



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 400 T2** 2006.06.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 129 188 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 400.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/08363**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 957 275.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/28022**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.11.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.09.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/533 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

107687 P 09.11.1998 US

(73) Patentinhaber:

Karolinska Innovations AB, Stockholm, SE

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**JAKOBSSON, Per-Johan, S-171 77 Stockholm,
SE; SAMUELSSON, Bengt, S-171 77 Stockholm,
SE; MORGENSTERN, Ralf, S-171 77 Stockholm,
SE; FORD-HUTCHINSON, Anthony, Doylestown
PA 18901, US; MANCINI, Joseph, Kirkland Quebec
H9J 2N5, CA**

(54) Bezeichnung: **PGE SYNTHASE UND VERFAHREN UND MITTELN ZUR MODULATION DEREN AKTIVITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Modulation von PGE-Synthaseaktivität. Insbesondere basiert die vorliegende Erfindung auf der Identifikation von PGE-Synthase und der hierfür kodierenden DNA, indem sie Tests für Substanzen bereitstellt, die in der Lage sind, PGE-Synthaseaktivität zu modulieren und insbesondere zu hemmen. PGE ist eine potente Verbindung, die dafür bekannt ist, Entzündung (Symptome einschließlich Fieber und Schmerz) hervorzurufen, und Inhibition dieser Wirkung kann bei der Behandlung von Entzündung, Arthritis, Krebs, Alzheimer-Krankheit, zur Modulation von Apoptose und zur Behandlung von Schmerz verwendet werden.

[0002] Prostaglandin-Endoperoxid- H_2 (PGH_2) wird aus Arachidonsäure durch die Wirkung von Cyclooxygenase- (cox-) 1 oder -2 gebildet. cox-1 wird konstitutiv in zahlreichen Zellen und Geweben, wie z.B. Plättchen, Endothel, Magen und Niere, exprimiert, während das cox-2-Protein durch entzündungsfördernde Cytokine wie Interleukin- β an Entzündungsstellen entstehen kann. Jüngere Berichte zu cox sind in W. Smith, *Advances in Experimental Medicine & Biology* 44B, 989–1011 (1997); H. R. Herschman, *Biochimica et Biophysica Acta* 1299, 125–40 (1996); und R. Dubois et al., *Faseb J.* 12, 1063–1073 (1998), zu finden. Stromab der Cyclooxygenasen kann ihr Produkt PGH_2 weiter zu den verschiedenen physiologisch wichtigen Eicosanoiden, z.B. $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 (Prostacyclin) und Thromboxan- (TX-) A_2 (W. L. Smith, *Am. J. Physiol.* 263, F181–F191 (1992)), metabolisiert werden.

[0003] Für den Mechanismus für die Biosynthese von PGE und $PGF_{1\alpha}$ (gebildet unter Verwendung von Dihomo- γ -linolensäure anstelle von Arachidonsäure) (M. Hamberg & B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 242, 5336–5343 (1967)) durch Schaf-Bläschendrüsen wurde angenommen, dass er über ein zyklisches Endoperoxid abläuft (B. Samuelsson, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3011–3013 (1965)), das später als PGH_2 bezeichnet wurde (M. Hamberg & B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 899–903 (1973); M. Hamberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 345–349 (1974); D. H. Nugteren & E. Hazelhof, *Biochim. Biophys. Acta* 326, 448–461 (1973)). Kurz zusammengefasst umfassen die durch die Cyclooxygenasen katalysierten Reaktionen eine stereospezifische Abstraktion des 13-pro-S-Wasserstoffatoms aus Arachidonsäure. Dies führt zur Bildung eines Kohlenstoffrests, der durch molekularen Sauerstoff an Position C-11 eingefangen wird, zur Bildung des 9,11-Endoperoxids und der Bindung zwischen den Positionen C-8 und C-12 mit trans-aliphatischen Seitenketten, zur Rest-Neuanordnung an C-15 und zur Reaktion mit einem zweiten Sauerstoffmolekül. Im nächsten Schritt wird die resultierende Peroxy-Gruppe an C-15 zu einer Hydroperoxy-Gruppe reduziert, und PGG_2 wird gebildet. Diese Hydroperoxy-Gruppe kann in weiterer Folge durch die Peroxidaseaktivität von Cyclooxygenase (in Gegenwart eines Reduktionsmittels, z.B. Glutathion) reduziert werden, wodurch PGH_2 gebildet wird. Das/Die Enzym(e), die für die Isomerisierung von PGH_2 zu PGE_2 verantwortlich ist/sind, ist/sind nicht gut bekannt. Es wurden bereits Versuche unternommen, die mikrosomale PGE-Synthase aus Schaf- und Rinder-Samenbläschen zu reinigen, ein Organ, das dafür bekannt ist, hohe PGE-Synthaseaktivität in sich zu tragen (N. Ogino et al., *Journal of Biological Chemistry* 252, 890–895 (1977); P. Moonen et al., *Methods in Enzymology* 86, 84–91 (1982)). Diese Studien zeigten, dass die mikrosomale PGE-Synthase löslich gemacht und teilweise gereinigt werden kann. Die Enzymaktivität hing auch von Glutathion ab, wurde jedoch im Laufe der Reinigung rasch deaktiviert. Zwei monoklonale Antikörper, die als IGG1(hei-7) und IGG1(hei-26) bezeichnet sind und gegen teilweise gereinigte PGE-Synthase aus Schaf-Samenbläschen gezüchtet wurden, konnten zwei Proteine aus Schaf-Samenbläschen mit Molekularmassen von 17,5 bzw. 180 kDa immunfällen (Y. Tanaka et al., *J. Biol. Chem.* 262, 1374–1381 (1987)). Für beide dieser ausgefällten Proteine wurde erkannt, dass sie Glutathion-abhängige PGE-Synthaseaktivität besaßen, jedoch keine Glutathion-S-Transferaseaktivität. Interessanterweise verursachte der IGG1(hei-7)-Antikörper auch Co-Fällung von Cyclooxygenase, was zeigt, dass das 17,5-kDa-Protein und die cox-Proteine auf derselben Seite der mikrosomalen Membranen lagen. Das 17,5-kDa-Protein zeigte eine K_m für PGH_2 von 40 μM , was den Beschreibungen anderer Forscher ähnlich ist, die die mikrosomale PGE-Synthase untersuchten (P. Moonen et al., *Methods in Enzymology* 86, 84–91 (1982)). Im Gegensatz dazu zeigte das größere Protein eine K_m für PGH_2 von 150 μM . Für zusätzliche Proteine, die zur zytosolischen Glutathion-S-Transferase-Superfamilie gehören, wurde auch beschrieben, dass sie PGE-, PGD - und PGF -Synthaseaktivitäten aufweisen (Y. Urade et al., *J. Lipid Med.* 12, 257–273 (1995)). Erst jüngst wurde ein mikrosomales 16,5-kDa-Protein aus Schaf-Samenbläschen gereinigt, das Glutathion-abhängige $PGF_{2\alpha}$ -Synthaseaktivität besitzt (J. R. Burgess & C. C. Reddy, *Biochem. & Mol. Biol. Int.* 41, 217–226 (1997)). Das Enzym (Prostaglandin-Endoperoxidreductase) könnte also auch die Reduktion von Cumolhydroperoxid katalysieren, während 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (typisches Substrat für verschiedene Glutathion-S-Transferasen) kein Substrat war. Mikrosomale PGE-Synthaseaktivität wurde auch in verschiedenen Rattenorganen gemessen (K. Watanabe et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 235, 148–152 (1997)), und hohe Glutathion-abhängige Aktivität wurde im Samenleiter, in den akzessorischen Geschlechtsorganen und in der Niere gefunden. Glutathion-unabhängige, mikrosomale PGE-Synthaseaktivität

wurde in Herz, Milz und Uterus beobachtet.

[0004] Das für PGE-Biosynthese verantwortliche Enzym stellt daher ein neues Ziel für die Wirkstoffentwicklung dar, um verschiedene Entzündungskrankheiten behandeln zu können. Wie jedoch aus der vorangehenden Einführung ersichtlich ist, gelang es bisher niemandem, reine PGE-Synthase oder die Mittel, um diese zu bilden, bereitzustellen.

[0005] Oxford Biomedical bietet ein teilweise gereinigtes Präparat von Schaf-PGE-Synthase an (Katalog-Nr. PE 02). Eine Analyse dieses Präparats zeigt, dass es relativ verunreinigt ist und ein komplexes Gemisch zahlreicher Komponenten umfasst.

[0006] Besondere Schwierigkeiten bei der Reinigung von PGE-Synthase umfassen die Tatsache, dass das Protein ein Membranprotein ist, das im Allgemeinen sehr schwer bis zur Homogenität zu reinigen ist, und die Tatsache, dass seine Enzymaktivität nach Solubilisierung sehr instabil ist. Auch zeigt die hierin beschriebene Arbeit, dass das Protein sehr hohe Enzymaktivität aufweist, was darauf hinweist, dass die Mengen an Protein innerhalb der Zellen sehr gering sind, was das Problem der Reinigung weiter verstärkt.

[0007] Urade et al., J. Lipid Med. 12, 257–273 (1995), merken an, dass nur wenig über die Eigenschaften von PGE-Synthase bekannt ist. In jüngerer Vergangenheit bemerkte William Smith in "Molecular Biology of Prostanoid Biosynthetic Enzymes and Receptors", Advances in Experimental Medicine & Biology 400B, 989–1011, veröffentlicht im Jahr 1997, dass das Thema der PGE-Synthase eine äußerst verworrene Angelegenheit sei, wobei er unterstrich, dass PGE-Bildung bisher nicht einem einzelnen Protein zugeteilt worden sei.

[0008] Die nachstehend beschriebene Arbeit der Erfinder der vorliegenden Erfindung zeigt, dass menschliche PGE-Synthase ein Mitglied einer Protein-Superfamilie ist, die aus membranassoziierten Proteinen mit einer Masse von 14–18 kDa besteht, die in Eicosanoid- und Glutathion-Stoffwechsel eingebunden sind. PGE-Synthase weist 38% Identität zu mikrosomaler Glutathion-S-Transferase 1 auf Niveau der Aminosäuresequenz auf. Die menschliche cDNA-Sequenz sowie die vorhergesagte Aminosäuresequenz wurden im Jahr 1997 in öffentlichen Datenbanken unter dem Namen MGST1-L1 (GenBank Zugriffsnummer AF027740) hinterlegt, sowie eine p53-induzierte PIG12 (GenBank Zugriffsnummer AF010316). Diesen cDNA-Sequenzen wurde davor keine Funktion zugeschrieben.

[0009] Polyak et al., Nature 389, 300–305 (1997), identifizierten, was sie als "PIG12" bezeichneten, durch Klonieren von Sequenzen, deren Expression durch P53 hochreguliert war. Sie stellten fest, dass PIG12 ein neues Mitglied der mikrosomalen Glutathion-S-Transferase-Familie von Genen ist, identifizierten jedoch keine tatsächliche Funktion. Es gab jedoch sicherlich keinen Vorschlag, dass ihr PIG12 tatsächlich menschliche PGE-Synthase gewesen sei.

[0010] Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bisher niemand PGE-Synthase in irgendeiner Form oder Menge bereitstellte, die Aminosäure-Sequenzieren ermöglichen würde, um einen potenziellen Startpunkt für versuchtes Klonieren einer Kodiersequenz zu bieten. Weiters gab es auch keinen Hinweis darauf, dass die Sequenz in den Datenbanken, für die die Erfinder der vorliegenden Beschreibung nun zeigten, dass sie für PGE-Synthase kodiert, tatsächlich für PGE-Synthase kodiert.

[0011] Im Lichte der Arbeit der Erfinder ermöglicht die vorliegende Erfindung in verschiedenen Aspekten die Verwendung gereinigter PGE-Synthase in unterschiedlichen Zusammenhängen, insbesondere in Test- und Screening-Verfahren für Substanzen, die in der Lage sind, PGE-Synthaseaktivität zu modulieren, insbesondere zu hemmen. Die gereinigte PGE-Synthase kann durch rekombinante Expression aus kodierender Nucleinsäure hergestellt werden. Sie kann in eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystemen exprimiert werden, und ihr kann natürliche Glykosylierung fehlen. Substanzen, die als Modulatoren von PGE-Synthase bekannt sind, können zur Kontrolle oder Behandlung von Entzündung, Arthritis, Krebs oder anderen zellulären Wachstumsabnormalitäten, Alzheimer-Krankheit, zur Modulation von Apoptose und zur Behandlung von Schmerz eingesetzt werden.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN:

[0012] [Fig. 1](#) zeigt die Resultate von Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie der Produkte, die nach Inkubationen mit PGH₂ gebildet wurden (Counts pro Minute (CPM) über die Zeit in Minuten graphisch dargestellt).

[0013] [Fig. 1A](#) zeigt Resultate, die mit PGE-Synthasemembranfraktion, vermischt mit Stopplösung, erhalten

wurden.

[0014] [Fig. 1B](#) zeigt Resultate, die mit Puffer erhalten wurden.

[0015] [Fig. 1C](#) zeigt Resultate, die mit PGE-Synthasemembranfraktion erhalten wurden. B und C wurden 2 min lang vor dem Zusatz von Stopplösung inkubiert. Produkte wurden unter Verwendung von Radioaktivitätsdetektion nachgewiesen. Die ersten 20 min zeigen isokratische Elution unter Verwendung von Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure (70:30:0,007, nach Vol.) als mobile Phase mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 100% mobiler Phase zu 100% Methanol über eine Zeitspanne von 10 min angelegt, das für die verbleibende Dauer aufrechterhalten wurde.

[0016] [Fig. 2](#) veranschaulicht die Abhängigkeit von PGE₂-Bildung von Membranproteinkonzentration, wobei die Menge von PGE₂ in pmol im Diagramm über mg/ml des Proteins aufgetragen ist.

[0017] [Fig. 3](#) zeigt einen Zeitverlauf für PGE₂-Bildung, wobei die Menge von PGE₂ in pmol im Diagramm über der Zeit in Minuten aufgetragen ist. Volle Kreise stehen für PGE-Synthase, inkubiert mit Glutathion; leere Kreise stehen für PGE-Synthase ohne Glutathion; volle Dreiecke stehen für Puffer mit Glutathion.

[0018] Die folgenden Abkürzungen werden hierin verwendet:

PGG₁, Prostaglandin G₁: 15(S)-Hydroperoxy-9α,11α-peroxidoprost-13-ensäure;
 PGG₂, Prostaglandin G₂: 15(S)-Hydroperoxy-9α,11α-peroxidoprost-5-cis-13-transdiensäure;
 PGG₃, Prostaglandin G₃: 15(S)-Hydroperoxy-9α,11α-peroxidoprost-5,13,17-triensäure;
 PGH₁, Prostaglandin H₁: 15(S)-Hydroxy-9α,11α-peroxidoprost-13-ensäure;
 PGH₂, Prostaglandin H₂: 15(S)-Hydroxy-9α,11α-peroxidoprost-5-cis-13-transdiensäure;
 PGH₃, Prostaglandin H₃: 15(S)-Hydroxy-9α,11α-peroxidoprost-5,13,17-triensäure;
 PGE₂, Prostaglandin E₂: 11α,15(S)-Dihydroxy-9-ketoprost-5-cis-13-transdiensäure;
 PGF_{2α}, Prostaglandin F_{2α}: 9α,11α,15(S)-Trihydroxyprost-5-cis-13-transdiensäure;
 PGD₂, Prostaglandin D₂: 9α,15(S)-Dihydroxy-11-ketoprost-5-cis-13-transdiensäure;
 PGI₂, Prostacyclin: 6,9α-Epoxy-11α,15(S)-dihydroxyprost-5-cis-13-transdiensäure;
 TXA₂, Thromboxan A₂: 9α,11α,Epoxy-15(S)-hydroxythromba-5-cis-13-transdiensäure;
 12-HHT: 12(S)-Hydroxy-8,10-trans-5-cisheptadecatriensäure;
 PGH-Synthase: Prostaglandin-H-Synthase;
 RP-HPLC: Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie;
 LT: Leukotrien;
 LTA₄, Leukotrien A₄: 5(S)-trans-5,6-Oxido-7,9-trans-11,14-ciseicosatetraensäure;
 LTC₄, Leukotrien C₄: 5(S)-Hydroxy-6-(R)-S-glutathionyl-7,9-trans-11,14-ciseicosatetraensäure;
 FLAP: 5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein;
 MGST: Mikrosomale Glutathion-S-Transferase;
 NSAID: Nichtsteroidale entzündungshemmende Wirkstoffe.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt reine PGE-Synthase bereit. Ein bevorzugtes Polypeptid der Erfindung umfasst die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2.

[0020] Isolierte Polypeptide der Erfindung sind jene, wie sie hierin in isolierter Form definiert sind, frei oder im Wesentlichen frei von Material, mit dem sie natürlich assoziiert sind, wie beispielsweise anderen Polypeptiden, mit denen sie in der Zelle gefunden werden. Die Polypeptide können natürlich mit Verdünnungsmitteln oder Adjuvantien formuliert werden und können für praktische Zwecke stets isoliert sein – beispielsweise sind die Polypeptide normalerweise mit Gelatine oder anderen Trägern vermischt, wenn sie verwendet werden, um Mikrotiterplatten zur Verwendung in Immuntests zu beschichten. Die Polypeptide können glykosyliert, entweder natürlich oder durch Systeme heterologer eukaryotischer Zellen, oder sie können (beispielsweise, wenn sie durch Expression in prokaryotischen Zellen hergestellt werden) unglykosyliert sein. Die Bezeichnung "fehlende native Glykosylierung" kann in Bezug auf ein Polypeptid verwendet werden, das entweder keine Glykosylierung aufweist (z.B. nach der Herstellung in einer prokaryotischen Zelle) oder ein Glykosylierungsmuster aufweist, das kein natürliches Muster ist, wie z.B. jenes, das durch Expression in einem bestimmten Wirtszelltyp (der CHO-Zellen sein kann) verliehen wird.

[0021] Polypeptide der Erfindung können beispielsweise durch Addition einer Signalsequenz, um ihre Sekretion aus einer Zelle zu fördern, oder durch Addition von Histidinresten, um ihre Reinigung zu unterstützen, modifiziert werden. Fusionsproteine können gebildet werden, die (z.B.) sechs Histidinreste entweder am N-Terminus oder am C-Terminus des rekombinanten Proteins inkorporieren. Solch eine Histidinmarkierung kann zur

Reinigung des Proteins unter Verwendung von im Handel erhältlichen Säulen, die ein Metallion, entweder Nickel oder Cobalt, enthalten (Clontech, Palo Alto, CA, USA), verwendet werden. Diese Markierungen dienen auch zur Detektion des Proteins unter Verwendung von im Handel erhältlichen, monoklonalen Antikörpern, die gegen die sechs Histidinreste gerichtet sind (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

[0022] Polypeptide, die Aminosäuresequenzvarianten, -allele, -derivate oder -mutanten sind, werden von der vorliegenden Erfindung auch bereitgestellt, wobei solche Formen zumindest 70% Sequenzidentität, beispielsweise zumindest 80%, 90%, 95%, 98% oder 99% Sequenzidentität, zu Seq.-ID Nr. 2 aufweisen. Ein Polypeptid, das eine Variante, ein Allel, ein Derivat oder eine Mutante ist, kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich von der in Seq.-ID Nr. 2 gezeigten Sequenz um eine oder mehrere Additionen, Substitutionen, Deletionen und Insertionen von einer oder mehrerer (wie beispielsweise von 1 bis 20, beispielsweise 2, 3, 4 oder 5 bis 10) Aminosäuren unterscheidet.

[0023] Für die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2 kodiert die menschliche Nucleotidsequenz aus Seq.-ID Nr. 1. Polypeptide der Erfindung umfassen jene, für die Allele der menschlichen Sequenz und Homologe anderer Säugetiere, insbesondere von Primaten, kodieren, sowie Fragmente solcher Polypeptide, wie nachstehend noch näher erläutert wird. Die Primärsequenz des PGE-Synthaseproteins ist im Wesentlichen jener aus Seq.-ID Nr. 2 ähnlich und kann mittels herkömmlicher Verfahren, die Fachleuten zugänglich sind, bestimmt werden. Im Wesentlichen umfassen solche Verfahren die Verwendung von Polynucleotiden, die von Seq.-ID Nr. 1 abgeleitet sind, als Sonden, um die Sequenz des PGE-Synthasegens aus anderen Spezies zu gewinnen und zu bestimmen. Zahlreiche verschiedene Verfahren sind hierfür erhältlich, beispielsweise PCR-Amplifikation und Klonierung des Gens unter Verwendung einer geeigneten mRNA-Quelle, oder auch Verfahren, die das Erhalten einer cDNA-Bibliothek aus dem Säugetier, z.B. einer cDNA-Bibliothek aus einer der zuvor erwähnten Quellen, das Sondieren dieser Bibliothek mit einem Polynucleotid der Erfindung unter stringenten Bedingungen und die Gewinnung einer cDNA, die für das ganze PGE-Synthaseprotein dieses Säugetiers oder für einen Teil davon kodiert, umfassen. Wird eine teilweise cDNA erhalten, so kann die Vollängen-Kodiersequenz durch Primer-Extensionsverfahren bestimmt werden.

[0024] Ein "aktiver Abschnitt" der Polypeptide bezeichnet ein Peptid, das weniger als das Vollängen-Polypeptid ist, jedoch seine wesentliche biologische Aktivität beibehält. Insbesondere behält der aktive Abschnitt die Fähigkeit bei, PGE-Synthese aus PGH in Gegenwart von Glutathion zu katalysieren.

[0025] Geeignete aktive Abschnitte umfassen somit das zentrale Segment von Seq.-ID Nr. 2, z.B. etwa zwischen den Resten 30–130. Die relevante katalytische Region des PGE-Synthaseproteins wird, auf Grundlage von Analogie zu MGST1- und LTC₄-Synthase, im zentralen Segment von Seq.-ID Nr. 2 erwartet: die Aminosäuren 1–41 können durch Proteolyse aus MGST1 ohne Funktionsverlust entfernt werden (Andersson et al., Biochim. Biophys. Acta 1204, 298–304 (1994)); C-terminale Segmente können zwischen LTC₄-Synthase und FLAP ohne Veränderung von Proteinfunktion ausgetauscht werden (Lam et al., J. Biol. Chem. 272, 13923–13928 (1997)).

[0026] Ein aktiver Abschnitt der Erfindung umfasst oder besteht aus Aminosäuren 30–152 aus Seq.-ID Nr. 2. Ein anderer aktiver Abschnitt umfasst oder besteht aus Aminosäuren 1–130 aus Seq.-ID Nr. 2. Ein wiederum anderer aktiver Abschnitt umfasst oder besteht aus Aminosäuren 30–130 aus Seq.-ID Nr. 2.

[0027] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Polypeptid einschließlich eines aktiven Abschnitts einer hierin bereitgestellten PGE-Synthase, wobei dieses Polypeptid heterologe Aminosäuren, wie beispielsweise eine identifizierbare Sequenz oder Domäne eines anderen Proteins, oder eine Histidin-Markierung oder andere Markierungssequenz umfassen kann, und die Erfindung umfasst ein Polypeptid, das im Wesentlichen aus einem aktiven Abschnitt einer PGE-Synthase besteht.

[0028] Ein Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise nach Produktion durch Expression aus kodierender Nucleinsäure (beispielsweise unter Verwendung eines Antikörpers) isoliert und/oder gereinigt werden. Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung können auch vollständig oder teilweise durch chemische Synthese, beispielsweise schrittweise, hergestellt werden. Das isolierte und/oder gereinigte Polypeptid kann bei der Formulierung einer Zusammensetzung verwendet werden, die zumindest eine zusätzliche Komponente, wie beispielsweise ein Verdünnungsmittel, umfassen kann.

[0029] Ein Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung kann beim Screenen auf Moleküle verwendet werden, die seine Aktivität oder Funktion beeinflussen oder modulieren. Solche Moleküle können in einem therapeutischen Zusammenhang (der auch Prophylaxe einbinden kann) nützlich sein. Dies wird nachstehend näher

erläutert.

[0030] Ein Polypeptid der Erfindung kann mit einer aufschlussreichen Markierung markiert sein. Die aufschlussreiche Markierung kann jegliche geeignete Markierung sein, die die Detektion des Polypeptids ermöglicht. Geeignete Markierungen umfassen Radioisotope, z.B. ¹²⁵I, Enzyme, Antikörper, Polynucleotide und Linker wie z.B. Biotin.

[0031] Wie bereits angemerkt ist eine bevorzugte Weise zur Herstellung eines Polypeptids der Erfindung die Verwendung von kodierender Nucleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, um das Polypeptid rekombinant herzustellen. In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nucleinsäure, die für PGE-Synthase-Polypeptid kodiert, bei der Herstellung von PGE-Synthase bereit.

[0032] Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung umfassen Nucleinsäuren, die eine Sequenz umfassen, die für ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2 umfasst, und für ein Polypeptid mit zumindest 70% Sequenzidentität zu Seq.-ID Nr. 2 kodiert. Vorzugsweise liegt der Sequenzidentitätsgrad in beiden Fällen bei zumindest 80%, wie beispielsweise zumindest 90%, 95%, 98% oder 99%.

[0033] Nucleinsäuren, die in der Erfindung nützlich sind, umfassen weiters Nucleinsäuren, die eine Sequenz mit zumindest 70% Homologie, noch bevorzugter zumindest 80%, wie z.B. zumindest 90%, 95%, 98% oder 99% Sequenzhomologie, zu den Nucleinsäuresequenzen aus Seq.-ID Nr. 1 oder ihren Komplementen umfassen.

[0034] Nucleinsäure der Erfindung kann für die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2, wobei sie in diesem Fall Seq.-ID Nr. 1 oder eine andere Nucleotidsequenz, je nachdem, wie es die Degeneration des genetischen Codes erlaubt, umfassen kann, oder für ein Polypeptid mit PGE-Synthaseaktivität kodieren, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von Seq.-ID Nr. 2 unterscheidet.

[0035] Wird ein Aspekt der vorliegenden Erfindung in Bezug auf Nucleinsäure mit zumindest einer spezifizierten %-Homologie mit Seq.-ID Nr. 1 oder ihrem Komplement ausgedrückt, so kann die tatsächliche Sequenz der Seq.-ID Nr. 1 oder ihr Komplement ausgeschlossen werden. In verschiedenen Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung nicht natürlich vorkommende Nucleinsäure, die für ein Polypeptid mit PGE-Synthaseaktivität kodiert, wie beispielsweise ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz aus Seq.-ID Nr. 2 oder eine allelische Variante davon umfasst, oder ein(e) nicht natürlich vorkommende(s) Polypeptidmutante, -variante oder -derivat davon bereit.

[0036] Nucleinsäuresequenzen, die für das gesamte PGE-Synthasegen oder einen Teil davon kodieren, können von Fachleuten unter Verwendung der hierin dargebotenen Informationen und Verweise und der auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren (siehe beispielsweise Sambrook, Fritsch & Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), und Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1992)) leicht hergestellt werden. Diese Verfahren umfassen (i) die Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR), um Proben solcher Nucleinsäure, z.B. aus genomischen Quellen, zu amplifizieren, (ii) chemische Synthese oder (iii) die Herstellung von cDNA-Sequenzen. Modifikationen an den hierin beschriebenen Wildtypsequenzen können z.B. unter Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese gebildet werden, um die Expression von modifizierten Polypeptiden zu bewirken oder Codonpräferenz in den Wirtszellen, die zur Expression der Nucleinsäure verwendet werden, zu berücksichtigen.

[0037] Im Allgemeinen werden kurze Sequenzen zur Verwendung als Primer auf dem Syntheseweg hergestellt, der eine schrittweise Herstellung der erwünschten Nucleinsäuresequenz, ein Nucleotid nach dem anderen, umfasst. Verfahren zur Durchführung solcher Synthese unter Verwendung automatisierter Verfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung leicht erhältlich.

[0038] Längere Polynucleotide werden im Allgemeinen unter Verwendung von Rekombinationsverfahren, beispielsweise unter Verwendung eines PCR- (Polymerasekettenreaktions-) Klonierverfahrens, hergestellt. Dies umfasst die Herstellung eines Primerpaars (z.B. aus etwa 15–50 Nucleotiden), basierend auf der hierin bereitgestellten Sequenzinformation, bezüglich einer Region der mRNA oder der genomischen Sequenz, die für jene mRNA kodiert, die wünschenswerterweise kloniert wird, wobei die Primer mit mRNA oder cDNA, die aus Säugetierzellen gewonnen ist (und beispielsweise jede beliebige von menschlicher Zelllinie A549, Epithelzellen, von Osteosarkom abstammenden Zelllinien, Osteoblasten, menschlichen Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Zellen des Fortpflanzungssystems, Mesangialzellen und andere Nierenzellen sein kann), kontaktiert werden, eine Polymerasekettenreaktion unter Bedingungen durchgeführt wird, die zur Amplifikation der

erwünschten Region führen, das amplifizierte Fragment (z.B. durch Reinigen des Reaktionsgemisches auf einem Agarosegel) isoliert und die amplifizierte DNA gewonnen wird. Die Primer können so entworfen sein, dass sie geeignete Restriktionsenzym-Erkennungsstellen enthalten, sodass die amplifizierte DNA in einen geeigneten Klonierungs-Vektor kloniert werden kann.

[0039] Solche Verfahren können verwendet werden, um die gesamte hierin beschriebene Sequenz oder einen Teil davon zu erhalten. Genomische Klone, die das PGE-Synthasegen und seine Intronen sowie Promotorregionen enthalten, können auch auf eine analoge Weise gewonnen werden, ausgehend von genomischer DNA aus einem Säugetier, z.B. aus einer menschlichen Zelle, z.B. einer primären Zelle wie beispielsweise einer Leberzelle, einer Gewebekulturzelle oder aus einer Bibliothek, wie z.B. einer Phagen-, Cosmid-, YAC- (künstliches Hefechromosom), BAC- (bakterielles künstliches Chromosom) oder PAC- (künstliches P1/P2-Phagenchromosom) Bibliothek.

[0040] Polynucleotide, die nicht 100% homolog zu den Sequenzen der vorliegenden Erfindung sind, jedoch in den Schutzzumfang der Erfindung fallen, können auf zahlreiche Wege gewonnen werden.

[0041] Andere menschliche Varianten (beispielsweise Allelformen) des hierin beschriebenen PGE-Synthasegens können beispielsweise durch Sondieren von cDNA oder genomischer DNA-Bibliotheken, die aus menschlichen Geweben erstellt werden, erhalten werden.

[0042] Weiters können andere Tier-, und insbesondere Säugetier- (z.B. Mäuse-, Ratten- oder Kaninchen-, Schaf-, Ziegen-, Rinder-, Pferde-, Schweine-, Hunde-, Katzen- oder Primaten-), Homologe des Gens gewonnen werden. Solche Sequenzen können durch Erstellen oder Erhalten von cDNA-Bibliotheken, die aus sich teilenden Zellen oder Geweben oder genomischen DNA-Bibliotheken von anderen Tierspezies hergestellt werden, und Sondieren solcher Bibliotheken mit Sonden einschließlich der gesamten Nucleinsäure der Erfindung oder eines Teils davon unter Bedingungen mittlerer oder hoher Stringenz (zur Hybridisierung an einem festen Träger (Filter) beispielsweise Übernacht-Inkubation bei 42°C in einer Lösung, die 50% Formamid, 5 × SSC (750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextran-sulfat und 20 µg/ml Lachssperma-DNA enthält, gefolgt von Waschen in 0,03 M Natriumchlorid und 0,03 M Natriumcitrat (d.h. 0,2 × SSC) bei etwa 50°C bis etwa 60°C) gewonnen werden.

[0043] Somit kann die vorliegende Erfindung eine isolierte Nucleinsäure verwenden, die an die in Seq.-ID Nr. 1 gezeigte Nucleotidsequenz unter den zuvor genannten Hybridisierungs- und Waschbedingungen hybridisiert. Solch eine Nucleinsäure ist für die Verwendung als eine Sonde zur Detektion eines PGE-Synthasegens, beispielsweise in Southern-Blots oder in Metaphase-Spreads, geeignet.

[0044] Alternativ dazu können solche Polynucleotide durch ortsgerichtete Mutagenese der Sequenzen aus Seq.-ID Nr. 1 oder von Allelvarianten davon erhalten werden. Dies kann nützlich sein, wenn beispielsweise stille Codon-Änderungen an Sequenzen erforderlich sind, um Codon-Präferenzen für eine bestimmte Wirtszelle zu optimieren, in der die Polynucleotidsequenzen exprimiert werden. Andere Sequenzänderungen können erwünscht sein, um Restriktionsenzym-Erkennungsstellen zu reduzieren oder um die Eigenschaft oder Funktion der Polypeptide, für die die Polynucleotide kodieren, zu ändern. Weitere Änderungen können wünschenswert sein, um über bestimmte Kodieränderungen zu verfügen, die erforderlich sind, um beispielsweise konservative Substitutionen bereitzustellen.

[0045] Im Zusammenhang mit dem Klonieren kann es für ein oder mehrere Genfragmente erforderlich sein, ligiert zu werden, um eine Vollängen-Kodiersequenz zu bilden. So kann, sofern kein Vollängen-Kodiernucleinsäuremolekül gewonnen wurde, auch ein kleineres Molekül, das einen Teil des Vollängen-Moleküls aufweist, verwendet werden, um Vollängen-Klone zu erhalten. Inserts können aus Teil-cDNA-Klonen hergestellt und verwendet werden, um cDNA-Bibliotheken zu screenen. Die isolierten Vollängen-Klone können in Expressionsvektoren subkloniert werden, und Aktivität kann durch Transfektion in geeignete Wirtszellen, z.B. mit einem Reporterplasmid, getestet werden.

[0046] Vorzugsweise wird ein Polynucleotid der Erfindung in einem Vektor operabel an eine Kontrollsequenz gebunden, die in der Lage ist, für die Expression der Kodiersequenz durch die Wirtszelle zu sorgen, d.h. der Vektor ist ein Expressionsvektor. Die Bezeichnung "operabel gebunden" bezieht sich auf eine Nebeneinanderstellung, worin die beschriebenen Komponenten in einer Beziehung zueinander stehen, die es ihnen ermöglicht, in ihrer beabsichtigten Weise zu funktionieren. Eine Kontrollsequenz, die an eine Kodiersequenz "operabel gebunden" ist, ist auf solche Weise ligiert, dass Expression der Kodiersequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel sind.

[0047] Geeignete Vektoren können ausgewählt oder konstruiert werden, die geeignete Regulationssequenzen einschließlich Promotorsequenzen, Terminatorfragmente, Polyadenylierungssequenzen, Enhancersequenzen, Markergene und andere Sequenzen, je nach Bedarf, enthalten. Vektoren können Plasmide, virale, z.B. Phage, Phagemid oder Baculovirus, Cosmide, YACs, BACs oder PACs, je nach Bedarf, sein.

[0048] Die Vektoren können mit einem Replikationsursprung, gegebenenfalls mit einem Promotor für die Expression des genannten Polynucleotids und gegebenenfalls mit einem Regulator des Promotors, bereitgestellt werden. Die Vektoren können ein oder mehrere selektierbare Markergene, beispielsweise ein Ampicillin-resistentes Gen im Fall eines bakteriellen Plasmids oder ein Neomycin-resistentes Gen für einen Säugetiervektor, enthalten. Vektoren können in vitro verwendet werden, beispielsweise für die Herstellung von RNA, oder können zur Transfektion oder Transformation einer Wirtszelle verwendet werden. Der Vektor kann auch an eine In-vitro-Verwendung angepasst werden, beispielsweise bei Verfahren der Gentherapie. Systeme zur Klonierung und Expression eines Polypeptids in zahlreichen verschiedenen Wirtszellen sind bekannt. Geeignete Wirtszellen umfassen Bakterien, eukaryotische Zellen, wie beispielsweise Säugetierzellen und Hefe, und Baculovirussysteme. Säugetier-Zelllinien, die auf dem Gebiet der Erfindung zur Expression eines heterologen Polypeptids erhältlich sind, umfassen Chinahamster-Eierstockzellen, HeLa-Zellen, Babyhamster-Nierenzellen, COS-Zellen und zahlreiche andere.

[0049] Weitere Details sind beispielsweise in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), nachzulesen. Zahlreiche andere Verfahren und Arbeitsvorschriften zur Manipulation von Nucleinsäure, beispielsweise bei der Herstellung von Nucleinsäurekonstrukten, für Mutagenese, Sequenzieren, Einführen von DNA in Zellen und Genexpression sowie Analyse von Proteinen werden detailliert in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (Hrsg.), John Wiley & Sons (1992), beschrieben.

[0050] Vektoren können zu einer geeigneten Wirtszelle wie zuvor beschrieben transformiert werden, um für Expression eines Polypeptids der Erfindung zu sorgen. Somit stellt in einem weiteren Aspekt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden gemäß der Erfindung bereit, das das Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor wie zuvor beschrieben transformiert oder transfiziert ist, unter Bedingungen, die für Expression einer Kodiersequenz, die für die Polypeptide kodiert, durch den Vektor sorgen, und die Gewinnung der exprimierten Polypeptide umfasst. Polypeptide können auch in In-vitro-Systemen wie beispielsweise Retikulozyten-Lysat exprimiert werden.

[0051] Nach der Herstellung eines Polypeptids der Erfindung kann es auf PGE-Synthaseaktivität getestet werden, z.B. durch Bestimmung von PGE-Produktion bei Inkubation des Polypeptids mit PGH_2 und reduziertem Glutathion. PGE kann unter Verwendung von Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (R-P-HPLC) nachgewiesen werden, die die Quantifizierung der vorhandenen Menge ermöglicht.

[0052] Isolierte/reine PGE-Synthase kann in zahlreichen verschiedenen Zusammenhängen verwendet werden.

[0053] Aufgrund der Wichtigkeit von PGE bei Entzündungen und in anderen Zusammenhängen medizinischer Bedeutung befassen sich wichtige Aspekte der Erfindung mit der Identifikation von Substanzen, die in der Lage sind, PGE-Produktion zu beeinflussen, insbesondere durch Modulation von PGE-Synthaseaktivität. Von größtem Interesse ist die Inhibition von PGE-Synthaseaktivität, um das Ausmaß von PGE-Produktion zu reduzieren.

[0054] PGE ist bekannt dafür, Schmerzen sowohl in vivo als auch in vitro zu verursachen (Bley et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 19, 141–147 (1998)). Der Prostaglandin-E-Rezeptor (EP_3) stellt sich auch als maßgeblich für funktionelle Fieberreaktion heraus (Ushikubi et al., *Nature* 395, 281–284 (1998)). Die Rolle von Prostaglandinen bei Entzündungen und Entzündungskrankheiten wie beispielsweise Arthritis wurde durch die Verwendung von verschiedenen Cyclooxygenase-Inhibitoren (nichtsteroiden entzündungshemmenden Wirkstoffen, NSAIDs, einschließlich Aspirin) (Vane & Botting, *American J. of Med.* 104(3A), 2S–8S (1998)) auch umfassend dokumentiert. In dieser Hinsicht wurde PGE als das stärkste entzündungsfördernde Prostaglandin erkannt (Moncada et al., *Nature* 246, 217–219 (1973)), wobei spezifische Entfernung dieser Verbindung durch Inhibition von PGE-Synthase verwendet werden kann, um Steuerung von Entzündungsreaktionen mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu den gegenwärtig verwendeten NSAIDs bereitzustellen.

[0055] Mehrere Berichte zeigten signifikante Anti-Tumor-Wirkungen durch NSAIDs auf kolorektale Tumoren (Giovannucci et al., *Annals of Internal Medicine* 121, 241–246 (1994); Giardiello et al., *European Journal of*

Cancer 31A, 1071 (1995); Williams et al., Journal of Clinical Investigation 100, 1325–1329 (1997)). PGE fördert Krebszellenproliferation (Qiao et al., Biochimica et Biophysica Acta 1258, 215–223 (1995)) und hemmt programmierten Zelltod (Ottonello et al., Experimental Hematology 26, 895–902 (1998); Goetzl et al., Journal of Immunology 154, 1041–1047 (1995)), was insgesamt darin resultiert, dass PGE Krebszellwachstum fördert (Sheng et al., Cancer Research 58, 362–366 (1998)). Inhibition von PGE-Bildung führt somit zu langsamerer Proliferation in Kombination mit gesteigerter Apoptose der Krebszellpopulation. Diese Inhibitionswirkung von NSAIDs wurde auch bei anderen Krebsleiden wie beispielsweise bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs beobachtet (Hida et al., Anticancer Research 18, 775–782 (1998)).

[0056] Prostaglandine sind auch in Alzheimer-Krankheit eingebunden. Mehrere klinische Versuche konnten zeigen, dass Benutzer von NSAIDs nur mit dem halben Risiko leben, an Alzheimer zu erkranken (Dubois et al., Faseb J. 12, 1063–1073 (1998)). Andere Beobachtungen, die damit übereinstimmen, lassen darauf schließen, dass Entzündungsprozesse zu dieser Erkrankung beitragen können (Aisen, Gerontology 43, 143–149 (1997)).

[0057] In verschiedenen anderen Aspekten betrifft die vorliegende Erfindung Screening- und Testverfahren und -mittel sowie hierdurch identifizierte Substanzen, insbesondere Inhibitoren von PGE-Synthase.

[0058] Somit stellen weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung die Verwendung eines Polypeptids oder Peptids (insbesondere eines Fragments eines Polypeptids der Erfindung wie offenbart und/oder hierfür kodierender Nucleinsäure) beim Screenen oder Suchen nach und/oder Gewinnen/Identifizieren von einer Substanz bereit, z.B. von einem Peptid oder einer chemischen Verbindung, das oder die mit dem Polypeptid oder Peptid wechselwirkt und/oder sich daran bindet und/oder seine Funktion oder Aktivität stört, oder von einer anderen Substanz, z.B. Polypeptid oder Peptid, die mit dem Polypeptid oder Peptid der Erfindung wechselwirkt und/oder sich daran bindet. Ein Verfahren gemäß einem Aspekt der Erfindung beispielsweise umfasst das Bereitstellen eines Polypeptids oder Peptids der Erfindung und das Kontaktieren mit einer Substanz, wobei dieser Kontakt zu einer Bindung zwischen dem Polypeptid oder Peptid und der Substanz führen kann. Bindung kann durch jegliche Anzahl an Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung erhältlich sind, sowohl qualitativer als auch quantitativer Art, bestimmt werden.

[0059] In verschiedenen Aspekten betrifft die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Tests auf Substanzen, die mit einem Polypeptid der Erfindung wechselwirken oder daran binden und/oder eine oder mehrere seiner Aktivitäten modulieren.

[0060] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt einen Test bereit, der Folgendes umfasst:

- (a) das Kontaktieren eines Polypeptids oder Peptids gemäß der Erfindung und eines mutmaßlichen Bindungsmolekül oder einer anderen Testsubstanz; und
- (b) das Bestimmen von Wechselwirkung oder Bindung zwischen dem Polypeptid oder Peptid und der Testsubstanz.

[0061] Eine Substanz, die mit dem Polypeptid oder Peptid der Erfindung wechselwirkt, kann isoliert und/oder gereinigt, hergestellt und/oder verwendet werden, um seine Aktivität wie bereits erläutert zu modulieren.

[0062] Es ist nicht erforderlich, die ganzen Proteine für Tests der Erfindung zu verwenden, die auf Bindung zwischen zwei Molekülen wie zuvor beschrieben oder auf PGE-Synthaseaktivität (siehe unten) testen.

[0063] Fragmente können auf jegliche geeignete Weise, die Fachleuten bekannt ist, gebildet und verwendet werden. Geeignete Wege zur Herstellung von Fragmenten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, rekombinante Expression eines Fragments aus der Kodier-DNA. Solche Fragmente können durch Auswählen von Kodier-DNA, Identifizieren geeigneter Restriktionsenzym-Erkennungsstellen für beide Seiten des zu exprimierenden Abschnitts und Ausschneiden dieses Abschnitts aus der DNA gebildet werden. Der Abschnitt kann dann operabel an einen geeigneten Promotor in einem herkömmlichen, im Handel erhältlichen Expressionssystem gebunden werden. Ein anderer Rekombinationsansatz umfasst die Amplifikation des relevanten Abschnitts der DNA mit geeigneten PCR-Primern. Kleine Fragmente (z.B. bis zu etwa 20 oder 30 Aminosäuren) können auch unter Verwendung von Peptidsyntheseverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, gebildet werden.

[0064] Das präzise Format des Tests der Erfindung kann von Fachleuten unter Einbezug von Routinefähigkeiten und -wissen variiert werden. Beispielsweise kann die Wechselwirkung zwischen den Polypeptiden in vitro durch Markieren eines mit einer nachweisbaren Markierung und Kontaktieren mit dem anderen, das an ei-

nem festen Träger isoliert ist, untersucht werden. Geeignete nachweisbare Markierungen umfassen ^{35}S -Methionin, das in rekombinant hergestellte Peptide und Polypeptide inkorporiert werden kann. Rekombinant hergestellte Peptide und Polypeptide können auch als ein Fusionsprotein exprimiert werden, das ein Epitop enthält, das mit einem Antikörper markiert werden kann.

[0065] Das Protein, das an einem festen Träger immobilisiert ist, kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen dieses Protein, der an einen festen Träger gebunden ist, oder mittels anderer Verfahren, die an sich bekannt sind, immobilisiert werden. Eine bevorzugte In-vitro-Wechselwirkung kann ein Fusionsprotein verwenden, das Glutathion-S-Transferase (GST) umfasst. Dieses kann an Glutathion-Agarose-Perlen immobilisiert werden. In einem In-vitro-Testformat des zuvor beschriebenen Typs kann eine Testverbindung durch Bestimmen ihrer Fähigkeit, die Menge an markiertem Peptid oder Polypeptid, das sich an das immobilisierte GST-Fusionspolypeptid bindet, zu reduzieren, getestet werden. Dies kann durch Fraktionierung der Glutathion-Agarose-Perlen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt werden. Alternativ dazu können die Perlen gespült werden, um ungebundenes Protein zu entfernen, und die Menge an Protein, die gebunden war, kann durch Zählen der Menge an vorhandener Markierung in beispielsweise einem geeigneten Szintillationszähler bestimmt werden.

[0066] Die Bestimmung der Fähigkeit einer Testverbindung, mit einem PGE-Synthase-Polypeptid oder Fragment wechselzuwirken und/oder sich daran zu binden, kann verwendet werden, um diese Testverbindung als einen Kandidaten für einen Modulator von PGE-Synthase-Aktivität zu identifizieren. Im Allgemeinen folgen der Identifikation der Fähigkeit einer Testverbindung, sich an ein Polypeptid oder Fragment der Erfindung zu binden, dann ein oder mehrere weitere Testschritte, die die Bestimmung einbinden, ob die Testverbindung in der Lage ist, PGE-Synthase-Aktivität zu modulieren oder nicht. Natürlich können Tests, die die Bestimmung der Fähigkeit einer Testsubstanz, PGE-Synthase-Aktivität zu modulieren, einbinden, durchgeführt werden, wenn keine Kenntnis darüber vorhanden ist, ob die Testsubstanz die PGE-Synthase binden oder mit ihr wechselwirken kann, wobei jedoch im Vorfeld ein Bindungs/Wechselwirkungs-Test zum "groben" Screening verwendet werden kann, um eine große Anzahl an Substanzen zu testen und dadurch die Anzahl an Kandidaten auf ein besser überschaubares Niveau für einen funktionellen Test zu reduzieren, der die Bestimmung von Fähigkeit, PGE-Synthase-Aktivität zu modulieren, einbindet. Eine weitere Möglichkeit für grobes Screening ist das Testen einer Substanz auf Fähigkeit, PGE-Produktion durch eine geeignete Zelllinie, die PGE-Synthase exprimiert (entweder natürlich oder rekombinant), zu beeinflussen. Ein Test gemäß der vorliegenden Erfindung kann auch in Form eines In-vivo-Tests durchgeführt werden. Der In-vivo-Test kann in einer Zelllinie wie beispielsweise einem Hefestamm durchgeführt werden, in dem die relevanten Polypeptide oder Peptide von einem oder mehreren Vektoren, die in die Zelle eingeführt wurden, exprimiert werden. Eine wiederum andere Möglichkeit für ein grobes Screening ist das Testen auf die Fähigkeit einer Substanz, PGE-Produktion durch ein unreines Proteinpräparat, das PGE-Synthase umfasst (entweder von Menschen oder anderen Säugetieren), zu beeinflussen. Ein bevorzugter Test der Erfindung schließlich umfasst jedoch die Bestimmung der Fähigkeit einer Testverbindung, PGE-Synthase-Aktivität eines isolierten/gereinigten Polypeptids der Erfindung (das eine Volllänge-PGE-Synthase oder einen aktiven Abschnitt davon umfasst) zu modulieren.

[0067] Ein Verfahren zum Screenen auf eine Substanz, die Aktivität eines Polypeptids moduliert, kann das Kontaktieren einer oder mehrerer Testsubstanzen mit dem Polypeptid in einem geeigneten Reaktionsmedium, das Testen der Aktivität des behandelten Polypeptids und das Vergleichen dieser Aktivität mit der Aktivität des Polypeptids in vergleichbarem Reaktionsmedium, das nicht mit der oder den Testsubstanz(en) behandelt wurde, umfassen. Ein Aktivitätsunterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Polypeptiden ist ein Hinweis auf eine Modulationswirkung der relevanten Testsubstanz oder -substanzen.

[0068] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Testverfahren bereitgestellt, das folgende Schritte umfasst:

- (a) das Inkubieren eines isolierten Polypeptids, das PGE-Synthase-Aktivität aufweist, und einer Testverbindung in Gegenwart von reduziertem Glutathion und PGH_2 unter Bedingungen, unter denen normalerweise PGE gebildet wird; und
- (b) das Bestimmen der Bildung von PGE.

[0069] PGH_2 -Substrat für PGE-Synthase kann durch Inkubation von Cyclooxygenase und Arachidonsäure bereitgestellt werden, sodass diese im Testmedium bereitgestellt werden können, um PGH_2 bereitzustellen.

[0070] Weiters katalysiert PGE-Synthase die stereospezifische Bildung von 9-Keto, 11 α -Hydroxyprostaglandin aus dem zyklischen Endoperoxid, und so können andere Substrate von PGE-Synthase zur Bestimmung von PGE-Synthase-Aktivität und der Wirkung auf diese Aktivität einer Testverbindung durch Bestimmung von

Bildung des geeigneten Produkts verwendet werden.

Substrat	Produkt
PGH ₂	PGE ₂
PGH ₁	PGE ₂
PGH ₃	PGE ₃
PGG ₂	15(S)-Hydroxyperoxy-PGE ₂
PGG ₁	15(S)-Hydroxyperoxy-PGE ₁
PGG ₃	15(S)-Hydroxyperoxy-PGE ₃

[0071] Somit stellt ein allgemeinerer Aspekt der Erfindung ein Testverfahren bereit, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) das Inkubieren eines isolierten Polypeptids, das PGE-Synthase-Aktivität aufweist, und einer Testverbindung in Gegenwart eines zyklischen Endoperoxid-Substrats von PGE-Synthase unter Bedingungen, unter denen PGE-Synthase normalerweise die Umsetzung des zyklischen Endoperoxid-Substrats zu einem Produkt, das die 9-Keto,11 α -Hydroxy-Form des Substrats ist, katalysiert; und
- (b) das Bestimmen der Bildung von diesem Produkt.

[0072] Wie bereits erwähnt kann das Substrat jedes beliebige der zuvor erläuterten sein oder auch jedes andere geeignete Substrat, das Fachleuten zur Verfügung steht. Es kann PGH₂ sein, wobei das Produkt dann PGE ist.

[0073] Ein Inhibitor von PGE-Synthase kann durch Bestimmung von reduzierter Produktion von PGE oder einem anderen Produkt (je nach verwendetem Substrat) im Vergleich zu einem Kontrollversuch, in dem die Testverbindung nicht angewendet wurde, identifiziert werden (oder eine Kandidatensubstanz, von der angenommen wird, dass sie ein PGE-Synthase-Inhibitor ist, kann so als solche bestätigt werden).

[0074] Zur Produktbestimmung kann HPLC, UV-Spektrometrie, Radioaktivitätsnachweis oder RIA (wie beispielsweise ein im Handel erhältliches RIA-Set zur Detektion von PGE) verwendet werden. Produktbildung kann mittels Gaschromatographie (GC) oder Massenspektrometrie (MS) oder mittels DC mit Radioaktivitäts-Scanning analysiert werden.

[0075] Ein kombinatorisches Bibliotheksverfahren (J. S. Schultz, Biotechnol. Prog. 12, 729–743 (1996)) liefert einen effizienten Weg zum Testen einer möglicherweise großen Anzahl an unterschiedlichen Substanzen auf die Fähigkeit, Aktivität eines Polypeptids zu modulieren.

[0076] Die Menge an Testsubstanz oder Verbindung, die einem Test der Erfindung zugesetzt werden kann, wird je nach Typ der verwendeten Verbindung normalerweise mittels Trial-and-Error-Methode bestimmt. Typischerweise können Konzentrationen von etwa 0,1 nM bis 10 μ M einer Testverbindung (z.B. eines mutmaßlichen Inhibitors) verwendet werden. Höhere Konzentrationen können verwendet werden, wenn ein Peptid die Testsubstanz ist.

[0077] Verbindungen, die verwendet werden können, können natürliche oder synthetische chemische Verbindungen sein, die in Wirkstoff-Screening-Programmen verwendet werden. Extrakte von Pflanzen, die mehrere charakterisierte oder nicht charakterisierte Komponenten aufweisen, können auch verwendet werden.

[0078] Andere Kandidaten-Inhibitorverbindungen können aufbauen auf das Modellieren der dreidimensionalen Struktur eines Polypeptid- oder Peptidfragments unter Verwendung von rationalem Wirkstoffdesign, um potenzielle Inhibitorverbindungen mit bestimmter molekularer Form, Größe und bestimmten Ladungseigenschaften bereitzustellen.

[0079] Nach der Identifikation einer Substanz, die Polypeptidaktivität moduliert oder beeinflusst, kann die Substanz weiter untersucht werden. Darüber hinaus kann sie hergestellt und/oder zur Herstellung, d.h. Bildung oder Formulierung, einer Zusammensetzung, wie beispielsweise eines Medikaments, einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Wirkstoffs, verwendet werden. Diese können Personen verabreicht werden.

[0080] Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung in verschiedenen Aspekten nicht nur auf eine Substanz, die gemäß den hierin offenbarten Informationen als ein Modulator von Polypeptidaktivität identifiziert wurde, und auf eine Substanz, die durch ein Verfahren der Erfindung gewonnen wurde, sondern auch auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, ein Medikament, ein Arzneimittel oder eine andere Zusammensetzung, die

solch eine Substanz umfasst, auf ein Verfahren, das die Verabreichung solch einer Zusammensetzung an einen Patienten umfasst, z.B. zur Behandlung (was auch präventive Behandlung umfassen kann) von Entzündungen oder einer zellulären Wachstumsabnormalität oder anderer Erkrankungen oder Leiden wie bereits erläutert, auf die Verwendung solch einer Substanz bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung, z.B. zur Behandlung von Entzündungen oder einer zellulären Wachstumsabnormalität oder anderer Erkrankungen oder Leiden wie bereits erläutert, und auf ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend das Vermischen solch einer Substanz mit einem pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelträger, Vehikel oder Träger und gegebenenfalls mit anderen Bestandteilen.

[0081] Eine als ein Modulator von PGE-Synthase-Aktivität identifizierte Substanz kann in der Natur ein Peptid oder ein Nicht-Peptid sein. Kleine Nicht-Peptid-Moleküle werden für zahlreiche pharmazeutische In-vivo-Verwendungen häufig bevorzugt. Demgemäß kann ein Mimetikum oder eine Nachahmung der Substanz (insbesondere, wenn sie ein Peptid ist) für pharmazeutische Verwendung entworfen werden. Das Entwerfen von Mimetika zu einer bekannten pharmazeutisch aktiven Verbindung ist ein bekannter Ansatz zur Entwicklung von Pharmazeutika basierend auf einer "Leit"-Verbindung. Dies kann wünschenswert sein, wenn die aktive Verbindung schwierig oder teuer zu synthetisieren ist oder wenn sie für ein bestimmtes Verabreichungsverfahren nicht geeignet ist, z.B. sind Peptide nicht gut als Wirkstoffe für orale Zusammensetzungen geeignet, da sie dazu neigen, durch Proteasen im Verdauungstrakt rasch abgebaut zu werden. Der Entwurf von Mimetika, die Synthese und das Testen können verwendet werden, um Zufalls-Screenen großer Mengen an Molekülen auf eine erwünschte Eigenschaft zu umgehen.

[0082] Es gibt mehrere Schritte, die normalerweise beim Entwurf eines Mimetikums ausgehend von einer Verbindung, die eine bestimmte erwünschte Eigenschaft aufweist, durchgeführt werden. Zuerst werden die bestimmten Teile der Verbindung, die maßgeblich und/oder wichtig zur Bestimmung der erwünschten Eigenschaft sind, bestimmt. Im Fall eines Peptids kann dies durch systematisches Variieren der Aminosäurereste im Peptid erfolgen, z.B. durch Substituieren eines Rests nach dem anderen. Diese Teile oder Reste, die die aktive Region der Verbindung darstellen, sind als ihr "Pharmakophor" bekannt.

[0083] Nachdem das Pharmakophor gefunden wurde, wird seine Struktur gemäß seinen physikalischen Eigenschaften, z.B. Stereochemie, Bindung, Größe und/oder Ladung, unter Verwendung von Daten aus zahlreichen verschiedenen Quellen, z.B. aus spektroskopischen Verfahren, Röntgenbeugungsdaten und NMR, modelliert. Rechnerische Analyse, Ähnlichkeitskartierung (die die Ladung und/oder das Volumen eines Pharmakophors modelliert, und nicht die Bindung zwischen Atomen) und andere Verfahren können in diesem Modellierungsvorgang verwendet werden.

[0084] In einer Variante dieses Ansatzes werden die dreidimensionale Struktur des Liganden und seine Bindungspartner modelliert. Dies kann besonders nützlich sein, wenn der Ligand und/oder Bindungspartner durch Bindung seine Konformation ändert, da dies ermöglicht, dass das Modell diese Änderung im Entwurf des Mimetikums berücksichtigt.

[0085] Ein Matrizenmolekül wird dann ausgewählt, auf das chemische Gruppen, die das Pharmakophor nachahmen, aufgepfropft werden können. Das Matrizenmolekül und die chemischen Gruppen, die darauf aufgepfropft sind, können so ausgewählt werden, dass das Mimetikum leicht zu synthetisieren ist, wahrscheinlich pharmakologisch annehmbar ist und sich in vivo nicht abbaut und dennoch die biologische Aktivität der Leitverbindung beibehält. Das Mimetikum oder die Mimetika, die mittels dieses Ansatzes gefunden werden, können dann gescreent werden, um zu sehen, ob bzw. in welchem Ausmaß sie die erwünschte Eigenschaft aufweisen. Weitere Optimierung oder Modifikation kann dann durchgeführt werden, um schließlich ein oder mehrere Endmimetika für In-vivo-Tests oder klinische Tests zu erhalten.

[0086] Mimetika von Substanzen, die unter Verwendung eines Screening-Verfahrens wie hierin offenbart als solche mit der Fähigkeit, Polypeptidaktivität zu modifizieren, identifiziert wurden, liegen innerhalb des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung. Ein Polypeptid, Peptid oder eine Substanz, das oder die in der Lage ist, Aktivität eines Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung zu modulieren, kann in einem Set, z.B. in einem geeigneten Behälter versiegelt, der seinen Inhalt vor der äußeren Umgebung schützt, bereitgestellt werden. Solch ein Set kann Gebrauchsanweisungen beinhalten.

[0087] Weitere Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden für Fachleute offensichtlich sein. Die folgenden Versuche liefern zusätzliche Informationen zur Erfindung sowie Beispiele durch Veranschaulichung von Aspekten und Ausführungsformen der Erfindung.

[0088] Alle in dieser Beschreibung erwähnten Dokumente sind durch Verweis aufgenommen.

VERSUCHSTEIL

[0089] Wie zuvor erwähnt gab es vor der hierin offenbarten Arbeit der Erfinder keine Hinweise darauf, dass die cDNA-Sequenz, die in der GenBank als MGST1-L1 (Gen-Bank-Zugriffsnummer AF027740) bezeichnet ist, sowie eine p53-induzierte PIG12 (GenBank-Zugriffsnummer AF010316) für menschliche PGE-Synthase kodiert. Polyak et al. (s.o.) merkten lediglich an, dass die PIG12-cDNA für eine andere, man könnte sagen für noch eine andere, mikrosomale Glutathion-S-Transferase kodiert.

[0090] Die Erfinder exprimierten das von ihnen als PGE-Synthase (Seq.-ID Nr. 2) identifizierte Protein in einem bakteriellen Expressionssystem, indem sie die Kodiersequenz aus Seq.-ID Nr. 1 verwendeten. Nach heterologer Expression in *E. coli* wurden sowohl cytosolische als auch Membranfraktionen hergestellt. Ein Kaninchen-Antiserum wurde gegen ein inneres Peptid von PGE-Synthase gezüchtet, und Western-Blot-Analyse wies spezifisch ein 15-kDa-Protein in der Membranfraktion von Bakterien, die PGE-Synthase exprimieren, nach.

[0091] Die bakterielle Membran- und cytosolischen Fraktionen wurden mit PGH₂ in Gegenwart oder Abwesenheit von reduziertem Glutathion inkubiert. Die Produkte (PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂ und 12-HHT) wurden durch RP-HPLC unter Verwendung von UV-Absorption bei 195 nm sowie Online-Radioaktivitätsdetektion analysiert. Für die Membranfraktion, jedoch nicht für die cytosolische Fraktion, wurde erkannt, dass sie hohe, Glutathion-abhängige PGE-Synthase-Aktivität (0,25 µmol/min/mg) besaß.

[0092] A549-Zellen wurden als ein Modell verwendet, um Cyclooxygenase-2-Induktion durch Interleukin-1β zu untersuchen. Wurden A549-Zellen in Gegenwart von Interleukin-1β (1 ng/ml) 24 h lang gezüchtet, so wurde mittels Western-Blot-Analyse eine signifikante Induktion des PGE-Synthase-Proteins beobachtet. Auch erkannte das Antiserum spezifisch ein 16-kDa-Protein in handelsüblicher, teilweise gereinigter PGE-Synthase-Aktivität, die aus Schaf-Samenbläschen isoliert worden war.

MATERIALIEN UND VERFAHREN

Materialien

[0093] Kaninchen-anti-Mensch-PGE-Synthase-Antiserum wurde zum folgenden synthetischen Peptid gezüchtet: CRSDPDVERSLRAHRN (Seq.-ID Nr. 3), konjugiert mit Schlüssellochnapfschnecken-Hämocyanin (Innovagen, Lund, Schweden). Dieses Peptid-Antigen entspricht Aminosäuren 59–74 von PGE-Synthase (es gilt anzumerken, dass Cys 68 durch Ser ersetzt wurde, sofern Einschluss von Cys die Peptidsynthese störte).

[0094] Meerrettichperoxidase-gebundener Esel-anti-Kaninchen-Antikörper wurde bei Amersham Pharmacia Biotech, England, erworben. Der Film (Hyperfilm ECL) wurde auch vom selben Lieferanten erhalten. Oligonucleotide stammten aus dem Kebo-Labor, Schweden. Pfu-DNA-Polymerase stammte von Stratagene, CA, USA. PGH₂ und 3H-PGH₂ wurde bei Cayman Chemical, USA, erworben. PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂ und 12-HHT wurden bei Biomol, PA, USA, erworben. Glutathion und Interleukin-1β stammten von Sigma-Aldrich, Inc. HPLC-Lösungsmittel stammten von Rathburn Chemicals, Schottland. Teilweise gereinigte PGE-Synthase, isoliert aus Schaf-Samenbläschen, wurde von Oxford Biomedical Research, Inc., MI, USA, bezogen. Die Zelllinie A549 stammte von Boehringer Ingelheim Biowhittaker, Belgien. Zellkulturmedien und Antibiotika stammten von Gibco BRL, Life Technology, Schweden. Proteaseinhibitor-Gemisch, Complete™, wurde von Boehringer Mannheim Scandinavia, Schweden, erhalten.

Isolieren und Klonieren von PGE-Synthase

[0095] Der EST-Klon 143735 mit GenBank-Zugriffsnummer R76492 war bereits davor als "microsomal glutathione S-transferase 1-like 1" (mikrosomaler Glutathion-S-Transferase-1-ähnlicher 1) (MGST1-L1) identifiziert und mit GenBank-Zugriffsnummer AF027740 kodiert worden. Dasselbe Genprodukt wurde auch als "p53-induzierte PIG12" charakterisiert und mit GenBank-Zugriffsnummer AF010316 kodiert.

[0096] Die Kodiersequenz von PGE-Synthase, die der Nucleotidsequenz 19 bis 477 des EST-Klons 143735 (Zugriffsnummer AF027740) entspricht, wurde mittels PCR amplifiziert. Oligonucleotidprimer wurden so konstruiert, dass sie geeignete Restriktionsstellen (NdeI-HindIII) in die 5'- und 3'-Enden des Produkts inkorporierten.

Primer 1 (Sense): 5'-GAGAGACATATGCCTGCCCACAGCCTG-3' (die unterstrichene Stelle entspricht der Nde-I-Stelle);

Primer 2 (Antisense): 5'-GAGAGAAAGCTTCACAGGTGGCGGGCCGC-3' (die unterstrichene Stelle entspricht der Hind-III-Stelle).

[0097] In beiden Primern sind GAGAGA nur zusätzliche flankierende Nucleotide.

[0098] PCR wurde mit 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM des jeweiligen Primers, 70 ng Matrize, 2,5 U von Pfu-Polymerase in 1 × Pfu-Puffer (vom Hersteller geliefert) durchgeführt. Die Temperaturzyklen waren 45 s bei 94°C, 45 s bei 60°C und 45 s bei 72°C und wurden 25-mal wiederholt. Die erste Denaturierungsphase betrug jedoch 4 min und die letzte Extensionsphase 10 min. Das PCR-Produkt wurde durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert, aus dem Gel gereinigt und mit NdeI und HindIII geschnitten.

[0099] Das resultierende Produkt wurde Gel-gereinigt und in den bakteriellen Expressionsvektor pSP19T7LT (R. Weinander et al., Biochemical Journal 311, 861–868 (1995)) ligiert. Ligierte Plasmide wurden in DH5aTM-kompetente Zellen transformiert. Plasmide wurden aus zahlreichen Klonen isoliert und mit NdeI und HindIII gespalten, woraufhin Agarosegel-Elektrophorese folgte, um die Größe der Inserts zu bestätigen. Selektierte Inserts wurden an einem automatisierten DNA-Sequenzierer Applied Biosystems 373A unter Verwendung eines Sequenzierungssets mit Farbstoff-Terminationszyklus sequenziert.

[0100] Das Expressionskonstrukt, das die korrekte Kodiersequenz für die PGE-Synthase enthielt, wurde zu E. coli BL21 (DE3)(das das Plasmid pLys SL in sich trug (F. W. Studier, Journal of Molecular Biology 219, 37–44 (1991))) transformiert. Glycerin-Stammlösungen wurde hergestellt und gefroren bei –70°C zur weiteren Verwendung als Ausgangsmaterial für die Expressionsversuche gelagert.

Expression in E. coli

[0101] Kleine Allquoten (1–2 µl) von bakterieller Glycerin-Stammlösung wurden in 2 × YT über Nacht bei 37°C gezüchtet. Die Kulturen wurden 1:100 in 2 l "Terrific Broth"-Medium, das Ampicillin (75 µg/ml) und Chloramphenicol (10 µg/ml) enthielt, in einem 5-l-Kolben, platziert in einem Wasserbad mit konstanter Temperatur, verdünnt. Die Kultur wurde durch Durchperlenlassen von Luft mit Sauerstoff angereichert und gezüchtet, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,4–1,2 erreicht hatte. An diesem Punkt wurde Expression durch den Zusatz von 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid induziert, die Temperatur wurde auf 30°C gewechselt, und die Kultur wurde weitere 4 h lang wachsen gelassen.

[0102] Hiernach wurden die Zellen pelletiert und in 100 ml TSEG-Puffer (15 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,25 M Saccharose, 0,1 mM EDTA, 1 mM Glutathion) resuspendiert. Lysozym wurde zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugesetzt, und das Gemisch wurde sanft 30 min lang bei 4°C gerührt. Dann wurden die Zellen durch sechs 30-s-Beschallungsimpulse aus einem MSE Soniprep 150 Sonifier (Beschallungsgerät) bei 40–60% der maximalen Leistung lysiert. Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 5.000 × g entfernt. Der Überstand wurde dann bei 250.000 × g 1 h lang zentrifugiert, und die Membranpellets wurden schließlich in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 20% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1 mM Glutathion resuspendiert. Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde durch den Coomassie-Proteintest gemäß den Anweisungen des Herstellers (Bio-Rad) bestimmt.

SDS-PAGE und Western-Blotting

[0103] Proben wurden verdünnt und zwei Minuten lang in SDS-hältigem Proben-Puffer (U.K. Laemmli, Nature 227, 680–685 (1970)) gekocht. Die Proteine wurden durch 14%ige Polyacrylamidgele (Novex) getrennt und auf PVDF-Membranen (Pall) elektrogeblottet (H. Towbin et al., PNAS USA 76, 4350–4354 (1979)). Übertragungseffizienz wurde unter Verwendung von vorgefärbten Standards (Novex) sichtbar gemacht. Die Membranen wurden anschließend 1 h lang bei 25°C in Tris-gepufferter Salzlösung (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl), die 0,1 Vol.-% Tween und 5% (Gew./Vol.) fettfreie Trockenmilch enthielt, eingeweicht. Die Membran wurde dann zweimal in 0,1% T-TBS gewaschen, gefolgt von 1 h Inkubation bei 25°C mit dem angegebenen Antiserum (Verdünnung 1:2.000) in 0,05 Vol.-% T-TBS und 2% (Gew./Vol.) fettfreier Trockenmilch. Nach mehreren Waschschritten (2 × 1 min, 1 × 15 min und 3 × 5 min) wurde der Blot 1 h lang bei 25°C mit einem Meerrettichperoxidase-gebundenen Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:2.000) in 0,05 Vol.-% T-TBS und 2% (Gew./Vol.) fettfreier Trockenmilch inkubiert. Die Waschschriffe wurden wiederholt, und daraufhin erfolgte verstärkte Chemilumineszenzbestimmung gemäß den Anweisungen des Herstellers (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech, England).

Zellkultur

[0104] A549-Zellen wurden in RPMI 1640, ergänzt mit hitzedeaktiviertem fötalem Rinderserum (10%), Fungizol (2,5 µg/ml), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von $0,15 \times 10^6$ /ml in 75-cm²-Kolben überimpft. Nach drei Tagen war Konfluenz erreicht, und die Zellen wurden in PBS zweimal gewaschen und dann unter Verwendung von 1,5 ml 1 × Trypsin/EDTA-Lösung (GibcoBRL) 15 min lang bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ herausgelöst. Hiernach wurden 3 ml Medium zugesetzt, um das Trypsin zu quenchen, und die Zellen wurden weiter verdünnt und bei einer geeigneten Anzahl/cm² wie eben erst beschrieben überimpft.

[0105] Um die Wirkung von IL-1β auf PGE-Synthase-Expression in A549-Zellen zu untersuchen, wurden 1×10^6 Zellen in 5 ml Medium in 25-cm²-Kolben ausplattiert und 24 h lang inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in PBS dreimal gewaschen, und anschließend wurden 5 ml RPMI-1640-Medium, das fötales Rinderserum (2%), β (1 ng/ml) enthielt, zugesetzt und weitere 24 h lang inkubiert. Für die Ernte wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 15 min lang bei 37°C in 0,5 ml 1 × Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert. 1 ml Kulturmedium wurde zugesetzt, und die Zellen wurden bei $500 \times g$ 10 min lang zentrifugiert, gefolgt von zwei Waschschritten in 1 ml PBS. Die Zellen wurden in 50 µl Homogenisierungspuffer, der aus Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) und 1 × Complete™-Protease-Inhibitorgemisch bestand, resuspendiert. Die Proben wurden 2×10 s lang beschallt, dann wurden 50 µl kochender 2 × Laemmli-Puffer zugesetzt, und die Probe wurde weitere 2 min lang gekocht.

PGE-Synthaseenzymtest

[0106] Die Proteinprobe wurde in anorganischem Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4), der 2,5 mM reduziertes Glutathion enthielt, verdünnt. Die Reaktion (Gesamtvolumen = 100 µl) wurde durch den Zusatz von 10 µM PGH₂ mit oder ohne 0,1 µCi 3H-PGH₂ gestartet und mit 60 µl Acetonitril/HCl gestoppt, was den pH auf 3,2 senkte. Um die Bildung von entweder PGF_{2α}, PGE₂ oder PGD₂ zu bestimmen, wurde eine Aliquote (60 µl) durch Umkehrphasen-HPLC, kombiniert mit UV-Detektion (195 nm), und/oder Radioaktivitätsnachweis unter Verwendung eines Online-β-RAM-Detektors (Inus System, Inc.) analysiert. Die Umkehrphasen-HPLC-Säule war Nova-Pak C18 (3,9 × 150 mm, 4 µm Teilchengröße), erworben bei Waters. Die mobile Phase war Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure (70:30:0,007, nach Vol.) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min.

[0107] Zur Analyse von 12-HHT wurde eine mobile Phase aus Methanol, Wasser und Essigsäure (70:30:0,01, nach Vol.) und UV-Detektion bei 236 nm verwendet. Die Mengen von produziertem PGE₂ und 12-HHT wurden durch Integration der Flächen unter den eluierten Peaks bei 195 nm bzw. 236 nm quantifiziert.

RESULTATE

Identifikation von PGE-Synthase

[0108] Die Aminosäuresequenz von menschlicher PGE-Synthase (Seq.-ID Nr. 2) weist eine Aminosäureidentität von 38% mit MGST1 auf. Darüber hinaus zeigen MGST1 und PGE-Synthase ähnliche Hydropathie-Profile und hohe pI (> 10).

Expression von PGE-Synthase

[0109] PGE-Synthase wurde unter Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems exprimiert. Um Proteinexpression nachzuweisen, wurde ein Peptid-Antiserum gegen PGE-Synthase (Aminosäure-Segment 59–74) gezüchtet. Sowohl die Membran- als auch die cytosolischen Fraktionen aus Bakterien, die PGE-Synthase exprimieren, wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert. Als Kontrolle wurde die Membranfraktion aus Bakterien, die ratMGST1 exprimieren, eingebunden. In allen Spuren wurden 5 µg von Gesamtproteinen analysiert. Die Resultate wurden unter Verwendung von Antipeptid-Antiserum gegen PGE-Synthase, dem entsprechenden Präimmunserum und dem Antipeptid-Antiserum, verdünnt in Gegenwart von 10^{-6} M Peptidantigen, gewonnen. Die Einwirkdauer betrug 2 min.

[0110] Das Antiserum erkannte eine 15-kDa-Bande in der Membranfraktion von Bakterien, die PGE-Synthase exprimieren. Diese Bande wurde nicht in der entsprechenden cytosolischen Fraktion gefunden. Weiters erkannte das Antiserum ratMGST1, das unter Verwendung desselben Expressionssystems exprimiert wurde, nicht.

[0111] Die Detektion von PGE-Synthase war spezifisch, da Antiserum, verdünnt in Gegenwart von 1×10^{-6} M Antigen (Peptid), die Fähigkeit verlor, PGE-Synthase zu detektieren.

Prostaglandin-E-Synthase-Aktivität

[0112] Die Membranfraktion (0,02 mg Gesamtprotein/ml), isoliert aus Bakterien, die PGE-Synthase exprimierten, wurde 2 min lang in Gegenwart von PGH₂ (10 µM einschließlich 1 µCi 3H-PGH₂) und reduziertem Glutathion (2,5 mM) inkubiert.

[0113] Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramme wurden für die Produkte, die nach Inkubationen mit PHG₂ gebildet wurden, erstellt (Auftragen von Counts pro Minute (CPM) über die Zeit in Minuten).

[0114] [Fig. 1](#) zeigt die Resultate von Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie der Produkte, die nach Inkubationen mit PGH₂ gebildet wurden (Zählungen pro Minute (CPM) über der Zeit in Minuten graphisch dargestellt).

[0115] [Fig. 1A](#) zeigt Resultate, die mit PGE-Synthase-Membranfraktion, vermischt mit Stopplösung, erhalten wurden.

[0116] [Fig. 1B](#) zeigt Resultate, die mit Puffer erhalten wurden.

[0117] [Fig. 1C](#) zeigt Resultate, die mit PGE-Synthase-Membranfraktion erhalten wurden. Das Material in den Versuchen, für die die Resultate in den [Fig. 1B](#) und 1C gezeigt sind, wurden 2 min lang vor dem Zusatz von Stopplösung inkubiert. Produkte wurden unter Verwendung von Radioaktivitätsdetektion nachgewiesen. Die ersten 20 min zeigen isokratische Elution unter Verwendung von Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure (70:30:0,007, nach Vol.) als mobile Phase mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 100% mobiler Phase zu 100% Methanol über eine Zeitspanne von 10 min angelegt, das für die verbleibende Dauer aufrechterhalten wurde.

[0118] [Fig. 1C](#) zeigt das RP-HPLC-Profil von radioaktiv markierten Produkten, die unter diesen Bedingungen gebildet wurden. Ein Hauptpeak wird durch Eluieren bei 12,3 min, was der Elutionsdauer von synthetischem PGE₂ entspricht, gebildet. Das Material von diesem Peak wurde gesammelt, derivatisiert und durch GC/MS analysiert, was seine Identität als PGE₂ bestätigte. Ein Nebenpeak wurde auch gebildet, der bei 31,5 min eluierte, was der Retentionsdauer von 12-HHT entsprach. Die nicht-enzymatische Bildung dieser Produkte wird in [Fig. 1B](#) gezeigt. In diesem Chromatogramm beträgt der Peak, dem PGE₂ entspricht, weniger als 25% jenes Peaks, der in Gegenwart von Membranen aus Bakterien, die PGE-Synthase exprimieren, gebildet wurde. Stattdessen entspricht das gebildete Hauptprodukt 12-HHT, das bei 31,5 min eluiert, sowie einem anderen Nebenpeak mit einer Retentionsdauer von 14,9 min, was der Retentionsdauer von PGD₂ entspricht. Das in [Fig. 1A](#) gezeigte Chromatogramm stellt die Nullzeit-Inkubation dar, wenn Substrat zum Puffer zugesetzt wurde, der die Membranfraktion, im Vorfeld mit Stopplösung vermischt, enthält. Wenig PGE₂ wurde nachgewiesen, und der Hauptprodukt-Peak entsprach der Retentionsdauer von 12-HHT.

[0119] Die PGE₂-Bildung ([Fig. 1C](#)) wurde unterbunden, wenn die Membran 2 min lang vor Inkubation gekocht wurde, was auf die enzymatische Natur der Katalyse hinweist. So wurde keine PGE-Synthase-Aktivität unter Verwendung der stattdessen aus Bakterien, die ratMGST1 exprimierten, erhaltenen Membranfraktion beobachtet. Wurde die Membranfraktion mit N-Ethylmaleinimid (1 mM) 5 min lang vor Inkubation behandelt, so wurde die Enzymaktivität unterbunden. Keine Aktivität wurde in der cytosolischen Fraktion aus Bakterien, die PGE-Synthase exprimierten, nachgewiesen. Darüber hinaus wurde keine PGE-Synthase-Aktivität in Mikrosomen festgestellt, die aus Sf9-Zellen, die MGST2 exprimierten, gewonnen wurden.

[0120] [Fig. 2](#) zeigt die Produktion von PGE₂ als eine Funktion der Proteinkonzentration. In diesem Versuch wurden die verschiedenen Verdünnungen der Membranfraktion, die aus Bakterien gewonnen wurde, die PGE-Synthase exprimierten, in Gegenwart von PGH₂ (10 µM) und GSH (2,5 mM) 2 min lang inkubiert. Die PGE₂-Bildung wurde durch RP-HPLC und UV-Detektion bei 195 nm wie zuvor in Materialien und Verfahren beschrieben analysiert und quantifiziert.

[0121] Unter Verwendung von Proteinkonzentrationen von bis zu 0,015 mg/ml wurde eine lineare Beziehung gefunden. Hiernach nimmt die Steigung aufgrund von beinahe vollständiger Umsetzung von zugesetztem PGH₂ zu PGE₂ rasch ab.

[0122] [Fig. 3](#) zeigt die Zeitfunktion der PGE₂-Produktion nach Inkubation der Membranfraktion (0,02 mg/ml)

mit PGH_2 (10 μM) in Gegenwart oder Abwesenheit von GSH (2,5 mM). Die aus Bakterien, die PGE-Synthase exprimieren, gewonnene Membranfraktion (0,02 mg/ml) wurde mit PGH_2 für die angegebenen Zeitspannen in Gegenwart (volle Kreise) oder in Abwesenheit (leere Kreise) von Glutathion inkubiert. Volle Dreiecke stehen für nicht-enzymatische (nur Puffer) PGE_2 -Bildung nach Inkubation mit PGH_2 . Die Produktbildung wurde durch RP-HPLC analysiert, und PGE_2 wurde unter Verwendung von UV-Absorption bei 195 nm quantifiziert.

[0123] Während der ersten 60 s Inkubation wurde eine lineare Beziehung festgestellt. Hiernach nimmt die Steigung aufgrund von Substratschöpfung ab.

[0124] [Fig. 3](#) zeigt auch, dass die Aktivität von der Gegenwart von Glutathion abhängt. Die spezifische Aktivität unter linearen Bedingungen (unter Abzug von Hintergrundbildung) betrug 600 pmol/1,2 min/0,002 mg Membranfraktion (d.h. 250 nmol/min/mg).

Induktion von PGE-Synthase durch IL-1 β

[0125] A549-Zellen wurden bereits verwendet, um cox-2-Induktion zu untersuchen, und es wurde auch berichtet, dass sie ihre PGE_2 -Freisetzung nach Behandlung mit Interleukin-1 β signifikant steigerten. Um zu untersuchen, ob PGE-Synthase auch durch dieses Cytokin reguliert werden kann oder nicht, wurden A549-Zellen 24 h lang in Gegenwart von 1 ng/ml IL-1 β kultiviert. Normale Zellen sowie Zellen, die mit IL-1 β behandelt worden waren, wurden in weiterer Folge auf PGE-Synthase-Expression durch SDS-PAGE, gefolgt von Western-Blotting, analysiert.

[0126] Gesamtprotein entsprechend $0,2 \times 10^6$ Zellen, das 24 h lang in Gegenwart (1 ng/ml) oder Abwesenheit von IL-1 β gezüchtet worden war, wurde durch SDS-PAGE fraktioniert und auf PVDF-Membran übertragen. Die Membranen wurden unter Verwendung von entweder PGE-Synthase-Antiserum oder PGE-Synthase-Antiserum, das das antigene Peptid (10^{-6} M) enthielt, inkubiert. Auch wurden die im Handel erhältliche, teilweise gereinigte PGE-Synthase aus Schaf-Samenbläschen (6 μg) sowie die Membranfraktion aus Bakterien, die menschliche PGE-Synthase exprimieren, (5 μg) analysiert.

[0127] PGE-Synthase wurde durch IL-1 β induziert. In der Spur, die mit IL-1 β -behandelten Zellen beladen war, erschien eine 15-kDa-Bande, die mit der exprimierten PGE-Synthase in Bakterien co-migrierte. Die Erkennbarkeit ging verloren, wenn Antiserum mit dem antigenen Peptid (1 μM) vermischt wurde, was auf spezifische Detektion von PGE-Synthase in A549-Zellen, die mit IL-1 β behandelt wurden, hinweist. Signifikant geringere Mengen an PGE-Synthase wurden in nicht-behandelten A549-Zellen nachgewiesen.

Identifikation eines immunreaktiven 16-kDa-Proteins in teilweise gereinigter PGE-Synthase, die von Schaf-Samenbläschen abstammt

[0128] Das im Handel erhältliche, verunreinigte PGE-Synthase-Präparat, teilweise gereinigt aus Widder-Samenbläschen, wurde auf Kreuzreaktivität mit menschlichem PGE-Synthase-Serum getestet.

[0129] Aus den Resultaten von Western-Blotting war klar ersichtlich, dass eine 16-kDa-Proteinbande in der Spur auftrat, die mit 6 μg dieser Probe beladen war. Die Bande wurde unter Verwendung des in Peptid absorbierten Antiserums verloren, was auf spezifische Erkennung schließen lässt. Das Protein ist in seiner Größe etwas unterschiedlich und scheint diffuser zu sein, was auf eine bestimmte Art von posttranskriptionaler Modifikation schließen lassen könnte.

PGE-Synthase-Aktivitätstest

[0130] Frühere Studien zeigten, dass Prostaglandine mittels RP-HPLC getrennt und mittels UV-Spektralphotometrie nachgewiesen werden können (Terragno et al., Prostaglandins 21(1), 101–112 (1981); Powell, Anal. Biochem. 148(1), 59–69 (1985)). Der molare Absorptionskoeffizient von PGE_2 beträgt 16.500 bei 192,5 nm (Terragno et al., Prostaglandins 21(1), 101–112 (1981)). Die Unterschiede zwischen der Absorption bei 192,5 nm und 195 nm waren marginal (Terragno et al., Prostaglandins 21(1), 191–112 (1981)). Die Resultate der Erfinder der vorliegenden Beschreibung, die unter Verwendung der RP-HPLC-Bedingungen (nachstehend beschrieben) erzielt wurden, zeigten jedoch eine signifikant stabilere Basislinie mit weniger Rauschen bei der höheren Wellenlänge. Die Hauptprodukte von PGH_2 sind $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 und PGD_2 . Unter Verwendung der beschriebenen RP-HPLC-Bedingungen betrugen die Retentionszeiten 19,0, 23,8 und 28,6 Minuten für $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 bzw. PGD_2 . Um einen inneren Standard zu erhalten, testeten die Erfinder 11 β - PGE_2 und 16,16-Dimethyl- PGE_2 . Die letztgenannte Verbindung war zu stark hydrophob und konnte im beschriebenen isokratischen

System nicht verwendet werden. Im Gegensatz dazu eluierte 11 β -PGE₂ mit einer Retentionsdauer von 25,3 min beinahe mit Basislinien-Trennung von PGE₂. Um die UV-Absorptions-Beziehung zwischen 11- β -PGE₂ und PGE₂ zu untersuchen, wurden gleiche Mengen (quantifiziert durch GC-MS) mittels RP-HPLC und durch UV-Absorption bei 195 nm analysiert. Die zwei Verbindungen zeigten identische UV-Absorptions-Eigenschaften. Um die Gewinnung aus und Reproduzierbarkeit von Festphasenextraktion zu testen, wurden bekannte Mengen von 11- β -PGE₂ und PGE₂ in Probenpuffer verdünnt und durch Zusatz der Stopplösung (die kein Eisenchlorid enthielt) angesäuert, gefolgt von Zusatz von Acetonitril (33% Endkonzentration) und Analyse (10 Vol.-% der Gesamtprobe). Alternativ dazu wurde die Probe nach dem Zusatz von Stopplösung durch Festphasenextraktion extrahiert, und die entsprechenden Fraktionen (10 Vol.-% der Gesamtprobe) wurden dann analysiert. Die Mengen von 11- β -PGE₂ und PGE₂ vor und nach der Extraktion wurden verglichen, und die Gewinnung wurde auf 85–90% geschätzt.

[0131] Um PGE₂ zu quantifizieren, wurde eine Standardkurve von PGE₂ erstellt. Die Kurve war über einen Bereich von 0,9 pmol bis 706 pmol ($R^2 = 0,9997$, $k = 0,0012$) linear. Zur Quantifizierung verwendeten die Erfinder routinemäßig sowohl das Verfahren mit externem Standard als auch das Verfahren mit innerem Standard, wobei Letzteres auch Verluste während der Herstellung in Betracht zieht.

[0132] Es können gewisse Schwierigkeiten beim Testen von PGE-Synthase mit PGH₂ auftreten. Das Substrat ist sehr labil und zerfällt auf nicht-enzymatische Weise, mit einer Halbwertszeit von etwa 5 min bei 37°C, zu einem Gemisch von PGE₂ und PGD₂ mit einem E/D-Verhältnis von etwa 3 (Hamberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 345–349 (1974); Nugteren & Christ-Hazelhof, in: Adv. in Prostaglandin and Thromboxane Res. 6, hrsg. von B. Samuelsson, P. W. Ramwell und R. Paoletti, Raven Press: NY, 129–137 (1980)). Auch erfolgt die PGE-Synthasekatalyse sehr rasch, was dafür verantwortlich ist, dass Substratschöpfung leicht innerhalb von Sekunden auftreten kann und somit eine quantitative Analyse unterbunden wird. Nachdem die Reaktion beendet wurde, muss sämtliches verbleibendes PGH₂ auch rasch von den Produkten getrennt werden, um eine Beeinträchtigung der Resultate zu vermeiden. Um diesen Eigenschaften des Substrats beizukommen, kann der Test wie folgt durchgeführt werden.

[0133] Um nicht-enzymatische Produktion von PGE₂ zu minimieren, wurde das Substrat (PGH₂) bis zur Verwendung stets auf CO₂-Eis (–78°C) gelagert, und die Enzymreaktion wurde bei 0°C in Gegenwart von PGH₂ und reduziertem Glutathion (GSH) durchgeführt. Eine FeCl₂-haltige Stopplösung wurde verwendet, die sämtliches verbleibendes PGH₂ zu HHT umsetzte (Hamberg & Samuelsson, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71(9), 3400–3404 (1974)). Auch sind die Produkte in organischen Lösungsmitteln sehr viel stabiler (Nugteren & Christ-Hazelhof, in: Adv. in Prostaglandin and Thromboxane Res. 6, hrsg. von B. Samuelsson, P. W. Ramwell und R. Paoletti, Raven Press: NY, 129–137 (1980)), die Erfinder extrahierten also die Probe unmittelbar nach Abschluss mittels Festphasenextraktion und beließen das Eluat in Acetonitril.

Testverfahren

[0134] Proteinproben wurden in anorganischem Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4), der 2,5 mM reduziertes Glutathion (GSH) enthielt, verdünnt. 4 μ l PGH₂, aufgelöst in Aceton (0,284 mM), wurden zu Eppendorf-Röhrchen zugesetzt und auf CO₂-Eis (–78°C) gehalten. Vor der Inkubation wurden sowohl das Substrat als auch die Proben auf Feuchteis (oder bei 37°C) zu einer 2-minütigen Temperaturäquilibration transferiert. Die Reaktion wurde durch den Zusatz der 100- μ l-Probe zu den Röhrchen, die PGH₂ enthielten, gestartet. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 400 μ l Stopplösung (25 mM FeCl₂, 50 mM Zitronensäure und 2,7 μ M 11- β -PGE₂) beendet, was den pH auf 3 senkte und eine Gesamtkonzentration von 20 mM FeCl₂, 40 mM Zitronensäure und 2,1 μ M 11- β -PGE₂ ergab. Festphasenextraktion wurde unverzüglich unter Verwendung von C18-Chromabond-Säulen durchgeführt. Die Proben wurden mit 500 μ l Acetonitril eluiert, und hiernach wurde 1 ml H₂O zugesetzt. Um die Bildung von PGE₂ und 11- β -PGE₂ zu bestimmen, wurde eine Aliquote (150 μ l) mittels RP-HPLC, kombiniert mit UV-Detektion bei 195 nm, analysiert. Die Umkehrphasen-HPLC-Säule war Nova-Pak C18 (3,9 \times 150 mm, 4 μ m Teilchengröße), erhalten von Waters, und die mobile Phase war Wasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure (72:28:0,007 nach Vol.). Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,7 ml/min, und die Produkte wurden durch Integration der Peakflächen quantifiziert.

DISKUSSION

[0135] MGST1-L1 wurde als ein Homolog zu MGST1 identifiziert, das Ähnlichkeiten sowohl in Bezug auf die Sequenz (38% Aminosäureidentität) als auch auf strukturelle Eigenschaften (Hydrophobizitäts-Diagramm) aufwies.

[0136] MGST1-L1 wurde unter Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems exprimiert. Wenn sie auf PGE-Synthase-Aktivität getestet wurden, wiesen Membranen aus Bakterien, die MGST1-L1 exprimierten, eine signifikante PGE-Synthase-Aktivität (0,25 $\mu\text{mol/min/mg}$) auf, die den höchsten Niveaus von normal auftretender PGE-Synthase-Aktivität, d.h. in Mikrosomen, die aus Schaf-Samenbläschen (P. Moonen et al., *Methods in Enzymology* 86, 84–91 (1982)) und Ratten-Samenleiter (K. Watanabe et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 235, 148–152 (1997)) isoliert wurden, entsprachen. Tatsächlich erreicht unter einer Schätzung, dass 1% des bakteriellen Membranproteins MGST1-L1 ist, die hergeleitete spezifische Aktivität 25 $\mu\text{mol/min/mg}$, was einem $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ im 10^6-M-1S-1 -Bereich entspricht. Solche hohen $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte sind Kennzeichen für äußerst effiziente Enzyme (A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman & Co., New York (1985)). In Anbetracht der kurzen Halbwertszeit von PGH_2 und der Existenz von konkurrierenden Stoffwechselwegen ergibt es Sinn, dass eine physiologisch relevante Aktivität hocheffizient ist.

[0137] Expression des Proteins und auch jene PGE-Synthaseprotein-Expression wurden in A549-Zellen (eine menschliche Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie) nach IL-1 β -Behandlung hinaufreguliert. A549-Zellen wurden von zahlreichen Forschern bereits verwendet, um die Regulation von *cox-2* und verwandten Enzymen wie beispielsweise cytosolischer Phospholipase A2 zu untersuchen. Die Resultate stimmen mit veröffentlichten Daten überein, die die Hinaufregulation von *cox-2* und den mehrfachen Anstieg von PGE_2 -Biosynthese als Reaktion auf Interleukin-1 β -Behandlung von A549-Zellen zeigen (M. Huang et al., *Cancer Res.* 58, 1208–1216 (1998); J. Mitchell et al., *British J. of Pharmacol.* 113, 1008–1014 (1994)). In Kombination mit diesen Ergebnissen für *cox-2* lassen die Daten darauf schließen, dass PGE-Synthase und *cox-2* co-reguliert werden und dass PGE_2 -Biosynthese von der Gegenwart dieser beiden Enzyme abhängen kann. Demgemäß wurde auch eine induzierbare PGE-Synthaseaktivität in Lipopolysaccharid-stimulierten Ratten-Peritonealmakrophagen beschrieben, was mit *cox-2*-Expression und Veränderung der Produktbildung zugunsten von PGE_2 übereinstimmt (H. Naraba et al., *Journal of Immunology* 160, 2974–2982 (1998); H. Matsumoto et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 230, 110–114 (1997)). Die Induktion von PGE-Synthase (PIG12), gefolgt von p53-Expression, in einer Zelllinie von kolorektalen Tumoren (DLD-1) (K. Polyak et al., *Nature* 389, 300–305 (1997)) kann ebenfalls für das Verständnis der Rolle von *cox* und PGE-Synthase bei Krebs und Apoptose von Bedeutung sein. Für Cyclooxygenase-2 wurde auch durch die positiven Wirkungen, die durch verschiedene NSAIDs auf Krebswachstum beobachtet wurden, erkannt, dass sie mit Kolonkrebs in Verbindung steht (R. DuBois et al., *Faseb J.* 12, 1063–1073 (1998)).

[0138] Zusammengefasst wurde die erste, von mikrosomalem Glutathion abhängige PGE-Synthase identifiziert und charakterisiert, und es wurde für sie gezeigt, dass sie durch das entzündungsfördernde Interleukin-1 β in einer Lungenkrebs-Zelllinie hinaufreguliert wird. Dieses Cytokin reguliert auch *cox-2* und zelluläre Fähigkeit, PGE_2 zu produzieren, hinauf. Dies macht PGE-Synthase zu einem neuen Ziel für Wirkstoffentwicklung in verschiedenen Bereichen, einschließlich Entzündung, Krebs und Apoptose, wie bereits zuvor erläutert.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Per-Johan Jakobsson
 Ralf Morgenstern
 Bengt Samuelsson
 Karolinska Institute, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Division of Physiological Chemistry II, S-171 77, Stockholm, Schweden

<120> Verfahren und Mittel zur Modulation von PGE-Synthase-Aktivität

<210> 1

<212> DNA

<213> Menschlich

<400> 1

ATGCCTGCCCACAGCCTGGTGTATGAGCAGCCCGGCCCTCCCGGCCTTCCTGCTCTGCAGCAC
 GCTGCTGGTCATCAAGATGTACGTGGTGGCCATCATCACGGGCCAAGTGAGGCTGCGGAAGA
 AGGCCTTTGCCAACCCCGAGGATGCCCTGAGACACGGAGGCCCCAGTATTGCAGGAGTGAC
 CCCGACGTGGAACGCTGCCTCAGGGCCACCGGAACGACATGGAGACCATCTACCCCTTCCT
 TTTCTGCGGCTTCGTCTACTCCTTTCTGGGTCCTAACCTTTTGTGCGCTGGATGCACTTCC
 TGGTCTTCCTCGTGGGCCGTGTGGCACACACCGTGGCCTACCTGGGGAAGCTGCGGGCACCC
 ATCCGCTCCGTGACCTAÇACCCTGGCCAGCTCCCCTGCGCCTCCATGGCTCTGCAGATCCT
 CTGGGAAGCGGCCCGCCACCTGTGA

<210> 2

<212> PRT

<213> Menschlich

<400> 2

MPAHS LVMSSPALPAFLLCSTLLVIKMYVVAIIITGQVRLRKKAFANPEDALRHGGPQYCRSD
 PDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPFVAWMHFLVFLVGRVAHTVAYLGKLRAP
 IRSVTYTLAQLPCASMALQILWEAARHL

Patentansprüche

1. Isoliertes und reines Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist und das die Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 umfasst.
2. Isoliertes und reines Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist und aus einem Abschnitt der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 besteht.
3. Polypeptid gemäß Anspruch 2, worin der Abschnitt die Aminosäuren 30–152 von Seq.-ID Nr. 2 einschließt.
4. Polypeptid nach Anspruch 2, worin der Abschnitt die Aminosäuren 1–130 von Seq.-ID Nr. 2 einschließt.
5. Polypeptid nach Anspruch 2, worin der Abschnitt die Aminosäuren 30–130 von Seq.-ID Nr. 2 einschließt.

6. Isoliertes und reines Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist und das eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 unterscheidet, jedoch zumindest zu 70% mit der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 identisch ist.

7. Polypeptid nach Anspruch 6, das zumindest 90% Identität mit der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 aufweist.

8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das an eine heterologe Sequenz von Aminosäuren fusioniert ist.

9. Testverfahren zur Identifikation eines vermutlichen Modulators von PGE-Synthase-Aktivität, umfassend:
(a) das Kontaktieren eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einem vermutlichen Bindungsmolekül oder einer anderen Testsubstanz; und
(b) das Bestimmen von Wechselwirkung oder Bindung zwischen dem Polypeptid und der Testsubstanz, wodurch ein vermutlicher Modulator von PGE-Synthase-Aktivität identifiziert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, weiters umfassend das Testen eines identifizierten vermutlichen Modulators von PGE-Synthase auf seine Fähigkeit, PGE-Synthase-Aktivität zu modulieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, worin der vermutliche Modulator als Inhibitor von PGE-Synthase-Aktivität identifiziert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, weiters umfassend das Formulieren des Inhibitors zu einer Zusammensetzung, die zumindest eine zusätzliche Komponente umfasst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin die Zusammensetzung einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

14. Testverfahren zur Identifikation eines Modulators von PGE-Synthase-Aktivität, umfassend:
(a) das Inkubieren eines isolierten Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in Gegenwart eines zyklischen Endoperoxid-Substrats von PGE-Synthase unter Bedingungen, unter denen PGE-Synthase normalerweise die Umsetzung des zyklischen Endoperoxid-Substrats zu einem Produkt katalysiert, das die 9-Keto-11 α -Hydroxy-Form des Substrats ist; und
(b) das Bestimmen der Bildung dieses Produkts.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Polypeptid und eine Testverbindung in Gegenwart von reduziertem Glutathion und PGH₂ unter Bedingungen inkubiert werden, unter denen normalerweise PGE gebildet wird, und worin das Verfahren das Bestimmen der Bildung von PGE umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, worin eine Testverbindung als Modulator von PGE-Synthase-Aktivität identifiziert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin eine Testverbindung als Inhibitor von PGE-Synthase-Aktivität identifiziert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, weiters umfassend das Formulieren dieses Modulators zu einer Zusammensetzung, die zumindest eine zusätzliche Komponente umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin die Zusammensetzung einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

20. Verwendung eines isolierten Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einem Verfahren zur Gewinnung oder Identifikation eines Modulators von PGE-Synthase-Aktivität.

21. Verwendung nach Anspruch 20, worin ein Inhibitor von PGE-Synthase gewonnen oder identifiziert wird.

22. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das PGE-Synthase-Aktivität aufweist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
(a) das Herbeiführen von Expression aus Nucleinsäure, die für ein Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist,

nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert, in einem geeigneten Expressionssystem, um das Polypeptid mittels Rekombination zu bilden; und

(b) das Testen des rekombinant produzierten Polypeptids auf PGE-Synthase-Aktivität.

23. Verfahren nach Anspruch 22, worin das Polypeptid die Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 umfasst.

24. Verfahren nach Anspruch 23, worin die Nucleinsäure die Nucleotidsequenz von Seq.-ID Nr. 1 umfasst.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, worin das rekombinant erzeugte Polypeptid isoliert wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, worin das isolierte Polypeptid durch Bestimmung von PGE-Bildung bei Inkubation des Polypeptids zusammen mit PGH_2 und reduziertem Glutathion auf PGE-Synthase-Aktivität getestet wird.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder Anspruch 26, worin das rekombinant produzierte Polypeptid zu einer Zusammensetzung formuliert wird, die zumindest eine zusätzliche Komponente umfasst.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, worin das rekombinant produzierte Polypeptid in Gegenwart und Abwesenheit einer Testverbindung auf PGE-Synthase-Aktivität getestet wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin die Testverbindung ein Inhibitor von PGE-Synthase-Aktivität ist.

30. Nucleinsäurekonstrukt, das zur Verwendung bei der Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 geeignet ist, umfassend eine Nucleotidsequenz, die für das Polypeptid kodiert und die operabel an Regulationssequenzen zur Expression des kodierten Polypeptids gebunden ist.

31. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 30, worin das kodierte Polypeptid die Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 umfasst.

32. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 31, worin die Nucleinsäure die Nucleotidsequenz von Seq.-ID Nr. 1 umfasst.

33. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 30, worin das kodierte Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist, aus einem Abschnitt der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 besteht.

34. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 30, worin das kodierte Polypeptid, das eine PGE-Synthase ist, eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 unterscheidet, die jedoch zumindest zu 70% mit der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 identisch ist.

35. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 34, worin das kodierte Polypeptid zumindest 90% Identität mit der Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 2 aufweist.

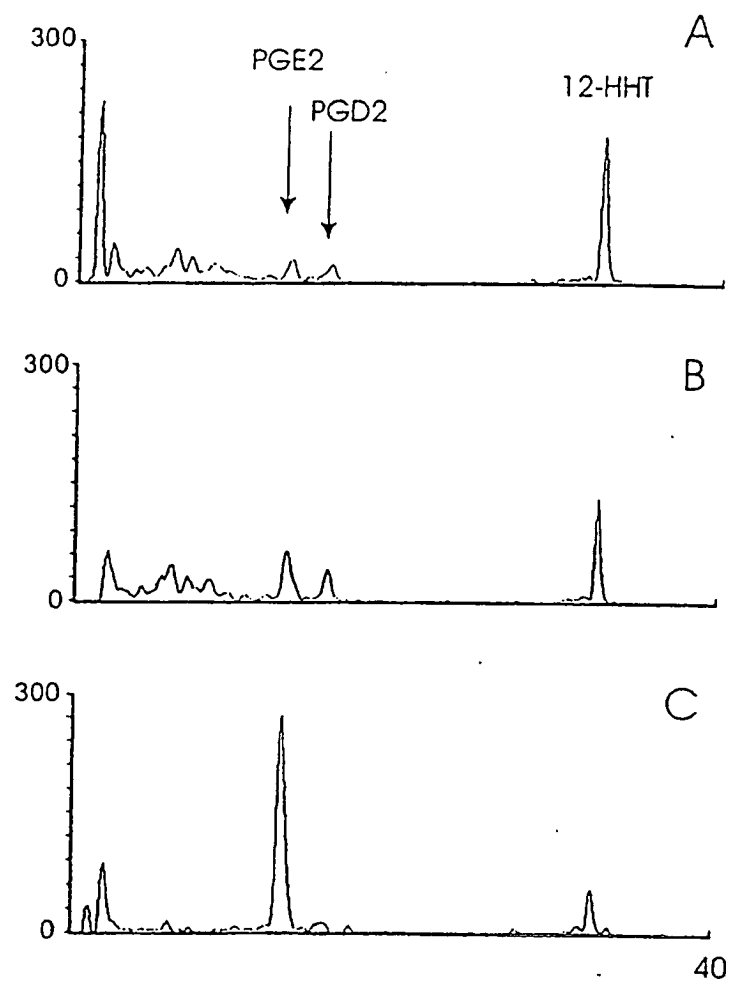
36. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 30 bis 35 transformiert ist.

37. Verwendung eines Nucleinsäurekonstrukts nach einem der Ansprüche 30 bis 35 in einem Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das eine PGE-Synthase ist.

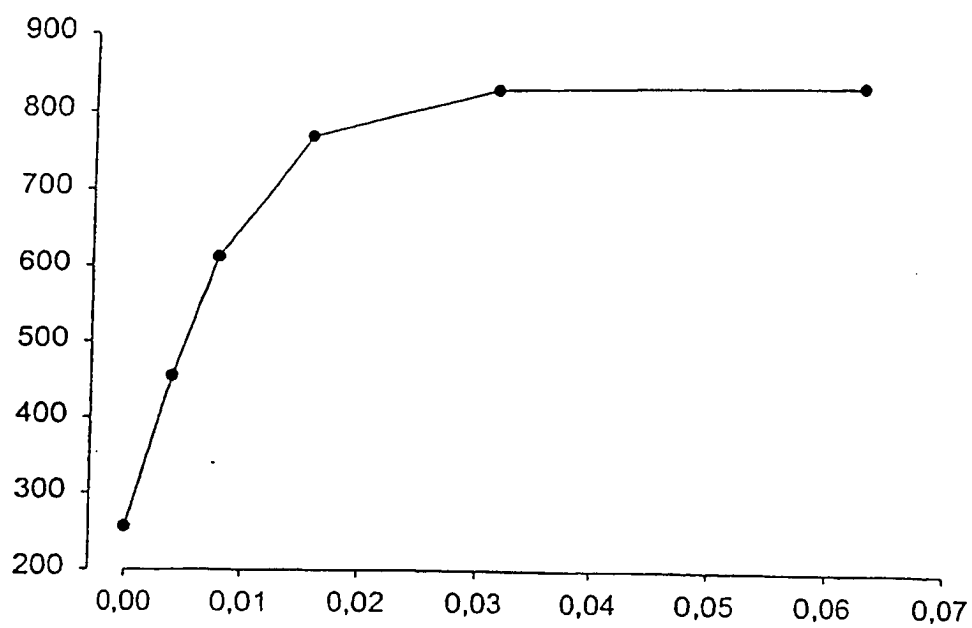
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2



Figur 3

