

## **DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

International application number:	<b>PCT/EP2018/067397</b>
International filing date:	<b>28 June 2018 (28.06.2018)</b>
Document type:	<b>Certified copy of priority document</b>
Document details:	Country/Office: <b>EP</b>
	Number: <b>17178817.7</b>
	Filing date: <b>29 June 2017 (29.06.2017)</b>
Date of receipt at the International Bureau:	<b>06 July 2018 (06.07.2018)</b>

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten  
Unterlagen stimmen mit der  
als ursprünglich eingereicht  
geltenden Fassung der auf  
dem nächsten Blatt  
bezeichneten europäischen  
Patentanmeldung überein.

The attached documents are  
exact copies of the text in  
which the European patent  
application described on the  
following page is deemed to  
have been filed.

Les documents joints à la  
présente attestation sont  
conformes au texte,  
considéré comme  
initialement déposé, de la  
demande de brevet  
européen qui est spécifiée à  
la page suivante.

Patentanmeldung Nr.

Patent application No.

Demande de brevet n°

17178817.7 / EP17178817

The organisation code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is EP17178817.

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.



V. Joseph

---

Anmeldung Nr:  
Application no.: 17178817.7  
Demande no :

Anmeldetag:  
Date of filing: 29.06.17  
Date de dépôt :

Anmelder / Applicant(s) / Demandeur(s):

Kulik, Andrea  
Forst-Kasten-Allee 131  
81475 München/DE

Esser, Knud  
Stammheimer Ring 33  
51061 Köln/DE

Bezeichnung der Erfindung / Title of the invention / Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, oder falls die Anmeldung in einer Nicht-Amtssprache des EPA eingereicht wurde, siehe Beschreibung bezüglich ursprünglicher Bezeichnung.  
If no title is shown, or if the application has been filed in a non-EPO language, please refer to the description for the original title.  
Si aucun titre n'est indiqué, ou si la demande a été déposée dans une langue autre qu'une langue officielle de l'OEB, se référer à la description pour le titre original.)

Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, die in un- oder dedifferenzierten Zellen, insbesondere in soliden Tumoren eine (Re-)Differenzierung induzieren

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(Priorities) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen / State/Date/File no. / Pays/Date/Numéro de dépôt:

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten / Contracting States designated at date of filing / Etats contractants désignés lors du dépôt:

AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL  
PT RO RS SE SI SK SM TR

Unser Zeichen: 170596EP EBO/ko

29.06.2017

**Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, die in un- oder dedifferenzierten Zellen, insbesondere in soliden Tumoren eine (Re-)Differenzierung induzieren.**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zelle, wie beispielsweise einer Tumorzelle, induziert sowie die Verwendung zweier gegensätzlicher metabolischer Marker zur Identifizierung eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zelle induziert. Unbeziehungsweise dedifferenzierte Zellen stellen besonders bei Tumorerkrankungen ein wichtiges pathophysiologisches Charakteristikum dar.

Maligne Tumorerkrankungen stellen weltweit ein großes Gesundheitsproblem dar und sind in den Industrieländern nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die häufigste Todesursache. Allein innerhalb Deutschlands erkranken gemäß den Angaben der Deutschen Krebsgesellschaft jedes Jahr etwa 500.000 Menschen neu an Krebs. Da die meisten Krebserkrankungen mit zunehmendem Alter auftreten, ist im Zuge des demographischen Wandels zukünftig eine weitere Zunahme an Inzidenzen zu erwarten. Experten schätzen, dass die Zahl der Krebserkrankungen bis zum Jahr 2050 um 30 Prozent zunehmen wird. Trotz intensiver Forschungsbemühungen und neuer molekularbiologischer Erkenntnisse in den letzten Jahren hat sich die Prognose vieler maligner Tumore nur unwesentlich verbessert. Aufgrund des hohen medizinischen Bedarfes an erfolgreichen Behandlungsmöglichkeiten bis heute unzureichend therapierbarer Tumorerkrankungen ist der Bedarf an neuen Wirkstoffen weiterhin sehr groß. In der Mehrheit der Fälle empfehlen die

aktuellen Leitlinien die Durchführung einer Chemotherapie, die nicht zielgerichtet den Tumor bekämpft und mit vielen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden ist.

Das Ziel moderner onkologischer Wirkstoffe ist eine geringe Toxizität bei hoher Spezifität und Anti-Tumorwirkung. Eine Klasse solcher Onkologika stellen differenzierungsinduzierende Wirkstoffe dar, welche heute erfolgreich in speziellen Fällen der akuten Leukämie eingesetzt werden. In soliden Tumoren sind jedoch die Mechanismen, die zu einem Block der (Re-)Differenzierung führen, bis heute nur sehr wenig verstanden. Neue molekularbiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Tumorentitäten aufgrund ihres epigenetischen Expressionsmusters in stärker und geringer differenzierte Tumore unterteilt werden können, wobei erstere eine deutlich bessere Prognose besitzen. Da im Gegensatz zu genetischen Mutationen epigenetische Veränderungen reversibel sind, ist es wahrscheinlich, dass spezifische differenzierungsinduzierende Substanzen auch in soliden Tumoren die aktuelle Therapie wesentlich verbessern werden. In diesem Zusammenhang sind besonders Untersuchungen interessant die darauf hinweisen, dass differenzierungsinduzierende Substanzen auch eine Tumorsubpopulation mit hoher Tumorigenität, sogenannte Tumorstammzellen, in weniger aggressive differenziertere Tumorzellen entwickeln können. In Figur 1 ist schematisch die Entstehung und Tumorigenität von Tumorstammzellen gezeigt. Diese sogenannten Tumorstammzellen, also Tumorzellen mit einem hohen Stammzellcharakter, bestimmen wahrscheinlich wesentlich die Malignität eines Tumors. Ihre Entstehung (obere Pfeile) ist bis heute nicht ausreichend verstanden und möglicherweise sehr heterogen. So werden sie zum einen als „Cell of origin“ in Tumorgenese-Modellen diskutiert, also der Zelle, aus der sich der Tumor mit seinen heterogenen Zellformen entwickelt. Zum anderen wird auch ihre Entstehung aus Tumorzellen mit geringem Stammzellcharakter angenommen, was möglicherweise besonders unter zytotoxischer Chemotherapie verstärkt auftritt und hier wahrscheinlich wesentlich den Erfolg der Therapie bestimmt. Bekannt ist, dass differenzierungsinduzierende

Wirkstoffe den Stammzellcharakter einer Tumorstammzelle reduzieren und in weniger maligne differenziertere Tumorzellen entwickeln können (untere Pfeile). Ein geringerer Stammzellcharakter von Tumorzellen ist mit geringerer Therapieresistenz und vermindertem Rückfallrisiko nach Therapie assoziiert.

Erste Studien mit bekannten Wirkstoffen, die im breiten Umfang das zelluläre Expressionsmuster verändern (wie beispielsweise Histondeacetylase-Inhibitoren) deuten darauf hin, dass die Verwendung epigenetisch-wirksamer Substanzen auch bei soliden Tumoren wie dem Brustdrüsen- und Lungenkarzinom ein bedeutendes Potential in der Verbesserung heutiger Behandlungsformen hat. Allerdings findet man, auch aufgrund der kaum verstandenen Pathophysiologie, bis heute noch keine Onkologika auf dem Markt, die spezifisch für die Therapie von soliden Tumoren mit differenzierungsinduzierender Wirkung entwickelt wurden. Insbesondere fehlen Wirkstoffe, die spezifisch pathophysiologische Mechanismen adressieren, die in soliden Tumorzelle zum Block der Differenzierung führen.

Aktuelle Hochdurchsatz-Testverfahren, die im Bereich der Leukämie oder dem Neuroblastom zur Identifizierung (re-)differenzierender Wirkstoffe entwickelt wurden, adressieren das Expressionsprofil einzelner Gene, die in differenzierten Zellen als hoch exprimiert beschrieben sind. Aufgrund der hohen Heterogenität der Genexpressionsmuster in soliden Tumoren ist dieses Verfahren jedoch mit einer geringen Spezifität und hohen Rate an falsch positiven Ergebnissen verbunden. Um diesen Faktor zu verringern, erfordern diese Systeme die parallele Analyse einer größeren Anzahl an Genen, was eine effiziente und breite Anwendung in Hochdurchsatztestungen verhindert. Alternativ finden Testverfahren Anwendung, die über Hochdurchsatz-Mikroskopie die Morphologieänderungen der Zellen analysieren. Diese Methoden sind jedoch sehr komplex und kostenintensiv und erfordern zur Analyse der enormen Datenmenge einen sehr hohen logistischen Aufwand und hohe Computerleistungen. Auch diese Systeme sind daher für eine effektive und breite Hochdurchsatzanwendung wenig geeignet.

Es besteht nun Bedarf an einem Verfahren zum Identifizieren von Mitteln, die die Differenzierung einer Tumorzelle induziert beziehungsweise tumorspezifisch den Differenzierungsblock aufhebt, wobei ein entsprechendes Testverfahren eine hohe Spezifität aufweisen soll. Gleichzeitig soll die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse möglichst gering sein. Zudem soll das Testverfahren im Hochdurchsatz möglich sein, das heißt, es sollen in kurzer Zeit möglichst viele unterschiedliche Mittel untersucht werden können. Dabei ist ein relevanter Faktor auch die Kostenfrage. Das Verfahren soll möglichst kostengünstig sein.

Überraschenderweise hat sich nun gezeigt, dass Mittel, welche die (Re-)Differenzierung einer Tumorzelle induzieren, aufgrund der Quantifizierung zweier unterschiedlicher metabolischer Marker ermöglicht werden kann. Je nach Tumorgenesemodell spricht man von Redifferenzierung (klonales Evolutionsmodell) oder von Differenzierung (Tumorstammzellmodell). Erfindungsgemäß sind unabhängig von dieser Terminologie solche Mittel umfasst, die die Umwandlung, wie in Figur 1 dargestellt, einer Tumor(-stamm)zelle zu einer weniger malignen (differenzierteren) Tumorzelle oder Zelle induzieren können.

In einer ersten Ausführungsform wird die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe daher gelöst durch ein Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zellen, insbesondere einer Tumorzelle induziert, umfassend:

- a) in Kontakt bringen des zu untersuchenden Mittels mit einer Zellkulturprobe umfassend de- beziehungsweise undifferenzierte Tumorzellen,
- b) anschließend Bestimmung der relativen Konzentration eines ersten metabolischen Markers gegenüber unbehandelten Zellen, und
- c) anschließend Bestimmung der relativen Konzentration eines zweiten metabolischen Markers gegenüber unbehandelten Zellen,

wobei gegebenenfalls die Reihenfolge der Schritte b) und c) ausgetauscht wird.

Erfindungsgemäß umfassen Tumorzellen auch sogenannte Tumorstammzellen. Unbehandelte Zellen bedeutet, dass die Zellen nicht mit dem zu untersuchenden Mittel behandelt wurden, also nicht mit diesem in Kontakt gekommen sind. Bei der bekannten Genexpression ist zu beachten, dass aufgrund der sehr hohen epigenetischen Heterogenität von soliden Tumoren einzelne ausgewählte Gene nur unzureichend eine (Re-)Differenzierung von untersuchten Tumorentitäten definieren. Metabolische Prozesse, die verstärkt oder vermindert bei differenzierten Zellen vorzufinden sind, sind in den differenzierten Tumorzellen weniger heterogen verändert. Es hat sich nun gezeigt, dass bei einer Umstellung in Richtung des Metabolismus differenzierter Zellen in einem Hochdurchsatzverfahren somit spezifischer und mit weniger falsch-positiven Ergebnissen die (Re-)Differenzierung einer entarteten Tumorzelle angezeigt werden kann.

Die vorliegende Erfindung zeigt nun erstmals, dass die kombinierte Quantifizierung zweier unterschiedlicher Stoffwechsellmarker (metabolischer Marker) in einem zellbasierten Hochdurchsatz-Testverfahren für die gezielte Identifizierung (re-)differenzierende Wirkstoffe in soliden Tumoren verwendet werden kann. Das erfindungsgemäße Testverfahren ermöglicht dabei die Implementierung unterschiedlichster Zielstrukturen, was für die Entwicklung innovativer Wirkstoffe einen wichtigen technologischen Vorsprung darstellt.

Erster und zweiter metabolischer Marker (erster und zweiter Stoffwechsellmarker) sind dabei voneinander verschieden. Bevorzugt handelt es sich hierbei um gegensätzliche metabolische Marker. Besonders bevorzugt ist der erste metabolische Marker ein kataboler Stoffwechsellmarker und der zweite metabolische Marker ein anaboler Stoffwechsellmarker. Dies ermöglicht eine Normalisierung des anabolen Stoffwechsellmarkers auf den katabolen Stoffwechsel einer Zelle, wodurch in einem Mikrotiterplattenmessgerät-



basierten Testverfahren falsch positive Ergebnisse verhindert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass bei der Erniedrigung zweier kataboler Marker, wie man es bei einer (Re-)Differenzierung erwarten würde, nicht (Re-)Differenzierung sondern rein antiproliferative Prozesse ursächlich sind, da hierbei der anabole Marker nicht erhöht wäre. Umgekehrt kann die Gesamterhöhung zweier anaboler Marker auch durch eine aufgrund von verstärkter Proliferation erhöhten Gesamtzellzahl verursacht werden, ohne dass der anabole Marker in einer einzelnen Zelle tatsächlich erhöht ist. Dies wird durch die Detektion einer Erniedrigung des katabolen Markers verhindert.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren und hier in der bevorzugten Ausführungsform werden zum ersten Mal ein kataboler Stoffwechsellmarker und einer anaboler Stoffwechsellmarker, und damit zwei gegensätzliche metabolische Marker, für die Identifizierung (re-)differenzierungsinduzierender Wirkstoffe in einem Hochdurchsatztestformat verwendet. Hierbei kann das Testverfahren auch auf andere Erkrankungen als Tumore erweitert werden, in deren Pathophysiologie Hinweise für eine wichtige Rolle der zellulären Dedifferenzierung beziehungsweise einem Block der Differenzierung vorliegen. Zu nennen sind hier zum Beispiel chronische Entzündungserkrankungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Hepatitiden inklusive NASH (Non-alcoholic steatohepatitis). Weitere Beispiele sind degenerative Erkrankungen wie zum Beispiel Arthrose, diverse Myopathien oder Morbus Alzheimer und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sowie diverse Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Amyloidose oder Lipidose.

Neben der Untersuchung pathophysiologischer Prozesse kann das System auch zur Untersuchung physiologischer Differenzierung von gesunden Stammzellen eingesetzt werden. Hierbei können mittels des Testsystems und der Verwendung gesunder Stammzellen Wirkstoffe identifiziert werden, welche gezielt die physiologische Differenzierung in gesunden Gewebe induzieren, beispielsweise in der Neonatologie bei der Behandlung des IRDS (engl.: infant respiratory distress syndrom; dt.: Surfactant- Mangelsyndrom). Darüber

hinaus kann über die Verwendung von gesunden Stammzellen in dem Testverfahren die Charakterisierung einer krankheitsspezifischen Wirkung eines Wirkstoffes im Sinne einer spezifischen Aufhebung eines pathologischen Differenzierungsblockes erreicht werden, indem die Differenzierungsinduktion eines Wirkstoffes in gesunden Stammzellen ausgeschlossen werden kann.

Entsprechend können Wirkstoffe, die mittels des vorgestellten Testverfahrens identifiziert werden und in soliden Tumoren eine (Re-)Differenzierung induzieren, auch in den genannten weiteren Anwendungsgebieten auf ein therapeutisches Potential hin untersucht werden.

Katabole und anabole Reaktionen laufen in einer Zelle nicht in die gleiche Richtung ab. Während Katabolismus den Abbau von Stoffwechselprodukten von komplexen zu einfachen Molekülen bezeichnet, beschreibt der Anabolismus den Aufbau von Stoffen. Beide, Katabolismus und Anabolismus sind Teile des Metabolismus.

Während der physiologischen Differenzierung von Stammzellen findet eine Verminderung der anaeroben Glykolyse und Zunahme der oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung der Zelle statt. Dies ist Bestandteil des Katabolismus. Insbesondere unter aeroben Bedingungen überwiegt dann bei der differenzierten Zelle die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung. Bei der überwiegenden Anzahl von Tumorzellen ist auch unter aeroben Bedingungen eine erhöhte anaerobe Glykolyse beschrieben.

Erstmals wird nun im erfindungsgemäßen Verfahren eine Verminderung der anaeroben Glykolyse unter aeroben Bedingungen als ein metabolischer Indikator für die (Re-)Differenzierung von soliden Tumorzellen in einem Hochdurchsatztestsystem verwendet.

Beispielhaft kann als kataboler Stoffwechselmarker Laktat genannt werden. Dies ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform auch der bevorzugte

katabole Stoffwechselmarker. Die Laktatkonzentration ermöglicht die Quantifizierung der anaeroben Glykolyse. Die Entstehung von Laktat kann durch eine Änderung des pH-Wertes nachgewiesen werden, so dass die Bestimmung der Konzentration hier indirekt mit Hilfe eines Indikators erfolgen kann.

Alternative aber ebenfalls bevorzugt kann Laktat-Dehydrogenase (LDH) als kataboler Stoffwechselmarker analysiert werden. Die Aktivität von LDH korreliert ebenfalls mit der anaeroben Glykolyse.

Es hat sich zudem überraschenderweise gezeigt, dass die Einlagerung von Neutral-Lipiden unter aeroben und anabolen Zellkulturbedingungen als anaboler Stoffwechselmarker geeignet ist, die (Re-)Differenzierung von soliden Tumorzellen nachzuweisen. Der Nachweis kann mit geeigneten fluoreszierenden Liganden erfolgen. Geeignet ist hier beispielsweise der kommerziell erhältliche Ligand BODIPY<sup>®</sup> 493/503, dessen unpolare Struktur spezifisch an neutrale Lipide bindet. Insbesondere in serumfreiem Medium ist die Signifikanz besonders deutlich, so dass das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt im serumfreien Medium erfolgt.

Besonders bevorzugt wird das Verfahren in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Entsprechende Mikrotiterplatten ermöglichen ein Hochdurchsatzverfahren. So kann beispielsweise in einer 384 Well-Mikrotiterplatte gleichzeitig gearbeitet werden, so dass innerhalb kurzer Zeit 384 Proben analysiert werden können.

Je nach Bedarf können hier selbstverständlich auch Mikrotiterplatten anderer Größe verwendet werden. Limitiert wird die Größe der Mikrotiterplatten durch die Möglichkeit der Analyse der Konzentration des ersten und zweiten metabolischen Markers. Soweit dieses mittels optischer Spektroskopie erfolgt, welche in einem kurzen Zeitraum möglich ist, sind hier Hochdurchsatzverfahren möglich, die rascher eine Identifizierung eines Mittels ermöglichen. Ebenso können unterschiedliche Zellkulturproben bezüglich eines

Mittels untersucht werden, wobei die Zellkulturproben zum Beispiel unterschiedliche Tumorzellen aufweisen. Entsprechend ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur die Identifizierung eines Mittels, sondern die Überprüfung bekannter Mittel für zum Beispiel eine Tumorart bezüglich der Wirksamkeit auf weitere Tumorarten.

Bevorzugt ist die Mikrotiterplatte während des erfindungsgemäßen Verfahrens, vorzugsweise mit einer gasdurchlässigen Folie, verschlossen. Dies verhindert das Eindringen von Verunreinigungen in flüssiger oder fester oder gasförmiger Art in den einzelnen Proben und ermöglicht einen gleichmäßigen Gasaustausch über Diffusion.

Bevorzugt wird das Entfernen des serumhaltigen beziehungsweise serumfreien Mediums aus den einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte vor Zugabe der Mittel beziehungsweise vor Zugabe der fluoreszierenden Liganden nicht wie üblich durch Absaugen sondern mittels kurzzeitiger Zentrifugation durchgeführt. So kann nach 5 Sekunden Zentrifugation ohne Waschschriffe das neue Medium zugegeben werden, wobei keine Mediumreste in den Wells zurückbleiben oder Vitalitätsverluste der Zellen/Zelllinien beobachtet werden. Die effiziente Mediumabnahme und Vermeidung von Waschschriffen erhöhen wesentlich die Robustheit des zellbasierten Testverfahrens. Die Abnahme von Überständen in Testverfahren über Zentrifugation anstatt Absaugevorrichtungen führt auch in Verfahren wie zum Beispiel ELISA-basierten Systemen zu einer Vermeidung von Waschschriffen und hiermit verbundenen Artefakten.

Es hat sich zudem gezeigt, dass aufgrund der mangelnden Adhärenz toter Epithelzellen in dem Testverfahren ein neuartiger Toxizitätstest integriert wird, da die toten Zellen bei der Zentrifugation mitentfernt werden und die Verringerung der Adhärenz somit als neuartiges Vitalitätskriterium in einem Testverfahren für adhärenente Zellen verwendet werden kann. Ein Fluoreszenz- oder Absorptionssignal nach Zentrifugation mit beziehungsweise in der Nähe der Intensität des Hintergrundsignals zeigt dabei eine Toxizität eines Stoffes

an, da keine beziehungsweise nur noch wenige vitale adhärenente Zellen als Quelle eines Fluoreszenzsignals vorhanden sind. Ein sich an den Primärttest anschließender Toxizitätstest ist somit nicht mehr erforderlich und vitale Zellen stehen für weitere Testreihen direkt zur Verfügung.

In einer weiteren Ausführungsform wird die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch die Verwendung zweier gegensätzlicher metabolischer Marker zur Identifizierung eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer Tumorzelle induziert.

Die zwei Marker sind vorzugsweise ein kataboler Marker und ein anaboler Marker. Bezüglich der Detektion der Marker wird auf das erfindungsgemäße Verfahren verwiesen.

Im nachfolgenden Ausführungsbeispiel wird die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe in nicht limitierender Weise weiter beschrieben.

Ausführungsbeispiel:

In einer 384-Well-Mikrotiterplatte wurden Zellen (Zelllinien: A549 und MDA-MB-231) mit definierter Dichte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert, um eine gleichmäßige Konfluenz zu erzeugen. Im Anschluss daran erfolgte ein Mediumwechsel mittels Zentrifugation und die Zugabe des zu testenden Mittels, wobei Na-Butyrat (bei A549 zusätzlich Dexamethason) als Mittel eingesetzt wurde. Die differenzierungsinduzierende Wirkung von Na-Butyrat (inklusive Dexamethason bei A549) ist bekannt.

Eventuell ist es für einige Zelllinien notwendig, nach der 24 stündigen Anwuchsphase eine weitere Kultivierung gegebenenfalls in serumfreien Medium vorzunehmen. Erst danach erfolgt die Zugabe des zu untersuchenden Mittels. Dessen Inkubationszeit ist wiederum dem zu untersuchenden Tumormodell anzupassen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit mit dem zu untersuchenden Mittel von etwa 48 h bis 168 h Stunden (je nach Zelllinie) wurde zunächst die Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierfür wurde Phenolrot als Indikator eingesetzt und die pH-Wertänderung der Proben und darüber die Änderung der Laktatkonzentration bestimmt. Hierfür wurde die Mikrotiterplatte durch die konfluente Zellschicht hindurch analysiert.

Im Anschluss daran erfolgte erneut ein Mediumwechsel mittels Zentrifugation. Dabei war es notwendig, das Medium vollständig zu wechseln, um die anschließende Messung des anabolen Stoffwechsellmarkers nicht zu verfälschen.

Nachdem das Medium vollständig ausgetauscht wurde erfolgte die Zugabe des fluoreszierenden Liganden BODIPY<sup>®</sup> 493/503. Anschließend erfolgte mittels

Fluoreszenzmessung die Bestimmung der Konzentration des anabolen Stoffwechselmarkers.

Bei einer (re-)differenzierungsinduzierenden Substanz wird der erste Marker erniedrigt und der zweite Marker erhöht. In einer Umrechnung mit einer positivierten Darstellung der Erniedrigung des ersten Markers (beispielhaft der Laktat erniedrigung) kann eine Erhöhung beider Marker-Werte analysiert werden. Bezogen auf Mittelwerte einer unbehandelten Zelle können so unterschiedliche Mittel hinsichtlich ihrer (re-)differenzierungsinduzierenden Eigenschaft untersucht, analysiert und bewertet werden.

### **Patentansprüche:**

1. Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zellen, insbesondere einer Tumorzelle induziert, umfassend:
  - a) in Kontakt bringen des zu untersuchenden Mittels mit einer Zellkulturprobe umfassend de- beziehungsweise undifferenzierte Tumorzellen,
  - b) anschließend Bestimmung der relativen Konzentration eines ersten metabolischen Markers gegenüber unbehandelten Zellen, und
  - c) anschließend Bestimmung der relativen Konzentration eines zweiten metabolischen Markers gegenüber unbehandelten Zellen, wobei gegebenenfalls die Reihenfolge der Schritte b) und c) ausgetauscht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und zweite metabolische Marker zueinander gegensätzliche metabolische Marker sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der erste metabolische Marker gemäß Schrittes b) ein kataboler Stoffwechsellmarker und der zweite metabolische Marker gemäß Schrittes c) ein anaboler Stoffwechsellmarker ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die qualitative Bestimmung des ersten und/oder des zweiten metabolischen Markers direkt oder indirekt, insbesondere mittels optischer Spektroskopie erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung mittels Indikatoren und/oder Liganden, insbesondere fluoreszierenden Liganden, erfolgt.



6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das in Kontakt bringen in Schritt a) in einem serumfreien Medium erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrotiterplatte, vorzugsweise mit einer gasdurchlässigen Folie, verschlossen ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es vor und/oder während und/oder zwischen den Schritten a), b) und c) einen Mediumwechsel umfasst, wobei der Mediumwechsel insbesondere mittels Zentrifugation erfolgt.
10. Verwendung zweier gegensätzlicher metabolischer Marker zur Identifizierung eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zellen, insbesondere einer Tumorzelle induziert.
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die gegensätzlichen Marker ein kataboler Marker und ein anaboler Marker sind.
12. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Bestimmung der Verringerung der Adhärenz der Zellen, wodurch die Toxizität des Mittels untersucht werden kann.

**Zusammenfassung:**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zelle, wie beispielsweise einer Tumorzelle, induziert sowie die Verwendung zweier gegensätzlicher metabolischer Marker zur Identifizierung eines Mittels, das die (Re-)Differenzierung einer un- oder dedifferenzierten Zelle induziert. Unbeziehungsweise dedifferenzierte Zellen stellen besonders bei Tumorerkrankungen ein wichtiges pathophysiologisches Charakteristikum dar.

Figur 1

