

# Unterstützung der Identifizierung von Leitstrukturen mit PBMCs

Dr. Peter Habenberger, Dr. Axel Choidas, Dr. Bert Klebl und Dr. Jan Eickhoff, Lead Discovery Center GmbH, Dortmund

Um die *in vivo*-Effizienz von Leitstrukturkandidaten vorherzusagen, werden in der Regel zelluläre Modellsysteme herangezogen, die den angestrebten pharmakologischen Effekt abbilden. Da *in vivo* jedoch nicht nur der gewünschte phänotypische Effekt, sondern auch ein mehr oder weniger großes therapeutisches Fenster erreicht werden soll, wird häufig versucht, die *in vivo*-Toxizität über zelluläre Modellsysteme vorherzusagen. Ein aussagekräftiges System zur Prädiktion der nicht systemisch bedingten Toxizität stellen mononukleäre periphere Blutzellen (PBMCs) dar, die vergleichsweise einfach aus Spenderblut isoliert werden können. Für die Untersuchung der Wirkmechanismen und der Vorhersage der Toxizität bietet dieses System die Vorteile, dass sich die *ex vivo* untersuchten Zellen in einem *in vivo*-ähnlichen Zustand befinden, zugleich Toxizitäts- und Funktionstests durchgeführt werden können und dass sich – anders als bei den meisten konventionellen Toxizitätsassays – auch nicht-proliferierende Zellen testen lassen. Der erhöhte Aufwand für die Beschaffung von PBMCs im Vergleich zu etablierten Zelllinien ist in vielen Fällen durch die höhere Aussagekraft mehr als gerechtfertigt.

Während der Hit-to-Lead-Phase der Wirkstoffentwicklung wird in der Regel erst auf Aktivität gegenüber dem isolierten Target *in vitro*, auf Hemmung des Targets in Zelllinien und gegebenenfalls auf Inhibition eines Signalweges (sowie einen funktionellen Readout) gescreent. Oft wird die Toxizität nicht oder erst vergleichsweise spät ermittelt, so

dass toxische Substanzen erst spät aus dem Optimierungsprozess entfernt und so unnötig Ressourcen gebunden werden. Um toxische Substanzen während des Optimierungsprozesses zu identifizieren, stehen verschiedene Optionen zur Verfügung:

- ▮ Toxizitätstestung im zellulären System, in dem der funktionelle Readout generiert wird,

- ▮ Verwendung funktioneller Readouts mit Signalzunahme nach Substanzzugabe, so dass zytotoxische Substanzen (falsch-)negative Readouts ergeben,
- ▮ Messung der Toxizität in speziellen Zelllinien.

Für phänotypische Assays werden oft genetisch veränderte oder transformierte Zelllinien verwendet, die vergleichsweise unempfindlich gegenüber toxischen Effekten sein können. Geeignet für die Vorhersage der Toxizität sind zum Beispiel spezielle, auch genetisch veränderte Zelllinien wie beispielsweise NIH3T3-Zellen, die wegen ihrer leichten Kultivierbarkeit gerne für Toxizitätsassays herangezogen werden. Um eine bessere Vorhersage der Toxizität *in vivo* zu erreichen, sollten hier weitgehend „wenig transformierte“ Zelllinien (wie IMR90) oder primäre Zelllinien wie HFFs (Human Foreskin Fibroblasts) eingesetzt werden. Ideal ist die Verwendung mehrerer Zelllinien aus verschiedenen Gewebetypen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Zellsysteme in Kultur in der Regel proliferieren, während sich die Zellen in vielen Geweben *in vivo* im nicht-proliferierenden (Go-)Zustand befinden, und dass proliferierende Gewebe oft empfindlicher auf bestimmte Substanzklassen reagieren. Auch hier gibt es Möglichkeiten der Abhilfe. So können beispielsweise die Zellen durch Kontaktinhibition an der Proliferation gehindert (sofern dieser Prozess in den gewählten Zellen noch intakt ist), oder es kann durch genetische Manipulation und/oder bestimmte Agenzien ihr Zellzyklus arretiert werden.

All diese Methoden haben jedoch den Nachteil, dass pro Assay nur einzelne Zelllinien/Zelltypen betrachtet werden können, dass die Arretierung der Zellen oft unphysiologisch ist (je nach Art des Zellzyklusarrests können die Zellen unterschiedlich auf Agenzien reagieren) und dass die eingesetzten Zellen oft weit vom physiologischen Zustand entfernt sind. Eine praktikable Alternative zu Assays in diesen Systemen bietet der Einsatz von frisch isolierten (*ex vivo*-) Blutzellen, sogenannten PBMCs (mononukleäre periphere Blutzellen). Die Beschaffung ist vergleichsweise einfach, und die Zellen können bei Bedarf eingefroren werden.

Der Zustand der Zellen ist weitgehend physiologisch, zudem werden die Substanzen in diesem System nicht auf einer einzelnen Zelllinie getestet, sondern in einer Population verschiedener Zelltypen (wenn auch auf das hämatopoetische System beschränkt). Ein besonderer Vorteil dieses Systems ist, dass sich die Zellen natürlicherweise im nicht-proliferierenden Zustand befinden, die Proliferation (zumindest einer Subpopulation) jedoch einfach induziert werden kann. Darüber hinaus kann in diesem System parallel zur Toxizitätsmessung eine Reihe funktioneller Readouts erfasst werden. PBMCs ermöglichen die Detektion toxischer

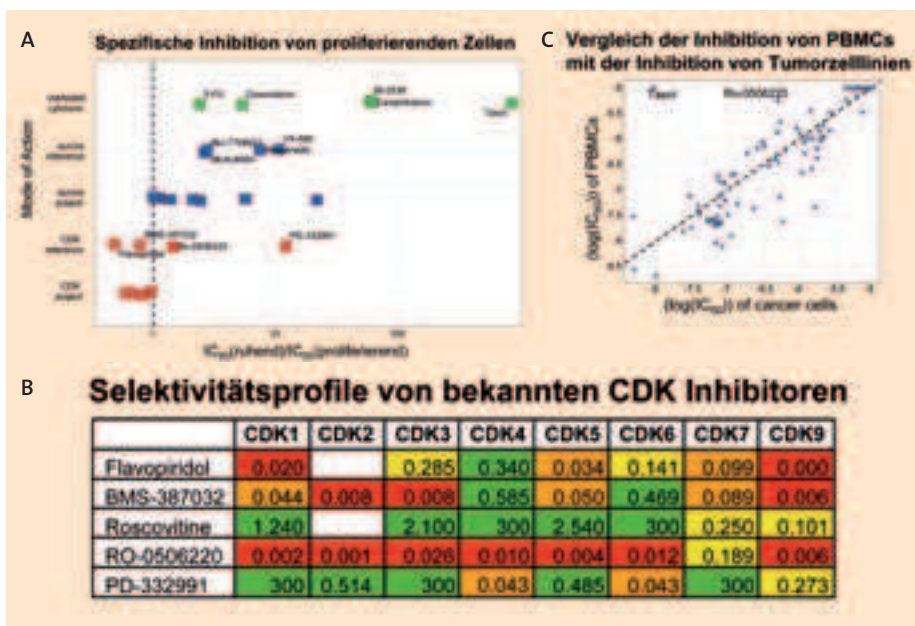


Abb. 1: Charakterisierung antimetabolischer Wirkstoffe in PBMCs. A: Vergleich der Wirkung von antimetabolischen Substanzen auf ruhende und proliferierende PBMCs. B: IC<sub>50</sub>-Werte [µM] bekannter CDK-Inhibitoren. C: Vergleich der Toxizität von CDK-Inhibitoren auf ruhende PBMCs und Krebszelllinien (abgebildet sind die Mediane der Toxizität in verschiedenen Zelllinien).



## Microplate Reader - wir haben die Antwort!

**Photometrie, Fluorometrie, Luminometrie, TRF oder FP, Spezialgerät oder Multimode – wenn es um Microplate Reader geht, haben wir immer die richtige Antwort.**

Egal für welchen Bedarf oder für welche Anwendung - Thermo hat das passende Gerät für Sie. Mit einer umfangreichen Zusatzausstattung bieten unsere Reader Höchstleistung ohne Kompromisse sowie die Flexibilität, die Sie heute und in der Zukunft brauchen.

Für jede Anwendung und für jeden Anwender - unter [www.thermo.com/readingroom](http://www.thermo.com/readingroom) finden Sie den richtigen Reader.



**Leistungsstarke  
Microplate Reader  
für Ihre individuellen  
Anforderungen**



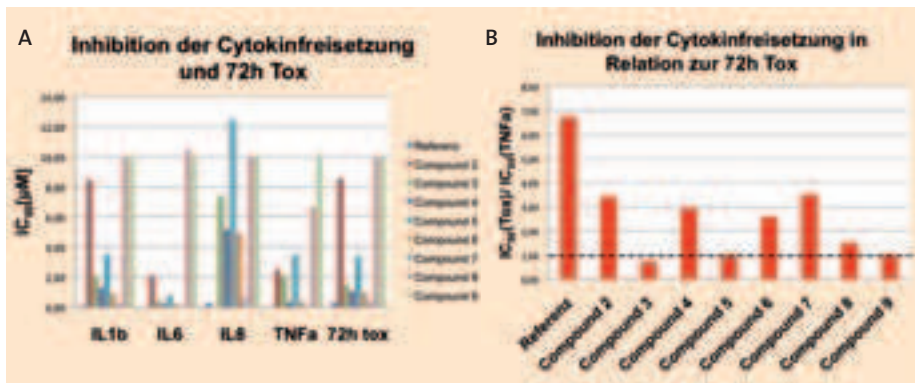


Fig. 2: PBMCs als Testsystem für antiinflammatorische Substanzen. A: Messung der Zytokinfreisetzung und Toxizität. B: Der Vergleich der Zytokinfreisetzung mit der Toxizität erlaubt die Abschätzung des möglichen therapeutischen Fensters.

Effekte in humanen Zellen, die aufgrund von Speziesunterschieden im Tiermodell verborgen bleiben.

Beim Einsatz von PBMCs sind jedoch auch einige Besonderheiten zu berücksichtigen. Zum Beispiel sind die Beschaffung und Logistik schwieriger als bei stabilen Zelllinien, und die Ausbeute an Zellen aus einer Spende ist begrenzt, so dass mit vergleichsweise kleinen Chargen gearbeitet werden muss. Zur Gewinnung der PBMCs werden die Zellen durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten von Plasma und Erythrozyten abgetrennt und Verunreinigungen durch Erythrozyten über hypotonische Lyse entfernt. Nach der Isolation können die Zellen sofort eingefroren oder für das Experiment verwendet werden. Die frisch gewonnenen Zellen sollten sich überwiegend im arretierten Zustand befinden, können jedoch bei Bedarf mit Agenzien wie Phytohämagglutinin oder durch Mischen von Zellen verschiedener Spender zur Zellteilung angelegt oder nach Bedarf stimuliert werden.

### PBMC-Anwendung: Testung antimitotischer Agenzien

Ein Beispiel für den Nutzen der PBMCs zur Charakterisierung von Wirkstoffen in der Hit-to-Lead-Phase ist das Testen antimitotischer Reagenzien. Wir haben Inhibitoren der Aurora-Kinase und der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) auf antimitotische Wirkung getestet. Dabei lautete die Arbeitshypothese: Substanzen, die selektiv Zellzyklus-regulierende CDKs oder Aurora inhibieren, sollten auf proliferierende Zellen toxisch wirken, ruhende Zellen jedoch nicht beeinflussen. Auf dieser Basis wurde eine Reihe von CDK-Inhibitoren entwickelt, die derzeit in klinischen Studien erprobt werden. Die Eignung des Testsystems aus ruhenden/replizierenden PBMCs wurde zunächst mittels bekannter Substanzen mit antimitotischer Wirkung validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bekannte Substanzen wie Doxorubicin oder Taxol auf sich teilende Zellen

toxischer wirken als auf ruhende Zellen, ebenso wie Inhibitoren der Aurora-Kinase (Abb. 1A oben), zu denen es bereits wissenschaftlich publizierte Daten gibt. Für Inhibitoren aus dem internen Aurora-Projekt ermöglicht das System eine deutliche Rangfolge hinsichtlich der Selektivität gegenüber proliferierenden Zellen und liefert eine Entscheidungsgrundlage für die Auswahl der aussichtsreichsten Verbindungen.

Überraschend ist jedoch die Wirkung bekannter sowie intern entwickelter CDK-Inhibitoren. Lediglich der publizierte CDK-Inhibitor PD-332991 ist selektiv gegenüber proliferierenden PBMCs, während alle übrigen Inhibitoren auf ruhende Zellen genauso toxisch wirken wie auf proliferierende. Tatsächlich ist dieser Toxizitätsmechanismus mit großer Wahrscheinlichkeit der Hauptgrund für den mäßigen Erfolg der diversen CDKis in präklinischen und klinischen Studien. Eine Korrelationsanalyse der CDKi-vermittelten Aktivitäten auf ruhende/replizierende Zellen sowie biochemische Aktivitätsbestimmungen ergaben eine deutliche Korrelation der Toxizität zur Hemmung von CDK7 und/oder CDK9 und/oder weiteren unbekanntem Targets (Abb. 1B). Dabei ist bekannt, dass die selektive Hemmung von CDK9 pharmakologisch toleriert wird. Tatsächlich ist diese Erkenntnis zur Toxizität von Bedeutung, da bis heute in der Medizinalchemie wenig Wert auf die Selektivität der CDKis innerhalb der CDK-Familie gelegt wurde. Sehr interessant ist hier der Befund, dass der CDK4- und CDK6-spezifische CDK-Inhibitor PD332991 selektiv auf proliferierende PBMCs wirkt, was auf ein wichtiges pharmazeutisches Prinzip zur Hemmung von proliferierenden Zellen hindeuten könnte.

Ein weiterer mechanistischer Aspekt der selektiven Wirkung von CDK-Inhibitoren auf Tumorzellen ist nicht nur die Hemmung von proliferierenden Zellen *per se*, sondern eine durch Mutationen bedingte besondere Abhängigkeit der Tumorzelllinien von einzelnen CDKs („oncogene addiction“). Dies könnte eine selektive Inhibition von Tumorzellen gegenüber ruhenden Zellen bedingen, aber

auch gegenüber nicht transformierten proliferierenden Zellen, so dass tumorselektive CDK-Inhibitoren im Testsystem der ruhenden/replizierenden PBMCs nicht auffallen würden.

Um entsprechend wirksame CDK-Inhibitoren zu identifizieren, wurden diese auf Toxizität in einer Reihe von Tumorzelllinien getestet und die so erhaltenen Daten mit der Toxizität gegenüber ruhenden PBMCs verglichen (Abb. 1C). Auffallend ist hier, dass Ro-0506220 selektiv auf proliferierende Tumorzelllinien wirkt, sowohl verglichen mit ruhenden als auch proliferierenden PBMCs.

### PBMCs als Testsystem für antiinflammatorische Substanzen

Eine weitere Einsatzmöglichkeit für PBMCs ist die Charakterisierung antiinflammatorischer Substanzen. Eine Alternative zu den verbreiteten NF-κB Reporterassays bietet das Screenen in PBMCs auf Inhibition der Zytokinfreisetzung. Bei diesem Assay wird nach Stimulation der PBMCs mit LPS die Freisetzung von Zytokinen gemessen. In dem in Abbildung 2A dargestellten Beispiel ist die Inhibition der Freisetzung der Zytokine IL1β, IL6, IL8 und TNFα dargestellt, die zum Beispiel problemlos per ELISA- oder MesoScale-Technologie im 96- oder 384-well-Format quantifiziert werden kann. Die Vorhersagekraft dieses Assays ist mit anderen *in vitro*-Systemen kaum zu erreichen, da alle relevanten humanen Blutzelltypen beteiligt sind und verschiedene Zytokine gleichzeitig gemessen werden können. Das System bietet eine noch bessere Grundlage zur Auswahl aktiver Substanzen, wenn parallel (bzw. zeitlich nachgeschaltet) zur Zytokinfreisetzung die Toxizität der Verbindungen gemessen wird. Der Quotient aus Toxizität und Inhibition der Zytokinfreisetzung kann zur Abschätzung des therapeutischen Fensters *in vivo* eingesetzt und als Auswahlkriterium für aktive Substanzen herangezogen werden (Abb. 2B).

Der logistische Aufwand für den Einsatz von PBMCs ist zwar höher als beim Einsatz von etablierten Zelllinien, wird jedoch durch die wesentlich höhere Aussagekraft mehr als ausgeglichen. Bei geeigneter Logistik eignet sich das PBMC-System auch für primäre Screeningkampagnen.

### Korrespondenzadresse

Dr. Jan Eickhoff  
Lead Discovery Center GmbH  
Emil-Figge-Str. 76A  
44226 Dortmund  
Tel.: +49-(0)231-9742-7005  
+49-(0)163-656-7005  
Fax: +49-(0)231-9742-7039  
eickhoff@lead-discovery.de