



(19)  
**Bundesrepublik Deutschland**  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 100 43 470 B4 2006.01.19**

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **100 43 470.3**  
 (22) Anmeldetag: **04.09.2000**  
 (43) Offenlegungstag: **28.03.2002**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **19.01.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/02 (2006.01)**  
**G01N 33/53 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**MPB MelTec Patent- und Beteiligungsgesellschaft  
 mbH, 39120 Magdeburg, DE**

(74) Vertreter:  
**Hofstetter, Schurack & Skora, 81541 München**

(72) Erfinder:  
**Schubert, Walter, Dr.med., 39175 Biederitz, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
 gezogene Druckschriften:  
**DE 197 09 348 C2**  
**Datenbank MEDLINE bei STN, AN 1999038414 zu:**  
**Dif-**  
**ferential expression of cytosolic proteins in the**  
**rat kidney cortex and medulla: preliminary prote-**

**omics. WITZMANN, F.A. u.a.,**  
**ELECTROPHORESIS, (1998**  
**Oct)19(14)2491-7 [recherchiert am 16.05.2001];**  
**Datenbank MEDLINE bei STN, AN 2000322579 zu:**  
**Pro-**  
**teomics to study genes and genomes. PANDEY, A.**  
**u.**  
**MANN, M., NATURE, (2000 JUN**  
**15)405(6788)837-46**  
**[recherchiert am 16.05.2001];**  
**MURPHY, R.F. u.a.: Towards a systematics for**  
**protein subcellular location: quantitative descrip-**  
**tion of protein localization patterns and**  
**automated analysis of fluorescence microscope**  
**images. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.**  
**(August 2000) 8, 251-9;**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Proteinen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Proteinen mit einem ersten Verfahrensschritt:  
 a) Ermittlung zellspezifischer topologischer Proteinkombinationsmuster von n Zellen auf Einzelzellniveau, dadurch gekennzeichnet,  
 dass zur Ermittlung eines ersten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters gesunde Zellen verwendet werden und zur Ermittlung eines zweiten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters pathologisch oder physiologisch veränderte Zellen des gleichen Zelltyps verwendet werden oder Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild zur Ermittlung von mindestens einem dritten und einem vierten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters verwendet werden, wobei das Verfahren folgende weitere Verfahrensschritte umfasst:  
 b1) Subtraktion der übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt a) ermittelten ersten und zweiten Proteinkombinationsmuster von gesunden und pathologisch oder physiologisch veränderten Zellen eines Zelltyps und Ermittlung eines einzelnen, aus der Subtraktion der übereinstimmenden Anteile des ersten und zweiten Proteinkombinationsmusters resultierenden zellspezifischen ersten Proteins; oder  
 b2) Subtraktion der nicht-übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt a) ermittelten dritten und vierten Protein-

kombinationsmuster von Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild und Ermittlung eines...

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Proteinen.

**[0002]** Die Identifizierung zellspezifischer Proteinkombinationsmuster ist von zentraler Bedeutung bei der Aufklärung von Zell-Zell-Interaktionen, die unzählige Wirkungen innerhalb eines Organismus nach sich ziehen können. Insbesondere die Kenntnis krankheitsspezifische Zielstrukturen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer und gleichzeitig nebenwirkungsarmer Arzneimittel.

## Stand der Technik

**[0003]** Es ist bekannt, daß Immunzellen (Lymphozyten) spezifische Kombinationen von Proteinen, auch Proteinkombinationsmuster bzw. kurz PKM genannt, exprimieren, die für eine Bindung an Endothelzellen der Blutgefäße von Gehirn und Muskelgewebe verantwortlich sind. Andere Kombinationen von Proteinen führen dagegen nicht zu einer Bindung an diese Endothelzellen. Überraschenderweise sind diese spezifischen Kombinationen interindividuell konstant und weisen immer dieselben Bindungsfunktionen auf. Es scheint sich folglich bei den spezifischen Proteinkombinationsmustern um einen interindividuellen konstanten Lymphozyten Bindungs-Code der Zelloberfläche für organspezifische Endothelzelloberflächen zu handeln, der eine zellspezifische Zielstruktur darstellt. Zellspezifische Zielstrukturen können folglich ganz spezifische Proteinkombinationsmuster aufweisen.

**[0004]** Auch invasive Tumorzellen verfügen über spezifische Proteinkombinationsmuster an ihren Zelloberflächen, die zu einem gezielten, d.h. organselektiven Invasionsverhalten führen. Solche Proteinkombinationsmuster stellen daher Zielstrukturen für mögliche Arzneimittel dar.

**[0005]** Unbedingte Voraussetzung für die Entwicklung solcher hoch-selektiver Arzneimittel ist jedoch die Kenntnis der molekularen Zusammensetzung dieser Zielstrukturen.

**[0006]** Aus dem Stand der Technik sind Verfahren zur Identifizierung von Zielstrukturen bekannt, die auf der Analyse von Gen-Expressionsprofilen von kranken Geweben oder Zellen im Vergleich zu Gen-Expressionsprofilen von gesunden Geweben oder Zellen beruhen, wobei sowohl Proteinexpressionsprofile als auch Expressionsprofile der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Aufschluss über das Auftreten neuer Proteine, fehlregulierter oder abnorm modifizierter Proteine in kranken Geweben oder Zellen geben sollen (z.B. in: F. Lottspeich/H.Zorbas; Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg,

1998).

**[0007]** Diese Verfahren gehen jedoch alle von Zellhomogenaten aus, denen in der Regel Tausende oder Millionen von Zellen zugrunde liegen, da nur mit Hilfe dieser Zellmengen Expressionsprofile der oben genannten Art erstellt werden können. In den Zellhomogenaten liegen die Zellen in aufgeschlossener Form vor, damit die Proteine oder mRNA-Moleküle mit Hilfe biochemischer Verfahren extrahiert und getrennt werden können.

**[0008]** Nachteilig an diesen bekannten Verfahren ist jedoch, daß sie nicht dazu geeignet sind, Proteinkombinationsmuster zu identifizieren, da die einzelnen Proteinkomponenten eines solchen Proteinkombinationsmusters durch die Erzeugung von Zellhomogenaten und durch die darauffolgenden Extraktionsvorgänge vollständig getrennt werden und die wesentliche Information bezüglich ihrer zell- und gewebetopologischen Lage verloren geht. Durch die Zerstörung der Zellkompartimente können weiterhin keine Informationen bezüglich der Kombinationen von Proteinen innerhalb dieser Zellkompartimente und ihre relative topologische Beziehung zueinander gewonnen werden.

**[0009]** Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren ist außerdem, daß keine Analytik auf dem Einzelzellniveau durchführbar ist, so daß Unterschiede der einzelnen Zellen bezüglich ihrer Proteinkombinationsmuster nicht erfassbar sind. Diese Nachteile überwinden die in der DE 197 09 348 C2 und der DE 100 01 685 A1 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung, Identifizierung und Kartierung zellspezifischer Zielstrukturen. Durch diese Verfahren können Proteinkombinationsmuster einzelner Zellen oder Zellmembranen von unterschiedlichen Zell- oder Gewebeproben vergleichend untersucht werden. Dabei können diejenigen Markiermoleküle identifiziert werden, die beispielsweise an ein bestimmtes Proteinkombinationsmuster oder an einen bestimmten Bereich eines solchen Proteinkombinationsmusters eines ersten Objektes binden, das einer ersten Gewebe- oder Zellprobe entstammt, und die gleichzeitig nicht an ein zweites Objekt binden, das einer zweiten Gewebe- oder Zellprobe entstammt. Mit Hilfe dieser identifizierten Markiermoleküle können nun unter Verwendung eines Probenanteils der ersten Gewebe- und/oder Zellprobe diejenigen molekularen Bereiche (Moleküle oder Molekülkomplexe) des Proteinkombinationsmusters aufgefunden bzw. selektiert und anschließend charakterisiert werden, die durch die identifizierten Markiermoleküle gebunden werden. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl die molekulare Zusammensetzung eines Proteinkombinationsmusters, die Anordnung der Moleküle innerhalb des Proteinkombinationsmusters und die Anordnung des Proteinkombinationsmusters innerhalb eines Gewebes oder eine Zelle zu erfassen.

**[0010]** Die so erhaltenen zellspezifischen Proteinkombinationsmuster sind jedoch noch immer hoch-komplex, was die Entwicklung hoch-selektiver Arzneimittel deutlich erschwert.

**[0011]** Auch in einer Veröffentlichung von R. F. Murphy et al. „Toward a systematics for protein subcellular location: quantitative description of protein localization patterns and automated analysis of fluorescence microscope images“ in Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. (August 2000) 8, 251 bis 9 ist eine Analyse von Proteinverteilungsmustern in Fluoreszenzabbildungen beschrieben.

#### Aufgabenstellung

**[0012]** Aufgabe der Erfindung ist es ein Verfahren der oben genannten Art weiterzubilden und bereitzustellen, durch das identifizierte und hoch-komplexe Proteinkombinationsmuster weiter aufbereitet werden und so die Entwicklung hoch-selektiver Arzneimittel erleichtert wird.

**[0013]** Diese Aufgabe wird gelöst durch ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Proteinen, das folgende Schritte umfasst: (a) Ermittlung zellspezifischer Proteinkombinationsmuster von n Zellen; (b) Vergleich der Proteinkombinationsmuster von gesunden und pathologisch oder physiologisch veränderten Zellen eines Zelltyps oder Vergleich der Proteinkombinationsmuster von Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild; (c1) Subtraktion der übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt (b) verglichenen Proteinkombinationsmuster von gesunden und pathologisch oder physiologisch veränderten Zellen eines Zelltyps und Ermittlung eines daraus resultierenden zellspezifischen Proteins; oder (c2) Subtraktion der nicht-übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt (b) verglichenen Proteinkombinationsmuster von Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild und Ermittlung eines daraus resultierenden zellspezifischen Proteins; und (d) molekulare und räumliche Identifizierung des resultierenden zellspezifischen Proteins.

**[0014]** Durch die Reduzierung der hoch-komplexen ermittelten Proteinkombinationsmuster auf ein einzelnes, hoch-selektives und zellspezifisches Protein ist es möglich, die Entwicklung von ebenfalls hoch-selektiven Arzneimittel deutlich zu erleichtern und den Zeitraum für diese Entwicklung signifikant zu verkürzen. So ist es bei der Entwicklung von Arzneimitteln nicht mehr notwendig die hoch-komplexen und ebenfalls zellcharakteristischen Proteinkombinationsmuster zu betrachten.

**[0015]** Erfindungsgemäß ist lediglich eine Selektion einer Substanz zur Hemmung der Aktivität des identifizierten zellspezifischen Proteins notwendig. Diese

Hemmung führt zu einem Zusammenbrechen des zellspezifischen Proteinnetzwerks und damit zu einem Zusammenbrechen der Zellfunktionen. Beispielsweise führt das Ausschalten des zellspezifischen Proteins von Tumorzellen zu einer Hemmung der Migration dieser Zellen, da das hierbei identifizierte Protein das Migrationsverhalten der Tumorzelle steuert und regelt. Die hemmende Substanz kann dabei ein Antikörper sein.

**[0016]** Besondere Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens ergeben sich dann, wenn es sich bei pathologisch veränderten Zellen um invasive Zellen handelt.

**[0017]** Aufgrund der Kenntnis dieser z.B. krankheitsspezifischen Proteine innerhalb eines Proteinkombinationsmusters können zudem hoch-spezifische Arzneimittel entwickelt werden, die aufgrund eben dieser Spezifität nahezu nebenwirkungsfrei sind.

**[0018]** Die erfindungsgemäß aufzuarbeitenden zellspezifischen Proteinkombinationsmuster werden mit Hilfe der in der DE 197 09 348 C2 und der DE 100 01 685 A1 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung, Identifizierung und Kartierung zellspezifischer Zielstrukturen ermittelt.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen Proteinen mit einem ersten Verfahrensschritt: a) Ermittlung zellspezifischer topologischer Proteinkombinationsmuster von n Zellen auf Einzelzellniveau, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Ermittlung eines ersten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters gesunde Zellen verwendet werden und zur Ermittlung eines zweiten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters pathologisch oder physiologisch veränderte Zellen des gleichen Zelltyps verwendet werden oder Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild zur Ermittlung von mindestens einem dritten und einem vierten zellspezifischen Proteinkombinationsmusters verwendet werden, wobei das Verfahren folgende weitere Verfahrensschritte umfasst: b1) Subtraktion der übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt a) ermittelten ersten und zweiten Proteinkombinationsmuster von gesunden und pathologisch oder physiologisch veränderten Zellen eines Zelltyps und Ermittlung eines einzelnen, aus der Subtraktion der übereinstimmenden Anteile des ersten und zweiten Proteinkombinationsmusters resultierenden zellspezifischen ersten Proteins; oder b2) Subtraktion der nicht-übereinstimmenden Anteile der in Verfahrensschritt a) ermittelten dritten und vierten Proteinkombinationsmuster von Zellen unterschiedlichen Zelltyps mit gleichem Krankheitsbild

und Ermittlung eines einzelnen, aus der Subtraktion der nicht-übereinstimmenden Anteile des dritten und vierten Proteinkombinationsmusters resultierenden zellspezifischen zweiten Proteins; und  
c) molekulare und räumliche Identifizierung des resultierenden zellspezifischen ersten oder zweiten Proteins.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die Selektion einer Substanz zur Hemmung der Aktivität des identifizierten zellspezifischen ersten und zweiten Proteins umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die Selektion eines Antikörpers zur Hemmung der Aktivität des identifizierten zellspezifischen ersten und zweiten Proteins umfasst.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei pathologisch veränderten Zellen um invasive Zellen handelt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen