



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 882 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 31/24
A 61 K 31/41
A 61 K 31/44
A 61 K 31/50
A 61 K 31/535

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 61 K / 335 506 7
(31) 285,151
335,007
351,331

(22) 11.12.89
(32) 12.12.88
07.04.89
03.05.89

(44) 19.03.92
(33) US

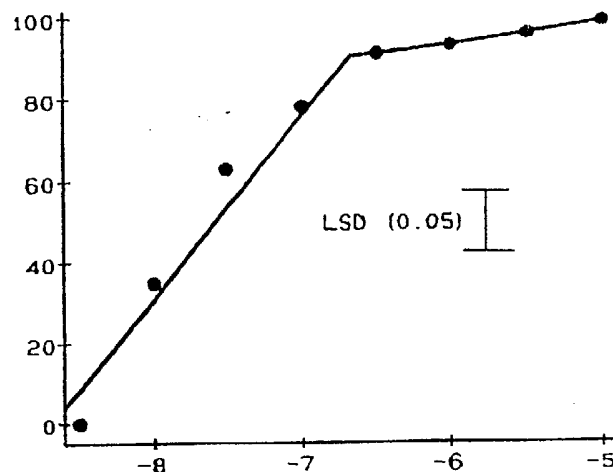
(71) siehe (73)
(72) Halling, Blaik; Witkowski, Debra A., US
(73) FMC CORPORATION, Philadelphia, Pennsylvania 19103, US
(74) Vossius, Tauchner, Heunemann u. a., Patentanwälte, Siebertstraße 4, W - 8000 München 80, DE

(54) Einen spezifischen Inhibitor enthaltendes Arzneimittel und dessen Verwendung in der Tumorbehandlung

(55) Verfahren, pharmazeutisch; Zusammensetzung;
Abtötung; Tumorzellen; Säugern; Licht, aktivierbar;
Tetrapyrrol; Protoporphyrinogen; Protoporphyrin IX;
Protoporphyrinogen-Oxidase, eukaryotisch; Mikroalgen;
Inhibitor

(57) Es wird ein Verfahren und eine pharmazeutische
Zusammensetzung zur Abtötung von Tumorzellen von
Säugern beschrieben, wobei das Verfahren darin besteht,
daß die Zellen in Gegenwart eines durch Licht aktivierbaren
Tetrapyrrols dem Licht ausgesetzt werden, wobei die
Verbesserung darin besteht, daß diese Zellen mit einer
Verbindung behandelt werden, die die enzymatische
Umwandlung von Protoporphyrinogen in Protoporphyrin IX
durch Protoporphyrinogen-Oxidase in diesen Zellen
inhibiert, wodurch in diesen Zellen der Aufbau von
Protoporphyrin IX bewirkt wird. Es wird weiterhin ein
Verfahren zur Erzeugung von Protoporphyrin IX
beschrieben, das darin besteht, eukaryontische Mikroalgen
in Gegenwart eines Protoporphyrinogen-Oxidase-Inhibitors
zu züchten. Fig. 1

FIG. 1



Patentansprüche:

1. Arzneimittel, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen spezifischen Inhibitor der enzymatischen Umwandlung des Protoporphyrinogens in Protoporphyrin IX durch Protoporphyrinogen-Oxidase und gegebenenfalls einen pharmazeutisch geeigneten Träger enthalten.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor einen I_{50} -Wert für Protoporphyrinogen-Oxidase von weniger als $1\ \mu\text{M}$ aufweist.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor kein Tetrapyrrol ist.
4. Arzneimittel nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor ein Redoxpotential aufweist, das negativer als -500 mV ist.
5. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zum Abtöten von Tumorzellen in Säugern.
6. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur photodynamischen Behandlung von Tumoren in Säugern.
7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Erhöhung des Gehaltes an Protoporphyrin IX in Tumorzellen von Säugern.
8. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zum Nachweis und zur Lokalisierung von Tumorzellen bei Säugern.
9. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen spezifischen Inhibitor der enzymatischen Umwandlung des Protoporphyrinogens in Protoporphyrin IX durch Protoporphyrinogen-Oxidase mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger vermischt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor einen I_{50} -Wert für Protoporphyrinogen-Oxidase von weniger als $1\ \mu\text{M}$ aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor kein Tetrapyrrol ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor ein Redoxpotential aufweist, das negativer als -500 mV ist.
13. Verfahren zur Erzeugung von Protoporphyrin IX, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine eukaryontische Mikroalge im Dunkeln oder unter Lichtverhältnissen, unter denen Protoporphyrin IX nicht angeregt wird, in Gegenwart einer wirksamen Menge eines Aryltriazolinons, eines Aryltetrazolinons oder eines Aryltriazindions, die einen Inhibitor für das Enzym Protoporphyrinogen-Oxidase darstellen, gezüchtet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mikroalge vom Stamm *Chlamydomonas* ist.
15. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Inhibitor 1-(4-Chlor-2-fluor-5-propargyloxyphenyl)-3-methyl-4-difluormethyl- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-on ist.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel, das einen spezifischen Inhibitor der enzymatischen Umwandlung des Protoporphyrinogens in Protoporphyrin IX durch Protoporphyrinogen-Oxidase und gegebenenfalls einen pharmazeutisch geeigneten Träger enthält, seine Herstellung und seine Verwendung zum Abtöten von Tumorzellen. Weiterhin betrifft sie ein Verfahren zur Erzeugung von Protoporphyrin IX unter Verwendung einer eukaryontischen Mikroalge. Es ist inzwischen gut bekannt, in Tumorzellen von Säugern ein Hämatoporphyrinderivat oder ein Gemisch von Porphyrinen, die sich davon ableiten (z. B. Photofrin II[®]), einzuführen und anschließend diese Zellen Licht einer geeigneten Wellenlänge auszusetzen, um die Zerstörung der Zelle zu bewirken. Diese photodynamische Therapie ist Gegenstand einer Reihe von Arbeiten, die eine Sonderausgabe von „Photochemistry and Photobiology“, Band 46, Nummer 5, November 1987 (im folgenden hierin als „P & P 46-5“ bezeichnet), darstellen. Wie in diesen Arbeiten gezeigt wird, wurde diese photodynamische Therapie zur Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen (einschließlich Krebs der Bronchialwege, der Blase, der Speiseröhre, der Lunge, der Haut, des Kopfes und des Nackens, des Gehirns und von Dickdarm- sowie Innenaugen- und gynäkologischen Krebserkrankungen) eingesetzt. Es wurde festgestellt, daß die biochemischen Wirkungen dieser Photosensitivierung durch Porphyrine die Vernetzung von Membranproteinen, die Peroxidierung von Lipiden, die Inhibierung des Transports einiger essentieller Metaboliten, die Lyse von lysosomalen und mitochondrialen Membranen, die Inaktivierung mehrerer Enzyme und die erhöhte Aufnahme von Porphyrinen durch die Zelle einschließen (P & P 45-6, Seite 695). Die Porphyrine werden im allgemeinen injiziert (z. B. intravenös oder intraperitoneal), wobei eine typische Dosis bei ungefähr $2\text{ mg Photofrin II je kg Körpergewicht}$ liegt.

Das Porphyrinderivat kann auch in ein Liposom eingearbeitet und injiziert (z. B. intraperitoneal) werden, wie es z. B. bei Spikes et al. in „Photodynamic Behavior of Porphyrins in Model Cell, Tissue and Tumor Systems“, in Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases, Herausgeber G. Jori und C. A. Perria, Seiten 45-53, Libreria Progetto, Padua (1985), und in darin zitierten Literaturstellen beschrieben worden ist.

Die Fachliteratur zeigt, daß die Einführung von Protoporphyrin in Zellen, z. B. in humane Erythrozyten (Dubbelman et al., Biochimica et Biophysica Acta, 511 [1978], 141-151) oder in Leukämiezellen von Mäusen (Kessel, Cancer Research 42 [Mai 1982],

1703–1706), zu einer ausgeprägten photosensibilisierenden Wirkung führt. Die Arbeit von Kessel zeigt, daß es das Mittel mit der größten photosensibilisierenden Wirkung von den untersuchten war. Als jedoch Kessel und andere (z.B. Berenbaum et al., Br. J. Cancer [1982], 45, 571–581) Protoporphyrin in Tiere injizierten, wurde in den Tumoren kein nachweisbares Protoporphyrin gefunden, was darauf hinweist, daß Protoporphyrin, wenn es als solches in den Körper eingeführt wird, leicht an den Kreislauf verloren gehen kann.

Es ist weiterhin bekannt, daß Hämatoporphyrin-Derivate und ähnliche Stoffe zum Nachweis und zur Lokalisierung von Tumoren, z.B. beim Blasen- oder Lungenkrebs (z.B. P & P 46–5, Seite 759) verwendet werden.

In der vorliegenden Erfindung ist das Mittel zur Behandlung der Zellen bei der photodynamischen Behandlung oder bei den bekannten Verfahren zum Nachweis und zur Lokalisation von Tumoren kein Porphyrin, oder es ist nicht allein ein Porphyrin. Im Gegensatz dazu besteht dieses Mittel aus einem Enzym-Inhibitor-Mittel, das die enzymatische Umwandlung von Protoporphyrinogen in Häm in diesen Zellen inhibiert und dadurch den Aufbau von endogenem Protoporphyrin IX in diesen Zellen bewirkt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Arzneimittel, das einen spezifischen Inhibitor der enzymatischen Umwandlung des Protoporphyrinogens in Protoporphyrin IX durch Protoporphyrinogen-Oxidase und gegebenenfalls einen pharmazeutisch geeigneten Träger enthält.

Wir haben sichergestellt, daß Mittel, wie bestimmte Typen von Herbiziden, die die enzymatische Umwandlung von Protoporphyrinogen in Chlorophyll in Pflanzenzellen, auch die enzymatische Umwandlung von Protoporphyrinogen in Häm in Säugerzellen inhibieren. Von uns wird angenommen, daß die Inhibierung durch solche Verbindungen wahrscheinlich die Stufe der Umwandlung von Protoporphyrinogen in Protoporphyrin IX durch ein Enzym (Protoporphyrinogenoxidase, EC 1.3.3.4) beeinflusst, so daß das Protoporphyrinogen nicht den normalen Stoffwechsel zu Protoporphyrin verfolgen kann, sondern an dessen Stelle in der Zelle (z.B. im Plasma) oxidiert wird, was jedoch außerhalb des normalen enzymatischen Stoffwechselweges erfolgt (z.B. außerhalb der Organellenmembranen), so daß das Ergebnis eine Ansammlung des Protoporphyrins IX an Orten ist, wo es für die normale Umwandlung in Häm nicht zur Verfügung steht, mit dem Ergebnis, daß, wenn die Zellen dem Licht ausgesetzt werden, das akkumulierte Protoporphyrin IX eine zellzerstörende Wirkung wie diejenige hat, die bei der oben beschriebenen photodynamischen Behandlung ausgeübt wird. Die erfindungsgemäßen Inhibierungsmittel für Enzyme sind spezifische Inhibitoren der Protoporphyrinogenoxidase in dem Sinne, daß sie nicht als allgemeine Enzymgifte wirken und z.B. Vernetzungsmittel (z.B. Sulfhydrylverbindungen) denaturieren; vorzugsweise sind es nicht solche Stoffe, die die Oxidationsbedingungen beeinflussen, wie es Elektronenakzeptoren sind. So haben die bevorzugten erfindungsgemäßen Mittel Redoxpotentiale, die negativer als -500 mV sind, z.B. solche, die negativer als -800 mV sind (gemessen z.B. auf übliche Art und Weise in einem aprotischen Lösungsmittel für das Mittel, z.B. durch cyclische Voltammetrie oder polarographisch). Es ist weiterhin ein bevorzugter Fall, daß das Mittel kein Tetrapyrrol ist und daß sein I_{50} -Wert für Protoporphyrinogenoxidase unter ungefähr $1\text{ }\mu\text{M}$ liegt, z.B. unterhalb $0,3\text{ }\mu\text{M}$, und z.B. dieser I_{50} -Wert ungefähr $0,1$ oder $0,03$ oder $0,01\text{ }\mu\text{M}$ oder darunter beträgt.

Das enzyminhibierende Mittel ist vorzugsweise ein solches, das eine hohe Kapazität für die Spaltung des Plasmalemmas von pflanzlichem Material aufweist. Eine Versuchsanordnung zur Bestimmung dieser Kapazität ist das Efflux-Experiment, das in der Arbeit von Halling und Peters in Plant Physiology, 84, 1114–5 (1987) beschrieben worden ist. In solch einer Versuchsanordnung (detaillierter im Anhang A weiter unten beschrieben) weisen bevorzugte Mittel einen totalen Efflux von wenigstens 50% bei einer Konzentration in der Behandlung von $100\text{ }\mu\text{M}$, vorzugsweise bei einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ oder darunter, z.B. bei 100 nM , auf. Hochaktive Stoffe, z.B. 1-(4-Chlor-2-fluor-5-propargyloxyphenyl)-3-methyl-4-difluormethyl- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-on oder Lactophen (weiter unten beschrieben), weisen Gesamteffluxraten von über 90% bei einer Konzentration von 100 nM auf.

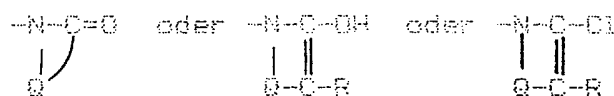
Eine weitere Versuchsanordnung zur Bestimmung der Fähigkeit eines Stoffes zur Spaltung des Plasmalemmas von pflanzlichem Material ist das durch Licht induzierte Experiment, bei dem die Inhibierung des Grünwerdens gemessen wird und das detaillierter im Anhang B weiter unten beschrieben wird. Durch diese Versuchsanordnung wird die Kapazität zur Inhibierung des Grünwerdens durch Licht an gebleichten Chlamydomonas reinhardtii, Mutante γ -1, (eine Algenart, die, wenn sie im Dunkeln gezogen wird, kein Chlorophyll produziert, so daß die Algenmasse gebleicht ist auf Grund der Anwesenheit neuer, nicht grüner Zellen, und die wieder Chlorophyll produziert, wenn sie dem Licht ausgesetzt wird) gemessen. Eine Vielzahl der bevorzugten Verbindungen (Mittel), die innerhalb dieser Erfindung verwendet werden, weisen eine Fähigkeit zur Inhibierung des Grünwerdens im Licht von wenigstens 50% auf, wenn die Verbindung mit einer Konzentration von 10^{-5} M , bevorzugter mit einer Konzentration von 10^{-6} M oder darunter, z.B. bei einer Konzentration von 10^{-7} M , angewendet wird. Zusätzlich dazu sollte die Verbindung so ausgewählt werden, daß sie, wenn sie bei der angegebenen Konzentration in der Versuchsanordnung zur Inhibierung des Grünwerdens im Licht verwendet wird, einen Überstand ergibt, der einen Lichtabsorptions-Peak von ungefähr 405 nm aufweist, welcher dann größer als der Chlorophyll-Peak ist (der Peak bei ungefähr 668 nm in diesem System), z.B. weist der Überstand einen Peak bei 405 nm auf, dessen Höhe 2-, 3- oder 4mal die Höhe des Peaks bei 668 nm aufweist.

Unter den enzyminhibierenden Mitteln, die zur Durchführung dieser Erfindung verwendet werden können, befinden sich als Herbizide wirksame Verbindungen der folgenden Klassen (A bis D);

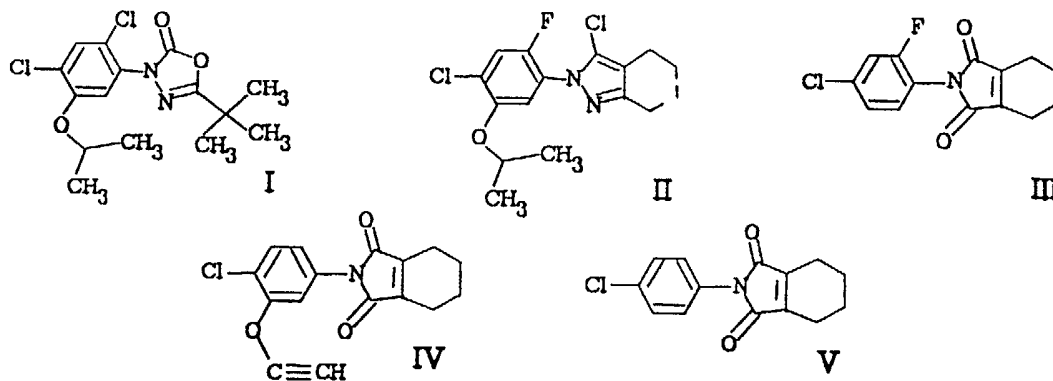
A: Herbizide, die Aryl- und heterocyclische Gruppen aufweisen, der allgemeinen Formel

Ph-NHet

worin Ph eine substituierte Phenylgruppe, vorzugsweise eine 2,4-disubstituierte Phenylgruppe, noch bevorzugter eine 2,4,5-trisubstituierte Phenylgruppe bedeutet und worin NHet ein 5- oder 6gliedriger heterocyclischer Ring mit ein bis vier Stickstoffatomen ist, der die Formel



aufweist, worin Q die Differenz zum Ausbalancieren des heterocyclischen Ringes bedeutet und R Wasserstoff oder eine Substituentengruppe darstellt. Diese Klasse von Verbindungen schließt solche Stoffe ein, wie diejenigen, die als die Klasse der „cyclischen Imid-Herbizide“ in der Arbeit von Wakabayashi et al., J. Pesticide Sci. 11, 635–640 (1986) bezeichnet worden sind, worin in der Abb. 1 die folgenden Verbindungen dargestellt sind:



Die Verbindung I ist ein Aryloxadiazol-Herbizid, nämlich 2-t-Butyl-4-(2,4-dichlor-5-isopropoxyphenyl)- Δ^2 -1,3,4-oxadiazolin-5-on. Andere 2-Alkyl-4-(2,4,5-trisubstituierte phenyl)- Δ^2 -1,3,4-oxadiazolin-5-one, die in dieser Erfindung verwendet werden können, werden z. B. in den USP 3.385.862, 3.836.539 und 3.876.413 beschrieben.

Die Verbindung II ist ein Aryl-tetrahydroindazol-Herbizid, nämlich 3-Chlor-2-(4-chlor-2-fluor-5-isopropoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazol. Weitere 3-substituierte-2-(2,4,5-trisubstituierte Phenyl)-tetrahydro-indazole, die innerhalb dieser Erfindung verwendet werden können, werden z. B. in der US-Patentschrift Nr. 4.760.043 beschrieben.

Die Verbindungen III, IV und V sind Aryl-tetrahydrophthalimid-Herbizide. Andere Aryl-tetrahydrophthalimide, die innerhalb dieser Erfindung verwendet werden können, werden z. B. in den USP 4.431.822, 4.670.046, 4.670.042 und 4.439.229 und in der veröffentlichten Internationalen Patentanmeldung (PCT) WO 87/07.602 beschrieben. In den zuletzt genannten zwei Patentschriften werden auch NHet-Ringe beschrieben, die verwendet werden können. Solche Ringe werden z. B. in der Spalte 4, Zeile 25 und Spalte 5, Zeile 20 der US-PS 4.439.229 und auf den Seiten 12 bis 14 des WO 87/07.602 erläutert.

Weitere geeignete Herbizide des PH-NHet-Typs sind:

Aryltriazolinone wie diejenigen, die in den US-PS 4.318.731, 4.398.943, 4.404.019, 4.702.945, 4.705.557, 4.702.763, 4.761.174 und in den Internationalen Patentanmeldungen (PCT) WO 85/01.637, WO 85/04.307, WO 87/00.730, WO 87/03.782, WO 86/04.481 und WO 88/01.133 beschrieben worden sind,

Aryltetrazolinone, wie diejenigen, die in der US-PS 4.734.124 und in den Internationalen Patentanmeldungen (PCT) WO 85/01.939 und WO 87/03.873 beschrieben worden sind,

Aryltriazindione, wie diejenigen, die in den US-PS 4.755.217 und 4.766.233 sowie in der Internationalen Patentanmeldung (PCT) WO 86/00.072 beschrieben worden sind,

Arylhantoine, wie diejenigen, die in der US-PS 4.427.438 beschrieben worden sind,

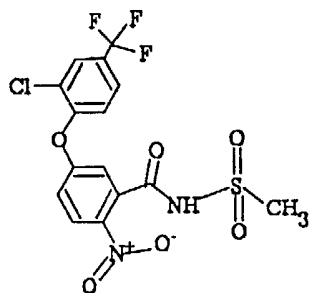
Arylurazole, wie diejenigen, die in der US-PS 4.452.981 beschrieben worden sind, und

Arylhexahydropyridazine, wie diejenigen, die in der US-PS 4.619.687 beschrieben worden sind.

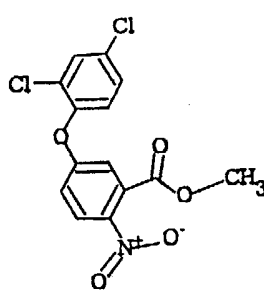
B: Durch Arylgruppen substituierte heterocyclische Urethane, wie diejenigen, die in der US-PS 4.521.242 beschrieben worden sind.

C: Phenylether-Herbizide, wie diejenigen, die eine p-Halogen- oder p-Nitro-phenoxyphenyl-Struktur aufweisen, wie die folgenden, im Handel zur Verfügung stehenden Stoffe:

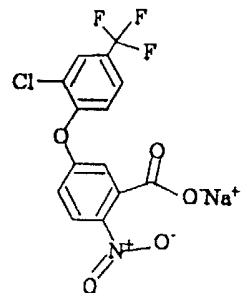
5-(2-Chlor-4-trifluormethylphenoxy)-2-nitro-N-methylsulfonyl-benzamid (Fomesafen)



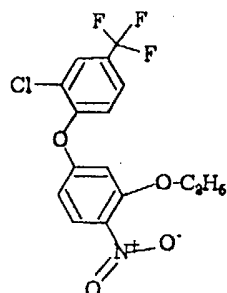
5-(2,4-Dichlorphenoxy)-2-nitrobenzoesäure-methylester (Bifenox)



5-(2-Chlor-4-trifluormethylphenoxy)-2-nitrobenzoesäure, Natriumsalz (Acifluorfen)



2-Chlor-1-(3-ethoxy-4-nitrophenoxy)-4-trifluormethyl-benzen (Oxyfluorfen)



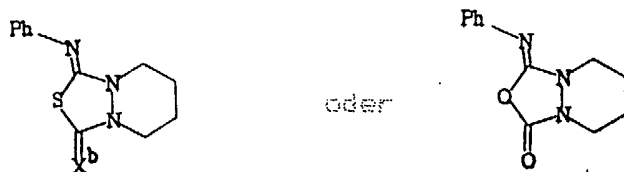
Weitere geeignete, im Handel erhältliche Diphenylether-Herbizide sind:

Lactophen: 1-Carbethoxyethyl-5-(2-chlor-4-trifluormethylphenoxy)-2-nitrobenzoat,
 Fluoroglykofen: (Carbethoxy)methyl-5-(2-chlor-4-trifluormethylphenoxy)-2-nitrobenzoat,
 Fromesofen: 5-(Chlor-4-trifluormethyl-phenoxy)-N-methylsulfonyl-2-nitro-benzamid.
 Chloronitrofen: 2,4,6-Trichlor-4-nitrophenoxy-benzen,
 Fluorodifen: 2-Nitrophenoxy-4-trifluormethyl-benzen,
 Nitrofen: 2,4-Dichlor-1-(4-nitrophenoxy)benzen,
 Chlormethoxyfen: 4-(2,4-Dichlorphenoxy)-2-methoxy-1-nitrobenzen.

Ein weiteres, geeignetes Diphenylether-Herbizid ist 5-(2-Chlor-4-trifluormethyl-phenoxy)-2-nitroacetophenon-oxim-O-essigsäure-methylester.

D: Arylpyrazol-Herbizide wie diejenigen, die in den US-PS 4.563.210, 4.496.390 und 4.459.150 sowie in der Deutschen Offenlegungsschrift 35 20 327 A 1 beschrieben worden sind.

E: Verbindungen der Formel



worin X^b O oder S bedeutet und „Ph“ die Bedeutung aufweist, die oben beschrieben worden ist, sowie Verbindungen, die in der Europäischen Patentanmeldung 273.417 oder Derwent Abstracts Zugriffs-Nr. 87-040749 beschrieben worden sind.

Die Behandlung mit den erfindungsgemäßen Verbindungen kann durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion erfolgen. Das Mittel kann als sterile Zusammensetzung verwendet werden, die aus dem Mittel besteht, das in einem pharmazeutisch geeigneten Trägermittel gelöst oder dispergiert ist, z. B. als wäßrige, isotonische Lösung, z. B. als wäßrige Kochsalzlösung (z. B. 0,9% NaCl) oder Dulbeccos durch Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit einer Konzentration von z. B. 2,5 mg/ml, oder die das Mittel in einem liposomalen System enthält, z. B. einem Phospholipid-Grundkörper auf eine Art und Weise, wie sie auf den Seiten 1659–1660 von Remingtons Pharmaceutical Sciences 1985 (17. Auflage), herausgegeben von der Mack Publishing Company, beschrieben worden ist, z. B. analog der Rezeptur, die von Jori et al., Br. J. Cancer (1983), 48, S. 307, beschrieben worden ist, nach der 51,4 mg Dipalmitoyldiphosphatidyl-cholin in 10 ml einer 1 mM Lösung des Mittels in Chloroform:Methanol wie 9:1 (Volumenteile) gelöst werden können und nach gründlicher Durchmischung das Lösungsmittel im Vakuum bei 30°C wieder abgezogen werden kann, wodurch ein Feststoff erhalten wird, der in 10 ml 0,01 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,4, der 150 mM NaCl enthält, resuspendiert und die getrübbte Lösung dann 30 Minuten bei 50°C beschallt wird.

Die enzyminhibierenden Mittel, die zur Durchführung dieser Erfindung verwendet werden können, können an geeignete tumorspezifische monoklonale Antikörper (MABs) gebunden oder gekoppelt werden, wobei die Kopplungstechnik verwendet wird, die nach dem Stand der Technik bekannt ist, so daß das enzyminhibierende Mittel zielgerichtet an spezielle Tumororte geführt werden kann.

Die enzyminhibierenden Mittel, die innerhalb dieser Erfindung verwendet werden, können auch angewendet werden, indem sie einfach oral in den Verdauungstrakt gegeben werden, vorzugsweise in verdünnter Form zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten Trägermittel, z. B. indem sie der Nahrung beigegeben werden, wie es im Beispiel 6 weiter unten illustriert wird.

Es kann wünschenswert sein, insbesondere bei der oralen Verabreichung, enzyminhibierende Mittel zu verwenden, die wasserlösliche Salze sind oder die eine Säure sind und wasserlösliche Natrium- oder Kaliumsalze bilden, z. B. saure Sulfonamide der Art, wie sie der Internationalen Patentanmeldung (PCT) WO 87/03.782 (z. B. das Mittel 6c im unten stehenden Beispiel 6) oder WO 85/00.1939 und WO 87/03.7873 beschrieben worden sind, oder wasserlösliche Salze davon, oder Carbonsäuren oder wasserlösliche Salze davon, z. B. das Natriumsalz, das als Acicfluorfen bekannt ist.

Die enzyminhibierenden Mittel, die erfindungsgemäß verwendet werden können, können in herkömmliche pharmazeutische Zusammensetzungen eingearbeitet werden, z. B. in Tabletten (z. B. verpreßte Tabletten, die beschichtet werden können, z. B. mit Zucker, Pasten und/oder Sirup), Zäpfchen, Kapseln (z. B. Hartgelatinekapseln), Suspensionen, Lösungen, Pulver oder Ampullen. In diesen Zusammensetzungen kann das Mittel in Abmischung mit pharmazeutisch geeigneten festen und/oder flüssigen Trägern vorliegen, die, wenn es gewünscht wird, ein Nahrungsmittel sein können. So können sie z. B. Feststoffe wie Maisstärke oder ein flüssiges Verdünnungsmittel wie Wasser oder ein als Nahrungsmittel verwendbares Öl, ein Mineralöl oder ein Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid sein. Es können auch Gemische von enzyminhibierenden Mitteln verwendet werden, z. B. ein Gemisch der Mittel 6c aus Beispiel 6 weiter unten und Acicfluorfen in z. B. ungefähr gleichen Anteilen. Die Dosierung, die angewendet werden soll, kann durch Routine-Versuche ermittelt werden, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, z. B. durch Versuche der Art, wie sie für Photofrin II in dem Artikel von Dougherty über die „Photodynamische Therapie (PDT) von schädlichen Tumoren“ in CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology, Band 2, Ausgabe 2 (1984), Seiten 83 bis 116, beschrieben worden sind.

Die folgenden Beispiele werden zur weiteren Erläuterung dieser Erfindung zur Verfügung gestellt.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

HeLa-Zellen (eine humane Tumorzell-Linie, die zur Tumorforschung verwendet wird und von der American Type Culture Collection zur Verfügung gestellt wird) in der logarithmischen Wachstumsphase (nachdem sie fünf Tage bei 37°C in 11-Falcon-Gewebekulturflaschen kultiviert worden sind) wurden mit durch Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Dazu wurden 2 ml einer 0,25%igen Lösung von Trypsin in PBS zugegeben und nach mehreren Minuten die Zellen vorsichtig aus der Flasche entnommen und in 100 ml einer 25 nM Lösung von HEPES in Essentiellem Minimalmedium (MEM), dem 10 Vol.-%

inaktiviertes Kälberserum, 1,1 ml einer 200 mM Lösung von Glutamin in 0,85%iger Kochsalzlösung und 11 000 Einheiten Penicillin/11 000 mcg Streptomycin zugesetzt worden waren, gegeben.

Danach wurden jeweils 5,0 ml Aliquots der so erhaltenen, resuspendierten Zellkultur in 50-ml-Falcon-Zellkulturflaschen gegeben und, ausgenommen im Falle der Kontrolle, mit dem zu untersuchenden Mittel vermischt. Die Aliquots wurden dann im Dunkeln drei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abgetrennt und auf die folgende Art und Weise unter grünem Licht extrahiert:

Unter Hinzufügen von 0,8 ml einer 0,25%igen Lösung von Trypsin in PBS wurden die Zellen vom Flaschenboden entfernt. Nachdem eine Stunde im Dunkeln inkubiert worden war, wurden Zellen und Medium aus den Flaschen entnommen, in Zentrifugengläser mit rundem Boden gegeben und zweimal eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu zerstören und die Extraktion zu ermöglichen.

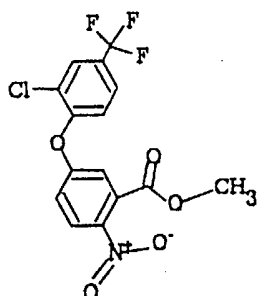
Nach diesem Verfahren des Aufbrechens der Zellen wurden in den Zellsuspensionen keine intakten Zellen mehr beobachtet. Es wurden zu jedem Zentrifugenröhrchen 10 ml basisches Aceton (90 % Aceton, 10 % 0,1 N NH_4OH) zugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen zentrifugiert, um Proteine und Zelltrümmer zu entfernen. Zu dem Überstand wurden 5 ml Wasser und danach 0,5 ml einer gesättigten wäßrigen Kochsalzlösung gegeben. Dann wurde der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von 2 M KH_2PO_4 auf 6,8 eingestellt. Danach wurde der wäßrig-acetonische Extrakt auf eine C8-Baker-Prep-Säule gegeben. Die Tetrapyrrole wurden mit $2 \times 1,5$ ml Volumina von $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ wie 90:10 eluiert.

Die Extrakte wurden dann mittels eines Spektrofluorometers quantitativ bestimmt.

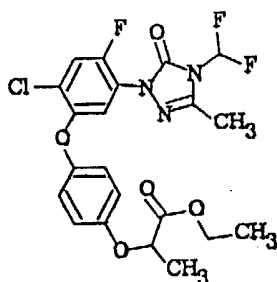
Die bei diesem Versuch verwendeten Mittel zur Behandlung waren:

A: 5-Aminolaevulinsäure, eine bekannte Vorstufe von Tetrapyrolen.

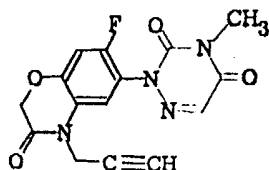
B: Acifluoren-methyl mit der Formel



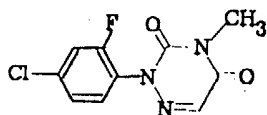
C: Ein Herbizid der Formel



D: Ein Herbizid der Formel



E: Ein Herbizid der Formel



Das Mittel A wurde als filtersterilisierte, 250 mM Lösung in Wasser, pH = 6,5, zur Verfügung gestellt. Die Mittel B, C, D und E wurden als 50 mM Lösungen in Aceton angewendet. Zu der Kontrolle wurde ebenfalls Aceton hinzugegeben, so daß darin eine Konzentration von 0,2 Vol.-% eingestellt wurde. Die den Zellkulturen zugesetzten Mengen der Mittel waren solcherart, daß sie zu den in der Tabelle 1 unten aufgelisteten Konzentrationen führten. In dieser Tabelle werden die Mengen des Tetrapyrrols Protoporphyrin IX (Proto IX), die erzeugt wurden, angegeben.

Tabelle 1

Tetrapyrrol-Akkumulation in behandelten HeLa-Zellen

Mittel	Konzentration des Mittels (μM)	Fluoreszenz- Emission (cps) 400/630	Menge an Proto IX (pMol)
A	5000	41 842	4,2
B	100	12 921	1,3
C	100	33 477	3,5
D	100	10 551	1,1
E	100	8 967	0,9
Kontrolle		2 795	0,3

Beispiel 2

HeLa-Zellen, die in der logarithmischen Wachstumsphase 6 Tage in sechs 1-l-Falcon-Gewebekulturflaschen bei 37°C gezogen wurden, wurden mit durch Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Es wurde eine 0,25%ige Lösung von Trypsin in PBS zugegeben, nach mehreren Minuten wurden die Zellen vorsichtig entnommen und in 110 ml einer 25-nM-Lösung von HEPES in Essentiellem Minimalmedium (MEM), dem 10 Vol.-% inaktivierten Kälberserums, 1,1 ml einer 200-mM-Lösung von Glutamin in 0,85%iger Kochsalzlösung und 11 000 Einheiten Penicillin/11 000 mcg Streptomycin zugesetzt worden waren, gegeben.

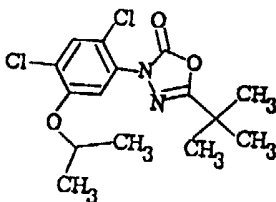
Jeweils 5,0-ml-Aliquots der resuspendierten Zellkultur wurden in 50-ml-Falcon-Gewebekulturflaschen mit oder ohne Herbizid gegeben und im Dunkeln 4 Tage bei 37°C inkubiert, wobei das Herbizid in verdünnter Acetonlösung zugegeben wurde, wie es im Beispiel 1 beschrieben worden ist. Auch zu den Kontrollen wurde Aceton zugegeben, so daß darin eine Aceton-Konzentration von 0,2 Vol.-% eingestellt wurde. Die Herbizidmenge war so groß, daß die in der Tabelle 2, weiter unten, angegebene Konzentration erreicht wurde.

Die Mittel zur Behandlung waren:

B: wie in Beispiel 1,

C: wie in Beispiel 1,

F: Ein Herbizid der Formel



Extraktion: Die Medien aus jeder Flasche wurden in Glasröhrchen mit rundem Boden gegeben, und die Zellen, die am Boden der Flaschen festgesetzt waren, wurden mittels Zugabe von 0,5 ml einer 0,25%igen Lösung von Trypsin in PBS gelöst, wobei mehrere Minuten bei 37°C gehalten wurde, dann aus den Kolben ausgewaschen und zu ihren Medien zugegeben. Von jeder Zellsuspension wurden dann Aliquots von 0,100 ml entnommen, um die Zelldichte zu bestimmen. Die verbleibenden 5,4 ml der Zellsuspension wurden 30 Minuten beschallt, um die Zellen aufzubrechen.

10 ml basisches Aceton (90% Aceton:10% 0,1 N NH_4OH) wurden zu jedem Röhrchen zugegeben. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, um Proteine und Zelltrümmer zu entfernen. Zu dem Überstand wurden 5 ml Wasser zugegeben, danach noch 0,5 ml einer gesättigten, wäßrigen Kochsalz-Lösung. Anschließend wurde der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von 2 M KH_2PO_4 auf 6,8 eingestellt. Dann wurde der wäßrige Acetonextrakt auf eine präparative Baker CB-Säule aufgetragen. Die Säulen wurden getrocknet und mit 2 ml Wasser gewaschen. Die Tetrapyrrole wurden mit 3 ml 90:10 Methanol:Wasser eluiert. Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden alle diese Extraktionsschritte im wesentlichen vollständig unter Lichtverhältnissen durchgeführt, durch die Protoporphyrin IX nicht angeregt wird (z. B. in Behältnisse, die mit lichtstreuenden Materialien umhüllt wurden). Die Fluoreszenz der Extrakte wurde dann mittels eines Spektrofluorometers vom Typ SPEX bestimmt. Die Akkumulation von Protoporphyrin IX (Proto IX) wurde unter Verwendung vorher bestimmter Extinktionskoeffizienten quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind weiter unten in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Durchschnittliche Inhibierung des Wachstums und Akkumulation von Proto IX

Mittel	Konzentration des Mittels (μM)	% Inhibierung des Wachstums	Menge an Proto IX (pMol)**	Relative % an Proto IX***
B	100	99	5,20	2 364
F	100	106	2,71	1 232
C	100	52	4,41	2 005
C	10	-15*	0,57	259
C	1	-26*	0,19	86

*: Negative Werte für die „Inhibierung des Wachstums“ zeigen an, daß Wachstum beobachtet wurde.

**: Durchschnittliche Menge je 10^6 Zellen.

***: Prozent Unterdrückung.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft die Herstellung von Protoporphyrin IX (hierin im folgenden als „Proto IX“ bezeichnet). Bei dieser Ausführung der Erfindung werden eukaryontische Mikroalgen im Dunkeln (oder in Licht, das nicht zur Bildung von Proto IX führt) in einem Medium, das ein Mittel (wie es oben beschrieben worden ist) enthält, das die enzymatische Umsetzung von Protoporphyrin zu Proto IX inhibiert, heterotroph gezüchtet. Anschließend werden sowohl das Medium als auch die Algen oder beides so behandelt, daß das Proto IX extrahiert und vom Chlorophyll, von Carotinoiden, Zelltrümmern usw. abgetrennt wird. Die Trennung kann auf eine beliebige, günstige Art und Weise erfolgen, z. B. durch Flüssigphasen-Chromatographie einschließlich Umkehrphasen-Flüssigchromatographie, oder durch Lösungsmittelextraktion, oder durch Fällung des Proto IX durch Chelatbildung, z. B. mit einem der folgenden Metalle: Fe, Zn, Mg, wobei die so hergestellte Chelatverbindung abgetrennt wird und, wenn es gewünscht wird, das Proto IX wieder erzeugt wird, wie es z. B. durch die bekannte Umsetzung der Chelate mit verdünnter Säure erfolgt.

Die Trennstufen werden unter Licht ausgeführt, bei dem Proto IX nicht angeregt wird (z. B. wie bei dem grünen Licht, das im Anhang A unter der Überschrift „Dunkelheit“ beschrieben wird), oder in Dunkelheit. Die Chelatverbindung mit Eisen ist gegenüber Licht nicht so empfindlich, so daß diese Verbindung dem Licht eher ausgesetzt werden kann, wenn mit diesem Material gearbeitet wird.

Die Mikroalgen werden vorzugsweise als Zellsuspensionen bei einer Temperatur im Bereich von ungefähr 15 bis 30°C gezogen. Die Konzentration des inhibierenden Mittels kann z. B. 10^{-5} bis 10^{-7} Mol betragen. Beispiele für Mikroalgen, die hierfür verwendet werden können, sind *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas reinhardi*, *Euglena* sp. und *Bumilleriopsis filiformis*.

Beispiel 3

Kulturen von *Chlamydomonas reinhardi* (Wildtyp) werden in einem Reaktor aus rostfreiem Stahl (z. B. 300l) subkultiviert, wobei das Kulturmedium verwendet wird, das weiter unten beschrieben wird. Eine Lösung von 5-(2-Chlor-4-trifluormethylphenoxy)-2-nitrobenzoesäure-(1-carbomethoxy-ethylester) (Lactophen, ein handelsübliches Herbizid auf Phenyletherbasis) in Aceton wird hinzugegeben, so daß eine Konzentration von 10^{-5} M und eine Aceton-Endkonzentration von 0,1 % eingestellt werden. Das Gemisch wird sieben Tage bei 25°C im Dunkeln bei leichter Bewegung und/oder Belüftung wachsen gelassen. Der Inhalt des Reaktors wird noch im Dunkeln filtriert und das Filtrat so behandelt, daß das darin enthaltene Protoporphyrin IX gewonnen wird. Ein Verfahren zur Gewinnung des Protoporphyrin IX besteht darin, den Inhalt des Reaktors (wobei dieser im Dunkeln verbleibt) zu filtrieren und dem Filtrat Aceton zuzusetzen. Dieses Gemisch wird mit Petrolether extrahiert. Das Gemisch in Wasser/Aceton wird dann mit Diethylether extrahiert. Der Diethylether wird abgedampft, wodurch ein Rückstand erhalten wird. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und der Umkehrphasen-Chromatographie unterworfen, wodurch Protoporphyrin IX erhalten wird. Es können auch die Gewinnungsverfahren der Beispiele 1 und 2 angewendet werden.

Zusammensetzung des Mediums:

Salze	Molarität	Vorratslösung	ml Vorratsl./l
Na-citrat · 6H ₂ O	$1,7 \times 10^{-3}$	10 %	5
Spurenmetalle	wie unten	wie unten	10
FeCl ₃ · H ₂ O	$0,37 \times 10^{-3}$ M	1 %	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	$0,36 \times 10^{-3}$ M	5,3 %	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	$1,2 \times 10^{-3}$ M	10 %	3
NH ₄ NO ₃	$3,7 \times 10^{-3}$ M	10 %	3
KH ₂ PO ₄	$2,2 \times 10^{-3}$ M	10 %	3
K ₂ HPO ₄	$1,7 \times 10^{-3}$ M	10 %	3
CH ₃ COONa	$7,5 \times 10^{-3}$ M	10 %	10

Stammlösung der Spurenmetalle:

H ₃ BO ₃	100 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	40 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg/l
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	20 mg/l
CuSO ₄	4 mg/l

Eine Alternative zur Verwendung von *Chlamydomonas reinhardi* ist die Verwendung von *Scenedesmus* sp., die in dem oben beschriebenen Medium kultiviert werden, wobei das Natriumacetat jedoch durch Glucose ersetzt wird.

Beispiel 4

Dieses Beispiel wird genauso ausgeführt wie Beispiel 3, ausgenommen, daß als Herbizid 1-(4-Chlor-2-fluor-5-propargyloxyphenyl)-3-methyl-4-difluormethyl- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-on an Stelle des Lactophens verwendet wird.

Beispiel 5

Bestimmung des I₅₀-Wertes

Protoporphyrinogen IX (Protogen IX). Proto IX wurde von Porphyrin Products, Logan, UT, USA, bezogen und gereinigt, wie es von T. P. Fuesler et al., Plant Physiol. 67, 246–249, (1981), beschrieben worden ist. Protogen IX wurde durch Reduktion von Proto IX mit Na/Hg-Amalgam frisch hergestellt, wie es von N. J. Jacobs und J. M. Jacobs, Enzyme 28, 206–219 (1982) beschrieben worden ist, wobei das gereinigte Proto IX mit einer Konzentration von 300 µM verwendet wurde.

Pflanzen-Material. Gurken (*Cucumis sativus* L., Sorte Wisconsin SMR 18) wurden in einem dunklen Treibhaus auf Vermiculit, berieselt mit einem handelsüblichen (9-45-15)-Dünger aufgezogen. Die Keimlinge wurden bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 % aufgezogen. Die Beleuchtung erfolgte intermittierend mit einer Dauer von einer Minute in einem

Zyklus von 60 Minuten mit einer gemessenen Intensität von $25 \mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ (PAR) mittels einer Leuchte vom Typ „Bright Stick“ der General Electric, die durch einen elektronischen Zeitgeber gesteuert wurde. Durch dieses Verfahren wurde Gewebe zur Verfügung gestellt, in dem eine schnelle Chlorophyllsynthese möglich war, während die Stärkereserven und die Ausgangswerte für Chlorophyll minimal gehalten wurden.

Chloroplasten-Isolierung. Die sich entwickelnden Chloroplasten wurden so isoliert, wie es von T. P. Fuesler et al., *Plant Physiol.* **75**, 662–664 (1984) beschrieben worden ist, ausgenommen, daß in der Endstufe der Reinigung die Plastide durch ein 40%iges (Vol.-%) und nicht durch ein 45%iges Percoll-Kissen zentrifugiert wurden. Die Chloroplasten wurden in einem Puffer für diese Testanordnung, bestehend aus 0,5M Mannit, 20mM TES, 10mM HEPES, pH = 7,7, 1mM EDTA, 1mM MgCl_2 , 1Vol.-% Rinderserumalbumin und 1mM Dithioerythritol bis zu einer Endkonzentration von 2mg Protein/ml, resuspendiert.

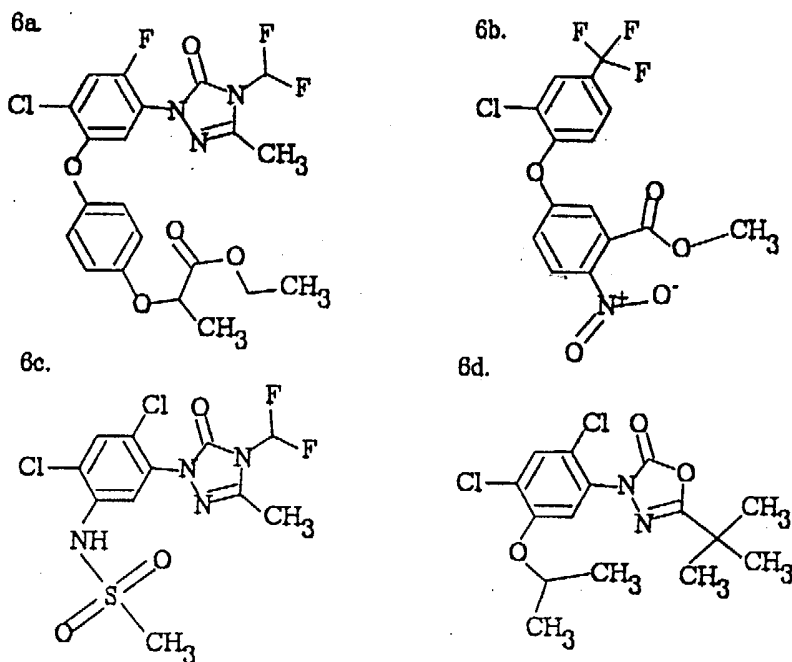
Testanordnung für Protoporphyrinogen-Oxidase. Diese Versuche wurden durchgeführt, wie es von J. M. Jacobs und N. J. Jacobs, *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 312–319 (1984), beschrieben worden ist. Proben von 0,2ml der Chloroplasten-Suspension wurden im Dunkeln mit verschiedenen Konzentrationen an Acifluorfen-methyl („AFM“) oder mit 0,2Vol.-% Aceton als Kontrolle 15 Minuten vorinkubiert. Danach wurden 50 μl frisch hergestelltes Protogen (ungefähr 15nM) zu der Suspension zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Versuche wurden durch Zugabe von 2,75ml des Fluorometrie-Mediums von N. J. Jacobs und J. M. Jacobs, *Enzyme* **28**, 206–219 (1982), das aus 1 Vol.-% Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbit-monolaurat), 50mM Tris-HCl, pH = 8,5, 1mM EDTA und 5mM Gluthathion an Stelle von 1mM Dithioerythrit bestand, gestoppt. Anschließend wurden die Suspensionen direkt mit einem Spektrofluorometer vom Typ SPEX Fluorolog-2, das mit einer Fluoreszenz-Meßeinrichtung an der Frontseite für die Messung getrüübter biologischer Proben ausgerüstet ist, gemessen. Die produzierte Menge Proto IX wurde mit Hilfe einer Eichkurve (der Menge an Proto IX gegen die Emission bei 630nm bei einer Anregung bei 400nm), die mittels gereinigtem Proto IX in Fluoreszenz-Medium erstellt wurde, quantitativ bestimmt.

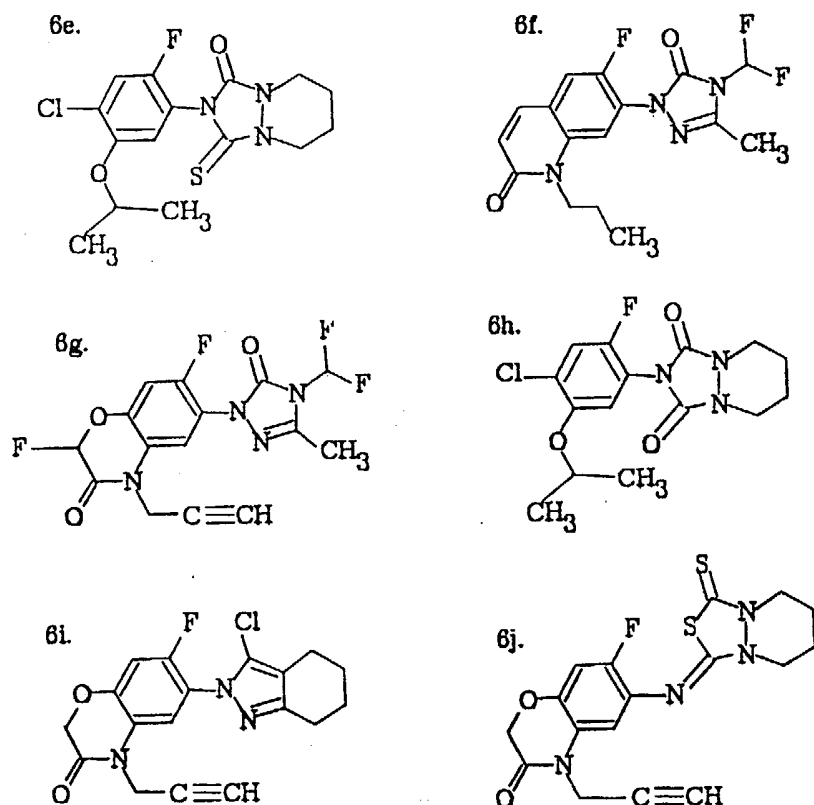
Zur Bestimmung des Anteils nichtenzymatischer Oxidschicht in Proto IX in der oben beschriebenen Versuchsanordnung wurde die gleiche Versuchsanordnung dergestalt durchgeführt, daß an Stelle der Suspension aktiver Chloroplasten eine Suspension verwendet wurde, in der die Chloroplasten durch 15minütiges Erwärmen auf 85°C inaktiviert worden waren. Durch die Subtraktion der so erzeugten Menge von Proto IX von der Menge an Proto IX, das in Gegenwart der aktiven Chloroplasten erzeugt worden war, wurde die enzymatisch hergestellte Menge an Proto IX bestimmt. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 1 grafisch dargestellt (worin LSD die kleinste signifikante Differenz anzeigt, wie es üblich ist). In der Abbildung 1 wird auch gezeigt, daß der I_{50} -Wert (die Konzentration, durch die eine Inhibierung von 50% erreicht wird) unterhalb 0,1 μM ist, d. h. ungefähr 0,03 μM beträgt.

Versuchsanordnungen, die zur Demonstration der Wirkung von 10 μM AFM auf die Umsetzung von Proto IX in Magnesium-Proto IX in der Chloroplasten-Suspension (in Gegenwart von ATP) durchgeführt wurden, zeigten, daß AFM keine inhibierende Wirkung auf diese Umsetzung hatte.

Beispiel 6

Bei der Durchführung dieses Beispiels wurden die enzyminhibierenden Mittel zur Nahrung von Mäusen mit Tumoren zugesetzt. Bei einigen Mäusen, die als Kontrolle verwendet wurden, wurde kein Mittel zur Nahrung zugegeben. Die Mäuse wurden dann getötet und ihre Nieren, Verdauungstrakte, Milz, Leber und Tumoren entnommen und hinsichtlich ihres Gehaltes an Proto IX analysiert. Es wurden dabei die folgenden enzyminhibierenden Mittel verwendet:





Genauer gesagt, waren die Mäuse vom Stamm DBA/2Ha, die am Tage 0 in die rechte Schulter mit SMT-F Tumoren subcutan injiziert worden waren. Die Mäuse in Einzelkäfigen erhielten unbehandeltes Futter vom Typ Purina Rodent Chow 5001 Mash am Tage 1, danach an den Tagen 2 bis 10 die gleiche Futtermischung, die mit 2000ppm des inhibierenden Mittels, das untersucht werden sollte, versetzt worden war (oder, im Falle der Kontrollen, die gleiche unbehandelte Futtermischung). Die Behandlung der Futtermischung wurde durch Vermischen derselben mit einer Menge einer Aceton-Lösung des zu untersuchenden Mittels vorgenommen. Am Tage 10 wurden die Mäuse dann getötet, außer die Maus, die mit dem Mittel, das als 6j bezeichnet wird, behandelt worden war; diese wurde am Tage 7 getötet. Die Gewebe wurden über Nacht bei 4°C kühl gelagert, dann getrocknet und das Frischgewicht jeder Probe bestimmt. Anschließend wurden die Gewebeproben in 5 ml, oder in 10 ml im Falle der Gedärme und der Leber, Aceton-0,1 NH₄OH-Gemisch (9:1, per Volumen) homogenisiert. Die Homogenisate wurden bei 1500 g zentrifugiert und die Überstände mit einem Spektrofluorometer vom Typ SPEX FA 112 untersucht, die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 400 nm, die Emission bei einer Wellenlänge von 630 nm, das Optimum für Proto IX. Die Akkumulation von Proto IX wurde als CPS (emittierte Fluoreszenz-Impulse je Sekunde) je Gramm Gewebe bestimmt. Die Ergebnisse sind weiter unten tabelliert (die Ergebnisse sind Durchschnittswerte für zwei Mäuse bei jeder Behandlung, ausgenommen bei der Behandlung mit den Mitteln 6f, 6h, 6i und 6j, bei denen jeweils nur eine Maus behandelt wurde):

Mittelwert der CPS für Proto IX je Gramm $\times 10^3$ *

Mittel	Tumor	Leber	Niere	Milz	Magen	Tumormasse (mg)
6a	1203	4291	10817	6572	5870**	143
6b	1520	1261	2441	2529	5577**	90
6c	14336	2739	16186	13790	9937**	157
6d	2006	1581	12865	443	5565**	294
6e	837	876	915	1331	2069**	165
6f	449	1170	661	5611	1157	69
6g	166	803	606	1984	466	250
6h	298	914	585	2259	584	192
6i	932	1510	4014	36940	3454	20
6j	1251	538	315	491	572	11
Kontrolle	239	536	494	1504	233	200
					424**	

* Die Angaben in der Tabelle sind gleich den Rohdaten $\times 10^3$.

** Die Messungen wurden an Proben durchgeführt, die mit 3 Teilen basischen Acetons je ein Teil der Probe verdünnt worden waren.

Diese Zahlen entsprechen den folgenden Konzentrationen Proto IX in den jeweiligen Gewebeproben, dargestellt als μg Proto IX je Gramm Gewebe:

Mittel	Tumor	Leber	Nieren	Milz	Verdauungsorgane
6a	11	39	99	60	54
6b	14	12	22	23	51
6c	131	25	148	126	91
6d	18	14	117	4	51
6e	8	8	8	12	19
6f	4	11	6	51	11
6g	2	7	6	18	4
6h	3	8	5	21	5
6i	9	14	37	337	32
6j	11	5	3	4	5
Kontrolle	2	5	5	14	2
					4

In dem Artikel von Dougherty, der weiter oben zitiert wurde, wird eine Zahl von $3,6 \mu\text{g/g}$ als Konzentration des Porphyrins in der gleichen Tumorart (SMT-F) nach der Injektion von 10 mg/kg des Hämatoporphyrin-Derivates bei der gleichen Mäuserasse (DBA/2 Ha) angegeben. In weiteren Arbeiten der Fachliteratur (Moan et al., P & P 46-5, Seiten 713-721; beachte Abbildung 2 auf Seite 716) wird gezeigt, daß eine Porphyrin-Konzentration von ungefähr $12 \mu\text{g/g}$ in Tumoren ($\text{C}_3\text{H}/\text{Tif}$ Mamma-Carcinom) bei DBA/H2-Mäusen nach intraperitonealer Injektion von 25 mg/kg Photofrin II, dem weit verbreiteten Sensibilisator für die photodynamische Behandlung und den Nachweis von Krebs, erreicht wird.

Die Gesamtmenge an das Mittel enthaltender Nahrung, die von den Mäusen aufgenommen wurde, war wie folgt: 6a: 22 und 35 g, 6b: 37 und 35 g, 6c: 25 und 22 g, 6d: 41 und 32 g, 6e: 40 und 44 g, 6f: 27 g, 6g: 33 und 40 g, 6h: 36 g, 6i: 10 g, 6j: 20 g. Bei der Durchführung der in diesem Beispiel 6 beschriebenen Versuche wurden die folgenden Routine-Stufen ausgeführt, wobei (wenn nichts anderes angegeben wird) das Mittel, das in diesem Beispiel mit 6c bezeichnet worden ist, bei Tieren, die keine Tumoren aufweisen, verwendet wird:

- a) Die LD_{50} -Dosis des Mittels wurde mit einem Wert von über 2600 mg/kg (d. h. mg des Mittels je kg Körpergewicht) bei Ratten (bestimmt innerhalb einer Zeitspanne von 14 Tagen nach einer einzigen oralen Dosis, die aus Maisöl mit 15% des Mittels bestand) und über 700 mg/kg bei Mäusen (bestimmt innerhalb einer Zeitspanne von 14 Tagen nach einer einzigen oralen Dosis, die aus Maisöl und 5% des Mittels bestand) bestimmt.
- b) Bei der Untersuchung der Trägermittel zur intraperitonealen Injektion ohne das Mittel wurde festgestellt, daß die Mäuse eine Injektion einer $0,5\text{-ml}$ -Dosis eines Gemisches gleicher Teile DMSO (Dimethylsulfoxid) und Wasser tolerierten.
- c) Bei Versuchen, bei denen das Mittel in einem Gemisch aus 60% Maisöl und 40% DMSO intraperitoneal injiziert wurde, wurde festgestellt, daß die Mäuse eine Dosis von 100 mg/kg tolerierten.
- d) Die folgenden Versuche wurden mit Mäusen durchgeführt:
 - i) Tägliche Verabreichung von 50 mg/kg (unter Verwendung einer 1%igen Lösung des Mittels in Aceton) innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen;
 - ii) tägliche Injektion i. p. von 50 mg/kg (unter Verwendung einer 1%igen Dispersion des Mittels in Mineralöl, hergestellt durch Auflösen des Mittels in einem Tropfen DMSO und Mischung der so erhaltenen Lösung mit dem Mineralöl) innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen;
 - iii) tägliche, äußerliche Anwendung von 50 mg/kg (unter Verwendung einer 1%igen Lösung des Mittels in DMSO) auf die Haut innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen;
 - iv) Fütterung eines Standard-Futters, dem 2000 ppm des Mittels, bezogen auf die Masse des Futters, beigemischt worden waren, innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen;
 - v) tägliche Injektion i. v. von 50 mg/kg (unter Verwendung einer 2%igen Lösung des Mittels in DMSO) innerhalb eines Zeitraumes von vier Tagen.

Die in diesen Versuchen verwendeten Mäuse wurden nach deren Abschluß getötet und ihre Gewebe auf eine Akkumulation von Proto IX hin untersucht.

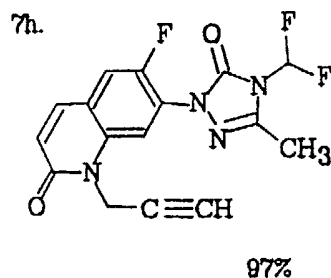
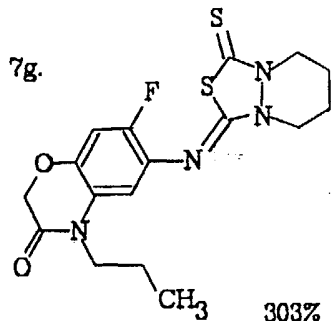
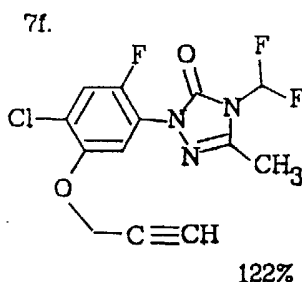
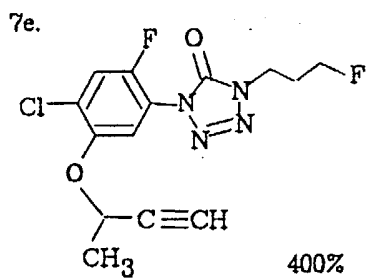
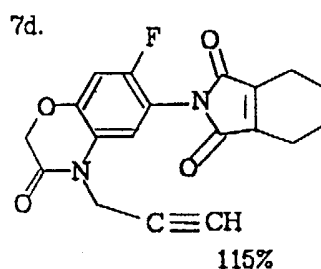
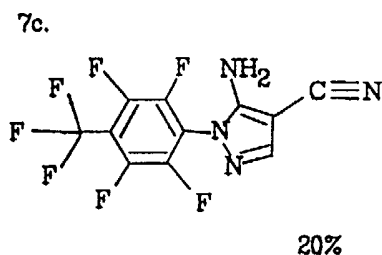
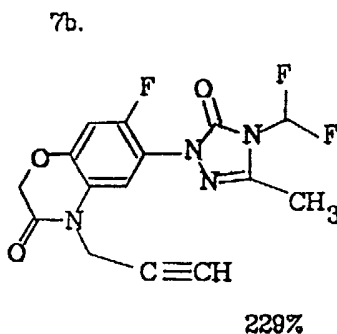
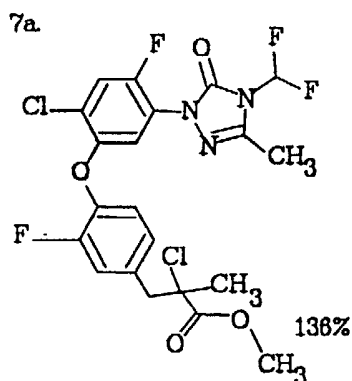
In einem anderen Versuch wurde eine männliche Ratte von der Rasse Fisher 344 verwendet, die 27 Tage lang mit einem Futter gefüttert wurde, das 5000 ppm des Mittels 6c enthielt. Anschließend wurde die Ratte getötet. In den Geweben dieser Ratte wurden erhöhte Konzentrationen an Proto IX im Vergleich zu einem Kontrollversuch festgestellt, wobei besonders deutliche Konzentrationserhöhungen in der Niere, im Verdauungstrakt, im Magen und Gehirn festgestellt wurden, während im Muskelgewebe nur eine kleine Erhöhung der Konzentration bestimmt wurde.

In den oben beschriebenen Versuchen wurden die Ratten und Mäuse einem Standard-Zyklus von 12 Stunden Dunkelheit und 12 Stunden Licht unterworfen.

Beispiel 7

In einer Reihe von Versuchen, die analog denen ausgeführt wurden, die in den Beispielen 1 und 2 beschrieben worden sind, wurden Kulturen von HeLa-Zellen in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ der verschiedenen Mittel zur Behandlung, die unten aufgeführt sind, inkubiert. Die Prozentangaben, die zu jedem Mittel der Behandlung angegeben werden, zeigen die Erhöhung der Menge an Proto IX an, die in Gegenwart des betreffenden Mittels zur Behandlung in Bezug zu der Menge, die mit einer Kontrolle im gleichen Experiment erzielt worden ist, erzeugt wurde.

Mittel, die in den Beispielen 6 verwendet worden sind: 6a: 337%, 6b: 366%, 6c: 297%, 6d: 1200%, 6e: 1210%, 6f: 280%, 6g: 326%, 6h: 431%, 6i: 544%, 6j: 469%. Andere Mittel:



Anhang A

Versuch zur Bestimmung der Ausflußmenge

In dem Versuch zur Bestimmung der Ausflußmenge werden Keimblätter verwendet, die von gebleichten Gurkenkeimlingen erhalten wurden. In der ersten Stufe wird eine Masse der Keimblätter im Dunkeln mit einer wäßrigen Pufferlösung behandelt, die radioaktiv markierten Zucker enthält. Danach wird die Menge an Zucker, die durch die Keimblätter aufgenommen wird, gemessen (durch Zählung, wie weiter unten beschrieben). Die Gesamtmenge der Keimblätter wird dann in zwei Teile geteilt; ein Teil der Keimblätter wird im Dunkeln mit einer wäßrigen Pufferlösung behandelt, die die zu untersuchende Verbindung enthält, während der andere Teil der Keimblätter auf die gleiche Art und Weise im Dunkeln mit einer ansonsten identischen Lösung behandelt wird, die jedoch nicht die zu untersuchende Verbindung enthält (Kontrolle). Die Keimblätter werden dann im Kontakt mit den wäßrigen Lösungen 16 Stunden belichtet und dann von den wäßrigen Lösungen abgetrennt. Diese Lösungen werden dann gemessen (durch Zählen), um den Gehalt an radioaktivem Material zu bestimmen. Die Ergebnisse werden als Prozent Ausfluß angegeben, der wie folgt berechnet wird (dabei ist S_T der Zählwert des radioaktiven Materials je Keimblatt, das von den Keimblättern bei ihrer Erstbehandlung aufgenommen worden ist, S_T ist der Zählwert an radioaktivem Material je Keimblatt in der wäßrigen Lösung, die die zu untersuchende Verbindung enthält, nach der Belichtung und S_c ist der Zählwert von radioaktivem Material je Keimblatt in der wäßrigen Lösung der Kontrolle nach der Belichtung):

$$\text{Prozent Ausfluß} = \frac{S_T \text{ minus } S_c}{S}$$

Insbesondere wurden die folgenden Stoffe und Bedingungen im Versuch zur Bestimmung der Ausflußmenge angewendet.

Pflanzliches Material: Gurkensamen (*Cucumis sativus* L., Sorte Wisconsin SMR18) wurden in Vermiculit, das mit einem handelsüblichen (9-45-15)-Kunstdünger beregnet wurde, zum Keimen gebracht und aufgezogen. Die Keimlinge wurden bei 25°C und 80 bis 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer abgedunkelten Inkubationskammer aufgezogen. Die Keimblätter wurden fünf Tage nach dem Pflanzen von den gebleichten Keimlingen gewonnen und mit 1,0 mM CaCl_2 -Lösung gespült, wobei alle Operationen unter grünem Licht durchgeführt wurden.

Pufferlösung: 1 nM KCl, 1 nM CaCl_2 und 2,0 mM Kaliumphosphat, eingestellt mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5.

Radioaktiv markierter Zucker: 3-O-Methyl-3-[^{14}C]glucose einer spezifischen Aktivität von 10,9 GBq/mmol (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

Anfangsbehandlung: 180 bis 230 gewaschene Keimblätter wurden in einen 250 ml Weithals-Erlenmeyer-Kolben mit Schaumstopfen, der 50 ml der Pufferlösung enthielt, und radioaktiv markierter Zucker in einer Menge, die zu einer Konzentration von 600 nM desselben in der Lösung führte, gegeben. Der Kolben wurde 24 Stunden mit 125 U/min auf einem Rotationsschüttler im Dunkeln geschüttelt. Anschließend wurden die Keimblätter auf einem Nylonsieb abgetrennt und dreimal mit je 20 ml 1 mM CaCl_2 -Lösung gespült. Die Aufnahme an radioaktiv markiertem Zucker wurde gemessen, indem drei Proben von je fünf Keimblättern in einem NCS-Gewebelöser (Amersham Corp.) abgebaut wurden. Das so erhaltene Gemisch wurde dann in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen. Es wurde festgestellt, daß die Ergebnisse aus diesem Abbau gleich den analogen Bestimmungen waren, die mittels der Verbrennung der Keimblatt-Proben in einem Autoxydator durchgeführt wurden.

Behandlung mit der zu untersuchenden Probe (und Kontrollbehandlung):

Fünf Keimblätter werden, mit der achsenentfernten Seite nach oben, auf 3 ml Pufferlösung in einer Petrischale aus Kunststoff mit 35 mm Durchmesser schwimmen gelassen. Dann wurde die zu untersuchende Verbindung (als Lösung in Aceton) in einer solchen Menge zugegeben, daß eine vorher festgelegte Konzentration der zu untersuchenden Verbindung in der Pufferlösung eingestellt wurde (weiter unten diskutiert). Die Acetonkonzentration in der Pufferlösung beträgt dann 0,1 Vol.-% sowohl in der Kontrolle als auch in der Lösung mit der zu untersuchenden Verbindung. Die schwimmenden Keimblätter wurden dann verwirbelt, indem die Schälchen 16 Stunden auf einem Schüttler mit 90 U/min geschüttelt wurden.

Belichtung: Die Schälchen, die die Keimblätter auf den Lösungen schwimmend enthalten, wurden 16 Stunden belichtet, wobei vier GE F20T12-CW-Fluoreszenz-Lampen mit einer gemessenen Intensität von $150 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$ in dem für die Photosynthese aktiven Bereich des Spektrums (PAR) (gemessen auf der Oberfläche der Keimblätter) verwendet wurden, während die Schälchen geschüttelt wurden.

Messung der Menge an radioaktiv markiertem Material in der Flüssigkeit: Die gesamte Flüssigkeit wurde von den Keimblättern abgetrennt und dann in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen.

Dunkelheit: Alle Behandlungen vor dem Belichtungsschritt wurden im Dunkeln oder unter grünem Fluoreszenzlicht durchgeführt (d. h. Licht, das durch ein Grünfilter aus Kunststoff, das Licht der Wellenlänge von 450 bis 600 nm durchläßt, gefiltert wurde).

Anhang B

Kulturmedium: Medium M

Salze	Molarität	Vorratslösung ml	Vorratslösung/l
Na-citrat · 6H ₂ O	$1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 %	5
Spurenmetalle	wie unten	wie unten	10
FeCl ₃ · 6H ₂ O	$0,37 \times 10^{-3} \text{ M}$	1 %	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	$0,36 \times 10^{-3} \text{ M}$	5,3 %	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	$1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 %	3
NH ₄ NO ₃	$3,7 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 %	3
KH ₂ PO ₄	$2,2 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 %	3
K ₂ HPO ₄	$1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$	10 %	3

Vorratslösung des Spurenmittelgemisches

H ₃ BO ₃	100 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	40 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg/l
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	20 mg/l
CuSO ₄	4 mg/l

Das Kulturmedium A wird hergestellt, indem 10 ml einer wäßrigen, 10%igen Natriumacetatlösung ($7,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) zu 1 l Medium M hinzugefügt werden.

Die Komponenten werden in der oben angegebenen Reihenfolge zu destilliertem Wasser zugegeben und anschließend bei 15 psi 15 Minuten autoklaviert.

Vorratskulturen, die in Gegenwart von Licht aufgezogen wurden

Die Vorratskulturen der γ-1-Zellen wurden axial in flüssiger Kultur auf Medium A oder M, vorzugsweise auf Medium M, bei einem Dunkel-Hell-Zyklus von 10:14 Stunden bei 25°C in Erlenmeyer-Kolben, die mit Polyurethan-Stopfen verschlossen wurden, gehalten. Die Vorratskulturen wurden ohne zusätzliche Belüftung auf Rotationsschüttlern bei 125 U/min inkubiert. Die Lichtintensität auf dem Kulturniveau betrug $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$ (PAR). Unter diesen Bedingungen befinden sich die Kulturen in einem halbsynchronen Wachstumsmodus, bis sie eine stationäre Phase von 2 bis 4×10^6 Zellen/ml erreichen.

Ohne Licht gezogene Kulturen (im Dunkeln gezogene Kulturen)

Zellen aus der stationären Phase der Vorratskulturen, die in Gegenwart von Licht gezogen wurden (7,5 ml) wurden in 750 ml des Mediums A in Erlenmeyer-Kolben gegeben. Die Zellen wurden drei bis vier Tage bei 25°C im Dunkeln inkubiert, wobei mittels eines in die Flüssigkeit eintauchenden Rohres belüftet wurde. Während dieses Zeitraumes gehen diese Kulturen der y-1-Zellen sieben bis acht Zellteilungen ein, verlieren das gesamte sichtbare Chlorophyll. Die Konzentration beträgt dann $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml.

Herstellung der Zellen zur Verwendung im Assay

Zellen werden aus 750 ml einer frisch hergestellten, im Dunkeln gezogenen Kultur durch Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit, d.h. ungefähr 2000 U/min innerhalb ungefähr 5 Minuten bei 20°C, geerntet. Die Zellen werden vorsichtig in 50 ml des Mediums A resuspendiert. Eine Probe dieser Suspension (ungefähr 0,25 ml) sollte hinsichtlich ihrer Bewegungsfähigkeit untersucht werden und nach der Fixierung mit einer 1%igen wäßrigen Glutaraldehydlösung eine Zellzählung durchgeführt werden, um die Anzahl der Zellen je ml zu bestimmen. Eine übliche Zahl von Zellen beträgt ungefähr 5×10^7 Zellen/ml. Aliquots von 1 ml (10^7 Zellen/ml) werden in Untersuchungsgefäße gegeben (z.B. Falcon® Gewebekulturplatten mit 24 Bohrungen). Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen sehr beweglich und weisen eine gelbe Färbung auf. Die zu untersuchende Verbindung wurde in einem Lösungsmittel (Aceton, Ethanol, Dimethylsulfoxid oder Wasser, vorzugsweise Aceton) gelöst, so daß eine Konzentration eingestellt wurde, die das 1000fache der Endkonzentration beträgt. 1 ml dieser zu untersuchenden Lösung wird mittels einer Mikroliterspritze von 5 oder 10 µl zu jeder von zwei Bohrungen zugegeben. Es werden je Gewebekulturplatte vier Kontroll-Bohrungen auf die oben beschriebene Art und Weise ohne die zu untersuchende Verbindung hergestellt. Die Gewebekulturplatten wurden mit einer durchsichtigen Kunststoff-Abdeckung bedeckt und 13 bis 16 Stunden bei 25°C in ein Gewächshaus bei einer Lichtintensität von 70 bis 90 µE/m²sec gestellt. Wenn der Inhalt der jeweiligen Bohrungen gelb erscheint, werden diese extrahiert, wie es im Abschnitt „Auswertung der Ergebnisse“ weiter unten beschrieben wird. Wenn der Inhalt der Testbohrungen durchsichtig oder hellgrün erscheint, werden sie auf einen Rotationsschüttler bei ungefähr 125 U/min gestellt und zwei Stunden mit einer Lichtintensität von ungefähr 600 µE/m²sec vor der Extraktion bestrahlt.

Auswertung der Ergebnisse

250 µl einer 10%igen wäßrigen Lösung von Natriumdodecylsulfat und 1 ml Methanol wurden zu jeder Testbohrung zugegeben und der Inhalt gut durchmischt. Diese Gemische wurden dann drei bis vier Stunden im Dunkeln stehengelassen. Die Gewebekulturplatten wurden fünf Minuten bei Zimmertemperatur mit niedriger Geschwindigkeit (ungefähr 2000 U/min) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgezogen und in einem Spektrophotometer vom Typ Beckmann Modell 35 zwischen 350 und 500 nm hinsichtlich des Auftretens von Protoporphyrin IX, bei 668 nm, was den Absorptionsspeak von Chlorophyll in diesem Lösungsmittelsystem darstellt, und bei 720 nm zur Feststellung des Untergrundwertes durch Trübung gemessen.

Datenanalyse

Für jede Bohrung wird ein Grünwert erhalten, indem der Wert bei 720 nm von dem Wert bei 668 nm subtrahiert wird. Von diesen Werten wird der Mittelwert bei jeder Konzentration der zu untersuchenden Verbindung und für die Kontrollen gebildet. Die Prozent Inhibierung werden dann wie folgt errechnet:

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{Durchschnittlicher Grünwert für eine gegebene Konzentration}}{\text{Durchschnittlicher Grünwert für die Kontrolle}} \right)$$

Beispiel 8

In diesem Beispiel wurde der Enzymhemmstoff 6c von Beispiel 6 an Ratten verfüttert, Tumore wurden in Ratten implantiert und die tumortragende Zone wurde mit Licht bestrahlt, was eine Regression der Tumoren bewirkte.

3 Sprague-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 120 g wurden 6 Tage auf eine Diät mit einer Nahrung, die 2000 ppm des Mittels enthielt, gesetzt. Am Tag 3 wurden Chondrosarkoma in den rechten hinteren Schenkel jeder Ratte implantiert, indem 0,3 ml einer Suspension der Tumorzellen (1 Million Tumorzellen) injiziert wurden. Am Tag 6 wurde der rechte hintere Schenkel jeder Ratte rasiert und enthaart, die Größe jedes Tumors gemessen und die Tumoorfläche und die umgebende Haut wurden dann mit nicht-thermischen Dosen von Licht der Wellenlänge 630 nm mit insgesamt 270 J/cm² bestrahlt. Am nächsten Tag waren zwei Ratten offensichtlich frei von Tumoren (d.h. keine tastbare Tumormasse) und die dritte Ratte zeigte eine fast vollständige Regression des Tumors. Die umgebende Haut und das Muskelgewebe der Ratten waren leicht gebleicht und zeigten eine leichte Schwellung, die deutlich geringer war als die mit der Photofrin II vermittelten photodynamischen Therapie einhergehende.

FIG. 1

