

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH** **696 701 A5**

(51) Int. Cl.: **C12Q** **1/34** (2006.01)
G01N **33/566** (2006.01)
G01N **33/573** (2006.01)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTSCHRIFT**

(21) Gesuchsnummer: 02053/02

(22) Anmeldedatum: 05.12.2002

(30) Priorität: 18.12.2001 US 60/341,573

(24) Patent erteilt: 15.10.2007

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.10.2007

(73) Inhaber:
F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124
4070 Basel (CH)

(72) Erfinder:
Huang, Kuo-Sen, Livingston, N.J. 70039 (US)
Anthony Neri, 94018 El Granada, CA (US)
John Lawson, 07828 Budd Lake, NJ (US)

(54) **Verfahren zum Testen eines Mittels auf dessen Fähigkeit, die Heparanaseaktivität zu hemmen.**

(57) Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit bereit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Interagieren eines auf einem festen Träger immobilisierten Heparanase-Substrat-bindenden Proteins mit einem markierten Heparanase-Substrat, wodurch ein immobilisiertes markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird, Interagieren einer Heparanase-Enzymlösung mit dem immobilisierten markierten Heparanase-Substrat in Gegenwart des Mittels und Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger. Das markierte Heparanase-Substrat kann an eine Immobilisierungsbrücke gebunden werden, die an auf einem festen Träger immobilisierte Moleküle bindet, wodurch ein über die Brücke immobilisiertes markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird. Ausserdem stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit bereit, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und dem Heparanase-Substrat zu hemmen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: Interagieren in Lösung eines auf einem festen Träger immobilisierten FGF mit dem Mittel und dem markierten Heparanase-Substrat und Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit bereit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen. Die Verfahren der Erfindung umfassen das Immobilisieren eines Heparanase-Substrats über ein Heparanase-Substrat-bindendes Protein. Die Verfahren lassen sich einfach durchführen und können leicht als automatisierte Systeme für HTS durchgeführt werden.

[0002] Heparansulfat (HS) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) liegen in der extrazellulären Matrix (ECM) und auf der Zelloberfläche vor. Sie spielen in regulatorischen Prozessen der Zelle eine wichtige Rolle, wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation (Jackson, R. L. Busch, S. J., und Cardin, A. L. (1991), Glycoaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes; *Physiol. Rev.* 71, 481–539; Kjellen, L. und Lindahl, U. (1991), Proteoglycans: Structures and interactions; *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443–475; Wight, T. N., Kinsella, M. G., und Qwarnstrom, E. E. (1992), The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation; *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 793–801). Ausserdem interagieren sie mit zahlreichen Molekülen, umfassend Wachstumsfaktoren (z.B. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und Thrombocyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor), Cytokine, extrazelluläre Matrixproteine, Lipoproteine und β -Amyloid-Proteine (Ishai-Michaeli, R., Eldor, A., und Vlodavsky, I. (1990), Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix; *Cell Reg.* 1, 833–842; Schlessinger, J., Lax, I., und Lemmon, M., (1995), Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors? *Cell.* 83, 357–360; Najjam, S., Gibbs, R. V., Gordon, M. Y., und Rider, C. C. (1997), Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach; *Cytokine* 9, 1013–1022; Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivercrona, T., und Vlodavsky, I. (1992), Lipoprotein, lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix; *J. Clin. Invest.* 90, 2013–2021; Schulz, J. G., Megow, D., Reszka, R., Villringer, A., Einhaupl, K. M., und Dirnagl, U. (1998), Evidence that glypican is a receptor mediating beta-amyloid neurotoxicity in PC12 cells; *Eur. J. Neurosci.* 10, 2085–2093). Die Freisetzung dieser Proteine durch Proteasen oder Glykosidasen stellt einen Regulationsmechanismus dar, der in normalen Prozessen und in Prozessen bei Krankheiten die Induktion von Wachstum, die Chemotaxis und die Extravasation von Zellen bewirkt.

[0003] Die Heparanase ist eine Endo-(D)-Glucuronidase, die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) an spezifischen Stellen spaltet. Ihre Aktivität wurde in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen, umfassend menschliche Thrombocyten, Fibroblasten, Neutrophile, aktivierte T-Lymphocyten, Monocyten und menschliche Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) (Ishai-Michaeli, R., Eldor, A., und Vlodavsky, I. (1990), Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix; *Cell Reg.* 1, 833–842; Schlessinger, J., Lax, I., und Lemmon, M. (1995), Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors? *Cell.* 83, 357–360; Najjam, S., Gibbs, R. V., Gordon, M. Y., und Rider, C. C. (1997), Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach; *Cytokine* 9, 1013–1022; Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivercrona, T., und Vlodavsky, I. (1992), Lipoprotein, lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix; *J. Clin. Invest.* 90, 2013–2021; Schulz, J. G., Megow, D., Reszka, R., Villringer, A., Einhaupl, K. M., und Dirnagl, U. (1998), Evidence that glypican is a receptor mediating beta-amyloid neurotoxicity in PC12 cells; *Eur. J. Neurosci.* 10, 2085–2093; Kosir, M. A., Quinn, C. C., Zukowski, K. L., Grignon, D. J., und Ledbetter, S. (1997), Human prostate Carcinoma cells produce extracellular heparanase; *J. Surg. Res.* 67, 98–105; Godder, K., Vlodavsky, I., Eldor, A., Weksler, B. B., Haimovith-Friedman, A., und Fuks, Z. (1991), Heparanase activity in cultured endothelial cells; *J. Cell Physiol.* 148, 274–280; Barne, K. J. (1993), Release of heparan sulfate glycosaminoglycans from proteoglycans in Chinese hamster ovary cells does not require proteolysis of the core protein; *J. Biol. Chem.* 268, 19956–19964). Ausserdem stehen erhöhte Heparanase-Spiegel mit dem Melanom und anderen Tumorzelltypen in Zusammenhang (Vlodavsky, I., Fuks, Z., Bar-Ner, M., Ariav, Y., und Schirrmacher, V. (1983), Lymphoma cell mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix relationship to tumor cell metastasis; *Cancer Res.* 43, 2704–2711; Vlodavsky, I., Eldor, A., Haimovitz-Friedman, A., Metzner, Y., Ishai-Michaeli, R., Lider, O., Naparstek, Y., Cohen, I. R., und Fuks, Z. (1992), Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune System: Possible involvement in diapedesis and extravasation; *Invasion Metastasis* 12, 112–127; Nakajima, M., Irimura, T., DiFerranta, D., DiFerranta, N., und Nicholson, G. L. (1983), Heparan sulfate degradation; Relation to tumor invasion and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines; *Science* 220, 611–613; Ikuta, M., Podyma, K. A., Maruyama, K., Enomoto, S., Yanagishita, M. (2001), Expression of heparanase in oral Cancer cell lines and oral Cancer tissues; *Oral Oncol.* 37, 177–184). Es gibt Beweise, dass die Spaltung der HS-Ketten aus HSPG durch die Heparanase zur Zerstörung der ECM führt und dadurch die Zellmigration erleichtert wird. Hierbei handelt es sich um einen wichtigen Prozess bei der Gewebe-Invasion von aus dem Blut stammenden malignen Tumorzellen und Leukocyten (Hanahan, D., und Folkman, J. 1996), Patterns and Emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis; *Cell* 86, 353–364; Zetter, B. R. (1998), Angiogenesis and tumor metastasis; *Ann. Rev. Med.* 49, 407–424; Nakajima, M., Irimura, T., und Nicholson, G. L. (1988), Heparanase and tumor metastasis; *J. Cell. Biochem.* 36, 157–167). Tatsächlich reduziert eine Behandlung von Versuchstieren mit Heparanase-Inhibitoren deutlich die Häufigkeit von Lungenmetastasen (Vlodavsky, I., Mohsen, M., Lider, O., Svahn, C. M., Ekre, H. P., Vigoda, M., Ishai-Michaeli, R., Peretz, T. (1995), Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin; *Invasion Metastasis* 14, 290–302; Parish, C. R., Coombe, D. R., Kakobsen, K. B., und Underwood, P. A. (1987), Evidence that sulphated Polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor cell-derived heparanase; *Int. J. Cancer* 40, 511–517; Parish, C. R., Freeman, C. Brown, K. J., Francis, D. J., und Cowden,

W. B. (1999), Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity; *Cancer Res.* 59, 3433–3441, dies zeigt, dass Heparanase-Inhibitoren möglicherweise eingesetzt werden können, um die Invasion von Tumorzellen und die Metastasierung zu hemmen.

[0004] Es wurde gefunden, dass die Fähigkeit von aktivierten Lymphocyten, Makrophagen und Granulocyten, die ECM zu durchdringen und zu Zielgeweben zu wandern, von der Heparanase-Aktivität abhängig ist (Lider, O., Baharav, E., Mekori, Y. A., Miller, T., Naparstek, Y., Vlodavsky, I., und Cohen, I. R. (1989), Suppression of experimental autoimmune diseases and Prolongation of allograft survival by treatment of animals with low doses of heparins; *J. Clin. Invest.* 83, 752–756.)

[0005] Die Heparanase wird als Antwort auf verschiedene Aktivierungssignale (z.B. Immunkomplexe, Antigene, Nitrogene) aus intrazellulären Kompartimenten (z.B. Lysosomen, spezifischen Granula) freigesetzt, dies legt ihre Beteiligung an Entzündungs- und Autoimmunreaktionen nahe. Die Behandlung von Versuchstieren mit Heparanase-Inhibitoren reduzierte deutlich die Häufigkeit einer T-Zellen-vermittelten Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ, einer experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis und einer anjuvanten Arthritis (Willenborg, D. O., und Parish, C. R. (1988), Inhibition of allergic encephalomyelitis in rats by treatment with sulfated Polysaccharides; *J. Immunol.* 140, 3401–3405,) dies zeigt, dass Heparanase-hemmende Verbindungen möglicherweise zum Hemmen von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten eingesetzt werden können.

[0006] Somit spielt die Heparanase beim Abbau der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Sie ist an der Entzündung, der Tumor-Angiogenese und der Metastasierung beteiligt. Obwohl Hinweise vorliegen, dass die Heparanase als ein therapeutisches Ziel für eine Intervention attraktiv wäre, war die Entwicklung von Arzneistoffen bisher dadurch eingeschränkt, dass es kein Verfahren mit einer hohen Durchsatzleistung gab, mit dem die Fähigkeit von Mitteln, die Heparanase-Aktivität zu hemmen, getestet werden kann.

[0007] Heparanase-Tests wurden unter Verwendung von radiomarkierten ECM-assoziierten HSPG durchgeführt (Bartlett et al. (1995), Comparative Analysis of the ability of leukocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: Evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase; *Immunol. Cell Biol.* 73, 113–124; Vlodavsky et al. (1992), Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune System: Possible involvement in diapedesis and extravasation; *Invasion Metastasis* 12, 112–127). Dabei wird das radiomarkierte Material nachgewiesen, das durch die Heparanase-Spaltung aus der ECM freigesetzt wird. Zu den Nachteilen zählt, dass häufig Proteasen erforderlich sind, um die HS-Ketten für den Heparanase-Abbau freizulegen. Es ist schwierig, die Gelfiltrations-Analyse so anzupassen, dass in dem Test ein hoher Durchsatz möglich ist. Ausserdem müssen bei der Verwendung von radioaktivem Material bestimmte Sicherheitsstandards eingehalten werden.

[0008] Satoh et al. (Satoh, A., et al. (1999), Comparison of methods of immobilization to enzyme-linked immunosorbent assay plates for the detection of sugar chains; *Anal. Biochem.* 275, 231–235) beschreiben Verfahren, wobei Oligosaccharide kovalent an mit dem Methylvinylether-Maleinsäureanhydrid-Copolymer (MMAC) beschichtete Mikrotiterplatten gebunden werden. Diese Verfahren sind jedoch arbeitsaufwendig, da hierfür mehrere chemische Reaktionen erforderlich sind, um die Oligosaccharide an die MMAC-beschichteten Platten zu binden. Einige der organischen Reagenzien und Lösungsmittel können möglicherweise die Mikrotiterplatten zerstören. Ausserdem könnte es sein, dass die Gesamtausbeute nach mehreren Schritten der chemischen Reaktionen nur noch sehr gering ist.

[0009] Freeman und Parish beschreiben ein schnelles Verfahren zum Messen der Heparanase-Aktivität (Freeman, C. und Parish, C. R. (1997), A rapid quantitative assay for the detection of mammalian heparanase activity; *Biochem. J.* 324, 229–237). Histidin-reiches Glykoprotein des Huhns (cHRG) wurde an Sepharose gekoppelt und zum Isolieren von ungespaltenem HS eingesetzt. Zwar werden in diesen Verfahren die Heparanase-gespaltenen Produkte von dem HS-Substrat abgetrennt, es sind jedoch grosse Mengen von cHRG-Sepharose erforderlich, um das ungespaltene HS quantitativ aus den Reaktionsgemischen zu entfernen. Ausserdem eignet sich die Verwendung von Sepharose-Kügelchen in Verbindung mit Säulenchromatographie- und Zentrifugationsverfahren nicht für ein Screening mit hohem Durchsatz.

[0010] Ben-Artzi et al. (Ben-Artzi et al. (2001), Methods of Screening for potential anti-metastatic and anti-inflammatory agents using mammalian heparanase as a probe. US-Patent Nr. US 6 190 875) beschreiben einen Test mit hohem Durchsatz zum Messen der Heparanase-Aktivität. Unter Verwendung von HS oder von bestimmten Heparin-Typen als Substrat wird die Heparanase-Reaktion in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt und durch Zugabe von Tetrazolium-Blau gestoppt. Das Tetrazolium-Blau reagiert mit den reaktiven Enden von Zuckern, die durch die Heparanase-Spaltung freigelegt werden. Die Zahl der Spaltungen des Substrats wird kalorimetrisch gemessen. In diesem Test ist die Verwendung von grossen Mengen HS als Substrat erforderlich (50 µg HS pro 100 µl), und ausserdem muss die Inkubationszeit mindestens zwei Stunden betragen (zwei bis 24 Stunden). Durch diese Bedingungen für den Test, der zwar vom Ablauf her nicht optimal ist, wird eine Spaltung der Zucker des HS-Substrats begünstigt. Um das niedrige Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in einem gewissen Ausmass zu kompensieren, ist es erforderlich, dass eine grössere Anzahl von reaktiven Zuckern gemessen wird. Ein weiterer Nachteil des Tests kommt durch die Verwendung des Tetrazoliumsalzes zustande, das mit vielen Typen von Gruppen reagieren kann, so dass möglicherweise ungenaue Ergebnisse erhalten werden. Deshalb ist die Reinheit der Testreagenzien und Testverbindungen ein sehr wichtiger Punkt.

[0011] Die katalytische Aktivität der Heparanase könnte auch indirekt durch ein Mittel gehemmt werden, das die Bindung des Heparanase-Substrats an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) verhindert oder verändert. Da solche Mittel wahrscheinlich FGF-vermittelte Signalereignisse blockieren können, sind sie mögliche Kandidaten für Arzneimittel gegen Krebs

und Krankheiten, die durch eine abnorme Neovaskularisation verursacht werden (Folkman, J. (1995), Angiogenesis in Cancer, vascular, rheumatoid and outhor diseases; Nat. Med. 1, 27–31).

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit bereit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Interagieren eines auf einem festen Träger immobilisierten Heparanase-Substrat-bindenden Proteins mit einem markierten Heparanase-Substrat, wodurch ein immobilisiertes markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird,
- (b) Interagieren einer Heparanase-Enzymlösung mit dem immobilisierten markierten Heparanase-Substrat in Gegenwart des Mittels, und
- (c) Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger, wodurch bestimmt wird, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Heparanase zu hemmen.

[0013] Das markierte Heparanase-Substrat kann an eine Immobilisierungsbrücke gebunden sein, die an immobilisierte Moleküle auf einem festen Träger bindet, wodurch ein über die Brücke immobilisiertes markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird.

[0014] Ausserdem stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit bereit, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und dem Heparanase-Substrat zu hemmen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Interagieren in Lösung des auf einem festen Träger immobilisierten FGF mit dem Mittel und dem markierten Heparanase-Substrat, und
- (b) Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger, wodurch bestimmt wird, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und dem Heparanase-Substrat zu hemmen.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zum Messen der Heparanase-Aktivität und zum Testen eines Mittels oder von Mitteln bereit, mit denen seine/ihre Fähigkeit gemessen werden kann, die Heparanase-Aktivität zu hemmen. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung lassen sich einfach durchführen. Ausserdem können sie leicht als automatisierte Systeme für ein Screening mit hohem Durchsatz (HTS) durchgeführt werden.

[0016] Die HS-Komponente von HSPG dient in vivo als Niederaffinitäts-Rezeptor für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) auf der Zelloberfläche. Bei der Spaltung mit Heparanase wird der FGF/HS-Komplex aus der Zelloberfläche freigesetzt, woraufhin die Zellproliferation stimuliert wird. Während der Angiogenese, Metastasierung und Entzündung fördert eine erhöhte Heparanase-Aktivität die Freisetzung des FGF/HS-Komplexes aus der Zelloberfläche, der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. In der vorliegenden Erfindung kann die physiologische Relevanz der katalytischen Aktivität der Heparanase für die Aktivität des Zelloberflächen-FGF/Heparanase-Substrat-Komplexes dafür genutzt werden, um Mittel auf ihre Fähigkeit durchzumustern, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen.

[0017] Die vorliegende Erfindung umfasst Tests, in denen das Heparanase-Substrat über ein Heparanase-Substrat-bindendes Protein immobilisiert wird.

[0018] Die vorliegende Erfindung umfasst das Interagieren eines immobilisierten Heparanase-Substrat-bindenden Proteins mit einem markierten Heparanase-Substrat. Das Heparanase-Substrat-bindende Protein ist auf einem festen Träger immobilisiert. Beim Interagieren des immobilisierten Heparanase-Substrat-bindenden Proteins mit dem markierten Heparanase-Substrat bindet das markierte Heparanase-Substrat an das immobilisierte Heparanase-Substrat-bindende Protein, wodurch das Heparanase-Substrat-bindende Protein plus immobilisierte markierte Heparanase-Substrat entsteht. Das Heparanase-Substrat-bindende Protein plus immobilisierte markierte Heparanase-Substrat wird mit einer Heparanase-Enzymlösung inkubiert, so dass die Heparanase das markierte Heparanase-Substrat enzymatisch spalten kann. Die aus der Enzymspaltung resultierenden gespaltenen Fragmente werden in die Lösung freigesetzt. Die Enzym-Spaltproduktlösung wird entfernt vom festen Träger getestet, wobei die Markierung gemessen wird, um die katalytische Aktivität der Heparanase zu bestimmen. Diese Inkubation mit Heparanase in Abwesenheit eines zu testenden Mittels dient dazu, um den Punkt von 100% der katalytischen Aktivität der Heparanase zu bestimmen, anhand dessen sodann die prozentuale Hemmung der Heparanase-Aktivität durch eine Testsubstanz berechnet werden kann.

[0019] Zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, werden das Heparanase-Enzym und das Heparanase-Substrat-bindende Protein plus das immobilisierte markierte Heparanase-Substrat in Gegenwart des Mittels inkubiert. Die Enzym-Spaltproduktlösung wird entfernt vom festen Träger getestet, wobei die Markierung gemessen wird, um zu bestimmen, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Heparanase zu hemmen. Eine prozentuale Hemmung der Heparanase-Aktivität kann für ein bestimmtes Mittel anhand des Punktes von 100% der katalytischen Aktivität der Heparanase berechnet werden.

[0020] Das Heparanase-Substrat-bindende Protein kann ein beliebiges Protein, Peptid oder Fragment davon sein, das an ein Heparanase-Substrat bindet. Beispiele umfassen FGF, VEGF und PDGF.

[0021] Der FGF kann das in der Natur vorkommende Produkt sein, oder er kann synthetisiert werden. FGF lässt sich billig durch Clonierung und Expression herstellen, z.B. wie in Prats et al. beschrieben (Prats, H., et al. (1989), High molecular

mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1836–1840.

[0022] Das Heparanase-Enzym kann das in der Natur vorkommende Produkt sein, oder es kann synthetisiert werden. Die Heparanase lässt sich durch Clonierung und Expression herstellen, z.B. wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0023] Das markierte Heparanase-Substrat enthält ein Heparanase-Substrat und mindestens eine Markierung für den Nachweis, die mit dem Heparanase-Substrat verknüpft ist. In der vorliegenden Erfindung bezieht sich das Heparanase-Substrat auf ein Substrat, das durch das Enzym Heparanase in Spaltprodukte gespalten werden kann und das die Fähigkeit besitzt, an den FGF zu binden. Das Heparanase-Substrat kann ausgewählt sein aus Heparansulfat (HS), Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) und Heparansulfat-Analoga. Die Heparansulfat-Analoga gemäss der vorliegenden Erfindung sind Analoga, die durch das Heparanase-Enzym gespalten werden. Obwohl Heparin im Allgemeinen als ein Heparanase-Inhibitor gilt, werden bestimmte Heparin-Arten, die als Heparanase-Substrate dienen (Ben-Artzi, H., et al., US-Patent Nr. US 6 190 875), auch als Heparansulfat-Analoga gemäss der vorliegenden Erfindung angesehen. Es wurde gezeigt, dass die für die FGF-Bindung erforderlichen Struktureigenschaften von Heparin jedoch von denen verschieden sind, die für das Ersetzen des β FGF ausreichend sind, das an HS auf Zelloberflächen und ECM gebunden ist (Ben-Artzi, H., et al., US-Patent Nr. US 6 190 875; Ishai-Michaeli, R., et al. (1992), Importance of size and sulfation of heparin in release of β FGF from the vascular endothelium and extracellular matrix; Biochemistry 31, 2080–2088). Somit würden Heparin-Arten, die in vivo β FGF nicht ersetzen, z.B. in einem Test unter Verwendung eines immobilisierten FGF nicht die gleiche physiologische Relevanz wie Heparansulfat haben.

[0024] Die mindestens eine Markierung für das Heparanase-Substrat kann ausgewählt sein aus fluoreszierenden, radioaktiven, chemilumineszierenden und chromogenen Molekülen. Das Heparanase-Substrat kann mit einer oder mehreren Markierungen markiert sein. Sofern es gewünscht wird, kann (können) die Markierung(en) für das Heparanase-Substrat danach ausgewählt sein, ob sie einen empfindlichen Signalnachweis bereitstellt (bereitstellen).

[0025] Eine fluoreszierende Markierung bezieht sich auf eine Fluorophore oder eine Gruppe, die eine Fluorophore enthält. Da die Fluorophore absorbiertes Licht bei einer charakteristischen Wellenlänge emittiert, kann das fluoreszierend markierte Heparanase-Substrat unter Verwendung bekannter Vorrichtungen zum Fluoreszenz-Nachweis gemessen werden. Die fluoreszierende Markierung kann z.B. Fluorescein (wie z.B. Fluorescein-Isothiocyanat FITC oder F₂FITC), Lanthanid-Chelate, Rhodamin usw. sein. Die zurzeit handelsüblichen Lanthanide sind Europium (Eu), Samarium (Sm), Terbium (Tb) und Dysprosium (Dy).

[0026] Die Verwendung von FITC als Markierung ermöglicht einen empfindlichen Nachweis der Fluoreszenzintensität und eignet sich für das Testen einer grossen Anzahl von Mitteln. F₂FITC weist eine etwas bessere Photostabilität und Fluoreszenz auf und erfordert eine geringere Löschung als FITC. Ein Eu-Chelat, ein Lanthanid-Chelat, zeigt eine Fluoreszenz mit einem lang andauernden Zerfall. Durch Tests unter Verwendung eines Eu-Chelats kann die Beteiligung einer Fluoreszenz ausgeschlossen werden, die aufgrund des zu testenden Mittels nachgewiesen wird.

[0027] Bisher wurden verbreitet Zeit-aufgelöste fluorometrische (TRF) Tests unter Verwendung von Eu-Chelaten als Fluorophoren für HTS eingesetzt (Hemmila, I., Dakubu, S., Mikkala, V. M., Sütari, H., Lovgren, T. (1984), Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays; Anal. Biochem. 137, 335–343; Hemmila, I., und Webb, S. (1997), Time-resolved fluorometry: An overview of the labels and core technologies for drug Screening applications; Drug Discovery Today 2, 373–381). Diese Fluorophoren zeigen eine intensive und lang anhaltende Fluoreszenzemission, weshalb es möglich ist, die Fluoreszenz erst nach einer Verzögerungszeit zu messen. Hierdurch werden die Hintergrund-Zählungen von kurzlebigen fluoreszierenden Emissionen aus organischen Fluorophoren, die in der Probe enthalten sind, vermieden, denn sie sind zerfallen, bevor der Nachweis erfolgt. Die zeitverzögerte Fluoreszenz in Kombination mit einer grossen Stokes-Verschiebung (340–625 nm) reduziert wirksam die Hintergrundemissionen und trägt zur Empfindlichkeit des Tests bei. Tests, die unter Verwendung eines Eu-markierten HS und eines Eu-markierten Biotin-HS entwickelt wurden, zeigen eine höhere Empfindlichkeit als diejenigen, bei denen eine FITC-Markierung eingesetzt wird. Eu(DPTA), wobei DPTA 1-(p-Isothio-cyanatobenzyl)diethylentriamin-N1,N1,N2,N3,N3-pentaessigsäure ist, ist auch empfindlich, wobei es bei den sauren Bedingungen der Heparanase-Spaltung (d.h. pH 5,4) stabiler ist als ein Eu-Chelat.

[0028] Wenn eine fluoreszierende Markierung verwendet wird, werden die Enzymspaltprodukt-Proben durch eine Lichtquelle passiert, z.B. einen Laser, der Licht bei der Anregungswellenlänge der Fluorophore emittiert. Die Fluoreszenz wird gemessen, indem die emittierten Photonen bei der Emissionswellenlänge der Fluorophore bestimmt werden. Z.B. liegt die Anregungswellenlänge für Fluorescein bei etwa 494 nm und die für Eu-Chelat bei etwa 340 nm. Die Emissionswellenlänge für Fluorescein liegt z.B. bei etwa 518 nm und für Eu-Chelat bei etwa 615 nm.

[0029] Ein Beispiel einer radioaktiven Markierung ist Tritium (³H). Ein Beispiel einer chromogenen Markierung ist Paranitrophenyl (PNP).

[0030] Das Mittel oder die Mittel, nach denen durchgemustert wird, können Mittel eines beliebigen Typs sein. Sie können in der Natur vorkommende Substanzen oder vom Menschen hergestellte (synthetische) Substanzen sein. Z.B. können die Mittel Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht, Peptide, Proteine oder Antikörper sein. Es ist bekannt, dass die katalytische Aktivität eines Enzyms gehemmt werden kann, indem ein Antikörper an das aktive Zentrum gebunden wird. Der hier verwendete Begriff «Antikörper» bezieht sich auf ein monoklonales oder polyclonales Immunglobulin oder

ein Fragment eines Immunglobulins, z.B. Fab1 oder Fab2. Das Immunglobulin kann ein «vermenschlichter» Antikörper sein, der fusionierte oder transplantierte Antikörperregionen umfasst, in denen mindestens eine der Regionen von einem menschlichen Antikörper stammt.

[0031] Das Heparanase-Substrat wird auf einem festen Träger immobilisiert, der für in-vitro-Testverfahren geeignet ist. Beispiele eines festen Trägers umfassen eine Mikrotiterplatte, Sepharose-Kügelchen und Polymer-Kügelchen.

[0032] Das Verfahren ist empfindlich. Nur etwa eine von zehn möglichen Spaltstellen auf dem markierten Heparanase-Substrat wird durch die Bindung an den FGF maskiert.

[0033] Die hohe Durchsatzleistung des FGF/markierten-Heparanase-Substrat-Tests kann realisiert werden, wenn er als ein automatisiertes System durchgeführt wird. Z.B. wurde für den FGF/FITC-HS-Test unter Verwendung eines Zeiss uHTS-Systems ein Screening-Durchsatz von mehr als 25 000 Verbindungen pro Tag erreicht. Um positive Ergebnisse aufgrund einer eigenen Fluoreszenz der Testverbindungen auszuschliessen, kann der FGF/Eu-HS-Test z.B. eingesetzt werden, um die Mittel erneut zu testen, die im FITC-HS/FGF-Test ein positives Ergebnis zeigten.

[0034] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Heparanase-Substrat an mindestens eine Markierung und an eine Immobilisierungsbrücke gebunden. Eine Immobilisierungsbrücke ist in der vorliegenden Erfindung eine Gruppe oder Gruppen, (a) die in der Lage ist, an ein Heparanase-Substrat zu binden, (b) die, wenn sie an ein markiertes Heparanase-Substrat gebunden ist, (i) nicht die katalytische Aktivität der Heparanase am markierten Heparanase-Substrat stört, und (ii) nicht die Messung der mindestens einen Markierung stört oder nicht externe Signale zufügt, und (c) die an ein Molekül bindet, das an einem festen Träger immobilisiert werden kann. Das an eine Immobilisierungsbrücke gebundene markierte Heparanase-Substrat wird mit dem immobilisierten Molekül in Kontakt gebracht, das spezifisch an die Immobilisierungsbrücke bindet. Das resultierende, über die Brücke immobilisierte markierte Heparanase-Substrat wird sodann mit Heparanase umgesetzt. Die Produkte der Heparanase-Spaltung werden als markierte Fragmente in die Lösung freigesetzt. In der Lösung wird die Markierung entfernt vom festen Träger gemessen.

[0035] Z.B. können die Immobilisierungsbrücke und das entsprechende, auf dem festen Träger immobilisierte Molekül Biotin bzw. Streptavidin (SA) oder Avidin sein.

[0036] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Heparanase-Substrat HS, die Markierung ist eine fluoreszierende Markierung und die Immobilisierungsbrücke und das entsprechende, auf einem festen Träger immobilisierte Molekül sind Biotin bzw. Streptavidin. Biotin bindet eher an den terminalen Zucker der HS-Kette als an die Heparanase-Spaltstellen. Somit sollte die katalytische Wirkung der Heparanase durch die Bindung des fluoreszierend markierten Biotin-HS an SA nicht gestört werden.

[0037] Als Alternative zur Verwendung eines Heparanase-Substrats, das an mindestens eine Markierung und eine Immobilisierungsbrücke gebunden ist, kann das Heparanase-Substrat an eine Immobilisierungsbrücke ohne Markierung gebunden sein. In diesem Aspekt der Erfindung wird ein Test wie vorstehend angegeben durchgeführt, wobei ein Mittel auf seine Fähigkeit, die katalytische Aktivität zu hemmen, unter Verwendung eines FGF-immobilisierten markierten Heparanase-Substrats getestet wird. Ausserdem wird ein Test durchgeführt, mit dem das Mittel unter Verwendung eines an eine immobilisierte Brücke gebundenen Heparanase-Substrats getestet wird. Dieser Test unter Verwendung eines an eine Immobilisierungsbrücke gebundenen Heparanase-Substrats eignet sich für die Bestimmung, ob bei Testsubstanzen, für die im FGF/markierten-Heparanase-Substrat-Test gefunden wurde, dass sie die Heparanase-Aktivität hemmen, diese Heparanase-Hemmaktivität bestätigt werden kann oder nicht.

[0038] Der IC50-Wert bezieht sich auf die Konzentration eines Mittels, die erforderlich ist, um 50% einer spezifischen gemessenen Aktivität zu hemmen. In der vorliegenden Erfindung ist die spezifische gemessene Aktivität, die gemeint ist, die katalytische Aktivität der Heparanase. Für jede Testsubstanz kann ein IC50-Wert bestimmt werden. Weitere Informationen hinsichtlich der Bestimmung des IC50-Wertes finden sich in Beispiel 16.

[0039] Der Nachweis des Vorliegens oder der Abwesenheit einer Markierung in der Enzym-Spaltproduktlösung erfolgt an einer Stelle, die vom festen Träger entfernt ist. Die Messung wird an der entfernten Stelle durchgeführt, so dass die Messung der Markierung nicht durch die Markierung verfälscht wird, die möglicherweise immobilisiert auf dem festen Träger verbleibt. Die vom festen Träger entfernte Stelle muss nicht in einer bestimmten Entfernung vom festen Träger vorliegen. Die Messung der Markierung könnte sehr nah am festen Träger stattfinden, wobei z.B. ein Schutzschirm gegen den Nachweis der auf dem festen Träger verbliebenen Markierung verwendet wird und sie somit vom festen Träger gemäss der vorliegenden Erfindung entfernt ist.

[0040] Die Mittel, bei denen durch das Verfahren des FGF/markierten-Heparanase-Substrat-Tests bestimmt wurde, dass sie die Heparanase-Aktivität hemmen, wurden in kinetischen Tests wie in Beispiel 17 untersucht. Die Ergebnisse (hier nicht dargestellt) zeigten, dass diese Mittel kompetitive oder gemischte Inhibitoren der Heparanase am enzymatisch aktiven Zentrum der Heparanase waren. Auch die Beispiele 18 bis 21 bieten eine Bestätigung des FGF/markierten-Heparanase-Substrat-Tests.

[0041] Ausserdem umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Durchmusterung von Mitteln, um zu bestimmen, ob sie die HS/FGF-Wechselwirkungen stören oder nicht, denn dann könnten sie markierte Heparanase-Substrat-Fragmente auch in Abwesenheit der Heparanase freisetzen. Ferner könnten solche Mittel als Arzneimittel in der Behandlung von Krebs und Krankheiten nützlich sein, die durch eine abnorme Neovaskularisation verursacht werden. Die Bindung

eines markierten Heparanase-Substrats an FGF-beschichtete Platten kann überwacht werden (vgl. die Fig. 3 und 11A). Zu den FGF-beschichteten Platten wird ein markiertes Heparanase-Substrat in einer ausreichenden Menge zugefügt, so dass es an den immobilisierten FGF binden kann. Im Überstand wird die Markierung entfernt vom festen Träger gemessen, wodurch ein Mass für den Hintergrund bereitgestellt werden kann. Zum Testen eines Mittels werden das Mittel und das markierte Heparanase-Substrat in Lösung mit dem immobilisierten FGF in Kontakt gebracht. Der Überstand wird entfernt vom festen Träger getestet, wobei das Vorliegen oder die Abwesenheit der Markierung nachgewiesen wird, um zu bestimmen, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und dem Heparanase-Substrat zu hemmen. Die Mittel, die die Fähigkeit besitzen, die Bindung zu hemmen, weisen deshalb im Überstand einen höheren Wert der Markierung auf als die Hintergrundmessung.

[0042] Aus diesem Grund stellt die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Identifizierung von Inhibitoren der Bindung zwischen dem FGF und dem Heparanase-Substrat bereit. Zusätzlich wird die Verwendung dieser Mittel, die die Bindung zwischen dem FGF und dem Heparanase-Substrat hemmen, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Krebs und Krankheiten bereitgestellt, die durch eine abnorme Neovaskularisation verursacht werden.

[0043] In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von Inhibitoren der katalytischen Aktivität der Heparanase.

[0044] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit, das die Komponenten umfasst, die zur Durchführung eines erfindungsgemässen Verfahrens erforderlich sind, ausgewählt aus der Gruppe, die einen festen Träger, ein Heparanase-Substrat-bindendes Protein, das auf dem festen Träger immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann, ein markiertes Heparanase-Substrat und Heparanase umfasst.

[0045] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit, das die Komponenten umfasst, die zur Durchführung eines erfindungsgemässen Verfahrens erforderlich sind, ausgewählt aus der Gruppe, die einen festen Träger, ein Molekül, das auf dem festen Träger immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann und spezifisch an eine Immobilisierungsbrücke bindet, eine Immobilisierungsbrücke, die in der Lage ist, an ein Heparanase-Substrat zu binden, ein markiertes Heparanase-Substrat und Heparanase umfasst.

[0046] Ausserdem betrifft die vorliegende Erfindung neue Inhibitoren der katalytischen Aktivität der Heparanase und neue Inhibitoren der Bindung zwischen dem FGF und dem Heparanase-Substrat, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung identifiziert wurden.

[0047] Ferner stellt die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel bereit, das einen pharmazeutisch verträglichen Träger und eine therapeutisch wirksame Menge eines Inhibitors der katalytischen Aktivität der Heparanase umfasst, der durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung identifiziert wurde; und ausserdem pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

[0048] Obendrein stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels bereit, das die Schritte der erfindungsgemässen Verfahren umfasst, wobei das identifizierte Mittel modifiziert und das erhaltene Mittel mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel formuliert wird.

[0049] Der hier verwendete Begriff «pharmazeutisch verträglich» bezieht sich auf diejenigen Verbindungen, Stoffe, Zusammensetzungen und/oder Dosierungsformen, die nach der üblichen medizinischen Meinung für die Verwendung in Kontakt mit Geweben von Menschen und Tieren geeignet sind, ohne dass sie eine starke Toxizität, Reizung, allergische Reaktion oder ein anderes Problem oder eine andere Komplikation verursachen, wobei sie ein angemessenes vernünftiges Nutzen-/Risiko-Verhältnis aufweisen.

[0050] Der hier verwendete Begriff «pharmazeutisch verträgliche Salze» bezieht sich auf Derivate der identifizierten Mittel, wobei das ursprüngliche Mittel modifiziert wird, indem saure oder basische Salze davon hergestellt werden. Beispiele von pharmazeutisch verträglichen Salzen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Mineral- oder organische Säuresalze von basischen Resten, wie Aminen; Alkali- oder organische Salze von sauren Resten, wie Carbonsäuren; und dergleichen. Die pharmazeutisch verträglichen Salze umfassen die herkömmlichen nicht-toxischen Salze oder die quartären Ammoniumsalze der ursprünglichen Verbindung, die z.B. aus nicht-toxischen anorganischen oder organischen Säuren gebildet werden. Solche herkömmlichen nicht-toxischen Salze umfassen z.B. Salze, die von anorganischen Säuren stammen, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Sulfaminsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure und dergleichen; und die Salze, die aus organischen Säuren hergestellt wurden, wie Essigsäure, Propionsäure, Bernsteinsäure, Glykolsäure, Stearinsäure, Milchsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Ascorbinsäure, Pamoasäure, Maleinsäure, Hydroxymaleinsäure, Phenyllessigsäure, Glutaminsäure, Benzoesäure, Salicylsäure, Sulfanilsäure, 2-Acetoxybenzoesäure, Fumarsäure, Benzolsulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, Oxalsäure, Isethionsäure und dergleichen.

[0051] Die pharmazeutisch verträglichen Salze der vorliegenden Erfindung können aus dem ursprünglichen Mittel, das eine basische oder saure Gruppe enthält, durch herkömmliche chemische Verfahren synthetisiert werden. Im Allgemeinen können solche Salze hergestellt werden, indem die freien Säuren- oder Basenformen dieser Verbindungen mit einer stöchiometrischen Menge der geeigneten Base oder Säure in Wasser oder in einem organischen Lösungsmittel oder in einem Gemisch aus beiden umgesetzt wird; im Allgemeinen sind nicht-wässrige Medien, wie Ether, Essigsäureethylester, Ethanol, Isopropanol oder Acetonitril bevorzugt. Listen mit geeigneten Salzen finden sich in Remington's Pharmaceutical

Sciences, 17. Aufl., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, S. 1418, dessen Beschreibung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

[0052] Die durch das erfindungsgemässe Verfahren identifizierten Mittel können so modifiziert werden, dass Folgendes erreicht wird; (i) ein modifiziertes aktives Zentrum, Aktivitätsspektrum, und/oder (ii) eine bessere Wirksamkeit, und/oder (iii) eine geringere Toxizität (ein besserer therapeutischer Index), und/oder (iv) schwächere Nebenwirkungen, und/oder (v) ein modifizierter Wirkungseintritt, eine modifizierte Wirkungsdauer, und/oder (vi) modifizierte kinetische Parameter (Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung), und/oder (vii) modifizierte physikalisch-chemische Parameter (Löslichkeit, hygroskopisches Verhalten, Farbe, Geschmack, Geruch, Stabilität, Zustand), und/oder (viii) eine bessere allgemeine Spezifität, Organ/Gewebespezifität, und/oder (ix) eine optimierte Anwendungsform und Anwendungsrouten durch (i) Veresterung von Carboxylgruppen, oder (ii) Veresterung von Hydroxylgruppen mit Kohlensäuren, oder (iii) Veresterung von Hydroxylgruppen zu z.B. Phosphaten, Pyrophosphaten oder Sulfaten oder Hemisuccinaten, oder (iv) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Salzen, oder (v) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Komplexen, oder (vi) Synthese von pharmakologisch aktiven Polymeren, oder (vii) Einführung von hydrophilen Resten, oder (viii) Einführung/Austausch von Substituenten auf Aromaten oder Seitenketten, Änderung des Substituentenmusters, oder (ix) Modifikation durch Einführung von isosterischen oder bioisosterischen Resten, oder (x) Synthese von homologen Verbindungen oder (xi) Einführung von verzweigten Seitenketten, oder (xii) Umwandlung von Alkylsubstituenten zu cyclischen Analoga, oder (xiii) Derivatisierung von Hydroxylgruppen zu Ketalen, Acetalen, oder (xiv) N-Acetylierung zu Amiden, Phenylcarbamaten, oder (xv) Synthese von Mannich-Basen, Iminen, oder (xvi) Transformation von Ketonen oder Aldehyden zu Schiff-Basen, Oximen, Acetalen, Ketalen, Enolestern, Oxazolidinen, Thiozolidinen oder Kombinationen davon: Weiterhin umfasst das erfindungsgemässe Verfahren das Formulieren des Produkts dieser Modifikation mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder einem Träger/Verdünnungsmittel, der/das für den Geruch oder den Geschmack von Zusammensetzungen oder Produkten geeignet ist.

[0053] Ausserdem betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung solcher Inhibitoren der katalytischen Aktivität der Heparanase, die durch die erfindungsgemässen Verfahren identifiziert wurden, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten und Krebs, insbesondere von Tumorangiogenese und Metastasierung.

[0054] Die vorliegende Erfindung wurde nun allgemein beschrieben, zum besseren Verständnis sind die spezifischen Beispiele, die hier lediglich der Erläuterung dienen und in keiner Weise die Erfindung einschränken sollen, sofern nicht anders angegeben, in Verbindung mit den folgenden Figuren angegeben.

[0055] Die Abbildungen zeigen:

- In Fig. 1A sind die Produkte der Heparanase-Spaltung von F₂FITC-HS graphisch dargestellt, die aus einer Superose 6-FPLC eluiert wurden.
- In Fig. 1B sind die Produkte der Heparanase-Spaltung von ³H-HS graphisch dargestellt, die aus einer Superose 6-FPLC eluiert wurden.
- In Fig. 2 ist die von der FGF-Konzentration abhängige Bindung an Mikrotiterplatten bei pH 7,5 und pH 9,5 graphisch dargestellt.
- In Fig. 3 ist die von der F₂FITC-HS-Konzentration abhängige Bindung an die FGF-beschichteten Platten graphisch dargestellt.
- In Fig. 4 ist die Heparanase-Aktivität der exprimierten Produkte aus den transfizierten CHO-Zellen graphisch dargestellt.
- In Fig. 5 ist die von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von F₂FITC-HS auf den FGF-beschichteten Platten graphisch dargestellt.
- In Fig. 6 ist eine Superose 6-FPLC-Elution des Heparanase-Spaltprodukts aus dem F₂FITC-HS/FGF-Heparanase-Test graphisch dargestellt.
- In Fig. 7 ist der zeitliche Ablauf der Heparanase-Spaltung graphisch dargestellt.
- In Fig. 8 ist die pH-Abhängigkeit der Heparanase-Aktivität graphisch dargestellt.
- In Fig. 9 ist ein Streudiagramm der Platten-Nummern zu den Fluoreszenz-Einheiten (FU) im F₂FITC-HS/FGF-Test dargestellt, es zeigt das gesamte Heparanase-Aktivitäts-Signal, d.h. die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Spaltprodukts nach Zugabe der Heparanase ohne einen möglichen Inhibitor, und es zeigt das Hintergrundsignal, d.h. die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Testpuffers.

- In Fig. 10 ist ein Streudiagramm dargestellt, das die berechneten Z'-Faktoren für die angegebenen Platten zeigt.
- In Fig. 11A ist die von der Eu-HS-Konzentration abhängige Bindung an die FGF-beschichteten Platten graphisch dargestellt.
- In Fig. 11B ist ein Diagramm der Heparanase-Konzentration zu den zeitaufgelösten fluorometrischen Einheiten (TRF) dargestellt, das die von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von Eu-HS auf den FGF-beschichteten Platten zeigt.
- In Fig. 12A ist die von der F₂FITC-HS-Biotin-Konzentration abhängige Bindung an SA-beschichtete Platten graphisch dargestellt.
- In Fig. 12B ist die von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von F₂FITC-HS-Biotin auf den SA-beschichteten Platten graphisch dargestellt.
- In Fig. 13A ist die von der Eu-HS-Biotin-Konzentration abhängige Bindung an SA-beschichtete Platten in einem Diagramm von Konzentration zu den gemessenen TRF graphisch dargestellt.
- In Fig. 13B ist die von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von Eu-HS-Biotin auf den SA-beschichteten Platten in einem Diagramm von Konzentration zu den gemessenen TRF graphisch dargestellt.

Beispiele

[0056] Bei den folgenden Beispielen wurde das Heparansulfat aus der Rinderniere von Seikagaku Corp. bezogen, Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC «Isomer I») und Oregon Green 488 Isothiocyanat (F₂FITC) wurden von Molecular Probes bezogen. Das DELFIA Eu-DTPA-ITC-Chelat, das Waschkonzentrat, die Verstärkungslösung stammten von Perkin-Elmer Life Sciences. Biotin-LC-Hydridze wurde von Pierce bezogen. N-Acetylmannosamin stammte von Lancaster. Rinderseumalbumin (BSA), Triton X 100 und Tween 20 wurden von Roche Molecular Biochemicals bezogen.

Beispiel 1: Clonierung, Expression und Reinigung von FGF

[0057] bFGF wurde wie beschrieben cloniert und exprimiert (Prats, H., et al. (1989), High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1836–1840. E. coli-Zellen, die bFGF exprimieren, wurden in Lysepuffer (20 mM NaPO₄, 5 mM EDTA, pH 7,0) in einem Verhältnis von 1 g Zellen/5 ml Lysepuffer suspendiert. Protease-Inhibitorcocktail-Tabletten (EDTA-frei; Roche Molecular Biochemicals) und Lysozym (200 µg/ml) wurden zugegeben und die Suspension 30 Minuten bei 4°C gerührt. Die Probe wurde beschallt, RNAase und DNAase (Roche Molecular Biochemicals) wurden zugefügt (1 µg/ml) und die Probe weitere 30 Minuten inkubiert. Nach der Zentrifugation der Probe bei 20 000 × g, 20 Minuten, wurde der Überstand durch ein 0,8-µm-Filter filtriert und auf eine SP-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit 20 mM NaPO₄, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,0, äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit dem Äquilibrierungspuffer wurde der bFGF aus der Säule mit 20 mM NaPO₄, 600 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,0, eluiert. Die eluierte Fraktion wurde eingengt und auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit dem SP-Sepharose-Elutionspuffer äquilibriert worden war. Der bFGF wurde mit 20 mM NaPO₄, 2 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,0, eluiert. Der gereinigte bFGF wurde nach Zugabe von 1 mM DTT zu der Probe eingengt. Um die Oligomerbildung zu induzieren, wurde der eingengte bFGF 72 Stunden bei 4°C gegen Dialysepuffer (50 mM NH₄HCO₃, 50 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert, der mehrfach ausgetauscht wurde.

Beispiel 2: Clonierung, Expression und Reinigung von Heparanase

[0058] Ein cDNA-Clon der menschlichen Heparanase der vollen Länge wurde von der ATCC bezogen. Unter Verwendung der in GenBank veröffentlichten Sequenz (Hinterlegungsnummer AF152 376) wurden Oligos entworfen, um das aus 1632 bp bestehende offene Leseraster (ORF) zu PCR-amplifizieren, während gleichzeitig (i) Restriktionsstellen für die Subclonierung angefügt wurden (5'-KpnI-3'-NotI), (ii) am C-Terminus des ORF ein 6-Aminosäuren-Epitop tag angehängt wurde («EE-tag», NH₂-EFMPME-COOH), wobei davor ein flexibler 4-Aminosäuren-Linker (SGSG) liegt und dahinter ein einzelner Ala-Rest folgt, der vor dem STOPP-Codon liegt.

[0059] Der Vorwärts-Primer (SEQ ID NO: 1) war
5'-GGGTACCATGCTGCTGCGCTCGAAGCCTGCGCTGCCGCCGCGCTGATGCTG-3'

[0060] Der Rückwärts-Primer (SEQ ID NO: 2) war
5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACGCTTCCATCGGCATGAATTCACCAGAACAGAGATGCAAGCAGCAACTTTGG-CATTTCCTATCACAAAAAACTATATGAG-3'

[0061] Das Amplicon wurde unter Verwendung einer «proof-reading» Polymerase und des ATCC-Plasmids als Matrize erhalten. Das resultierende Amplicon wurde mit KpnI und NotI gespalten und in den Säuger-Expressionsvektor pEFBOS

subcloniert. Die Sequenz des clonierten ORF wurde bestätigt, bevor CHO-Zellen mit dem Heparanase-Expressionskonstrukt und einem NEO-Selektionsplasmid co-transfiziert wurden.

[0062] Dihydrofolat-Reduktase-defekte Zellen des Chinesischen Hamsters (CHOdhfr-) wurden als Wirt für die Transfektion verwendet. Die Zellen (2×10^5 Zellen pro Vertiefung) wurden auf DMEM, angereichert mit 10% (Vol./Vol.) FBS plus 100 μM Natriumhypoxanthin und 16 μM Thymidin ($1 \times \text{HT}$), in einer Gewebekulturplatte mit sechs Vertiefungen gezüchtet. Die Transfektion erfolgte durch Zugabe von 0,5 μg Plasmid-DNA, codiert für die Heparanase (pEF-BOS), Neomycin-Resistenz-Gen (pRSV-Neo) und Dihydrofolat-Reduktase-Gen (pSV-dhfr), in einem Verhältnis von 15:1:1 in Gegenwart von 2 μl FuGene6-Reagens (Roche Molecular Biochemicals) zu der Kultur. Nach 72 Stunden Inkubation in einem 37°C-CO₂-Inkubator wurde das Kulturmedium durch HT-minus-DMEM ersetzt, das mit 10% dialysiertem FBS angereichert war. Die transfizierte Kultur wurde weiter vier bis acht Wochen inkubiert, wobei das Medium dreimal pro Woche ausgetauscht wurde. Anschliessend wurden die im Selektivmedium überlebenden Zellen auf 150-mm-Schalen überführt, die mit 1×10^6 Zellen/Schale in HT-minus-DMEM, enthaltend 10% dialysiertes FBS und zunehmende Konzentrationen von Methotrexat (MTX) von 0,1 bis 3,0 μM , angesät wurden. Aus über 100 Kolonien wurde ein mit CHO33 bezeichneter Clon selektiert, der eine Heparanase-Aktivität zeigte. Die Expression von Heparanase durch den Clon CHO33 ist etwa viermal höher als die durch die nicht-transfizierten CHO-Zellen.

[0063] Die Produktion der Heparanase mit dem Clon CHO33 erfolgte durch die folgenden zwei Verfahren:

- Heparanase-Produktion in Rollerflaschen: Corning 850-cm²-Rollerflaschen wurden verwendet. Jede Flasche wurde beimpft mit $2,4 \times 10^7$ Zellen in 150 ml DMEM, angereichert mit 10% (Vol./Vol.) dialysiertem FBS plus 3 μM MTX und 25 mM Hepes-Puffer. Ein Ansatz mit 100 Flaschen wurde bearbeitet, indem die Flaschen fünf bis sieben Tage auf einem Rollerflaschen-Ständer inkubiert wurden, wobei sie mit einer Geschwindigkeit von fünf Umdrehungen pro Minuten gerollt wurden. Nach einer Trypsin-Behandlung wurden die Zellpellets aus den Flaschen nach Waschen mit Phosphat-Kochsalzlösung-Puffer abzentrifugiert.
- Heparanase-Produktion in Suspensionskultur: Ein 10-L-Bioreaktor, enthaltend 7 L Excel 301-Medium (JRH), angereichert mit 5% dialysiertem FBS, 3 μM MTX, 0,1% «pluronic acid» und 25 mM Hepes, wurde mit einer CHO33-Kultur beimpft, so dass eine anfängliche Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml erhalten wurde. Die Suspensionskultur wurde vier bis fünf Tage bei 35°C inkubiert, bis die Zelldichte 3×10^6 erreichte. Danach wurden die Zellen für die Isolierung und Reinigung der Heparanase geerntet.

[0064] CHO-Zellen, die Heparanase exprimierten, wurden in Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, pH 7,5) bei 2×10^7 Zellen/ml suspendiert, Protease-Inhibitorcocktail-Tabletten (Roche Molecular Biochemicals) wurden zugegeben und die Probe kurz beschallt. Anschliessend wurde die Probe 30 Minuten bei 4°C gerührt, worauf eine Zentrifugation bei $100\,000 \times g$, 60 Minuten, folgte. Die lösliche Fraktion («100kxg-sup») wurde durch 0,8- und 0,45- μm -Filter laufen gelassen und für enzymatische Tests verwendet. Um zu bestätigen, dass die in der «100kxg-sup»-Fraktion festgestellte Aktivität auf der Heparanase beruhte, wurde eine kleine Menge Heparanase im Wesentlichen wie durch ein Verfahren beschrieben gereinigt (Prats, H., et al. (1989), High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1836–1840).

Beispiel 3: Herstellung von Fluorescein-markiertem HS (FITC-HS oder F₂FITC-HS)

[0065] HS wurde mit Oregon Green 488 Isothiocyanat (F₂FITC) und ein anderes HS wurde mit Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) durch das Verfahren wie beschrieben markiert. Typischerweise wurde HS aus Rinderniere (60 mg) in 16 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 9,35) gelöst. FITC (94 mg) oder F₂FITC (103 mg) in 0,8 ml DMSO wurde langsam (tropfenweise) zu der HS-Lösung zugegeben und 18 Stunden bei 4°C im Dunkeln gerührt. Die Umsetzung wurde durch 1 M Tris-HCl, pH 8,0, (0,5 ml) abgestoppt, und die Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde die Probe auf eine Sephadex G-25-Säule (2,5 $\times$ 30 cm) in PBS aufgetragen, um das überschüssige FITC-Reagens zu entfernen. Die Fraktionen, die Fluorescein-markiertes HS enthielten, wurden vereinigt. Das Ausmass der Fluorescein-Markierung wurde bestimmt, indem die Absorption bei 490 nm abgelesen wurde ($\epsilon = 72\,000 \text{ M}^{-1}$). Typischerweise betrug das molare Verhältnis von Fluorescein zu HS 0,6.

Beispiel 4: Herstellung von Eu-Chelat-markiertem HS

[0066] HS (3,3 mg) wurde in 0,2 ml 0,2 M Na₂CO₃ (pH 9,35) gelöst. Zu der Lösung wurde DELFIA Eu-DTPA-ITC-Chelat (1 mg in 0,1 ml H₂O) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur und danach 14 Stunden bei 4°C gerührt. Anschliessend wurde die Probe auf eine Sephadex G-50-Säule (feine Qualität, 1,5 cm $\times$ 50 cm) in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) aufgetragen. Vor dem Auftragen der Probe wurden auf die Säule 10 mg BSA (um unspezifische Bindungen zu sättigen) und 20 ml 20 mM EDTA geladen, gefolgt von 60 ml TBS. Die Fraktionen, die Eu-markiertes HS enthielten, wurden vereinigt. Das Ausmass der Markierung wurde durch eine Standardkurve von bekannten Konzentrationen von Eu-Chelat-Lösungen bestimmt. Typischerweise betrug das molare Verhältnis von Eu-Chelat zu HS 0,54.

Beispiel 5: Herstellung von Biotin-HS

[0067] HS (4,5 mg) wurde in 0,2 ml H₂O gelöst, gefolgt von 0,6 ml Methanol. Die Lösung wurde mit 5,0 mg festem Biotin-LC-Hydridid und anschliessend 4 μl 0,5 M NaHCO₃ in 10% Methanol versetzt. Die Umsetzung liess man einen Tag

bei 50°C ablaufen. Danach wurde NaCNBH_3 (25 mg) zu der Lösung zugefügt. Die Lösung wurde durch Zugabe von 0,2 ml H_2O geklärt. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Tage bei 50°C inkubiert. Noch zwei weitere Mengen (jeweils 25 mg) von NaCNBH_3 wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch nach jeder Zugabe zwei Tage bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Probe durch Vakuumzentrifugation auf 0,3 ml eingeeengt, mit H_2O auf 0,5 ml verdünnt und auf eine Sephadex G-25-Säule in PBS aufgetragen. Die Fraktionen, die HS enthielten, wurden vereinigt, und der pH-Wert wurde durch Zugabe von 30 μl 1 M Na_2CO_3 auf 9,4 eingestellt.

Beispiel 6: Herstellung von Fluorescein-markiertem Biotin-HS (FpFITC-HS-Biotin)

[0068] F_2FITC (0,8 mg in 80 μl DMSO) wurde zu der Biotin-HS-Lösung von Beispiel 5 unter Rühren zugegeben, sodann liess man die Umsetzung über Nacht im Dunkeln bei 4°C ablaufen. Die Probe wurde auf eine Sephadex G-25-Säule aufgetragen und mit PBS eluiert. Die Fraktionen, die F_2FITC -markiertes Biotin-HS enthielten, wurden vereinigt. Das Ausmass der Fluorescein-Markierung wurde bestimmt, indem die Absorption bei 490 nm abgelesen wurde. Das molare Verhältnis von Fluorescein zu HS betrug 0,6.

Beispiel 7: Herstellung von Eu-Chelat-markiertem Biotin-HS (Eu-HS-Biotin)

[0069] Zu der Biotin-HS-Lösung (0,34 ml, 4,5 mg/ml in PBS), die wie in Beispiel 5 beschrieben hergestellt wurde, wurden 6,5 mg Na_2CO_3 zugegeben, um den pH-Wert auf 9,4 einzustellen. Eu-DTPA-ITC-Chelat (1 mg) wurde in 0,1 ml 10 mM Natriumacetat (pH 4,8) gelöst und 50 μl dieser Lösung unter Rühren zu der Biotin-HS-Lösung zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei 25°C geschüttelt, worauf 15 Stunden bei 4°C und weitere vier Stunden bei 25°C folgten. Danach wurden die Proben auf eine Sephadex G-50-Säule (feine Qualität, 1,5 cm $\times$ 50 cm) in TBS aufgetragen. Vor dem Auftragen der Probe wurden auf die Säule 10 mg BSA (um die unspezifischen Bindungen zu sättigen) und 20 ml 20 mM EDTA geladen, gefolgt von 60 ml TBS. Die Fraktionen, die Eu-markiertes HS enthielten, wurden vereinigt. Das Ausmass der Markierung wurde durch eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen von Eu-Chelat-Lösungen bestimmt. Das molare Verhältnis von Eu-Chelat zu HS betrug 0,34.

Beispiel 8: Herstellung von ^3H -markiertem HS

[0070] ^3H -markiertes HS wurde wie früher beschrieben (Toyoshima, M., and Nakajima, M. (1999), Human heparanase-purification, characterization, cloning, and expression; J. Biol. Chem. 274, 24153–24160) hergestellt. Typischerweise wurde HS (10 mg) in 0,38 ml Hydrazinhydrat, enthaltend 7,6 mg Hydrazinsulfat, gelöst und das Gemisch in einem verschlossenen Glasgefäss zwei Stunden auf 100°C erhitzt. Das Gemisch wurde abgekühlt und unter Argon getrocknet. Toluol (0,4 ml) wurde zugegeben und das Gemisch durch Rotationsvakuumverdampfung getrocknet. Diese Vorgehensweise wurde zweimal wiederholt. Der Rückstand wurde in 0,9 ml 1 M NaCl gelöst und auf einer Sephadex G-25-Säule in Wasser entsalzt. Das entsalzte Material wurde auf eine Dowex 50-Säule (X-8, Na^+ -Form) (1,0 cm $\times$ 3,0 cm) aufgetragen und mit 5 ml Wasser gewaschen. Die „Durchfluss“- und „Wasch“-Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Das resultierende N-desacetylierte HS wurde in 0,5 ml 0,5 M NaHCO_3 , enthaltend 10% (Vol./Vol.) Methanol, gelöst, in einem Eisbad auf 0°C gekühlt und mit 30 μl [^3H]-Essigsäureanhydrid (3 mCi, 500 mCi/mMol) in Toluol versetzt. Das Gemisch wurde drei Stunden kräftig bei 0°C gerührt. Sodann wurden weitere 0,5 ml 0,5 M Na_2CO_3 , 20 μl MeOH und 25 μl Essigsäureanhydrid unter Rühren für 30 Minuten bei 0°C zugegeben. Dieses Verfahren wurde noch einmal wiederholt. Nachdem sich das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt hatte, wurde das Toluol unter einem Argon-Strom entfernt und die Lösung auf einer Sephadex G-25-Säule in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,8, entsalzt. Das [^3H]-markierte HS wurde vereinigt und die Aliquots bei –20°C gelagert.

Beispiel 9: Heparanase-Test unter Verwendung von FITC-HS oder F_2FITC -HS und FGF-beschichteten Platten (FITC-HS/FGF-Test)

[0071] FGF (1,97 mg/ml) wurde mit PBS auf 18,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und zur Beschichtung von feste schwarze Hochbindungs-Platten mit 384 Vertiefungen von Costar (40 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$) über Nacht bei 4°C verwendet. Die Platten wurden mit 1% BSA/PBS (60 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$) eine Stunde bei 37°C blockiert und mit PBS/0,02% Tween 20 gewaschen (60 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$, viermal). Sodann wurde FITC-HS oder F_2FITC -HS (0,15 $\mu\text{g}/\text{Vertiefung}/40 \mu\text{l}$ in PBS, 1% BSA, 0,02% Tween 20) zugegeben und eine bis eineinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit PBS/0,02% Tween 20 gewaschen (60 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$, dreimal). Die rohe Heparanase aus transfizierten CHO-Zellen (1 μl von «100kxg-sup» von Beispiel 2, enthaltend 5 μg Gesamtprotein in Lysepuffer) und die gereinigte Heparanase (20 ng) wurden jeweils mit 40 μl Testpuffer (50 mM Natriumacetat, pH 5,0, 0,2 mg/ml BSA, 5 mM N-Acetyl-mannosamin, 0,05% Triton X 100) verdünnt, in jede Vertiefung zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 5 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$ 1 M Tris-HCl, pH 8,0, abgestoppt. Anschliessend wurde die Lösung (35 $\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$) auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz (Anregung bei 485 nm und Emission bei 535 nm) auf einem Victor-2-Lesegerät (Perkin Elmer Life Sciences) abgelesen.

Beispiel 10: Heparanase-Test zum Screening mit hohem Durchsatz (HTS) unter Verwendung von FITC-HS auf FGF-beschichteten Platten

[0072] Der HTS-FITC-HS/FGF-Heparanase-Test wurde anhand eines Zeiss-uHTS-Systems durchgeführt, das aus einem Pipettiergerät für 384 Vertiefungen, drei Pipettiergeräten für 96 Vertiefungen, zwei Waschvorrichtungen, zwei «Multidrop»-Spendern, vier «Cybidrop»-Spendern, drei Inkubatoren und zwei Zeiss-HTS-Lesegeräten bestand. Die Mikrotiterplatten (384 Vertiefungen) wurden mit FGF beschichtet, mit BSA blockiert und bis zu drei Wochen bei 4°C aufbewahrt. Die Platten wurden mit PBS/0,02% Tween 20 gewaschen und anschliessend mit FITC-HS inkubiert. Für die Heparanase-Spaltung wurde das rohe Enzym aus dem «100kxg-sup» (1 µl/Vertiefung) von Beispiel 2 verwendet. Alle Schritte zur Bewegung der Platten, zur Übertragung von Flüssigkeiten und die Fluoreszenzmessungen wurden von Automaten durchgeführt.

[0073] Das Gesamtsignal-zu-Hintergrund-Verhältnis betrug 7,5 (Fig. 9) und der durchschnittliche Z'-Faktor war 0,32 (Fig. 10). Mittel wurden identifiziert, die die Fähigkeit besitzen, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, wobei sie mehr als 65% der Aktivität bei einer Konzentration von 25 µM hemmen. Da einige dieser möglichen Inhibitoren fluoreszierende Mittel waren, wurden sie auch im Eu-HS/FGF-Test (Beispiel 11) auf dem Zeiss-uHTS getestet, wobei Mittel, die hierbei ein positives Ergebnis zeigten, als Heparanase-Inhibitoren bestätigt wurden.

Beispiel 11: Heparanase-Test unter Verwendung von Eu(DTPA)-markiertem HS auf FGF-beschichteten Platten (Eu-HS/FGF-Test)

[0074] FGF wurde an Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen wie in Beispiel 9 beschichtet. Die Platten wurden mit 1% BSA/PBS (50 µl/Vertiefung) eine Stunde bei 37°C blockiert und mit TBS gewaschen (60 µl/Vertiefung, dreimal). Eu-markiertes HS (40 µl/Vertiefung, 0,375 µg/ml in TBS, 0,5% BSA, 0,02% Tween 20) wurde zu den Platten zugegeben und diese eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit TBS gewaschen (60 µl/Vertiefung, dreimal). Die rohe Heparanase (1 µl von «100kxg-sup» von Beispiel 2, enthaltend 5 µg Gesamtprotein in Lysepuffer) und die gereinigte Heparanase (20 ng) wurden jeweils mit 40 µl Testpuffer verdünnt (50 mM Natriumacetat, pH 5,4, 0,2 mg/ml BSA, 5 mM N-Acetylmannosamin, 0,025% Triton X 100), in jede Vertiefung zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) abgestoppt. Anschliessend wurde die Lösung (8 µl/Vertiefung) auf eine Mikrotiterplatte überführt und mit 60 µl/Vertiefung der Verstärkungslösung 30 Minuten bei Raumtemperatur gemischt. Das Signal wurde quantitativ bestimmt, indem die Zeit-aufgelöste Fluoreszenz (TRF) bei den Wellenlängen EX (340 nm) und EM (615 nm) auf einem Wallace-Victor-2-Lesegerät abgelesen wurde.

Beispiel 12: HTS-Heparanase-Test unter Verwendung von Eu-HS auf FGF-beschichteten-Platten

[0075] Der Heparanase-Test unter Verwendung von Eu-HS als Substrat wurde auf einem Zeiss-uHTS-System durchgeführt. Die Bewegung der Platten und die Übertragung von Flüssigkeiten wurden von Automaten durchgeführt. Die TFR-Messungen erfolgten getrennt auf einem Victor-2-Lesegerät.

Beispiel 13: Heparanase-Test unter Verwendung von FITC-HS-Biotin (oder F₂FITC-HS-Biotin) auf Streptavidin (SA)-beschichteten Platten (FITC-HS-Biotin/SA-Test)

[0076] Zur Herstellung von FITC-HS-Biotin wurde das HS zuerst mit Biotin-LC-Hydrazid behandelt, um die Biotingruppe an den terminalen Zucker von HS anzuhängen. Das resultierende Imin wurde sodann durch NaCNBH₃ zu dem Amin reduziert. Anschliessend wurde das markierte Material (Biotin-HS) mittels Passage durch eine Gelfiltrationssäule gereinigt und mit FITC markiert, wie oben beschrieben. Fig. 12A zeigt eine konzentrationsabhängige Bindung von F₂FITC-HS-Biotin an die SA-beschichteten Platten. Die Bindung erreichte ein Plateau, wenn 1 µg/Vertiefung von F₂FITC-HS-Biotin verwendet wurde. Für den Heparanase-Test wurden 0,5 µg/Vertiefung von F₂FITC-HS-Biotin eingesetzt. Eine von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung des gebundenen F₂FITC-HS auf den SA-beschichteten Platten ist in Fig. 12B dargestellt.

[0077] Streptavidin (10 µg/ml in PBS, 40 µl/Vertiefung) wurde zur Beschichtung von festen schwarzen «Verstärkungsob-erfläche»-Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen (Becton Dickinson) über Nacht bei 4°C verwendet. Die Platten wurden mit 1% BSA in PBS (40 µl/Vertiefung) eine Stunde bei 37°C (oder über Nacht bei 4°C) blockiert und mit TBS gewaschen (50 µl/Vertiefung, dreimal). F₂FITC-HS-Biotin (40 µl/Vertiefung, 12,5 µg/ml) in 1% BSA, TBS wurde zu den Platten zugefügt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit TBS gewaschen. Da die Biotin/SA-Wechselwirkung extrem fest ist ($K_d = 10^{-16}$ M), wären nur sehr wenige Mittel (z.B. Biotin-ähnliche Mittel) in der Lage, die Wechselwirkung zu blockieren. Die rohe Heparanase (1 µl von «100kxg-sup», enthaltend 5 µg Gesamtprotein in Lysepuffer) oder die gereinigte Heparanase (20 ng) wurde mit 40 µl Testpuffer (50 mM Natriumacetat, pH 5,4, 0,2 mg/ml BSA, 5 mM N-Acetylmannosamin) verdünnt, in jede Vertiefung zugegeben und 25 Minuten bei 37°C inkubiert. 1 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) wurde zugefügt und 35 µl/Vertiefung der Lösung auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz gemessen (Anregung bei 470 nm und Emission bei 535 nm).

Beispiel 14: Heparanase-Test unter Verwendung von Eu-HS-Biotin auf SA-beschichteten Platten (Eu-HS-Biotin/SA-Test)

[0078] Biotin-HS wurde mit Eu(DTPA)ITC markiert. Die Bindung von Eu-HS-Biotin an SA-beschichtete Platten ist in Fig. 13A dargestellt, diese ist ähnlich wie die von F₂FITC-HS-Biotin. Auch eine von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung ist ähnlich wie die von F₂FITC-HS-Biotin (Fig. 13B).

[0079] Die Platten wurden mit Streptavidin beschichtet und mit BSA blockiert, wie vorstehend beschrieben. Das Eu-HS-Biotin (40 µl/Vertiefung, 7,5 µg/ml) in 1% BSA, TBS wurde zu den Platten zugefügt und diese eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit TBS gewaschen. Die rohe Heparanase (1 µl von «100kxg-sup» von Beispiel 2, enthaltend 5 µg Gesamtprotein in Lysepuffer) oder die gereinigte Heparanase (20 ng) wurde mit 40 µl Testpuffer verdünnt (50 mM Natriumacetat, pH 5,4, 0,2 mg/ml BSA, 5 mM N-Acetylmannosamin), in jede Vertiefung zugegeben und 25 Minuten bei 37°C inkubiert. 1 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) wurde zugefügt und 8 µl/Vertiefung der Lösung auf eine Mikrotiterplatte überführt, die 60 µl/Vertiefung der «Verstärkungslösung» enthielt. Die Zeit-aufgelöste Fluoreszenz wurde durch ein Victor-2-Lesegerät gemessen.

[0080] Mittel, bei denen anhand der Eu-HS/FGF-Screening-Tests nachgewiesen wurde, dass sie die Fähigkeit besitzen, die Heparanase zu hemmen, wurden in diesem Test getestet (Eu-HS-Biotin-SA). Die Ergebnisse zeigten, dass die IC₅₀-Werte in beiden Tests ähnlich waren (Ergebnisse nicht dargestellt).

Beispiel 15: TRF-Heparanase-Test unter Verwendung von Eu-HS als Substrat auf FGF-beschichteten Platten

[0081] Um einen TRF-Test für Heparanase zu entwickeln, wurde HS mit Eu-Chelat (DTPA) ITC markiert. Fig. 11A zeigt eine konzentrationsabhängige Bindung von Eu-HS an FGF-beschichtete Platten. Die Bindung erreicht bei 20 ng/Vertiefung von Eu-HS ein Plateau. Eu-HS (15 ng/Vertiefung) wurde mit den FGF-beschichteten Platten inkubiert und gründlich mit TBS gewaschen, das gebundene Eu-HS wurde mit Heparanase gespalten. Fig. 11B zeigt eine zeitabhängige Spaltung von Eu-HS durch die gereinigte Heparanase. Nach 30 Minuten erreichte das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis einen Wert von 8,0.

Beispiel 16: Bestimmung des IC₅₀-Wertes

[0082] Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Mitteln, bei denen eine Heparanase-Hemmaktivität nachgewiesen worden war, wurden die Mittel bei einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Ein Aliquot (4 µl) wurde mit DMSO (16 µl) weiter auf eine Konzentration von 2 mM verdünnt. Eine Verdünnungsreihe von 1:3-Verdünnungen in DMSO wurde durchgeführt, so dass ein Konzentrationbereich von 0,1 µM bis 2 mM erhalten wurde. Jede Probe wurde weiterhin mit Testpuffer 25-fach verdünnt. Sodann wurden Aliquots (30 µl/Vertiefung) zu den Testplatten zugegeben, die die immobilisierten Substrate enthielten. Danach wurde ein Aliquot (20 ng/10 µl/Vertiefung) der gereinigten Heparanase zugefügt und die Platten 20 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) abgestoppt. Die Signale wurden quantitativ bestimmt, indem entweder die Fluoreszenz oder TRF auf einem Victor-2-Lesegerät abgelesen wurde. Die prozentuale Hemmung der katalytischen Aktivität der Heparanase durch ein Mittel bei verschiedenen Konzentrationen wurde durch die folgende Formel berechnet:

% Hemmung = $100 \cdot [1 - (F_s - F_b) / (F_i - F_b)]$, wobei F_s das Fluoreszenzsignal der Probe, die das Mittel enthält, darstellt, F_b das Fluoreszenzsignal in Abwesenheit von Heparanase und Mittel bedeutet, F_i das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von Heparanase, jedoch ohne Mittel darstellt.

Beispiel 17: Kinetische Analyse

[0083] Eine mechanische Analyse von Mitteln, für die bestimmt wurde, dass sie die Heparanase-Aktivität im erfindungsgemässen FGF/markierten Heparanase-Substrat-Test hemmen, erfolgte durch Messung der Heparanase-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen von markiertem HS in Gegenwart der Mittel. Typischerweise wurden verschiedenen Konzentrationen des markierten HS auf den Testplatten immobilisiert. Die Heparanase-Lösungen (mit oder ohne Mittel) wurden sodann zu den Vertiefungen zugegeben (40 µl/Vertiefung), die verschiedenen Konzentrationen des immobilisierten markierten HS enthielten, und die Platten 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) abgestoppt und die Markierung entfernt gemessen. Anschliessend wurden die Heparanase-Aktivitäten der Reaktionslösungen, die kein Mittel enthielten, und die Heparanase-Hemmaktivitäten der Mittel quantitativ bestimmt.

[0084] Die Heparanase-Aktivitäten ohne Inhibitor und mit verschiedenen Konzentrationen eines Hemmstoffs wurden durch doppeltreziproke Darstellung von $1/v$ gegen $1/s$ analysiert, wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit und s die Substratkonzentration ist. Anschliessend wird der Hemmmechanismus (kompetitiv, nicht-kompetitiv, unkompetitiv oder gemischt) eines Inhibitors durch die Steigung und Lage (X- und Y-Achse) der Kurven bestimmt, die bei den verschiedenen Hemmkonzentrationen erhalten wurden.

Beispiel 18: F₂FITC-HS (oder FITC-HS) als Substrat für die Heparanase

[0085] Im Heparanase-Test unter Verwendung von F₂FITC-HS (oder FITC-HS) als Substrat auf FGF-beschichteten Platten (Beispiel 9) wurden die Spaltprodukte durch Gelfiltration-FPLC-Analyse untersucht. Toyoshima berichtete, dass FITC-HS

ein Substrat ist, wenn das molare Verhältnis von FITC zu HS weniger als 1,0 beträgt (Toyoshima, M., and Nakajima, M. (1999), Human heparanase-purification, characterization, cloning, and expression; J. Biol. Chem. 274, 24153–24160). HS wurde mit F₂FITC mit einem molaren Verhältnis von 0,6 markiert. (Das molare Verhältnis von FITC wäre das gleiche.) Um zu bestätigen, dass es sich um ein Heparanase-Substrat handelt, wurden die Spaltprodukte durch Gelfiltration (Superose 6)-FPLC analysiert (Fig. 1A). Zum Vergleich wurde auch [³H]-HS als Substrat mit Heparanase gespalten und die Produkte durch FPLC analysiert (Fig. 1B). In beiden Fällen eluierten die Spaltprodukte an den gleichen Positionen, dies zeigt, dass sowohl FITC-HS als auch [³H]-HS Substrate für die Heparanase sind.

Beispiel 19: Bindung von F₂FITC-HS an FGF-beschichtete Platten

[0086] Untersucht wurde die Bindung von F₂FITC-HS an verschiedenen Konzentrationen von FGF (Oligomerform), der an Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen beschichtet war. Fig. 2 zeigt, dass die Bindung ein Plateau erreichte, wenn die Platten mit einer FGF-Konzentration von 18,75 µg/ml (oder 0,75 µg/40 µl/Vertiefung) beschichtet waren. Ausserdem zeigen die Ergebnisse, dass die F₂FITC-HS-Bindung höher war, wenn der FGF bei einem pH-Wert von 7,5 anstelle von pH 9,5 beschichtet wurde. Wenn das gleiche Experiment unter Verwendung des monomeren FGF durchgeführt wurde (der Form, die durch DTT reduziert wird), war die Bindung geringer. Es ist nicht klar, ob die festgestellte geringere Bindung auf einer geringen Beschichtungseffizienz oder auf einer geringen Bindungsaffinität des monomeren FGF (MW~16 k) beruhte. Es wurde gefunden, dass die F₂FITC-HS-Bindung höher war, wenn der FGF an Costar-«Hochbindungs»-Platten beschichtet wurde, als wenn er an die «regulären» Platten beschichtet wurde. Fig. 3 zeigt eine konzentrationsabhängige Bindung von F₂FITC-HS an FGF, der bei der Konzentration von 18,75 µg/ml beschichtet war. Die Bindung erreichte ein Plateau, wenn 0,1 bis 0,2 µg/Vertiefung von F₂FITC-HS verwendet wurden.

Beispiel 20: Heparanase-Spaltung von F₂FITC-HS auf FGF-beschichteten Platten

[0087] F₂FITC-HS wurde an FGF-beschichtete Platten gebunden und mit dem «100kxg-sup» aus transfizierten CHO-Zellen (Beispiel 2) gespalten. Wie in Fig. 4 dargestellt, stieg die Fluoreszenzintensität im Medium im Vergleich zum Lysepuffer an, dies zeigt, dass F₂FITC-HS-Fragmente bei der Heparanase-Spaltung ins Medium freigesetzt wurden. Bei der Kontrolle, wenn gebundenes F₂FITC-HS mit dem «100kxg-sup» aus nicht-transfizierten Zellen inkubiert wurde, wurde kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz festgestellt. Eine von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von F₂FITC-HS ist in Fig. 5 dargestellt. Die ins Medium freigesetzte Fluoreszenzintensität nahm proportional zu, wenn steigende Mengen Heparanase eingesetzt wurden.

Beispiel 21: Gemessene Fluoreszenzintensität aufgrund einer Heparanase-Spaltung von F₂FITC-HS

[0088] Um zu bestätigen, dass die im Medium festgestellte Fluoreszenzintensität auf der Heparanase-Spaltung von F₂FITC-HS beruhte, wurden vier Experimentreihen durchgeführt. Erstens wurden die Spaltprodukte der Heparanase-Spaltung im Medium durch Superose 6-FPLC analysiert (Fig. 6). Das fluoreszierende Material wurde langsamer eluiert als das von intaktem F₂FITC-HS, dies zeigt, dass es sich hierbei um F₂FITC-HS-Fragmente handelte, die durch die Heparanase-Reaktion erzeugt wurden. Zweitens wurde eine zeitabhängige Heparanase-Spaltung von F₂FITC-HS durchgeführt. Das Ausmass der Hydrolyse wurde durch die Freisetzung von gespaltenen Fragmenten ins Medium registriert, wobei das nicht-gesplante Material auf der Platte verblieb. Wie in Fig. 7 zu sehen ist, nahm die Fluoreszenzintensität im Überstand während der Spaltung zu, während die Fluoreszenzintensität, die mit der Platte assoziiert war, abnahm, dies zeigt, dass das intakte F₂FITC-HS gespalten und ins Medium freigesetzt wurde. Drittens wurde die Heparanase-Aktivität in dem «100kxg-sup» bei verschiedenen pH-Werten gemessen, wobei gefunden wurde, dass der optimale pH-Wert für die Aktivität 5,1 betrug (Fig. 8), dies stimmt mit den veröffentlichten Ergebnissen überein (Freeman, C. und Parish, C. (1998), Human platelet heparanase: Purification, characterization and catalytic activity; Biochem. J. 330, 1341–1350). Viertens wurde das F₂FITC-HS mit der gereinigten Heparanase gespalten. Eine konzentrationsabhängige Spaltungskurve wurde festgestellt, die ähnlich war wie die Kurve in Fig. 4. Weitere Informationen bezüglich der Figuren sind wie folgt:

Fig. 1: Analyse von Heparanase-gespaltenen Produkten durch Superose 6-FPLC

[0089] (A) F₂FITC-HS (20 µl, 1,9 mg/ml) wurde mit 80 µl 50 mM Natriumacetat, pH 5,0, 0,1 mg/ml BSA und 5 mM N-Acetylmannosamin verdünnt. Ein Aliquot (20 µl) wurde mit der Heparanase, die durch transfizierte CHO-Zellen exprimiert wurde, d.h. «100kxg-sup» (5 µl in Lysepuffer, wie im Beispiel 2 beschrieben), 20 Stunden bei 37°C gespalten. Anschliessend wurde die Probe mit PBS verdünnt und auf eine Superose 6-FPLC in PBS mit einer Fliessrate von 0,25 ml/Min. aufgetragen. Gesammelt wurden 0,5 ml pro Fraktion. Aus jeder Fraktion wurde ein Aliquot (25 µl) entnommen und für die Fluoreszenz-Bestimmung auf eine Mikrotiterplatte mit 384 Vertiefungen überführt.

[0090] (B) ³H-markiertes HS (20 µl, 2,6 mg/ml) wurde mit dem Puffer wie in (A) beschrieben verdünnt. Ein Aliquot (20 µl) wurde mit Heparanase gespalten und die Produkte durch Superose 6-FPLC wie in (A) beschrieben analysiert. Die Radioaktivität in jeder Fraktion wurde durch einen Szintillationszähler gemessen.

Fig. 2: Von der FGF-Konzentration abhängige Beschichtung bei zwei verschiedenen pH-Werten

[0091] FGF (1,81 mg/ml) wurde entweder mit PBS (pH 7,5) oder mit 50 mM Na₂CO₃ und 100 mM NaCl (pH 9,5) auf verschiedene Konzentrationen verdünnt (2,5 µg/ml bis 50 µg/ml). Aliquots (40 µl/Vertiefung) wurden auf Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen (feste schwarze «Hochbindungs»-Platten von Costar) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden mit 1% BSA in PBS eine Stunde bei 37°C blockiert und mit PBS gewaschen. F₂FITC-HS (1,5 µg/Vertiefung/40 µl in PBS, 1% BSA, 0,02% Tween 20) wurde zugefügt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS/0,02% Tween 20 gewaschen. Anschliessend wurde gebundenes Material mit 0,1% SDS in PBS von den Platten eluiert und anhand der Fluoreszenzintensität quantitativ bestimmt. FU ist eine Fluoreszenzeinheit, die durch das Victor-2-Lesegerät gemessen wurde.

Fig. 3: Von der F₂FITC-HS-Konzentration abhängige Bindung an FGF-beschichtete Platten

[0092] FGF (18,75 µg/ml in PBS) wurde an Platten mit 384 Vertiefungen (40 µl/Vertiefung) bei 4°C über Nacht beschichtet und mit 1% BSA/PBS blockiert. Verschiedene Mengen (0,012 bis 0,375 µg/40 µl/Vertiefung) von F₂FITC-HS in PBS, 1% BSA, 0,02% Tween 20, wurden zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS/0,02% Tween 20 gewaschen. Das gebundene Material wurde mit 0,1% SDS in PBS eluiert und durch Messung der Fluoreszenz quantitativ bestimmt.

Fig. 4: Heparanase-Aktivität aus dem exprimierten Produkt von transfizierten CHO-Zellen

[0093] FGF wurde auf Mikrotiterplatten beschichtet und mit F₂FITC-HS wie beschrieben inkubiert. Das gebundene F₂FITC-HS wurde mit der «100kxg-sup»-Probe aus transfizierten oder nicht-transfizierten CHO-Zellen (1 µl Probe in Lysepuffer verdünnt mit 40 µl Testpuffer in jeder Vertiefung) 30 Minuten bei 37°C behandelt. Als Kontrolle wurde gebundenes F₂FITC-HS auch mit dem Lysepuffer behandelt (1 µl Lysepuffer verdünnt mit 40 µl Testpuffer in jeder Vertiefung). Die Reaktionen wurden durch 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl/Vertiefung) abgestoppt. Für die Bestimmung der Fluoreszenz wurden Aliquots (35 µl/Vertiefung) entnommen.

Fig. 5: Von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von F₂FITC-HS auf FGF-beschichteten Platten

[0094] Der F₂FITC-HS/FGF-Test wurde wie beschrieben durchgeführt, ausser dass verschiedene Mengen von Heparanase in «100kxg-sup» aus transfizierten CHO-Zellen verwendet wurden.

Fig. 6: Superose 6-FPLC-Analyse von Spaltprodukten im F₂FITC-HS/FGF-Test

[0095] Der F₂FITC-HS/FGF-Test unter Verwendung der rohen Heparanase wurde wie beschrieben durchgeführt. Nach der Spaltung wurde das Reaktionsgemisch im Medium (140 µl, kombiniert aus vier Vertiefungen) auf eine Superose 6-FPLC in PBS aufgetragen. Die Fraktionen wurden gesammelt und die Fluoreszenzintensität in jeder Fraktion wie in Fig. 1 beschrieben bestimmt. Als Kontrolle wurde auch intaktes F₂FITC-HS auf eine Superose 6-FPLC aufgetragen und analysiert.

Fig. 7: Zeitlicher Ablauf der Heparanase-Spaltung

[0096] Der F₂FITC-HS/FGF-Test wurde unter Verwendung der rohen Heparanase wie beschrieben durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Spaltung wurde 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0 zu den Vertiefungen zugegeben (5 µl/Vertiefung), um die Reaktionen abzustoppen. Der Überstand wurde für die Analyse der gespaltenen F₂FITC-HS-Fragmente durch Fluoreszenzmessung entnommen (○). Ungespaltenes F₂FITC-HS, das auf den Platten verblieb, wurde durch 0,1% SDS in PBS extrahiert und durch Fluoreszenzmessung analysiert (Δ).

Fig. 8: pH-Abhängigkeit der Heparanase-Aktivität

[0097] FGF wurde auf Mikrotiterplatten beschichtet und diese mit F₂FITC-HS wie beschrieben inkubiert. Die rohe Heparanase wurde in 50 mM Citronensäure-Na₂HPO₄-Puffer bei verschiedenen pH-Werten (3,6 bis 7,0), enthaltend 0,2 mg/ml BSA und 5 mM N-Acetylmannosamin, verdünnt. Anschliessend wurde die Heparanase-Reaktion bei verschiedenen pH-Werten eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Ausserdem wurde gebundenes F₂FITC-HS mit Puffer bei verschiedenen pH-Werten (keine Heparanase) inkubiert und als Hintergrund verwendet. Die Heparanase-Aktivität wurde nach Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz berechnet.

Fig. 9: Signal und Hintergrund des F₂FITC-HS/FGF-Tests auf einem Zeiss-uHTS

[0098] Der F₂FITC-HS/FGF-Test wurde zum Screening nach Inhibitoren auf einem Zeiss-uHTS-System laufen gelassen. Bei jeder Testplatte mit 394 Vertiefungen enthielten die Spalten 1 und 2 nur den Testpuffer (d.h. keine Heparanase und keine Testverbindungen). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität aus diesen Vertiefungen wurde als «Hintergrund» genommen. Die Vertiefungen in den Spalten 3 und 4 enthielten die Heparanase, jedoch keine Testverbindungen. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität aus diesen Vertiefungen wurde als ein «Gesamt-signal» genommen. Diese zwei Werte wurden eingesetzt, um die prozentuale Hemmung durch eine spezifische Verbindung zu berechnen (die Testverbindungen wurden in die Vertiefungen der Spalten 5 bis 24 eingebracht). Um die Qualität der Durchmusterung zu testen, wurden das «Gesamt-signal» und der «Hintergrund» aus den durchgemusterten Platten aufgetragen. Die X-Achse stellt

die Platten-Nummer und die Y-Achse die Fluoreszenzintensität dar. Wenn das «Gesamtsignal» für eine bestimmte Platte höher oder niedriger ist als der Mittelwert plus oder minus zweimal die Standardabweichung ($M \pm 2 \sigma$), wurde diese Platte erneut getestet.

Fig. 10: Z'-Faktor des F₂FITC-HS/FGF-Tests auf dem Zeiss-uHTS

[0099] Der Z'-Faktor wurde aus jeder Testplatte durch die Formel: $Z' \text{-Faktor} = 1 - 3(\sigma_T + \sigma_B) / (m_T - m_B)$ berechnet, wobei m_T = der Mittelwert des Gesamtsignals (die Vertiefungen in den Spalten 3 und 4), m_B = Mittelwert des Hintergrunds (die Vertiefungen in den Spalten 1 und 2), σ_T = die Standardabweichung des Gesamtsignals und σ_B = die Standardabweichung des Hintergrunds. Um die Qualität der Durchmusterung zu bestimmen, wurden die Z'-Faktoren der Platten aufgetragen. Die X-Achse stellt die Platten-Nummer und die Y-Achse den Z'-Faktor dar. Wenn der Z'-Faktor für eine bestimmte Platte niedriger war als der Mittelwert minus zweimal die Standardabweichung ($M - 2 \sigma$), wurde die Platte erneut getestet. Die Z'-Werte, die im Bereich von etwa 0,3 bis 0,7 lagen, zeigen eine Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit des Tests.

Fig. 11: (A) Eu-HS-Bindung an FGF-beschichtete Platten

[0100] Platten mit 384 Vertiefungen wurden mit FGF beschichtet (0,75 µg/40 µl/Vertiefung), anschliessend folgte eine Blockierung mit BSA wie beschrieben. Danach wurden die Platten mit verschiedenen Mengen von Eu-HS eine Stunde bei 37°C inkubiert und mit TBS gewaschen. Anschliessend wurde das gebundene Eu-HS mit 0,1% SDS/TBS (40 µl/Vertiefung) von den Platten eluiert. Ein Aliquot (8 µl) wurde entnommen und für die TRF-Messung mit 60 µl «Verstärkungslösung» gemischt.

(B) Von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von Eu-HS auf FGF-beschichteten Platten

[0101] Der Eu-HS/FGF-Test wurde wie beschrieben durchgeführt, ausser dass verschiedene Mengen der gereinigten Heparanase verwendet wurden.

Fig. 12: (A) F₂FITC-HS-Biotin-Bindung an SA-beschichtete Platten

[0102] Platten mit 384 Vertiefungen wurden mit SA beschichtet, worauf die Blockierung mit BSA wie beschrieben folgte. Anschliessend wurden die Platten mit verschiedenen Mengen von F₂FITC-HS-Biotin eine Stunde bei 37°C inkubiert und mit TBS gewaschen. Danach wurde das gebundene F₂FITC-HS-Biotin mit 0,1% SDS/TBS (40 µl/Vertiefung) von den Platten eluiert und die Fluoreszenz gemessen.

(B) Von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von F₂FITC-HS-Biotin auf SA-beschichteten Platten

[0103] Der F₂FITC-HS-Biotin/SA-Test wurde wie beschrieben durchgeführt, ausser dass verschiedene Mengen der gereinigten Heparanase verwendet wurden.

Fig. 13: (A) Eu-HS-Biotin-Bindung an SA-beschichtete Platten

[0104] Platten mit 384 Vertiefungen wurden mit SA beschichtet, worauf die Blockierung mit BSA wie beschrieben folgte. Anschliessend wurden die Platten mit verschiedenen Mengen von Eu-HS-Biotin eine Stunde bei 37°C inkubiert und mit TBS gewaschen. Danach wurde das gebundene Eu-HS-Biotin mit 0,1% SDS/TBS (40 µl/Vertiefung) von den Platten eluiert. Ein Aliquot (8 µl) wurde entnommen und für die TRF-Messung mit 60 µl «Verstärkungslösung» gemischt.

(B) Von der Heparanase-Konzentration abhängige Spaltung von Eu-HS-Biotin auf SA-beschichteten Platten

[0105] Der Eu-HS-Biotin/SA-Test wurde wie beschrieben durchgeführt, ausser dass verschiedene Mengen der gereinigten Heparanase verwendet wurden.

Sequenzprotokoll

[0106]

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Verfahren zum Screening eines Mittels auf die Fähigkeit zur Hemmung der Heparanase-Aktivität
 <130> G2981 DE
 <150> US 60/341 573
 <151> 2001-12-18
 <160> 2
 <170> PatentIn Version 3.1
 <210> 1
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Künstlich
 <400> 1

gggtaccatg ctgctgcgct cgaagcctgc gctgccgccg ccgctgatgc tg 52

<210> 2
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Künstlich
 <400> 2

atagttagc gccgcctcac gcttccatcg gcataaattc accagaacca gagatgcaag 60
 cagcaacttt ggcatttttt atcacaaaaa aactatatga g 101

Patentansprüche

1. Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Interagieren eines auf einem festen Träger immobilisierten Heparanase-Substrat-bindenden Proteins mit einem markierten Heparanase-Substrat, wodurch ein immobilisiertes markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird,
 - (b) Interagieren einer Heparanase-Enzymlösung mit dem immobilisierten markierten Heparanase-Substrat in Gegenwart des Mittels, und
 - (c) Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger, wodurch bestimmt wird, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Heparanase zu hemmen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Markierung des markierten Heparanase-Substrats mindestens ein Molekül ist, das aus fluoreszierenden, radioaktiven, chemilumineszierenden und chromogenen Molekülen ausgewählt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Fluorophoren Fluorescein, Lanthanid-Chelat und Eu(DPTA)-Chelat umfassen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Fluorescein aus FITC und F₂FITC ausgewählt ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Lanthanid-Chelat aus Europium-Chelat (Eu-Chelat), Samarium-Chelat (Sm-Chelat), Terbium-Chelat (Tb-Chelat) und Dysprosium-Chelat (Dy-Chelat) ausgewählt ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Lanthanid-Chelat ein Eu-Chelat ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Heparanase-Substrat des markierten Heparanase-Substrats aus Heparansulfat, Heparansulfat-Proteoglykan und Heparansulfat-Analoga ausgewählt ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Heparanase-Substrat Heparansulfat ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Heparanase-Substrat-bindende Protein aus Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), VEGF und PDGF ausgewählt ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Heparanase-Substrat-bindende Protein FGF ist.
11. Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit, die katalytische Aktivität der Heparanase zu hemmen, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Interagieren von auf einem festen Träger immobilisierten Molekülen mit einem markierten Heparanase-Substrat, das an eine Immobilisierungsbrücke gebunden ist, wobei die immobilisierten Moleküle an die Immobilisierungsbrücke binden, wodurch ein über die Brücke immobilisiertes, markiertes Heparanase-Substrat bereitgestellt wird,
 - (b) Interagieren einer Heparanase-Enzymlösung mit dem über die Brücke immobilisierten, markierten Heparanase-Substrat in Gegenwart des Mittels, und
 - (c) Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger, wodurch bestimmt wird, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Heparanase zu hemmen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Immobilisierungsbrücke Biotin ist und die immobilisierten Moleküle aus Streptavidin- und Avidin-Molekülen und Gemischen davon ausgewählt sind.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die immobilisierten Moleküle Streptavidin-Moleküle sind.
14. Verfahren zum Testen eines Mittels auf seine Fähigkeit, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und dem Heparanase-Substrat zu hemmen, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Interagieren in Lösung des auf einem festen Träger immobilisierten Mittel und dem markierten Heparanase-Substrat, und
 - (b) Nachweisen des Vorliegens oder der Abwesenheit der Markierung in der Lösung entfernt vom festen Träger, wodurch bestimmt wird, ob das Mittel die Fähigkeit besitzt oder nicht besitzt, die Bindung zwischen dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und dem Heparanase-Substrat zu hemmen.
15. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Identifizierung von Inhibitoren der katalytischen Aktivität der Heparanase.
16. Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 14 zur Identifizierung von Inhibitoren der Bindung zwischen dem FGF und dem Heparanase-Substrat.
17. Kit, umfassend die Komponenten, die zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10 erforderlich sind, ausgewählt aus der Gruppe, die einen festen Träger, ein Heparanase-Substrat-bindendes Protein, das auf dem

festen Träger immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann, ein markiertes Heparanase-Substrat und Heparanase umfasst.

18. Kit, umfassend die Komponenten, die zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 11 bis 13 erforderlich sind, ausgewählt aus der Gruppe, die einen festen Träger, ein Molekül, das auf dem festen Träger immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann und spezifisch an eine Immobilisierungsbrücke bindet, eine Immobilisierungsbrücke, die in der Lage ist, ein Heparanase-Substrat zu binden, ein markiertes Heparanase-Substrat und Heparanase umfasst.
19. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, umfassend die Schritte der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, Modifizieren des identifizierten Mittels und Formulieren des erhaltenen Mittels mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel.

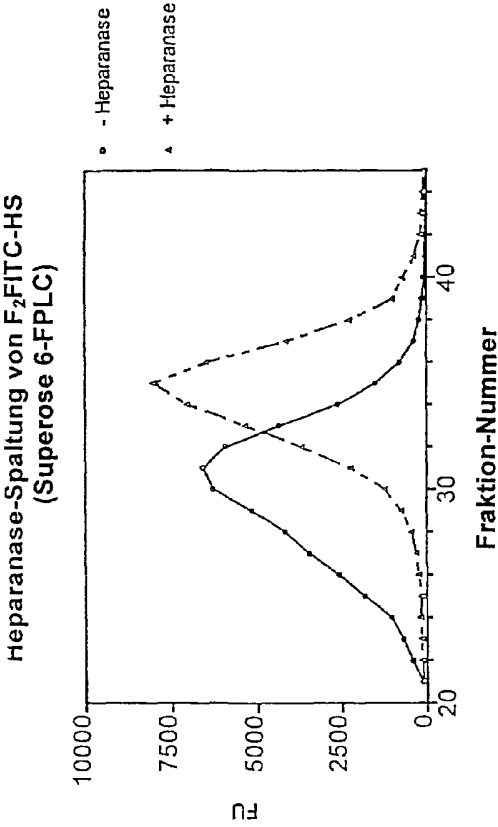


Fig 1A

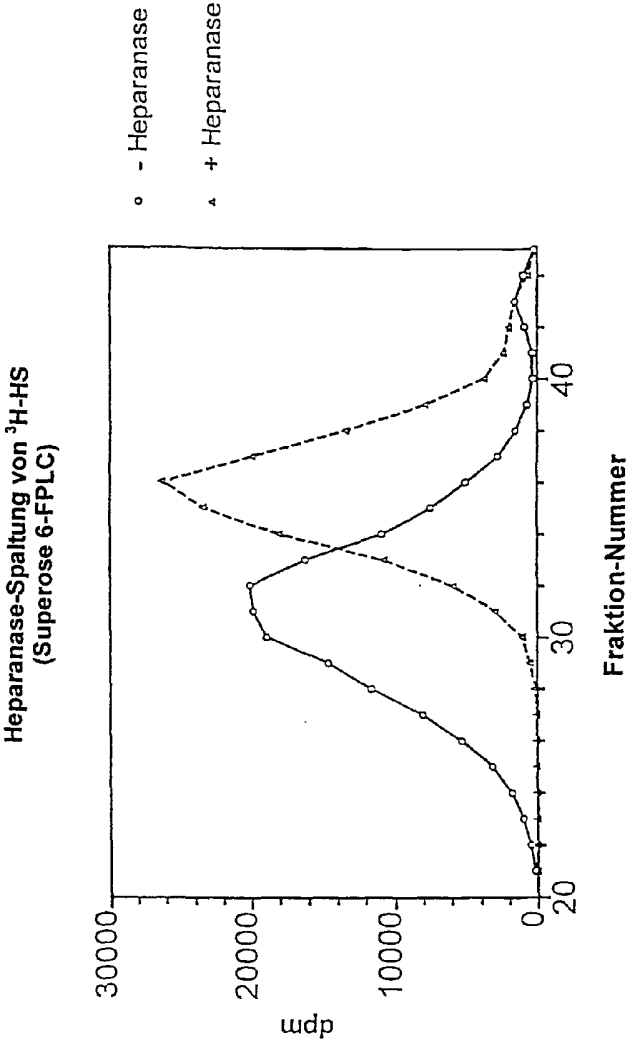


Fig 1B

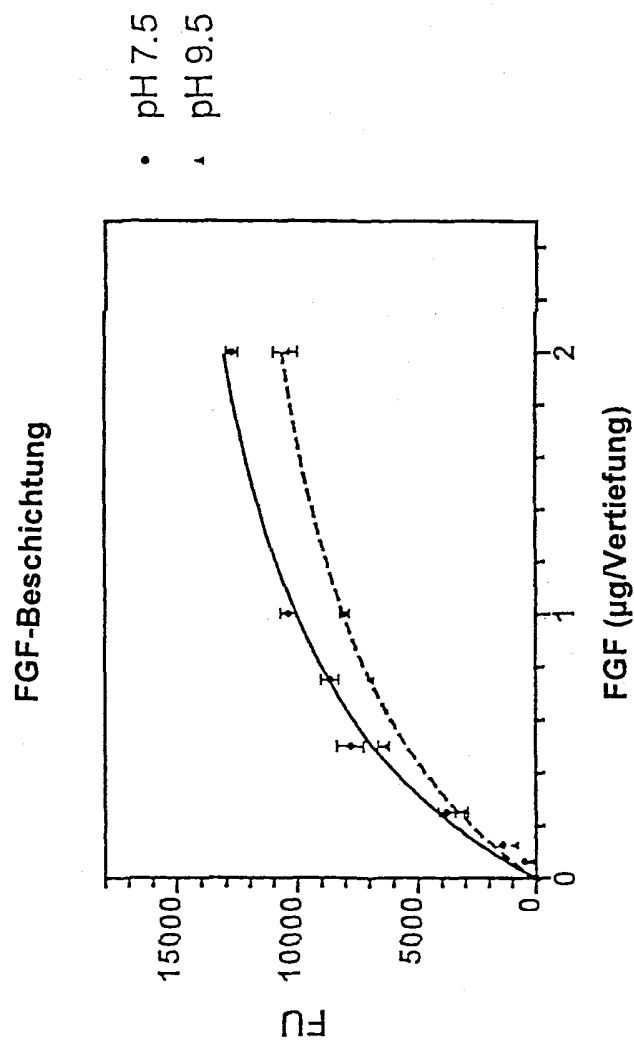


Fig 2

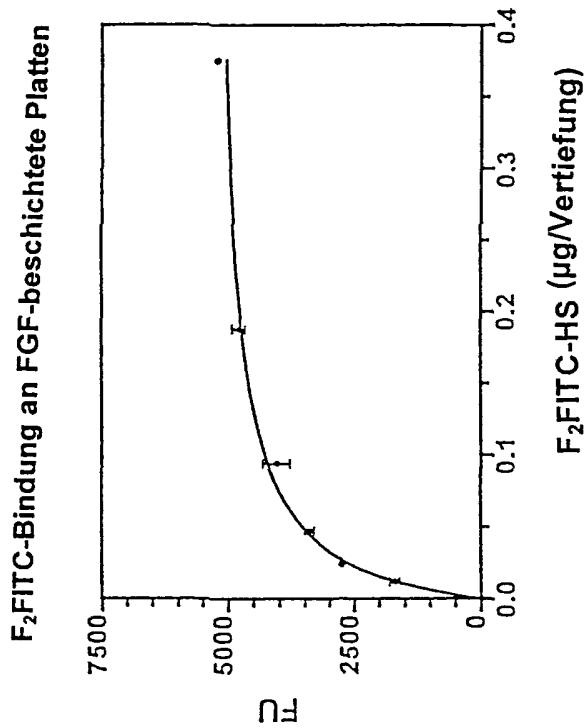


Fig 3

Heparanase-Aktivität in "100kxg-sup
aus transfizierten CHO-Zellen

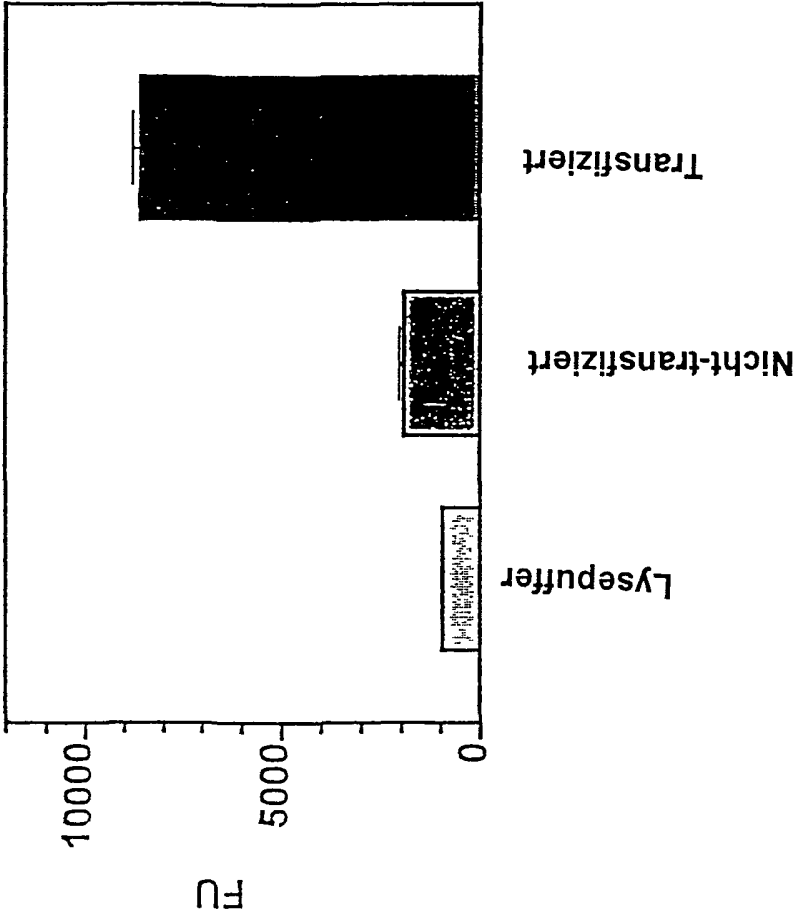


Fig 4

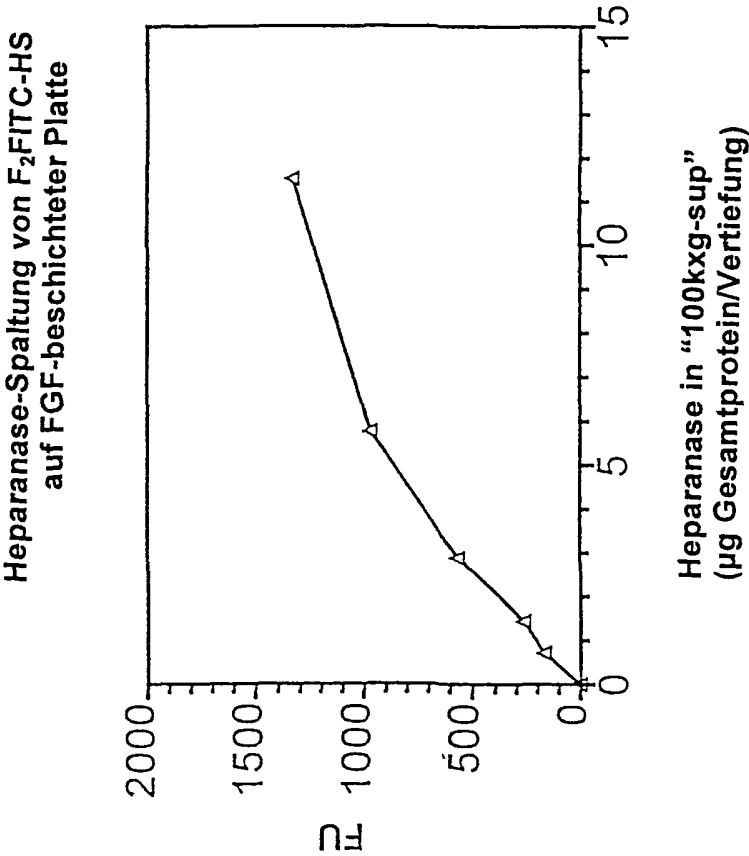


Fig 5

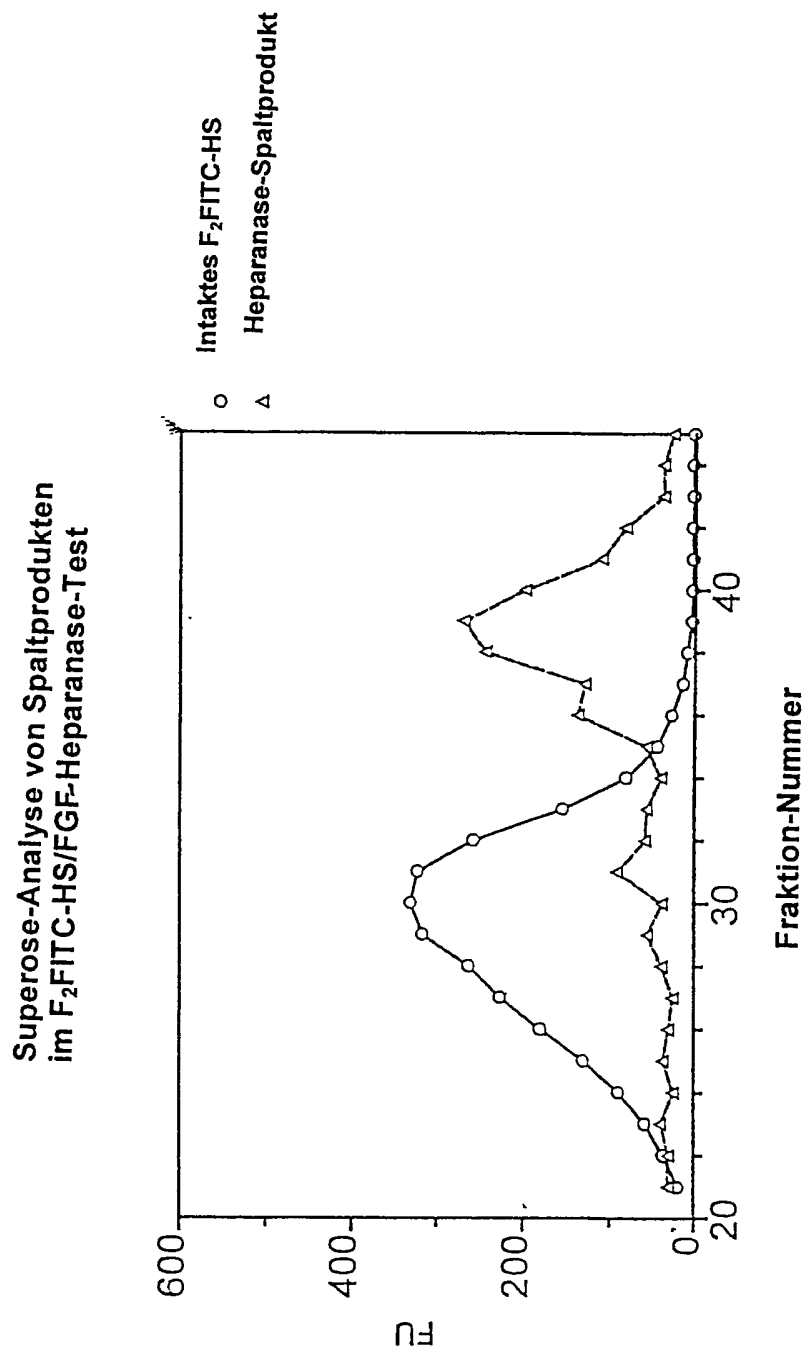


Fig 6

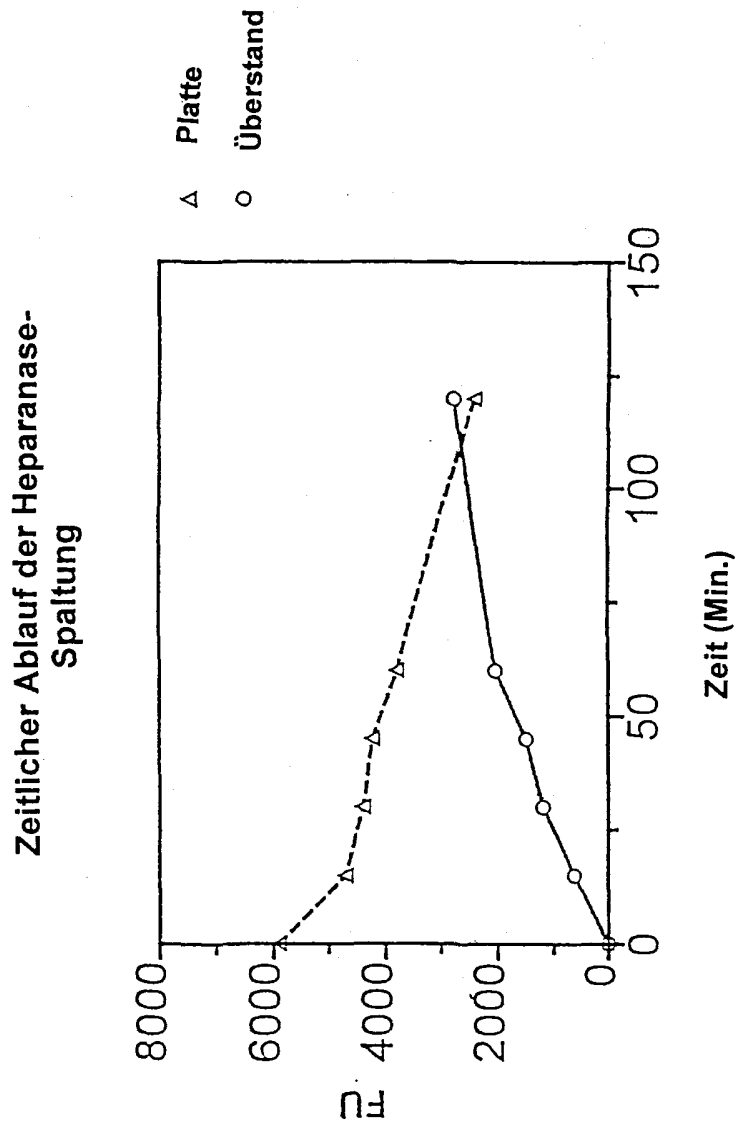


Fig 7

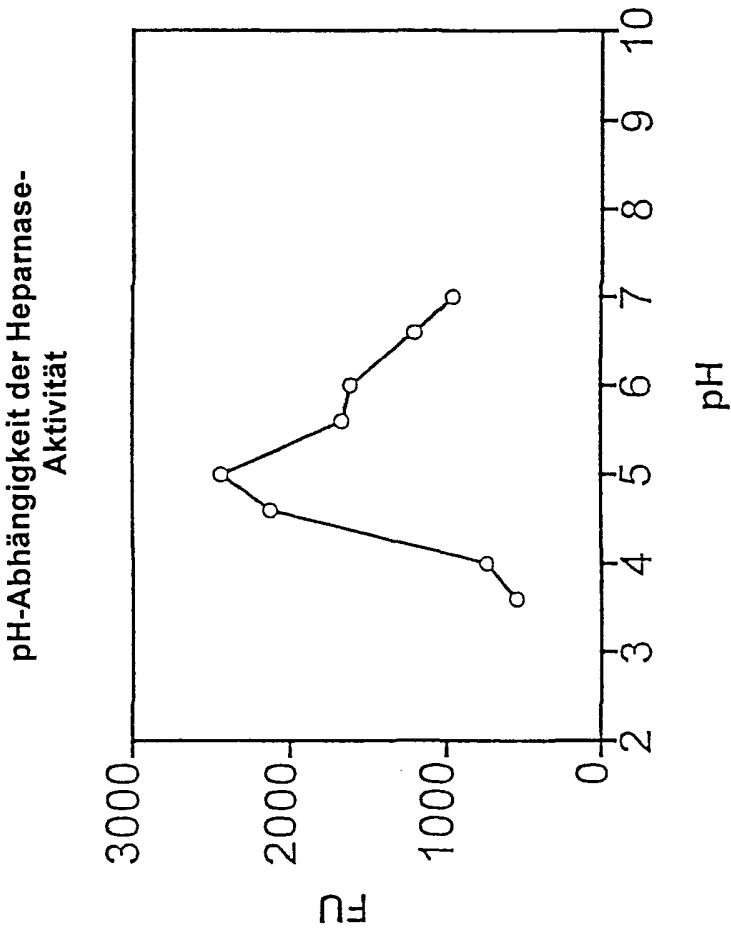


Fig 8

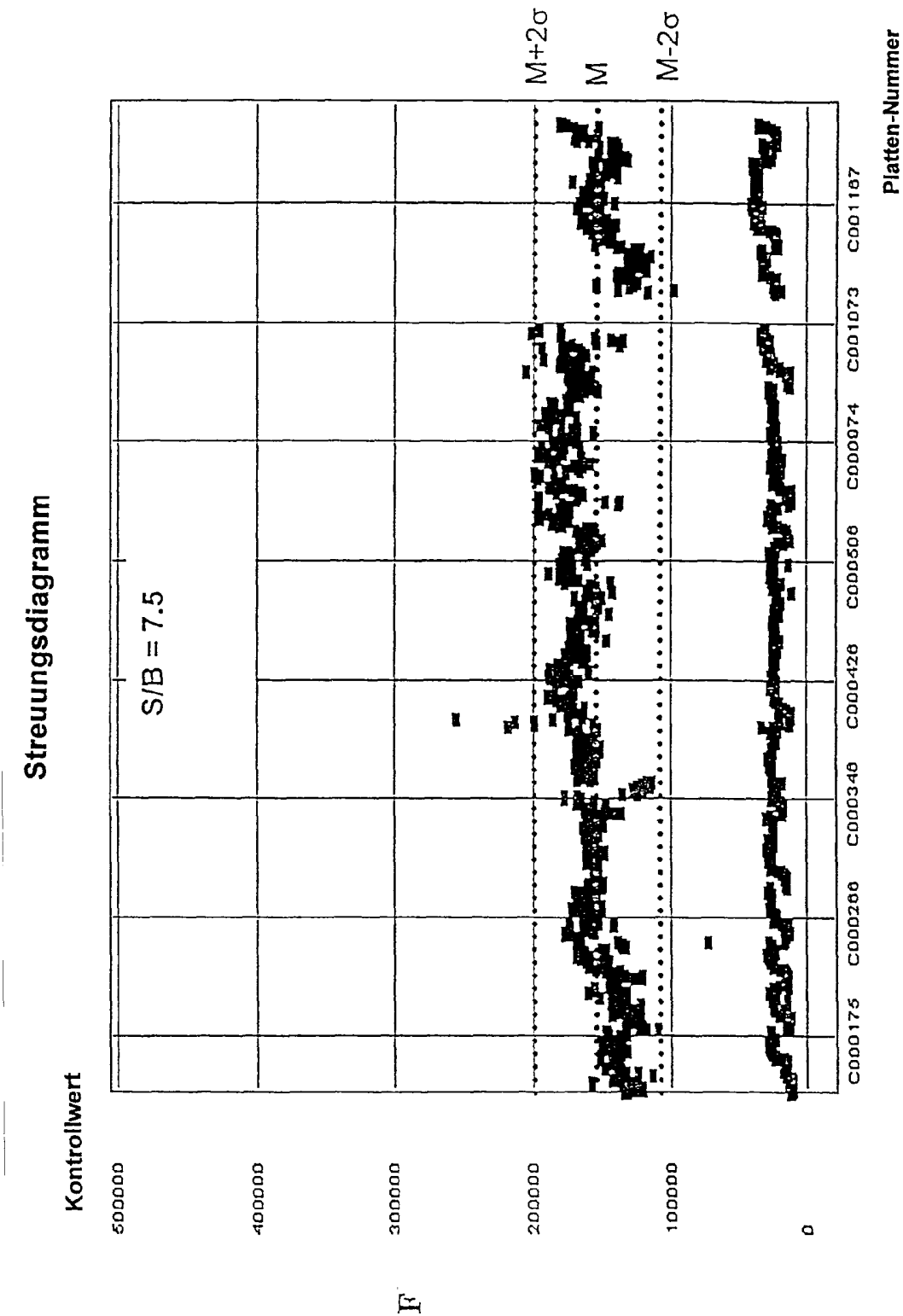


Fig 9

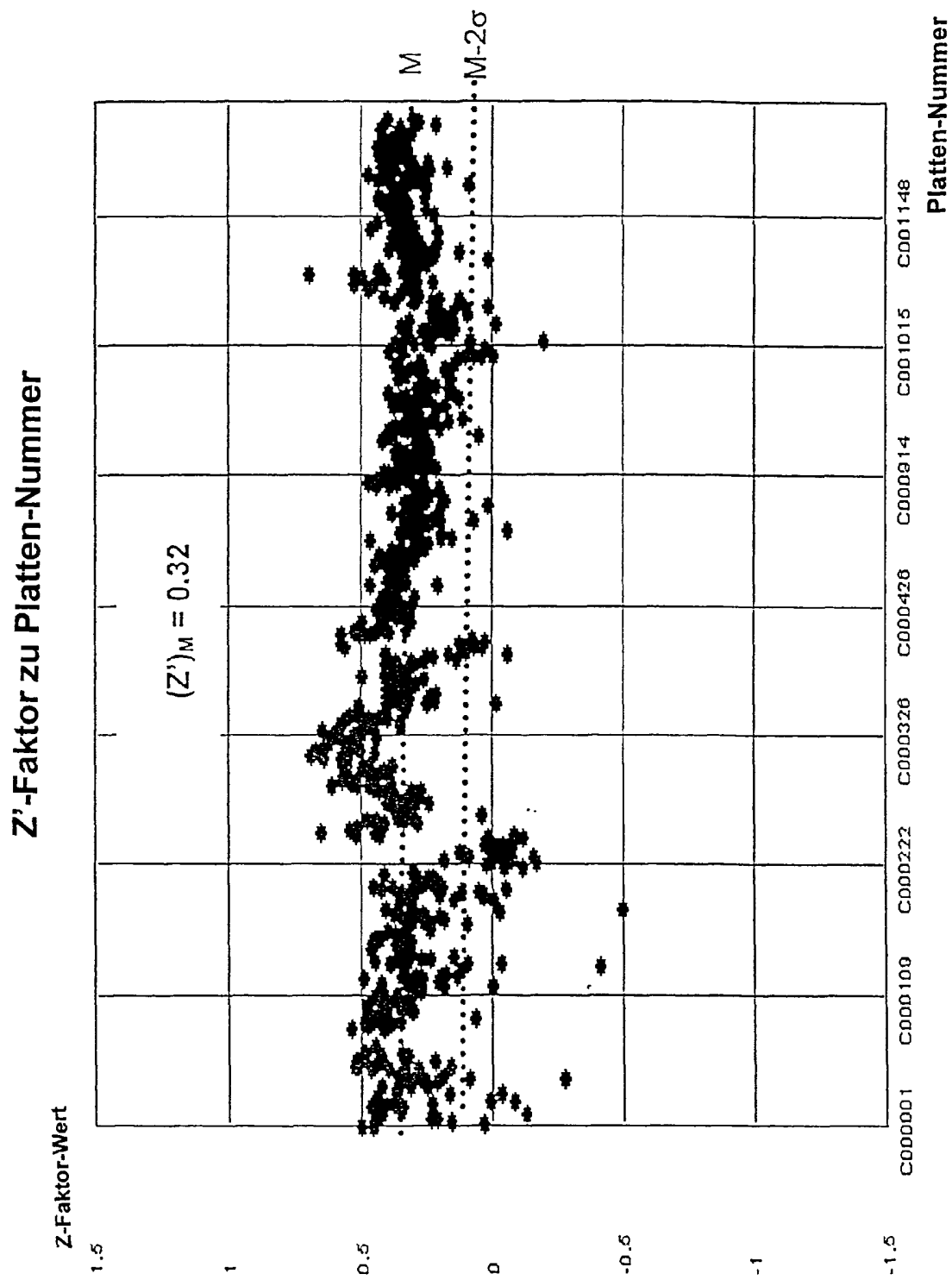


Fig 10

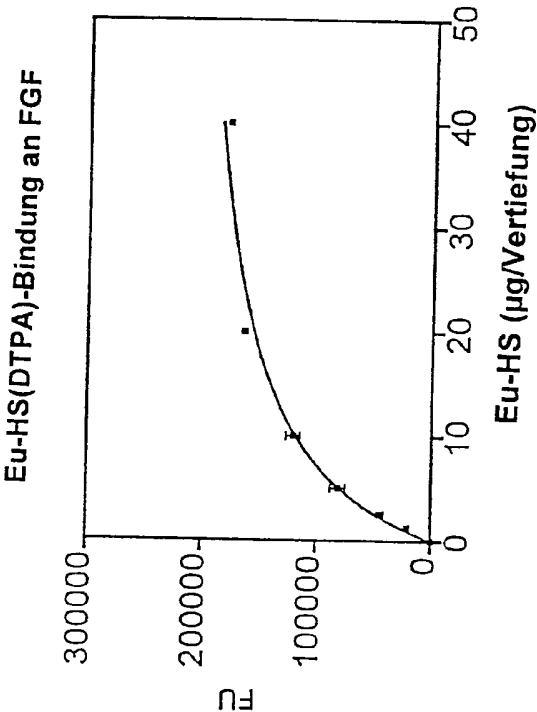


Fig 11A

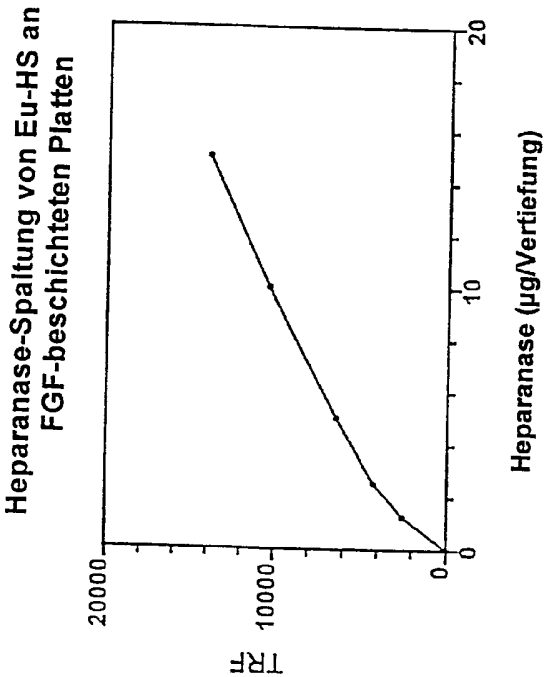


Fig 11B

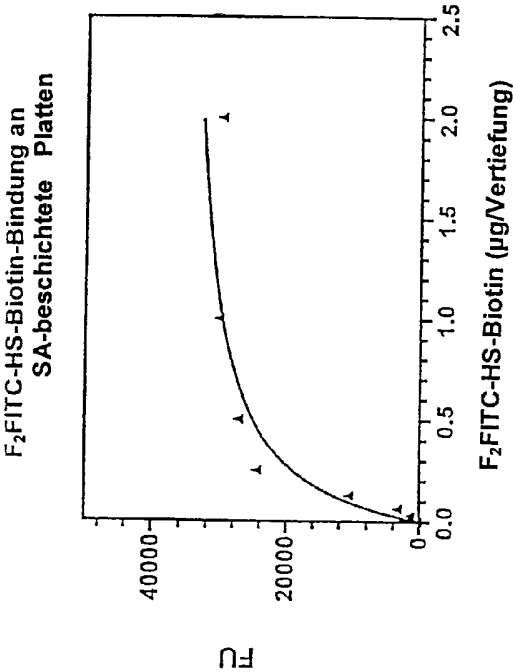


Fig 12A

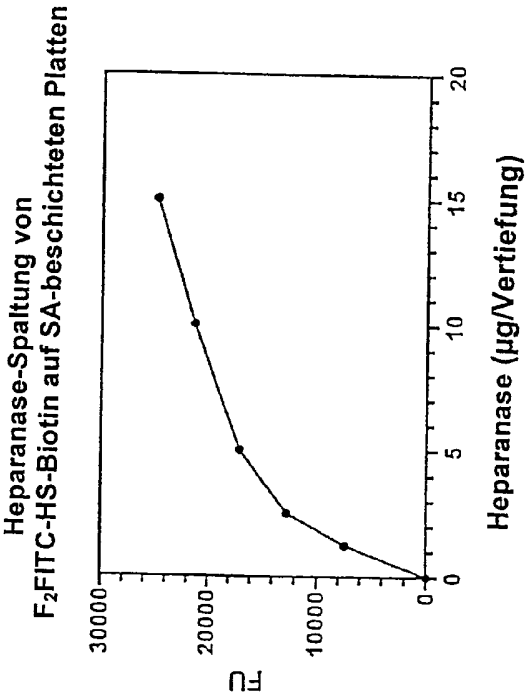


Fig 12B

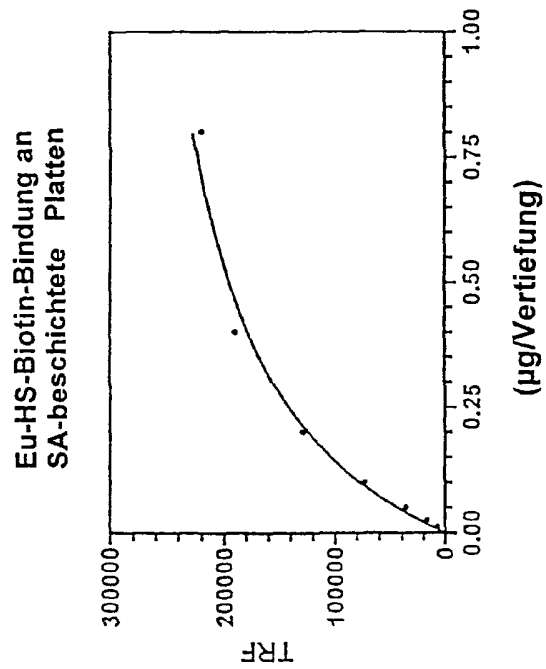


Fig 13A

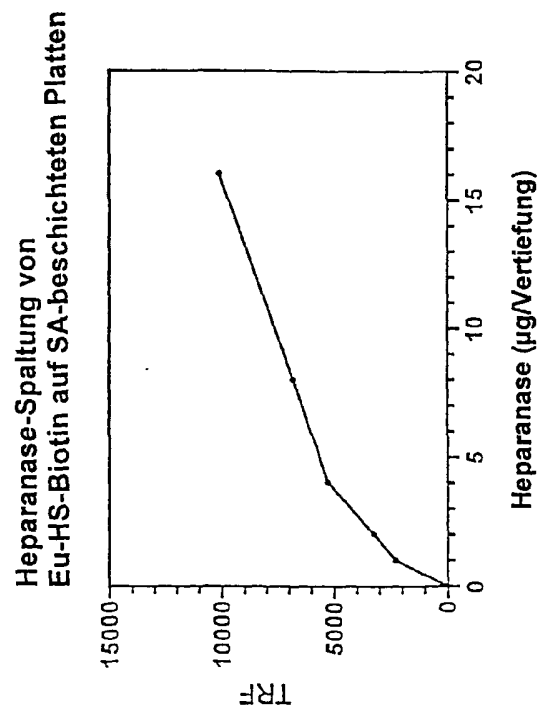


Fig 13B