



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 20 928 T2** 2007.02.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 263 440 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 20 928.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/08480**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 918 763.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/068098**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **20.09.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.02.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/55** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

189699 P **15.03.2000** **US**

(73) Patentinhaber:

**ChemGenex Pharmaceuticals, Inc., Menlo Park,
Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

BROWN, M., Dennis, Menlo Park, CA 94025, US

(54) Bezeichnung: **CEPHALOTAXINALKALOID ENTHALTENDE KOMBINATIONSPRÄPARATE UND DEREN 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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Das technische Gebiet dieser Erfindung ist die Verwendung von Cephalotaxin-Alkaloiden zusammen mit antiproliferativen Mitteln, um Wirte mit Zellproliferationserkrankungen zu behandeln.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es besteht ein beträchtliches Interesse daran, die Wirksamkeit der derzeit gebräuchlichen antiproliferativen Mittel zu verändern, um die Geschwindigkeit und die Dauer von Antitumorwirkungen herkömmlicher antineoplastischer Mittel zu erhöhen.

[0003] Herkömmliche, in der Krebsbehandlung eingesetzte antiproliferative Mittel werden allgemein als (1) chemische Verbindungen klassifiziert, die Einfluss auf die Integrität von Nucleinsäurepolymeren nehmen, indem sie diese binden, alkylieren, Strangbruch verursachen, zwischen Basenpaaren interkalieren oder auf Enzyme Einfluss nehmen, welche die Integrität und Funktion von DNA und RNA aufrechterhalten; bzw. als (2) chemische Mittel, die sich an Proteine binden, um enzymatische Wirkung (z.B. als Antimetaboliten) oder die Funktion von Strukturproteinen, die für die Zellintegrität notwendig sind (z.B. als Antitubulin-Wirkstoffe), zu hemmen. Arzneimittel, die zur Behandlung von Brust- und Prostatakrebs die Wirkung von Steroidhormonen blockieren, photochemisch aktivierte Mittel, Strahlensensibilisatoren und vor Strahlung schützende Mittel sind, unter anderem, weitere chemische Verbindungen, die sich bei der Behandlung mancher Krebsarten als nützlich erwiesen haben.

[0004] Von besonderem Interesse für diese Erfindung sind jene Verbindungen, die direkten Einfluss auf die Integrität der Genstruktur der Krebszellen nehmen. Nucleinsäurepolymere, wie z.B. DNA und RNA, sind Hauptziele für Arzneimittel zur Krebsbehandlung. Alkylierungsmittel, wie z.B. Stickstofflöst, Nitrosoharnstoffe und Verbindungen, die Aziridin enthalten, greifen direkt DNA an. Metallkoordinationsverbindungen wie Cisplatin und Carboplatin greifen auf ähnliche Weise direkt die Nucleinsäurestruktur an, was zu Läsionen führt, die für die Zellen schwer zu reparieren sind und wiederum zum Zelltod führen können. Weitere Verbindungen, die Einfluss auf Nucleinsäure nehmen, sind Anthracyclin-Moleküle wie Doxorubicin, die zwischen Nucleinsäurebasenpaaren von DNA-Polymeren interkalieren, Bleomycin, das Nucleinsäurestrangbrüche verursacht, und fraudulente Nucleoside. Fraudulente Nucleoside sind z.B. Pyrimidin- und Purinnucleosid-Analoga, die unpassend in die Polymerstrukturen der Nucleinsäure eingeführt werden und letztlich frühzeitige DNA-Kettentermination verursachen. Bestimmte Enzyme, die Einfluss auf die Integrität und Funktionalität des Genoms nehmen, können auch in Krebszellen durch spezielle chemische Mittel gehemmt werden und zum Zelltod der Krebszellen führen. Dazu zählen Enzyme, die Einfluss auf Ribonucleotid-Reductase (z.B. Hydroxyharnstoff, Gemcitabin), Topoisomerase I (z.B. Camptothecin) und Topoisomerase II (z.B. Etoposid) nehmen.

[0005] Eines der gebräuchlichsten Arzneimittel dieser auf DNA abzielenden Arzneimittel gegen Krebs ist Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II), CDDP). Diese Verbindung ist gegen mehrere Formen von Krebs beim Menschen wirksam, dazu gehören Hodenkrebs, kleinzelliger Lungenkrebs, Blasenkrebs, Gebärmutterhalskrebs und Krebs im Hals und Kopfbereich.

[0006] Obwohl die klinische Wirksamkeit der derzeit zugelassenen antiproliferativen Mittel gegen viele Formen von Krebs bewiesen ist, wird weiterhin nach Verbesserungsmöglichkeiten gesucht, um die Responsegeschwindigkeiten, die Responsedauer und letztlich die Zahl der überlebenden Patienten zu erhöhen. Die hierin beschriebene Erfindung beschreibt die neue Verwendung der Cephalotaxin-Alkaloide und von Analoga davon, einschließlich Homoharringtonin (HHT), das die Antitumorwirkungen von chemotherapeutischen Arzneimitteln verstärken kann, insbesondere von Mitteln, die Einfluss auf die Integrität von Nucleinsäurepolymeren wie etwa DNA nehmen.

Visani et al. [Leukemia 11, 624-628 (1997)] offenbaren Kombinationen aus Homoharringtonin und Cytosin-Arabinose (Cytarabin) oder IFN- α bei der Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie.

Yuzhu et al. [EMBASE Abstract, Zugriffsnr. 1998384948 (1998)] offenbaren Kombination aus Homoharringtonin und Cytosin-Arabinose (Cytarabin) oder Aclarubicin bei der Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie.

Laster et al. [EMBASE Abstract, Zugriffsnr. 82182588 (1982)] offenbaren Kombinationen aus Homoharringtonin und 5-Fluoruracil bei der Behandlung von Leukämie.

Zhang et al. [Asia Pacific J. Pharma. 7, 191-19 (1992)] offenbaren die Verwendung von Homoharringtonin in Kombination mit Methotrexat und Verapamil zur Hemmung des Wachstums von P388-Leukämiezellen oder

Ascites-Tumorzellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] In einem Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines Cephalotaxins und eines antiproliferativen Mittels zur Herstellung eines Arzneimittels zur Reduktion oder Hemmung des Wachstums von festen Tumoren bereit, worin das Cephalotaxin eine chemopotenzierende Wirkung ausübt.

[0008] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen oder Medikamente bereit, die ein Cephalotaxin und ein antiproliferatives Mittel enthalten, wobei das antiproliferative Mittel aus der aus Cisplatin, Camptothecin, Vinblastin, Etoposid, Amonafid, Colchicin und Genistein bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0009] [Fig. 1](#) zeigt die allgemeine Struktur eines Cephalotaxin-Analogons. R1 und R2 stellen Substituentengruppen dar. Die Strukturen für R1 und R2 sind für das Cephalotaxin-Analogon Homoharringtonin dargestellt.

[0010] [Fig. 2](#) zeigt die Struktur des Cephalotaxin-Analogons Homoharringtonin.

[0011] [Fig. 3](#) zeigt die Verzögerung des Tumorwachstums, angegeben als Tumolvolumen an Tagen nach Behandlung mit HHT, HHT gefolgt von CDDP oder nur CDDP.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0012] Es werden medizinische Verwendungen und Zusammensetzungen zur Behandlung eines Wirts mit einem festen Tumor bereitgestellt. In den vorliegenden medizinischen Verwendungen wird ein pharmazeutisch annehmbares Cephalotaxin, vorzugsweise systemisch, gemeinsam mit einem antiproliferativen Mittel verabreicht, um die Antitumorwirkungen zu verbessern. Das Cephalotaxin stellt eine chemopotenzierende Wirkung bereit.

[0013] Die Mittel werden in Mengen verabreicht, die ausreichen, um das Wachstum eines festen Tumors zu reduzieren oder zu hemmen. In einer Ausführungsform stellt die Behandlung des festen Tumors eine Zunahme der TVQT ("tumor volume quadrupling time"; Zeit, in der ein Tumor auf sein vierfaches Volumen anwächst; nachstehend beschrieben) bereit. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Modulation einer Krankheit eine chemosensitivierende Wirkung. In weiteren Ausführungsformen umfasst die Modulation einer Krankheit Zytostase. In wiederum anderen Ausführungsformen umfasst die Modulation einer Krankheit eine zytotoxische Wirkung.

[0014] Ein chemisches Mittel ist ein "Chemopotentiator", wenn es die Wirkung eines bekannten antiproliferativen Arzneimittels im Vergleich zur Wirkung des Chemopotentiators oder des antiproliferativen Mittels alleine stärker als bloß additiv erhöht. In manchen Fällen kann eine chemosensitivierende Wirkung beobachtet werden. Diese ist als jene Wirkung definiert, die durch die Verwendung eines Mittels hervorgerufen wird, das bei alleiniger Verwendung keine signifikanten Antitumorwirkungen zeigen würde, jedoch die Antitumorwirkungen eines antiproliferativen Mittels im Vergleich zur alleinigen Verwendung des antiproliferativen Mittels verbessern würde.

[0015] Der Begriff "Cephalotaxin" umfasst, wie er hierin verwendet wird, alle Mitglieder dieser chemischen Familie, einschließlich von Alkaloid-Derivaten des chinesischen Immergrüns, Cephalotaxus fortunei, und Analoga davon. Die Familie der Cephalotaxine ist durch eine chemische Struktur mit den Ringstrukturen in [Fig. 1](#) definiert.

[0016] Ein Cephalotaxin-Analogon wird durch die in [Fig. 1](#) gezeigte Struktur mit Substituenten- oder Substitutionsgruppen R1 und R2 näher definiert, ist aber nicht darauf beschränkt. Beispiele für R1 und/oder R2 sind Ester, einschließlich Herringtonin, Isoharringtonin, Homoharringtonin, Desoxyharringtonin, Acetylcephalotaxin und dergleichen. In Tabelle 1 sind Strukturen von R1 und R2 für manche dieser Analoga angeführt. R1- und R2-Substitutionen werden typischerweise dazu eingesetzt, die biologische Wirkung oder pharmazeutische Eigenschaften wie Bioverfügbarkeit oder Stabilität zu verbessern oder die Toxizität zu verringern. In einer Ausführungsform umfassen R1 und R2 Alkylsubstitutionen (z.B. Methyl, Ethyl, Propyl etc.). In einer anderen Ausführungsform umfassen R1 und R2 Ester (z.B. Methoxy, Ethoxy, Butoxy etc.). R1 und R2 sind im Schutzzumfang

dieser Erfindung jedoch nicht auf die oben genannten Beispiele beschränkt.

Tabelle 1	R1	R2
Isoharringtonin	$-\text{OCH}_3$	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CHCO}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{CO}_2^- \end{array}$
Harringtonin	$-\text{OCH}_3$	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$
Acetylcephalotaxin	$-\text{OCH}_3$	CH_3CO_2^-
Homoharringtonin	$-\text{OCH}_3$	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$

[0017] Cephalotaxin-Analoga sind weitere chemische Verbesserungen. Ein spezifisches Beispiel für ein Cephalotaxin-Analogon ist Homoharringtonin, das ein 4-Methyl-2-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)bernsteinsäure-Ester von Cephalotaxin ist (siehe [Fig. 2](#)).

[0018] Wie hierin verwendet sind antiproliferative Mittel Verbindungen, die Zytostase oder Zytotoxizität induzieren. Zytostase steht für die Hemmung des Zellwachstums, während Zytotoxizität als Abtötung der Zellen definiert ist. Spezifische Beispiele für antiproliferative Mittel sind Antimetaboliten wie Methotrexat, 5-Fluoruracil, Gemcitabin, Cytarabin, Pentostatin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, L-Asparaginase, Hydroxyharnstoff, N-Phosphonoacetyl-L-aspartat (PALA), Fludarabin, 2-Chlordesoxyadenosin und Floxuridin; Strukturprotein-Mittel wie Vincaalkaloide, dazu zählen Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinorelbin, Paclitaxel und Colchicin; Antibiotika wie Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Bleomycin, Plicamycin und Mitomycin; Hormonantagonisten, wie Tamoxifen und Analoga des luteinisierenden Hormon freisetzenden Hormons (LHRH); Nucleinsäure schädigende Mittel wie die Alkylierungsmittel Mechlorethamin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Chlorambucil, Dacarbazin, Methylnitrosourea, Semustin (Methyl-CCNU), Chlorozotocin, Busulfan, Procarbazin, Melphalan, Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) und Thiotepa; die interkalierenden Mittel Doxorubicin, Dactinomycin, Daurorubicin und Mitoxantron; die Topoisomerase-Hemmer Etoposid, Camptothecin und Teniposid und die Metallkoordinationskomplexe Cisplatin und Carboplatin.

[0019] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung:

BEISPIELE

Beispiel 1

Chemopotenzierung von Cisplatin (CDDP) durch Homoharringtonin (HHT)

[0020] Transplantierbare murine Versuchs-Fibrosarkome (2×10^5 RIF-1-Zellen) wurden intradermal in den Flanken von 3 Monate alten weiblichen C3H-Mäusen (Charles River, Holister, Kalifornien) gezüchtet. Als die Tumore ein Volumen von etwa 100 mm^3 erreichten, wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip jeder Versuchsgruppe zugeordnet (4 Mäuse pro Gruppe).

[0021] Die Versuchszusammensetzungen wurden wie in Tabelle 2 beschrieben hergestellt.

Tabelle 2

Mittel	Dosis	Lösungsmittel	Bezugsquelle
Homoharringtonin	2 mg/kg	DMSO	NCI
Cisplatin	4 mg/kg	Wasser für die Injektion	David Bull Labs

[0022] Der Chemopotentiator Homoharringtonin wurde vom NCI erhalten und mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die geeignete Konzentration eingestellt. Cisplatin (David Bull Laboratories – Mulgrave, Australien, Chargenr. 5201844x) wurde mit Wasser zur Injektion auf die geeignete Konzentration eingestellt. Die Zusammensetzungen wurden in einem Volumen von 100 µl systemisch (d.h. intraperitoneal, i.p.) injiziert. Zur Behandlung von Gruppe 3 wurde der Chemopotentiator Homoharringtonin 30 min vor der Cisplatin-Injektion injiziert. Nach der Behandlung wurde das Tumorstadium dreimal pro Woche durch Messschiebermessungen dreier lot-rechter Durchmesser des Tumors und Berechnung des Tumorstadiums aus folgender Formel überwacht:

$$V = \pi/6 \times D_1 \times D_2 \times D_3 \text{ (mit } D_{1-3} \text{ in mm).}$$

[0023] Die Tumoren wurden solange überwacht, bis sie das Vierfache des Volumens an Tag 0 der Behandlung erreicht hatten ("tumor volume quadrupling time", TVQT) bzw. bis zu 30 Tage nach der Behandlung, je nachdem, was zuerst eintrat. Die Daten sind als "TVQT-Mittelwert" und als "Verzögerung" angegeben. Die mittlere TVQT ist die mittlere Anzahl an Tagen, die ein Tumor benötigt, um auf das Vierfache seines Volumens am ersten Behandlungstag anzuwachsen. Die "Verzögerung" ist der Mittelwert der Tage, die ein Tumor benötigt, um auf das Vierfache der mittleren Größe der behandelten Gruppe anzuwachsen, abzüglich des Mittelwerts der Tage, die der Tumor benötigt, um auf das Vierfache der mittleren Größe der Kontrollgruppe anzuwachsen.

[0024] Die Daten werden auch als Verhältnis zwischen der TVQT der Gruppe mit behandelten Tumoren und der TVQT der unbehandelten Kontrollgruppe (TVQT/CTVQT) angegeben. Zunehmende Werte dieses Verhältnisses zeigen erhöhte Antitumorstadiumwirkung an.

[0025] Die Daten sind in nachstehender Tabelle 3 und in [Fig. 3](#) angeführt.

Tabelle 3

Gruppe	Behandlung	Dosis (mg/kg)	TVQT-Mittelwert ± Standardfehler	TVQT/CTVQT	Mittelwert (TVQT)	Verzögerung (Tage)
1	Unbehandelte Kontrolle	-	8,3 ± 0,4	1,0	8,6	0,00
2	Homoharringtonin	2	10,1 ± 0,4	1,2	9,8	1,20
3	Homoharringtonin → Cisplatin	2 → 4	14,9 ± 0,8	1,8	14,8	6,17
4	Cisplatin	4	12,9 ± 1,1	1,5	12,5	3,83

Der Pfeil (→) in Gruppe 3 zeigt an, dass das Cisplatin 30 Minuten nach Verabreichung von Homoharringtonin verabreicht wurde.

[0026] Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, dass die antiproliferative Wirkung von Cisplatin durch die Verwendung des Chemopotentiators Homoharringtonin verstärkt wird, da eine im Vergleich zur alleinigen Verwendung von Cisplatin (Gruppe 4) oder von Homoharringtonin (Gruppe 2) mehr als nur additive Wirkung beobachtet wurde, als beide Verbindungen gemeinsam verwendet wurden, um die Tumor-tragenden Mäuse (Gruppe 3) zu behandeln.

Wirkung von Homoharringtonin auf das Wachstum von RIF-1-Tumoren bei C3H-Mäusen, bei alleiniger Verwendung und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika

[0027] Das murine RIF-1-Fibrosarkommodell wurde eingesetzt, um die Antitumorwirkung von Homoharringtonin, sowohl bei alleiniger Verwendung als auch in Kombination mit anderen antiproliferativen Mitteln zu bewerten. Zu den verwendeten antiproliferativen Mitteln zählen jene, die Einfluss auf die Integrität von Nucleinsäure (z.B. von DNA) nehmen (z.B. Cisplatin, Cytarabin, Camptothecin, Etoposid, 5-Fluoruracil, Amonafid), wie auch Mittel, die Strukturproteine beeinflussen (z.B. Paclitaxel, Vinblastin oder Colchicin) oder die zytoplasmatische Enzyme beeinflussen (z.B. Genistein).

[0028] Homoharringtonin (HHT-NCI) wurde vom NCI als Pulver und Homoharringtonin (HHT-Clin) von der Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China) in 1-ml-Ampullen bezogen, die zuvor mit Wasser auf 1 mg/ml verdünnt worden waren. Cisplatin zur Injektion (USP) wurde von den David Bull Labs (Mulgrave, Australien; Chargennr. 5201844x) als gefriergetrocknetes Pulver und Paclitaxel von der Bristol Myers Squibb Co. (Princeton, New Jersey; Chargennr. 9J16241, geliefert im September 2001), vorverdünnt auf 6 mg/ml in Cremaphor/EL, bezogen. Cytarabin wurde von den Bedford Labs (Bedford, Ohio; Chargennr. 86968A, geliefert im Juni 2002) als gefriergetrocknetes Pulver und Camptothecin von Boehringer-Ingelheim (Chargennr. 142088.) als Pulver geliefert. Vinblastin wurde von den Bedford Labs (Bedford, Ohio; Chargennr. 112647) als gefriergetrocknetes Pulver und Etoposid von Pharmacia (Kalamazoo, Michigan; Chargennr. ETA013; geliefert im Mai 1999) als auf 20 mg/ml verdünnte Flüssigkeit bezogen. 5-Fluoruracil wurde von Pharmacia (Kalamazoo, Michigan; Chargennr. FFA 191; geliefert im Juli 2000) als auf 50 mg/ml verdünnte Flüssigkeit und Amonafid von Penta Biotech (Union City, Kalifornien; Chargennr. 039-01) als Pulver bezogen. Colchicin wurde von Sigma (St. Louis, Missouri; Chargennr. 55H-0685) als Pulver und Genistein von der ChemCon GmbH (Freiburg i. Br.; Chargennr. CC-6700-26) als Pulver bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Sigma (St. Louis, Missouri; Chargennr. 80K3695) bezogen. 0,9%iges Natriumchlorid für Injektionszwecke (USP; Salzlösung) wurde von den Abbott Laboratories (Chargennr. 55-199-DK) hergestellt. Steriles Wasser zur Injektion (USP; WFI) wurde von Lyphomed Inc. (Chargennr. 390849) hergestellt.

[0029] Formulierungen: Testpräparate (Behandlungsgruppen) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

[0030] Zur Herstellung der Formulierungen 1-4 wurde HHT-NCI in Ampullen eingewogen, in DMSO gelöst und auf die genannten Konzentrationen eingestellt.

[0031] Für Formulierung 5 wurde der Inhalt einer 10-mg-Ampulle von gefriergetrocknetem CDDP (Cisplatin zu Injektionszwecken) mit 10 ml WFI resuspendiert, um eine 1-mg/ml-CDDP-Suspension herzustellen.

[0032] Für die Formulierung 6 wurde Paclitaxel, das in Cremaphor/EL und in absolutem Alkohol auf 6 mg/ml vorverdünnt worden war, mit WFI auf 3,3 mg/ml weiter verdünnt.

[0033] Die Formulierungen 7 und 8 wurden durch weitere Verdünnung von HHT-Clin mit WFI auf die genannten Konzentrationen hergestellt. Formulierung 9 bestand aus unverdünntem HHT-Clin, das so verwendet wurde, wie es geliefert worden war.

[0034] Formulierung 10 wurde durch Zusatz von 1 ml WFI auf 100 mg Cytarabin als gefriergetrocknetes Pulver hergestellt.

[0035] Formulierung 11 wurde durch Zusatz von DMSO zu Camptothecin in einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt.

[0036] Formulierung 12 wurde durch Zusatz von 0,9%igem Natriumchlorid zu Injektionszwecken zu einer Ampulle mit 10 mg Vinblastin als gefriergetrocknetes Pulver hergestellt.

[0037] Die Formulierungen 13-17 wurden durch Verdünnung der geeigneten Menge des jeweiligen Testmittels in Salzlösung (13: 2,5 mg/ml Etoposid, 14: 7,5 mg/ml 5-Fluoruracil, 15: 7,5 mg/ml Amonafid, 16: 2,5 mg/ml Colchicin, 17: 3,75 mg/ml 5-Fluoruracil) hergestellt.

[0038] Formulierung 18 wurde durch Verdünnung von 15 mg Genistein in 1 ml DMSO hergestellt.

[0039] Versuchstiere: Für diese Studie wurden etwa 3 Monate alte weibliche C3H-Mäuse (Charles River Laboratories, Holister, Kalifornien) verwendet. Ihr durchschnittliches Körpergewicht betrug etwa 25 g. Die Tiere wurden in Isolationskäfigen in einem 12-Stunden-Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Futter und Wasser waren unbegrenzt verfügbar.

[0040] Tumoren: Die murine RIF-1-Fibrosarkom-Zelllinie wurde in einer In-vitro-Kultur (Waymouth Medium, ergänzt mit 20%igem Rinderfötenserum) bei 37 °C in einem Inkubator mit feuchter Luft und 5 % CO₂ gehalten. Log-Phasen-RIF-1-Zellen wurden trypsinisiert und aus Zellkulturflaschen gewonnen, um eine Konzentration von 4 × 10⁶ Zellen/ml zu erreichen; danach wurden sie in einem Volumen von 50 µl in jeweils beide Flanken der Mäuse intradermal injiziert (was 2 × 10⁵ Zellen pro Injektion entspricht). Neun Tage später, als die Tumoren eine Größe von etwa 100 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere in verschiedene Behandlungsgruppen randomisiert.

[0041] Behandlungsgruppen: Die Behandlungsgruppen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Jeder Gruppe wurden 4 bis 5 Tiere zugeordnet. Das Volumen der intraperitonealen Injektionen betrug 100 µl. Bei jedem Tier wurden in einen der beiden Tumore intratumorale Injektionen (50 µl) gesetzt, wobei der kontralaterale Tumor als unbehandelte Kontrolle fungierte. Das Volumen der oralen Verabreichungen betrug 100 µl. Kombinationsbehandlungen unter Verwendung zweier Testmittel wurden in Form von zwei separaten Injektionen verabreicht, wobei die zweite Injektion entweder sofort nach der ersten oder 30 Minuten später gesetzt wurde.

[0042] Bestimmung der TVQT: Die Tumoren wurden dreimal wöchentlich bis zu 22 Tage lang mit Messschiebern abgemessen. Das Tumolvolumen (in Kubikmillimetern, mm³) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \pi/6 \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

wobei D₁₋₃ für die lotrecht gemessenen Durchmesser (mm) stehen.

[0043] Die "tumor volume quadrupling time" (TVQT), die als jene Zeit definiert ist, die ein Tumor benötigt, um auf das Vierfache seines Anfangsvolumens (zum Zeitpunkt der Behandlung) anzuwachsen, wurde als Endpunkt der Studie betrachtet. Die TVQT wurde für jede Behandlungsgruppe bestimmt und ist als Mittelwert +/- Standardfehler in Tagen angegeben.

[0044] Die Antitumorwirkung oder Modulation des Tumorwachstums (gemessen anhand des verzögerten Tumorwachstums, d.h. der zunehmenden TVQT-Werte) von/durch Homoharringtonin, bei alleiniger Verwendung oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, ist in Tabelle 5 angeführt.

[0045] Diese Studie enthält Ergebnisse von acht verschiedenen Versuchen. In Versuch E010 wuchsen die Tumoren bei unbehandelten Kontrolltieren in durchschnittlich 7,2 Tagen auf die vierfache Größe an. Die intraperitoneale Verabreichung von Homoharringtonin vom NCI in einer Dosis von 5 mg/kg ergab eine TVQT von 14,5 Tagen, und die intratumorale Verabreichung von Homoharringtonin in dieser Dosis ergab eine TVQT von 15,6 Tagen.

[0046] Im Versuch E011 wuchsen die Tumoren bei unbehandelten Kontrolltieren in durchschnittlich 8,3 Tagen auf die vierfache Größe an, während die intraperitoneale Verabreichung von Homoharringtonin vom NCI in einer Dosis von 2 mg/kg die durchschnittliche TVQT auf 10,1 Tage verlängerte und die zusätzliche intraperitoneale Verabreichung von CDDP die durchschnittliche TVQT auf 14,9 Tage verlängerte. Während Paclitaxel (10 mg/kg) bei alleiniger Verabreichung eine TVQT von 8,8 Tagen zeigte, veränderte der Zusatz von Homoharringtonin (2 mg/kg) die TVQT nicht, womit Paclitaxel das einzige Mittel mit einer geringeren Kombinationswirkung als Homoharringtonin bei alleiniger Verwendung war.

[0047] In den übrigen Kombinationsstudien wurde Homoharringtonin von der Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China) verwendet, das mit sterilem Wasser auf 2 mg/kg oder 4 mg/kg eingestellt wurde.

[0048] Bei 2 mg/kg zeigte Homoharringtonin in Versuch E026 eine durchschnittliche TVQT von 10,4 Tagen, während die unbehandelten Kontrolltumoren in 7,4 Tagen auf das Vierfache anwuchsen. Kombinationsverabreichungen von Cisplatin (4 mg/kg) und Homoharringtonin (2 mg/kg) ergaben eine TVQT von 11,1 Tagen, was länger als bei alleiniger Verabreichung von Homoharringtonin (TVQT = 10,4 Tage) oder Cisplatin (TVQT = 9,4 Tage) war.

[0049] In Versuch E030, in dem unbehandelte Kontrolltumoren in 6,7 Tagen auf das Vierfache anwuchsen, ergab Homoharringtonin-Behandlung (2 mg/kg) eine TVQT von 7,9 Tagen, und Camptothecin oder Cytarabin ergaben eine TVQT von 9,4 bzw. 7,6 Tagen. Kombinationsverabreichung von Homoharringtonin (2 mg/kg) und Camptothecin (6 mg/kg) oder Cytarabin (400 mg/kg) verlängerte die TVQT auf 10,1 bzw. 8,6 Tage.

[0050] In Versuch E032, in dem unbehandelte Kontrolltumoren in 6,5 Tagen auf das Vierfache anwuchsen, ergab Homoharringtonin in einer Dosis von 4 mg/kg eine durchschnittliche TVQT von 8,5 Tagen. Verabreichung von Homoharringtonin (4 mg/kg) in Kombination mit 5-Fluoruracil (30 mg/kg) ergab eine TVQT von 17,9 Tagen im Vergleich zu 13,6 Tagen bei alleiniger Verabreichung von 5-Fluoruracil. Kombinationsverabreichung von Homoharringtonin (4 mg/kg) und Vinblastin (2 mg/kg) ergab eine TVQT von 10,9 Tagen im Vergleich zu 8,6 Tagen bei alleiniger Verabreichung von Vinblastin. Kombinationsverabreichung von Homoharringtonin (4 mg/kg) und Cisplatin (4 mg/kg) oder Amonafid (30 mg/kg) ergab eine TVQT von 10,4 bzw. 10,2 Tagen im Vergleich zu 9,9 bzw. 7,6 Tagen bei alleiniger Verabreichung dieser Mittel. Homoharringtonin in Kombination mit Etoposid (19 mg/kg) ergab eine TVQT von 8,7 Tagen, während Etoposid bei alleiniger Verabreichung eine TVQT von 8,5 Tagen ergab.

[0051] Oral verabreichtes Colchicin (10 mg/kg) ergab in Versuch E033 eine TVQT von 6,3 Tagen, während unbehandelte Kontrollen eine TVQT von 7,8 Tagen und Homoharringtonin (4 mg/kg) eine TVQT von 8,3 Tagen ergaben. Homoharringtonin in Kombination mit Colchicin verlängerte in diesen Dosierungen die TVQT auf 9,4 Tage.

[0052] In Versuch E036 ergab Genistein (60 mg/kg) in Kombination mit Homoharringtonin (4 mg/kg) eine TVQT von 9,2 Tagen, was länger war als jene von Genistein bei alleiniger Verabreichung (7,1 Tage).

[0053] Bei den Versuchstieren gab es in manchen Gruppen Todesfälle, die wie folgt aufgezeichnet wurden. Drei von vier Mäusen starben nach Behandlung mit Homoharringtonin, das vom NCI bezogen wurde und in DMSO auf eine Konzentration von 1,25 mg/ml eingestellt wurde. Zwei von fünf Mäusen starben, nachdem sie diese Formulierung intratumoral erhalten hatten. Vier von vier Mäusen starben nach Behandlung mit demselben Homoharringtonin, das in DMSO auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml eingestellt worden war. Die Kombination von Homoharringtonin (0,5 mg/ml) in DMSO mit Paclitaxel (2,5 mg/ml) war für zwei von vier Mäusen tödlich, und die Kombination von Homoharringtonin (0,5 mg/ml) in DMSO mit Cisplatin (1 mg/ml) war für eine von vier Mäusen tödlich. Die Kombination von Homoharringtonin (1 mg/ml) mit Vinblastin (0,5 mg/ml) war für eine von vier Mäusen, die diese Behandlung erhielten, tödlich, und die Kombination von Homoharringtonin (1 mg/ml) mit Genistein (15 mg/ml) war für zwei von fünf Mäusen tödlich.

[0054] Zusammengefasst zeigte die intraperitoneale Verabreichung von Homoharringtonin Antitumorwirkung, d.h. sie modulierte das Tumorwachstum im murinen RIF-1-Fibrosarkom-Modell. intraperitoneale Verabreichung von Homoharringtonin in Kombination mit Cisplatin, Cytarabin, Camptothecin, Vinblastin, Etoposid, 5-Fluoruracil, Amonafid, Colchicin und Genistein ergab bessere Antitumorwirkung als Homoharringtonin oder die jeweiligen Testmittel bei alleiniger Verabreichung. Die beste Kombinationswirkung zeigten 5-Fluoruracil, Amonafid und Vinblastin. Homoharringtonin in Kombination mit Paclitaxel ergab eine schwächere Antitumorwirkung als Homoharringtonin bei alleiniger Verabreichung. Homoharringtonin, das vom NCI bezogen und in DMSO formuliert wurde, zeigte einen gewissen Grad an tödlicher Toxizität, während das von der Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China) bezogene und in sterilem Wasser zur Verwendung beim Menschen formulierte Homoharringtonin in den eingesetzten Dosen keine tödliche Toxizität zeigte.

Tabelle 4

Zusammenfassung der Behandlungsgruppen

Formulie- rung	Behandlung	Konzentra- tion (mg/ml)	Verabrei- chungsweg	Injektions- volumen (µl)
1	HHT-NCI in DMSO	1,25	IP	100
2	HHT-NCI in DMSO	2,5	IP	100
3	HHT-NCI in DMSO	2,5	IT	50
4	HHT-NCI in DMSO	0,5	IP	100
5	CDDP in WFI	1	IP	100
6	Paclitaxel in WFI	2,5	IP	100
7	HHT-Clin in WFI	0,5	IP	100
8	HHT-Clin in WFI	0,25	IP	100
9	HHT-Clin in WFI	1	IP	100
10	Cytarabin in WFI	100	IP	100
11	Camptothecin in DMSO	2,5	IP	100
12	Vinblastin in Salzlösung	0,5	IP	100
13	Etoposid in Salzlösung	2,5	IP	100
14	5-Fluoruracil in Salzlösung	7,5	IP	100
15	Amonafid in Salzlösung	7,5	IP	100
16	Colchicin in Salzlösung	2,5	PO	100
17	5-Fluoruracil in Salzlösung	3,75	IP	100
18	Genistein in DMSO	15	IP	100

Tabelle 5

Wirkung von Homoharringtonin und Homoharringtonin in Kombination mit anderen Chemotherapeutika auf das RIF-1-Tumorwachstum bei C3H-Mäusen

Versuch Nr.	Formulierung	Behandlung	Anzahl der Tumoren	TVQT (in Tagen) (Mittelwert \pm Standardfehler)
E010	-	unbehandelte Kontrolle	8	7,2 \pm 0,1
E010	1	HHT-NCI (5 mg/kg)	2*	14,5 \pm 0,9
E010	2	HHT-NCI (10 mg/kg)	0*	alle verstorben
E010	3	HHT-NCI (5 mg/kg)	3*	15,6 \pm 1,8
E011	-	unbehandelte Kontrolle	8	8,3 \pm 0,4
E011	4	HHT-NCI (2 mg/kg)	8	10,1 \pm 0,4
E011	5	CDDP (4 mg/kg)	8	12,9 \pm 1,1
E011	4,5	HHT-NCI -30'- CDDP	6*	14,9 \pm 0,8
E011	6	Paclitaxel (10 mg/kg)	8	8,8 \pm 0,4
E011	4,6	HHT -30'- Paclitaxel	4*	8,8 \pm 0,4
E026	-	unbehandelte Kontrolle	8	7,4 \pm 0,3
E026	7	HHT-Clin (2 mg/kg)	8	10,4 \pm 1,0
E026	5	CDDP (4 mg/kg)	8	9,4 \pm 0,5
E026	7,5	HHT-Clin + CDDP	8	11,1 \pm 0,4
E026	7,5	HHT-Clin -30'- CDDP	8	10,1 \pm 0,4
E028	-	unbehandelte Kontrolle	8	8,7 \pm 0,5
E028	8	HHT-Clin (1 mg/kg)	8	9,2 \pm 0,7
E028	9	HHT-Clin (4 mg/kg)	8	10,1 \pm 0,4
E030	-	unbehandelte Kontrolle	8	6,7 \pm 0,4
E030	7	HHT-Clin (2 mg/kg)	8	7,9 \pm 0,3
E030	10	Cytarabin (400 mg/kg)	8	7,6 \pm 0,2
E030	7,10	HHT-Clin + Cytarabin	8	8,6 \pm 0,4
E030	11	Camptothecin (6 mg/kg)	8	9,4 \pm 0,4
E030	7,11	HHT-Clin + Camptothecin	8	10,1 \pm 0,6
E032	-	unbehandelte Kontrolle	8	6,5 \pm 0,6
E032	9	HHT-Clin (4 mg/kg)	8	8,5 \pm 0,5
E032	5	CDDP (4 mg/kg)	8	9,9 \pm 0,6
E032	9,5	HHT-Clin + CDDP	8	10,4 \pm 0,4
E032	12	Vinblastin (2 mg/kg)	8	8,6 \pm 0,4
E032	9,12	HHT-Clin + Vinblastin	6*	10,9 \pm 0,4
E032	13	Etoposid (10 mg/kg)	8	8,5 \pm 1,0
E032	9,13	HHT-Clin + Etoposid	8	8,7 \pm 0,5
E032	14	5-Fluoruracil (30 mg/kg)	8	13,6 \pm 1,9
E032	9,14	HHT-Clin + 5-Fluoruracil	8	17,9 \pm 0,7
E032	15	Amonafid (30 mg/kg)	8	7,6 \pm 0,4
E032	9,15	HHT-Clin + Amonafid	8	10,2 \pm 0,5

E033	-	unbehandelte Kontrolle	8	$7,8 \pm 0,6$
E033	9	HHT-Clin (4 mg/kg)	8	$8,3 \pm 0,4$
E033	16	Colchicin (10 mg/kg)	8	$6,3 \pm 0,3$
E033	9,16	HHT-Clin + Colchicin	8	$9,4 \pm 0,5$
E033	17	5-Fluoruracil (15 mg/kg)	8	$6,7 \pm 0,4$
E033	9,17	HHT-Clin + 5-Fluoruracil	8	$8,6 \pm 0,3$
E036	-	unbehandelte Kontrolle	8	$6,8 \pm 0,4$
E036	18	Genistein (60 mg/kg)	8	$7,1 \pm 0,4$
E036	9,18	HHT-Clin + Genistein	6*	$9,2 \pm 0,5$

* In diesen Gruppen kam es bei den Versuchstieren zu Todesfällen. Details im Text.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Cephalotaxins und eines antiproliferativen Mittels zur Herstellung eines Medikaments zur Reduktion oder Hemmung von Wachstum eines festen Tumors, worin das Cephalotaxin eine chemopotenzierende Wirkung bereitstellt.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Cephalotaxin Homoharringtonin umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Cephalotaxin ein Homoharringtonin-Analogon umfasst.

4. Verwendung nach Anspruch 1, worin das antiproliferative Mittel ein Mittel umfasst, das mit Nucleinsäuren wechselwirkt.

5. Verwendung nach Anspruch 1, worin das antiproliferative Mittel ein Alkylierungsmittel, ein interkalierendes Agens, einen Metallkoordinationskomplex, ein Pyrimidinnucleosid, ein Purinnucleosid, einen Inhibitor von Nucleinsäure-assoziierten Enzymen oder einen Inhibitor von Nucleinsäure-assoziierten Proteinen umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 1, worin das antiproliferative Mittel Cisplatin, Cytarabin, Camptothecin, Vinblastin, Etoposid, 5-Fluoruracil, Amonafid, Colchicin oder Genistein umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Medikament ein Cephalotaxin-Medikament und ein antiproliferatives Medikament umfasst und worin das Cephalotaxin-Medikament vor der Verabreichung des antiproliferativen Medikaments verabreicht wird.

8. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Medikament ein Cephalotaxin-Medikament und ein antiproliferatives Medikament umfasst und worin das Cephalotaxin-Medikament während der Verabreichung des antiproliferativen Medikaments verabreicht wird.

9. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Medikament ein Cephalotaxin-Medikament und ein antiproliferatives Medikament umfasst und worin das Cephalotaxin-Medikament nach der Verabreichung des antiproliferativen Medikaments verabreicht wird.

10. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Veränderung am festen Tumor mit dem genannten Medikament größer als jene im Fall des antiproliferativen Mittels alleine ausfällt.

11. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Reduktion oder Hemmung von Wachstum eines festen Tumors eine Steigerung der Dauer umfasst, die der Tumor nach der anfänglichen Behandlung benötigt, um zu seinem vierfachen Volumen anzuwachsen.

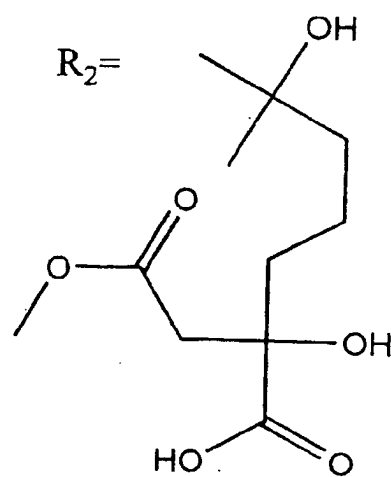
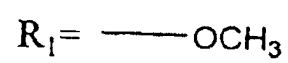
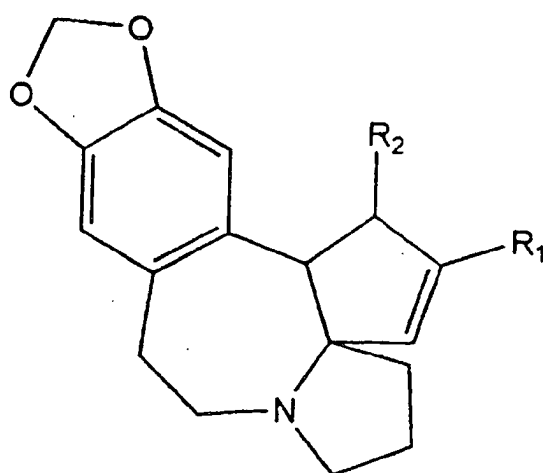
12. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Cephalotaxin und ein antiproliferatives Mittel, worin das antiproliferative Mittel aus der aus Cisplatin, Camptothecin, Vinblastin, Etoposid, Amonafid, Colchicin oder Genistein bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das Cephalotaxin Homoharringtonin oder ein Homoharringtonin-Analogon umfasst.

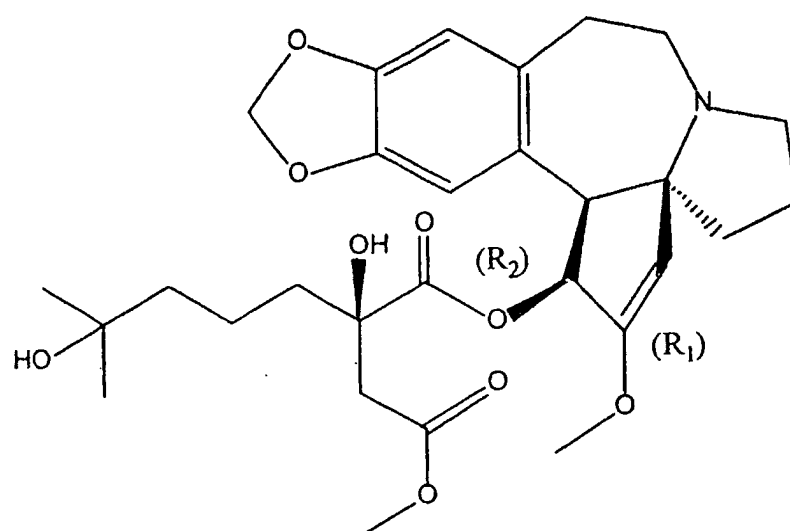
14. Medikament, umfassend ein Cephalotaxin und ein antiproliferatives Mittel, worin das antiproliferative Mittel aus der aus Cisplatin, Camptothecin, Vinblastin, Etoposid, Amonafid, Colchicin oder Genistein bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

15. Medikament nach Anspruch 14, worin das Cephalotaxin Homoharringtonin oder ein Homoharringtonin-Analogon umfasst.

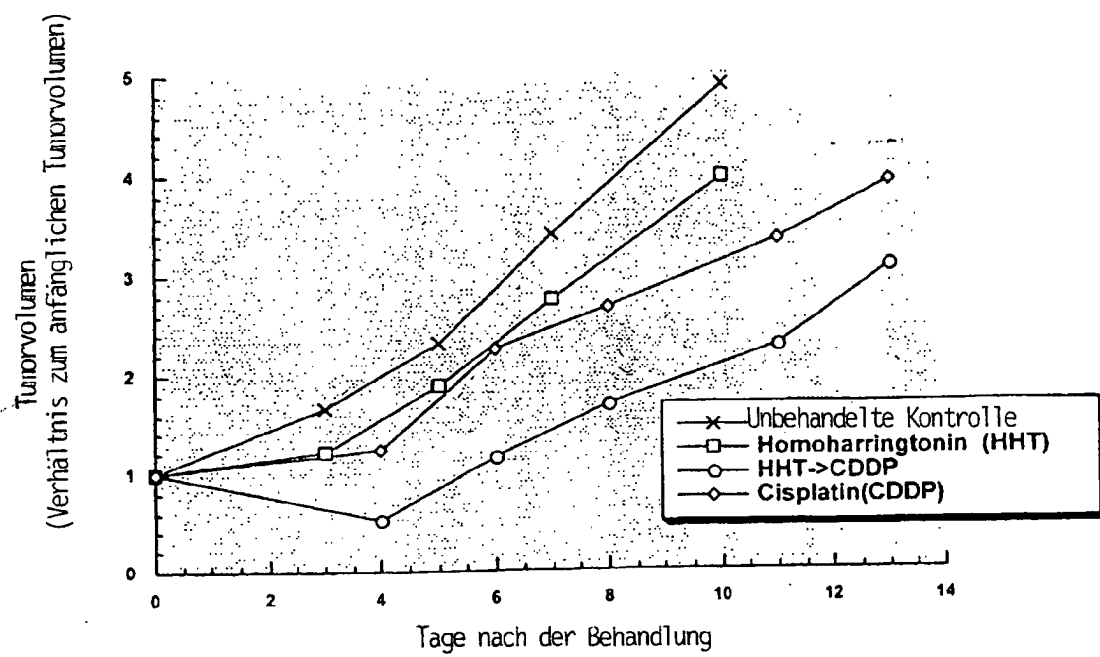
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen



FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3