

ZELLBASIERTE ASSAYS FÜR DAS WIRKSTOFF- UND TARGET-SCREENING







ZELLBASIERTE ASSAYS FÜR DAS WIRKSTOFF- UND TARGET-SCREENING

In den vergangenen Jahren konnte vor allem in der pharmazeutischen Forschung und bei der Entwicklung neuer Medikamente ein Wachstumstrend im Bereich zellbasierter Testsysteme beobachtet werden. Zellbasierte Testsysteme beruhen auf der Verwendung von vitalen mammalischen Zellen als diagnostisches Mittel. Sie umfassen eine Vielzahl von Testverfahren, welche Zellproliferation, Toxizität, Motilität, Morphologie und Produktion eines messbaren Parameters beinhalten. Im Unterschied zu nicht-zellbasierten Testsystemen stellen zellbasierte Systeme die In-vivo-Situation realitätsnah nach und ermöglichen eine direkte Analyse der entsprechenden Zellreaktion.

In der Anwendung haben zellbasierte Testsysteme gezeigt, dass sie ein gezieltes Screening nach neuen Medikamenten ermöglichen und dabei Zeit und Kosten sparen. Durch diese Screening-Verfahren werden zudem nachfolgende Analysen vereinfacht.

Anwendungen

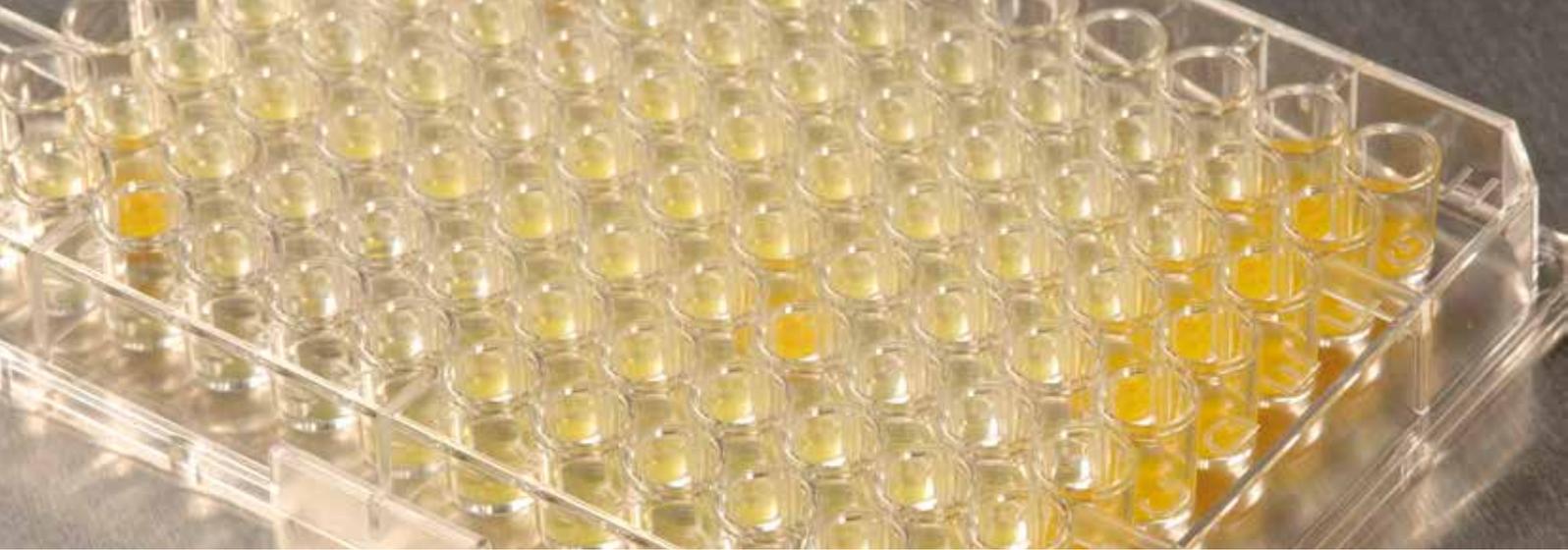
Die am Fraunhofer IGB etablierten zellbasierten Testsysteme bieten ein breites Anwendungsspektrum:

- Screening nach antimikrobiellen und antiviralen Substanzen
- Beurteilung von toxischen und nicht-toxischen Substanzen
- Detektion von infektiösen, viralen Kontaminationen
- Detektion von Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)
- Screening nach Agonisten und Antagonisten von Pattern-Recognition Receptors (PRR)

Zellbasierte Assays sind über photometrische Auswertungsverfahren hochdurchsatzfähig. Die Auswertung kann jedoch auch visuell mittels qPCR oder über Änderungen der Zellmorphologie erfolgen.

Unser Labor ist für »Zellbasierte Testsysteme zur Bestimmung biologischer Parameter« zertifiziert. Die am Fraunhofer IGB entwickelten zellbasierten Testsysteme können deshalb nach GLP (Good Laboratory Practice) in industriellen Prozessen oder in klinischen Anwendungen eingesetzt werden. Ebenso führen wir Screeningassays im Auftrag unserer Kunden durch.

*Zellbasiertes Testsystem
zum Nachweis von pyrogenen Rückständen.*



SCREENING NACH NEUEN ANTIMIKROBIELLEN SUBSTANZEN

HTS-AKTIVITÄTS-SELEKTIVITÄTS-SCREENINGSYSTEM

Herausforderung

Die Schlüsselkriterien für den erfolgreichen klinischen Einsatz eines Medikaments sind dessen Effizienz und Verträglichkeit. Zahlreiche antimikrobielle Medikamente, insbesondere Antimykotika, wirken nur auf ein begrenztes Spektrum an Pathogenen oder führen zu ernststen Nebenwirkungen. Durch die Verwendung eines neuen, automatisierbaren Screeningverfahrens (Aktivitäts-Selektivitäts-Test) können Substanzbibliotheken schnell und effizient auf antimikrobielle Substanzen mit einer verbesserten Verträglichkeit getestet werden. Dabei werden humane Wirtszellen in Gegenwart der zu unterscheidenden Substanz mit dem Pathogen, beispielsweise Viren, Bakterien oder Pilze, inkubiert. Damit bildet das Testsystem die kleinste Einheit einer natürlichen Infektion nach. Analog zu Tiermodellen (lethal challenge) wird nach der vorgesehenen Inkubationszeit die Vitalität der Zellen ermittelt. Toxische Substanzen, die die Vitalität der Humanzellen beeinflussen werden so automatisch ausgeschlossen. Damit erhöht das Testsystem die Chancen für die erfolgreiche Entwicklung eines anti-infektiösen Medikaments. Es ist sensitiv, robust, zeit- und kosteneffizient und vor allem effektiv als Screeningsystem, um identifizierte Wirksubstanzen zu Leitstrukturen zu optimieren (Hit-to-lead-Optimierung).

Verfahrensschritte

Die Nöpfchen einer Mikrotiterplatte werden mit humanen Zellen bewachsen. Danach werden die Testsubstanzen und das entsprechende Pathogen dazu pipettiert und inkubiert (Abb. 1). Üblicherweise entwickelt der Erreger unverzüglich sein pathogenes Potenzial und tötet die humane Zelle. Wenn

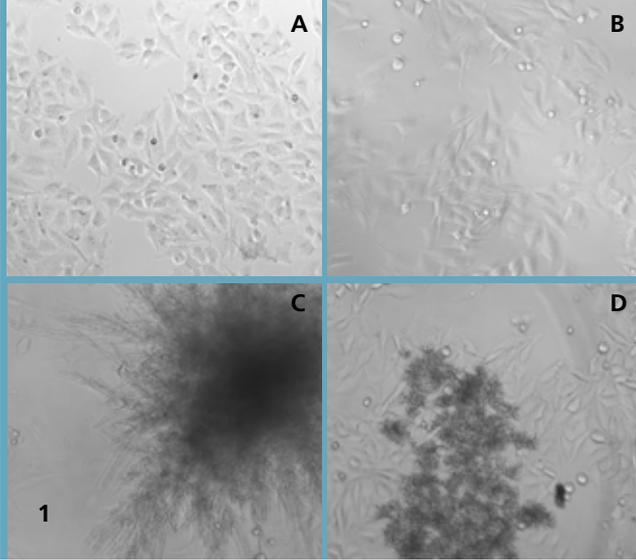
allerdings eine der Testsubstanzen die Vermehrung des Pathogens hemmt oder dessen Virulenzmechanismen blockiert, bleibt die humane Zelle vital. Die Vitalität humaner Zellen kann man auf einfachem Weg photometrisch durch metabolisierbare Farbstoffe ermitteln. Mikroskopische Kontrollen der individuellen Nöpfe einer Mikrotiterplatte ermöglichen zusätzlich eine Evaluierung des physiologischen Zustands der humanen Zellen. Dies führt zu einem weiteren Auswertungsparameter, welcher sicherstellt, dass nur gut verträgliche und biokompatible Substanzen für weitere Tests selektiert werden (Grafik rechts). Der Assay ist HTS-kompatibel und wurde halbautomatisiert am Fraunhofer IGB etabliert.

Spezifikationen

- Generelle Anwendung in der Antiinfektiva-Entwicklung
- Testsystem, welches simultan die Verträglichkeit und die Aktivität von antimikrobiellen Substanzen in einem einzelnen Assay aufzeichnen kann
- Methode, welche in Zellkulturen direkt das Überleben der Wirtszellen in Anwesenheit eines Pathogens ermittelt
- Halbautomatisiertes Screening von Substanzbibliotheken

Leistungsangebot

- Adaption des zellbasierten Screeningassays auf unterschiedliche Erregertypen (Pilze, Bakterien und Viren)
- Halbautomatisiertes Screening von Substanzbibliotheken
- Zielorientiertes (target-directed) Screening durch die Verwendung zusätzlicher reporter-genvermittelter zellbasierter Testsysteme



1 Beispiel für eine Pilzinfektion: Phasenkontrastaufnahmen des Testsystems 24 h nach Infektion mit *Candida albicans*.

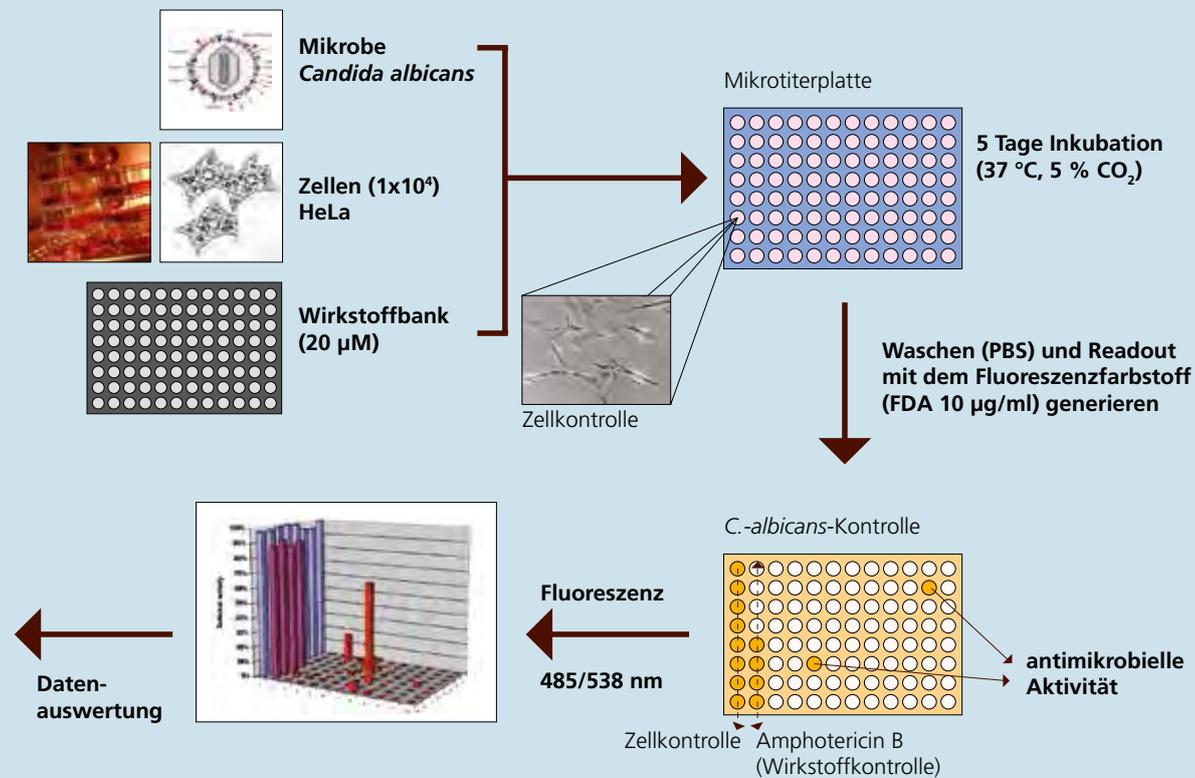
A: Mikroskopische Aufnahme der mammalischen Testzellen (Lebendkontrolle),

B: Zellen infiziert mit *C. albicans* und behandelt mit Amphotericin B (Wirkstoffkontrolle),

C: Zellen infiziert mit *C. albicans* (Infektionskontrolle),

D: Zellen infiziert mit *C. albicans* und zeitgleicher Zugabe einer Testsubstanz, welche als Wirkstoff identifiziert wurde: Die Substanz hemmt das Wachstum von *C. albicans*, während das vitale Wachstum der Zellen nicht beeinflusst wird.

HTS-Screening-Assay



Schematische Darstellung des Aktivitäts-Selektivitäts-Testsystems zur Identifizierung von Leitstrukturen in der Anti-infektiva-Entwicklung. Es bildet die kleinste Einheit einer Infektion nach, indem die Wirtszellen (humane Zelllinie HeLa) mit dem Pathogen in Gegenwart der Testsubstanz inkubiert werden.



ZELLBASIERTES TESTSYSTEM ZUR BESTIMMUNG VON PYROGENEN RÜCKSTÄNDEN

Herausforderung

Pyrogene sind Fieber auslösende Bestandteile von Bakterien, Viren oder Pilzen, welche nach einem Eintritt in den Blutkreislauf eine Sepsis auslösen können. Sepsis wird als eine der schwersten Komplikationen in Krankenhäusern angesehen und manifestiert sich durch eine Summe an lebensbedrohlichen Symptomen und pathophysiologischen Veränderungen, welche durch so genannte Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ausgelöst werden. Dies können mikrobielle Rückstände, isolierte chemische Strukturen, Zellwandbestandteile oder vollständige Mikroorganismen sein. Der Körper reagiert mit der Produktion endogener Botenstoffe (Zytokine), welche eine Entzündungskaskade aktivieren. Bei einer Sepsis führt die Hyperstimulation dieser Kaskaden zu einer systemischen Reaktion, welche außer Kontrolle gerät und zu Multiorganversagen führen kann. Um die Übertragung von pyrogenen Stoffen in den humanen Blutkreislauf zu verhindern, müssen

Operationsbesteck, medizinische Ausrüstungen und Produkte (Implantate und intravenös verabreichte Medikamente) auf die Abwesenheit von pyrogenen Stoffen untersucht werden. Momentan sind drei Methoden zur Detektion von Pyrogenen kommerziell erhältlich (siehe Tabelle), welche jedoch entweder sehr teuer oder limitiert auf spezifische Pyrogene sind.

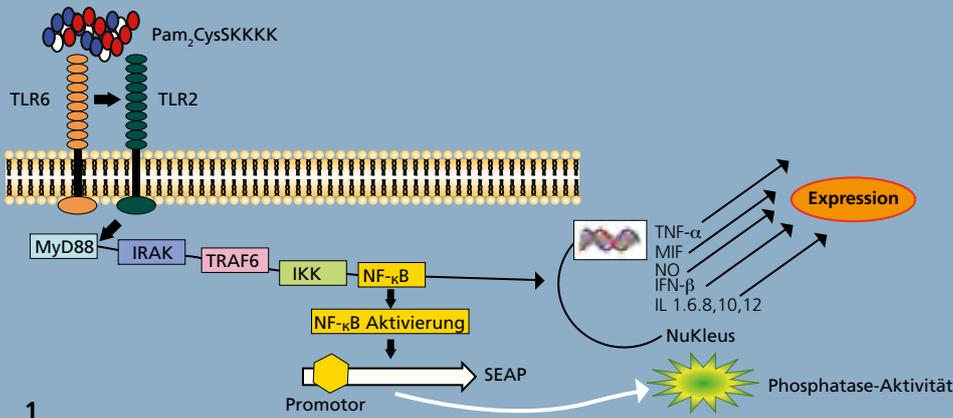
Verfahrensschritte

Am Fraunhofer IGB wurde ein neues, zellbasiertes Testsystem entwickelt, welches die Detektion und Differenzierung von PAMPs mit Hilfe ihrer natürlichen Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), wie beispielsweise den Toll-like-Rezeptoren (TLRs), NOD-like-Rezeptoren (NLRs) oder C-Typ-Lektinen, über einen einfachen Reporter-Gen-Assay, ermöglicht. PRRs sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche Komponenten von Viren, Bakterien oder Pilzen erkennen und eine Immunantwort über Zytokine induzieren. Für diesen Assay

Überblick über die Vor- und Nachteile kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Bestimmung von Pyrogenen.

	Kaninchentest	LAL (Limulus Amebocyte Lysate) Test	IPT In-vitro-Pyrogentest
Testprinzip	Tierexperiment Fieberreaktion	Abwehrreaktion von Arthropoden	Vollbluttest mit ELISA-Analytik: Fieberreaktion humaner Zellen
Gram-negative Organismen	+	+	+
Gram-positive Organismen	+	-	+
Pilze	+	-	+
Viren	-	-	+

1 Prinzip des zellbasierten Pyrogen-Detektionssystems: Nach Ligandenbindung an den Rezeptor aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade den Transkriptionsfaktor NF- κ B und induziert die Expression des Reportergens (sekretierte, alkalische Phosphatase, SEAP).



wurde der entsprechende Rezeptorkomplex (z. B. TLR2/6, siehe Abb. 1) in eine Zelllinie (NIH3T3-Fibroblasten) stabil transfiziert und exprimiert. Diese Zelllinie exprimiert endogen nur in sehr geringem Ausmaß PRRs. In diese Zelllinie wurde ein Reportergen stabil integriert, welches durch PRR-Aktivität induziert wird. Die Aktivierung zum Beispiel von TLR2/6 durch einen spezifischen Liganden ($\text{Pam}_2\text{CysSK}_4$) führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dies wiederum induziert die Expression des Reportergens, z. B. eine sekretierte, alkalische Phosphatase (SEAP). Pyrogene, welche in der Analyselösung vorhanden sind, können somit durch die Expression des Reportergens nachgewiesen werden. Abhängig von den Assaybedingungen kann die Bildung eines unlöslichen, blauen Präzipitats visuell beobachtet oder ein HTS-fähiger Assay mit photometrischer Analyse durchgeführt werden (Grafik rechts).

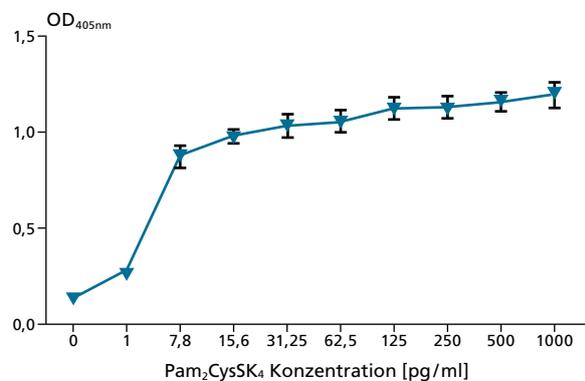
Spezifikationen

- Das zellbasierte Testsystem ermöglicht eine schnelle und einfache qualitative und quantitative Messung von Pyrogenen.
- Es kann direkt in Assay-Platten verschickt werden und ist ohne Zellkultur-Labor durchführbar.
- Es kann etablierte Testsysteme, wie LAL (Limulus Amebocyte Lysate) und IPT (In-vitro-Pyrogentest) ergänzen oder ersetzen.
- Pyrogene können auf medizinischer Ausrüstung, in injizierbaren Medikamenten, auf Implantaten oder Instrumenten ebenso nachgewiesen werden wie in Nahrungsmitteln.
- Screening nach TLR-Antagonisten, welche als Immunsuppressiva z. B. in der Dermatologie eingesetzt werden können.

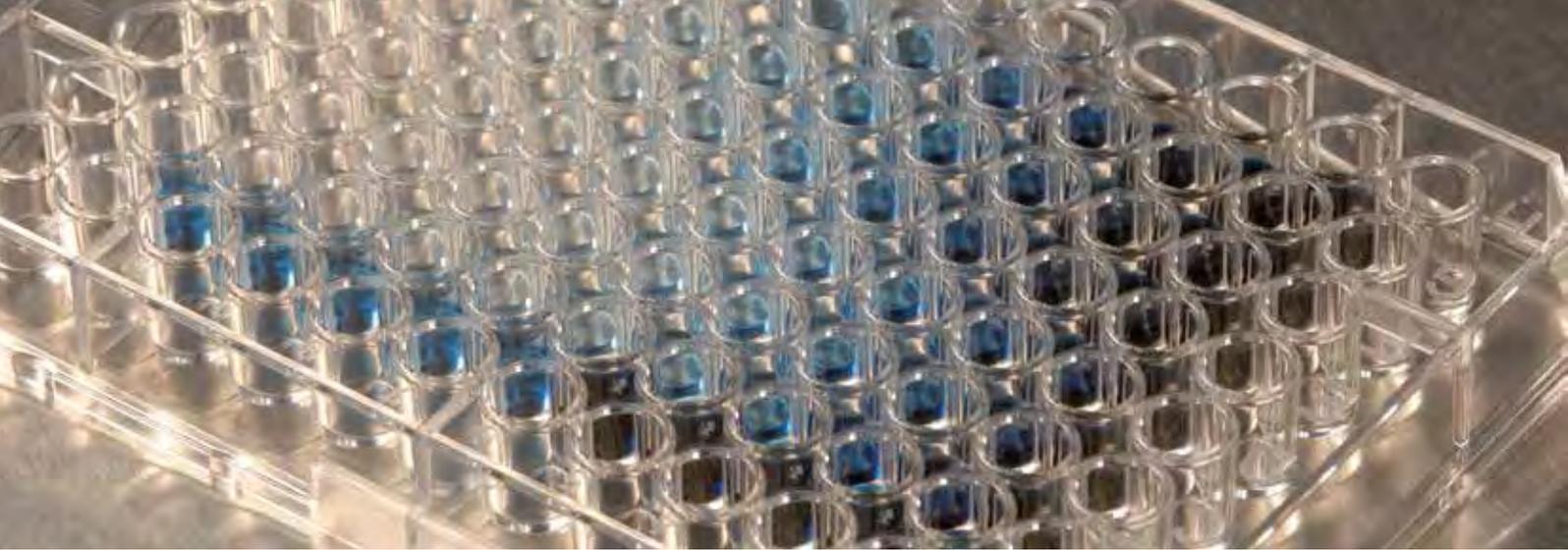
Leistungsangebot

- Anpassung und Weiterentwicklung des Pyrogen-Detektionstests an die spezifischen Anforderungen unserer Kunden
- Erweiterung des Pyrogen-Detektionstests um alle bekannten PRRs, um so das gesamte humane Immunsystem nachzustellen

Photometrische Analyse des Pyrogentests



Das TLR2/6-Testsystem wurde durch den spezifischen Liganden $\text{Pam}_2\text{CysSK}_4$ dosisabhängig aktiviert. Das Reportergen (SEAP) katalysiert die Hydrolyse des Substrats zu einem gelben Endprodukt, welches photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.



VIRUS-PROTECTION ASSAY (ANTIVIRALER ASSAY, AVA)

Herausforderung

Pharmazeutische Proteine, welche mittels Zelllinien produziert werden, oder Medizinprodukte aus tierischem Gewebe müssen entsprechend der USP Pharmacopoe Europeae oder ISO Standards auf virale Kontaminationen überprüft werden. Aufgrund eines möglichen Infektionsrisikos sind die hierzu eingesetzten Assays unter Einhaltung der entsprechenden Sicherheitsstandards für Biologische Sicherheit (am Fraunhofer IGB bis S2 GenTSV) durchzuführen.

Ein Antiviraler Assay (AVA) kann am Fraunhofer IGB entsprechend den GLP-Standards durchgeführt werden. Für die Bestimmung der biologischen Aktivität von Interferonen (IFN) wird der AVA routinemäßig eingesetzt. Er basiert auf der antiviralen Aktivität von Interferonen und deren Induktion der zellulären Antwort. Diese wird quantitativ mithilfe eines robusten und einfachen photometrischen Testsystems bestimmt. Des Weiteren werden andere virale Testsysteme, wie z. B. Tissue Culture Infectious Dose₅₀ (TCID₅₀) und Plaque-Tests entsprechend den GLP-Richtlinien durchgeführt.

Verfahrensschritte

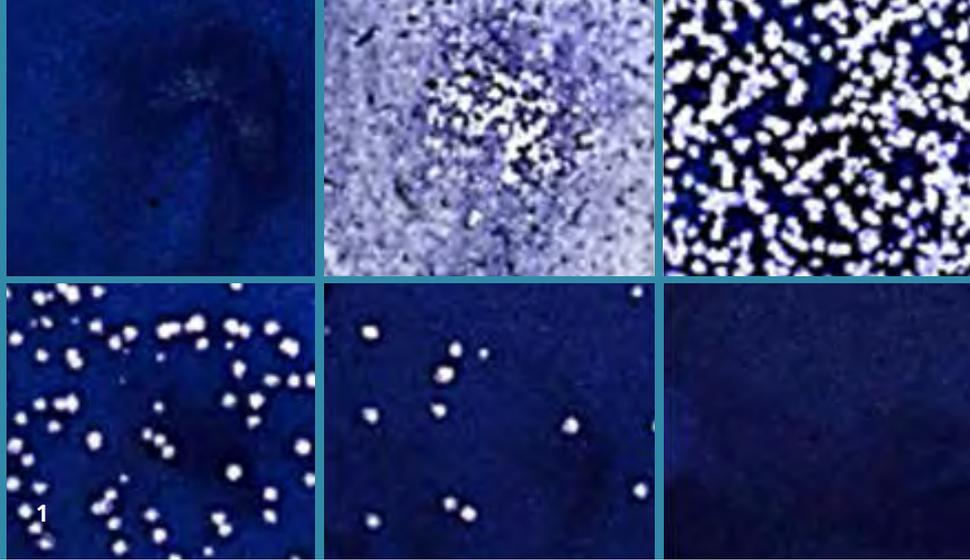
Basierend auf der Ausbreitung des zytopathischen Effekts (CPE) in der Lungenepithelzelllinie A549 wird die antivirale Aktivität der Probe im Vergleich zu einer Standardkurve (zytopathischer Effekt des Virus ohne Probe) ermittelt. Dabei wird der Assay bis zu einem CPE der Viruskontrolle von 100 Prozent inkubiert. Die Verdünnung, bei welcher 50 Prozent des maximalen zytopathischen Effekts erreicht werden, wird ermittelt und ergibt die relative Aktivität der Probe. Die Ergebnisse werden als EC₅₀ angegeben, der mittleren effektiven Konzentration. Ermittelt wird der EC₅₀ einer Substanz im Vergleich zur nicht induzierten Zellkontrolle und der Viruskontrolle. Der dynamische Bereich ist definiert als das Verhältnis zwischen dem maximalen Signal und dem geringsten Messpunkt im linearen Bereich der Dosiswirkungskurve.

Spezifikationen

- Photometrische Bestimmung des zytopathischen Effekts des jeweiligen Virus
- Antivirale Wirkung der zu prüfenden Substanz
- GLP-Zertifizierung

Leistungsangebot

- Analyse rekombinanter Proteine auf Viruskontaminationen
- Bestimmung des Titers von zytopathischen Viren im Kundenauftrag
- Implementierung von Virentestsystemen in Produktionsprozesse



1 *Plaque-Assay von HSV-1-infizierten Vero-B-Zellen (Färbung mit Coomassie).*

WEITERE VIRENDIAGNOSTIKTESTS

Neben dem beschriebenen AVA bieten wir weitere zellbasierte Testsysteme an, um den Titer zytopathischer Viren in unterschiedlichen Proben zu bestimmen. Die Assays können unter unterschiedlichen Qualitätssicherungskategorien, von der Anforderung in Forschung und Entwicklung bis zum zertifizierten GLP-Standard, durchgeführt werden.

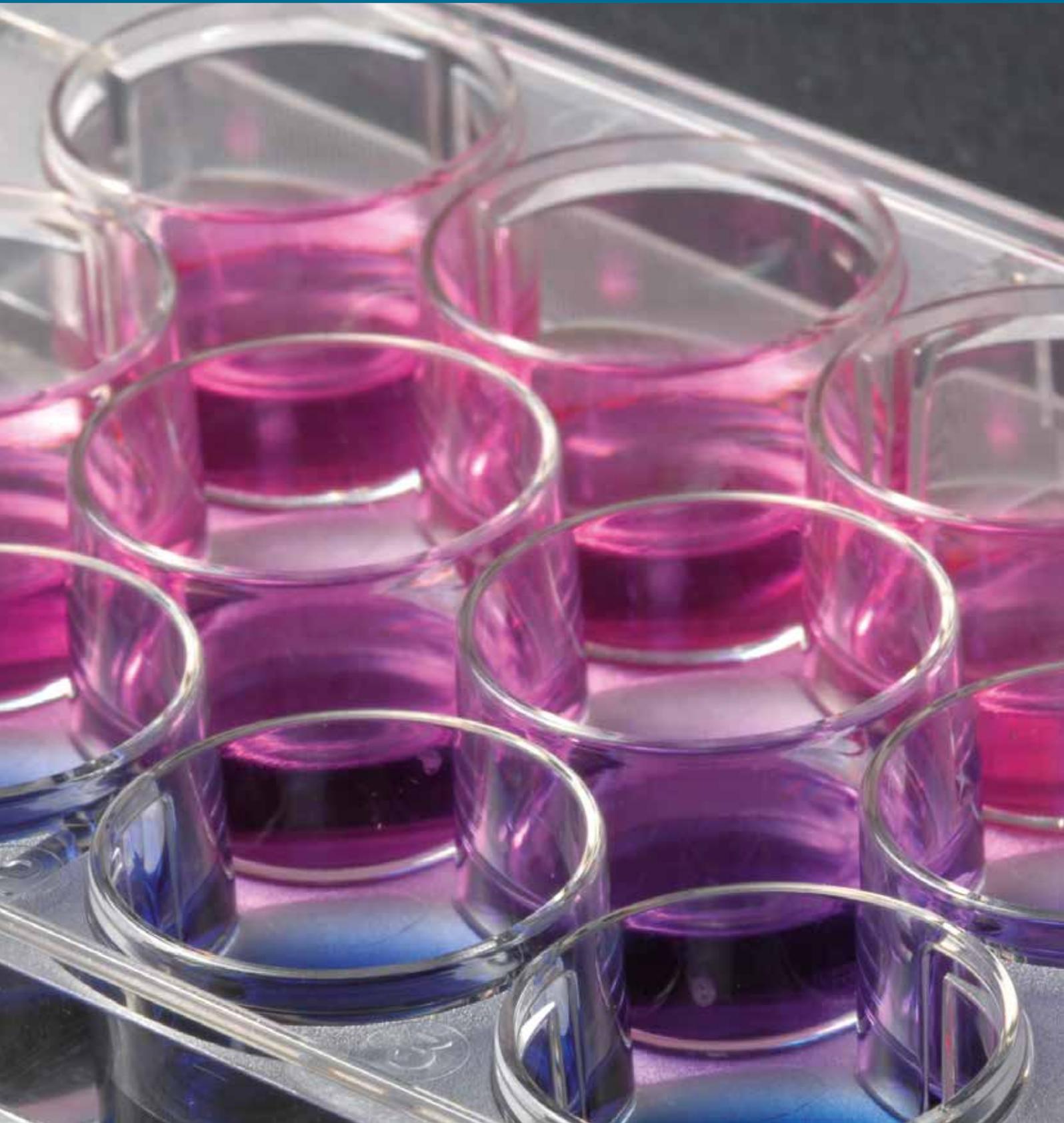
Der Plaque-Assay

Zytopathogene Viren können durch die Anzahl der Plaques quantifiziert werden, die sie in einem Zellmonolayer verursachen. Mittels dieses Testsystems kann nach Wirkstoffen mit antiviraler Aktivität gesucht werden, welche die Plaquebildung inhibieren.

TCID₅₀-Testsystem:

Bestimmung der Tissue Culture Infectious Dose₅₀

Zytopathische Effekte (CPE) von Viren werden auch mithilfe des TCID₅₀-Assays quantifiziert. Dieser Assay kann auch für Viren eingesetzt werden, die keine Plaques bilden, um die Werte Lethal Dose₅₀ (LD₅₀) oder Infectious Dose₅₀ (ID₅₀) zu bestimmen. Für die Datenauswertung setzen wir unterschiedliche statistische Methoden ein, beispielsweise die Spearman-Kärber-Analyse. Ergänzend wenden wir nukleinsäurebasierte analytische Verfahren zur Virendetektion an, die in einer eigenen Broschüre beschrieben sind.



KONTAKT

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Telefon +49 711 970-4401

Fax +49 711 970-4200

info@igb.fraunhofer.de

www.igb.fraunhofer.de

Dr. Anke Burger-Kentischer

Stv. Abteilungsleiterin Molekulare Biotechnologie

Gruppenleiterin Molekulare Zelltechnologie

Telefon +49 711 970-4023

anke.burger-kentischer@igb.fraunhofer.de

Dr. Christina Kohl

Molekulare Zelltechnologie

Telefon +49 711 970-4183

christina.kohl@igb.fraunhofer.de

**Fraunhofer-Institut
für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik IGB**
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Telefon +49 711 970-4401
Fax +49 711 970-4200
info@igb.fraunhofer.de
www.igb.fraunhofer.de

Fraunhofer IGB Kurzprofil

Das Fraunhofer IGB entwickelt und optimiert Verfahren und Produkte für die Geschäftsfelder Medizin, Pharmazie, Chemie, Umwelt und Energie. Wir verbinden höchste wissenschaftliche Qualität mit professionellem Know-how in unseren Kompetenzfeldern – stets mit Blick auf Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit. Komplettlösungen vom Labor- bis zum Pilotmaßstab gehören dabei zu den Stärken des Instituts. Kunden profitieren auch vom interdisziplinären Austausch zwischen den fünf FuE-Abteilungen in Stuttgart und den Institutsteilen an den Standorten Leuna, Straubing und Würzburg. Das konstruktive Zusammenspiel der verschiedenen Disziplinen am Fraunhofer IGB eröffnet neue Ansätze in Bereichen wie Medizintechnik, Nanotechnologie, industrieller Biotechnologie oder Umwelttechnologie. Das Fraunhofer IGB ist eines von 66 Instituten und Forschungseinrichtungen der Fraunhofer-Gesellschaft, Europas führender Organisation für angewandte Forschung.

www.igb.fraunhofer.de

Bleiben Sie mit uns in Verbindung:

