



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 293 263 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 31/13
A 61 K 31/40
A 61 K 37/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 K / 339 437 0	(22)	23. 03. 90	(44)	29. 08. 91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Benndorf, Rainer, Dr. rer. nat.; Österreich, Steffi; Schunck, Hildegunde; Gaestel, Matthias, Dr. rer. nat. Dipl.- Biol.; Gross, Burkhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Stahl, Joachim, Dr. sc. nat.; Böhm, Hans, Dr. rer. nat.; Bielka, Heinz, Prof. Dr. habil. Dipl.-Biol., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Mittel zur Hemmung des Tumorwachstums				

(57) Herstellung; Mittel; Wachstumshemmung; Tumorzellen; Mammakarzinom; Antiöstrogen; Tumornekrosefaktor;
pharmakologische Wirkqualität; Hitzeschock; chemische Substanzen; medizinische Forschung; pharmazeutische
Industrie

(57) Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Mittels zur gezielten Hemmung des Wachstums
östrogenrezeptor-positiver Tumorzellen, insbesondere des Mammakarzinoms. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß
ein Antiöstrogen wie Tamoxifen und Nafoxidin mit α - oder β -Tumornekrosefaktor kombiniert wird. Das Verhältnis der
beiden Wirkstoffe kann in weiten Bereichen variieren, die Gesamtmenge im Mittel beträgt maximal 2%. Das neue
Mittel wird erfindungsgemäß auch zur Testung der pharmakologischen Wirkqualität der enthaltenen Stoffe
eingesetzt, wobei die Tumorzellen zuvor, gleichzeitig oder nachfolgend einer Streßbehandlung durch Hitzeschock
oder durch chemische Substanzen unterzogen werden. Anwendungsgebiete sind die medizinische Forschung und
Therapie sowie die pharmazeutische Industrie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Mittels zur gezielten Hemmung des Wachstums von Tumorzellen, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Antiöstrogen mit einem Tumornekrosefaktor in pharmazeutisch üblichen Trägerstoffen kombiniert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Hemmung des Wachstums humaner Mammakarzinomzellen, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Antiöstrogen mit einem Tumornekrosefaktor in pharmazeutisch üblichen Trägerstoffen kombiniert wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **gekennzeichnet durch** einen Gesamtanteil an Antiöstrogenen und Tumornekrosefaktor $< 2\%$.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1–3, **gekennzeichnet durch** ein Verhältnis Antiöstrogen:Tumornekrosefaktor von 1:1 000 000 bis 1 000 000:1, vorzugsweise 1:100 bis 100:1.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** Einsatz von Tamoxifen oder Nafoxidin als Antiöstrogen und durch Einsatz von α - oder β -Tumornekrosefaktor.
6. Testverfahren zur Prüfung der pharmakologischen Wirkqualität von Antiöstrogenen und/oder Tumornekrosefaktoren, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zu prüfende Stoff einem Organismus appliziert, am Organismus vorher, gleichzeitig oder nachfolgend eine stressauslösende Manipulation vorgenommen und die Wirkung der zu prüfenden Stoffe gemessen wird.
7. Testverfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß als stressauslösende Manipulation eine Hitzeschockbehandlung durchgeführt wird.
8. Testverfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß als stressauslösende Manipulation Substanzen appliziert werden, die die Stressreaktion im Organismus auslösen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Mittels zur gezielten Hemmung des Wachstums östrogenrezeptor-positiver Tumorzellen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Forschung und Therapie sowie die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß in Zellen bei Stresswirkung (Hitzeeinwirkung) die Synthese einer Gruppe von Proteinen (Stressproteine, Hitzeschockproteine) induziert wird, die normalerweise nicht oder in geringer Menge in den Zellen auftreten. In allen Säugerzellen kommt im Molekulargewichtsbereich zw. 20 000 und 30 000 nur ein derartiges Protein vor, im folgenden „kleines Sägestressprotein“ (kSP) genannt. Das kSP ist wahrscheinlich in allen Geweben und Zelllinien durch Hitze induzierbar und dann für die Ausbildung der Thermotoleranz der Zellen mitverantwortlich (Landry, J., P. Chretien, H. Lambert, E. Hikey, and L. A. Weber. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human hsp 27 gene in rodent cells. *J. Cell. Biol.* 109: 7–15). Thermotolerante Zellen haben in Kultur unter relevanten Hitzeschockbedingungen eine im Vergleich zu Kontrollzellen bis zu 100 000fache Überlebensrate.

Das konstitutive Vorkommen des kSP in Geweben von Menschen und Mäusen ist weitgehend auf Karzinome der Mamma und des Endometriums sowie auf normales Endometrium und die Cervix beschränkt und korreliert dann gut mit dem Auftreten des Östrogenrezeptors (Ciocca, D. R., R. H. Asch, D. J. Adams, and W. L. McGuire. 1983. Evidence for modulation of a 24 K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 496–499). Ist der Östrogenrezeptor vorhanden, kann das kSP mit Östrogenen induziert und mit Antiöstrogenen reprimiert werden (Moretti-Rojas, I., S. A. W. Fuqua, R. A. Montgomery, and W. L. McGuire. 1988. AcDNA for the estradiol-regulated 24 K protein: Control of mRNA levels in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 11: 155–163).

Im Ehrlich Ascites Tumor (EAT) steht das kSP (p25) in enger Beziehung zum Wachstumsverhalten dieses Tumors (Benndorf, R., P. Nürnberg, and H. Bielka. 1988. Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 174: 130–138). Es wird wachstumsabhängig akkumuliert und existiert in 3 Isoformen, von denen 2 phosphoryliert sind. Nach einem Hitzeschock wird das kSP verstärkt synthetisiert. Dabei entscheidet die Art des Schocks (Temperatur, Dauer), welche der Isoformen bevorzugt synthetisiert wird (Österreich, S., R. Benndorf, and H. Bielka. 1990. The expression of the growth-related 25 kDa protein of Ehrlich ascites tumor cells is increased by hyperthermic treatment (heat shock). *Biomed. Biochim. Acta* 49: 219–225).

In weiteren Arbeiten wird auf einen Zusammenhang zwischen dem Zustand des kSP (ausgebildete Isoform) und der Wirksamkeit des Tumornekrosefaktors (TNF) hingewiesen (Robaye, B., A. Hepburn, R. Lecocq, W. Fiers, J.-M. Boeynaems, and J. E. Dumont. 1989. Tumor necrosis factor- α induces the phosphorylation of 28 kDa stress proteins in endothelial cells: Possible role in protection against cytotoxicity? *BBRC* 163: 301–308). TNF ist für bestimmte Tumorzellen in vitro zytotoxisch und kann, wie im Falle des EAT, eine Tumornekrose verursachen.

Bisher wurden noch keine Möglichkeiten entwickelt, das Wachstum Östrogenrezeptor-positiver Tumorzellen auf der Basis dieser Befunde gezielt zu hemmen.

Ziel der Erfindung

Ziel ist es, eine verbesserte selektive Schädigung von Östrogenrezeptor-positiven Tumorzellen zu erreichen.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Herstellung eines Mittels zur gezielten Hemmung des Wachstums Östrogenrezeptor-positiver Tumorzellen, insbesondere des Mammakarzinoms.

Erfindungsgemäß wird das Mittel hergestellt, indem ein Antiöstrogen und ein Tumornekrosefaktor kombiniert werden. Zweckmäßigerweise wird dieses Mittel in Form einer 10000fach konzentrierten alkoholischen Stammlösung des Antiöstrogens und einer 100fach konzentrierten Stammlösung des Tumornekrosefaktors in physiologischer Kochsalzlösung den Östrogenrezeptor-positiven Tumorzellen zugesetzt. Das Verhältnis Antiöstrogen:Tumornekrosefaktor kann in weiteren Bereichen, zwischen 1:1000000 bis 1000000:1, vorzugsweise zwischen 1:100 bis 100:1, variieren.

Der Gesamtanteil der beiden Wirkstoffe im Mittel beträgt maximal 2%, wobei die wirksame Konzentration des Antiöstrogens bevorzugt bei 10^{-6} M liegt, die des Tumornekrosefaktors bevorzugt bei 2000 U/ml.

Bevorzugt verwendete Antiöstrogene sind Tamoxifen und Nafoxidin, die verwendeten Tumornekrosefaktoren sind die α - oder β -Form.

Das neue Mittel kann erfindungsgemäß zur Testung der pharmakologischen Wirkqualität der enthaltenen Antiöstrogene und/oder Tumornekrosefaktoren eingesetzt werden. Dazu sind verschiedene zeitlichen Abfolgen des Einsatzes des Mittels möglich:

- Antiöstrogen und Tumornekrosefaktor werden gleichzeitig verabreicht
- Antiöstrogen wird Stunden bis Tage vor der Gabe des Tumornekrosefaktors verabreicht
- beide Komponenten des Mittels werden gleichzeitig oder nacheinander verabreicht, jedoch werden die Tumorzellen zuvor, gleichzeitig, oder nachfolgend einer Hitzeschockbehandlung ausgesetzt.

Als streßauslösende Manipulation kann auch eine Applikation streßauslösender Substanzen dienen (z.B.: NaAsO_3). Die Zeitspanne zwischen dem Einsatz des Mittels und der Hitzebehandlung bzw. dem Zusatz streßauslösender Substanzen kann Stunden bis Tage betragen. Die Wirkung der eingesetzten zu prüfenden Stoffe wird zum Beispiel anhand der Überlebensrate der Zellen gemessen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein neues Mittel zur Verfügung gestellt, welches potentiell in der medizinischen Forschung und Therapie eingesetzt werden kann. Ferner erlaubt die Erfindung, die pharmazeutische Wirkqualität von Antiöstrogenen und Tumornekrosefaktoren in einfacher Weise zu bestimmen. Die Erfindung soll nachfolgend in Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Einer Kultur (5 ml Medium) der Tumorzelllinie MCF 7 wird zunächst Tamoxifen (0,5 μl einer 10^{-2} M alkoholischen Stammlösung) und nach 24 h α -TNF (10000 U gelöst in 40 μl physiologischer Kochsalzlösung) gegeben. Nach weiteren 24 h wird das Wachstum der Tumorzellen durch einen Vitalitätstest ermittelt. Als Kontrolle dienen gleich behandelte normale Mammaepithelzellen.

Beispiel 2

Einer Kultur (5 ml Medium) der Tumorzelllinie MCF 7 wird zunächst Tamoxifen (0,5 μl einer 10^{-2} M alkoholischen Stammlösung) und α -TNF (100 U, gelöst in 40 μl physiologischer Kochsalzlösung) gegeben. Nach 24 h wird die Kultur dem folgenden Hitzeschockregime ausgesetzt: 1 h 41,5°C, 3 h 37°C, 1 h 43,5°C. Anschließend wird das Wachstum der Tumorzellen durch einen Vitalitätstest ermittelt. Als Kontrolle dienen gleich behandelte normale Mammaepithelzellen.

Beispiel 3

Einer Kultur (5 ml Medium) der Tumorzelllinie MCF 7 wird zunächst Tamoxifen (0,5 μl einer 10^{-2} M alkoholischen Stammlösung) und α -TNF (100 U gelöst in 40 μl physiologischer Kochsalzlösung) gegeben. Nach 24 h wird der Kultur NaAsO_3 (500 μM Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wird das Wachstum der Tumorzellen durch einen Vitalitätstest ermittelt. Als Kontrolle dienen gleich behandelte normale Mammaepithelzellen.

Beispiel 4

Bei Applikation in vivo (Tier, Mensch) hat das Mittel folgende Zusammensetzung (Menge bezogen auf ein 70 kg schweres Tier bzw. auf einen 70 kg schweren Menschen):

Antiöstrogen (Tamoxifen)	30 mg
Ethanol	40 μl
Polyethylenglykol	1 g
Physiologische Kochsalzlösung, enthaltend 6×10^5 U (ca. 300 μg α -TNF) und 0,2% Methylhydroxybenzoat	1 ml