



(19) **Republik
Österreich
Patentamt**

(11) Nummer: **AT 401 061 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 136/95

(51) Int.Cl.⁶ : **C12Q 1/26**

(22) Anmeldetag: 26. 1.1995

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1995

(45) Ausgabetag: 25. 6.1996

(56) Entgegenhaltungen:

WO 94/14977A1

(73) Patentinhaber:

HAFSLUND NYCOMED PHARMA AG
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) BENUTZUNG EINER MENSCHLICHEN MONOZYTENARTIGEN ZELLINIE ZUR IDENTIFIKATION UND BESTIMMUNG VON SUBSTANZEN ZUR HEMMUNG DES MENSCHLICHEN ENZYMS CYCLOOXYGENASE-2

(57) Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die das menschliche Enzym Cyclooxygenase-2 hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß
a) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klones der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, die solchermaßen stimulierten Zellen zusammen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden und nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder
b) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klones der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden, diese Zellen anschließend mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, und nach der Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird.

AT 401 061 B

Die Erfindung betrifft die stimulierte Expression von human-COX-2 in Zellen eines Subklons einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Verwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind, die Aktivität des human-COX-2 zu hemmen.

5 Das Enzym Cyclooxygenase (COX) (Synonyme: Prostaglandin-endoperoxid Synthase, EC 1.14.99.1, Prostaglandin H Synthase (PGHS), Prostaglandin Synthase (PGS)) wandelt Arachidonsäure in Prostaglandin H₂ um, das dann von verschiedenen Enzymen zu den entsprechenden Prostaglandinen (z.B. PGE₂, PGF_{1a}), Prostacyclinen und Thromboxanen (z.B. TXA₂, TXB₂) weiter verstoffwechselt wird (Thiemermann, Eicosanoids, Bd.4, Jg. 1991, S.187-202). Zwei Formen, d.h. Isoenzyme, der COX sind bisher beschrieben worden, 10 die mit COX-1 und COX-2 bzw. PGHS-1 und PGHS-2 bezeichnet werden. Diese beiden Isoenzyme werden durch zwei distinkte Gene mit unterschiedlicher Regulation codiert (Battistini et al., DN&P, Bd.7(8), Jg.1994, S.501-512, Smith et al., Ann.N.Y.Acad.Sci., Bd.714, Jg.1994, S.136-142). So ist COX-1 permanent in fast allen Zellen exprimiert und katalysiert z.B. die Bildung von Prostacyclin, das, sekretiert von Magenschleimhautzellen, diese vor der Magensäure schützt (Whittle et al. Nature, Bd.284, Jg. 1980, S.271-273). Hingegen 15 wird COX-2 erst auf inflammatorische Stimuli hin in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten der Haut und anderen Zellen nachweisbar. Diese Stimuli erhöhen die COX-2-Expression um das 10 bis 80-fache (Smith et al., a.a.o.). Inflammatorische Stimuli *in vivo* sind pro-inflammatorische Cytokine oder bakterielle Endotoxine, *in vitro* sind es Mitogene, Cytokine und Lipopolysaccharid (LPS). Die dann sekretierten Mediatoren, wie z.B. PGE₂ sind u.a. für das entzündliche Geschehen verantwortlich. Die Unterdrückung der Bildung dieser 20 Mediatoren trägt im Wesentlichen zur Wirkung der nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDS) bei.

Die meisten NSAIDS hemmen die Aktivität beider COX Isoenzyme. Die Hemmung der COX-2 wird der anti-inflammatorischen Wirkung der NSAIDS zugeschrieben, während die Hemmung der COX-1 unter den Nebenwirkungen, wie z.B. Magenschleimhauterosionen, geführt wird. Zur Vermeidung dieser Nebenwirkung 25 von NSAIDS ist es bedeutsam, Medikamente zu entwickeln, die selektiv die COX-2 Aktivität hemmen können (Wallace & Cirino, Bd.15, Jg.1994, S.405-406).

Tests zur Messung der COX-2 Aktivität wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. (Übersicht siehe Battistini et al., a.a.o.).

30 1.) Gentechnologische Verfahren zur Testung der murinen und human COX-2 Aktivität

Gentechnologische Verfahren beinhalten Expressionsvektoren der murinen (Meade et al 1993) und humanen COX-2 Gene (Hla et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Bd.89, Jg.1992, S.7384-7388, O'Banion et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Bd.89, Jg.1992, S.4888-4892). Mit diesen Expressionsvektoren werden COS-Zellen (African green monkey kidney cells) transfiziert und die entsprechenden Gene entweder stabil oder transient zur Expression gebracht. Danach werden diese Zellen zur Bestimmung der COX-2 Aktivität benutzt.

2.) Nicht-gentechnologische Verfahren zur Testung der murinen COX-2 Aktivität

40 Nicht-gentechnologische Verfahren bedienen sich muriner Makrophagenzelllinien, die zur murinen COX-2 Expression mit LPS oder Phorbolester (PMA) stimuliert werden (Mitchell et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Bd.90, Jg.1993, S.11693-11697, Srinivasa & Herschman, J.Biol.Chem., Bd.269, Jg.1994, S.15473-15480).

3.) Nicht-gentechnologische Verfahren zur Testung der human COX-2 Aktivität

45 Zur Expression von human COX-2 und Testung auf Inhibition der human COX-2 sind Verfahren beschrieben worden, die sich peripherer Makrophagen/Monozyten bedienen, die nach Isolierung aus dem Blut von Spendern mit LPS stimuliert werden. Dieses Verfahren ist umständlich und zeitraubend. Humane Zelllinien (U937, THP-1, HL60), die nach Stimulation mit Phorbolestern (TPA, PMA) COX-2 50 exprimieren, sind ebenfalls beschrieben worden (Hoff et al., FEBS, Bd.320, Jg.1993, S.38-42, Sanduja et al., Blood, Bd.78, Jg.1991, S.3178-3185), und der Gebrauch von Zelllinien stellt insofern eine Verbesserung dar, indem der Schritt der Isolierung von Monozyten aus dem Spenderblut und die große Streuung der Stimulierbarkeit der Spendermonozyten entfallen. Der Nachteil der PMA-Stimulation der beschriebenen human Zelllinien besteht jedoch in der Gefährlichkeit im Umgang mit PMA, sodaß diese Verfahren nicht für einen Routinegebrauch geeignet sind.

Überraschenderweise konnte ein Verfahren gefunden werden, das die Nachteile der oben angeführten Verfahren umgeht, da es einfacher durchzuführen und somit zeitsparender ist und die Handhabung der co-carcinogenen Phorbolester unnötig macht.

Die Erfindung beschreibt die durch LPS-stimulierte Expression von human-COX-2 in Zellen eines Subklons einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Anwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind die Aktivität des human-COX-2 zu hemmen. Es handelt sich hierbei um ein nicht gentechnologisches Verfahren. Gegenstand 5 der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die das menschliche Enzym Cyclooxygenase-2 hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klonen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden,
- 10 die solchermaßen stimulierten Zellen zusammen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden und nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder
- b) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klonen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit 15 potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden, diese Zellen anschließend mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, und nach der Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird.

Durch Subklonierung der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 (Ziegler-Heitbrock et al., Int.J.Cancer, 20 Bd.41, Jg.1988, S.456-461) und anschließendem Suchen nach Klonen, die nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) unter anderem auch COX-2 im Zytoplasma aufweisen, wurden überraschenderweise mehrere positive Klone gefunden. Der Zellklon mit dem weitergearbeitet wurde, wurde mit MonoMac-6.X-2 (MM6.X-2) bezeichnet. Vorhandensein von COX-2 in MM6.X-2 Zellen nach Stimulation durch LPS wurde einerseits mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers 25 gegen menschliches COX-2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) und 2) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese des Zellylates und nachfolgendem Westernblot unter Verwendung des oben genannten spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-2 gezeigt. Des weiteren wurden die Produkte PGF_{1 α} , PGE₂ und TXB₂ des Stoffwechselweges der Cyclooxygenasen im Kulturüberstand von 30 stimulierten und unstimulierten Zellen mittels ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) bestimmt und eine vielfach höhere Konzentration dieser Stoffe in den mit LPS stimulierten Kulturen gefunden. Diese Befunde zeigen klar, daß sich das Enzym COX-2 in diesen Zellen durch Stimulierung mit LPS induzieren läßt. Im Gefolge dessen wurde ein Verfahren zum Suchen und Bestimmen von Hemmstoffen entwickelt.

Dazu werden beispielsweise mit einem geeigneten Faktor, wie Interleukin-1 oder Lipopolysaccharid, 35 stimulierte Zellen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2, gelöst in Kulturmedium oder einem Zellkultur-verträglichen Lösungsmittel, beispielsweise phosphat gepufferter Saline, inkubiert. Eine weitere Vorgehensweise besteht darin, zunächst unstimulierte Zellen zuerst mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 zu inkubieren und erst danach mit einem geeigneten Faktor zu stimulieren. Nachdem 40 Arachidonsäure hinzugegeben wurde, wird weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens, beispielsweise Radioimmunoassay oder ELISA, auf seinen Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels gemessen. Eine Reduktion der gemessenen Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Vergleich zu einem Kulturansatz, der statt potentieller Hemmstoffe nur Lösungsmittel enthielt, wird als Hemmung der Cyclooxygenase-2 gewertet.

45 Beispiel 1

Zellen des Klonen MM6.X-2 werden mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ angereicherte Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit), um COX-2 zu induzieren. Danach wird das Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 10 000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml 50 Streptomycin und 1 mM Pyruvat) erneuert und potentielle Hemmstoffe der Cyclooxygenase-2, gelöst in phosphat gepufferter Saline, hinzugefügt und eine halbe Stunde wie oben beschrieben inkubiert. Arachidonsäure wird hinzupippettiert und 15 Minuten weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und auf seinen Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels hin mittels ELISA gemessen.

	Konz. PGF _{1α}
5	Zellen, unstimuliert 0.22 ng/ml
	Zellen, stimuliert 12 ng/ml
	Zellen, stimuliert, inkubiert mit Diclofenac 0.2 ng/ml
	Zellen, stimuliert, inkubiert mit Lornoxicam 1.3 ng/ml
	Zellen, stimuliert, inkubiert mit Aspirin 12.2 ng/ml
10	Alle Substanzen wurden mit 1 μ mol/l getested

Beispiel 2

15 Zellen des Klones MM6.X-2 werden mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes, gelöst in Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 160 μ g/ml nicht-essentielle Aminosäurenmischung (Sigma), 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin, 8.2 μ g/ml Insulin, 1 mM Oxalessigsäure 1 mM Pyruvat) inkubiert (10 min, Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), und dann mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), um 20 COX-2 zu induzieren. Danach wird das Kulturmedium erneuert, Arachidonsäure wird hinzugefügt und 15 Minuten weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und auf seinen Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels hin mittels ELISA gemessen.

Patentansprüche

- 25 1. Ein Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die das menschliche Enzym Cyclooxygenase-2 hemmen, **dadurch gekennzeichnet**, daß
- 30 a) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klones der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, die solchermaßen stimulierten Zellen zusammen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden und nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder
- 35 b) Zellen eines nicht gentechnologisch manipulierten Klones der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden, diese Zellen anschließend mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, und nach der Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird.
- 40 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Zellen des Subklons X-2 der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 verwendet werden.
- 45 3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren Interleukin-1, Lipopolysaccharid oder Interferon- γ oder Kombinationen davon, bevorzugt Lipopolysaccharid, verwendet werden.