



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 238 725 A5

 4(51) A 61 K 45/00
 A 61 K 45/02
 A 61 K 37/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP A 61 K / 277 633 5

(22) 21.06.85

(44) 03.09.86

(31) P3423234.6

(32) 23.06.84

(33) DE

(71) siehe (73)

(72) Adolf, Günther, Dr., AT

(73) Boehringer Ingelheim IGmbH, 6507 Ingelheim am Rhein, DE

(54) Verfahren zur Herstellung einer synergistischen Mischung von Interferonen und Tumor-Nekrose-Faktor

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung binärer Mischungen eines Interferons vom Typ alpha, beta oder gamma mit Tumor-Nekrose-Faktor, und ternäre Mischungen eines Interferons vom Typ alpha oder beta mit einem Interferon des Typs gamma und Tumor-Nekrose-Faktor. Die Mischungen zeigen jeweils höhere cytostatische und/oder cytotoxische Wirkung auf transformierte Zellen, als auf Grund der Aktivität der einzelnen Komponenten zu erwarten gewesen wäre.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung einer synergistischen Mischung, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Tumor-Nekrose-Faktor, ein Interferon des Typs I und des Typs II mischt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bestandteile zu mindestens 90% frei von Verunreinigungen sind.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Tumor-Nekrose-Faktor, Interferon-alpha und Interferongamma mischt.
4. Verfahren nach einem der Punkte 1, 2 oder 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Humanen-Tumor-Nekrose-Faktor und Human-Interferone mischt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Tumor-Nekrose-Faktor und/oder die Interferone gentechnologisch hergestellt werden.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung binärer Mischungen, die in der Therapie neoplastischer Erkrankungen eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Mehrere in höheren Organismen natürlich vorkommende Proteine sind in der Lage, die Proliferation von Tumorzellen in vitro und in vivo zu hemmen. Dazu gehören unter anderem Interferone, Lymphotoxine und Tumor-Nekrose-Faktoren. Interferone werden gegenwärtig in drei Klassen eingeteilt, die sich in ihren biologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden. Alpha-Interferone (IFN- α) umfassen im Menschen und einer Reihe von anderen bisher untersuchten Säugetieren eine Familie von untereinander in Aminosäuresequenz und Eigenschaften sehr ähnlichen Proteinen. Beta-Interferone (IFN- β) werden im Menschen sowie in den meisten anderen untersuchten Säugetierspezies durch ein einziges Protein repräsentiert; in Rindern sind jedoch mehrere IFN- β Subtypen vorhanden.

Humanes IFN- β zeigt partielle Sequenzhomologie zu humanem IFN- α , ist wie dieses relativ säurestabil und scheint an den selben Membranrezeptor zu binden, kann jedoch zum Beispiel serologisch sowie durch sein Aktivitätsspektrum auf heterologen Zellen von IFN- α unterschieden werden. Gamma-Interferon (IFN- γ), das im Menschen wie in allen anderen bisher untersuchten Spezies durch lediglich ein Gen kodiert wird, ist in seiner Aminosäuresequenz mit IFN- α und IFN- β nicht oder nur sehr entfernt verwandt, ist säurelabil und unterscheidet sich auch in anderen Eigenschaften deutlich von IFN- α und IFN- β .

In der Literatur werden daher IFN- α und IFN- β gelegentlich als Typ-I Interferone, IFN- γ als Typ-II Interferon bezeichnet. Alle Interferone zeigen antivirale Aktivität und haben eine Reihe von immunmodulatorischen Wirkungen. Typ-I- und Typ-II Interferon-Mischungen zeigen in verschiedenen Systemen synergistische Wirkung.

In den letzten Jahren konnten durch die Fortentwicklung molekularbiologischer Arbeitsmethoden alle Klassen von menschlichen Interferonen kloniert und in Mikroorganismen produziert werden. Dadurch konnten erstmals hinreichend große Mengen von bis zur Homogenität gereinigten Interferonen hergestellt und für klinische Prüfungen zur Verfügung gestellt werden. Die bisher vorliegenden Berichte über klinische Studien zeigen jedoch, daß bei einer Reihe von malignen Erkrankungen keine oder nur unbefriedigende Therapieerfolge zu verzeichnen sind.

Ferner wurde beobachtet, daß eine Verbesserung des Therapieerfolges durch Erhöhung der applizierten IFN-Dosis auf Grund von untolerierbaren Nebenwirkungen oft nicht möglich ist. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) wurde ursprünglich als ein in *Bacillus Calmette-Guérin* sensitivierten Versuchstieren durch Endotoxin-Behandlung induzierbares Protein beschrieben. Diese Substanz zeigt in vitro sytostatische und/oder cytotoxische Effekte auf eine Reihe von Tumorzelllinien und bewirkt in Tiermodellen eine hämorrhagische Nekrose gewisser transplantierbarer Tumoren.

Vor kurzem wurde berichtet, daß humane B-lymphoblastoide Zelllinien spontan ein Protein produzieren, das nach verschiedenen Kriterien als Humaner-Tumor-Nekrose-Faktor (Hu-TNF) zu bezeichnen ist.

Partiell gereinigte Kulturüberstände dieser Zellen zeigten synergistische antiproliferative Wirkung mit humanem Interferon- α oder Interferon- γ . Wie aus der Literatur bekannt ist, produzieren diese Zellen jedoch nicht nur TNF, sondern geben auch eine Reihe anderer Lymphokine ins Medium ab, darunter IFN- α , Makrophagen-Aktivierungsfaktor, Migration Inhibitory Factor und Skin Reactive Factor. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß eines oder mehrere dieser Proteine oder auch andere, bisher nicht charakterisierte Faktoren an den Effekten beteiligt sind.

Ziel der Erfindung

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die Auswirkung von hochgereinigtem Hu-TNF in einer Mischung mit Interferonen zu untersuchen.

Ziel der Erfindung

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die Auswirkung von hochgereinigtem Hu-TNF in einer Mischung mit Interferonen zu untersuchen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Mischungen für die Therapie neoplastischer Erkrankungen des Menschen bereitzustellen. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß bei der Herstellung von Mischungen eines Interferons vom Typ α , β oder γ mit Tumor-Nekrose-Faktor eine synergistische Wirkung erreicht wird.

Erst vor kurzem konnte ein neues Verfahren entwickelt werden, das die Herstellung von Tu-TNF aus Zellen einer permanenten B-lymphoblastoiden Linie in einer Reinheit von mehr als 90% erlaubt. Dazu wird die humane B-lymphoblastoide Zelllinie RPMI-1788/EBI, hinterlegt bei der CNCM Paris unter der Hinterlegungsnummer I-305 am 23. Mai 1984, in einem geeigneten, serumhaltigen Medium kultiviert, nach anfänglicher Proliferation in serumfreies Medium überführt und mit einem geeigneten Tumorpromotor, beispielsweise Mezelein stimuliert. Um die geforderte hohe Reinheit zu erzielen, wird der Hu-TNF durch porenkontrolliertes Glas (CPG), durch Anionenaustausch- und Lectin-Affinitätschromatographie gereinigt.

Dabei können aus einem Liter Zellkultur etwa 0,1 bis 0,2 mg gereinigter Hu-TNF erhalten werden, so daß erstmals eine genaue Charakterisierung der biologischen Eigenschaften dieses Proteins möglich wurde, und dessen Auswirkungen in einer Mischung mit Interferonen untersucht werden konnten.

Die antiproliferative (cytostatische/cytotoxische) Wirkung der zu untersuchenden Substanzen wurde wie folgt bestimmt: Transformierte Zellen humanen und murinen Ursprungs wurden in Gegenwart von Typ-I-IFN oder Typ-II-IFN der jeweiligen Spezies, von Hu-TNF sowie von Kombinationen dieser Substanzen gezüchtet. Nach fünf bis sechs Tagen wurden die Zellzahlen in den Kulturen bestimmt und mit der Zellzahl unbehandelter Kontrollkulturen verglichen.

Dabei zeigte sich, daß eine Kombination von hochgereinigtem Hu-TNF mit Typ-I-IFN oder Typ-II-IFN eine höhere cytostatische und/oder cytotoxische Wirkung aufweist als aus der Addition der Wirkung der Einzelkomponenten zu erwarten gewesen wäre. Überraschend wurde außerdem festgestellt, daß eine Mischung aller drei Substanzen eine höhere cytostatische und/oder cytotoxische Wirkung haben kann, als dies auf Grund der Wirkung der drei binären Mischungen vorausgesehen werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, daß mit den beschriebenen Mischungen in vitro „therapeutische“ Effekte erzielt werden können, die sonst nur mit extrem hohen, untolerierbaren Dosen der Einzelkomponenten erreichbar sind. Darüber hinaus können mit den Mischungen Wirkungen erzielt werden, die selbst mit hohen Dosen der Einzelkomponenten nicht erzielbar sind.

Diese synergistischen Wirkungen wurden mit hochgereinigten Human-Interferonen (Reinheit $\geq 98\%$), die in bekannter Weise aus genmanipulierten Bakterien gewonnen worden waren, mit hochgereinigtem Maus-Interferon- γ aus genmanipulierten Bakterien (Reinheit $\geq 95\%$) sowie mit hochgereinigtem Hu-TNF (Reinheit $\geq 90\%$) erzielt.

Die beobachteten Effekte sind daher als charakteristisch für die untersuchten Interferone bzw. für den Hu-TNF und nicht durch in den Präparaten enthaltene Verunreinigungen verursacht.

Mischungen von humanen-Interferonen und Hu-TNF sind daher für die Therapie neoplastischer Erkrankungen des Menschen von großer Bedeutung.

Vor kurzem konnten für zwei menschliche cytotoxische Proteine die cDNA's in E. coli kloniert werden. Die aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen, daß eines dieser Proteine identisch mit dem ist, das bei der vorliegenden Erfindung verwendet wurde. Beide Proteine haben sehr ähnliche biologische Eigenschaften und ihre Aminosäuresequenzen zeigen einen sehr hohen Homologiegrad, ähnlich denen zwischen IFN- α und IFN- β .

Es ist daher zu erwarten, daß die in der vorliegenden Erfindung gezeigten synergistischen Wirkungen mit den Interferonen mit beiden Proteinen erzielt werden können.

Ausführungsbeispiel

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert, ohne sie in irgendeiner Weise zu beschränken; insbesondere sei darauf hingewiesen, daß prinzipiell jedes Interferon und jeder TNF, also auch Präparate, die durch andere Verfahren hergestellt werden, impliziert sind. Die Fig. 1 bis 4 zeigen Diagramme mit den Ergebnissen der Untersuchungen.

Beispiel 1

Hemmung der Proliferation der humanen Cervixcarcinom-Zelllinie Hela

Zellen der humanen Carvix-Carcinomlinie Hela wurden in Eagle's Minimum Essential Medium in Gegenwart von 10% fötalem Kalbsserum, Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (50 Einheiten/ml) bei 37°C in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft gezüchtet. In 3cm-Kunststoffgewebekulturschalen wurden je 50 000 Zellen in 2,5 ml Medium angesetzt; jeweils 2 Schalen erhielten Zusätze von Interferonen, TNF oder Kombinationen dieser Substanzen in 0,5 ml Medium. Zwei Schalen erhielten nur Medium; diese Kulturen wurden als Referenz für das Wachstum unbehandelter Zellen gewertet. Die Schalen wurden sechs Tage lang wie oben beschrieben inkubiert, anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Substrat gelöst und die Zahl lebensfähiger Zellen in Hämocytometerkammern bestimmt.

Folgende Interferon- bzw. TNF-Präparate wurden verwendet:

a) Humanes IFN-alpha2arg („IFN-alpha“), produziert in E. coli, Reinheit mindestens 98%, spezifische Aktivität 300×10^6 IE/mg (bezogen auf den Referenzstandard GO-23-901-527 der National Institutes of Health, USA), hergestellt von Boehringer Ingelheim, Ingelheim. BRD. Dieses Protein ist identisch mit dem von Streuli et al. beschriebenen Interferon mit Ausnahme der Aminosäure an Position 34 (Arginin anstelle von Histidin).

b) Humanes IFN-gamma, produziert in E. coli, Reinheit mindestens 98%, spezifische Aktivität 68×10^6 E/mg (getestet mit A549-Zellen und Maus-Enzephalomyocarditis-Virus), hergestellt von Genentech Inc., San Francisco, USA.

c) Humaner TNF, Reinheit mindestens 90%, hergestellt wie beschrieben.

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte der Zellzahlen in beiden parallel geführten Kulturen. Balken stellen jeweils den höheren der beiden Einzelwerte dar. Pfeile in der Abbildung deuten an, daß weniger als 10 000 Zellen pro Kulturschale gezählt wurden.

Eine Kombination von IFN-gamma (100 E/ml) mit TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigte deutlich höhere Aktivität als auf Grund der Aktivität der Komponenten zu erwarten war; eine Mischung von IFN-alpha, IFN-gamma (jeweils 100 E/ml) und TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigte deutlich höhere Aktivität als dies auf Grund der Aktivität der drei binären Mischungen zu erwarten war.

Beispiel 2

Hemmung der Proliferation der humanen Lungencarcinom-Zelllinie A549

Kultur von Zellen der humanen Lungencarcinom-Zelllinie A549 (22) und Behandlung mit Interferonen und TNF wurden wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Fig. 2.

Eine Kombination von IFN-gamma (100 E/ml) mit TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigte deutlich höhere Aktivität, als dies auf Grund der Aktivität der Einzelkomponenten zu erwarten war. Eine Kombination von IFN-alpha mit IFN-gamma (jeweils 100 E/ml) und TNF (1 000 ng/ml) zeigte höhere Aktivität als dies auf Grund der Wirkung der drei binären Mischungen zu erwarten war.

Beispiel 3

Hemmung der Proliferation der Mauszelllinie L929

Kultur der Zellen der humanen Linie L929 wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt. Zur Untersuchung der Wachstumshemmung durch Interferone und TNF wurden folgende Präparationen verwendet:

a) Maus-Interferon-alpha/beta, spezifische Aktivität 44×10^6 E/mg, produziert von Enzo Biochem Inc., New York, USA.

b) Maus-Interferon-gamma, produziert in E. coli, Reinheit mindestens 95%, spezifische Aktivität 7×10^6 E/mg (getestet auf L929-Zellen mit Enzephalomyocarditis-Virus), hergestellt von Genentech Inc., San Francisco, USA.

c) Humaner TNF, Reinheit mindestens 90%, hergestellt wie beschrieben.

Die Behandlung der Zellen wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, die Zellzahl wurde nach fünf Tagen bestimmt.

Fig. 3 zeigt die Ergebnisse.

Eine Behandlung der Zellen mit einer Mischung von IFN-alpha/beta (100 E/ml) und TNF (10 oder 1 000 ng/ml) oder IFN-gamma (100 E/ml) und TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigte eine stärkere Wachstumshemmung als dies auf Grund der Wirkung der Komponenten zu erwarten war.

Beispiel 4

Hemmung der Proliferation der Maus-Melanomzelllinie B16

Kultur der Maus-Melanomzellen und Behandlung mit Maus-Interferonen und TNF wurden wie in Beispiel 1 bzw. Beispiel 3 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Fig. 4.

Behandlung mit einer Kombination von IFN-alpha/beta (100 E/ml) und TNF (1 000 ng/ml) oder einer Kombination von IFN-gamma (100 E/ml) und TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigten höhere Wirkung, als dies auf Grund der Aktivität der Einzelkomponenten zu erwarten war. Eine Kombination von IFN-alpha/beta (100 E/ml) mit IFN-gamma (100 E/ml) und TNF (10 oder 1 000 ng/ml) zeigte höhere Aktivität als dies auf Grund der Wirkung der drei binären Kombinationen zu erwarten war.

Abbildung 1

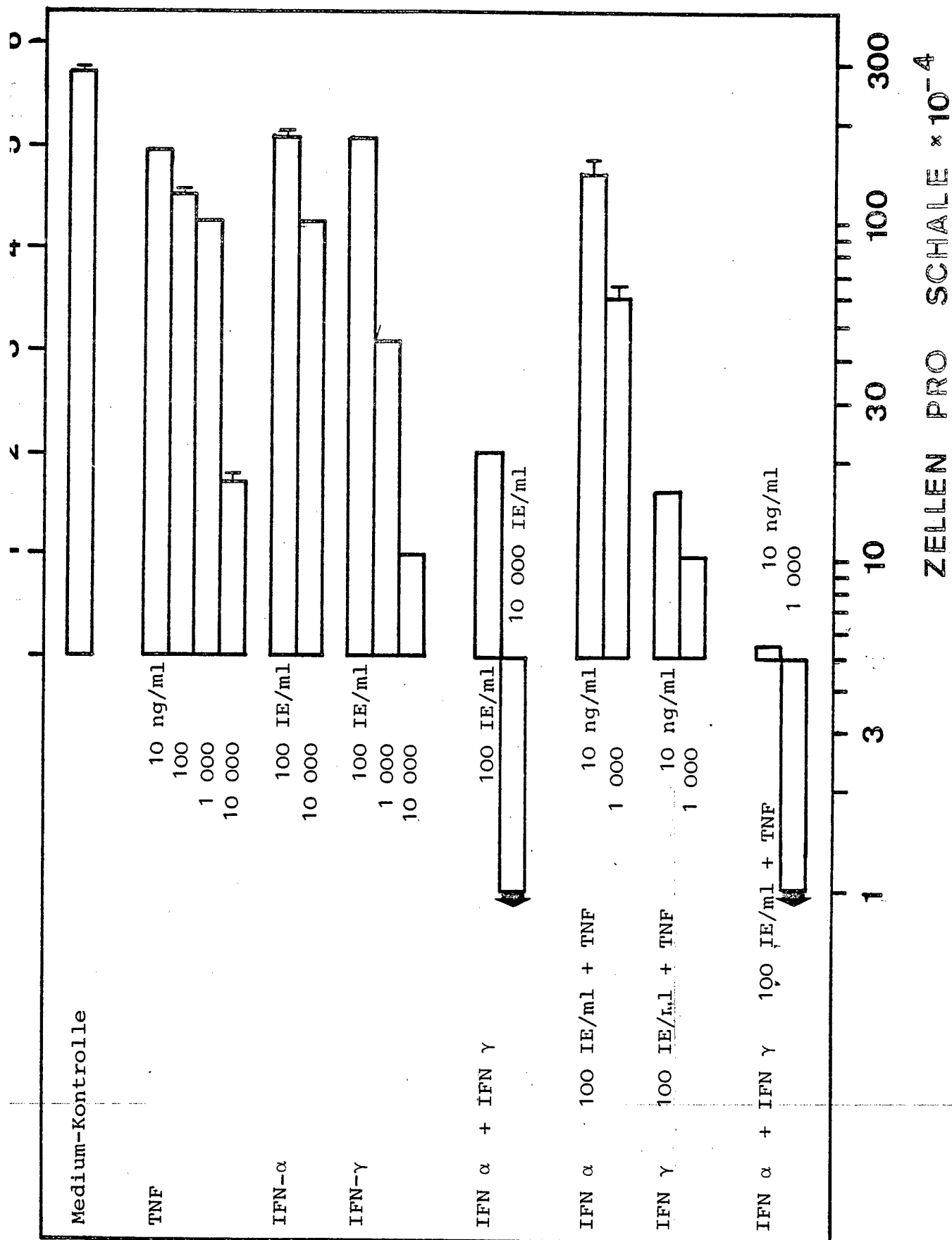


Abbildung 2

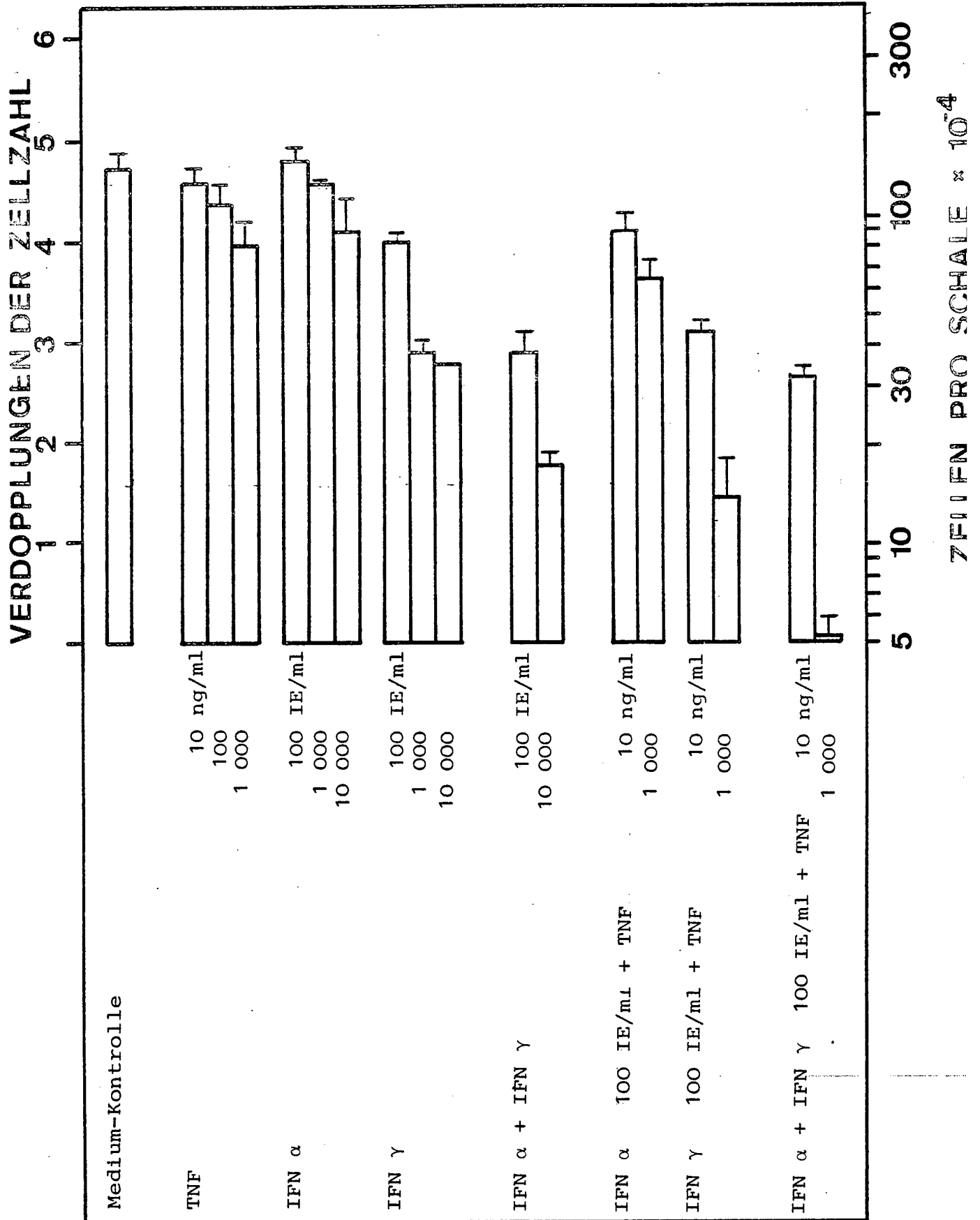


Abbildung 3

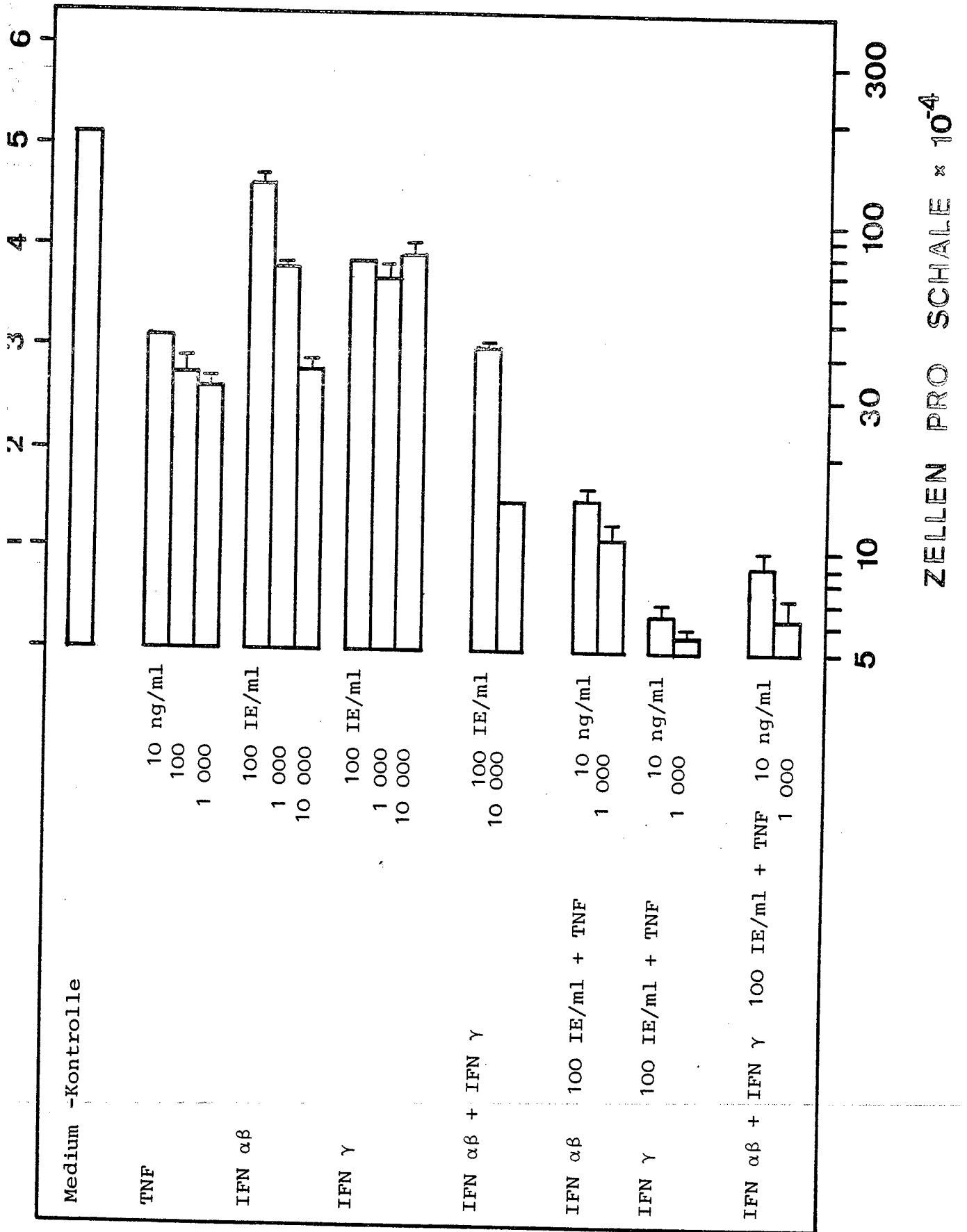


Abbildung 4

