(19) REPUBLIK ÖSTERREICH Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 069 B**

(12) # PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 360/99
(22) Anmeldetag: 03.03.1999
(42) Beginn der Patentdauer: 15.01.2001
(45) Ausgabetag: 27.08.2001

(51) Int. Cl.[7]: **A61K 35/54**
A61K 31/03, 47/42, A61P 35/00

(73) Patentinhaber:
TICHONOV ALEXANDROS
A-1190 WIEN (AT).

(54) STOFFGEMISCH

(57) Die Erfindung betrifft ein Stoffgemisch, enthaltend onkofetales Alpha-Fetoprotein (AFP) und ein Zytotoxikum aus der Gruppe der polychlorierten Biphenyle, aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzofurane und/oder aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzodioxine.

AT 408 069 B

Die Erfindung betrifft ein Stoffgemisch.

Der Anteil von hormonabhängigen Geschwülsten (Tumoren) an bösartigen Neubildungen im menschlichen Körper ist zahlenmäßig erheblich. Als die häufigsten Formen gelten der Gebärmutterkrebs (bis zu 80% der Geschwülste der weiblichen Geschlechtsorgane), der Milchdrüsenkrebs (in einigen Ländern die häufigste Geschwulstart bei Frauen), Krebs der Eierstöcke (bis zu 16% der Geschwülste der weiblichen Geschlechtsorgane), Krebs der Vorsteherdrüse (2 bis 3% aller Geschwülste bei Männern). Seltener kommen in der klinischen Praxis Krebs von Leber und Thymus vor. Die Behandlung von hormonabhängigen Geschwülsten ist öfters operativer Art. Jedoch sind in vielen Fällen wegen der Ausbreitung der Geschwulst die Bestrahlung und Chemotherapie notwendig.

Der Erfolg von der Arzneimitteltherapie hängt großteils von der zytostatischen und/oder zytotoxischen Wirkung der Geschwulst-Präparate auf die Krebszellen ab. Das onkofetale Eiweiß des menschlichen Blutserums Alpha-Fetoprotein (im Folgenden kurz: AFP genannt) findet für diese Ziele seit langem schon Anwendung. Bekannt ist AFP für sein selektives Eindringen in die Geschwulstzellen, welche auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für dieses Eiweiß (Rezeptorendozytose) besitzen; hierbei sind die normalen Zellen eines erwachsenen Organismus nicht zur AFP-Resorption geeignet [1,2]. Erstmals hat Doktor Deutsch der Universität in Madison (Staat Viskonsin, USA) das AFP zur gezielten Beförderung des Zytostatikums Daunomizin verwendet [3]. In Rußland geht die zweite Etappe der klinischen Prüfungen des Antigeschwulstpräparates auf Basis von einem fetalen menschlichen AFP (als Transporteiweiß) und einem kovalenten Doxorubicin-Estron-Verbund (als Zytostatikum) im onkologischen wissenschaftlichen Blochin-Zentrum in Moskau erfolgreich zu Ende [4].

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Stoffgemisch mit verbesserter und spezifischer Wirkung gegen insbesondere hormonabhängige Geschwülste zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird durch ein Stoffgemisch gelöst, welches onkofetales Alpha-Fetoprotein (AFP) und ein Zytotoxikum aus der Gruppe der polychlorierten Biphenyle, aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzofurane und/oder aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzodioxine enthält.

Es hat sich gezeigt, daß ein Stoffgemisch der erfindungsgemäßen Zusammensetzung die biologische Aktivität der freien (nicht im Gemisch mit AFP) erfindungsgemäß vorliegenden Zytotoxika erheblich erhöht. Weiters weist das erfindungsgemäße Stoffgemisch eine hohe Selektivität in Bezug auf verschiedene Zelllinien auf.

Bevorzugt stammt das Zytotoxikum aus der Gruppe von Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), 1,2,3,7,9-Pentachlordibenzofuran, 2,3,4,7,8-Pentachlordibenzofuran, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzofuran sowie 1,3,6,8-Tetrachlordibenzofuran. Besonders bevorzugt ist das Zytotoxikum Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD).

TCDD stellt eine der toxischsten chemischen Verbindungen dar [5-7]. Die Eignung von TCDD zum Töten der Zellen nach einem apoptotischen Mechanismus (programmierbares Zugrundegehen von Zelle, PCD) ist bekannt [8,9]. Insbesondere kommt diese apoptotische TCDD-Wirkung bei Zellen von hormonabhängigen Organen und Geweben zum Ausdruck. Insbesondere werden in diesem Zusammenhang Gebärmutter, Milchdrüse, Thymus, Eierstöcke und Vorsteherdrüse erwähnt [9-12]. Es wurde entdeckt, dass das TCDD in vitro und in vivo eine außerordentlich hohe zytotoxische Aktivität gegenüber menschlichen Krebszellen der Milchdrüse, Gebärmutter und Eierstöcke aufweist [13-15]. Aber bis vor kurzem blieben für eine klinische Anwendung von TCDD zwei Hauptprobleme ungelöst:

1) Eine geringe TCDD-Löslichkeit im wässrigen Medium (TCDD ist eine hochhydrophobe Verbindung, was seine Anwendung in wässrigen Systemen verhindert).

2) Die ungenügende Selektivität von TCDD auf Zielzellen (eine TCDD-Injektion in den Körper führt neben einer geschwulsthemmenden Aktivität zur Entstehung vielfacher toxischen Systemreaktionen).

Es wurde nun gefunden, dass TCDD imstande ist, sich an menschliches fetales AFP zu binden. Als Folge entsteht ein nichtkovalentes AFP-TCDD-Konjugat in einem molaren Verhältnis von AFP:TCDD = 1:2.

Es zeigt sich, dass in diesem Konjugat eine Steigerung der TCDD-Löslichkeit in wässrigen Medien etwa um das 5000-fache im Vergleich zu freiem TCDD erreicht werden kann. Durch den

Einsatz von AFP als Transporteiweiß kann weiters eine hohe spezifische Selektivität in Bezug auf verschiedene Zielzellen erreicht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das erfindungsgemäße Stoffgemisch als lyophilisiertes Pulver vor. Es hat sich gezeigt, dass das Konjugat aus AFP und TCDD als lyophilisiertes Pulver über längere Zeit ohne Änderung des Verhältnisses AFP/TCDD und ohne Einbußen an biologischer Aktivität lagerbar ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird auch durch ein Arzneimittel gelöst, welches das erfindungsgemäße Stoffgemisch enthält. Weiters wird die Aufgabe der vorliegenden Erfindung durch ein Arzneimittel zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von hormonabhängigen Geschwülsten, insbesondere Tumoren, gelöst, welches ein erfindungsgemäßes Stoffgemisch enthält.

Es zeigt sich, dass das erfindungsgemäße Arzneimittel gegenüber den Zellen des menschlichen T-Zellen-Lymphoms CEM, den menschlichen Krebszellen der Milchdrüse MCF-7 und menschlichen Hepatomzellen HepG2 eine ausgesprochen gute zytotoxische Aktivität in vitro entwickelt. Erfindungsgemäße Arzneimittel können zur Behandlung der Gebärmuttergeschwulst, von Milchdrüsenkarzinom, von Eierstöcken-, Vorsteherdrüse-, Leber-, Hoden- und Thymuskrebs verwendet werden.

Mit dem vorliegenden erfindungsgemäßen Stoffgemisch sowie dem erfindungsgemäßen Arzneimittel wird es somit ermöglicht, ein Verfahren zur Unterdrückung des Krebszellenwachstums von hormonabhängigen Organen zur Verfügung zu stellen.

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Stoffgemisches wird bevorzugt ein molarer Überschuss an Zytotoxikum in Dioxan aufgelöst, dieser Lösung die benötigte Menge an AFP gelöst in Phosphatpuffer langsam zugegeben, die Reaktionsmasse inkubiert und der gebildete Komplex auf einer Säule von überschüssigem Ausgangsmaterial und Verunreinigungen abgetrennt.

Als Ergebnis des Verfahrens wird ein stabiler, nicht kovalenter TCDD/AFP-Verbund mit einem molaren Verhältnis von Liganden zu Eiweiß gleich 2:1 erzielt. Dieser Verbund weist eine hohe Wasserbeständigkeit auf. Die Messungen ergaben, dass das TCDD/AFP-Verhältnis bei einer Lagerung des erzeugten Verbundes in wässriger Pufferlösung bei einer Temperatur von +4°C zumindest 15 bis 20 Tage stabil bleibt.

Nach einer Lyophilisation aus dem wässrigen Puffer im Beisein von Mannitol als Stabilisator und bei einer Lagerung unter Inertgas bei einer Temperatur von -70°C wurden innerhalb von 60 Tagen weder Änderungen am Verhältnis TCDD/AFP noch Einbußen an biologischer Aktivität festgestellt.

Im Falle der Verwendung einer Standardmethode, die zur Erzeugung eines Überschusses an gebundenem TCDD und sowie zur Abtrennung von überschüssigem freiem TCDD vom erzeugten Verbund mittels Gel-Filtration dient, hängt der TCDD-Gehalt im AFP-hältigen Verbund von der ursprünglichen Eiweißkonzentration, dem Verhältnis des Probevolumens zu Säulenvolumen und -geometrie, dem verwendeten Elutionsmittel und anderen Faktoren ab. Üblicherweise lag die TCDD-Konzentration im erzeugten Verbund bei 2 bis 7 µg/ml. Durch den Einsatz von modernen Membraneinrichtungen zur Eiweißkonzentrierung lässt sich die TCDD-Konzentration auf 10 bis 30 µg/ml ohne wesentliche Verluste oder Änderungen in der Stöchiometrie des Verbundes steigern.

Beispiele

1) Erhalt von menschlichem Alpha-Fetoprotein (AFP):

Fraktionierung mit Ammoniumsulfat:

Es wurde nach der Prüfung auf Hepatitis B-Antigene, Syphilis und AIDS ein Nabelserum nach einer normalen Geburt bei einer Schwangerschaftsdauer von 32 bis 40 Wochen erhalten. Die aus diesen Tests negativ ausfallenden Serumproben wurden eingefroren und bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -70°C aufbewahrt. Vor dem Beginn der AFP-Ausscheidung wurde das Serum aufgetaut (12 Stunden bei +4°C). Die unlöslichen Bestandteile wurden mit einer Zentrifuge beseitigt (Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14 Beckman, USA; 30 Minuten, 10 000 U/min). Dem Überstand wurde unter Rühren und Abkühlen mit Eis eine kalte gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung bis

zum Erreichen der 30%igen Sättigung zugemischt. Nach der Zugabe der notwendigen Sulfatmenge wurde die Lösung zur Sedimentbildung ruhig in einem Kühlschrank bei +4°C über Nacht stehen gelassen. Das Sediment wurde wiederum mit einer Zentrifuge (40 min, 10 000 U/min) abgetrennt. Dem Überstand wurde unter Rühren und Abkühlen mit Eis trockenes Ammoniumsulfat bis zum Erreichen der 70%igen Sättigung zugemischt. Nach der Zugabe der notwendigen Sulfatmenge wurde die Lösung zur Sedimentbildung ruhig in einem Kühlschrank bei +4°C über Nacht stehen gelassen. Das Sediment wurde wiederum mit einer Zentrifuge (45 min, 10 000 U/min) abgetrennt. Das erhaltene Sediment wurde in einer 10 mM Natriumphosphat-Lösung pH 7.3 (das Endvolumen betrug gewöhnlich 65-70% vom Ausgangs-Serumvolumen) gelöst und zur Beseitigung vom Ammoniunsulfat gegen 10 l 10 mM Phosphatpuffer in einer semipermeablen Membran vom Typ "künstliche Niere" dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Lösung zentrifugiert (45 min, 10 000 U/min) und die erhaltene helle Lösung auf die Affinitätschromatographiesäule mit den zum AFP spezifischen monoklonalen Antikörper aufgetragen.

Ausscheidung monoklonaler Antikörper

Ascites-Flüssigkeit (100-150 ml) wurde aufgetaut und das Sediment mit der Zentrifuge (Rotor JA-20, 500 U/min, 20 Minuten) abgetrennt. Der Flüssigkeit wurde unter Rühren und Abkühlen mit Eis das gleiche Volumen von gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben und die Mischung für 12 Stunden bei +4°C stehen gelassen. Das Sediment wurde durch Zentrifugation auf übliche Weise abgetrennt. Die Flüssigkeit wurde abgelassen, das Sediment in 100 ml 20 mM Phosphatpuffer, der 150 mM Natriumchlorid enthält, pH 7,3 (PSP) aufgelöst. Um das Ammoniumsulfat zu beseitigen, wurde gegen denselben Puffer dialysiert. Dann wurde die Lösung auf eine mit Protein A modifizierte Agarose ((Protein A Sepharose (Pharmacia, Schweden)) gefüllte Säule (1,6 x 10 cm) aufgetragen. Das Eiweiß im Eluat wurde mittels Photometer bei 280 nm (Unicord SII (LKB, Schweden)) detektiert. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit PSP bis zur Stabilisierung der Detektor-Basislinie gewaschen und die Antikörper aus der Säule mit 0,1 M Natriumcitrat-Buffer, pH 4,0 eluiert. Unmittelbar nach der Elution des Proteinpeaks aus der Säule wurde das Eluat mittels gedünnter NaOH-Lösung auf einen neutralen pH-Wert gebracht und die Lösung auf der Polycarbonat-Membran (PM-30 (Amikon, Niederlande)) konzentriert.

Vorbereitung der Affinitätschromatographiesäule

Das Affinitätssorbens (100-140 ml) auf der Basis von monoklonalen Antikörpern und modifizierter Agarose ((Sepharose CL-4B (LKB-Pharmacia, Schweden)) wurde gemäß der Standardmethode für die Aktivierung von modifizierter Agarose (Sepharose) mit Bromcyan in Aceton mit Triethylamin als Katalysator [16] erhalten. Nach der Konjugation mit monoklonalen Antikörpern wurden die Nebenprodukte der Reaktion vom Sorbens abgewaschen, in die Säule mit einem Durchmesser von 50 mm gepackt und mit PSP abgeglichen.

Affinitätschromatographie

Die das AFP enthaltende Ammoniumsulfat-Fraktion wurde nach der Dialyse innerhalb von 12-14 Stunden auf die Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 0,1 M Tris-Chloridbuffer, pH 8,2, gewaschen, bis kurz vor der völligen Elution des ungebundenen Proteins. Das Zielprotein wurde mit demselben Puffer mit einem Anteil von 4 M Harnstoff eluiert. Das Protein im Eluat wurde mit einem Durchgangsphotometer bei 280 nm detektiert.

Ionenaustausch-Chromatographie

Der Proteinpeak wurde nach der Affinitätschromatographiesäule ggf. nach Korrektur des pH-Wertes unmittelbar auf die mit 0,1 M Tris Chlorid-Puffer, pH 8,2, abgeglichene Ionenaustausch-Säule (1,6 x 15 cm) mit kovalent gebundenem Diethylaminoethylgruppen ((DEAE-ToyoPearl M650 (Toyo Soda, Japan)) aufgetragen. Nach dem Auftragen der ganzen Probe wurde die Säule mit demselben Puffer durch Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration (von 0 bis 0,6 M) eluiert.

Gelpermeations-Chromatographie

Die das gereinigte AFP enthaltende Protein-Fraktion wurde nach der Ionenaustausch-Säule in

einer Ultraschallzelle mittels einer Polycarbonat-Membran ((PM-10 (Amicon, Niederlande)) konzentriert. Eine Säule (2,6 x 150 cm) gefüllt mit einer Matrix aus mit N, N'-Methylenbis(acrylamid) vernetzten Dextranketten ((Sephacryl S200HR (LKB-Pharmacia Schweden)) wird mit PSP, dem 0,02% Natriumazid zugesetzt worden, abgeglichen. Die Probe wird aufgetragen und die Säule mit demselben Puffer eluiert. Das Protein wurde entsprechend dem photometrischen Profil ausgewählt. Die Fraktionen, die AFP in monomerer Form enthielten, wurden vereinigt, auf der Membran (PM-10 (Amikon, Niederlande)) bis zur Dichte 2-4 mg/ml konzentriert, lyophilisiert, die die Abfüllung des Lyophilisats in Ampullen erfolgt unter Stickstoffumgebung. Die Aufbewahrung der Ampullen erfolgt bei -70°C.

2) Herstellung des nicht-kovalenten Konjugates aus TCDD und AFP:

TCCD (0,8-0,9 mg/ml) wurde in Dioxan aufgelöst. Die Lösung wurde in Stickstoffumgebung bei +4°C aufbewahrt. Die TCDD-Lösung in Dioxan wurde der AFP-Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1,5-2,0 mg/ml in PSP langsam unter Rühren zugegeben, so dass die Endkonzentration an Dioxan 5% (v/v) nicht überstieg. Die Reaktionsmasse wurde 1 bis 6 Stunden bei 30-35°C inkubiert. Nach dem Inkubationsende wurde das gebildete Konjugat aus AFP-TCDD von den niedrigmolekularen Beimischungen durch Gelchromatographie ((Sephadex G-25 sf (Pharmacia, Schweden)) abgetrennt. Die Säule war mit PSP das 10% Acetonitril (v/v) enthielt abgeglichen. Jene Fraktionen, die das Zielkonjugat enthielten, wurden vereinigt und bei +4°C bis zu einer qualitativen bzw. quantitativen Analyse, in der Regel nicht mehr als 24 Stunden, aufbewahrt. Für eine längere Lagerung wurde der Lösung trockenes Mannit (bis 10%) zugegeben, die Mischung über einen Ultrafilter (0,22 µm) gefiltert, in Glasampullen abgefüllt und lyophilisiert. Nach dem Trocknen wurden die Ampullen mit sterilem Stickstoff oder Argon gefüllt, mit einem Wasserstoffbrenner dichtgelötet und bei -70°C eingelagert.

3) Quantitative Bestimmung vom TCDD mittels Reversed Phase-Chromatographie

Die Ermittlung des TCDD-Gehaltes im erzielten Konjugat wurde anhand einer extra hierfür entwickelten chromatographischen Methode mit einem äußeren Standard durchgeführt. Die Analyse dauerte von 3 bis 15 min, die Nachweisgrenze lag bei 10 ng, der Variationskoeffizient bei 4%. Ein typisches Chromatogramm, welches bei der TCDD-Detektion in seinem Konjugat mit AFP erhalten wurde, ist in Fig. 1 dargestellt.

Die quantitative und qualitative Bestimmung von TCDD wurde mittels Reversed Phase-Chromatographie mit dem Flüssigkeitschromatograph "GOLD" (Beckman, USA) durchgeführt. Das chromatographische System bestand aus einer zweiköpfigen Gradientenpumpe ((M-126 (Beckman, USA)), einem Schlaufeninjektor (M-7125) mit einem Schlaufenvolumen von 500 µl (Rhedyne, USA), einer HPLC-Reversed Phase-Säule mit Oktyl-Gruppen (Ultraspere Octyl, 3 µm, 0,46 x 7,5 cm) und einem spektrophotometrischen Detektor ((M-167 (Beckman, USA)). Die Fläche der chromatographischen Peaks und die Bearbeitung der Analysenergebnisse wurden unter Verwendung des chromatographischen Programms "GOLD Personal Chromatograph" (Beckman, USA) durchgeführt.

Die Trennung wurde im System: A = 0,1 M Ammoniumacetat, pH 6,0, 10% Gehalt an Acetonitril (v/v);
B = 50:50 = Acetonitril:Isopropanol

durchgeführt.

Die Analyse wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min nach einer Gradientenelution von 65 bis 85% der B-Komponente, Retentionszeit 10 min, durchgeführt. Bei genügenden TCDD-Konzentrationen in den Proben (mehr als 1 µM) wurde die Analyse gemäß einer isokratischen Elution bei 75% von B durchgeführt. In diesem Fall betrug das Probevolumen höchstens 20 µl und die Analysezeit verringerte sich auf 3 Minuten. Um eine qualitative Bestimmung durchzuführen, wurden auf die Säule von 5 bis 500 µl einer Lösung des TCDD:AFP-Konjugats aufgetragen. Es wurde gleichzeitig ein äußerer Standard unter Verwendung einer TCDD-Lösung in Dioxan (Konzentration 0,1-0,2 mg/ml) bestimmt: Den Mittelwert erhielt man aufgrund dreier paralleler Konzentrationsbestimmungen sowohl in den Proben, als auch in Standardlösungen. Die Fehler wurden nach der

Methode kleinster Quadrate errechnet.

4) Prüfung biologischer Aktivität in vitro.

Zellenzüchtung

Für den biologischen Test von TCDD und dessen Konjugat mit AFP wurden verwendet: Menschliches T-Lymphozyten der Zelllinie CEM, Karzinom menschlicher Milchdrüse Linie MCF-7 und menschliches Hepatom Linie HepG2. Die Zellen der Linie CEM wurden in Kunststoffflaschen (Costar, USA), in flüssigem RPMI 1640-Medium ohne L-Glutamin und mit Natriumbicarbonat (Sigma, USA) mit einem Gehalt von 10% embryonalem Kälberserum (Gibco, USA), 100 Einheiten/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in feuchter, CO_2-hältiger Umgebung (5%), kultiviert. Die Zelllinie MCF-7 wurde bei gleichen Bedingungen, jedoch mit dem Dulbecco's modified Eagle's Medium mit L-Glukose, Natrium Bicarbonat, Pyridoxin Hydrochlorid, ohne L-Glutamin (DMEM (Sigma)) gezüchtet.

Bestimmung der zytotoxischen Aktivität:

Um die Toxizität von TCDD und seinem nichtkovalenten Komplex mit AFP einzuschätzen, wurde eine Aussaat von Zellen in 96-Wells Mikrotiterplatten (Costar) mit je 15 000 Zellen pro Well unter Zusatz verschiedener Konzentrationen der zu testenden Verbindungen vorgenommen. Diese wurden unter Standardbedingungen für 72 Stunden inkubiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit dem MMT-Test nach der Mosmann-Methode [17] festgestellt. 2 Stunden vor dem Inkubationsende wurde jedem Well je 50 µl Lösung MTT-Bromid (=(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Sigma, USA)) im Medium für Zellzüchtung in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben. Nach der Färbung wurde das Medium entfernt, die ausgefallenen Formazan-Kristalle in 150 µl Dimethylsulfoxid aufgelöst und die Färbungsintensität mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem mehrkanaligen Spektrophotometer (Labsystem, Finnland) gemessen. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde in Prozent zur entsprechenden Kontrollgruppe bestimmt.

5) Ergebnisse der Prüfung auf die biologische Aktivität

Die biologische Aktivität des Konjugates aus TCDD und AFP gegenüber freiem TCDD wurde nach seiner toxischen Wirkung auf menschliche Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft beurteilt. Für sämtliche untersuchte Zelllinien ist die Zytotoxizität des TCDD/AFP-Verbundes wesentlich höher als diejenige von freiem Dioxin. Dagegen war die Differenz in der Empfindlichkeit der Zellen für die Wirkung des freien TCDD je nach Zelllinie wesentlich geringer (IC50 = 0,7 - 8 µM).

Durch die höchste Empfindlichkeit für die Wirkung des Verbundes zeichnen sich die T-Lymphozyten der Zelllinie CEM (IC50 < 0,50 nM) aus. Einigermaßen stabiler sind die Zellen des Adenokarzinoms der Milchdrüse MCF-7 (IC50 = 18 nM). Die niedrigste Empfindlichkeit bei dem Versuch zeigten die Hepatomzellen der Zelllinie HepG2 (IC50 = 52 nM).

In den Fig. 2a, 2b und 2c sind diese Ergebnisse graphisch zusammengefasst. Auf der Ordinate ist die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen in % und auf der Abszisse die Menge an Wirksubstanz (Konjugat AFP/TCDD oder freies TCDD) in nM aufgetragen. Die Kurven zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Konjugat aus AFP und TCDD (Kurve mit Kreisen) sowie bei einer Behandlung mit freiem TCDD (Kurve mit Quadraten).

Die Ergebnisse lassen sich tabellarisch wie folgt zusammenfassen:

Zelllinie	IC50 bei Behandlung mit Konjugat TCDD/AFP (nM)	IC50 bei Behandlung mit freiem TCDD (nM)
Menschliche T-Lymphozyten der Zelllinie CEM	<1	712
Menschliche Zellen des Adenokarzinoms der Milchdüse der Linie MCF-7	18	7000
Menschliche Hepatomzellen der Linie HepG2	52	10400

In Fig. 3 sind die Angaben über die relative Toxizität von Dioxin und seines AFP-Verbundes für diese Zelllinien dargestellt. In der Koordinatenachse sind in dieser Abbildung das Verhältnis der Hemm-Konstanten des TCDD/AFP-Konjugates zu freiem Dioxin (IC50(TCDD/AFP)/IC50(TCDD) dargestellt. In Fig. 4 sind die IC50-Werte des TCDD/AFP-Konjugates für die gleichen Zelllinien graphisch dargestellt. Man sieht daran, dass die Differenz zwischen den mehr und weniger empfindlichen Zelllinien viel höher liegt als im Falle der relativen Toxizität.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann man den durchaus begründeten Schluss ziehen, dass die Erzeugung des TCDD/AFP-Konjugates nicht nur die Steigerung der Löslichkeit von organischen Toxinen im Wasser, sondern auch eine erhebliche Erhöhung der biologischen Selektivität gegenüber Tumorzellen von unterschiedlichen menschlichen Organen und Geweben zur Folge hat. Dies lässt sich ohne weiteres anhand des Vergleiches der Toxizität eines freien Dioxins mit dem TCDD/AFP-Verbund für mehr oder weniger empfindliche Zelllinien (z.B. CEM und HepG2) veranschaulichen. Im Falle von Dioxin liegt diese Differenz nur beim 15-fachem (10400:712), während beim Konjugat dieser Wert zumindest 100mal so groß ist (52:0.5 = 104).

Literatur:

1. Suzuki Y.H., Taga H., Ishizuki H. et al. Immunohistochemical study of AFP in rat embryos during ontogenesis, Ann. NY Acad. Sci, 417, 224-239 (1983).
2. Uriel J., Laborda J., Naval J. et al. AFP receptors in malignant cells: an overview, CRC Press, "Biological Activities of AFP". 113-116, 1989,II.
3. Deutsch H.F., Tsukada Y., Sasaki T. et al. Cytotixic effects of daunomycin-fatty acid complex on rat hepatoma cells, Cancer Res., 43, 2668-2672 (1983).
4. Tichonov A.V., Shcherbakov V.M. and Volodarsky V.I. "A method for therapy of primary and metastatic liver cancer and a kit for therapy of primary and metastatic liver cancer, Patent (Russian Federation) No. 2065307 frorn 20 August 1996.
5. Safe S. PCBs, PCDDs PCDFs, and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TFFs), Toxicology, 21, 51-88 (1990).
6. Poland A., Knutson J.C. TCDD action, Annu Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 251-277 (1970).
7. Poland A., Greenlee W.F., Kende A.S. Studies on the mechanism of the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds, New York Acad.Sci-, 320, 214-230 (1979).
8. McConkey D.J. and Orrenius S. TCDD kills glucocoticoid-sesitive thymocytes in vivo, Biochem.Biophys.Res.Commun., 160, 1003-1008 (1989).
9. McConkey D.J., Hartzell P., Duddy S.K. et al. TCDD kills immature thymocytes by Ca2+-mediated endonuclease activation, Science, 242, 256-259 (1988).
10. Korach K.S., Sarver P., Chae KL et al. Estrogen receptor-binding activity of PCBs: conformationally restricted structural probes, Mol.Pharmacol., 33, 120-126 (1988).
11. Astroff B., and Safe S. TCDD as an antiestrogen: effect on rat uterine peroxidase activity, Biochem. Pharmacol., 39, 485-488 (1990).
12. Keeping H.S., and Lyttle C.R. Modulation of rat uterine progesterone receptor levels and peroxidase activity by tamoxifen citrate LY 117018 and estradiol, Endocrinology, 111, 2046-2054 (1982).

13. Gierthy J.F. and Lincoln D.W. Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 breast cancer cells by TCDD, Breast Cancer Res., 12, 227-233 (1988).
14. Gierthy J.F., Lincoln D.W., Gillespie M.B. et al. Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by TCDD, Cancer Res., 47, 6198-6203 (1987).
15. Rowlands C., Krishnan V., Wang X. et al. Characterization ofthe aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines, Cancer Res., 53, 1802-1807 (1993).
16. Kohn J., Wilchek M., Effective method for Sepharose activation in organic phase. FEBS Lett., 107, 878-884 (1982).
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol. Meth., 65, 55-63 (1983).

PATENTANSPRÜCHE:

1. Stoffgemisch, enthaltend onkofetales Alpha-Fetoprotein (AFP) und ein Zytotoxikum aus der Gruppe der polychlorierten Biphenyle, aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzofurane und/oder aus der Gruppe der polychlorierten Dibenzodioxine.
2. Stoffgemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytotoxikum aus der Gruppe von Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), 1,2,3,7,9-Pentachlordibenzofuran, 2,3,4,7,8-Pentachlordibenzofuran, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzofuran sowie 1,3,6,8-Tetrachlordibenzofuran stammt.
3. Stoffgemisch nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytotoxikum Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) ist.
4. Stoffgemisch nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass AFP und TCDD in einem nicht-kovalenten Konjugat im Molverhältnis AFP:TCDD 1:2 vorliegen.
5. Stoffgemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es als lyophilisiertes Pulver vorliegt.
6. Arzneimittel, enthaltend ein Stoffgemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Arzneimittel zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von hormonabhängigen Geschwulsten, insbesondere Tumoren, enthaltend ein Stoffgemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

HIEZU 6 BLATT ZEICHNUNGEN

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben am: **27.08.2001**
Blatt: **1**

Patentschrift Nr.: **AT 408 069 B**
Int. Cl. [7]: **A61K 35/54,** A61K 31/03, 47/42, A61P 35/00

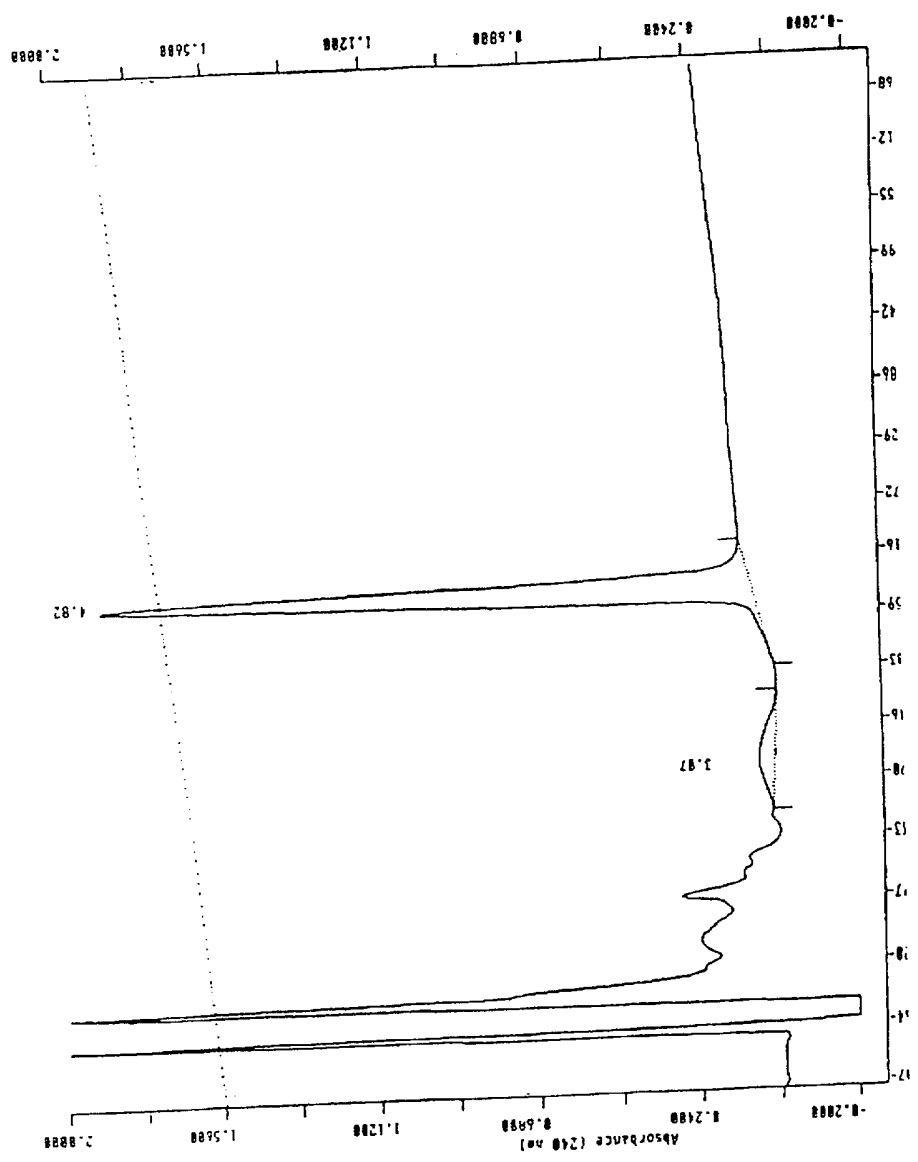
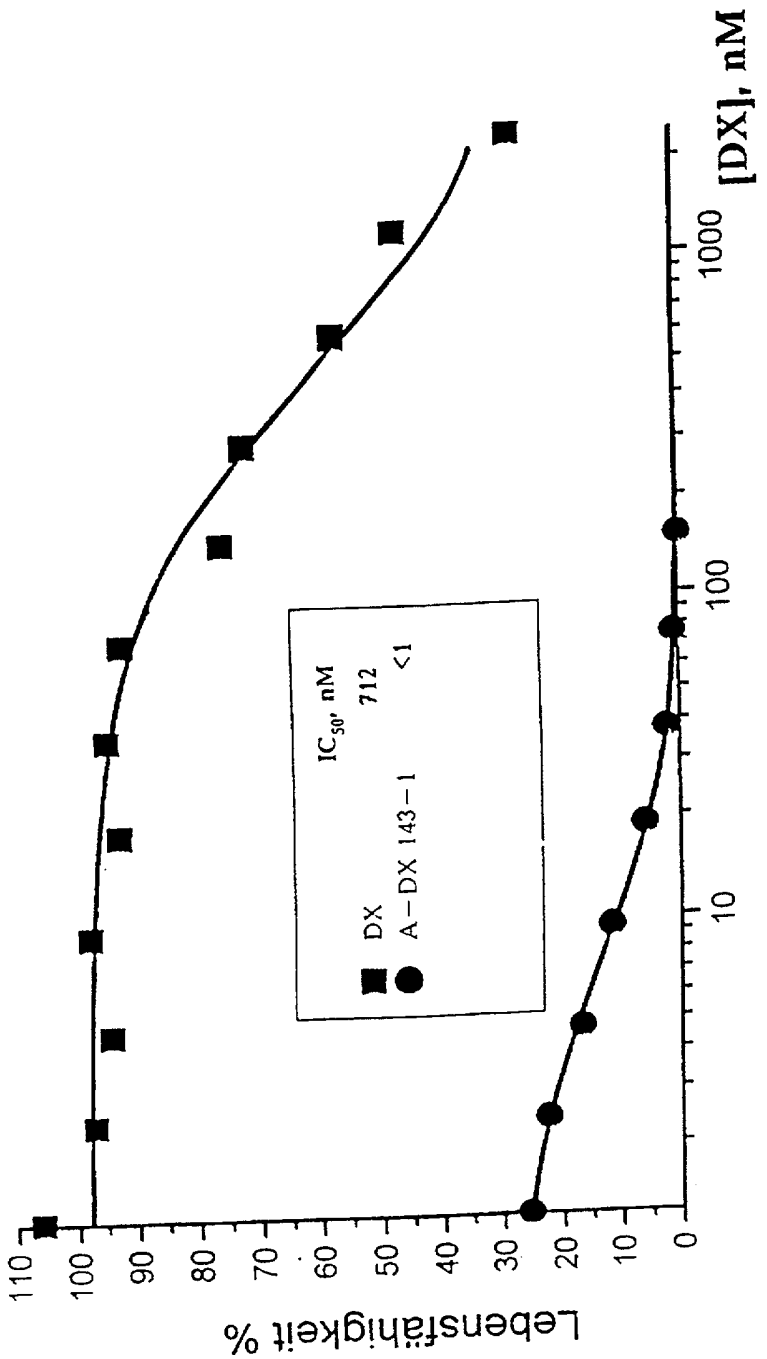


Fig. 1 Ein typisches Chromatogramm des TCDD/AFP-Verbundes (4.82).

Fig. 2a

Die zytotoxische Aktivität des TCDD/AFP Verbundes (TCDD:AFP 1:2) für menschliche Lymphom T-Zellen der Linie CEM.

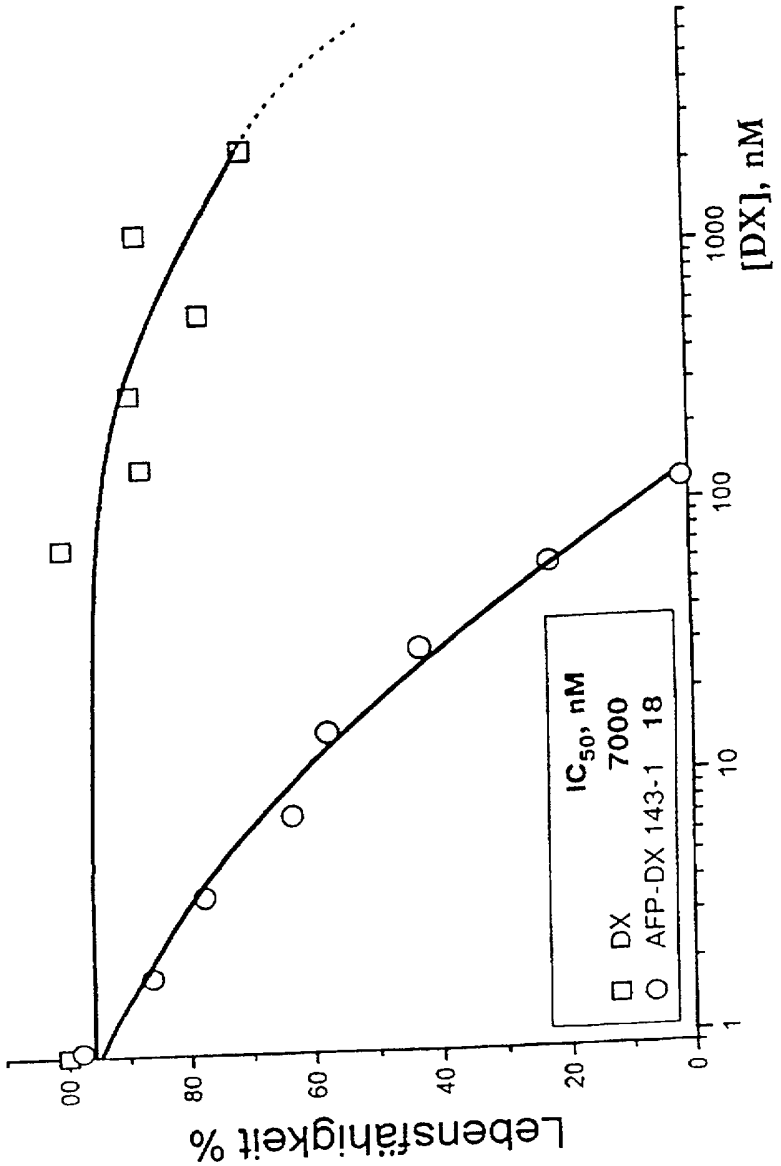


ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben am: **27.08.2001**
Blatt: **3**

Patentschrift Nr.: **AT 408 069 B**
Int. Cl. [7]: **A61K 35/54,** A61K 31/03, 47/42, A61P 35/00

Fig. 2b

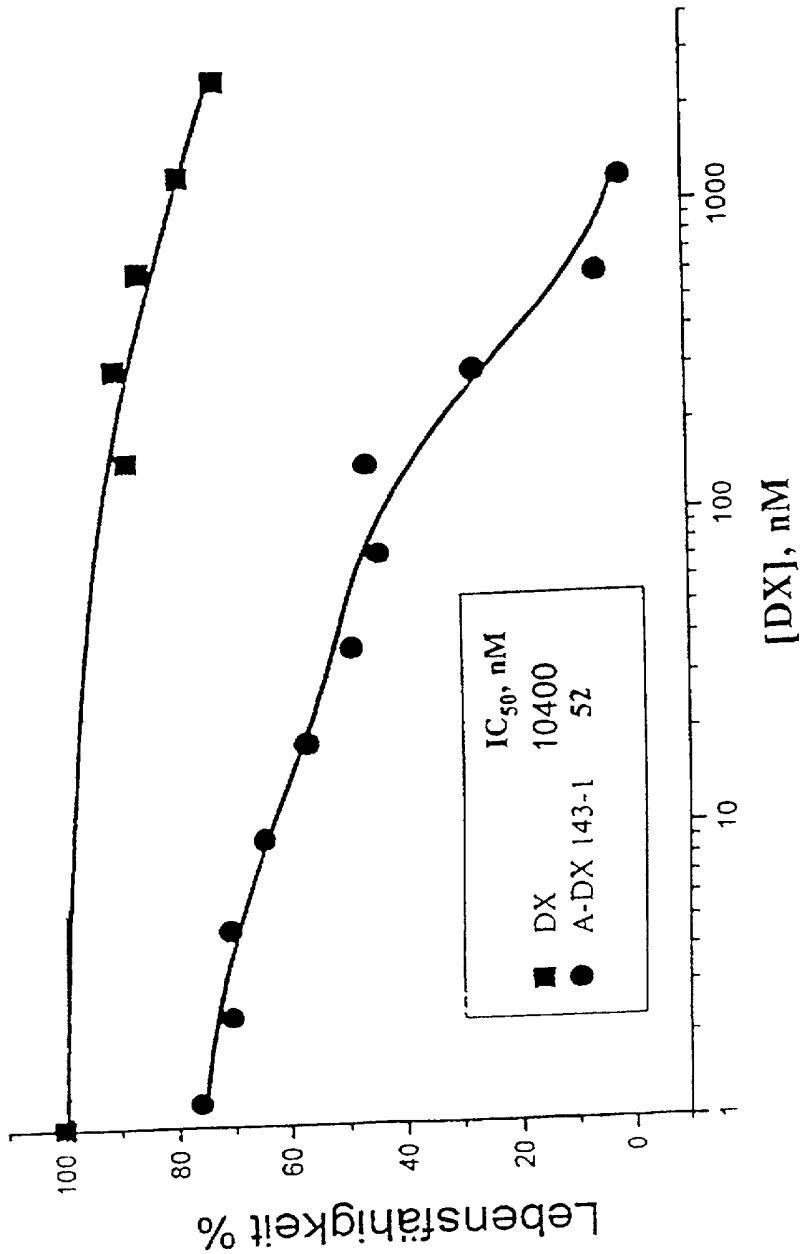
Die zytotoxische Aktivität des TCDD/AFP Verbundes (TCDD:AFP 1:2) für menschliche Zellen des Adenokarzinoms der Milchdrüse der Linie MCF-7.



Patentschrift Nr.: **AT 408 069 B**
Int. Cl. [7]: **A61K 35/54,** A61K 31/03, 47/42, A61P 35/00

Fig. 2c

Die zytotoxische Aktivität des TCDD/AFP Verbundes (TCDD:AFP 1:2) für menschliche Hepatomzellen der Linie HepG2.



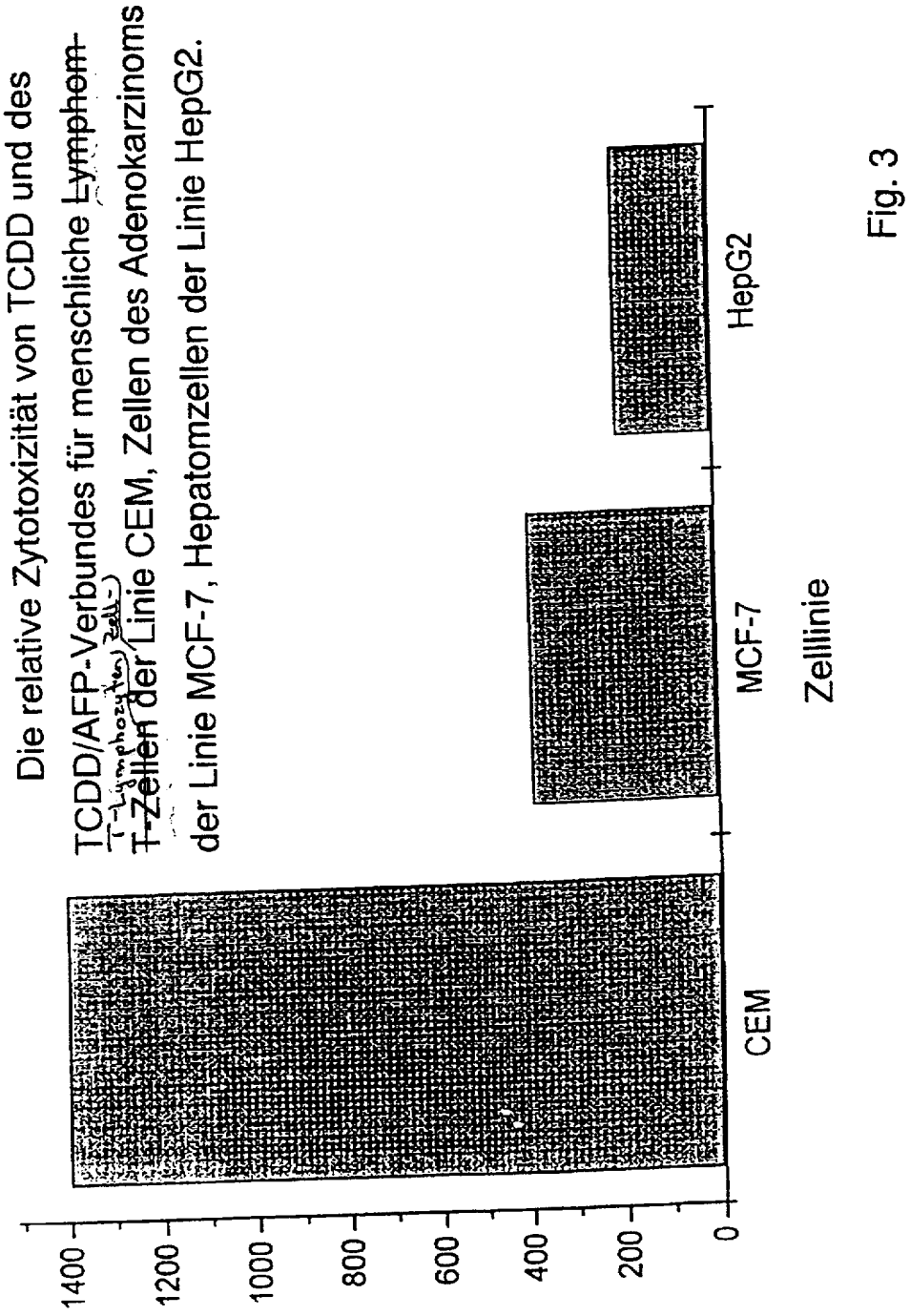

Die relative Zytotoxizität von TCDD und des TCDD/AFP-Verbundes für menschliche Lymphem- T-Zellen der Linie CEM, Zellen des Adenokarzinoms der Linie MCF-7, Hepatomzellen der Linie HepG2.
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CEM
MCF-7
HepG2
Zelllinie

Fig. 3

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben am: **27.08.2001**
Blatt: **6**

Patentschrift Nr.: **AT 408 069 B**
Int. Cl. [7]: **A61K 35/54,** A61K 31/03, 47/42, A61P 35/00

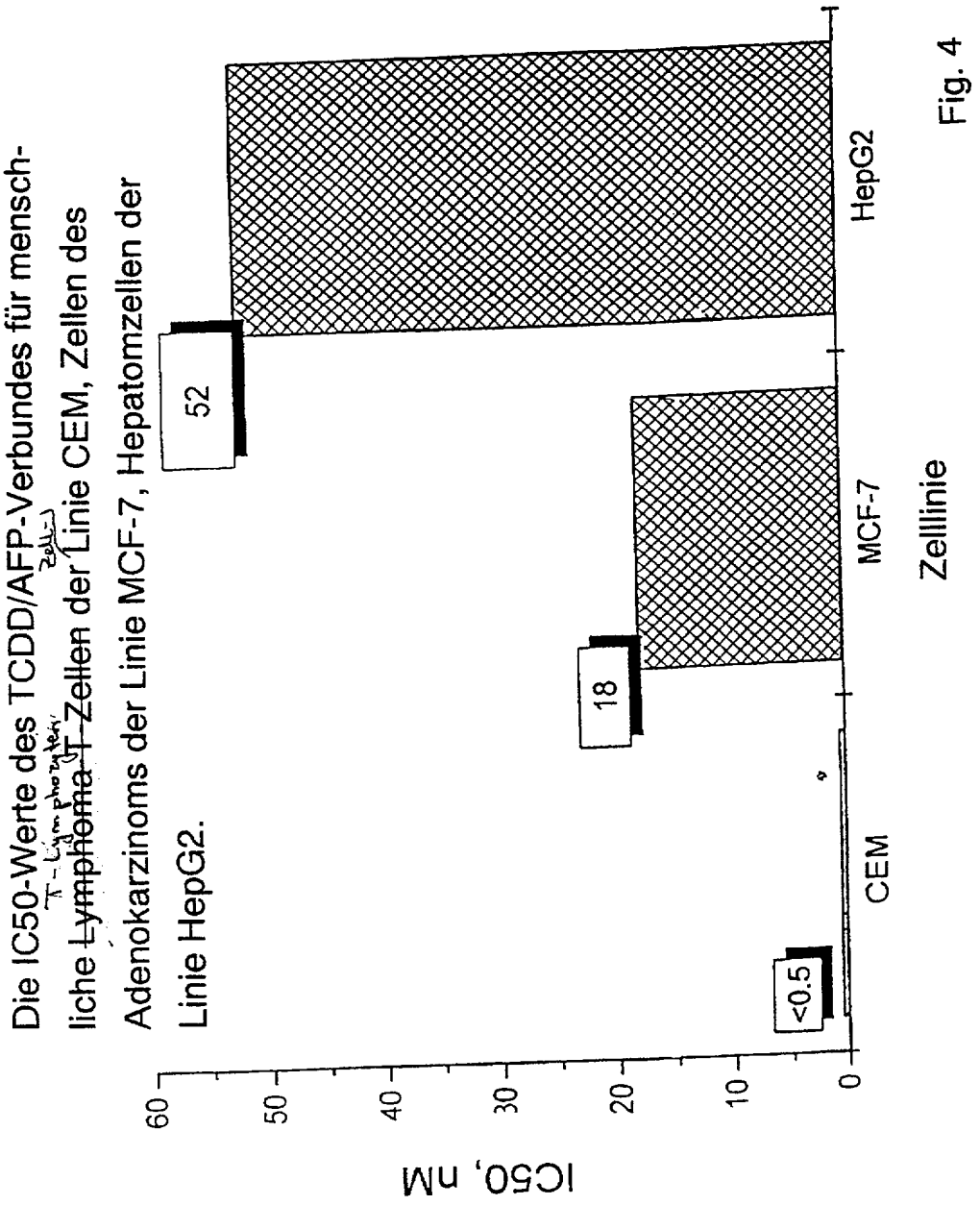


Fig. 4