitumorale Wirkstoffe aus Makroalgen: Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie für Proliferationsinhibitoren von Pankreaskrebszelllinien nach dem Prinzip der „Aktivitäts-geleiteten Fraktionierung“ "

-> daraus abgeleitet ist mindestens ein Artikel, insbesondere im *Journal of Applied Phycology* geplant

- Dissertation von Ulf Geisen (CAU Kiel) zum Thema „Beschreibung der Wirkmechanismen aufgereinigter antitumorale Extraktfraktionen aus Makroalgen“

-> daraus abgeleitet 1-2 Artikel in *Peer Reviewed Journals*

- Dissertation von Karina Ehrig (CAU Kiel) zum Thema „Antitumorale Wirkungen von sulfatierten Polysacchariden aus Makroalgen: Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie und Charakterisierung ihrer anti-metastatischen Aktivitäten“ (Arbeitstitel)

-> daraus abgeleitet 1-3 Artikel in *Peer Reviewed Journals*

Auf Basis eines Teils der Projektarbeiten hat CRM – Coastal Research & Management im zweiten Quartal 2014 ein **Patent** beim DPMA („Zytostatikum“, AZ 10 2014 105260.9) angemeldet.

Die beschriebenen Substanzen, die im vorgeschlagenen Projekt für die Anwendung bei Tumorerkrankungen weiterentwickelt werden sollen, gehören hochdiversen Stoffgruppe an, deren Potential für antitumorale Aktivitäten bereits beschrieben wurde. Nach derzeitigem Kenntnisstand zum Substanzprofil (Molekulargewichte, Strukturen, Aktivitäten etc.) kann man ausschließen, dass die von uns aufgereinigten Substanzen mit den an anderer Stelle beschriebenen übereinstimmen.