



Patent beschränkt
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(51) Int. Cl.⁶: **C 12 N 5/06**
C 12 Q 1/04

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD C 12 N / 340 558 4	11. 05. 90	16. 04. 92	19. 10. 95

(30) Unionspriorität:

—

(72) Erfinder: Wobus, Anna, Dr. rer. nat., 06466 Gatersleben, DE; Wallukat, Gerd, Dr. rer. nat.,
13127 Berlin, DE; Kemler, Rolf, Prof. Dr. rer. nat., 79100 Freiburg, DE

(73) Patentinhaber: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung – Stiftung des öffentlichen Rechts,
Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, DE

(54) Verfahren zur Untersuchung der Wirkung von chemischen Wirkstoffen und medizinisch-pharmazeutischen Präparaten

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
WALLUKAT, G., WOLLENBERGER, A., Acta biol. med. germ. 39 (1980): k7–k13
WOBUS, A. M. et al., Biomed. Biochim. Acta 47 (1988) 12: 965–973
DOETSCHMANN, T. C. et al., J. Embryol. exp. Morph. 87 (1985): 27–45

Patentanspruch:

Verfahren zur Untersuchung der Wirkung von chemischen Wirkstoffen und medizinisch-pharmazeutischen Präparaten an in vitro kultivierten lebenden Zellverbänden aus Säugetieren, vorzugsweise der Maus, hinsichtlich ihres Einflusses auf spezielle zelluläre Leistungen an pulsierenden, differenzierten Herzmuskelzellen, dadurch **gekennzeichnet, daß**

- pluripotente embryonale Stammzellen (ESC) im Kulturmedium 3 Tage nach der Methode des hängenden Tropfens kultiviert werden,
- die in dieser Zeit gebildeten „embryoid bodies“ auf einem adhäsiven Substrat ausplattiert werden,
- die dabei entstehenden Zellaggregate weiter 3–4 Tage im gleichen Medium kultiviert werden,
- danach dem zu untersuchenden Wirkstoff ausgesetzt und die dabei eintretenden Haupt- und Nebenwirkungen gemessen werden.

Hierzu 5 Seiten Zeichnungen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung der Wirkung von chemischen Wirkstoffen und medizinisch-pharmazeutischen Präparaten nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs. Pharmazeutische Präparate oder entsprechende Wirkstoffe, die in irgendeiner Weise in Haupt- oder Nebenwirkung die Tätigkeit des Herzmuskels beeinflussen und hinsichtlich dieser Wirkung getestet werden sollen, werden zumeist an perfundierten Herzen bzw. an Papillarmuskelpräparaten der Ratte, des Meerschweinchens oder des Kaninchens untersucht. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von isolierten adulten Herzmyozyten bzw. in vitro kultivierten neonatalen Herzmuskelzellen.

Solche Testreihen erfordern einen erheblichen Zeit- und Geldaufwand, bis genügend gesicherte Ergebnisse gewonnen werden und es muß zu diesen Untersuchungen eine große Zahl an Versuchstieren eingesetzt werden. Auch aus Gründen des Tierschutzes ist es erwünscht, daß die Züchtung und Tötung großer Mengen von Versuchstieren vermieden wird. Eine Differenzierung der pluripotenten ES-D3-Zelllinie in spontan pulsierende Zellen wurde bereits von Doetschman et al beschrieben (J. Embryol. exp. Morph. 87 [1985], S. 27–45). Die Autoren verweisen aber lediglich auf die Einsatzmöglichkeit dieser Zellen zur Erforschung der Herz-Organogenese ohne einen Verweis auf die Pharmakotoxikologie. Bei Wobus et al (Biomed. Biochim. Acta 47 [1988] 12, S. 965–973) ist eine Methode zur ESC-Differenzierung unter Zusatz des Nerven-Wachstumsfaktors NGF beschrieben mit der Zielstellung, das Zellwachstum zu aktivieren.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Testverfahren der eingangs bezeichneten Art zu entwickeln, das wirtschaftlich und in vitro ausführbar ist, so daß es vor allem zum Prä-screening herzaktiver Substanzen eingesetzt werden kann. Demzufolge hat sich die Erfindung die Aufgabe gestellt, ein entsprechendes Verfahren so zu gestalten, daß wenige Versuchstiere genügen, um mit der gleichen Sicherheit und höherer Testgenauigkeit als bisher zu verwertbaren Ergebnissen zu gelangen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die im kennzeichnenden Teil der Patentansprüche angegebenen Maßnahmen gelöst. Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dabei, daß eine pluripotente embryonale Stammzelllinie aus einem frühen Embryonalstadium isoliert und in vitro kultiviert wird, die in spontan pulsierende Herzmuskelzellen zu differenzieren imstande ist.

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen sind wie im adulten Herzen oder in kultivierten Herzmyozyten neonataler Ratten u. a. folgende Rezeptor-Effektor-Systeme ausgebildet:

- a) β -adrenerge rezeptor-vermittelte Reaktionskaskade,
- b) α -adrenerge und cholinerg muskarinerg vermittelte Reaktion.

Durch die Erfindung sind die Schwierigkeiten beseitigt, die mit einem In-vivo-Test verbunden sind. Eine einmal erzeugte Zelllinie läßt sich konstant vorrätig halten und kultivieren, so daß tatsächlich angesichts vieler weltweit erforderlichen Untersuchungen die Zahl der Versuchstiere verringert werden kann.

Ausführungsbeispiel

An einem Ausführungsbeispiel wird das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert; es wird für insgesamt 5 pharmakologische Wirkstoffe durchgeführt, und die Ergebnisse werden in der Zeichnung zusammenfassend graphisch dargestellt.

1. Medienansätze

a) Verwendetes Kulturmedium

Das eingesetzte Kulturmedium besteht aus

- 80ml nach DULBECCO modifiziertem E(MEM) Vertrieb: Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg;
- 20ml fötalem Kälberserum – getestete Charge, Hersteller: Staatliches Institut für Immunpräparate Berlin,
- 10^5 Internationalen Einheiten (IE)/l Penicillin;

- 200 ml/l Streptomycin;
- 1 ml nicht-essentiellen Aminosäuren (100×);
- 1 ml beta-Mercaptoäthanol einer Stammlösung von 0,007 ml/10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Hersteller: Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg (Zugabe nur bei ESC-Kultur, nicht bei Differenzierung), und
- 1 ml L-Glutamin einer Stammlösung von 146 mg/10 ml, Hersteller: Reanal, Budapest.

b) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) nach DULBECCO

10 g/l NaCl, 0,25 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2HPO_4 und 0,25 g/l KH_2PO_4 ;

Trypsin-EDTA-Lösung (zur Dissoziation der ESC in einzelne Zellen)

200 g/l Trypsin (1:250) und 20 g/l EDTA in PBS werden vor dem Gebrauch im Volumen-Verhältnis 1:1 gemischt.

2. Kultur der „embryoid bodies“

Embryonale Stammzellen ESC einer Zelllinie D3 (Doetschman, T. C. et al., J. Embryol. exp. Morph. **87** [1985], S. 27–45) werden auf „feeder-layer“-Zellen embryonaler Fibroblasten der Maus (Wobus, A. M. et al., Exp. Cell Res. **152** [1984], S. 212–219) kultiviert. Nach Dissoziation mit der Trypsin-EDTA-Lösung werden die ESC in einer Zählkammer gezählt. Die ESC sind wesentlich kleiner als die „feeder-layer“-Zellen und deshalb von diesen leicht zu unterscheiden.

50 Einzeltropfen mit jeweils 100 ESC in 0,02 ml Kulturmedium werden auf den Deckel einer mit PBS gefüllten bakteriologischen Petrischale von 10 cm Durchmesser aufgetragen und im hängenden Tropfen kultiviert (Rudnicki, M. A./Burney, M. W., in: E. J. Robertson [Edt.]: Teratocarcinomas and embryonic stem cells, IRL Press Oxford, Washington D. C. [1987], S. 19–49).

Drei Tage später werden die inzwischen gebildeten „embryoid bodies“ vom Deckel der Petrischale abgespült und in 5 ml Kulturmedium in einer bakteriologischen Petrischale von 6 cm Durchmesser weitere vier Tage kultiviert. Nach insgesamt sieben bis acht Tagen Kultivierung werden die „embryoid bodies“ in je eine Kavität von 24er Mikrotiter-Platten in jeweils 1 ml darin befindliches Kulturmedium transferiert, nachdem alle Kavitäten zuvor 1 bis 2 Stunden mit 0,1%iger Gelatinelösung bei 4°C vorbehandelt worden sind.

Bereits einen Tag nach der Plattierung sind in etwa 70% der plattierten Zellaggregate pulsierende Herzmuskelzellen vorhanden.

Es empfiehlt sich, die Untersuchungen am fünften Tag nach der Plattierung der „embryoid bodies“ durchzuführen, da zu diesem Zeitpunkt die bisher untersuchten Rezeptoren und Signalübertragungs-Systeme ausgebildet sind.

3. Test

Nachdem das Kulturmedium abgesaugt wurde, wird 1 ml Kulturmedium erneut zugegeben; es wird die „Basalfrequenz“, d. h. die normale Pulsfrequenz, mittels Stoppuhr ermittelt.

Anschließend wird der zu testende Wirkstoff in der gewünschten Konzentration zugegeben. Nach erneuter Messung der Pulsfrequenz kann die Differenz zur Basalfrequenz festgestellt werden, die ein Maß für die Wirksamkeit der Testsubstanz ist. Zur Erstellung von Dosiswirkungs-Kurven werden die Wirkstoffe dem System kumulativ zugesetzt.

Diese Untersuchungen können über einen langen Zeitraum nach der Plattierung der „embryoid bodies“ mit Erfolg durchgeführt werden.

4. Testergebnisse

In der Zeichnung sind einige getestete Substanzen dargestellt. Die Diagramme spezifischer zellulärer Leistungen der Fig. 1 bis 5 sind nach Einwirkung von 5 pharmakologischen Präparaten ermittelt worden. Es bedeuten im einzelnen:

- a) Fig. 1 den Effekt von (–) Isoprenalin (im folgenden nur Isoprenalin genannt) auf die Schlagfrequenz aus ESC differenzierter, spontan pulsierender Herzmuskelzellen; die Basal-Pulsationsrate der Zellen beträgt hier $(106,3 \pm 10,2)$ Schläge/min. Ein β_2 -adrenerger Antagonist ICI 118.551 (10^{-7} M) hat an den fröhendifferenzierten Herzmuskelzellen keine Hemmwirkung; der β_1 -adrenerge Antagonist Bisoprolol (10^{-6} M) hemmt den positiv chronotropen Effekt des Isoprenalins;
- b) Fig. 2 den Einfluß des Aktivators der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase auf die Pulsationsrate der Herzmuskelzellen; Forskolin erhöht dosisabhängig die Schlagfrequenz; die Basal-Pulsationsrate beträgt hier $(107,3 \pm 9,2)$ Schläge/min;
- c) Fig. 3 die Wirkung des Phosphodiesterase-Hemmers Isobutylmethylxanthin IBMX auf die Schlagfrequenz der Herzmuskelzellen; die Basal-Pulsationsrate liegt bei $(104,0 \pm 8,7)$ Schläge/min;
- d) Fig. 4 den Einfluß des α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin auf die kultivierten herzspezifisch differenzierten Myozyten; die Ausgangs-Pulsationsrate betrug $(101,9 \pm 7,6)$ Schläge/min;
- e) Fig. 5 den Nachweis des cholinerg muskarinerg induzierten, negativ chronotropen Effekts. Die Zugabe von Carbachol führt zu einer dosisabhängigen, signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz. Dieser negativ chronotrope Effekt des Carbachols wird durch Atropin (10^{-4} M) aufgehoben; Basal-Pulsationsrate: $(128,0 \pm 11,0)$ Schläge/min.

Isoprenalin (Hersteller: Sigma St. Louis, Fig. 1), ein β -adrenerger Agonist, erhöht in den aus ESC differenzierten Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge der Substanz die Schlagfrequenz. Dieser positiv chronotrope Effekt des Isoprenalins wird im Versuchsansatz (1 bis 2 Tage nach der Plattierung 7 Tage alter „embryoid bodies“) durch einen spezifischen β_2 -adrenergen Antagonisten ICI 118.551 (10^{-7} M) – Hersteller: Imperial Chemical Industries plc – nicht beeinflusst. Ein β_1 -adrenerger Blocker Bisoprolol (E. Merck Darmstadt) in einer Konzentration von 10^{-5} M hemmt den positiven chronotropen Effekt von 10^{-5} M Isoprenalin nahezu vollständig. Ein solcher Befund deutet darauf hin, daß in einer frühen Phase der Differenzierung Isoprenalin seine Wirkung über den β_1 -adrenergen Rezeptor-Subtyp realisiert. Des weiteren sind solche Befunde eine Hinweis dafür, daß in einem frühen Differenzierungsstadium die β -Rezeptor-Adenylatzyklase-Kaskade bereits funktioniert.

Letzteres wird durch die Untersuchungen gestützt, in denen gezeigt wird, daß Forskolin – ein Aktivator der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase, Hersteller: Serva Feinbiochemica GmbH & Co. Heidelberg – die Schlagfrequenz der Herzmuskelzellen erhöht (Fig. 2). Auch das zyklische AMP (cAMP) hydrolysierende System ist in den Herzmuskelzellen bereits entwickelt. Eine Hemmung der cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen führt zu einer Akkumulation des cAMP; aus einer Akkumulation des cAMP wiederum folgt eine Steigerung der Pulsationsrate der Herzmuskelzellen (Fig. 3).

Auch der α_1 -adrenerge Rezeptor ist in früh differenzierten Herzmuskelzellen bereits vorhanden. Der α_1 -adrenerge Agonist Phenylephrin (Hersteller: Serva Feinbiochemica GmbH & Co. Heidelberg, Fig. 4). erhöht dosisabhängig die Schlagfrequenz der

Herzmyozyten. Dieser positiv chronotrope Effekt des Phenylephrins wird durch den α_1 -adrenergen Antagonisten Prazosin (10^{-4} M) – Hersteller: VEB Arzneimittelwerk Dresden – geblockt.

Neben dem α_1 -adrenergen Rezeptor ist auch der muskarinerg cholinerge Rezeptor in den Herzmyozyten ausgebildet. Der cholinerge Agonist Carbachol (Hersteller: E. Merck Darmstadt, Fig. 5) senkt in den differenzierten Herzzellen die Schlagfrequenz. Dieser negativ chronotrope Effekt des Carbachols wird durch den Antagonisten Atropin (10^{-4} M) – Hersteller: Serva

Feinbiochemica GmbH & Co. Heidelberg – aufgehoben.

Die Befunde zeigen, daß bereits in den frühen Phasen der Differenzierung sowohl die adrenerg als auch die cholinerg rezeptorvermittelten Signalübertragungssysteme, aber auch die cAMP-generierenden und hydrolysierenden Systeme in den Herzmyozyten ausgebildet sind.

Die Erfindung ist nicht auf die in der Beschreibung vor allem betrachtete Zelllinie beschränkt; ohne die Erfindung zu verlassen, ist die Anwendung des Verfahrens auch an anderen pluripotenten ESC-Linien, die in pulsierende Herzmuskelzellen differenzieren können, ohne weitere erfinderische Maßnahmen anwendbar. Beispielsweise sind solche Untersuchungen mit einer pluripotenten ESC-Linie BI 17 des Zentralinstituts für Genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Akademie der Wissenschaften der DDR erfolgreich durchgeführt worden.

Es ist darüber hinaus auch möglich, spontan pulsierende Herzmuskelzellen von pluripotenten embryonalen Karzinomzellen beispielsweise der Zelllinie P 19 (McBurney, M. W./Rogers, B. J., *Developmental Biology* **89** [1982], S. 503) nach Differenzierungsinduktion mit 1 % Dimethylsulfoxid für ein screening herzaktiver Wirkstoffe einzusetzen. In diesem Fall kann sogar auf den Einsatz von „feeder-layer“-Zellen für die Kultur der undifferenzierten Zellen ganz verzichtet werden. Die Versuche werden analog zur oben dargestellten Verwendung der Zelllinie D3 durchgeführt mit dem Unterschied, daß anstelle von 100 ESC nunmehr 400 Zellen der Zelllinie P 19 in der o. a. Menge des Kulturmediums zu „embryoid bodies“ kultiviert werden.

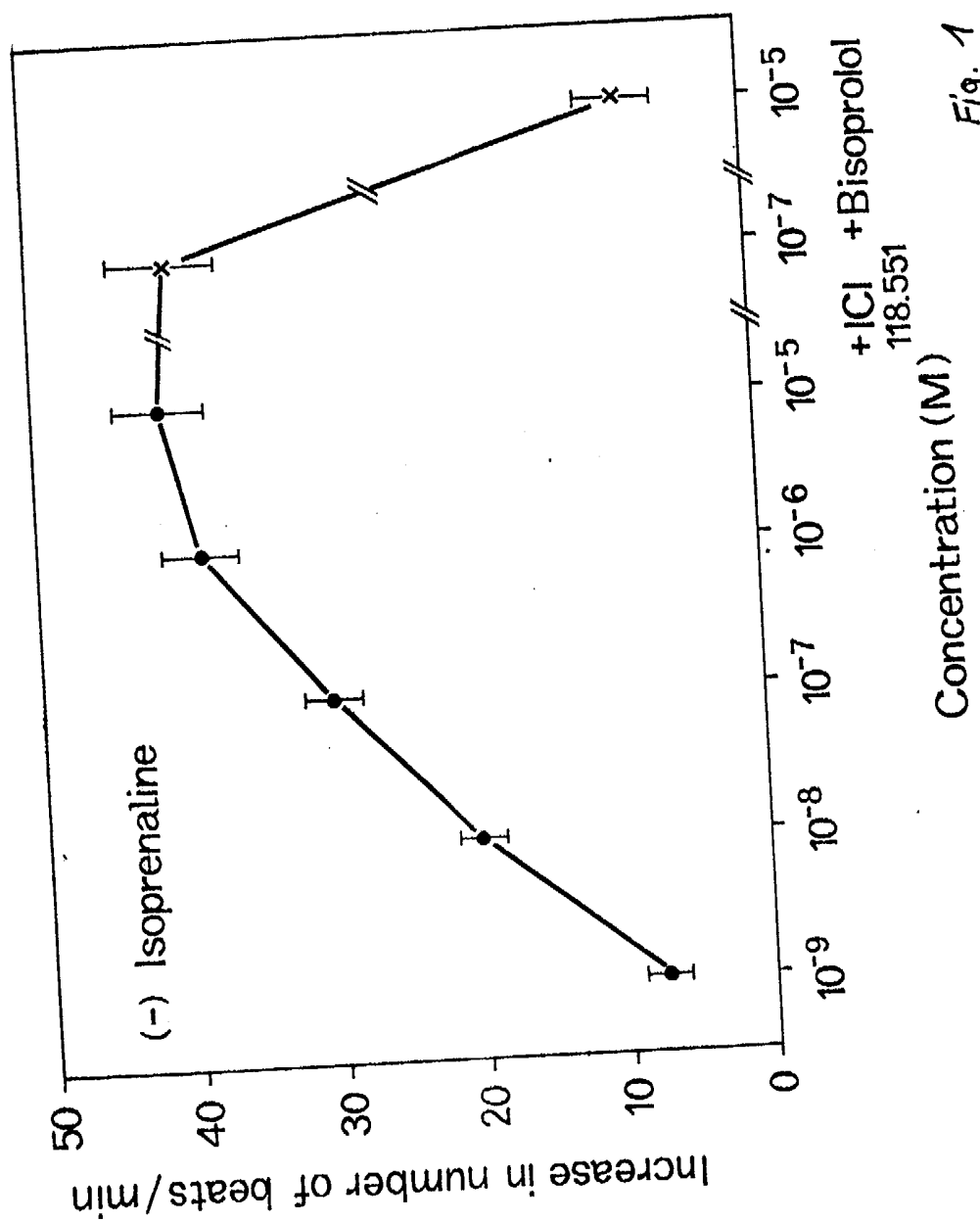


Fig. 1

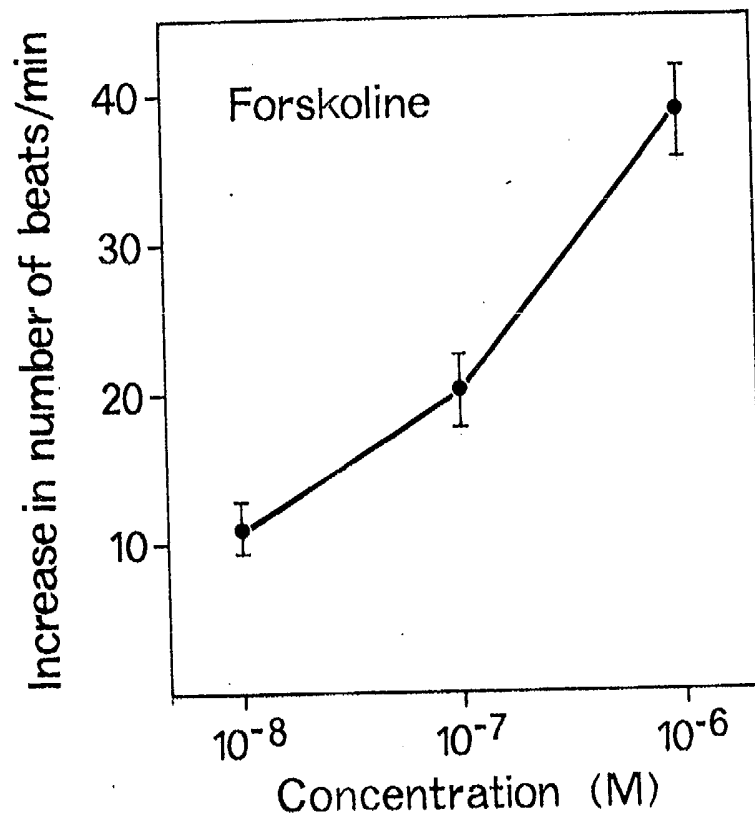


Fig. 2

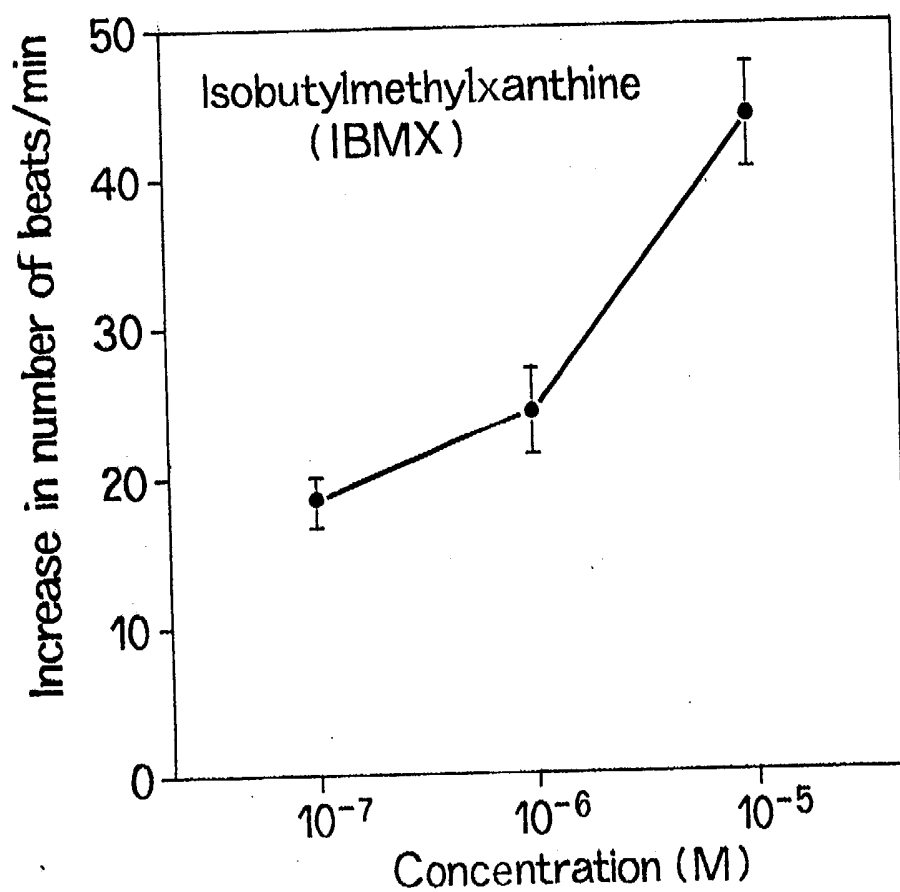


Fig. 3

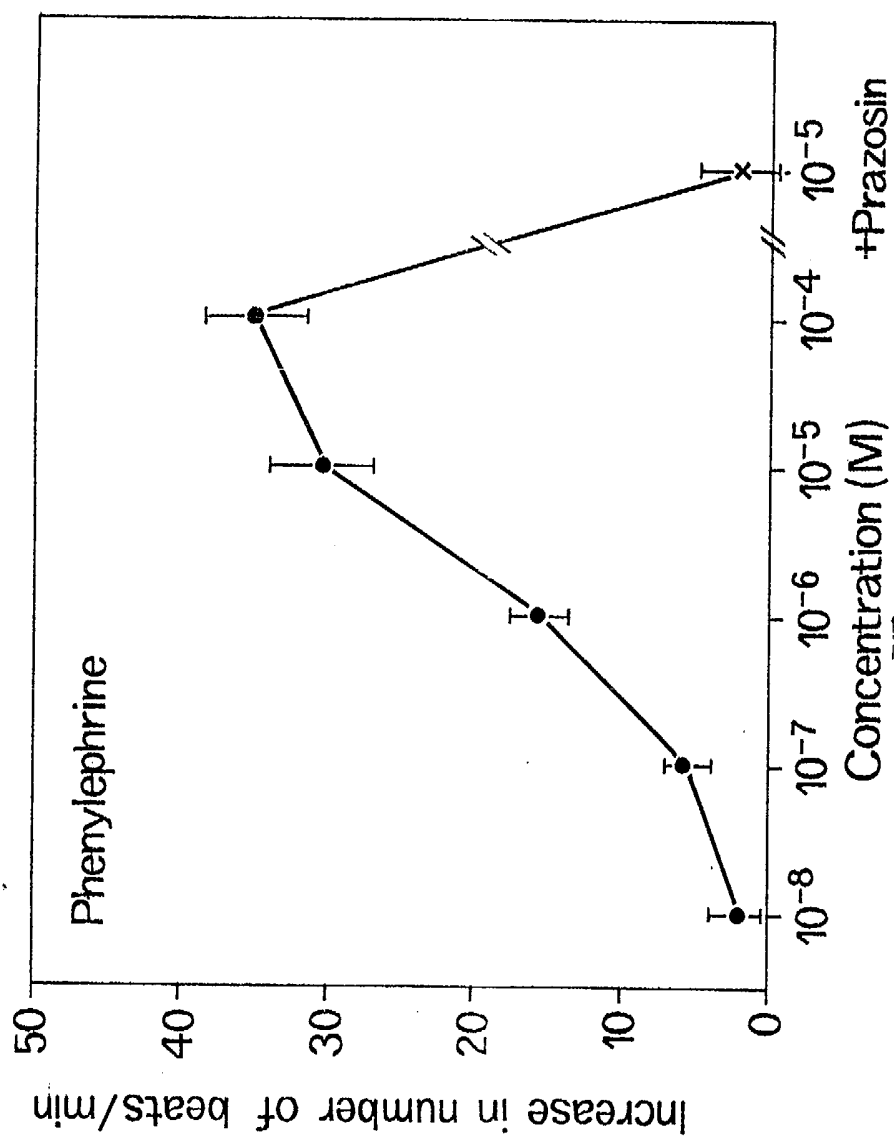


Fig. 4

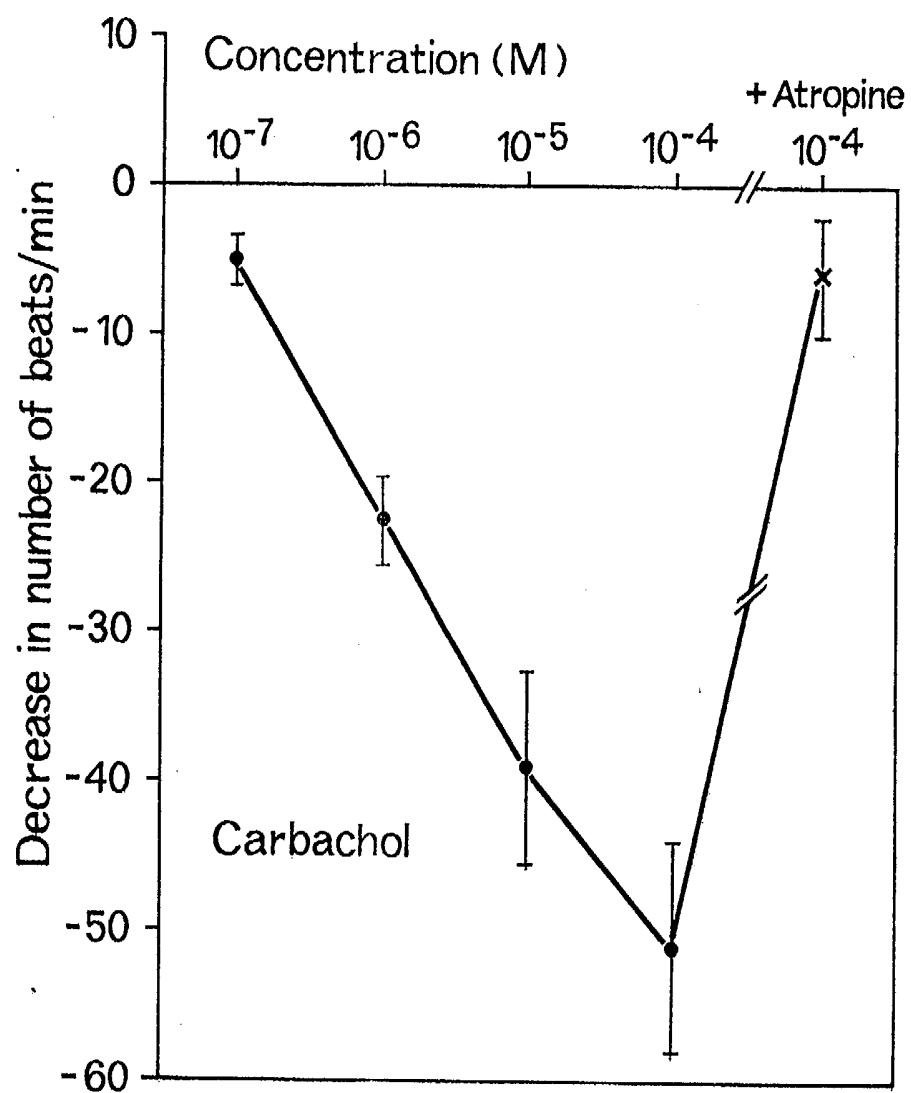


Fig. 5