



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1977170 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200580022127.2

(22) 申请日 2005.06.24

(30) 优先权数据

60/584,459 2004.06.30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.12.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/022365 2005.06.24

(87) PCT申请的公布数据

W02006/012259 EN 2006.02.02

(73) 专利权人 安万特药物公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 Y·曹 S·艾尔斯 J·S·萨伯尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李连涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/25(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004 / 016223 A, 2004.02.26, 全文.

US 2003/157084 A, 2003.08.21, 全文.

审查员 胡玉连

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

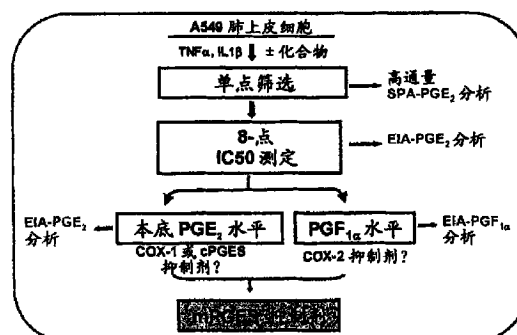
(54) 发明名称

与微粒体前列腺素 E2 合成酶有关的方法

(57) 摘要

本发明提供了利用一种基于细胞的分析系统来测定微粒体前列腺素 E2 合成酶抑制剂的效力、特异性和毒性的方法。

mPGES 基于细胞的分析



1. 体外筛选特异性地抑制响应外部刺激诱导增加 PGE2 水平的哺乳动物细胞中的 mPGES 的化合物的方法,该方法包括以下步骤:

- i) 让哺乳动物细胞与所述化合物接触,
- ii) 用外部刺激刺激所述哺乳动物细胞,
- iii) 测量所述哺乳动物细胞中 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的水平,以及

iv) 将所述哺乳动物细胞中 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的水平与未加测试化合物的哺乳动物细胞以及既未加测试化合物也未加外部刺激的哺乳动物细胞中 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的水平进行比较;其中效力测定为接触外部刺激的细胞在测试化合物存在和不存在时 PGE2 水平的比值,而特异性和细胞毒性测定为接触外部刺激的细胞在测试化合物存在和不存在时 6-酮 PGF1 α 水平的比值。

2. 权利要求 1 的体外筛选方法,其中外部刺激选自一种或多种促炎细胞因子、生长因子或肿瘤促进剂。

3. 权利要求 2 的体外筛选方法,其中细胞因子为 TNF α 和 IL1 β 。

4. 权利要求 1 的体外筛选方法,其中所述哺乳动物细胞从由 A549、HEK293、COS 和 J774 组成的组中选择。

5. 权利要求 4 的体外筛选方法,其中哺乳动物细胞为 A549。

6. 权利要求 1 的体外筛选方法,其中所述 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 水平是利用 HPLC、ELISA、GM-MS、EIA、RIA、FP 或 SPA 测量的。

7. 体外筛选特异性地抑制响应外部刺激诱导增加 PGE2 水平的哺乳动物细胞中的 mPGES 的化合物的方法,该方法包括以下步骤:

- i) 让哺乳动物细胞与两个或多个不同浓度的所述化合物接触,
- ii) 用外部刺激刺激所述哺乳动物细胞,
- iii) 测量所述哺乳动物细胞中 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的水平,以及

iv) 将所述哺乳动物细胞中 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的水平与未加测试化合物的哺乳动物细胞的 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 水平进行比较并计算对照值的百分比,随后根据两个或多个浓度点计算 IC50 值,再与另一个既未加测试化合物也未加外部刺激的哺乳动物细胞作比较;其中效力测定为接触外部刺激的所述哺乳动物细胞在测试化合物存在和不存在时的 PGE2 的 IC50,而特异性和细胞毒性测定为接触外部刺激的所述细胞在测试化合物存在和不存在时的 6-酮 PGF1 α 的 IC50 来确定的。

8. 权利要求 7 的体外筛选方法,其中外部刺激选自一种或多种促炎细胞因子、生长因子或肿瘤促进剂。

9. 权利要求 8 的体外筛选方法,其中细胞因子为 TNF α 和 IL1 β 。

10. 权利要求 7 的体外筛选方法,其中所述哺乳动物细胞从由 A549、HEK293、COS 和 J774 组成的组中选择。

11. 权利要求 7 的体外筛选方法,其中哺乳动物细胞为 A549。

12. 权利要求 7 的体外筛选方法,其中所述 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 水平是利用 HPLC、ELISA、GM-MS、EIA、RIA、FP 或 SPA 测量的。

与微粒体前列腺素 E2 合成酶有关的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及分析化合物和试剂降低或抑制微粒体前列腺素 E2 合成酶 (mPGES) 活性的能力的一种新颖有用的方法。具体来说,本发明涉及测量 mPGES 抑制剂的效力、特异性和毒性的分析方法。

[0002] 相关技术的说明

[0003] 前列腺素类是对疼痛、发烧和炎症有重要作用的类花生酸类物质 (eiconoids)。它们是从花生四烯酸合成的,具有构成花生四烯酸链一部分的五元碳原子环。前列腺素类局部起作用,即在其合成部位附近起作用。前列腺素 E2 与造成发烧、疼痛和炎症等方面尤为相关 (Funk, C. Science, 294 :1871-1875 (2001))。

[0004] PGE2 已被证明是一种重要的促炎和诱导痛觉过敏的脂质介质。PGE2 的合成是由两类酶催化的。第一类环加氧酶利用膜磷脂中释放的花生四烯酸前体产生前列腺素 H2 (PGH2)。环加氧酶的实例包括 COX-1 和 COX-2。第二类酶为 PGE2 合成酶,利用 PGH2 前体生成 PGE2。PGE2 合成酶的实例包括胞质 PGE2 合成酶 (cPGES) 和微粒体 PGE2 合成酶 (mPGES) (Murakami, M 等人, Progress in Lipid Research 43 :3-35, (2004))。

[0005] 现已证明, PGE2 是通过两个单独的通路生成的。第一个通路产生本底水平的 PGE2。组成型产生的 PGES (前列腺素 E2 合成酶) 在基础条件下在多种哺乳动物细胞的胞质中表达 (cPGES)。在基础条件下, COX-1 刺激从花生四烯酸生成 PGH2, 而 PGH2 经 cPGES 激活又依次产生本底水平的 PGE2。第二个通路在经过外部刺激物如细胞因子诱导后产生 PGE2, 并定位于细胞的微粒体区室中, 因此称为 mPGES。在受到促炎刺激物如细胞因子刺激时, COX-2 与花生四烯酸反应, 生成 PGH2, PGH2 又依次诱导 mPGES 从 PGH2 生成 PGE2 (见图 1)。正是这第二个“诱导型”通路与炎症和痛觉过敏有牵连, 而第一个“组成型”通路则被证明很少起作用或根本不起作用 (Murakami, M 等人, J. Biol. Chem. 275 :32783-32792, (2000) 和 Tanioka 等人, J. Biol. Chem. 275 :32775-32782 (2000))。现已了解, mPGES 抑制剂可潜在地用于治疗炎症和疼痛。

[0006] mPGES 抑制剂可能具有不希望有的性质, 如非特异性和毒性。例如, 除了 mPGES 之外, 还有其它前列腺素合成酶, 如前列腺素 I2 合成酶 (PGIS), 可催化形成能够造成血管舒张并抑制血小板聚集的前列腺素 PGI2。非特异性 PGES 抑制剂可能会抑制其它的这些合成酶, 造成不希望的副作用。另外, mPGES 抑制剂还可能抑制本底水平 PGE2 的生成。

[0007] 由于 PGE2 在发烧、疼痛和炎症过程中起着重要作用, 已经作了很多努力来建立能够抑制其产生的化合物的分析方法。尤其是高压液相色谱 (HPLC), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 亦称为酶免疫测定法 (EIA), 或放射性免疫测定法 (RIA) 等技术已被用来对产生的 PGE2 进行定量, 以确定化合物或试剂降低或抑制 PGE2 生成的能力。

[0008] 过去, 对效力、特异性和毒性的评估是用不同的实验进行的。此外, 特异性在生物化学分析中更具可行性, 但是这些分析在很多情况下并不能模拟细胞内复杂的真实条件。因此, 期望能设计基于细胞的分析方法对同一实验样品测量 mPGES 抑制剂的效力、特异性和毒性。这样的设计将会缩短通常需要二次筛选的步骤, 并提供更接近体内细胞条件的信

息。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明建立了基于单一细胞的分析方法来同时评估 mPGES 抑制剂的效力、特异性和细胞毒性。mPGES 抑制剂是潜在的治疗炎症和疼痛的办法。这样的分析设计适合用于已证明外部刺激可诱导 PGE₂ 生成的任何哺乳动物细胞系。在本发明中,哺乳动物细胞采用一种或多种细胞因子如 TNF α 和 IL-1 β 处理。生成的 PGE₂ 含量是如此之高,以至可以通过将测试化合物与细胞一起孵育并测量上清液中 PGE₂ 的减少来对测试的抑制剂化合物进行评估。除了测量测试化合物的效力之外,本发明还确保完全在同一基于细胞的分析系统中进行特异性和细胞毒性的测量。本发明方法的设计是通过评估类前列腺素 6-酮 PGF_{1 α} 的二次读出以及评估测试化合物对本底 PGE₂ 生成的影响而实现的。

[0011] 通过下面的详细描述并结合附图,将能够更好地理解本发明的上述方面和其它方面及其特点和优势。

[0012] 附图的简短说明

[0013] 图 1 为花生四烯酸代谢通路示意图。图中的缩写定义如下:花生四烯酸(AA)、前列腺素 E₂(PGE₂)、前列腺素 H₂(PGH₂)、前列腺素 I₂(PGI₂)、6-酮前列腺素 F_{1 α} (PGF_{1 α})、前列腺素 I₂ 合成酶(PGIS)、胞质 PGE₂ 合成酶(cPGES)、微粒体 PGE₂ 合成酶(mPGES)。

[0014] 图 2 是 mPGES 基于细胞分析的代表性筛选系统,既使用单一浓度(单点),也使用多个浓度(本例中为 8 个点)的化合物。使用高通量筛选可快速筛选测试化合物,接着对多浓度测试化合物的阳性点进行 IC₅₀ 测量。

[0015] 发明详述

[0016] 本发明涉及基于细胞的分析方法,用来筛选微粒体 PGE₂ 合成酶(mPGES)抑制剂。所述方法评估测试化合物 PGES 抑制剂在活细胞中的效力、特异性和毒性。本发明能够鉴定可能作为口服药物用于治疗疼痛、发烧、阿尔茨海默症和许多炎症性疾病,包括但不限于哮喘、过敏性鼻炎、关节炎、肠道炎症性疾病以及多发性硬化症的抑制剂化合物。

[0017] 一般来说,本发明涉及基于细胞的分析方法,用以完全在同一基于细胞的分析中测量试验 mPGES 抑制剂化合物的效力、特异性和细胞毒性。可以很快地进行测量,并可以扩展用来同时测试许多不同的抑制性化合物。

[0018] 对于所用的抑制剂化合物,没有任何特别的限制。实例有:小分子量化学分子、合成的低分子量化合物文库、纯化的蛋白质;基因文库的表达产物、合成肽文库、细胞提取物以及培养物上清液。

[0019] 任何哺乳动物细胞系均可用于本发明,只要所述哺乳动物细胞系可被一种或多种细胞因子诱导以表达 mPGES 即可。细胞因子刺激时所产生的 PGE₂ 诱导程度越大,则可用于测量测试化合物效力、特异性和细胞毒性的筛选窗口就越大。优选的细胞系为 A549,一种可商购的非小细胞肺癌人上皮细胞系。但是,也可以很方便地用其它哺乳动物细胞系来代替 A549,例如人细胞系如 HEK293,猴细胞系如 COS 细胞以及小鼠细胞系如 J774。

[0020] 受到细胞因子刺激时产生高水平 PGE₂ 的细胞系随即被用来测量化合物的效力,即在细胞用一种或多种外部刺激分子刺激后,将测试化合物和细胞一起进行孵育。外部刺激选自促炎细胞因子、生长因子和促进剂(promotor)。

[0021] 在用一种或多种细胞因子、生长因子、促进剂等刺激之前或之后,可以很容易地利

用特异于 PGE2 的酶免疫测定法来测量 PGE2 的浓度。抑制剂化合物的效力是通过加入该化合物后上清液中 PGE2 水平的降低来测量的。本发明计划单独或联合使用任何已证明在与选定的细胞类型混合时能够刺激诱导型 PGE2 通路的刺激化合物。在优选的实施方案中,细胞因子、生长因子或肿瘤促进剂可单独使用或联合使用,以便在选定的细胞中刺激 PGE2 的生成,从而诱导 PGE2 水平达到本底水平的 100 到 400 倍。在更为优选的实施方案中,利用 TNF α 和 IL-1 β 来刺激 A549 细胞,以诱导 COX-2 和 mPGES 偶联通路而产生 PGE2 (见图 1)。

[0022] 除了效力之外,本发明还在同一基于细胞的分析系统中整合了对特异性和细胞毒性的评估。这一点设计上是通过评估 6-酮 PGF1 α 类前列腺素生成的二次读出以及通过评估测试化合物对 COX-1 和 cPGES 偶联通路介导的本底 PGE2 生成的影响来实现的 (见图 1)。

[0023] 基础抑制测量测试化合物对 cPGES 介导的本底水平的 PGE2 生产的影响。基础水平的抑制是在抑制剂化合物存在及不存在的情况下通过测量未经诱导的细胞中 PGE2 的浓度来确定的。

[0024] 特异性抑制测量测试化合物期望的效果:即诱导细胞中 mPGES 介导的 PGE2 的生成。特异性抑制是在抑制剂化合物存在及不存在的情况下通过测量诱导细胞中 PGE2 的浓度来确定的。因此,基础和特异性抑制测量结果是测试化合物的细胞毒性和特异性的指标。

[0025] 在优选的实施方案中, TNF α 和 IL1 β 诱导的 A549 细胞产生了协同效果,生成的 PGE2 增加了 400 倍,这样就能比以前设想的更精确地测量抑制水平 (就效力、特异性和毒性而言)。

[0026] 非特异性抑制测量测试化合物可能具有的其它影响,如抑制除了 mPGES 之外的其它酶。非特异性抑制是通过测量测试化合物对 PGI2 通路或其它前列腺素通路的影响而测定的,这些通路催化与 mPGES 相同的底物产生 PGI2,并最终产生 6-酮 PGF1 α (或其它前列腺素)。在优选的实施方案中,6-酮 PGF1 α 的浓度是在存在及不存在测试化合物的情况下诱导后,在细胞上清液中测量的。如果测试化合物被证明既抑制 6-酮 PGF1 α 的产生又抑制 PGE2 的产生,那么,可以推断,该化合物不仅作用于 mPGES,而且作用于一些负责产生其共同前体如 PGH2 的上游元件。

[0027] 不仅在抑制剂化合物存在和不存在的条件下,而且还在该化合物的多种浓度下测定了抑制水平。通过测定抑制剂化合物多种浓度时的抑制水平,有可能计算出某些性质,如 IC50。IC50 定义为化合物产生 50%抑制作用时的浓度 (见图 2,其中制备了 8 种浓度的化合物 (8 点))。

[0028] 应该理解,本发明的分析方法也可用作单点分析,仅用化合物的一个浓度来评估化合物对 PGE2 生成的抑制作用。单点筛选和 IC50 分析均可实现高通量筛选 (见图 2)。高通量筛选系统可商购获得 (参见如 Zymark Corp., Hopkington, Mass.; Air Technical Industries, Mentor, Ohio; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, Calif.; Precision Systems, Inc., Natick, Mass. 等)。这些系统通常都对整个程序进行自动化处理,包括所有样品和试剂移取、液体分配、定时孵育以及最后在适于分析的检测器上读取样品读数。这些可配置的系统提供高通量分析和快速启动以及高度灵活性和用户定制功能。制造商或此类系统为多种高通量分析提供详细方案。测量 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 浓度的方法是本领域为人们所熟知的技术。实例包括高压液相色谱 (HPLC), 气相色谱-质谱 (GC-MS), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 亦称为酶免疫测定 (EIA), 放射性免疫测定 (RIA), 荧光偏振 (FP) 和闪烁

亲近分析 (SPA)。

[0029] 此处所描述的具体实施方案并不限制本发明的范围。确实,除了此处描述的那些之外,对于本领域技术人员来说,本发明的各种变化形式从上面的说明和附图中将会变得显而易见。这些变化形式也旨在包括到所附的权利要求的范围之内。

[0030] 所有参考资料均通过引用而以其整体纳入本文。

[0031] 实施例

[0032] 实例 1 :用细胞因子处理细胞并与实验和对照化合物一起孵育

[0033] 本例中, A549 细胞被涂布到一个 96 孔平底聚苯乙烯板上,密度为每孔 10^4 细胞。96 孔板然后于 37°C 过夜孵育。

[0034] 第二天,将 COX-2 抑制剂 NS398 (购自 Cayman Chemical) 解冻,充分混合,之后以 1mM 的浓度使用。将 TNF- α 和 IL1- β (R&D Systems) 等份试样保持在冰上备用。解冻测试化合物并置于转速为 500rpm 的台式混合器上。

[0035] 按照下面的布局排布一组灭菌簇集管:

[0036]

	测试化合物		NS398 对照		阴性对照	阳性对照
第 1 排	A (30 uM)	B (10 uM)	C (300 nM)	C (100 nM)	仅含培养基	C
第 2 排	C (3 uM)	C (1 uM)	C (30 nM)	C (10 nM)	仅含培养基	C
第 3 排	C (0.3 uM)	C (0.1 uM)	C (3 nM)	C (1 nM)		
第 4 排	C (0.03 uM)	C (0.01 uM)	C (0.3 nM)	C (0.1 nM)		

[0037] A、B 和 C 指的是如下所述含有 TNF- α 和 IL1- β 细胞因子的三个不同 DMSO 浓度 (试剂 A、B 和 C) 的培养基。

[0038] 试剂 A 含有培养细胞培养基, TNF- α 浓度为 5ng/ml, IL1- β 浓度为 5ng/ml, 不含 DMSO。试剂 B 是通过在试剂 A 中加入 0.2% 的 DMSO 配制的。试剂 C 是通过在试剂 A 中加入 0.3% 的 DMSO 配制的。阴性对照管中加入了 1ml 不含细胞因子的培养基。所有管中均加入 200 μl 试剂 A。第 1 列簇集管中加入了 315 μl 试剂 A。第 2 列簇集管中加入了 315 μl 试剂 B。第 1 排 NS398 对照簇集管中加入了 500 μl 试剂 C。第 2-4 排的测试化合物簇集管中加入了 450 μl 试剂 C。阳性对照管中加入了 1ml 试剂 C (见上表)。

[0039] 为制备测试化合物的贮液, 向对应管中加入了 2 μl 的 10mM 测试化合物贮液 (最终稀释为 1:100), 并涡旋混合。测试化合物的稀释按如下方式进行: 移取 135 μl 贮液并加入到 30 μM 管中, 并移取 45 μl 贮液并加入到 10 μM 管中。然后进行系列稀释, 以产生浓度为 30、10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01 以及 0.003 μM 的化合物。

[0040] 为制备对照 NS398 的贮液,向对应管中加入了 2 μ l 的 1mM NS398(最终稀释为 1:100),并涡旋混合。NS398 的稀释按如下方式进行:从贮液中移取 15 μ l 并加入到 300nM NS398 管中,并从贮液中移取 5 μ l 并加入到 100nM NS398 管中。然后进行系列稀释,以产生浓度为 300、100、30、10、3、1、0.3 以及 0.1 μ M 的 NS398。

[0041] 稀释完成后,孵育的细胞按下述方式处理。除去细胞的培养基并快速替换为稀释的化合物和对照液。96 孔板然后在 37°C 孵育 16 小时,并以 1000rpm 离心 5 分钟。从每孔中收集 80 μ l 的上清液供下面实施例中描述的酶免疫测定(EIA)或闪烁亲近分析(SPA)测试用。上清液可在 4°C 储存长达 2 小时,或在 -80°C 储存长达 3 个月。

[0042] 作为可选的短期分析,首先用 TNF α 和 IL1 β 处理 A549 细胞,并在 37°C 加入细胞因子孵育细胞 16 小时。用 HBSS 缓冲液加 0.1% BSA 替换培养基,然后加入系列稀释的测试化合物进行 30 分钟预孵育。然后,加入 10 μ M 花生四烯酸,30 分钟后,收集细胞上清液。

[0043] 实例 2:前列腺素水平的定量:酶免疫测定

[0044] 在这一实施例中,利用酶免疫测定法(EIA)测量 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的浓度。用于测量 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 的 EIA(试剂盒)可商购获得。例如,Assay Designs 出售 PGE2 和 6-酮 PGF1 α 分析的 EIA 试剂盒。PGE2EIA 采用对 PGE2 具有特异性的小鼠单克隆抗体。溶液中的游离 PGE2 与已知量的 PGE2 示踪剂竞争结合有限量的抗 PGE2 抗体。PGE2 示踪剂是 PGE2 和乙酰胆碱酯酶的缀合物。抗 PGE2 抗体然后用山羊抗小鼠 Ig 抗体固定。固定的抗体然后用含有乙酰胆碱酯酶底物的埃尔曼试剂显色。该反应产生的产物为黄色,在 412nm 处有很强的吸收。如果 PGE2 的浓度高,PGE2 将会在与示踪剂的竞争中胜出,得到的样品在 412nm 处的吸收就会很弱。反之,如果 PGE2 的浓度低,示踪剂将会在与 PGE2 的竞争中胜出,得到的样品在 412nm 处的吸收就会很强。在进行这一分析时,将样品在 412nm 的吸收与已知 PGE2 浓度的标准吸收进行比较。

[0045] 通过更换适当的单克隆抗体和示踪剂,可对 6-酮 PGF1 α 进行类似的分析。通过使用诸如 Zymark SciClone Deck 的系统,本领域的技术人员可以很容易地将这一分析转换成自动化分析形式。

[0046] 测定了用 8 个浓度测试化合物处理过的细胞的前列腺素水平后,作出前列腺素水平相对于测试化合物浓度对数座标的半对数图,则可产生该化合物的 IC₅₀。这一分析也可仅作单点分析,仅用一个化合物浓度来评估化合物对 PGE2 生成的抑制作用。

[0047] 实例 3:前列腺素水平的定量:闪烁亲近分析

[0048] 在本例中,用闪烁亲近分析(“SPA”)测量了细胞悬浮液中 PGE2 的浓度。例如,美国专利 No. 4,568,649 描述了用 SPA 测量测试样品中的放射性标记化合物浓度。

[0049] 按 1:6.67 的稀释率将抗 PGE2 抗体(Cayman Chemical)稀释到分析缓冲液中,制备抗体和珠的过夜混合物。所用的分析缓冲液为含有 0.05% Tween20 的 TBS。然后向混合物中加入了等体积的 SPA 蛋白质 A 珠。得到的混合物在 4°C 混合过夜。

[0050] 非放射性(“冷的”)PGE2 标准被稀释到 0.5% FBS 培养基中。待测的上清液样品也按类似方式进行了稀释。

[0051] 制备示踪剂,从而 500 μ l 总体积的 3-H PGE2 的总放射性为 50mCi,5 μ l 的参照平均值为 4.74 $\times 10^5$ cpm。

[0052] 分析如下进行:每孔中加入 20 μ l 分析缓冲液,在适当的孔中加入 20 μ l 冷标准或

样品,除了空白对照孔之外的所有孔中加入 25 μ l 示踪剂,除了非特异性结合 (NSB) 孔之外的所有孔中加入 130 μ l 抗体 / 珠混合物,并向 NSB 孔中加入 130 μ l 适当稀释的没有抗体的珠。在室温摇振 96 孔板 2 小时。放射性读数用 Wallac1450Microbeta Trilux 进行。

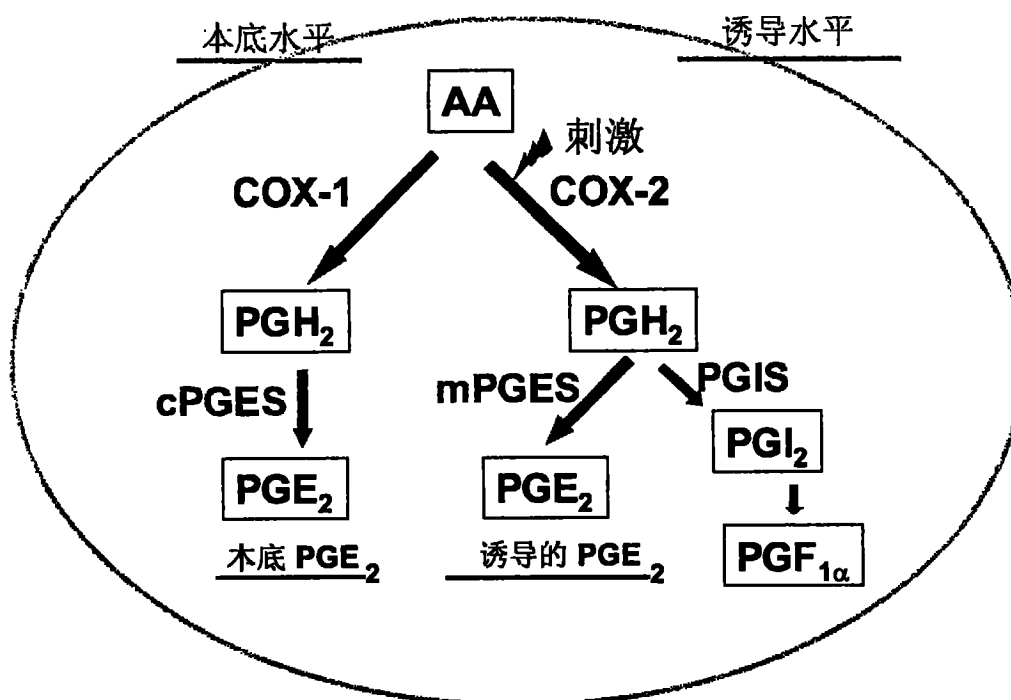


图 1

mPGES 基于细胞的分析

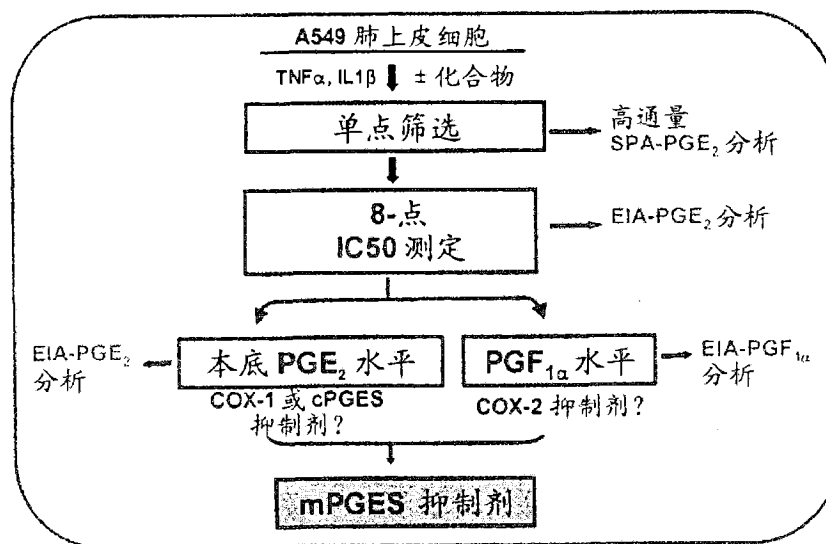


图 2