



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 33 320 T2 2006.06.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 970 187 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 33 320.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/11971**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 934 904.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/002525**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 1/21 (2006.01)**

C12N 15/16 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

21589 P 11.07.1996 US

(73) Patentinhaber:

Platica, Micsunica, New York, N.Y., US; Platica, Ovidiu, New York, N.Y., US; Holland, James F., Scarsdale, N.Y., US

(74) Vertreter:

Kador & Partner, 80469 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

Platica, Micsunica, New York, US; Platica, Ovidiu, New York, US; Holland, James F., Scarsdale, US

(54) Bezeichnung: **DIFFERENZIERUNGSFAKTOR DER HYPOPHYSE UND METHODEN ZU SEINER VERWENDUNG.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die maligne Transformation ist durch die Entkopplung der Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet, was zu einer andauernden Amplifikation der Zellen einhergehend mit dem Verlust ihrer Fähigkeit führt, zur Differenzierung überzugehen. Mittel, die in der Lage sind die Differenzierungsfähigkeit von Krebszellen wiederherzustellen, sind demnach in der Krebstherapie potentiell nützlich.

[0002] Es wurde von verschiedenen Extrakten, Proteinen und Chemikalien gezeigt, dass sie die Differenzierung von bestimmten Krebszellen in vitro und in vivo induzieren. Zum Beispiel stellt Sachs et al. (1987), Cancer Research 47: 1981 einen Review über die Induktion und Differenzierung von myeloiden hämatopoetischen Leukämiezellen bereit, einschließlich von Beobachtungen, dass myeloide Leukämiezellen durch ein normales Differenzierungsprotein in vitro und in vivo induziert werden können zu differenzieren. Tallman et al. (1992) J. Clin. Pharmacol, 32: 868 besprechen die Rolle von Retinoiden bei der Krebsbehandlung. Retinoide wurden als Differenzierungsmittel zur Prävention und Therapie von Blasen- und Brustkrebs und Leukämien untersucht. Platica et al. (1992) Endocrinology 131: 2573 berichten, dass Extrakte aus einer bovinen Hypophyse und einem mammosomatotropen Tumor in Ratten die Differenzierung von Rattenbrusttumorzellen induzieren.

[0003] Die Differenzierungsmittel, die durch in vitro-Studien und in vivo-Studien in Nagern identifiziert wurden, sind auch klinisch beurteilt worden. Zum Beispiel haben Differenzierungsmittel, einschließlich von Hexamethylenbisacetamid und Retinolsäure, die klinischen Versuche für die Krebsbehandlung und -prävention erreicht und wurden von Linskey et al. (1995) Neurosurgery 36: 1 besprochen. Von der erfolgreichen Verwendung von Differenzierungsmitteln zur Behandlung von akuter promyelotischer Leukämie ist durch Warrell et al. (1993) New Engl. J. Med. 329: 177 berichtet worden. Von Retinoiden wurde durch Lippmann et al. (1993) J. Natl. Cancer Inst. 85: 499 gezeigt, dass sie therapeutisch in der Behandlung von Gebärmutterhalskrebs nützlich sind.

[0004] Die klinische Verwendung von Differenzierungsmitteln um Krebszellen zu induzieren zu differenzieren und folglich normalere Merkmale anzunehmen, wurde Differenzierungstherapie (Englisch: Differentiation Therapy) genannt. Die Differenzierungstherapie stellt einen alternativen Ansatz zur konventionellen Krebstherapie wie der zytotoxischen Chemotherapie bereit. Dementsprechend gibt es einen Bedarf auf diesem Gebiet zur Identifikation und Isolation oder Synthese von neuen Mitteln, die in der Lage sind die Differenzierung von Krebszellen zu fördern.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen hypophysären Differenzierungsfaktor (PDF), einen Faktor der Hypophyse, der in der Lage ist Zellen zu differenzieren, einschließlich von Brustkrebs- und Prostatakrebszellen.

[0006] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung isolierte Nukleinsäuren bereit, die für den PDF kodieren. Es werden ferner Vektoren und Wirtszellen bereitgestellt, die die isolierten Nukleinsäuren, welche den PDF kodieren, enthalten.

[0007] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt den isolierten und aufgereinigten PDF und biologisch aktive Analogons und Fragmente davon bereit, und sie stellt ein Verfahren zur Herstellung des PDF's und der biologisch aktiven Analogons und Fragmente davon bereit.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ferner eine Verfahren zur Förderung der Differenzierung von Brustkrebs- und Prostatakrebszellen bereit, umfassend die Kontaktierung der Brust- und Prostatakrebszellen mit einer Differenzierungs-fördernden Menge eines PDF's.

[0009] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Behandlung von Brust- oder Prostatakrebs bereit, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des PDF's an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf.

[0010] In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die den PDF oder biologisch aktive Analogons oder Fragmente davon umfassen, vermischt mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] [Fig. 1](#) stellt humane MCF-7-Brustkrebszellen in konditioniertem Medium in Abwesenheit des PDF's dar.

[0012] [Fig. 2](#) stellt humane MCF-7-Brustkrebszellen dar, die mit dem Lysat von Oocyten behandelt wurden, welchen cDNA injiziert wurde, die für den PDF kodiert, und illustriert die Aggregation, die durch den PDF induziert wird.

[0013] [Fig. 3](#) stellt DU145 Prostatakrebszellen dar, die in Abwesenheit des PDF's kultiviert wurden.

[0014] [Fig. 4](#) illustriert die morphologischen Veränderungen, einschließlich der Aggregation und der Sphäroidformation, die durch den PDF bei den DU145-Zellen induziert werden.

[0015] [Fig. 5](#) zeigt die Nukleinsäuresequenz von SEQ:ID:NO 1.

[0016] [Fig. 6](#) ist ein Graph, der die Wirkung des Oocytenlysats, welches den PDF enthält, auf die Sphäroidformation von MCF-7-Zellen demonstriert.

[0017] [Fig. 7](#) ist ein Graph, der die Wirkung des PDF's auf die Sphäroidformation von Du-145-Zellen demonstriert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen hypophysären Differenzierungsfaktor (PDF). Der PDF ist ein Polypeptid, das aus einer Säugetierhypophyse und hypophysären Tumoren, einschließlich MtTW10, erhalten werden kann. Der PDF fördert die Differenzierung von Zellen, einschließlich von Brustkrebs- und Prostatakrebszellen.

[0019] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine isolierte Nukleinsäure bereit, die für den PDF kodiert. Es wurde eine Plasmid, bezeichnet mit pBS-PDF1, welches eine 2,2 kb cDNA enthält, die für den PDF kodiert, bei der American Type Culture Collection (ATCC), 21301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 hinterlegt und ihm die Accession Number ATCC 97648 erteilt.

[0020] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung kann eine isolierte Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, aus einer Säugetierhypophyse mittels Expressionsklonierung erhalten werden. Eine Säugetierhypophysen-cDNA-Bibliothek kann durch Verfahren hergestellt werden, die Fachleuten mit gewöhnlichen Kenntnissen auf dem Gebiet bekannt sind, wie von Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY beschrieben. Außerdem sind Säugetierhypophysen-cDNA-Bibliotheken kommerziell erhältlich, zum Beispiel von Clontech, Palo Alto, CA. Eine humane Hypophysenbibliothek wird bevorzugt.

[0021] Eine isolierte Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, wurde aus einer Säugetier-cDNA-Bibliothek durch die Expression der cDNA-Klone der Bibliothek und durch die Beurteilung des exprimierten Produkts hinsichtlich der PDF-Aktivität in einem funktionalem Nachweis erhalten. Fachleuten mit gewöhnlichen Kenntnissen auf dem Gebiet sind verschiedene Expressionssysteme bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Xenopus-Oocyten als Wirt für die Expression der hypophysären cDNA verwendet. Die Verwendung von Xenopus-Oocyten für die Expression von exogenen Nukleinsäuren ist im Stand der Technik bekannt und beschrieben, zum Beispiel von Gurdon et al. (1983) Methods in Enzymology 101: 370. Expressionsvektoren, die die hypophysäre cDNA unter der Kontrolle eines starken Promotors enthalten, können in die Nuclei der Oocyten injiziert werden und die Oocyten danach für ein bis mehrere Tage inkubiert werden, gefolgt von der Beurteilung des Oocytenlysats oder konditioniertem Mediums (CM) hinsichtlich der PDF-Aktivität. Alternativ kann die mRNA in vitro von der hypophysären cDNA synthetisiert werden und in die Oocyten injiziert werden, gefolgt von der Beurteilung des Oocytenlysats oder des CM hinsichtlich einer PDF-Aktivität wie unten beschrieben. Die hypophysäre cDNA kann in Pools aufgeteilt werden, von welchen die RNA synthetisiert, in Oocyten injiziert und auf die funktionale Aktivität getestet wird. Positive Pools werden in Unterpools unterteilt und das Protokoll wird wiederholt bis eine einzige cDNA identifiziert wird, die für den PDF kodiert.

[0022] Die Bionachweise, die für die Identifikation des PDF's nützlich sind, basieren auf der Fähigkeit des PDF's die Differenzierung von Brust- und Prostatakrebszellen zu fördern. Alle beliebigen Brust- oder Prostata-

krebszellen, die auf die Differenzierungs-induzierende Aktivität des PDF's wie hierin beschrieben reagieren, sind für die Verwendung in dem Bionachweis der vorliegenden Erfindung geeignet. Es sind verschiedene kultivierte Brust- und Prostatakrebszellen von der ATCC erhältlich. In einer bevorzugten, nicht einschränkenden Ausführungsform der Erfindung sind die Brustkrebszellen, die für den Bionachweis verwendet werden, Brustkrebszellen aus Ratten der Linie MTW9/P1, erhältlich von D. Sirbascu, University of Texas Medical School, Houston, TX, oder humane MCF-7-Brustkrebszellen, erhältlich von der ATCC. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammen die Prostatakrebszellen von der humanen Prostatazelllinie DU145, erhältlich von der ATCC.

[0023] Die Behandlung von Brust- oder Prostatakrebszellen mit dem PDF veranlasst die undifferenzierten Krebszellen sich zu differenzieren. Die Differenzierung kann mittels morphologischen und biochemischen Parametern gemessen werden, die im Einklang mit der Differenzierung zu der Struktur normaler Brust- oder Prostata Drüsen stehen. Die Krebszellen, die normalerweise in Kultur als Einzelzellsuspensionen wachsen, aggregieren und bilden innerhalb einer 24-stündigen Behandlung mit dem PDF Sphäroide. Die Aggregation kann gemessen werden, indem die suspendierten Einzelzellen entfernt und gezählt werden, dann die verbleibenden aggregierten und adhärenen Zellen abgelöst und gezählt werden und dann der Prozentsatz der Gesamtzellzahl, die aggregiert haben, bestimmt wird. Eine statistisch signifikante Zunahme der Aggregation der behandelten Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen ist ein Beweis für eine PDF-Aktivität. Die Messung der Aggregation stellt folglich einen einfachen und zweckmäßigen Bionachweis für die PDF-Aktivität bereit.

[0024] Der Aggregationsbionachweis kann wie folgt durchgeführt werden. Es werden etwa 1×10^5 Brustkrebszellen, zum Beispiel MTW9/P1-Zellen in 1 ml serumfreien Dulbecco's modified Eagles's Medium (DMEM) in An- oder Abwesenheit des Expressionsprodukts der hypophysären cDNA mit einer Konzentration von etwa 10 ng/ml bis etwa 10 µg/ml gewachsen. Die Kulturen werden bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre für etwa 72 Stunden kultiviert. Die suspendierten Einzelzellen werden entfernt, indem sie mit serumfreiem DMEM gespült und dann gezählt werden. Die verbleibenden aggregierten und adhärenen Zellen werden durch Trypsinisierung mit Trypsin-EDTA für 5 Minuten abgelöst und dann gezählt. Die Zellen werden zweckmäßig gezählt, indem sie unter dem Lichtmikroskop auf mit Gittern versehenen Kulturplatten betrachtet werden. Eine Dosis-Response-Zunahme der Aggregation als Antwort auf die Behandlung mit dem Expressionsprodukt der hypophysären cDNA zeigt an, dass die cDNA für einen PDF kodiert.

[0025] Ein Nachweis für die Sphäroidformation kann wie folgt durchgeführt werden. Es werden etwa 1×10^5 Prostatakrebszellen, zum Beispiel DU145-Zellen, in RPMI 1640-Medium (Sigma), versetzt mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) (Bio Whittacker, Walkersville, MD) und 10 IU Penicillin/ml und 50 mg Streptomycin/ml, bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre wachsen gelassen. Die Kulturen werden mit verschiedenen Konzentrationen des PDF's, zum Beispiel mit 50–300 µg/ml Kultur behandelt. Nach 72 Stunden werden die Kulturen auf die Bildung von Sphäroiden gezählt. Sphäroide sind als multizelluläre Aggregate ohne eine individuell unterscheidbare Zellmorphologie definiert. Die Kulturen werden zweckmäßig gezählt, indem sie unter dem Lichtmikroskop auf mit Gittern versehenen Kulturplatten betrachtet werden und die Sphäroide gezählt werden. Eine Dosis-Response-Zunahme der Sphäroidformation zeigt eine PDF-Bioaktivität an.

[0026] In einer Modifikation des vorhergegangenen Aggregationsbionachweises können die Aggregation und die Sphäroidformation mittels Licht- oder Elektronenmikroskopie von fixierten Schnitten detektiert werden. Nach der Kultivierung und Behandlung der Zellen wie oben beschrieben werden die kultivierten Zellen fixiert und für die Mikroskopie durch Verfahren geschnitten, die im Stand der Technik bekannt sind. Zum Beispiel werden die kultivierten Zellen in 1,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für eine Stunde fixiert. Die Pellets, welche durch eine Niedriggeschwindigkeitszentrifugation erhalten wurden, werden in 1,5% Osmiumtetroxid in Collidinpuffer für 30 Minuten und gefolgt von 30 Minuten in Uranylacetat in Maleatpuffer nachfixiert und dann dehydriert und in Epon 812 eingebettet. Für die Lichtmikroskopie werden 1 µm Schnitte mit Methylenblau, Azure-II und basischem Fuchsin gefärbt. Für die Elektronenmikroskopie werden 60 bis 90 nm Schnitte geschnitten und mit Uranylacetat-Bleicitrat gefärbt. Die Aggregation und Sphäroidformation kann dann unter dem Licht- oder Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Eine statistisch signifikante Zunahme in der Aggregation und Sphäroidformation der behandelten Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen ist ein Beweis für eine PDF-Bioaktivität.

[0027] Die Behandlung von Brustkrebszellen mit dem PDF bewirkt andere Effekte, die mittels Mikroskopie beobachtet werden können, was folglich weitere PDF-Nachweise bereitstellen. Durch Lichtmikroskopie kann beobachtet werden, dass PDF-behandelte Zellen eine kleinere Größe haben als unbehandelte Zellen und dass sie übereinstimmend mit der Drüsenformation in Organoidstrukturen geklustert sind. Mittels Elektronenmikroskopie kann beobachtet werden, dass die behandelten Zellen kleiner sind und kleinere Nuklei haben als die

unbehandelten Zellen. Ferner ist das Cytoplasma reich an polarisierten Organellen wie Lysosomen und endoplasmatisches Retikulum im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, die ein vakuolisiertes Cytoplasma mit wenig Organellen mit Ausnahme der Mitochondrien haben.

[0028] Die Brustkrebszellen, die mit dem PDF behandelt wurden, machen biochemische Veränderungen durch, die zusätzliche Bionachweise für den PDF bereitstellen. Speziell wird Lactalbumin, das nur von differenzierten Brustzellen sekretiert wird, von den PDF-behandelten MTW9/P1-Zellen aber nicht von den unbehandelten Zellen produziert. Demnach stellt die Synthese von Lactalbumin, wie sie zum Beispiel durch konventionelle Northern- oder Westernblots, histochemische Techniken oder Immunassays nachgewiesen wird, einen weiteren Bionachweis für den PDF bereit.

[0029] Durch die vorhergegangenen Klonierungsverfahren und Bionachweise wurde eine isolierte cDNA identifiziert, die für den PDF kodiert. Es wurde folglich in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung herausgefunden, dass eine einzige Nukleinsäure, die für ein einziges Polypeptid kodiert, die hypophysäre Differenzierungsaktivität regelt.

[0030] Die isolierte Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, kann zusätzlich durch ihre Nukleotidsequenz charakterisiert werden. Die Nukleotidsequenzierung kann von Fachleuten auf dem Gebiet durch bekannte Verfahren durchgeführt werden, einschließlich von zum Beispiel dem Dideoxy-Kettenterminationverfahren von Sanger et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463. Eine isolierte Nukleinsäure, die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung für den PDF kodiert, enthält die Sequenz, dargelegt in SEQ ID NO: 1 in [Fig. 5](#).

[0031] Die vorliegende Erfindung umfasst isolierte Nukleinsäuren, die aus einer Säugetierhypophyse und hypophysären Tumoren erhalten werden können und für den PDF kodieren, ein Polypeptid, das die Fähigkeit hat die Differenzierung von Brustkrebszellen zu fördern, wie durch irgendeinen der oben beschriebenen Bionachweise festgestellt werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Nukleinsäure die 2,2 kb Nukleinsäure, die in dem Plasmid pBS-PDF1 enthalten ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte Nukleinsäure ein zusammenhängendes Fragment des 2,2 kb-Inserts, worin das Fragment für den biologisch aktiven PDF kodiert. Fachleute auf dem Gebiet können Fragmente des 2,2 kb-Inserts durch konventionelle molekularbiologische Techniken erhalten, Expressionsvektoren herstellen, die die Fragmente enthalten, die Nukleinsäure exprimieren und das resultierende Produkt für die PDF-Aktivität wie oben beschrieben nachweisen, um die Fragmente, die für den PDF kodieren, zu identifizieren.

[0032] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist die isolierte Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, in dem 2,2 kb-Fragment des Plasmids pBS-PDF1 enthalten. Die vorliegende Erfindung umfasst ferner Analogons der Nukleinsäure, die in dem 2,2 kb-Fragment des Plasmids pBS-PDF1 enthalten ist, worin die besagten Analogons für den PDF kodieren. Zum Beispiel kann ein Fachmann auf dem Gebiet, der über das Wissen der Degeneration des genetischen Codes verfügt, die Nukleinsäuresequenz bestimmen, die für die Aminosäuresequenz kodiert, die von dem Insert des Plasmids pBS-PDF1 kodiert wird. Ferner kann die Sequenz ausgewählt werden, um die Expression in einem bestimmten Wirtsorganismus durch die Verwendung von Codons zu optimieren, von denen bekannt ist, dass sie von dem Wirtsorganismus der Wahl bevorzugt verwendet werden. Zusätzlich können Analogons hergestellt werden, indem Reste substituiert oder deletiert werden, die nicht für die biologische Aktivität nötig sind. Solche Analogons können mittels den Bionachweisen, die oben beschrieben werden, identifiziert werden.

[0033] Die vorliegende Erfindung umfasst ferner Nukleinsäuren, die aus einer Säugetierhypophyse oder hypophysären Tumoren isolierbar sind und in der Lage sind unter hochstringenten Bedingungen an das 2,2 kb-Insert des Plasmids pBS-PDF1 zu hybridisieren und ferner in der Lage sind für den biologisch aktiven PDF zu kodieren. Hochstringente Hybridisierungsbedingungen sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und werden zum Beispiel in Sambrook et al. und Beltz et al. (1983) Methods Enzym. 100: 266 beschrieben. Hochstringente Bedingungen schließen zum Beispiel eine Hybridisierung bei 68°C in einer wässrigen gepufferten Lösung oder bei 42°C in 50% Formamid ein. Die Fähigkeit der isolierten Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung für den biologisch aktiven PDF zu kodieren, kann durch die funktionalen Nachweise, die oben beschrieben sind, bestimmt werden.

[0034] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf Vektoren, die die isolierten Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung umfassen. Die Vektoren sind für die Amplifikation und/oder Expression der Nukleinsäuren, die für den PDF kodieren, nützlich. In einer Ausführungsform umfassen die Vektoren der Erfindung die Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, wirksam verbunden mit geeigneten transkriptionalen und/oder translationalen regulatorischen Elementen, um die Expression des PDF's in einer geeigneten Wirtszelle zu bewirken. Die re-

gulatorischen Elemente können von Säugetiergenen, mikrobiellen, viralen oder Insektengen genen stammen und zum Beispiel Promotoren, Enhancer, Transkriptions- und Translationsinitiationssequenzen, Terminationssequenzen, Replikationsursprünge und Sequenzen einschließen, die für Leader- oder Transportsequenzen kodieren. Geeignete regulatorische Elemente werden nach der optimalen Expression in einer gewünschten Wirtszelle ausgewählt. Brauchbare Expressionsvektoren können durch Verfahren konstruiert werden, die einem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind, und sind auch kommerziell erhältlich. Rekombinante virale Vektoren, einschließlich retroviraler, parvoviraler, densovira ler und baculovira ler Vektoren, werden besonders bevorzugt.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Expressionsvektor einen starken konstitutiven oder induzierbaren Promotor, der wirksam mit einer Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, verbunden ist. Geeignete Promotoren sind gut bekannt und für Fachleute auf dem Gebiet fertig erhältlich und schließen zum Beispiel bakterielle, Hefe-, virale, Säugetier- und Insektenpromotoren ein. Expressionsvektoren, die mit Insekten- und Säugetierzellen kompatibel sind, werden besonders bevorzugt.

[0036] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt Wirtszellen bereit, die eine Nukleinsäure umfassen, die für den PDF kodiert. Die Wirtszellen, die die Nukleinsäure umfassen, sind für die Replikation und Expression der Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, brauchbar. Die Wirtszelle kann prokaryotisch oder eukaryotisch sein, einschließlich von bakteriellen, Hefe-, Insekten- oder Säugetierzellen. Insekten- und Säugetierzellen werden bevorzugt. Besonders bevorzugte Wirtszellen sind Insektenzelllinien, die zum Beispiel Spodoptera frugiperda- und Trichoplusiani-Zellen einschließen.

[0037] Die isolierten Nukleinsäuren oder Expressionsvektoren können in die Wirtszellen durch Verfahren eingeführt werden, die einem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind, einschließlich von Transformation, Transfektion und Infektion. Zum Beispiel kann eine Transfektion durch bekannte Verfahren wie einer Liposomen-vermittelte Transfektion, einer Calciumphosphat-vermittelte Transfektion, einer Transfektion mit nackter DNA, einer Mikroinjektion und einer Elektroporation durchgeführt werden. Transformationsverfahren für prokaryotische Zellen werden zum Beispiel von Cohen et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 beschrieben. Die Transformation von eukaryotischen Wirtszellen wird zum Beispiel von Sambrook et al. beschrieben.

[0038] Es werden auch Expressionssysteme, die baculovirale Vektoren und Insektenwirtszellen verwenden, bevorzugt. Die Verwendung von Baculoviren als rekombinante Expressionsvektoren, um Lepidoptera-Insektenzellen zu infizieren sind im Stand der Technik bekannt und werden zum Beispiel von Luckow et al. (1988) BioTechnology 6: 47 beschrieben.

[0039] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf den isolierten und aufgereinigten PDF und die biologisch aktiven Analogons und Fragmente davon. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat der isolierte und aufgereinigte PDF eine Aminosäuresequenz, die von der DNA in dem Plasmid pBS-PDF1 kodiert wird.

[0040] Der isolierte und aufgereinigte PDF kann durch die Einführung einer Nukleinsäure, die für den PDF kodiert, zum Beispiel durch Transformation, Transfektion oder Injektion, die Kultivierung der Wirtszelle unter Bedingungen, die für die Expression geeignet sind, und die Rückgewinnung des rekombinanten PDF's hergestellt werden. Der rekombinante PDF kann aus den Zellen oder dem Kulturmedium mittels Proteinaufreinigerungsverfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, zurückgewonnen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Expressionsvektor in Insekten- oder Säugetierwirtszellen eingeführt, der eine Nukleinsäure unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors umfasst, die für den PDF kodiert.

[0041] Biologisch aktive Analogons oder Fragmente des PDF's werden auf ähnliche Weise hergestellt, wobei eine Nukleinsäure, die für ein biologisch aktives Analogon oder Fragment des PDF's kodiert, verwendet wird. Das isolierte rekombinante Analogon oder Fragment kann mit dem oben beschriebenen Bionachweis identifiziert werden. Der Begriff "Analogons" schließt Substitutionen und Alterationen der Aminosäuresequenz des PDF's ein, wobei die Substitutionen und Alterationen die biologische Aktivität des PDF's aufrechterhalten. Aminosäureinsertionsderivate schließen amino- und carboxyterminale Fusionen und einzelne oder vielfache Intra-sequenzinsertionen ein. Deletionsvarianten haben eine oder mehrere Aminosäuren aus der Sequenz entfernt. Bei Substitutionsaminosäurevarianten wurde wenigstens ein Rest entfernt oder durch einen anderen Rest ersetzt. Biologisch aktive Fragmente sind Fragmente des PDF's oder der PDF-Analogons, die nicht die volle Länge des PDF-Polypeptids umfassen, die aber die biologische Aktivität des PDF's aufrechterhalten. Die biologisch aktiven Analogons und Fragmente können durch rekombinante Verfahren, wie zum Beispiel von Sambrook et al. beschrieben, hergestellt werden oder durch Peptidsynthesetechniken, die im Stand der Technik gut

bekannt sind wie der Festphasenpeptidsynthese.

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Förderung der Differenzierung von Brustkrebs- oder Prostatakrebszellen bereit, das die Kontaktierung der Brust- oder Prostatakrebszellen mit einer Menge des PDF's oder eines Analogons oder Fragments davon umfasst, die wirksam die Differenzierung fördert. Eine Menge des PDF's, die wirksam die Differenzierung fördert, ist die Menge, die die Differenzierung von Krebszellen durch irgendeinen der oben beschriebenen Differenzierungsbiomarker fördert.

[0043] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Behandlung von Brustkrebs bereit, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des PDF's oder eines Analogons oder Fragments davon an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf. Eine therapeutisch wirksame Menge des PDF's für die Brustkrebsbehandlung ist eine Menge, die zu einer Veränderung im Verhalten der bewachten (Englisch: sentinel) Tumormassen führt wie der morphologischen oder biochemischen Differenzierung, Reduktion der Tumormarker, Tumorregression, Apoptose oder partiellen Einstellung des Tumorwachstums oder der Tumordinvasion. Der PDF wird als pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht, die den PDF oder ein biologisch aktives Analogon oder Fragment davon und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.

[0044] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Behandlung von Prostatakrebs bereit, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen des PDF's oder eines Analogons oder Fragments davon an einen Patienten umfasst, der einer solchen Behandlung bedarf. Eine therapeutisch wirksame Menge des PDF's für die Prostatakrebsbehandlung ist eine Menge, die zu einer Veränderung im Verhalten der bewachten Tumormassen wie oben beschrieben führt. Der PDF wird als pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht, die den PDF oder ein biologisch aktives Analogon oder Fragment davon und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.

[0045] Die Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzungen ist im Allgemeinen im Stand der Technik bekannt und es kann zweckmäßig auf Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Auflage, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania verwiesen werden. Die Formulierung des PDF's oder biologisch aktiver Analogons und Fragmente davon für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung muß unter den Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein und muß auch vor der kontaminierenden Wirkung von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen bewahrt werden. Die Bewahrung vor der Kontamination mit Mikroorganismen kann durch die Zugabe von verschiedenen antibakteriellen und antifungalen Mittel erreicht werden.

[0046] Die pharmazeutischen Formen des PDF's, die zur Verabreichung geeignet sind, schließen sterile wässrige Lösungen oder Dispersionen und steriel Pulver für die extemporane Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen ein. In allen Fällen muss die Form steril und zu einem Ausmaß flüssig sein, dass eine leichte Spritzbarkeit besteht. Typische Träger schließen ein Lösungs- oder Dispersionsmedium ein, das zum Beispiel Wasser, gepufferte wässrige Lösungen (dass heißt biokompatible Puffer), Ethanol, Polyole wie Glycerol, Propylenglycol, Polyethylenglycol, geeignete Mischungen davon, oberflächenaktive Stoffe oder pflanzliche Öle umfasst. Die Sterilisation kann durch eine im Fach anerkannte Technik durchgeführt werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der Filtration oder der Zugabe von antibakteriellen oder antifungalen Mitteln, zum Beispiel von Paraben, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure oder Thimerosal. Ferner können isotonische Mittel wie Zucker oder Natriumchlorid in die Zusammensetzungen, die Gegenstand der Erfindung sind, inkorporiert werden.

[0047] Die Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen, die den PDF, der Gegenstand der Erfindung ist, enthalten, wird durch die Inkorporation dieser Verbindungen in der benötigten Menge in das geeignete Lösungsmittel mit verschiedenen Ingredienzien, die oben aufgelistet sind, bewerkstelligt, gefolgt, wenn erforderlich, von einer Sterilisation, vorzugsweise einer Filtersterilisation. Um ein steriles Pulver zu erhalten werden die oben genannten Lösungen gegebenenfalls vakuumgetrocknet oder gefriergetrocknet.

[0048] Der PDF, der Gegenstand der Erfindung ist, oder die Analogons oder Fragmente davon werden folglich für eine zweckmäßige und wirksame Verabreichung in pharmazeutisch wirksamen Mengen mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmittel in einer therapeutisch wirksamen Dosis entrichtet.

[0049] Wie hierin verwendet schließt der Begriff „pharmazeutisch akzeptabler Träger und/oder pharmazeutisch akzeptables Verdünnungsmittel“ irgendeines und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, antibakterielle und antifungale Mittel, Mikrokapseln, Liposomen, kationische Lipidträger, isotonische und absorptionsverzö-

gernde Mittel und dergleichen ein, die nicht mit den aktiven Ingredienzien inkompatibel sind. Die Verwendung solcher Medien und Mittel für pharmazeutisch aktive Substanzen sind im Stand der Technik gut bekannt. Es können auch zusätzliche aktive Ingredienzien in die Zusammensetzungen inkorporiert werden und in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0050] Die genaue therapeutisch wirksame Menge des PDF's, Analogons oder Fragments davon, welche in den Verfahren der Erfindung angewendet auf den Menschen verwendet werden soll, kann durch einen Fachmann mit gewöhnlichen Kenntnissen auf dem Gebiet unter Berücksichtigung der individuellen Unterschiede im Alter, Gewicht, Erkrankungsausmaß und Verfassung des Patienten bestimmt werden. Allgemein kann festgehalten werden, dass die pharmazeutische PDF-Präparation der vorliegenden Erfindung vorzugsweise in einer Menge von wenigstens etwa 1 mg pro Infusionsdosis, vorzugsweise in einer Menge von bis zu 10 mg pro Dosis oder mit einer Dosis verabreicht werden, die eine lokale Brust- oder Prostatagewebekonzentration von etwa 10^{-9} M bis 10^{-6} M erreicht.

[0051] Es ist besonders vorteilhaft paranterale Zusammensetzungen in Form von Dosierungseinheiten für eine einfache Verabreichung und die Einheitlichkeit der Dosierung zu formulieren. Die Dosierungseinheitform, wie sie hierin verwendet wird, bezieht sich auf physikalisch diskrete Einheiten, die für die zu behandelnden Säugetiere als einheitliche Dosierungen geeignet sind, wobei jede eine vorbestimmte Menge des aktiven Materials enthält, welche berechnet ist, um die gewünschte therapeutische Wirkung in Verbindung mit dem benötigten pharmazeutischen Träger zu verursachen. Die Spezifikation der neuartigen Dosierungseinheitsformen der Erfindung sind vorgegeben durch und hängen direkt von den einzigartigen Merkmalen des aktiven Materials (das heißt dem PDF, den Analogons oder den Fragmenten davon) und den Einschränkungen ab, die der Enrichtungsweise einer solchen aktiven Verbindung zur Behandlung von Brust- oder Prostatakrebs inhärent sind.

[0052] Die aktive Hauptingredienz wird für eine zweckmäßige und wirksame Verabreichung in wirksamen Mengen mit einem geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Träger in Dosierungseinheitsformen wie oben offenbart entrichtet. Im Fall von Zusammensetzungen, die zusätzliche aktive Ingredienzien enthalten, werden die Dosierungen in Bezug auf die gewöhnliche Dosis und Verabreichungsweise der Ingredienzien bestimmt.

[0053] In dem Behandlungsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können der PDF, die Analogons oder Fragmente davon auf eine Weise, die mit der Dosierungsformulierung kompatibel ist, in solchen Mengen verabreicht werden, wie sie therapeutisch wirksam sind, und auf irgendeinem Weg, der medizinisch akzeptabel für die Behandlung von Brust- und Prostatazellkrebs ist. Mögliche Verabreichungswege schließen Injektionen auf paranteralen Wegen wie intravaskulär, intravenös, intraarteriell, subkutan, intramuskulär, intratumoral, intraperitoneal, intraventrikulär oder intraepidural ein. Die Zusammensetzungen können auch direkt auf Gewebeoberflächen, zum Beispiel während einer Operation angewendet werden. Eine Verabreichung mit einer anhaltenden Freisetzung (Englisch: sustained release) ist auch spezifisch in der Erfindung durch Vorrichtungen wie Depotinjektionen oder erodierbaren Implantaten mit eingeschlossen.

[0054] Die Erfindung wird ferner durch die folgenden spezifischen Beispiele illustriert, welche nicht dazu gedacht sind den Bereich der Erfindung auf irgendeine Weise einzuschränken.

Beispiel 1

Hypophyseextrakte induzieren die Differenzierung von Brustkrebszellen und Prostatakrebszellen

[0055] Extrakte, die aus boviner Hypophyse und aus einem mammosomatischen Hypophysetumor hergestellt wurden, wurden hinsichtlich der Fähigkeit, die Differenzierung von Brustkrebszellen zu induzieren, bewertet.

[0056] Es wurden alkalische Hypophyseextrakte von dem mammosomatotropen Tumor MtTW10 und dem hypophysären Tumor MTW9-0M, erhalten von Dr. Untae Kim, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, wie durch Platica et al. (1992) Endocrinology 131: 2573, hergestellt. Der bovine Hypophyseextrakt wurde kommerziell von Collaborative Research, Bedford, MA, erhalten.

[0057] Die Hypophyseextrakte wurden zu serumfreien Kulturen von MTW9/P1 Rattenbrusttumorzellen, MCF-7 humanen Brustkrebszellen, normalen epithelialen Brustzellen und myelocytischen und lymphocytischen Leukämiezellen zugegeben. Nach 24 Stunden aggregierten die Brustkrebszellen, welche normalerweise als Einzelzellsuspensionen wachsen, und formten Sphäroide. Eine Elektronenmikroskopie zeigte Verände-

rungen, welche die Differenzierung in Richtung der normalen Brustdrüsenstruktur anzeigen, einschließlich der Polarisierung der Organellen, der Bildung einer lumenartigen Struktur, Junctionbildung und dem Auftauchen von intrazellulären sekretorischen Granulas. Northern- und Westernblots, die mittels Standardverfahren durchgeführt wurden, zeigten, dass der Hypophysaeextrakt die Expression von Laminin, Casein und Lactalbumin und die Überexpression von E-Cadherin in Brustkrebszellen induzierte. Normale epitheliale Zelle und myelocytische und lymphocytische leukämische Zellen wurden von der Behandlung mit dem Hypophysaeextrakt nicht beeinflusst.

[0058] Prostatakrebszellen wurden von der ATCC erhalten. Es wurden serumfreie Kulturen der Prostatakrebszellen mit dem Hypophysaeextrakt, hergestellt von Platica et al. wie oben beschrieben, behandelt und morphologisch und biologisch auf Differenzierungsanzeichen beurteilt. Der Hypophysaeextrakt induzierte die Differenzierung der Prostatakrebszellen, wie es mittels eines Bionachweises gemessen wurde.

[0059] Es wurden gleichermaßen aus Rattenleber und Rattennieren Extrakte hergestellt und zu den Zellkulturen wie oben beschrieben zugegeben. Die Rattenleber- und Rattennierenextrakte hatten keine Wirkung auf die Differenzierung der Brustkrebs- und Prostatakrebszellen.

[0060] Es wurden verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren, einschließlich dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF für Englisch: epidermal growth factor), transformierenden Wachstumsfaktor (TGF für Englisch transforming growth factor), thrombozytäre Wachstumsfaktor (PDGF für Englisch: platelet-derived growth factor), fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF für Englisch: fibroblast growth factor), insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF für Englisch: insulin-like growth factor) -I und II, Estradiol, Wachstumshormon und Prolactin, zu den Brustkrebszellkulturen zugegeben und hinsichtlich der Differenzierungsaktivität wie oben beschrieben bewertet. Keines der Hormone und keiner der Wachstumsfaktoren wies die Fähigkeit auf eine Differenzierung zu induzieren.

Beispiel 2

Identifikation eines Klonierungssystems für eine hypophysäre Differenzierungsaktivität

[0061] Es wurde ein Expressionsklonierungsverfahren entwickelt, um die hypophysäre Differenzierungsaktivität weiter zu charakterisieren. Um festzulegen, ob Xenopus-Oocyten ein geeignetes Expressionssystem sind, wurden die Xenopus-Oocyten auf die Abwesenheit einer hypophysären Differenzierungs-ähnlichen Aktivität, einer Toxizität für Brustkrebszellen in dem ausgewähltem funktionalem Nachweis und der Anwesenheit von Faktoren beurteilt, die eine hypophysäre Differenzierungsaktivität zerstören oder mit dieser interferieren können.

[0062] Der Aggregationsbionachweis für eine hypophysäre Differenzierungsaktivität hat die Sphäroidbildung von MCF-7-Brustkrebszellen gemessen. MCF-7-Zellen aggregieren und bilden Sphäroide als Antwort auf die hypophysäre Differenzierungsaktivität eines Hypophysenextrakts. Die Sphäroide wurden mittels Lichtmikroskopie sichtbar gemacht.

[0063] Das Oocytenlysats wurde durch die Homogenisierung der Oocyten in 0,15 M NaCl₂ erhalten, gefolgt von einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 15000 × g und 4°C und der Sammlung des Überstands. Es wurden verschiedene Mengen des Oocytenlysats, welches 50–400 µg Protein enthielt, und konditioniertes Medium, in welchem die Oocyten für 24 Stunden gehalten wurden, zu 1 ml-Kulturen zugegeben, die 1 × 10⁵ MCF-7-Zellen enthielten, gefolgt von einer Inkubation bei 37°C für 72 Std. Es wurden keine morphologischen Veränderungen oder toxischen Wirkungen auf die MCF-7-Zellen bei jeder Konzentration des Lysats oder Mediums beobachtet, was anzeigt, dass die Xenopus-Oocyten keine hypophysäre Differenzierungs-ähnliche Aktivität enthalten und dass das Oocytenlysats für Brustkrebszellen nicht toxisch ist.

[0064] Um zu bestimmen, ob die hypophysäre Differenzierungsaktivität in der Anwesenheit des Xenopus-Oocytenlysats aktiv bleibt, wurden Kulturen, die 1 × 10⁵ MCF-7-Zellen enthielten, mit 150 µg/ml Hypophysaeextrakt bei 37°C für 72 Std. in der An- oder Abwesenheit von verschiedenen Mengen des Oocytenlysats (50–400 µg/ml) inkubiert. Die Aggregationswirkung, welche durch den Hypophysaeextrakt induziert wurde, wurde von der Anwesenheit des Oocytenlysats nicht beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen an, dass die hypophysäre Differenzierungsaktivität in der Anwesenheit des Xenopus-Oocytenlysats aktiv bleibt.

[0065] Es wurde die Fähigkeit der Xenopus-Oocyten bestimmt eine hypophysäre Differenzierungsaktivität in Mengen zu exprimieren, die ausreichend für die Detektion mit den Aggregationsbionachweis sind. Es wurde

Poly (A)⁺-RNA von dem hypophysären Rattentumor MtTW10 mittels dem Guanidinium/Cäsiumchlorid (CsCl)-Zentrifugationsverfahren wie von Sambrook et al. in einer RNase-freien Umgebung hergestellt. Kurz, es wurde 1 g Gewebe in 5 ml 4M Guanidiniumthiocyanat, 0,1 Tris-HCl (pH 7,5) und 1% 2-ME bei Raumtemperatur homogenisiert. Dann wurden 9,7 ml Homogenat auf ein 3,3 ml Pad aus 5,7M CsCl und 4 mM EDTA, pH 7,5, geschichtet und bei 30000 rpm für 24 Stunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die RNA, welche auf dem Boden des Tubes pelletiert wurden, wurde in 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA und 0,1% SDS gelöst und dann mit Ethanol präzipitiert. Die Poly (A)⁺-RNA wurde durch das zweimalige Passieren der Gesamt-RNA über eine Oligo-dT-Cellulosesäule erhalten. Es wurden 17 µg der Poly (A)⁺-RNA aus 900 µg Gesamt-RNA erhalten. Dann wurden 20 ausgewachsene Oocyten (Stadium V und VI), welche in steriler MBS-Lösung bei 19°C gehalten wurden, mit 5 ml injiziert, die 50 ng mRNA pro Oocyte erhielten, wobei eine automatische Spritze verwendet wurde. Die Oocyten wurden dann in eine MBS-Lösung gegeben, die Penicillin und Streptomycin enthielt, und bei 19°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Überstände des Oocytenlysats (hergestellt wie oben beschrieben) und konditioniertes Medium (CM) der RNA-injizierten Oocyten auf die hypophysäre Differenzierungsaktivität getestet. Die Kulturen, welche 1×10^5 MCF-7-Zellen in 1 ml serumfreien RPMI enthielten, wurden in der Anwesenheit von verschiedenen Proteinkonzentrationen des Oocytenlysats (10–300 µg) oder CM (50–200 µl/Kultur) bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 72 Stunden wurde in den MCF-7-Kulturen, die mit dem Oocytenlysats behandelt wurden, eine Aggregation beobachtet, nicht jedoch in den CM-behandelten MCF-7-Zellen. Es wurde eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl der erhaltenen Aggregate und der Lysatproteinkonzentration wie in [Fig. 6](#) gezeigt beobachtet.

[0066] Es wurden ähnliche Experimente unter Verwendung von Poly (A)⁺-RNA aus Rattenleber durchgeführt. Weder das konditionierte Medium noch die Lysate von Oocyten, die mit der Leber-mRNA injiziert worden waren, hatten einen Effekt auf die MCF-7-Zellen.

[0067] Diese Ergebnisse zeigen an, dass eine hypophysäre Differenzierungsaktivität durch den Aggregationsnachweis sogar detektiert werden kann, wenn die gesamte Population der hypophysären mRNA in Xenopus-Oocyten exprimiert wurde.

[0068] Die vorangehenden Ergebnisse demonstrieren, dass die Xenopus-Oocyten keine hypophysäre Differenzierungs-ähnliche Aktivität enthalten, für MCF-7-Zellen nicht toxisch sind und die hypophysäre Differenzierungsaktivität nicht zerstören. Ferner exprimierten Xenopus-Oocyten, die mit hypophysärer mRNA injiziert worden waren, eine hypophysäre Differenzierungsaktivität auf einem Level, der durch den Aggregationsnachweis detektiert ist.

Beispiel 3

Charakterisierung der hypophysären Differenzierungsaktivität

[0069] Es wurde eine humane cDNA-Bibliothek von Clontech, Palo Alto, CA erhalten und auf die Anwesenheit einer cDNA getestet, die für eine hypophysäre Differenzierungsaktivität kodiert. Die cDNA-Bibliothek wurde direktional in die EcoRI-HindIII-Stelle des Lambda-Bluemid-Phagen kloniert, welcher eine Transkription von beiden Strängen des DNA-Inserts mit entweder der T7- oder T3-RNA-Polymerase ermöglicht. Es wurden 5 µl einer seriellen Verdünnung der Phagenbibliothek mit 200 µl K802 E. coli (OD₆₀₀ = 0,25) gemischt und bei 37°C 20 Minuten inkubiert. Dann wurden 3 ml geschmolzener 0,7% Agar mit 48°C zugegeben und die Mischung wurde oben auf einer 100 mm Platte, die 1,5% LB-Agar enthielt, verteilt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Plaques für jede Phagenverdünnung gezählt und der Bibliothekstitel mit 1×10^{10} pfu/ml bestimmt. Dann wurde ein Pool von 400000 pfu von jeder Bibliothek auf 20 Platten (20000 pfu pro Platte) ausplattiert und bei 37°C inkubiert, bis die Plaques etwa 1 mm Durchmesser erreicht hatten. Der obere Agar wurde dann in SM-Puffer (0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2% Gelatine) geerntet und die Bakterienzellen mit Chloroform lysiert. Der Agar und die bakterielle Debris wurden durch eine Zentrifugation bei 8000 × g für 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 µg/ml DNase I und 5 µg/ml RNase A für 1 Stunde bei 37°C behandelt und dann nochmals bei 8000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Phagenpartikel enthielt, wurde bei 25000 rpm (Beckman, SW27 ROTOR) für 2 Stunden bei 20°C zentrifugiert. Die pelletierten Phagen wurden dann in 0,5 M Tris-Puffer, pH 8, resuspendiert und mit 100 µg/ml Proteinase K für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, gefolgt von drei Phenol-, einer Pheno/Chloroform- und einer Chloroformextraktion und einer Ethanolpräzipitation.

[0070] Da in dieser Bibliothek die T3-RNA-Polymerase den (+)-Strang des klonierten Inserts synthetisiert, wurde die Phagen-DNA durch einen Verdau mit Sall linearisiert, das in der in multiplen Klonierungsregion auf der Seite des Inserts, die dem T3-RNA-Polymerasepromotor entgegengesetzt ist, schneidet. Für eine effizien-

te Translation wurde eine CAP-Stelle an das 5'-Ende des Transkripts hinzugefügt. Die Transkription erfolgte, mit geringeren Modifikationen, nach dem Protokoll nach Melton (Kroeg et al., 1987, Methods Enzymol. 155: 397), wie von Regec et al. (1995) Blood 85: 2711 beschrieben, wobei ein mMessage-mMachine-Kit von Ambion verwendet wurde, der 30–50 µg gecapete RNA pro µg Plasmid-DNA herstellen kann. Die Reaktion wurde in einem 20 µl Volumen unter Verwendung von 5 µg linearisierter Phagen-DNA durchgeführt und das Protokoll und die Reagenzien wurden von dem Hersteller bereitgestellt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde 1U RNase-freie DNase I pro µg DNA zugegeben und die Inkubation für 15 Minuten fortgesetzt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefolgt von einer Präzipitation mit einem halben Volumen 7,5 M NH₄-Acetat und drei Volumina Ethanol. Mit drei solcher Ehtanolpräzipitationen in Folge wurden 99% der nichteingebauten Nukleotide entfernt.

[0071] Es wurden 20 Oocyten mit 50 ng RNA pro Oocyte wie oben beschrieben injiziert, in MBS-Lösung, die Penicilin und Streptomycin enthielt, gegeben und bei 19°C für 3 Tage inkubiert. Das Oocytenlysat, das wie oben beschrieben hergestellt wurde, wurde dann an MCF-7-Zellen unter Verwendung des oben beschriebenen Bionachweises auf eine Differenzierungsaktivität getestet. Die behandelten Zellen bildeten Sphäroide ähnlich zu jenen, die von diesen humanen Brusttumorzellen in Anwesenheit des Hypophysextrakts gebildet wurden. Es wurde eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl an gebildeten Sphäroiden und dem Proteinlysat, das in dem Bionachweis verwendet wurde, beobachtet. (Bitte Daten bereitstellen). Diese Daten zeigen, dass die humane hypophysäre cDNA-Bibliothek von Clontech ein oder mehrere Klone enthält, die für eine hypophysäre Differenzierungsaktivität kodieren.

[0072] Der oben beschriebene Pool von 400000 pfu der hypophysären cDNA-Bibliothek wurde für eine Sib-Selektion verwendet. Von dem 400000 pfu-Pool wurden jeweils 10 Unterpools von etwa 40000 Plaques separat ausplattiert und bis sie eine Größe von etwa 1 mm erreicht hatten wachsen gelassen. Die Phagen-DNA von jedem Pool wurde hergestellt und mit der T3-RNA-Polymerase wie beschrieben gecapete Transkripte synthetisiert. Die RNA von jedem Unterpool wurde in 20 Froschoocyten injiziert (50 ng/Oocyte) und die Lysate an MCF-7-Zellen auf eine Differenzierungsaktivität getestet. Für jeden Bionachweis wurden Kontrollen mit mRNA von hypophysären Tumoren, mit Lysat von nichtinjizierten Oocyten und mit Hypophysextrakten angefertigt. Von den 10 analysierten Unterpools zeigten drei in dem Bionachweis eine aggregierende Aktivität. Der Unterpool Nr. 2 wies die stärkste biologische Aktivität auf und wurde für eine weitere Sib-Selektion ausgewählt. Dieser Unterpool wurde in 10 Unterpools von jeweils etwa 4000 pfu aufgeteilt, mit denen wie oben beschrieben verfahren wurde. Von diesen Unterpools wies der Unterpool Nr. 6 die stärkste Differenzierungsaktivität auf und wurde weiter in 10 Unterpools aufgeteilt (jeder enthielt mehr als 400 pfu), mit welchen ähnlich verfahren wurde. Dieses Verfahren wurde weiter fortgesetzt, indem weitere positive Pools aufgeteilt und auf eine Differenzierungsaktivität gescreend wurden, bis ein einzelner positiver Klon, der für den hypophysären Differenzierungsfaktor kodiert, identifiziert war.

[0073] Der identifizierte PDF-cDNA-Phagenklon wurde in eine Plasmidklon konvertiert, wobei das Verfahren von Clontech gefolgt wurde. Die Phage-DNA wurde mit NotI verdaut, um die pBLUESCRIPT-Plasmid-DNA, die das cDNA-Insert enthält, freizusetzen. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion und einer Ethanolpräzipitation wurde die verdaute Plasmid-DNA ligiert und verwendet, um kompetente DM5 alpha E. coli (Gibco, BRL) zu transformieren. Die Kolonien wurden auf Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin wachsen gelassen und enthielten das Blueskript-Plasmid mit der klonierten PDF-cDNA.

[0074] Um zu versichern, dass der Plasmidklon eine cDNA erhielt, die für einen PDF kodiert, wurde das Transkript von der cDNA mit der T3-RNA-Polymerase synthetisiert und in Xenopus-Oocyten translatiert. Das Oocytenlysat wurde wie oben beschrieben auf eine PDF-Aktivität getestet. [Fig. 1](#) zeigt MCF-7-Zellen, die mit dem Kontroll-CM inkubiert wurden. [Fig. 2](#) zeigt MCF-7-Zellen, die mit dem Oocytenlysat behandelt wurden, welches das cDNA-Transkript enthielt. Die behandelten Zellen aggregierten und bildeten Sphäroide und somit wurde bestätigt, dass der cDNA-Klon für den PDF kodiert. Die Plasmid-DNA wurde dann für eine Sequenzierung vorbereitet.

[0075] Es wurden 500 ml Ampicillin/LB-Medium mit 0,5 ml einer Stocksuspension von E. coli inokuliert, welche das Plasmid, das die PDF-cDNA enthielt, trugen, unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 8000 × g für 20 Minuten bei 4°C pelletiert und die Plasmid-DNA mittels dem Verfahren der alkalischen Lyse von Birnboim und Dolly (1979) Nucleic Acid Res, 7: 1573 hergestellt. Das bakterielle Pellet wurde in 10 ml 50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 10 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert. Nach einer Behandlung mit Lysozym wurden die bakteriellen Zellen mit 0,2 N NaOH und 1% SDS für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Dann wurden 15 ml 3 M kaltes Natriumacetat zugegeben. Die Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis gestellt und mit 4000 × g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der vor-

nehmlich die Plasmid-DNA enthielt, wurde gefiltert und mit 0,6 Volumina Isopropanol präzipitiert. Die Nukleinsäure wurde durch eine Zentrifugation mit 5000 rpm für 15 Minuten sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst.

[0076] Es wurden CsCl/Ethidiumbromidgradienten nach Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, hergestellt. Es wurde 1 g CsCl in jeweils 1 ml der Plasmidpräparation gelöst und 80 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro ml CsCl-DNA-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation mit 60000 rpm für 24 Stunden bei 20°C in einem Ti 65-Rotor war die bakterielle DNA in zwei Banden aufgetrennt: obere Bande enthielt die lineare, chromosomale und genickte zirkuläre Plasmid-DNA und die untere Bande bestand aus der geschlossenen zirkulären superhelikalen Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde wiedergewonnen, das Ethidiumbromid mit 1-Butanol extrahiert und nach der Entfernung des CsCl mittels Dialyse wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert.

[0077] Die Sequenzierung der PDF-cDNA wurde in der Core Facility of Mount Sinai Medical School, New York, durchgeführt, wobei das Verfahren der Dideoxykettentermination von Sanger et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463, verwendet wurde. Es wurde jeder Teil des Klons von sowohl der Vorwärts- als auch reversen Orientierung sequenziert. Es wurden 530 Nukleotide des 2,2 kb-Inserts unter Verwendung von M13-20 und den reversen Primer von der Bluescript-Plasmidsequenz sequenziert. Die 530 Basenpaare der PDF-cDNA haben die Nukleotidsequenz, dargelegt in SEQ ID NO: 1. Die Sequenz wurde mit dem DNASIS-Programm (Hitachi Software Engineering Co.) auf eine Homologie mit anderen Sequenzen der GENBANK und des EMBL analysiert. Es wurde keine einfache Homologie dieser Sequenz mit irgendeiner Sequenz aus der GENBANK-Datenbank gefunden. Die größte gefundene Maximalübereinstimmung war 72,5% über einen Bereich von 98 Basenpaaren, was anzeigt, dass der PDF ein neuartiges Polypeptid ist.

Beispiel 4

Wirkung des PDF's auf prostatistische Krebszellen

[0078] Die humane prostatistische Zelllinie DU145 wurde von der American Type Culture Collection erhalten und in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) (BioWhittaker, Walkersville, MC), 10 IU Penicillin/ml 50 mg Streptomycin/ml, bei 37°C in einer humidifizierten Atmosphäre wachsen gelassen, die 5% CO₂ enthielt.

[0079] Um die Wirkung des PDF's auf diese Zellen zu beobachten, wurden Kulturen, die 1×10^5 DU-145-Zellen in serumfreiem RPMI 1640-Medium enthielten, mit verschiedenen Konzentrationen des PDF's (50–300 µg/ml Kultur) behandelt. Drei Tage später wurden die Kulturen auf die Bildung von Sphäroiden ausgewertet. Es wurde eine Korrelation zwischen der PDF-Konzentration und der Anzahl an gebildeten Sphäroiden gefunden, wie in dem Graph in der [Fig. 7](#) dargestellt.

[0080] [Fig. 3](#) zeigt DU145-Zellen, die in Abwesenheit des PDF's kultiviert wurden. [Fig. 4](#) illustriert die morphologischen Veränderungen, die durch 150 µg PDF/ml in den DU145 prostatistischen Krebszellen nach 72 Stunden induziert wurden. Die PDF-behandelten Zellen aggregierten und bildeten Sphäroide ähnlich zu jenen, die von den Brustkrebszellen, die mit dem PDF behandelt wurden, erzeugt wurden.

Beispiel 5

Sequenzierung und Expression des PDF's

[0081] Es wurde die vollständige Sequenz der PDF-cDNA, beschrieben in Beispiel 3, mittels einer Primerextensionsstrategie wie zum Beispiel von Sambrook et al. beschrieben bestimmt. Von der vollständigen Sequenz wurden die Start- und Stopcodons, der offene Leserahmen und die abgeleitete Aminosäuresequenz bestimmt.

[0082] Es wurden baculovirale Expressionsvektoren, die die für den PDF kodierende cDNA enthielten, hergestellt. Die PDF-cDNA wurde in den baculoviralen Vektor AcNPv kloniert und der rekombinante baculovirale Vektor verwendet, um Zellen der Insektenzelllinie Sf21 zu transformieren. Das Baculovirus/Insektenystem wird kultiviert, um den rekombinanten PDF zu exprimieren, welcher dann aus dem Kulturmedium oder den Zellextrakten aufgereinigt wird. Die biologische Aktivität des rekombinanten PDF's wurde durch den in vitro Aggregationsnachweis bestätigt.

Wirkung des rekombinanten PDF's auf das Tumorwachstum

[0083] Es wurden nackte Mäuse, die den Brusttumor MTW9 trugen, mittels Transplantation, wie von Diamond et al. (1976) Cancer Research 36: 77 beschrieben, erhalten. Mittels einer intraperitonealen Injektion wurde der rekombinante PDF an die tumortragenden Mäuse für 21 Tage mit einer Dosierung von 50 µg/kg pro Tag verabreicht. Die Reduktion der Tumorgroße in Reaktion auf die Behandlung mit dem PDF wurde in regelmäßigen Abständen durch die Messung der Tumurlänge, -breite und -höhe mit Messschiebern (Englisch: calipers) bewertet und das Tumolvolumen berechnet.

[0084] Es sind verschiedene Publikationen hierin zitiert und die Inhalte davon sind hiermit durch Referenz in ihrer Gesamtheit enthalten.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Platica et al.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Differenzierungsfaktor der
Hypophyse und Methoden zu seiner Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) EMPFÄNGER: Brumbaugh, Graves, Donohue & Raymond

(B) STRASSE: 30 Rockefeller Plaza

(C) STADT: New York

(D) STAAT: NY

(E) LAND: U.S.A.

(F) ZIP: 10112-0228

(v) COMPUTERLESBARE FORM

(A) MEDIUMTYP: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5

(vi) DERZEITIGE ANMELDEDATEN

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDEDATUM:

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN

- (A) ANMELDENUMMER: USSN 60/021,589
- (B) ANMELDEDATUM: 11. Juli 1996

(viii) ANWALT/KANZLEIINFORMATION

- (A) NAME: Clark, Richard S
- (B) REGISTRATIONSNUMMER: 26,154
- (C) REFERENZ/PROZESSLISTENNUMMER: AP30487
165/33281

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

- (A) TELEFON: 212-408-2558
- (B) TELEFAX: 212-765-2519

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 538 Nukleinsäuren
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) URSPRUNGSQUELLE

- (A) ORGANISMUS: Mensch

(iv) MERKMAL

- (A) NAME:/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKATION
- (C) WEITERE INFORMATION: hypophysärer
Differenzierungsfaktor

(v) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

ACGCCAAGCT CTAATACGAC TCACTATAGG GAAAGCTGGT
ACGCCTGCAG GTACCGGTCC GGAATTCCCG GGTCGACGAA
TCCGCGGNCG CCCTATAGTG AGTCGTATTA CGCGCCGATT
NAGGTGACAC TATAGNCCGA TTTAGGTGAC ACTATAGTCG
ATTTAGGTGA CACTATAGTG AGTCGTATTA GAAGCTTGGC
GATTTAGGTG ACACTATAGN CCGATTTAGG TGACACTATA
GTCGATTTAG GTGACACTAT AGTCGGGCCG CCCTATAGTG
AGTCGTATTA GCGGTCGATT TAGGTGACAC TATAGTCGTA
TTAGCCGCC TATAGTGAGT CGTATTACGC GCCGATTTAG
GTGACACTAT AGTCGTATTA GCCGCCCTAT AGTGAGTCGT
ATTACGCGCC GATTTAGGTG ACACTATAGN CGACGAATTC
GCGGCCGCTC TAGAGGATCC AAGCTTACGT ACGCGTGCAT
GCGACGTCAT NNTCTTCTTT AGTGTC AACC TAAATCAATC
ANTGGCCGCC GGTTACAA

Patentansprüche

1. Isolierter, biologisch aktiver hypophysärer Differenzierungsfaktor (PDF), der eine Aminosäuresequenz hat, die von DNA kodiert wird, welche unter hochstringenten Bedingungen mit dem 2,2 kb-Insert in dem Plasmid pBS-PDF1, ATCC Nr. 97648, hybridisiert; oder ein biologisch aktives Substitutions-, Insertions- oder Deletionsanalogon oder -fragment des besagten PDF's.
2. Isolierte Nukleinsäure, die für einen hypophysären Differenzierungsfaktor nach Anspruch 1 kodiert.
3. Vektor, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 enthält.
4. Vektor nach Anspruch 3, welcher ein Expressionsvektor ist.
5. Vektor nach Anspruch 3, welcher das Plasmid pBS-PDF1, ATCC Nr. 97648, ist.
6. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven hypophysären Differenzierungsfaktors (PDF), welches die Einführung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 in eine Wirtszelle, die Kultivierung der besagten Wirtszelle unter Bedingungen, bei welchem die besagte Nukleinsäure exprimiert wird, und die Gewinnung des PDF's umfasst.
7. Hypophysärer Differenzierungsfaktor nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von Brustkrebs.
8. Hypophysärer Differenzierungsfaktor nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von Prostatakrebs.
9. Verwendung des hypophysären Differenzierungsfaktors nach Anspruch 1 bei der Herstellung einer Formulierung zur Behandlung von Brustkrebs.
10. Verwendung des hypophysären Differenzierungsfaktors nach Anspruch 1 bei der Herstellung einer For-

DE 697 33 320 T2 2006.06.08

mulierung zur Behandlung von Prostatakrebs.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

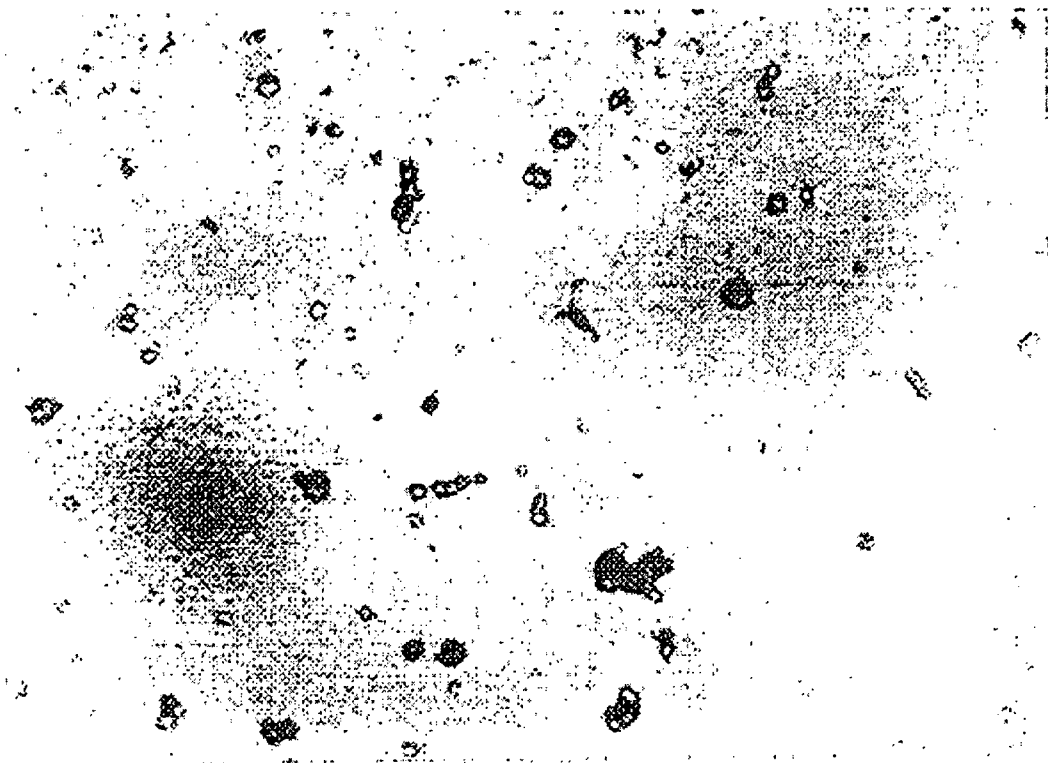


FIG. 1

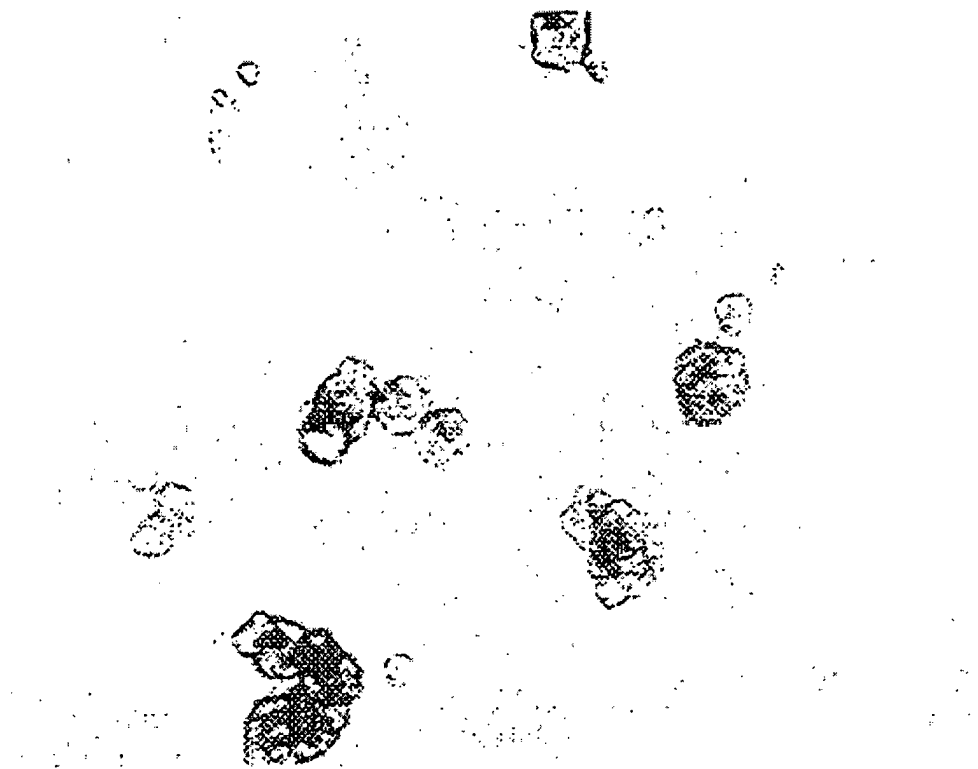


FIG. 2

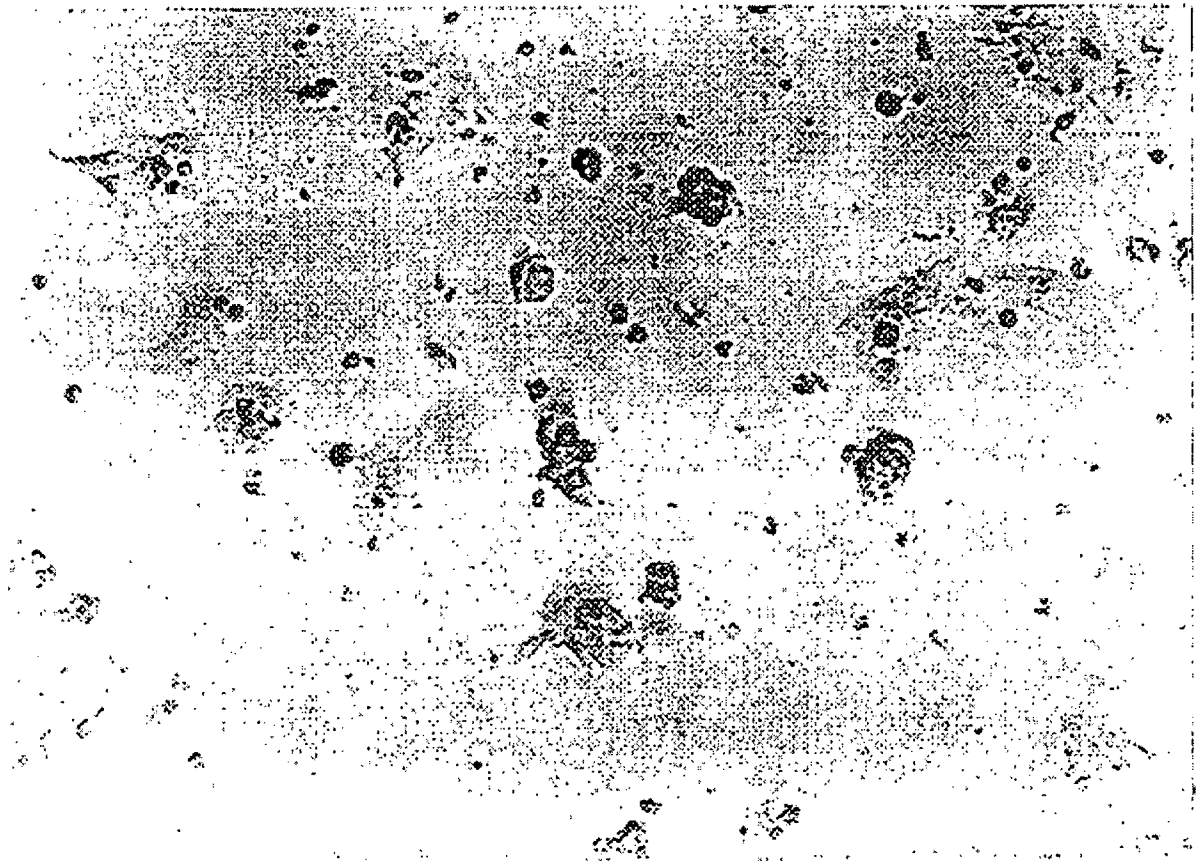


FIG. 3

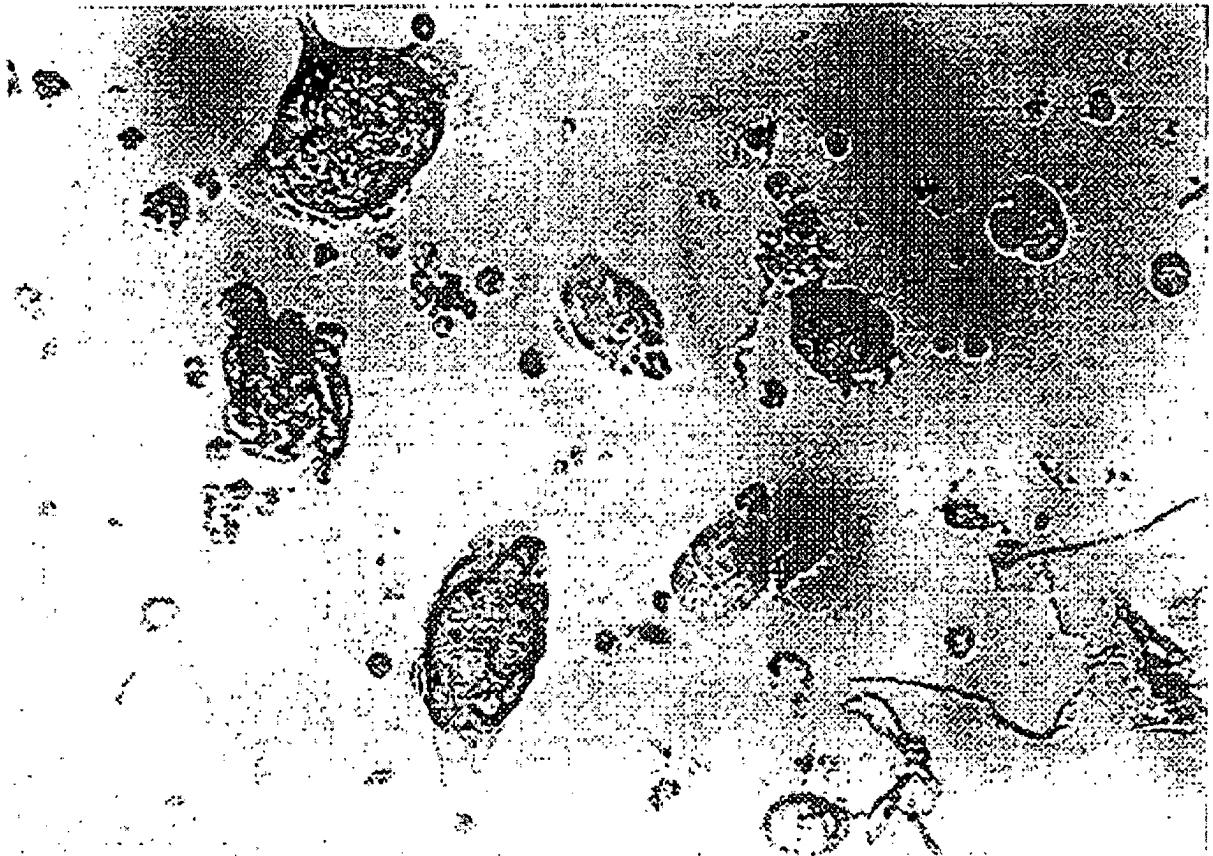


FIG. 4

ACGCCAGCTCTAATACGACTCACTA TAGGGAAGCTGGTACGCC TGCAGGTACGGTCCGG AATTCC
CGGGTCGACGAATCCGGGNGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGGCCGATTNAGGTGACACTATAGN
CCGATTTAGGTGACACTATAGTCGATTTAGGTGACACTATAGTGAGTCGTATTAGAAGCTTGGCGATT
TAGGTGACACTATAGNCCGATTTAGGTGACACTATAGTCGATTTAGGTGACACTATAGTCGGCCGCC
CTATAGTGAGTCGTATTAGGCGTCGATTTAGGTGACACTATAGTCGTATTAGCCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACGGCCCGATTTAGGTGACACTATAGTCGTATTAGCCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCG
CCGATTTAGGTGACACTATAGNCGACGAATTCGGCCCGCTC TAGAGGATCCAAGCTTACGTACGCGT
GCATGGACGTCATNNTCTTTAGTGTCAACCTAAATCAATCANTGGCCCGGTTACAA

FIG. 5

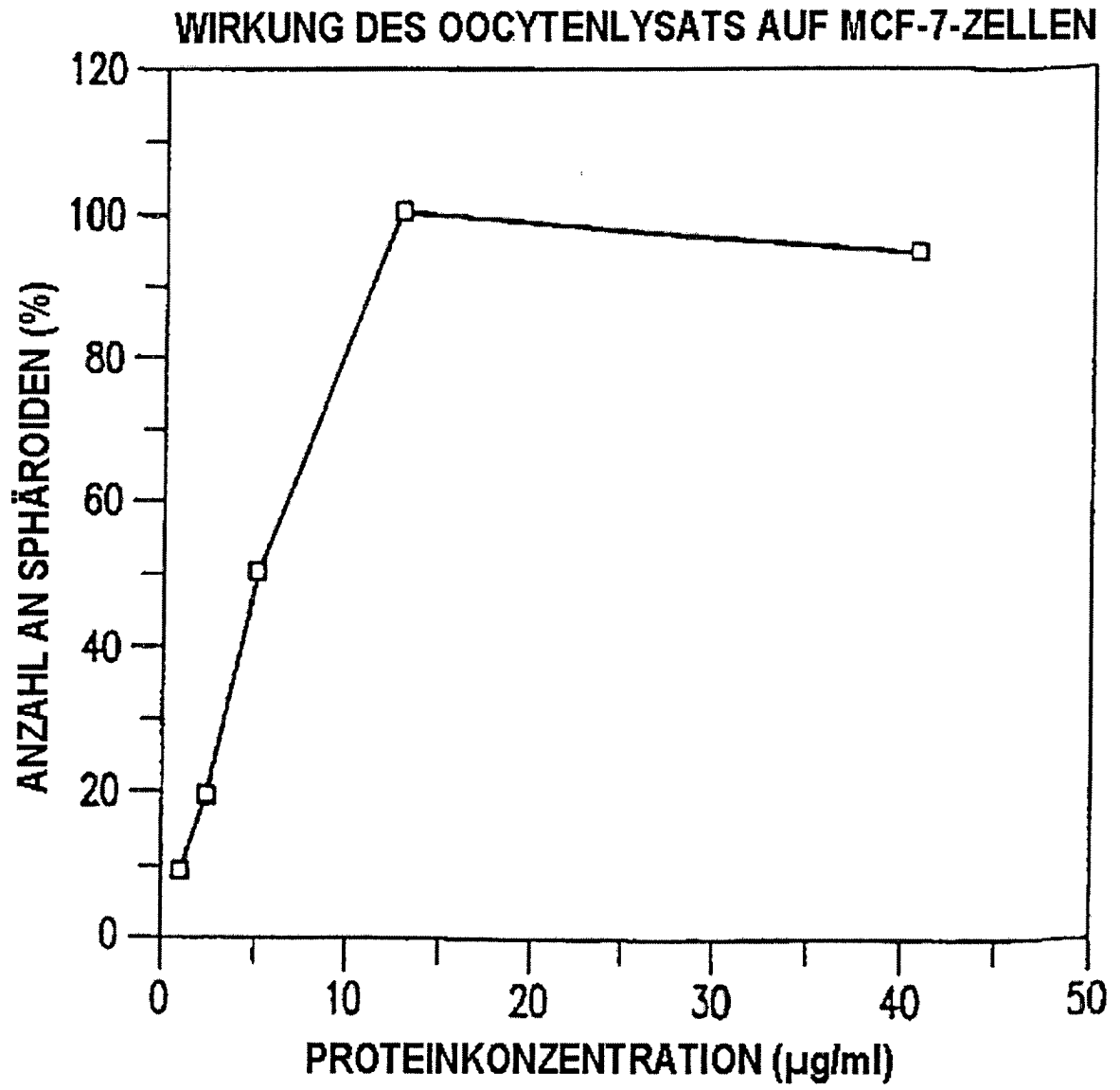


FIG. 6

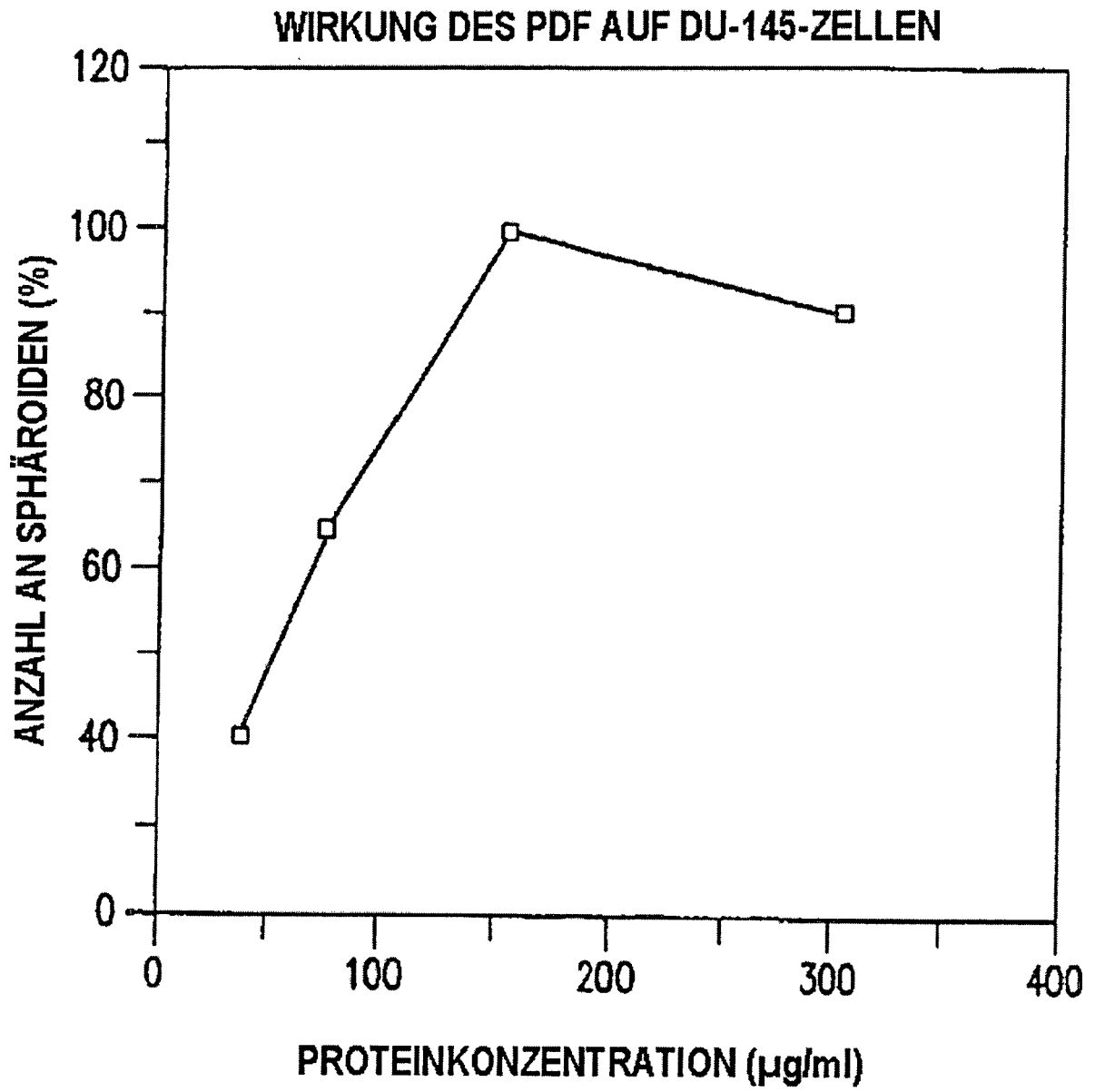


FIG. 7