



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 16 305 T2** 2007.07.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 432 402 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 16 305.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA02/01500**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 766 997.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/028696**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.10.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.04.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.06.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

(30) Unionspriorität:

326671 P	03.10.2001	US
341529 P	17.12.2001	US
356759 P	15.02.2002	US
2383259	23.04.2002	CA
401984 P	07.08.2002	US
408733 P	06.09.2002	US

(73) Patentinhaber:

Celator Pharmaceuticals, Inc., Princeton, N.J., US

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**TARDI, Paul, Surrey, British Columbia V3S 7M6,
CA; HARASYM, Troy, North Vancouver, British
Columbia V7K 2K, CA; WEBB, Murray, North
Vancouver, British Columbia V7R 3C, CA; SHEW,
Clifford, Vancouver, British Columbia V6Z 2S8,
CA; MAYER, Lawrence, North Vancouver, British
Columbia V7J3M4, CA; BALLY, Marcel, Bowen
Island British Columbia V0N 1G0, CA; JANOFF,
Andrew, Yardley Pennsylvania 19067, US**

(54) Bezeichnung: **Zusammensetzungen und Verfahren zur Abgabe von Arzneimittelkombinationen**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren zur verbesserten Abgabe von synergistischen oder additiven Kombinationen von therapeutischen Mitteln. Spezieller betrifft die Erfindung Abgabesysteme, die die Aufrechterhaltung von synergistischen oder additiven Verhältnissen sicherstellen, wenn die Mittel an ein beabsichtigtes Ziel abgegeben werden, indem eine Formulierung, die Abgabevehikel umfasst, bereitgestellt wird.

Stand der Technik

[0002] Der Verlauf vieler lebensbedrohlicher Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs, Aids, Infektionskrankheiten, Immunstörungen und kardiovaskuläre Störungen, wird durch mehrere molekulare Mechanismen beeinflusst. Aufgrund dieser Komplexität hat das Erreichen von Heilungen mit einem einzelnen Mittel beschränkten Erfolg gehabt. Deshalb sind häufig Kombinationen von Mitteln verwendet worden, um Erkrankungen zu bekämpfen, insbesondere bei der Behandlung von Krebs. Es scheint, dass es eine starke Korrelation zwischen der Anzahl verabreichter Mittel und den Heilungsraten für Krebsarten, wie zum Beispiel akute lymphozytäre Leukämie, gibt (Frei, et al., Clin. Cancer Res. (1998) 4: 2027–2037). Klinische Versuche unter Verwendung von Kombinationen von Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Methotrexat mit Leucovorin-Rescue und Cytarabin (ACOMLA) oder Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison und Bleomycin (CHOP-b) sind erfolgreich eingesetzt worden, um histiozytäre Lymphome zu behandeln (Todd, et al., J. Clin. Oncol. (1984) 2: 986–993).

[0003] Die Wirkungen von Kombinationen von Arzneimitteln bzw. Wirkstoffen sind verstärkt, wenn das Verhältnis, in dem sie zugeführt werden, eine synergistische Wirkung bereitstellt. Es ist aufgezeigt worden, dass synergistische Kombinationen von Mitteln die Toxizität aufgrund geringerer Dosiserfordernisse verringern, die Krebsheilungsraten erhöhen (Barriere, et al., Pharmacotherapy (1992) 12: 397–402; Schimpff, Support Care Cancer (1993) 1: 5–18) und die Ausbreitung von multiresistenten Stämmen von Mikroorganismen verringern (Shlaes, et al., Clin. Infect. Dis. (1993) 17: S527–S536). Durch Wählen von Mitteln mit unterschiedlichen Wirkmechanismen können mehrfache Stellen bzw. Ziele in biochemischen Wegen angegriffen werden, wodurch eine Synergie resultiert (Shah und Schwartz, Clin. Cancer Res. (2001) 7: 2168–2181). Es wurde berichtet, dass Kombinationen wie zum Beispiel L-Canavanin und 5-Fluoruracil (5-FU) eine größere antineoplastische Aktivität in Ratten-Colontumormodellen aufweisen als die kombinierten Wirkungen jedes Wirkstoffs alleine (Swaffar, et al., Anti-Cancer Drugs (1995) 6: 586–593). Cisplatin und Etoposid zeigen eine Synergie beim Bekämpfen des Wachstums einer humanen kleinzelligen Lungenkrebs-Zelllinie, SCB-3 (Kanzawa, et al., Int. J. Cancer (1997) 71(3): 311–319).

[0004] Weitere Berichte synergistischer Wirkungen werden gefunden für:

Vinblastin und rekombinantes Interferon- β (Kuebler, et al., J. Interferon Res. (1990) 10: 281–291);
Cisplatin und Carboplatin (Kobayashi, et al., Nippon Chiryo Gakkai Shi (1990) 25: 2684–2692);
Ethyldeshydroxy-sparsomycin und Cisplatin oder Cytosin-arabinosid (AraC) oder Methotrexat oder 5-FU oder Vincristin (Hofs, et al., Anticancer Drugs (1994) 5: 35–42);
all-trans-Retinolsäure und Buttersäure oder Tributyrin (Chen, et al., Chin. Med. Engl. (1999) 112: 352–355);
und
Cisplatin und Paclitaxel (Engblom, et al., Br. J. Cancer (1999) 79: 286–292).

[0005] In den vorangehenden Studien wurde die Bedeutung des Verhältnisses der Komponenten für die Synergie erkannt. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass 5-Fluoruracil und L-Canavanin bei einem Molverhältnis von 1:1 synergistisch, aber bei einem Verhältnis von 5:1 antagonistisch sind; Cisplatin und Carboplatin zeigten eine synergistische Wirkung bei einem Fläche-unter-der-Kurve(AUC)-Verhältnis von 13:1, aber eine antagonistische Wirkung bei 19:5.

[0006] Es wurde gezeigt, dass andere Wirkstoffkombinationen synergistische Wechselwirkungen zeigen, obwohl die Abhängigkeit der Wechselwirkung vom Kombinationsverhältnis nicht beschrieben wurde. Diese Liste ist ziemlich umfangreich und besteht hauptsächlich aus Berichten von in vitro-Kulturen, obwohl gelegentlich in vivo-Studien eingeschlossen sind.

[0007] Zusätzlich zu der Vielzahl an Berichten ist gezeigt worden, dass eine Anzahl an Kombination in der Klinik wirksam ist. Diese sind in der nachstehenden Tabelle beschrieben.

Referenz	Wirkstoff 1	Wirkstoff 2	Wirkstoff 3
Langer, <i>et al.</i> (1999) Drugs 58 Suppl. 3:71-75	Cisplatin oder Vindesin	+ UFT (Tegafur/Uracil)	
FDA ^a (Dickdarm- oder Rektalkrebs)	Leucovorin	+ 5-FU	
FDA (Dickdarm- oder Rektalkrebs)	Irinotecan	+ Leucovorin	+ 5-FU
FDA (Brustkrebs)	Herceptin	+ Paclitaxel	
FDA (Brustkrebs)	Xeloda (andere Namen: Capecitabin)	+ Docetaxel	
FDA (Eierstock- und Lungenkrebs)	Paclitaxel	+ Cisplatin	
FDA (Lungenkrebs)	Etoposid	+ andere von der FDA zugelassene chemotherapeutische Mittel	
FDA (Lungenkrebs)	Gemcitabin	+ Cisplatin	
FDA (Prostata)	Novantron (Mitoxantron-Hydrochlorid)	+ Corticosteroide	
FDA (akute nichtlymphatische Leukämie)	Novantron	+ andere von der FDA zugelassene Wirkstoffe	
FDA (akute nichtlymphatische Leukämie/akute lymphatische Leukämie)	Daunorubicin (DNR, Cerubidin)	+ andere von der FDA zugelassene Wirkstoffe	
FDA (chronische myelogene Leukämie)	Busulfex (Busulfan; 1,4-Butandiol, Dimethansulfonat; BU, Myleran)	+ Cyclophosphamid (Cytosan)	

^aFDA: United States Food and Drug Administration

[0008] Zusätzlich kann aufgrund verschiedener Berichte in der Literatur postuliert werden, dass bestimmte andere Kombinationen das Potential zum Aufweisen nicht-antagonistischer Kombinationswirkungen oder klinischer Wirksamkeit haben oder sind von regionalen Studiengruppen als der Behandlungsstandard akzeptiert. Diese sind:

Erkrankung	Wirkstoff 1	Wirkstoff 2	Wirkstoff 3
(Dickdarmkrebs) Leucovorin	Oxaloplatin	+ 5-FU (oder FUDR) +	
(Metastasierender Brustkrebs)	Taxol	+ Doxorubicin	
	Adriamycin (Doxorubicin)	+ Cytosan (Cyclophosphamid)	
	Methotrexat	+ 5-FU (oder FUDR) + Cytosan	
	Vinblastin	+ Doxorubicin	
(Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs)	Carboplatin	+ Taxol	
	Cisplatin	+ Docetaxel (Taxotere®)	
	Vinorelbin	+ Cisplatin	
	Irinotecan	+ Cisplatin	
(Kleinzelliger Lungenkrebs)	Carboplatin	+ Taxol	
	Cisplatin	+ Etoposid	
(Prostatakrebs)	Estramustin	+ Taxol	
	Estramustin	+ Mitoxantron	
	Estramustin	+ Taxoter	

(Hodgkin-Lymphom)	Bleomycin (als Teil von ABDV: Adriamycin, Bleomycin, DTIC, Vinblastin)	+ Vinblastin
(Nicht-Hodgkin-Lymphom)	Carboplatin (als Teil von ICE: Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid)	+ Etoposid
(Melanom)	IL-2	+ Cisplatin
(Akute myeloische Leukämie)	Daunorubicin Vincristin	+ Cytosin-Arabinosid + Doxorubicin
(Blasenkrebs)	Carboplatin Carboplatin Gemcitabin Vinblastin (als Teil von MVAC: Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin)	+ Taxol + Gemcitabin + Taxol + Doxorubicin
(Kopf- und Nackenkrebs)	5-FU (oder FUDR) + Cisplatin + Leucovorin	
(Bauchspeicheldrüsenkrebs)	Gemcitabin	+ 5-FU (oder FUDR)
Weitere Kombinationen:	Carboplatin Carboplatin Irinotecan Vinorelbin Methotrexat Idarubicin Adriamycin Safingol	+ 5-FU (oder FUDR) + Irinotecan + 5-FU (oder FUDR) + Carboplatin + 5-FU (oder FUDR) + AraC + Vinorelbin + Fenretinid

[0009] Trotz der vorstehend genannten Vorteile, die mit der Verwendung synergistischer Wirkstoffkombinationen verbunden sind, gibt es viele Nachteile, die ihre therapeutische Verwendung beschränken. Beispielsweise hängt die Synergie häufig von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Dauer der Wirkstoffexposition und der Reihenfolge der Verabreichung, ab (Bonner und Kozelsky, Cancer Chemother. Pharmacol. (1990) 39: 109–112). Studien unter Verwendung von Ethyldeshydroxy-sparsomycin in Kombination mit Cisplatin zeigen, dass die Synergie durch die Kombinationsverhältnisse, die Dauer der Behandlung und die Reihenfolge der Behandlung beeinflusst wird (Hofs, et al., supra).

[0010] Es ist daher bekannt, dass zur Synergie, die von einer Kombination von Mitteln gezeigt werden soll, diese Mittel in Mengen vorliegen müssen, die definierte Verhältnisse darstellen. Tatsächlich kann die gleiche Kombination von Wirkstoffen bei manchen Verhältnissen antagonistisch sein, bei anderen synergistisch und bei noch anderen additiv. Es ist wünschenswert, antagonistische Wirkungen zu vermeiden, so dass die Wirkstoffe wenigstens additiv sind. Die vorliegende Erfindung erkennt an, dass das bei einem individuellen Verhältnis erhaltene Ergebnis auch von der Konzentration abhängt. Manche Verhältnisse sind bei einer Konzentration antagonistisch und bei einer anderen nicht-antagonistisch. Die Erfindung gewährleistet Verhältnisse von Komponenten im synergistischen oder additiven Bereich durch Abgabe dieser Mittel in Formulierungen, die das gewünschte oder verabreichte Verhältnis aufrechterhalten, wenn der Zielort in dem Subjekt erreicht ist, und durch Auswählen der Verhältnisse, um bei gewünschten Konzentrationsbereichen vorwiegend nicht-antagonistisch zu sein, da die Konzentration am Ziel von der verschiedenen sein kann, die verabreicht worden ist.

[0011] Die PCT-Veröffentlichung WO 00/51641 beschreibt die Verabreichung einer Kombination antiviraler

Mittel, die synergistisch sein soll. In vitro-Tests wurden verwendet, um synergistische Verhältnisse zu bestimmen. Es gibt dort jedoch keine Lehre über eine Verabreichungsweise, die dieses Verhältnis in vivo aufrechterhalten würde. Tatsächlich stellt die Veröffentlichung fest, dass die Komponenten sequentiell oder gleichzeitig verabreicht werden können.

[0012] Die PCT-Veröffentlichung WO 01/15733 beschreibt mutmaßlich synergistische Zusammensetzungen zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Wiederum stellt das Formulierungsverfahren die Aufrechterhaltung dieses Verhältnisses nach der Abgabe nicht sicher.

[0013] Daoud, et al., Cancer Chemother. Pharmacol. (1991) 28: 370–376 beschreiben synergistische cytotoxische Wirkungen von Cisplatin und liposomalem Valinomycin auf humane Eierstockkarzinomzellen. Diese Veröffentlichung beschreibt einen in vitro-Assay, bei dem Cisplatin, das frei vorliegt, und Valinomycin, das in Liposomen verkapselt ist, verwendet werden, um Kulturen von CaOV-3, eine von humanem Eierstocktumor abgeleitete Zelllinie, zu behandeln. Die Autoren bestimmten die Konzentrationsbereiche, über die Synergismus und Antagonismus gezeigt wurden. Liposom-Verkapselung wurde eingesetzt, um das Valinomycin zu solubilisieren. Da die Experimente in vitro durchgeführt wurden, ist eine in vivo-Abgabe irrelevant.

[0014] Das US-Patent 6,214,821, erteilt am 10. April 2001 an Daoud, beschreibt pharmazeutische Zusammensetzungen, die Topoisomerase-I-Inhibitoren und ein Staurosporin enthalten. Die Ansprüche scheinen auf der Entdeckung zu beruhen, dass Staurosporine die Fähigkeit besitzen, Topoisomerase-I-Inhibitor-induziertes Anhalten der S-Phase aufzuheben und seine Cytotoxizität gegenüber humanen Brustkrebszellen, denen eine normale p53-Funktion fehlt, zu erhöhen. Es wird keine spezielle pharmazeutische Formulierung vorgeschlagen.

[0015] Das US-Patent 5,000,958, erteilt an Fountain, et al., beschreibt Gemische von antimikrobiellen Mitteln, die in Liposomen verkapselt sind, und von denen behauptet wird, dass sie eine verstärkte therapeutische Wirkung in vivo ausüben. Geeignete Verhältnisse antimikrobieller Mittel werden durch einen Kombinationswirkungstest, der empirisch auf Synergie in vitro testet, bestimmt. Es gibt keine Diskussion über das Sicherstellen eines synergistischen Verhältnisses über einen Bereich von Konzentrationen.

[0016] Schiffelers, et al., J. Pharmacol. Exp. Therapeutic (2001) 298: 369–375 beschreiben die synergistische Wechselwirkung von Gentamicin und Ceftazidim, co-verkapselt in Liposomen, in vivo. Die gewünschten Verhältnisse wurden unter Verwendung eines ähnlichen Kombinationswirkungstests, wie der von Fountain (supra) bestimmt, aber es gibt keine Diskussion über die Bestimmung eines Verhältnisses, bei dem der Synergismus über einen Bereich von Konzentrationen aufrechterhalten bleibt.

[0017] Die vorliegende Erfindung erkennt erstens, dass es möglich ist, ein bestimmtes bzw. festgelegtes synergistisches oder additives Verhältnis von therapeutischen Mitteln durch Kontrollieren der Pharmakokinetiken der Formulierung, in der sie verabreicht werden, aufrechtzuerhalten, und zweitens, dass das nicht-antagonistische Verhältnis über einen Bereich von Konzentrationen gezeigt werden muss, da die Konzentration an Komponenten in einem Wirkstoffcocktail, der das Zielgewebe erreicht, nicht die gleiche sein muss wie die, die verabreicht wird. Das Problem der Aufrechterhaltung von Synergie oder Additivität wird durch die Erkenntnis gelöst, dass wenn therapeutische Mittel verkapselt sind in (d.h. stabil assoziiert mit) Abgabevehikeln, wie zum Beispiel Liposomen, die Abgabevehikel die Pharmakokinetiken bestimmen und die Mittel, die verkapselt sind, sich folglich auf eine ähnliche Weise verhalten werden, und durch Auswählen von Verhältnissen, die über einen Bereich von Konzentrationen vorwiegend synergistisch/additiv sind.

Offenbarung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Verabreichung nicht-antagonistischer Verhältnisse von antineoplastischen Mitteln unter Verwendung von Abgabevehikel-Zusammensetzungen, die zwei oder mehr Mittel verkapseln, wobei die Mittel in den Vehikeln in Verhältnissen vorliegen, die über einen Bereich von Konzentrationen synergistisch oder additiv (d.h. nicht-antagonistisch) sind. Vor der Verkapselung werden die Verhältnisse antineoplastischer Mittel in der Kombination so gewählt, dass die Kombination über einen gewünschten Konzentrationsbereich Synergie oder Additivität aufweist. Die Verkapselung in Abgabevehikeln ermöglicht es, dass zwei oder mehr Mittel auf eine geordnete Weise an der Krankheitsstelle abgegeben werden, wodurch sichergestellt wird, dass die Mittel an der Krankheitsstelle in einem nicht-antagonistischen Verhältnis vorhanden sein werden. Dieses Ergebnis wird erreicht werden, ungeachtet ob die Mittel in Abgabevehikeln co-verkapselt sind oder separat in Abgabevehikeln verkapselt sind, die so verabreicht werden, dass nicht-antagonistische Verhältnisse an der Krankheitsstelle aufrechterhalten werden. Die Pharmakokinetiken (PK) der Zusam-

mensetzung werden durch die Abgabevehikel selbst kontrolliert, so dass eine koordinierte Abgabe erreicht wird (vorausgesetzt, dass die PKs der Abgabesysteme vergleichbar sind).

[0019] Folglich stellt die Erfindung unter einem Gesichtspunkt eine Abgabevehikel-Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung, umfassend zwei oder mehr Mittel, die in der Vehikelzusammensetzung in einem Verhältnis, das über einen gewünschten Konzentrationsbereich synergistisch oder additiv ist, verkapselt sind, bereit. Die Abgabevehikel-Zusammensetzung wird durch ein Verfahren hergestellt, das Verkapseln der Mittel in der Abgabevehikel-Zusammensetzung in diesen Verhältnissen umfasst. Das nicht-antagonistische Verhältnis der Mittel wird bestimmt durch Bewertung der biologischen Aktivität oder Wirkungen der Mittel auf relevante Zellkultur- oder zellfreie Systeme über einen Bereich von Konzentrationen und, in einer Ausführungsform, Anwenden eines Algorithmus, um einen „Kombinationsindex“ (CI) zu bestimmen. Wie es untenstehend weiterhin beschrieben ist, kann ein Kombinationsindex bei jedem Konzentrationslevel unter Verwendung anerkannter Algorithmen berechnet werden. Es werden Verhältnisse ausgewählt, bei denen der CI Synergie oder Additivität über einen Bereich von Konzentrationen darstellt. Bevorzugt ist der CI über einen weiten Konzentrationsbereich synergistisch. Die Mittel sind Antitumormittel. Jedes Verfahren, das in der Bestimmung bzw. Festlegung eines Verhältnisses von Mitteln, das eine nicht-antagonistische Wirkung über einen gewünschten Bereich von Konzentrationen aufrechterhält, resultiert, kann verwendet werden.

[0020] Insbesondere betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung, die partikulierte Abgabevehikel umfasst, die damit assoziiert wenigstens ein erstes antineoplastisches Mittel und ein zweites antineoplastisches Mittel haben, wobei das erste und das zweite Mittel in einem Molverhältnis sind, das eine nicht-antagonistische, cytotoxische oder cytostatische Wirkung aufweist, und wobei das erste und zweite Mittel mit den Abgabevehikeln assoziiert sind, um bei Verabreichung ein nicht-antagonistisches Verhältnis im Blut aufrecht zu erhalten. In einer Ausführungsform weist das Molverhältnis des ersten Mittels zum zweiten Mittel eine nicht-antagonistische cytotoxische oder cytostatische Wirkung für relevante Zellen in Kultur über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs auf, bei dem $> 1\%$ der Zellen in einem in vitro-Assay auf die cytotoxische oder cytostatische Wirkung affiziert werden ($f_a > 0,01$). Mit „relevanten“ Zellen meinen die Anmelder wenigstens eine Zellkultur oder Zelllinie, die zum Testen bzw. zur Untersuchung der gewünschten biologischen Wirkung geeignet ist. Wenn zum Beispiel das Mittel ein antineoplastisches Mittel ist, wäre eine „relevante“ Zelle eine Zelllinie, die durch das „Development Therapeutics Program“ (DTP) des „National Cancer Institute“ (NCI)/„National Institutes of Health“ (NIH) als in ihrem Antikrebswirkstoff-Entdeckungsprogramm nützlich identifiziert wurde. Gegenwärtig nutzt die DTP-Durchmusterung 60 verschiedene humane Tumorzelllinien. Die gewünschte Aktivität auf wenigstens eine solcher Linien würde gezeigt werden müssen.

[0021] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden verwendet, um ein synergistisches oder additives Verhältnis von zwei oder mehr antineoplastischen Mitteln an ein gewünschtes Ziel abzugeben, in dem die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verabreicht werden.

[0022] Unter einem anderen Gesichtspunkt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wobei das Verfahren umfasst: a) Bestimmung eines Molverhältnisses des ersten und des zweiten Mittels in einem relevanten Zellkulturassay auf cytotoxische oder cytostatische Aktivität, das über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs, über den mehr als 1% Zellen durch das genannte Verhältnis der Mittel affiziert werden ($f_a > 0,01$), nicht-antagonistisch ist, und b) Einkapseln eines Molverhältnisses von Mitteln, das in Schritt a) als nicht-antagonistisch bestimmt wurde, mit den genannten Abgabevehikeln. Das Verfahren kann das Bereitstellen eines Panels von wenigstens zwei Mitteln, wobei das Panel wenigstens ein aber bevorzugt eine Mehrzahl bzw. Multiplizität von Verhältnissen der genannten Mittel umfasst, Testen der Fähigkeit der Mitglieder des Panels eine cytotoxische oder cytostatische Wirkung auf ein relevantes Zellkultur- oder zellfreies System über einen Bereich von Konzentrationen auszuüben, Auswählen eines Mitglieds des Panels, wobei das Verhältnis eine synergistische oder additive Wirkung auf das genannte Zellkultur- oder zellfreie System über einen geeigneten Bereich von Konzentrationen bereitstellt; und Einkapseln (d.h. stabiles Assoziieren) der Verhältnisse der Mittel, die durch das erfolgreiche Mitglied im Panel dargestellt werden, in Wirkstoffabgabevehikel umfassen.

[0023] Wie zudem untenstehend beschrieben wird, werden in einer bevorzugten Ausführungsform beim Entwickeln bzw. Gestalten einer geeigneten Kombination gemäß dem oben beschriebenen Verfahren die nicht-antagonistischen Verhältnisse als jene gewählt, die einen Kombinationsindex (CI) von $\leq 1,1$ über einen Bereich von wenigstens 5% der Dosen oder Konzentrationen haben, die mehr als 1% oder mehr der Zellen ($f_a > 0,01$), bevorzugt zwischen 20 und 80% der Zellen ($f_a = 0,2$ bis $0,8$) affizieren, wie durch relevante Zellkultursysteme definiert wird.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0024] [Fig. 1](#) ist eine Darstellung, die das erfindungsgemäße Verfahren zum Bestimmen eines geeigneten Verhältnisses therapeutischer Mittel zum Einschließen in Formulierungen skizziert.

[0025] [Fig. 2\(A–E\)](#) illustriert fünf Verfahren zum Darstellen von Kombinations- und Synergiedaten.

[0026] [Fig. 3A](#) ist ein Diagramm des Kombinationsindex (CI) für Irinotecan:5-FU bei Molverhältnissen von 1:10 (gefüllte Quadrate) und 1:1 (gefüllte Kreise) als Funktion des Anteils bzw. der Fraktion affizierter HT29-Zellen (f_a).

[0027] [Fig. 3B](#) ist ein Diagramm des CI für Etoposid:Carboplatin bei Molverhältnissen von 1:10 (gefüllte Raute) und 10:1 (gefüllte Quadrate) als Funktion des Anteils affizierter MCF-7-Zellen (f_a).

[0028] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm des CI für Cisplatin:Edelfosin bei Molverhältnissen von 10:1 (gefüllte Dreiecke) und 1:1 (gefüllte Kreise) als Funktion des Anteils affizierter H460-Zellen (f_a).

[0029] [Fig. 5A](#) ist ein Diagramm des CI-Maximums als Funktion von Carboplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 10:1, 1:1 und 1:10 in H460-Zellen. Das eingesetzte Feld ist ein Histogramm des CI für Carboplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 10:1 und 1:1 bei Wirkdosis- bzw. Effektivdosis(ED)-Werten von 50, 75 und 90 in MCF-7-Zellen.

[0030] [Fig. 5B](#) ist ein Diagramm des CI für Carboplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 1:10 (gefüllte Dreiecke), 1:1 (gefüllte Quadrate) und 10:1 (gefüllte Kreise) als Funktion des Anteils affizierter H460-Zellen (f_a). Das eingesetzte Feld ist ein Histogramm des CI für Carboplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 1:10, 1:1 und 10:1 bei ED-Werten von 50, 75 und 90 in H460-Zellen.

[0031] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm der Carboplatin-(ungefüllte Kreise) und Daunorubicin-(gefüllte Kreise)Konzentrationen in Plasma (nmol/ml) als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung, wenn die Wirkstoffe in einem einzigen Liposom (DSPC/DSPG, 80:20 mol%) bei einem nicht-antagonistischen Verhältnis (10:1) formuliert sind.

[0032] [Fig. 7A](#) ist ein Diagramm des Carboplatin:Daunorubicin-Molverhältnisses als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung bei drei verschiedenen Verhältnissen, wenn die Wirkstoffe in einem einzigen Liposom (DSPC/DSPG, 80:20 mol%) bei 10:1 (gefüllte Kreise), 5:1 (ungefüllte Kreise) und 1:1 (gefüllte Dreiecke) formuliert sind.

[0033] [Fig. 7B](#) ist ein Diagramm der 1:1-Carboplatin:Daunorubicin-Daten in [Fig. 7A](#), wieder aufgetragen als eine Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung.

[0034] [Fig. 8](#) ist ein Diagramm der Carboplatin-(gefüllte Kreise) und Daunorubicin-(ungefüllte Kreise)Konzentrationen in Plasma (nmol/ml) als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung, wenn die Wirkstoffe in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (10:1) in einem einzigen Liposom (DSPC/Sphingomyelin/DSPE-PEG2000, 90:5:5 mol%) formuliert sind.

[0035] [Fig. 9](#) ist ein Diagramm, das die Aktivität eines Cocktails aus Carboplatin und Daunorubicin (gefüllte umgekehrte Dreiecke), Carboplatin und Daunorubicin, formuliert in einem einzigen Liposom (ungefüllte umgekehrte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 tragen. Carboplatin und Daunorubicin waren in DSPC/DSPG(80:20 mol%)-Liposomen bei einem Molverhältnis von 1:1 formuliert. Die Pfeile geben die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0036] [Fig. 10](#) ist ein Diagramm, das die Aktivität eines Cocktails aus Carboplatin und Daunorubicin (gefüllte Dreiecke), Carboplatin und Daunorubicin, formuliert in einem einzigen Liposom (ungefüllte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Dreiecke) vergleicht, der Mäusen gegeben wurde, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen. Carboplatin und Daunorubicin waren in DSPC/SM/DSPE-PEG2000(90:5:5 mol%)-Liposomen in einem Molverhältnis von 10:1 formuliert. Die Pfeile entlang der x-Achse geben den Dosierungszeitplan an.

[0037] [Fig. 11A](#) ist ein Diagramm des CI für Cisplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 1:1 (gefüllte

Quadrate) und 10:1 (gefüllte Kreise) als Funktion des Anteils affizierter H460-Zellen (f_a).

[0038] **Fig. 11B** ist ein Diagramm des CI-Maximums als Funktion von Cisplatin:Daunorubicin bei Molverhältnissen von 10:1, 1:1 und 1:10 gegen H460-Zellen.

[0039] **Fig. 12** ist ein Diagramm der Cisplatin-(ungefüllte Kreise) und Daunorubicin-(gefüllte Kreise)Konzentrationen in Plasma ($\mu\text{mol/ml}$) als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung, wenn die Wirkstoff in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (10:1) in einem einzigen Liposom (DMPC/Chol, 55:45 mol%) formuliert sind.

[0040] **Fig. 13** ist ein Diagramm der Cisplatin-(gefüllte Kreise) und Daunorubicin-(ungefüllte Kreise)Konzentrationen im Plasma ($\mu\text{mol/ml}$) als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung, wenn die Wirkstoffe in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (10:1) in zwei separaten Liposomen (DMPC/Chol, 55:45 mol% für Cisplatin und DSPC/DSPE-PEG2000, 95:5 mol% für Daunorubicin) formuliert sind.

[0041] **Fig. 14** ist ein Diagramm, das die Aktivität eines Cocktails aus Cisplatin und Daunorubicin (gefüllte umgekehrte Dreiecke), Cisplatin und Daunorubicin, formuliert in getrennten Liposomen (ungefüllte umgekehrte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise), vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen. Cisplatin war in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen formuliert und Daunorubicin war in DSPC/DSPE-PEG2000(95:5 mol%)-Liposomen formuliert und sie wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (10:1) verabreicht. Die Pfeile geben die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0042] **Fig. 15** ist ein Diagramm, das die Konzentrationen von Cisplatin (gefüllte Kreise) und Daunorubicin (ungefüllte Kreise), die zu verschiedenen Zeiten nach der intravenösen Verabreichung im Plasma verblieben (nmol/ml) darstellt, wenn die Wirkstoff in einem einzelnen Liposom (DMPC/Chol, 55:45 mol%) bei einem antagonistischen Molverhältnis von 1:1 formuliert waren. Die eingesetzten Felder zeigen das Cisplatin:Daunorubicin-Molverhältnis zu verschiedenen Zeiten nach der Verabreichung.

[0043] **Fig. 16** ist ein Diagramm, das die Aktivität eines Cocktails aus Cisplatin und Daunorubicin (gefüllte Dreiecke), Cisplatin und Daunorubicin, formuliert in einem einzigen Liposom (ungefüllte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen. Die Wirkstoffe waren in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen in einem antagonistischen Molverhältnis (1:1) formuliert. Die Pfeile geben die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0044] **Fig. 17A** ist ein Diagramm des CI für Cisplatin:Topotecan bei Molverhältnissen von 1:1 (gefüllte Kreise) und 10:1 (ungefüllte Kreise) als Funktion des Anteils affizierter H460-Zellen (f_a).

[0045] **Fig. 17B** ist ein Diagramm des CI-Maximums als Funktion des Cisplatin:Topotecan-Molverhältnisses gegen H460-Zellen.

[0046] **Fig. 18** ist ein Diagramm, das die Konzentrationen von Cisplatin (gefüllte Kreise) und Topotecan (ungefüllte Kreise) zeigt, die im Plasma ($\mu\text{mol/ml}$) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung verbleiben, wenn die Wirkstoffe in separaten Liposomen (DMPC/Chol, 55:45 mol% für Cisplatin und DSPC/Chol, 55:45 mol% für Topotecan) formuliert sind. Das eingesetzte Feld zeigt das Cisplatin:Topotecan-Molverhältnis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verabreichung.

[0047] **Fig. 19** ist ein Diagramm, das die Aktivität eines Cocktails aus Cisplatin und Topotecan (gefüllte Dreiecke), Cisplatin und Topotecan, formuliert in separaten Liposomen (ungefüllte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen. Cisplatin war in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen formuliert und Topotecan war in DSPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen formuliert und sie wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (10:1) verabreicht. Die Pfeile geben die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0048] **Fig. 20A** ist ein Diagramm des CI für Cisplatin:Irinotecan bei Molverhältnissen von 1:1 (Quadrate), 10:1 (Kreise), 1:5 (Dreiecke) und 1:10 (Rauten) als Funktion des Anteils affizierter H460-Zellen (f_a).

[0049] **Fig. 20B** ist ein Diagramm des CI-Maximums als Funktion des Cisplatin:Irinotecan-Molverhältnisses gegen H460-Zellen.

[0050] [Fig. 21](#) ist ein Diagramm, das die Konzentrationen von Cisplatin (gefüllte Kreise) und Irinotecan (ungefüllte Kreise) zeigt, die im Plasma (nmol/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung verblieben, wenn die Wirkstoffe in ein einziges Liposom (DSPC/DSPG, 80:20 mol%) co-geladen wurden.

[0051] [Fig. 22](#) ist ein Diagramm, das die Konzentrationen von Cisplatin (gefüllte Kreise) und Irinotecan (ungefüllte Kreise) zeigt, die im Plasma (nmol/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung verbleiben, wenn die Wirkstoffe in separaten Liposomen formuliert sind (DMPC/Chol, 55:45 mol% für Cisplatin und DSPC/DSPE-PEG2000, 95:5 mol% für Irinotecan).

[0052] [Fig. 23](#) ist ein Graph, der die Aktivität eines Cocktails aus Cisplatin und Irinotecan (gefüllte Quadrate), Cisplatin und Irinotecan, formuliert in separaten Liposomen und verabreicht in unterschiedlichen Dosen (ungefüllte Symbole), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den humanen nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 tragen. Cisplatin, formuliert in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen, und Irinotecan, formuliert in DSPC/DSPE-PEG2000(95:5 mol%)-Liposomen, wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (1:5) verabreicht. Die Pfeile zeigen die Tage, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0053] [Fig. 24](#) ist ein Diagramm des CI für Vinorelbin in Kombination mit POPS (umgekehrte Dreiecke), DPPS (aufrechte Dreiecke), DLPS (Kreise), DSPS (Rauten) oder DOPS (Quadrate) als Funktion der bei Vinorelbin:PS-Molverhältnissen von 1:1 affizierten H460-Zellen (f_a).

[0054] [Fig. 25A](#) ist ein Diagramm der Vinorelbin-Konzentration in Plasma als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung an SCID/rag2-Mäuse von Vinorelbin in freier Form (gefüllte Kreise) oder verkapselt in SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000(35:45:10:10 mol%)-Liposomen (ungefüllte Kreise) bei einem Vinorelbin:PS-Molverhältnis von 1:1.

[0055] [Fig. 25B](#) ist ein Histogramm, das die Plasmakonzentrationsfläche unter der Kurve (AUC) für Vinorelbin in freier Form (gefüllte Balken) oder verkapselt in SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000, 35:45:10:10 mol% (grauer Balken) nach intravenöser Verabreichung an SCID/rag2-Mäuse zeigt, wobei die Daten von [Fig. 25A](#) verwendet wurden.

[0056] [Fig. 26](#) ist ein Diagramm, das die Aktivität von freiem Vinorelbin (ungefüllte Kreise), Vinorelbin, verkapselt in DSPC/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000, 35:45:10:10 mol% Liposomen (gefüllte umgekehrte Dreiecke), Vinorelbin, verkapselt in SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000(35:45:10:10 mol%)-Liposomen (ungefüllte Dreiecke), oder Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) vergleicht, die Mäusen gegeben wurden, die den nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen. Vinorelbin und Phosphatidylserin (DPPS) wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (1:1) formuliert. Die Pfeile zeigen die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0057] [Fig. 27](#) zeigt die Wirkung von Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise); freiem Vinorelbin (ungefüllte Kreise); Vinorelbin, verkapselt in: SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000, 35:45:10:10 (gefüllte umgekehrte Dreiecke), DAPC/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000, 35:45:10:10 mol% (ungefüllte Dreiecke) und DSPC/Chol/DSPS/DSPE-PEG2000 (35:45:10:10 mol%) (gefüllte Quadrate)-Liposomen, die Mäusen, die den nicht-kleinzelligen Lungentumor H460 trugen, gegeben wurden. Vinorelbin und Phosphatidylserin (DPPS oder DSPS) wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (1:1) formuliert. Die Pfeile zeigen die Tage an, an denen die Dosen verabreicht wurden.

[0058] [Fig. 28](#) zeigt die Wirkung von Kochsalzlösungskontrolle (ungefüllte Dreiecke); freiem Vinorelbin (gefüllte Kreise) und Vinorelbin, verkapselt in SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000(35:45:10:10 mol%)-Liposomen (gefüllte umgekehrte Dreiecke) auf das prozentuale Überleben von Mäusen, die die murine P388-Leukämie trugen. Vinorelbin und Phosphatidylserin wurden in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (1:1) formuliert. Die Pfeile entlang der x-Achse geben den Tag an, an dem die Dosen verabreicht wurden.

[0059] [Fig. 29](#) zeigt den CI, aufgetragen als Funktion des Anteils von HT-29-Zellen, die durch die Kombination von FUDR:CPT-11 bei verschiedenen Verhältnissen affiziert wurden: 10:1 (gefüllte Quadrate); 5:1 (gefüllte Kreise); 1:1 (gefüllte Dreiecke); 1:5 (gefüllte umgekehrte Dreiecke) und 1:10 (ungefüllte Kreise).

[0060] [Fig. 30](#) ist ein Diagramm der Plasmakonzentrationspiegel von FUDR (gefüllte Kreise) und CPT-11 (ungefüllte Kreise) als Funktion der Zeit nach intravenöser Verabreichung.

[0061] [Fig. 31](#) ist ein Diagramm des Tumorzellvolumens gegen die Zeit nach der Tumorzellinokulation für Kochsalzlösungskontrollen (gefüllte Kreise), Injektion eines Cocktails aus CPT-11/FUDR (ungefüllte umgekehrte Dreiecke) und der liposomalen Formulierung von CPT-11/FUDR (gefüllte umgekehrte Dreiecke).

Ausführungsweisen der Erfindung (Abkürzungen)

[0062] Die folgenden Abkürzungen werden verwendet:

PE: Phosphatidylethanolamin; PS: Phosphatidylserin; DPPS: Dipalmitoylphosphatidylserin; DSPS: Distearoylphosphatidylserin; DLPS: Dilauroylphosphatidylserin; DOPS: Dioleoylphosphatidylserin; POPS: Palmitoyloleoylphosphatidylserin; PC: Phosphatidylcholin; SM: Sphingomyelin; PG: Phosphatidylglycerin; PI: Phosphatidylinositol; PA: Phosphatidsäure; DSPC: Distearoylphosphatidylcholin; DMPC: Dimyristoylphosphatidylcholin; DSPG: Distearoylphosphatidylglycerin; DSPE: Distearoylphosphatidylethanolamin; Chol: Cholesterin; CH oder CHE: Cholesterylhexadecylether; PEG: Polyethylenglycol; DSPE-PEG: Distearoylphosphatidylethanolamin-N-[polyethylenglycol]; wenn auf PEG eine Zahl folgt, ist die Zahl das Molekulargewicht von PEG in Dalton; DSPE-PEG2000: Distearoylphosphatidylethanolamin-N-[polyethylenglycol 2000]; SUV: kleine unilamellare Vesikel; LUV: große unilamellare Vesikel; MLV: multilamellare Vesikel; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid; DMSO: Dimethylsulfoxid; OD: optische Dichte; OGP: N-Octyl-beta-D-glucopyranosid; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]; HBS: HEPES-gepufferte Kochsalzlösung (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4); SHE: 300 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 30 mM EDTA; ED50, ED75 und ED90: erforderliche Wirkdosis bzw. Effektivdosis, um 50, 75 und 90% der Zellen in Kultur zu affizieren; LD50: erforderliche Dosis, um eine 50%-ige Letalität der Zellen in Kultur zu bewirken; CI: Kombinationsindex; CI max oder CI-Maximum: CI-Wert, der für einen einzelnen f_a -Wert (zwischen 0,2 und 0,8) genommen wird, wobei der größte Unterschied in den CI-Werten für die Wirkstoffe bei verschiedenen Verhältnissen beobachtet wird; f_a : affizierter Anteil bzw. affizierte Fraktion; TEA: Triethanolamin; FDA: United States Food and Drug Administration; NCI: National Cancer Institute.

[0063] Die Erfindung umfasst die Bestimmung eines Verhältnisses antineoplastischer Mittel, das über einen gewünschten Konzentrationsbereich in vitro nicht-antagonistisch ist und Bereitstellen dieses nicht-antagonistischen Verhältnisses auf eine Weise, die gewährleistet wird, dass das Verhältnis am Ort der gewünschten Aktivität aufrechterhalten wird. Das synergistische oder additive Verhältnis wird durch Anwenden von Standardanalysentools bzw. Standardanalysenwerkzeugen auf die Ergebnisse bestimmt, die erhalten werden, wenn wenigstens ein Verhältnis von zwei oder mehr Mitteln in vitro über einen Bereich von Konzentrationen an bzw. gegen relevante Zellkulturen oder zellfreie Systeme untersucht wird. Zur Erläuterung werden individuelle bzw. einzelne Mittel und verschiedene Kombinationen davon bei verschiedenen Konzentrationslevels auf ihre cytotoxische oder cytostatische Wirkung, d.h. ihre Fähigkeit, Zelltod zu verursachen oder Zellwachstum zu inhibieren, an einer Zellkultur oder einem zellfreien System untersucht. Die Konzentrationslevel der vorgegebenen Verhältnisse werden gegen das prozentuale Überleben der Zellen aufgetragen, um eine Korrelation zu erhalten, die durch bekannte und etablierte mathematische Techniken manipuliert werden kann, um einen „Kombinationsindex“ (CI) zu berechnen. Die Mathematik ist so, dass ein CI von 1 (d.h. 0,9–1,1) eine additive Wirkung der Wirkstoffe beschreibt; ein $CI > 1$ (d.h. $> 1,1$) eine antagonistische Wirkung darstellt und ein $CI < 1$ (d.h. $< 0,9$) eine synergistische Wirkung darstellt.

[0064] Ein allgemeiner Ansatz ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Wie gezeigt werden die Mittel A und B einzeln und zusammen bei zwei verschiedenen Verhältnissen auf ihre Fähigkeit untersucht, Zelltod oder Stase der Zellen („cell stasis“) zu verursachen, wie durch den nachstehend beschriebenen MTT-Assay bestimmt. Anfänglich werden Korrelationen zwischen den Konzentrationen der Wirkstoffe A, B und den zwei unterschiedlichen Kombinationsverhältnissen (Y:Z und X:Y) gegen die Cytotoxizität, berechnet als Prozentsatz auf der Basis des Überlebens der unbehandelten Kontrollzellen, aufgetragen. Wie erwartet gibt es eine dosisabhängige Wirkung auf das Überleben von Zellen sowohl bei den einzelnen Wirkstoffen als auch bei den Kombinationen. Sobald diese Korrelation etabliert worden ist, kann das Überleben der Zellen oder der affizierte Anteil (f_a) als ein Ersatz für die Konzentration bei der Berechnung des CI verwendet werden.

[0065] Die Ergebnisse der CI-Berechnung sind auch in [Fig. 1](#) gezeigt; dieser Index wird als Funktion des Anteils an affizierten Zellen gemäß der Verfahrensweise von Chou und Talalay, *Advance Enz. Regul.* (1985) 22: 27–55 berechnet. In dieser hypothetischen Situation ist das erste Verhältnis (X:Y) der Wirkstoffe A plus B bei allen Konzentrationen nicht-antagonistisch, während die Kombination im zweiten Verhältnis (Y:Z) antagonistisch ist. Somit ist es möglich, ein Verhältnis der Wirkstoffe A plus B (Verhältnis 1) bereitzustellen, das unge-

achtet der Konzentration über einen weiten Bereich nicht-antagonistisch sein wird. Es ist wünschenswert, dass dieses Verhältnis von den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfasst wird.

[0066] Die Erfinder haben durch Berechnung eines „CI-Maximums“ für verschiedene Verhältnisse der Kombinationen von Mitteln eine alternative Darstellung für die Wirkung des Verhältnisses und der Konzentration auf die Synergie ersonnen. Das „CI-Maximum“ ist definiert als der für einen einzelnen f_a -Wert (zwischen 0,2 und 0,8) angenommene CI-Wert, wobei der größte Unterschied der CI-Werte für die Wirkstoffe bei unterschiedlichen Verhältnissen beobachtet wurde. Dies ist in den [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) dargestellt; wie gezeigt unterscheidet sich der CI, wenn das Irinotecan/Carboplatin-Verhältnis 1:10 ist am stärksten von dem der übrigen Verhältnisse, wo der Wert der affizierten Fraktion 0,2 ist. Der CI-Wert für dieses Verhältnis bei f_a 0,2 ist, wie gezeigt, näherungsweise 2,0.

[0067] Während die in vitro-Bestimmung von nicht-antagonistischen Verhältnissen für eine Kombination von nur zwei Wirkstoffen erläutert wurde, stellt die Anwendung der gleichen Technik auf Kombinationen von drei oder mehr Wirkstoffen einen CI-Wert über dem Konzentrationsbereich auf eine ähnliche Weise bereit.

[0068] Das auf diese Weise erhaltene Verhältnis wird in der pharmazeutischen Zusammensetzung durch Einkapseln der Mittel in dem vorherbestimmten Verhältnis in Liposomen oder andere partikulierte Formen aufrechterhalten, wodurch sichergestellt wird, dass das nicht-antagonistische Verhältnis aufrechterhalten werden wird. Folglich enthalten die Zusammensetzungen Abgabevehikel, die partikulärer Natur sind und das gewünschte Verhältnis der therapeutischen Mittel enthalten.

[0069] Wenngleich es bevorzugt ist, die Mittel zu co-verkapseln, so dass beide in dem gleichen Abgabevehikel enthalten sind, ist dies nicht notwendig. Da partikuläre bzw. partikulierte Träger ähnliche Pharmakokinetiken gemeinsam haben können, erfahren die aktiven bzw. wirksamen Substanzen eine koordinierte Abgabe aus der Formulierung, selbst wenn sie separat eingekapselt sind.

[0070] Mit „Einkapselung“ ist eine stabile Assoziation mit dem Abgabevehikel gemeint. Es ist somit nicht notwendig, dass das Vehikel das Mittel oder die Mittel umgibt, solange das Mittel oder die Mittel stabil mit den Vehikeln assoziiert ist/sind, wenn sie in vivo verabreicht werden. Somit sollen „stabil assoziiert mit“ und „eingekapselt bzw. verkapselt in“ oder „eingekapselt bzw. verkapselt mit“ oder „co-ingekapselt bzw. co-verkapselt in oder mit“ synonyme Begriffe sein. Sie werden in dieser Beschreibung austauschbar verwendet. Die stabile Assoziation bzw. Assoziierung kann durch eine Vielzahl an Mitteln, einschließlich kovalenter Bindung an das Abgabevehikel, bevorzugt mit einer spaltbaren Bindung, nicht-kovalenter Bindung und Einfangen bzw. Einschließen des Mittels im Inneren des Abgabevehikels und dergleichen, bewirkt werden. Die Assoziation muss hinreichend stabil sein, so dass die Mittel mit dem Abgabevehikel in einem nicht-antagonistischen Verhältnis assoziiert bleiben, bis es am Zielort in dem behandelten Subjekt abgegeben wird.

[0071] Abgabevehikel können Lipidträger, Liposome, Lipidmizellen, Lipoproteinmizellen, Lipid-stabilisierte Emulsionen, Cyclodextrine, polymere Nanopartikel, Polymermikropartikel, Blockcopolymermizellen, Polymer-lipidhybridsysteme, derivatisierte Einzelkettenpolymere und dergleichen umfassen. Liposome können hergestellt werden, wie es beschrieben ist in Liposomes: Rational Design (A. S. Janoff Hrsg., Marcel Dekker, Inc., N.Y.) oder mittels weiterer Techniken, die Fachleuten aus dem Gebiet bekannt sind. Liposomen zur Verwendung dieser Erfindung können so hergestellt sein, dass sie (aus) „cholesterinarm“ sind. Derartige Liposomen sind „cholesterinfrei“ oder enthalten „im Wesentlichen kein Cholesterin“ oder „tatsächlich bzw. im Wesentlichen („essentially“) kein Cholesterin“. Der Begriff „cholesterinfrei“, wie er hierin in Hinblick auf ein Liposom verwendet wird, bedeutet, dass ein Liposom in Abwesenheit von Cholesterin hergestellt wird. Der Begriff „im Wesentlichen kein Cholesterin“ erlaubt das Vorhandensein einer Menge an Cholesterin, die nicht hinreichend ist, um die Phasenübergangscharakteristiken des Liposoms signifikant zu verändern (typischerweise weniger als 20 mol% Cholesterin). Das Einarbeiten von weniger als 20 mol% Cholesterin in Liposomen kann die Retention bzw. Zurückhaltung von Wirkstoffen ermöglichen, die nicht optimal zurückgehalten werden, wenn Liposomen mit mehr als 20 mol% Cholesterin hergestellt werden. Zusätzlich zeigen Liposomen, die mit weniger als 20 mol% Cholesterin hergestellt werden, enge Phasenübergangstemperaturen, eine Eigenschaft, die für die Herstellung von Liposomen ausgenutzt werden kann, die eingekapselte Mittel aufgrund der Anwendung von Wärme freisetzen (thermosensitive Liposomen). Die erfindungsgemäßen Liposomen können auch therapeutische Lipide enthalten, die Etherlipide, Phosphatidsäure, Phosphonate, Ceramid und Ceramidanaloga, Sphingosin und Sphingosinanaloga und Serin-haltige Lipide umfassen. Liposomen können mit oberflächenstabilisierenden hydrophilen Polymer-Lipid-Konjugaten, wie zum Beispiel Polyethylenglycol-DSPE, hergestellt werden, um die Zirkulationslanglebigkeit bzw. Kreislaumlanglebigkeit zu erhöhen. Das Einarbeiten von negativ geladenen Lipiden, wie zum Beispiel Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylinositol (PI) kann Liposomenformulie-

rungen auch hinzugefügt werden, um die Zirkulationslanglebigkeit des Trägers zu erhöhen. Diese Lipide können eingesetzt werden, um hydrophile Polymer-Lipid-Konjugate als oberflächenstabilisierende Mittel zu ersetzen. Ausführungsformen dieser Erfindung nutzen cholesterinfreie Liposomen, die PG oder PI enthalten, um eine Aggregation zu verhüten, wodurch die Verweilzeit des Trägers im Blut erhöht wird.

[0072] Mizellen sind selbstassemblierende Partikel, bestehend aus amphipatischen Lipiden oder polymeren Komponenten, die zur Abgabe schlecht löslicher Mittel, die im hydrophoben Kern vorhanden sind, eingesetzt werden. Verschiedene Mittel zur Herstellung von mizellären Abgabevehikeln sind verfügbar und können von einem Fachmann leicht durchgeführt werden. Beispielsweise könne Lipidmizellen hergestellt werden, wie es beschrieben ist in Perkins, et al., *Int. J. Pharm.* (2000) 200(1): 27–39 (hierin durch Referenz aufgenommen). Lipoproteinmicellen können aus natürlichen oder künstlichen Lipoproteinen, einschließlich Lipoproteinen niedriger und hoher Dichte und „Chylomikronen“, hergestellt werden. Lipidstabilisierte Emulsionen sind Micellen, die so hergestellt sind, dass sie einen ölfüllten Kern, der durch eine emulgierende Komponente, wie zum Beispiel eine Monoschicht bzw. „Monolayer“ oder Doppelschicht bzw. „Bilayer“ aus Lipiden, stabilisiert ist, umfassen. Der Kern kann Fettsäureester, wie zum Beispiel Triacylglycerin (Maisöl) umfassen. Die Monoschicht oder Doppelschicht kann ein hydrophiles Polymerlipidkonjugat, wie zum Beispiel DSPE-PEG, umfassen. Diese Abgabevehikel können durch Homogenisation des Öls in Gegenwart des Polymer-Lipid-Konjugats hergestellt werden. Mittel, die in lipidstabilisierte Emulsionen eingearbeitet werden, sind im Allgemeinen schlecht wasserlöslich.

[0073] Synthetische Polymeranaloga, die Eigenschaften, ähnlich zu Lipoproteinen, zeigen, wie z.B. Micellen aus Stearinsäureestern oder Poly(ethylenoxid)-Block-Poly(hydroxyethyl-L-asparaginsäureamid) und Poly(ethylenoxid)-Block-Poly(hydroxyhexyl-L-asparaginsäureamid) können auch bei der Durchführung dieser Erfindung verwendet werden (Lavasanifar, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* (2000) 52: 831–835).

[0074] Cyclodextrine umfassen Hohlraum bildende, wasserlösliche Oligosaccharide, die wasserunlösliche Wirkstoffe in ihren Hohlräumen beherbergen können. Unter Anwendung von Fachleuten bekannten Verfahrensweisen können Mittel in Cyclodextrine eingekapselt werden, siehe z.B. Atwood, et al., Hrsg., „Inclusion Compounds“, „Bde. 2 & 3, Academic Press, NY (1984); Bender, et al., „Cyclodextrin Chemistry“, Springer-Verlag, Berlin (1978); Szeitli, et al., „Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes“, Akademiai Kiado, Budapest, Ungarn (1982) und WO 00/40962.

[0075] Nanopartikel und Mikropartikel können einen konzentrierten Kern aus Wirkstoff umfassen, der von einer polymeren Hülle umgeben ist (Nanokapseln) oder als ein Feststoff oder eine Flüssigkeit, der/die in einer Polymermatrix dispergiert ist (Nanosphären). Allgemeine Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln und Mikropartikeln werden von Soppimath, et al. (*J. Control Release* (2001) 70(1-2): 1–20) beschrieben, wobei die Referenz hierin aufgenommen ist. Andere polymere Abgabevehikel, die verwendet werden können, umfassen Block-Copolymer-Mizellen, die einen wirkstoffhaltigen hydrophoben Kern, der von einer hydrophilen Hülle umgeben ist, umfassen; Sie werden im Allgemeinen als Träger für hydrophobe Wirkstoffe verwendet und können hergestellt werden, wie es in Allen, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (1999) Nov 16(1-4): 3–27 beschrieben ist. Polymerlipid-Hybridsysteme bestehen aus einem Polymernanopartikel, das von einer Lipidmonoschicht umgeben ist. Die Polymerpartikel dienen als ein Frachtraum für die Aufnahme bzw. Einarbeitung von hydrophoben Wirkstoffen, während die Lipidmonoschicht eine stabilisierende Wirkung zwischen dem hydrophoben Kern und der äußeren wässrigen Umgebung bereitstellt. Polymere, wie z.B. Polycaprolacton und Poly(D,L-lactid) können verwendet werden, während die Lipidmonoschicht typischerweise aus einem Lipidgemisch besteht. Geeignete Verfahren zur Herstellung sind ähnlich zu jenen, auf die oben stehend für Polymernanopartikel Bezug genommen wurde. Derivatisierte Einzelkettenpolymere sind Polymere, die für kovalente Bindung eines biologisch aktiven Mittels, um ein Polymer-Wirkstoff-Konjugat zu bilden, adaptiert sind. Für die Synthese von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten sind zahlreiche Polymere vorgeschlagen worden, einschließlich Polyaminosäuren, Polysacchariden, wie z.B. Dextrin oder Dextran, und synthetische Polymere, wie z.B. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid(HPMA)-Copolymer. Geeignete Verfahren zur Herstellung sind im Detail beschrieben in Veronese und Morpurgo, *IL Farmaco* (1999) 54(8): 497–516 und sind hierin durch Referenz aufgenommen.

[0076] Abgabevehikel werden demnach bereitgestellt, derart, dass eine beständige Abgabe des verabreichten Verhältnisses der therapeutischen Komponenten erreicht wird. Somit kann das Verhältnis durch einfache Co-Einkapselung der Mittel in den Vehikeln, die die Zusammensetzung umfassen, aufrecht erhalten werden oder die Mittel können in separaten Vehikeln eingekapselt werden, wenn die Vehikel die Pharmakokinetiken der Zusammensetzung kontrollieren, um nicht-antagonistische Wirkstoffverhältnisse auf die gleiche Weise aufrecht zu erhalten.

[0077] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden verwendet, um Zusammensetzungen aus Antitumormitteln, die nicht-antagonistisch sind, abzugeben. Die folgende detaillierte Beschreibung legt die Weise, auf die die Verhältnisse therapeutischer Mittel bestimmt bzw. festgelegt werden und Verfahren zum Einkapseln der gewünschten Verhältnisse in die erfindungsgemäßen Abgabesysteme dar.

[0078] Kurz gesagt werden in einem Szenario zuerst einzelne Mittel separat in einer Vielzahl an in vitro- oder in vivo-Assays durchmustert, um ihre individuellen Aktivitäten zu bestimmen. Dann werden Paare von Mitteln kombiniert und im gleichen Durchmusterungsverfahren durchsucht. Bei dieser anfänglichen Durchmusterung sind die Verhältnisse der Mittel, die Molverhältnisse der Konzentrationen mit 50% Aktivität (IC_{50} -Wert), die vorher festgestellt wurden. Alternativ werden auf der Basis von Überlegungen für Formulierungszwecke andere festgelegte Verhältnisse (typischerweise Molverhältnisse von 1:10, 1:1 und 10:1) gewählt. Die Mittelwerte, berechnet auf der Basis der Wirkungen der Mittel auf das Überleben von Zellen, und die Wirkstoffdosen werden in das CalcuSyn-Computerprogramm eingegeben und die ausgegebenen Daten werden bewertet, um einen Kombinationsindex(CI)-Wert als Funktion des Anteils affizierter Zellen (f_a) zu bestimmen.

[0079] Das CalcuSyn-Verfahren ist erfolgreich angewendet worden, um verschiedene Mittel, wie z.B. Antitumor-Wirkstoffe, Immunsuppressiva für die Organtransplantation, kombiniertes Reinigen („combined purging“) leukämischer Zellen für die autologe Knochenmarkstransplantation, Insektizide, biologische Antwort-Modifikatoren, Mehrfachresistenz-Inhibitoren („multiple drug resistance inhibitors“), antimikrobielle Mittel, Anti-HIV-Mittel, antiherpetische und andere antivirale Mittel, zu untersuchen.

[0080] Kombinationen von Mitteln, die ein Wechselwirkungsverhalten ähnlich zu dem von Cisplatin:Daunorubicin bei einem Molverhältnis von 1:1 in [Fig. 11A](#) zeigen, sind antagonistisch und werden nicht verfolgt. Kombinationen von Verbindungen mit nicht-antagonistischen Wechselwirkungen über wesentliche Bereiche (bevorzugt wenigstens 20%) von f_a -Werten $> 0,01$ (d.h. Irinotecan:Carboplatin bei Molverhältnissen von 1:1 und 10:1; [Fig. 2A](#)) werden in diesem in vitro-Durchmusterungsassay bei einer Vielfalt unterschiedlicher Wirkstoff/Wirkstoff-Verhältnisse erneut bewertet, um das optimale Verhältnis/die optimalen Verhältnisse zum Erhöhen von sowohl der Stärke der nicht-antagonistischen Wechselwirkung (d.h. niedrigere CI-Werte) als auch des f_a -Bereichs, über den Synergie beobachtet wird, zu bestimmen.

[0081] Optimierte nicht-antagonistische Wirkstoffkombinationen, die so identifiziert wurden, definieren eine Zusammensetzung für die Formulierung in einem Abgabevehikel als eine Zwei-Mittel-Zusammensetzung und/oder können als eine einzelne pharmazeutische Einheit verwendet werden, um synergistische oder additive Wechselwirkungen mit einem dritten Mittel zu bestimmen.

In vitro-Bestimmung nicht-antagonistischer Verhältnisse

[0082] Um die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen herzustellen, müssen zuerst die gewünschten Verhältnisse von Mitteln, die in dem Abgabevehikel enthalten sind, bestimmt werden. Wünschenswerterweise wird das Verhältnis jenes sein, bei dem durch die Kombination über einen Bereich von Konzentrationen Synergie oder Additivität gezeigt wird. Derartige Verhältnisse können in vitro in Zellkulturen oder zellfreien Systemen unter Verwendung verschiedener mathematischer Modelle bestimmt werden.

[0083] Die Bestimmung von Verhältnissen von Mitteln, die synergistische oder additive Kombinationswirkungen über Konzentrationsbereiche zeigen, können unter Verwendung verschiedener Algorithmen, basierend auf den Typen der experimentellen Daten, die nachstehend beschrieben sind, durchgeführt werden. Diese Verfahren umfassen Isobologramm-Verfahren (Loewe, et al., *Arzneim-Forsch* (1953) 3: 285–290; Steel, et al., *Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys.* (1979) 5: 27–55), das Teilproduktverfahren („fractional product method“) (Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors* (1963) Bd. 1, S. 1–5. New York: Academic Press), das Monte Carlo-Simulationsverfahren, CombiTool, ComboStat und das Chou-Talalay-Median-Effekt- bzw. Mittelwirkungs-Verfahren, basierend auf einer Gleichung, die beschrieben ist in Chou, J. *Theor. Biol.* (1976) 39: 253–76; und Chou, *Mol. Pharmacol.* (1974) 10: 235–247). Alternativen umfassen die überlebende Fraktion (Zoli, et al. *Int. J. Cancer* (1999) 80: 413–416), prozentuale Reaktion auf Granulozyten/Makrophagen-Kolonie bildende Einheit im Vergleich zu Kontrollen (Pannacciulli, et al. *Anticancer Res.* (1999) 19: 409–412) und andere (Berenbaum, *Pharmacol. Rev.* (1989) 41: 93–141; Greco, et al., *Pharmacol. Rev.* (1995) 47: 331–385).

[0084] Das Chou-Talalay-Median-Effekt- bzw. Mittelwirkungs-Verfahren ist bevorzugt. Die Analyse wendet eine Gleichung an, wobei die Dosis, die eine bestimmte Wirkung bzw. Effekt, f_a , bewirkt, angegeben wird durch:

$$D = D_m [f_a / 1 - f_a]^{1/m},$$

in der D die Dosis des verwendeten Wirkstoffs ist, f_a der Anteil der durch diese Dosis affizierten Zellen ist, D_m die Dosis für den medianen Effekt ist, die die Wirksamkeit kennzeichnet, und m ein Koeffizient ist, der die Form der Dosis-Wirkungs-Kurve wiedergibt ($m = 1$ für Reaktionen erster Ordnung).

[0085] Diese Gleichung kann weiter manipuliert werden, um einen Kombinationsindex (CI) auf der Basis der Mehrfachwirkstoffeffektgleichung („multiple drug effect equation“) zu berechnen, wie sie von Chou und Talalay beschrieben wird in Adv. Enzyme Reg. (1984) 22: 27–55; und von Chou, et al., in: Synergism and Antagonism in Chemotherapy, Chou and Rideout, Hrsg, Academic Press: New York 1991: 223–244. Ein Computerprogramm für diese Berechnung (CalcuSyn) ist zu finden in Chou, Dose-effect analysis with microcomputers: quantitation of ED50, LD50, synergism, antagonism, low-dose risk, receptor ligand binding and enzyme kinetics (CalcuSyn-Handbuch und Software; Cambridge: Biosoft 1987).

[0086] Die Kombinationsindexgleichung basiert auf der Mehrfachwirkstoffeffektgleichung von Chou-Talalay, die von Enzymkinetikmodellen abgeleitet ist. Eine Gleichung bestimmt nur die additive Wirkung bzw. den additiven Effekt anstatt Synergismus und Antagonismus. Jedoch ist gemäß dem CalcuSyn-Programm Synergismus definiert als eine mehr als erwartet additive Wirkung und Antagonismus als eine weniger als erwartete additive Wirkung. 1983 schlugen Chou und Talalay die Bezeichnung von $CI = 1$ als die additive Wirkung vor, deshalb erhalten wir aus den Mehrfachwirkstoffeffektgleichungen von zwei Wirkstoffen:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 \quad \text{[Gleichung 1]}$$

für sich gegenseitig ausschließende („mutually exclusive“) Wirkstoffe, die die gleichen oder ähnliche Wirkungsweisen haben und es wird ferner vorgeschlagen, dass

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1(D)_2 / (D_x)_1(x)_2 \quad \text{[Gleichung 2]}$$

für sich gegenseitig nicht-ausschließende („mutually non-exclusive“) Wirkstoffe, die vollständig unabhängige Wirkungsweisen haben. $CI < 1$, $= 1$ und > 1 zeigt Synergismus additive Wirkung bzw. Antagonismus an. Gleichung 1 oder Gleichung 2 besagen, dass Wirkstoff 1, $(D)_1$ und Wirkstoff 2, $(D)_2$, (in den Zählern) in Kombination $x\%$ im tatsächlichen Experiment inhibieren. Somit kann die experimentell beobachtete $x\%$ -ige Inhibierung keine glatte Zahl sein, sondern hat häufig einen Dezimalbruch. $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ (in den Nennern) der Gleichungen 1 und 2 sind die Dosen von Wirkstoff 1 bzw. Wirkstoff 2 alleine, die $x\%$ inhibieren.

[0087] Der Einfachheit halber wird normalerweise eine gegenseitige Ausschließlichkeit angenommen, wenn mehr als zwei Wirkstoffe an Kombinationen beteiligt sind (CalcuSyn-Handbuch und -Software; Cambridge: Biosoft 1987).

[0088] Die zugrundeliegenden experimentellen Daten werden im Allgemeinen in vitro bestimmt, wobei Zellen in Kultur oder zellfreie Systeme verwendet werden. Bevorzugt wird der Kombinationsindex (CI) als eine Funktion des Anteils affizierter Zellen (f_a) aufgetragen, wie es in [Fig. 1](#) gezeigt ist, der, wie oben erklärt, ein Ersatzparameter für den Konzentrationsbereich ist. Bevorzugte Kombinationen von Mitteln sind jene, die über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten Synergie oder Additivität zeigen. Es werden Kombinationen von Mitteln ausgewählt, die Synergie über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs aufweisen, bei dem mehr als 1% der Zellen affiziert werden, d.h., ein f_a -Bereich von mehr als 0,01. Bevorzugt weist ein größerer Teil der gesamten Konzentration einen günstigen CI auf; z.B. 5% eines f_a -Bereichs von 0,2–0,8. Bevorzugter weisen 10% dieses Bereichs einen günstigen CI auf, noch bevorzugter werden 20% des f_a -Bereichs bevorzugt über 50% und am stärksten bevorzugt über wenigstens 70% des f_a -Bereichs von 0,2–0,8 in den Zusammensetzungen genutzt. Kombinationen, die Synergie über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten zeigen, können bei einer Vielfalt an Mittel-Verhältnissen erneut bewertet werden, um das optimale Verhältnis zum Erhöhen der Stärke der nicht-antagonistischen Wechselwirkung und Erhöhen des f_a -Bereichs, über den Synergie beobachtet wird, zu bestimmen.

[0089] Während es wünschenswert wäre, Synergie über den gesamten Bereich von Konzentrationen, über den Zellen affiziert werden, zu haben, ist beobachtet worden, dass in vielen Fällen die Ergebnisse in einem f_a -Bereich von 0,2–0,8 beträchtlich verlässlicher sind. Folglich ist es bevorzugt, dass die Synergie in dem f_a -Bereich von 0,2–0,8 etabliert wird, obwohl dargelegt wird, dass die durch erfindungsgemäße Kombinationen aufgewiesene Synergie innerhalb des breiten Bereichs von 0,01 oder mehr vorhanden ist.

[0090] Das optimale Kombinationsverhältnis kann ferner als einzelne pharmazeutische Einheit verwendet werden, um synergistische oder additive Wechselwirkungen mit einem dritten Mittel zu bestimmen. Zusätzlich

kann eine Drei-Mittel-Kombination als eine Einheit verwendet werden, um nicht-antagonistische Wechselwirkungen mit einem vierten Mittel zu bestimmen, usw.

[0091] Wie oben angegeben, werden die in vitro-Studien an Zellkulturen mit „relevanten“ Zellen durchgeführt werden. Die Wahl der Zellen wird von der beabsichtigten therapeutischen Verwendung des Mittels abhängen. Nur eine relevante Zelllinie oder ein relevanter Zellkulturtyp müssten die erforderliche nicht-antagonistische Wirkung aufweisen, um eine Basis dafür bereitzustellen, dass die Zusammensetzungen in den Umfang der Erfindung kommen.

[0092] Die Kombination von Mitteln soll z.B. für die Anti-Krebs-Therapie sein. Geeignete Auswahlen werden hinsichtlich der zu untersuchenden Zellen und der Natur des Tests gemacht werden. Insbesondere sind Tumorzelllinien geeignete Gegenstände und die Messung von Zelltod oder der Stase von Zellen ist ein geeigneter Endpunkt. Wie nachstehend weiter diskutiert wird, könnten im Kontext des Versuchs, geeignete nicht-antagonistische Kombinationen für andere Indikationen zu finden, andere Zielzellen und andere Kriterien als Cytotoxizität oder Stase der Zellen verwendet werden.

[0093] Für Bestimmungen, die mit Antitumormitteln zusammenhängen, können Zelllinien von Standard-Zelllinien-Hinterlegungsstellen (z.B. NCI oder ATCC), von akademischen Einrichtungen oder anderen Organisationen, einschließlich kommerzieller Quellen, erhalten werden. Bevorzugte Zelllinien würden eine oder mehrere umfassen, die ausgewählt sind aus Zelllinien, die durch das Developmental Therapeutics Program des NCI/NIH identifiziert wurden. Die durch dieses Programm verwendete Tumorzellliniendurchmusterung identifiziert gegenwärtig 60 verschiedene Tumorzelllinien, die Leukämie, Melanom und Krebs der Lunge, des Dickdarms, des Hirns, der Eierstöcke, der Brust, der Prostata und der Niere darstellen. Die erforderliche nicht-antagonistische Wirkung über einem gewünschten Konzentrationsbereich muss nur an einem einzigen Zelltyp gezeigt werden; es ist jedoch bevorzugt, dass wenigstens zwei Zelllinien diesen Effekt aufweisen, stärker bevorzugt drei Zelllinien, stärker bevorzugt fünf Zelllinien und noch stärker bevorzugt zehn Zelllinien. Diese Zelllinien können etablierte Tumorzelllinien sein oder primäre Kulturen, die aus Patientenproben erhalten wurden. Die Zelllinien können von jeder Spezies sein, aber die bevorzugte Quelle wird ein Säuger und insbesondere ein Mensch sein. Die Zelllinien können durch Selektion unter verschiedenen Laborbedingungen und/oder durch die Hinzufügung oder Deletion von exogenem genetischem Material genetisch verändert sein. Zelllinien können durch jede beliebige Gentransfertechnik einschließlich, aber nicht beschränkt auf, virale oder Plasmid-basierte Transfektionsverfahren, transfiziert sein. Die Modifikationen können den Transfer von cDNA, die für die Expression eines spezifischen Proteins oder Peptids, ein Regulatorelement wie z.B. einen Promotor oder eine Verstärkersequenz oder Antisens-DNA oder RNA, kodiert, umfassen. Genetisch veränderte Gewebekultur-Zelllinien können Linien mit und ohne Tumorsuppressorgene, d.h., Gene, wie z.B. p53, pTEN und p16, umfassen; und Linien, die durch die Verwendung von dominant negativen Verfahren, Geninsertionsverfahren und andere Selektionsverfahren erzeugt wurden. Bevorzugte Gewebekulturzelllinien, die verwendet werden können, um die Zelllebensfähigkeit zu quantifizieren, z.B. zum Testen von Antitumormitteln, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf H460, MCF-7, SF-268, HT29, HCT-116, LS180, B16-F10, A549, („Capan pancreatic“), CAO-V-3, IGROV1, PC-3, MX-1 und MDA-MB-231.

[0094] In einer bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die gegebene Wirkung (f_a) auf Zelltod oder die Stase von Zellen nach der Anwendung eines cytotoxischen Mittels auf eine Zellkultur. Zelltod oder Lebensfähigkeit können beispielsweise unter Anwendung der folgenden Verfahren gemessen werden:

Cytotoxizitätsassay	Referenz
MTT-Assay	Mosmann, <i>J. Immunol. Methods</i> (1983) 65(1-2):55-63
Trypanblau-Farbstoffausschluss	Bhuyan, <i>et al.</i> , <i>Experimental Cell Research</i> (1976) 97:275-280
Einbau- oder DNA-Interkalations-Assay mit radioaktives Tritium-markiertem (³ H)-Thymidin	Senik, <i>et al.</i> , <i>Int. J. Cancer</i> (1975) 16(6):946-959
Freisetzungssassay mit radioaktivem Chrom-51	Brunner, <i>et al.</i> , <i>Immunology</i> (1968) 14:181-196

Glutamatpyruvat-Transaminase-, Creatinphosphokinase- und Lactatdehydrogenase-Enzym-Leakage	Mitchell, <i>et al.</i> , <i>J. of Tissue Culture Methods</i> (1980) 6(3&4):113-116
Neutralrotaufnahme	Borenfreund und Puerner, <i>Toxicol. Lett.</i> (1985) 39:119-124
Alkalische Phosphatase-Aktivität	Kyle, <i>et al.</i> , <i>J. Toxicol. Environ. Health</i> (1983) 12 :99-117
Propidiumiodid-Färbung	Nieminen, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> (1992) 115:147-15
Bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein-(BCECF)-Retention	Kolber, <i>et al.</i> , <i>J. Immunol. Methods</i> (1988) 108:255-264
Mitochondriales Membranpotential	Johnson, <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> (1980) 77:990-994
Klonogene Assays	Puck, <i>et al.</i> , <i>J. of Experimental Medicine</i> (1956) 103:273-283
LIVE/DEAD Lebensfähigkeit/Cytotoxizitäts-assay	Morris, <i>Biotechniques</i> (1990) 8:296-308
Sulforhodamin B (SRB)-Assays	Rubinstein, <i>et al.</i> , <i>J. Natl. Cancer Instit.</i> (1990) 82:1113-1118

[0095] Der „MTT-Assay“ ist bevorzugt.

[0096] Nicht-antagonistische Verhältnisse von zwei oder mehr Mitteln können für andere Krankheitsindikationen als Krebs bestimmt werden und diese Information kann verwendet werden, um therapeutische Formulierungen von zwei oder mehr Wirkstoffen zum Behandeln dieser Erkrankungen herzustellen. Im Hinblick auf in vitro-Assays können viele messbare Endpunkte ausgewählt werden, von denen ausgehend die Wirkstoffsynergie zu definieren ist, mit der Maßgabe, dass diese Endpunkte für die spezifische Erkrankung therapeutisch relevant sind.

[0097] Somit wird ein Fachmann zum Beispiel fähig sein, nicht-antagonistische Verhältnisse von zwei oder mehr Mitteln zu bestimmen, die ausgewählt sind für die Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen, indem er in vitro die Suppression von proinflammatorischen Cytokinen, wie z.B. IL-1, IL-18, COX-2, TNF oder Interferon-Gamma misst. Andere inflammatorische Signale umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die Inhi-

bition von Prostaglandin E2 und Thromboxan B2. Insbesondere stellt die Endotoxin-vermittelte Makrophagenaktivierung einen geeigneten in vitro-Assay zum Messen der antiinflammatorischen Wirkung eines zugesetzten Mittels oder von Kombinationen von Mitteln bereit und wird auf dem Fachgebiet allgemein verwendet. In einem derartigen Assay werden Makrophagen, gezüchtet in großen Mengen, durch Zugabe eines Endotoxins, wie z.B. einem Lipopolysaccharid, aktiviert. Bei der Aktivierung ist die Sekretion von Cytokinen, wie z.B. IL-1 und TNF, durch den Makrophagen ebenso messbar wie die Aktivierung von COX-2. Antiinflammatorische Wirkstoffkandidaten werden zugegeben und auf der Basis ihrer Fähigkeit zum Supprimieren von IL-1, TNF und COX-2 bewertet. Die Titration mit 1×10^{-7} M Dexamethason wird typischerweise als Positivkontrolle verwendet. Es wird Fachleuten auf dem Gebiet offensichtlich sein, dass Makrophagenaktivierung umfassende Assays geeignet sind für eine breit gestreute Durchmusterung von Wirkstoffkombinationen, und dass die Suppression von IL-1, TNF und COX-2 geeignete Endpunkte zum Definieren von Synergie darstellt. Zusätzlich zum Messen inflammatorischer Signale können Forscher die Verwendung von in vitro-Modellen, die die Wirkung von zwei oder mehr Mitteln auf Leukozytenfunktionen messen, erwägen. Funktionale Tests können die Inhibierung der Degranulation, Superoxidbildung und Leukozytenmigration umfassen, sind aber nicht beschränkt darauf.

[0098] Ähnlich zu Krebs ist Proliferation ein Schlüsselereignis in der Entwicklung von Arteriosklerose, Restenose oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen mit vaskuloproliferativen Attributen. Somit kann ein Fachmann auf dem Gebiet durch Bestimmen der Wirkstoffsynergie durch die hierin angegebenen Verfahren, angewandt auf relevante proliferierende Zellpopulationen von Blutgefäßen, nicht-antagonistische Verhältnisse von zwei oder mehr Mitteln finden. Insbesondere kann Restenose, wie z.B. Restenose der koronar- und periphären Arterien, die typischerweise in Folge einer Angioplastie resultiert, der Proliferation von glatten Muskel- und Endothelzellen zugeschrieben werden (Fuster, Arch Mal Coeur Vaiss (1997) 90 Spec No 6: 41–47). Unter Verwendung von Standardverfahren, wie sie hier angegeben sind, kann ein Fachmann auf dem Gebiet messen, ob zwei oder mehr Mittel nicht-antagonistisch wirken, um die Proliferation von Endothelzellen oder glatten Muskelzellen zu inhibieren. Diese Assays können unter Verwendung von immortalisierten Zelllinien oder bevorzugt unter Verwendung von primären Zelllinien unternommen werden. Diese Zelllinien können von kommerziellen Quellen (z.B. Clonetics, Kalifornien) oder aus frischem Gewebe (z.B. Umbilikalvenen, Arterien, Gehirn) erhalten werden und müssen in geeigneten Wachstumsfaktoren gehalten werden, die Zellproliferation fördern. Ähnlich zu Assays, die die Synergie von zwei oder mehr Mitteln an Krebszellen messen, können derartige Assays Endpunkte der Inhibierung von Proliferation und Migration umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. Proliferationsendpunkte können auf LNE/DEAD-Assays, wie z.B. den in dieser Anmeldung beschriebenen MTT-Assay, Messungen der Proliferation, die auf [3 H]-Thymidineinbau beruhen, oder anderen ähnlichen Assays beruhen. Ähnlich zur Teilung von Krebszellen wird auch die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen durch Kontrollpunkte bzw. Checkpoints im Zellzyklus reguliert und Assays, die die Zellzyklusinhibierung messen, können verwendet werden, um nicht-antagonistische Verhältnisse von zwei oder mehr Mitteln, die für die Behandlung von vaskuloproliferativen Erkrankungen ausgewählt wurden, zu bestimmen.

[0099] Nicht-antagonistische Kombinationen von Mitteln können auch aufgrund ihrer Aktivität gegen mikrobielle oder virale Infektionen identifiziert werden. Als erste Stufe beim Identifizieren antimikrobieller Mittel kann die minimale Hemmkonzentration (MIC) für ein Mittel durch die klassischen antimikrobiellen Bouillon-Mikroti-terverdünnungs- oder Agarverdünnungsassays, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, bestimmt werden. Diese Assays werden durch das National Committee of Laboratory Safety and Standards (NCLSS) reguliert. Die Standard-Bouillonverdünnungsassays sind veröffentlicht in Amsterdam (1996) Susceptibility testing of Antimicrobials in liquid media in "Antibiotics in Laboratory Medicine", Lorian, V. 4. Ausgabe, Seiten 52–111, Williams und Wilkins, Baltimore. Die MIC ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die das in vitro-Wachstum eines infektiösen Organismus hemmen wird. In den oben genannten Assays kann die MIC durch Ausplattieren eines Inokulums von Mikroben in einem kleinen Fleck (bei z.B. 10^4 koloniebildenden Einheiten [kBE] pro Fleck) auf Wachstumsmedium (z.B. Agar) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Wirkstoffs bestimmt werden. Alternativ können Mikroben in eine Suspension eines Wachstumsmediums, das unterschiedliche Konzentrationen des Wirkstoffs enthält, inokuliert werden. Zusätzlich können die Mikroben entweder wie oben behandelt werden oder können als intrazelluläre Infektionen in einer spezifischen Zellpopulation (d.h. ein Makrophage) resident sein. Im letzteren Fall werden Säugerzellen, in Kultur durch Standardverfahren gezüchtet, intrazelluläre Infektionen durch eine kurze Exposition gegenüber einer niedrigen Konzentration an Mikroben beigebracht. Nach einer Zeitspanne zum Ermöglichen der intrazellulären Replikation der Mikroben werden die Zellen und ihre intrazellulären Mikroben mit einem Wirkstoff auf die gleiche Weise, wie es oben für Cytotoxizitätstests mit Säugerzellen beschrieben ist, behandelt. Nach einer geeigneten Zeitspanne, die hinreichend ist, damit der Wirkstoff das mikrobielle Wachstum hemmt, wenn er bei wirksamen Konzentrationen gegeben wird, kann das bakterielle Wachstum durch eine Vielfalt an Mitteln bestimmt werden, einschließlich: (i) Bestimmung der Abwesenheit oder des Vorhandenseins (und Größe, sofern geeignet) des Inokulumflecks; (ii) Ausplattieren und serielle Verdünnung bekannter Volumina der Suspension behandelter Bak-

terien auf Agarwachstumsplatten, um die Berechnung der Anzahl von Mikroorganismen, die die Behandlung überlebten, zu ermöglichen; (iii) makroskopische Bestimmung (durch das Auge); (iv) Zeit-Abtötungs-Kurven, in denen Mikroben in der logarithmischen Wachstumsphase in einem Wachstumsmedium, das einen Wirkstoff (Wirkstoffe) enthält, suspendiert werden und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation bekannte Volumina abgenommen und zum Auszählen der überlebenden Mikroben seriell auf Wachstumsagar verdünnt werden; (v) andere spektroskopische, analytische in vitro- oder in vivo-Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, die das Auszählen der lebensfähigen Mikroben ermöglichen. Die Wirksamkeit eines Wirkstoff oder von Kombinationen von Wirkstoffen zum Abtöten intrazellulär-residenter Infektionen werden typischerweise bestimmt, nachdem die Wirtszellen mit Detergenzien (z.B. 1% Triton X-100 plus 0,1% Natriumdodecylsulfat) lysiert wurden, um die Mikroben freizusetzen, wobei die Lysate dann seriell auf Agarwachstumsplatten zum Auszählen der Anzahl an überlebenden Mikroben verdünnt werden.

[0100] Unter Verwendung der oben stehend beschriebenen Mittel werden Kombinationen wirksamer Mittel hinsichtlich ihrer antagonistischen, additiven oder synergistischen Aktivität bewertet. Insbesondere werden Paare von Verbindungen auf die Bakterien in festgelegten Verhältnissen, die äquimolar oder das Verhältnis der MIC-Werte oder anderer festgelegter Verhältnisse sein können, angewandt und die Bakterien werden mit einer Auswahl an Konzentrationen der Paare von Verbindungen behandelt. Die Aktivität wird bestimmt, wie es oben stehend beschrieben ist. Antagonismus, Additivität oder Synergie werden aus einer Vielzahl mathematischer Behandlungen, wie z.B. durch Isobologramme, CI und dergleichen, bestimmt.

[0101] Ein ausgiebiges Durchmustern von Mitteln oder Kombinationen von Mitteln mit antiviraler Aktivität kann durch eine Anzahl von in vitro-Assays, typischerweise Plaquereduktions- und cytopathische Effekte-(CPE)Inhibierungsassays, die Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind, durchgeführt werden. Diese Assays sind dazu fähig, das Ausmaß, in dem ein antiviraler Wirkstoff oder Wirkstoffe, die Effekte bzw. Wirkungen einer viralen Infektion in Gewebekultur hemmen, direkt zu messen. Der Plaquereduktionsassay ist für Kombinationen aus einem Virus und einer Zelllinie bevorzugt, die eine gut definierte Plaque erzeugen. Michaelis, et al., zeigten die Verwendung von Plaquereduktionsassays kombiniert mit dem Chou-Talalay-Verfahren zur Bestimmung nicht-antagonistischer antiviraler Wirkungen von Aphidicolin und seinen Derivaten auf einer Anzahl an Viren bei verschiedenen Molverhältnissen (Michaelis, et al., Arzneimittelforschung (2002) 52(5): 393–399). Falls eine gut definierte Plaque nicht durch spezielle Kombinationen von Virus und Zelllinie erzeugt werden kann, sind CPE-Inhibierungsassays bevorzugt. Zusätzliche Verfahren zur raschen und zweckdienlichen Identifizierung nicht-antagonistischer Kombinationen antiviraler Mittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Lebensfähigkeit der Zelle, Virusaussbeute und akute oder chronische HIV-Infektionsassays. Die Lebensfähigkeit der Zelle wird verwendet, um die Fähigkeit eines antiviralen Mittels oder einer Kombination von Mitteln, die Lebensfähigkeit der Zelle zu erhöhen, zu bestimmen und kann unter Verwendung quantitativer Assays, wie z.B. dem vorher beschriebenen MTT-Assay, erhalten werden. Alternativ bewerten der Virusaussbeuteassay und die akuten HIV-Infektionsassays die Fähigkeit eines Mittels, die Virusaussbeute zu verringern, was direkte Messungen antiviraler Aktivität ermöglicht. Es wird für Fachleute auf dem Gebiet ersichtlich sein, dass die vorstehend genannten Assays zur Durchmusterung antiviraler Wirkstoffkombinationen auf synergistische, additive oder antagonistische Wirkungen in vitro geeignet sind.

Bevorzugte Kombinationen von Mitteln

[0102] Verschiedene Kombinationen therapeutischer Mittel, bei denen festgestellt wurde, dass sie die Kriterien für nicht antagonistische Wirkungen, wie sie oben angegeben sind, erfüllen, werden dann in der Form von Formulierungen von Wirkstoffabgabevehikeln bereitgestellt. Ein „therapeutisches Mittel“ ist eine Verbindung, die alleine oder in Kombination mit anderen Verbindungen eine wünschenswerte Wirkung auf ein Subjekt hat, das von einem unerwünschten Zustand oder einer unerwünschten Erkrankung betroffen ist.

[0103] Bestimmte therapeutische Mittel werden für eine Verwendung in Kombination bevorzugt, wenn das/die Zielerkrankung oder Zielzustand Krebs ist. Beispiele sind:

„Signaltransduktionsinhibitoren“, die mit Signalen interferieren, die Krebszellen dazu veranlassen zu wachsen oder sich zu teilen, oder diese verhüten;
 „Cytotoxische Mittel“;
 „Zellzyklusinhibitoren“ oder „Zellzykluskontrollinhibitoren“, die mit dem Fortschreiten einer Zelle durch ihren normalen Zellzyklus, die Lebensdauer einer Zelle, von der Mitose, die ihren Beginn darstellt, bis zu den an die Mitose, die diese in Tochterzellen teilt, anschließenden Ereignissen, interferieren;
 „Checkpoint-Inhibitoren“, die mit der normalen Funktion von Zellzyklus-Kontrollpunkten bzw. Zellzyklus-„Checkpoints“, z.B. dem S/G2-Checkpoint, dem G2/M-Checkpoint und dem G1/S-Checkpoint, interferieren;

„Topoisomeraseinhibitoren“, wie z.B. Camptothecine, die mit Topoisomerase-I- oder -II-Aktivität interferieren, Enzyme, die für die DNA-Replikation und -Transkription erforderlich sind;
 „Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren“, die mit der Aktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität besitzen, interferieren;
 „Apoptose-induzierende Mittel“, die den programmierten Zelltod fördern;
 „Antimetabolite“, wie z.B. Gemcitabin oder Hydroxyharnstoff, die einem essenziellen Metaboliten stark ähneln und deshalb physiologischen Reaktionen, an denen er beteiligt ist, interferieren;
 „Telomerase-Inhibitoren“, die mit der Aktivität von Telomerase, einem Enzym, dass die Telomerlänge verlängert und die Lebenszeit der Zelle und ihre replikative Kapazität erhöht, interferieren;
 „Cyclinabhängige Kinaseinhibitoren“, die mit cyclinabhängigen Kinasen interferieren, die die Hauptstufen zwischen verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch Phosphorylierung von Zellproteinen wie z.B. Histonen, Cytoskelettproteinen, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorgenen und dergleichen, kontrollieren;
 „DNA-schädigende Mittel“;
 „DNA-Reparaturinhibitoren“;
 „Antiangiogene Mittel“, die mit der Bildung neuer Blutgefäße oder dem Wachstum bestehender Blutgefäße, die/das während des Tumorwachstums auftritt, interferieren; und
 „Mitochondriale Gifte“, die direkt oder indirekt die mitochondriale Atmungskettenfunktion unterbrechen.

[0104] Besonders bevorzugte Kombinationen für die Behandlung von Tumoren sind die klinisch anerkannten bzw. zugelassenen Kombinationen, die hierin oben stehend angegeben sind. Da diese Kombinationen bereits für eine Verwendung im Menschen erprobt bzw. zugelassen worden sind, ist eine Reformulierung, um eine geeignete Abgabe zu gewährleisten, besonders wichtig.

[0105] Bevorzugte Mittel, die in Kombination verwendet werden können, umfassen DNA-schädigende Mittel wie z.B. Carboplatin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Mitomycin C, Mitoxantron; DNA-Reparatur-Inhibitoren, einschließlich 5-Fluoruracil (5-FU) oder FUDR, Gemcitabin und Methotrexat; Topoisomerase-I-Inhibitoren, wie z.B. Camptothecin, Irinotecan und Topotecan; S/G2 oder G2/M-„Checkpoint“-Inhibitoren, wie z.B. Bleomycin, Docetaxel, Doxorubicin, Etoposid, Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin; G1/„early-S-Checkpoint“-Inhibitoren; G2/M-„Checkpoint“-Inhibitoren; Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, wie z.B. Genistein, Trastuzumab, ZD1839; cytotoxische Mittel; Apoptose-induzierende Mittel und Zellzykluskontrollinhibitoren.

[0106] Es ist möglich, dass der Wirkmechanismus von einem oder mehreren der Mittel nicht bekannt oder nicht korrekt identifiziert ist. Alle synergistischen oder additiven Kombinationen von antineoplastischen Mitteln liegen innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise werden für die Behandlung eines Neoplasmas Kombinationen, die mehr als einen Mechanismus, der zu einer unkontrollierten Zellproliferation führt, hemmen, für eine Verwendung gemäß dieser Erfindung gewählt. Die vorliegende Erfindung umfasst beispielsweise das Auswählen von Kombinationen, die spezifische Punkte innerhalb des Zellzyklus beeinflussen, wodurch nicht-antagonistische Wirkungen resultieren. Zum Beispiel können Wirkstoffe, die einen DNA-Schaden verursachen, mit jenen, die eine DNA-Reparatur hemmen, wie z.B. Antimetabolite, gepaart bzw. angeordnet werden. Die vorliegende Erfindung umfasst auch das Auswählen von Kombinationen, die mehrfache bzw. mehrere Signalwege („pathways“) blockieren, die anderenfalls in Zellproliferation resultieren würden.

[0107] Besonders bevorzugte Kombinationen sind DNA-schädigende Mittel in Kombination mit DNA-Reparatur-Inhibitoren, DNA-schädigende Mittel in Kombination mit Topoisomerase-I- oder Topoisomerase-II-Inhibitoren, Topoisomerase-I-Inhibitoren in Kombination mit S/G2- oder G2/N-„Checkpoint“-Inhibitoren, G1/S-„Checkpoint“-Inhibitoren oder CDK-Inhibitoren in Kombination mit G2/M-„Checkpoint“-Inhibitoren, Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren in Kombination mit cytotoxischen Mitteln, Apoptose-induzierende Mittel in Kombination mit cytotoxischen Mitteln, Apoptose-induzierende Mittel in Kombination mit Zellzykluskontrollinhibitoren, G1/S oder G2/M-„Checkpoint“-Inhibitoren in Kombination mit cytotoxischen Mitteln, Topoisomerase-I- oder -II-Inhibitoren in Kombination mit DNA-Reparatur-Inhibitoren, Topoisomerase-I- oder -II-Inhibitoren oder Telomerase-Inhibitoren in Kombination mit Zellzykluskontrollinhibitoren, Topoisomerase-I-Inhibitoren in Kombination mit Topoisomerase-II-Inhibitoren und zwei cytotoxische Mittel in Kombination.

[0108] Spezifische Mittel, die in Kombination verwendet werden können, umfassen Cisplatin (oder Carboplatin) und 5-FU (oder FUDR), Cisplatin (oder Carboplatin) und Irinotecan und 5-FU (oder FUDR), Vinorelbin und Cisplatin (oder Carboplatin), Methotextrat und 5-FU (oder FUDR), Idarubicin und araC, Cisplatin (oder Carboplatin) und Taxol, Cisplatin (oder Carboplatin) und Etoposid, Cisplatin (oder Carboplatin) und Topotecan, Cisplatin (oder Carboplatin) und Daunorubicin, Cisplatin (oder Carboplatin) und Doxorubicin, Cisplatin (oder Carboplatin) und Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU (oder FUDR), Gemcitabin und 5-FU (oder FUDR), Adriamycin

und Vinorelbin, Taxol und Doxorubicin, Flavopuridol und Doxorubicin, UCN01 und Doxorubicin, Bleomycin und Trichlorperazin, Vinorelbin und Edelfosin, Vinorelbin und Sphingosin (und Sphingosinanaloga), Vinorelbin und Phosphatidylserin, Vinorelbin und Camptothecin, Cisplatin (oder Carboplatin) und Sphingosin (und Sphingosinanaloga), Sphingosin (und Sphingosinanaloga) und Daunorubicin und Sphingosin (und Sphingosinanaloga) und Doxorubicin.

[0109] Bevorzugte Kombinationen umfassen im Allgemeinen jene, die hierin oben stehend angegeben sind und die sich in der Klinik, wie von der FDA anerkannt, bereits als wirksam erwiesen haben, und jene, die weiterhin auf der Basis von Literaturberichten vorgeschlagen werden. Während die Mittel- bzw. Wirkstoffkandidaten zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren nicht auf diese spezifischen Kombinationen beschränkt sind, sind jene, die hierin oben stehend angegeben sind, als geeignete Kombinationstherapien offenbart worden und sind folglich zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen bevorzugt.

[0110] Manche Lipide sind „therapeutische Lipide“, die fähig sind, therapeutische Wirkungen, wie z.B. das Induzieren von Apoptose, auszuüben. Von dieser Definition sind Lipide, wie z.B. Etherlipide, Phosphatidsäure, Phosphonate, Ceramid und Ceramidanaloga, Dihydroxyceramid, Phytoceramid, Sphingosin, Sphingosinanaloga, Sphingomyelin, Serin-haltige Lipide und Sphinganolin umfasst. Der Begriff „Serin-haltiges Phospholipid“ oder „Serin-haltiges Lipid“, wie hierin definiert, ist ein Phospholipid, in dem die polare Kopfgruppe eine Phosphatgruppe umfasst, die an einem Ende kovalent mit einem Serin verbunden ist und am anderen Ende mit einem Drei-Kohlenstoff-Rückgrat, das durch eine Ether-Ester- oder Amidbindung mit einem hydrophoben Anteil verbunden ist. Von dieser Klasse sind die Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylserine (PS), umfasst, die zwei Kohlenwasserstoffketten im hydrophoben Anteil besitzen, die zwischen 5 und 23 Kohlenstoffatomelange sind und variierende Sättigungsgrade aufweisen. Der Begriff „hydrophober Anteil“ bezieht sich in Bezug auf ein Serinhaltiges Phospholipid oder ein Serin-haltiges Lipid auf apolare Gruppen, wie z.B. lange gesättigte oder ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffketten, gegebenenfalls mit einem oder mehreren aromatischen, alicyclischen oder heterocyclischen Gruppen, substituiert.

[0111] Kombinationen von therapeutischen Lipiden oder anderen Mitteln können auch verwendet werden, um synergistische oder additive Wirkungen zu erhalten (siehe Beispiele 17–21).

Hochdurchsatz-Durchmusterung zur Bestimmung von Verhältnissen, die nicht-antagonistische Kombinationswirkungen zeigen

[0112] Chemische Bibliotheken von Mitteln können gegeneinander in verschiedenen Verhältnissen durchgemustert werden, um neue nicht-antagonistische Wirkstoffkombinationen zu identifizieren. Chemische Bibliotheken können neue oder herkömmliche Mittel umfassen. Zusätzlich zur Durchmusterung auf Zwei-Mittel-Kombinationen können auch Drei- oder Vier-Mittel-Kombinationen auf nicht-antagonistische Kombinationswirkungen durchgemustert werden. Vorzugsweise ist die zum Bestimmen der Wirkstoffsynergie eingesetzte Datenanalysemethodologie die oben genannte Median-Effekt- bzw. Mittelwirkungsanalyse. Gemäß diesem Verfahren werden Bibliotheken von Mitteln einzeln und in Kombination in verschiedenen Verhältnissen untersucht. Dann werden unter Verwendung des von Chou und Talalay entwickelten oben genannten Verfahrens Kombinationsindices berechnet. Wirkstoffkombinationen, die nicht-antagonistische Wirkungen bei spezifischen Verhältnissen zeigen, werden in einem nicht-antagonistischen Verhältnis in Abgabevehikel eingekapselt.

[0113] Hochdurchsatz-Durchmusterungssysteme sind im Handel erhältlich (siehe z.B. Zymark Corp., Hopkinton, Mass.; Air Technical Industries, Mentor, Ohio; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, Calif.; Precision Systems, Inc., Natick, Mass., etc.). Diese Systeme automatisieren typischerweise die gesamten Verfahrensweisen, einschließlich aller Proben- und Reagenspipettierschritte, Dispensieren von Flüssigkeit, zeitgesteuerter Inkubationen und abschließender Ablesungen der Mikrotiterplatte in (einem) Detektor(en) der für den Assay geeignet ist. Diese konfigurierbaren Systeme stellen hohen Durchsatz und einen schnellen Anlauf, sowie einen hohen Grad an Flexibilität und kundenspezifischer Anpassung bereit. Die Hersteller derartiger Systeme stellen detaillierte Protokolle für die verschiedenen Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahren bereit.

Herstellung nicht-antagonistischer Zusammensetzungen

[0114] Wenn die geeigneten Verhältnisse der Mittel bestimmt worden sind, wie es oben beschrieben ist, werden die Mittel in dem geeigneten Verhältnis in eine Abgabevehikelzusammensetzung gegeben, wobei ein oder mehrere Abgabevehikel zwei oder mehr Mittel einkapseln. Es müssen nicht alle Abgabevehikel in der Zusammensetzung identisch sein. Die Abgabevehikel in den Zusammensetzungen sind Partikel mit Größen, die von

ihrem Verabreichungsweg abhängen, die in einem wässrigen oder anderen Lösungsmittel suspendiert sein können und die fähig sind, die Mittel der Erfindung einzukapseln. Derartige Vehikel umfassen z.B. Lipidträger, Liposomen, Cyclodextrine, Polymernanopartikel und Polymermikropartikel, einschließlich Nanokapseln und Nanosphären, Blockcopolymermicellen, lipidstabilisierte Emulsionen, derivatisierte Einzelkettenpolymere, Polymerlipidhybridsysteme, Lipidmicellen, Lipoproteinmicellen, wie vorher genannt. Für die intravenöse Verabreichung haben die Abgabevehikel typischer Weise einen Durchmesser von annäherungsweise 4–6.000 nm. Bevorzugte Durchmesser sind Durchmesser von näherungsweise 5–500 nm, stärker bevorzugt Durchmesser von 5–200 nm. Für Inhalation, intrathekale, intraartikuläre, intraarterielle, intraperitoneale oder subkutane Verabreichung sind die Vehikel typischerweise von 4 µm bis über 50 µm hinaus. Abgabevehikelzusammensetzungen, die für eine intraokulare Verabreichung gedacht sind, sind im Allgemeinen kleiner.

[0115] Die therapeutischen Mittel sind in den Abgabevehikeln „eingekapselt“ bzw. „verkapselt“. „Einkapselung“ bzw. „Verkapselung“, wie vorher beschrieben, umfasst kovalente oder nicht-kovalente Assoziation eines Mittels mit dem Abgabevehikel. Zum Beispiel kann dies durch Wechselwirkung des Mittels mit der/den Außenschichten des Abgabevehikels oder Einschließen eines Mittels innerhalb des Abgabevehikels erfolgen, wobei ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Anteilen des Abgabevehikels erreicht wird. Für Liposomen kann die Einkapselung eines Mittels z.B. durch Assoziation des Mittels durch Wechselwirkung mit der Doppelschicht der Liposomen durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkung mit den Lipidkomponenten oder Einschluss im wässrigen Inneren des Liposoms oder im Gleichgewicht zwischen der inneren wässrigen Phase und der Doppelschicht erfolgen. Für Polymerbasierte Abgabevehikel kann sich die Einkapselung auf kovalente Bindung eines Mittels an ein lineares oder nicht-lineares Polymer beziehen. Ferner umfassen nicht-beschränkende Beispiele die Dispersion eines Mittels in einer Polymermatrix oder die Konzentrierung des Wirkstoffs im Kern einer Nanokapsel, einer Blockcopolymermicelle oder eines Polymerlipidhybridsystems. „Beladung“ bezieht sich auf die Handlung des Einkapselns von einem oder mehreren Mitteln in ein Abgabevehikel.

[0116] Die Einkapselung der gewünschten Kombination kann entweder durch Einkapselung in separaten Abgabevehikeln oder innerhalb des gleichen Abgabevehikels erreicht werden. Wo eine Einkapselung in separate Abgabevehikel, wie z.B. Liposomen, gewünscht wird, kann die Lipidzusammensetzung jedes Liposoms durchaus verschieden sein, um koordinierte Pharmakokinetiken zu ermöglichen. Durch Ändern der Vehikelzusammensetzung können die Freisetzungsraten eingekapselter Wirkstoffe abgestimmt werden, um zu ermöglichen, dass nicht-antagonistische Verhältnisse der Wirkstoffe an der Tumorstelle abgegeben werden. Mittel zum Ändern der Freisetzungsraten umfassen Erhöhen der Acylkettenlänge vesikelbildender Lipide, um die Wirkstoffretention zu verbessern, Kontrollieren des Austauschs von auf der Oberfläche aufgepfropften hydrophilen Polymeren („surface grafted hydrophilic polymers“), wie z.B. PEG, aus der Liposomenmembran heraus und Einarbeiten bzw. Einbau Membran versteifender Mittel, wie z.B. Sterole oder Sphingomyelin, in die Membran. Es sollte für Fachleute auf dem Gebiet ersichtlich sein, dass, wenn es gewünscht ist, einen ersten und zweiten Wirkstoff in einem spezifischen Wirkstoffverhältnis zu verabreichen und wenn der zweite Wirkstoff in der Liposomenzusammensetzung des ersten Wirkstoffs (z.B. DMPC/Chol) schlecht zurückgehalten wird, verbesserte Pharmakokinetiken durch Einkapseln des zweiten Wirkstoffs in eine Liposomenzusammensetzung mit erhöhter Acylkettenlänge (z.B. DSPC/Chol) erreicht werden können. Alternativ können zwei oder mehr Mittel in dem gleichen Abgabevehikel eingekapselt sein.

[0117] Techniken zum Einkapseln sind abhängig von der Natur des Abgabevehikels. Zum Beispiel können therapeutische Mittel in Liposomen sowohl unter Verwendung passiver als auch aktiver Beladungsverfahren geladen werden.

[0118] Passive Verfahren zum Einkapseln von Mitteln in Liposomen umfassen Einkapseln des Mittels während der Herstellung der Liposomen. Bei diesem Verfahren kann der Wirkstoff-Membran-assoziiert sein oder in einem eingeschlossenen wässrigen Raum eingekapselt sein. Dies umfasst ein passives Einschlussverfahren, das von Bangham, et al., J. Mol. Biol. (1965) 12: 238 beschrieben wurde, wobei die das interessierende Mittel enthaltende wässrige Phase in Kontakt gebracht wird mit einem Film der getrockneten Vesikel bildenden Lipide, der auf den Wandungen eines Reaktionsbehälters abgelagert ist. Bei Bewegung durch mechanische Mittel wird ein Quellen der Lipide auftreten und es werden sich multilamellare Vesikel (MLV) bilden. Unter Anwendung von Extrusion können die MLVs in große unilamellare Vesikel (LUV) oder kleine unilamellare Vesikel (SUV) umgewandelt werden. Ein weiteres Verfahren der passiven Beladung, das verwendet werden kann, umfasst das von Deamer und Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443.629 beschriebene. Dieses Verfahren umfasst das Lösen Vesikel bildender Lipide in Ether und, anstatt den Ether zuerst zu verdampfen, um einen dünnen Film auf einer Oberfläche zu bilden, wird dieser Film danach in Kontakt mit einer wässrigen Phase, die einzukapseln ist, gebracht, wobei die Etherlösung direkt in die genannte wässrige Phase injiziert wird und der Ether danach verdampft wird, wodurch Liposomen mit eingekapselten Mitteln erhalten werden. Ein weiteres

Verfahren, das eingesetzt werden kann, ist das von Szoka und Papahadjopoulos, P.N.A.S. (1978) 75: 4194 beschriebene Umkehrphasenverdampfungs(REV)-Verfahren, bei dem eine Lösung von Lipiden in einem wasserunlöslichen Lösungsmittel in einer wässrigen Trägerphase emulgiert wird und das organische Lösungsmittel nachfolgend unter verringertem Druck entfernt wird.

[0119] Andere Verfahren zum passiven Einschluss, die verwendet werden können, umfassen Unterwerfen der Liposomen einer sukzessiven Dehydratisierungs- und Rehydratisierungsbehandlung oder Gefrieren und Auftauen. Dehydratisierung wird durch Verdampfung oder Gefriertrocknung durchgeführt. Diese Technik wird von Kirby, et al., Biotechnology (1984) 979–984 offenbart. Auch Shew und Deamer (Biochim. et Biophys. Acta (1985) 816: 1–8) beschreiben ein Verfahren, wobei durch Sonifizierung bzw. Beschallung hergestellte Liposomen in wässriger Lösung mit dem einzukapselnden Gelösten gemischt werden und das Gemisch unter Stickstoff in einem rotierenden Kolben getrocknet wird. Bei Rehydrierung werden große Liposomen gebildet, in denen ein signifikanter Anteil des Gelösten eingekapselt worden ist.

[0120] Passive Einkapselung von zwei oder mehr Mitteln ist für viele Wirkstoffkombinationen möglich. Dieser Ansatz ist durch die Löslichkeit der Wirkstoffe in wässrigen Pufferlösungen und dem großen Prozentsatz an Wirkstoff, der nicht in das Abgabesystem eingeschlossen wird, beschränkt. Die Beladung kann durch Co-Lyophilisieren der Wirkstoffe mit der Lipidprobe und Rehydratisieren in dem zum Solubilisieren der Wirkstoffe zulässigen Minimalvolumen verbessert werden. Die Löslichkeit kann durch Variieren des pHs des Puffers, Erhöhen der Temperatur oder Zugabe oder Entfernung von Salzen aus dem Puffer verbessert werden.

[0121] Es können auch aktive Verfahren zur Einkapselung verwendet werden. Liposomen können z.B. gemäß einer Metall-Komplexierungs- oder pH-Gradienten-Beladungstechnik beladen werden. Bei der pH-Gradienten-Beladung werden Liposomen gebildet, die eine wässrige Phase eines gewählten pHs einkapseln. Hydratisierte Liposomen werden in eine wässrige Umgebung eines anderen pHs gegeben, der so gewählt ist, dass er eine Ladung auf dem Wirkstoff oder einem anderen Mittel, der/das einzukapseln ist, entfernt oder minimiert. Sobald der Wirkstoff in das Liposom wandert, bewirkt der pH des Innenraums einen geladenen Zustand des Wirkstoffs, der verhindert, dass der Wirkstoff durch die Lipiddoppelschicht permeiert, wodurch der Wirkstoff im Liposom eingeschlossen wird.

[0122] Um einen pH-Gradienten zu schaffen, kann das ursprüngliche äußere Medium durch ein neues äußeres Medium mit einer anderen Protonenkonzentration ersetzt werden. Die Ersetzung des äußeren Mediums kann durch verschiedene Techniken, wie z.B. Passieren der Lipidvesikelzubereitung durch eine Gelfiltrations säule, z.B., eine Sephadex G-50-Säule, die mit dem neuen Medium äquilibriert worden ist (wie in den nachstehenden Beispielen angegeben), oder durch Zentrifugation, Dialyse oder damit verwandte Techniken, bewerkstelligt werden. Das innere Medium kann bezüglich des äußeren Mediums entweder sauer oder basisch sein.

[0123] Nach Etablierung eines pH-Gradienten wird ein Mittel, das durch einen pH-Gradienten geladen werden kann, zu dem Gemisch zugegeben und die Einkapselung des Mittels in das Liposom erfolgt, wie es oben beschrieben ist.

[0124] Die Beladung unter Verwendung eines pH-Gradienten kann gemäß den in den US-Patenten Nr. 5,616,341, 5,736,155 und 5,785,987 beschriebenen Verfahren, die hierin durch Literaturverweis aufgenommen sind, durchgeführt werden. Ein bevorzugtes Verfahren der pH-Gradienten-Beladung ist das Citrat basierte Beladungsverfahren unter Verwendung von Citrat als innerem Puffer bei einem pH von 2–6 und einem neutralen äußeren Puffer.

[0125] Es können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, um einen pH-Gradienten über ein Liposom hinweg zu etablieren und aufrecht zu erhalten, wobei alle von diesen hierin durch Literaturverweis aufgenommen sind. Dies kann die Verwendung von Ionophoren, die sich in die Liposomenmembran inserieren können und Ionen im Austausch gegen Protonen durch Membranen transportieren können, umfassen (siehe z.B. US-Patent Nr. 5,837,282). Es können auch Verbindungen, die in den Innenraum des Liposoms eingeschlossen sind und fähig sind, Protonen durch die liposomale Membran zu transportieren und somit einen pH-Gradienten auszubilden, genutzt werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 5,837,282). Diese Verbindungen umfassen eine ionisierbare Gruppierung, die neutral ist, wenn sie deprotoniert ist und geladen ist, wenn sie protoniert ist. Die neutrale deprotonierte Form (die im Gleichgewicht mit der protonierten Form steht) ist fähig, die Liposomenmembran zu passieren und somit ein Proton im Innenraum des Liposoms zu hinterlassen und dadurch eine Abnahme des pHs im Innenraum zu verursachen. Beispiele derartiger Verbindungen umfassen Methylammoniumchlorid, Methylammoniumsulfat, Ethylendiammoniumsulfat (siehe US-Patent Nr. 5,785,987) und Ammoniumsulfat. Innere Beladungspuffer, die fähig sind, einen basischen inneren pH zu etablieren, können ebenfalls verwendet

werden. In diesem Fall ist die neutrale Form protoniert, so dass Protonen aus dem Liposomeninnenraum transportiert werden, um einen basischen Innenraum zu etablieren. Ein Beispiel einer derartigen Verbindung ist Calciumacetat (siehe US-Patent Nr. 5,939,096).

[0126] Es können zwei oder mehr Mittel unter Verwendung der gleichen aktiven Beladungsverfahren in ein Liposom geladen werden oder sie können die Verwendung unterschiedlicher aktiver Beladungsverfahren umfassen. Metallkomplexierungsbeladung kann beispielsweise genutzt werden, um mehrere Mittel aktiv zu laden, oder sie kann mit einer anderen aktiven Beladungstechnik wie z.B. pH-Gradienten-Beladung gekoppelt werden. Die Metall-basierte aktive Beladung verwendet typischerweise Liposomen mit passiv eingekapselten Metallionen (mit oder ohne passiv geladene therapeutische Mittel). Verschiedene Salze von Metallionen werden verwendet, wobei vorausgesetzt wird, dass das Salz pharmazeutisch annehmbar und in wässrigen Lösungen löslich ist. Aktiv geladene Mittel werden, basierend darauf ob sie fähig sind, einen Komplex mit einem Metallion zu bilden und somit im Liposom zurückgehalten werden, wenn sie so komplexiert sind, jedoch aber zur Beladung in ein Liposom fähig sind wenn sie nicht mit Metallionen komplexiert sind, ausgewählt. Mittel, die zur Koordination bzw. koordinativen Anlagerung mit einem Metall fähig sind, umfassen typischerweise Koordinationsstellen wie z.B. Amine, Carbonylgruppen, Ether, Ketone, Acylgruppen, Acetylene, Olefine, Thiole, Hydroxyl- oder Halogenidgruppen oder andere geeignete Gruppen, die fähig sind, dem Metallion Elektronen zu spenden und dadurch einen Komplex mit dem Metallion bilden. Beispiele aktiver Mittel, die Metalle binden, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Chinolone, wie z.B. Fluorchinolone; Chinolone, wie z.B. Nalidixinsäure; Anthracycline, wie z.B. Doxorubicin, Daunorubicin und Idarubicin; Aminoglycoside wie z.B. Kanamycin; und andere Antibiotika, wie z.B. Bleomycin, Mitomycin C und Tetracyclin; und Stickstoff-Lost-Verbindungen, wie z.B. Cyclophosphamid, Thiosemicarbazone, Indomethacin und Nitroprussid; Camptothecine, wie z.B. Topotecan, Irinotecan, Lurtotecan, 9-Aminocamptothecin, 9-Nitrocamptothecin und 10-Hydroxycamptothecin; und Podophyllotoxine wie z.B. Etoposid. Die Aufnahme eines Mittels kann durch Inkubation des Gemischs bei einer geeigneten Temperatur nach der Zugabe des Mittels zum äußeren Medium etabliert werden. Abhängig von der Zusammensetzung des Liposoms, der Temperatur und dem pH des inneren Mediums und der chemischen Natur des Mittels, kann die Aufnahme des Mittels über eine Zeitdauer von Minuten oder Stunden erfolgen. Verfahren zur Bestimmung, ob Koordination zwischen einem Mittel und einem Metall in einem Liposom erfolgt, umfassen spektralphotometrische Analysen und andere herkömmliche Techniken, die Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind.

[0127] Die Liposomenbeladungseffizienz und die Retentionseigenschaften unter Verwendung Metall-basierter Verfahrensweisen, die in Abwesenheit eines Ionophors im Liposom durchgeführt werden, sind weiterhin abhängig von dem eingesetzten Metall und der Lipidzusammensetzung des Liposoms. Durch Auswahl der Lipidzusammensetzungen eines Metalls können die Beladungs- oder Retentionseigenschaften maßgeschneidert werden, um eine gewünschte Beladung oder Freisetzen eines ausgewählten Mittels aus einem Liposom zu erreichen.

[0128] Passive und aktive Beladungsverfahren können sequenziell kombiniert werden, um mehrere bzw. mehrfache Wirkstoffe in ein Abgabevehikel zu laden. Beispielsweise können Liposomen, die einen passiv in der Gegenwart von $MnCl_2$ eingeschlossenen Platinwirkstoff, wie z.B. Cisplatin, enthalten, nachfolgend verwendet werden, um ein Anthracyclin, wie z.B. Doxorubicin, aktiv im Innenraum des Liposoms einzukapseln. Dieses Verfahren ist wahrscheinlich auf zahlreiche Wirkstoffe anwendbar, die in Liposomen durch passive Einkapselung eingekapselt werden.

Therapeutische Verwendungen von Abgabevehikelzusammensetzungen, die mehrere Mittel einkapseln

[0129] Diese Abgabevehikelzusammensetzungen können verwendet werden, um eine Vielfalt an Erkrankungen in warmblütigen Tieren und in Vogelarten zu behandeln. Somit umfassen geeignete Subjekte für die Behandlung gemäß den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung Menschen, Säuger, wie z.B. Viehbestand oder Haustiere, domestizierte Vogelsubjekte, wie z.B. Hühner und Enten, und Labortiere für die Verwendung in der Forschung. Beispiele medizinischer Verwendungen der hierin beschriebenen Zusammensetzungen umfassen Krebsbehandlung, Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. Hypertension, Herzrhythmusstörung und Restenose, Behandlung bakterieller, viraler, pilzlicher oder parasitischer Infektionen, Behandlung und/oder Verhütung von Erkrankungen durch die Verwendung der hierin beschriebenen Zusammensetzung als Vakzine bzw. Impfstoffe, Behandlung von Inflammation bzw. Entzündung oder Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

[0130] Erfindungsgemäße Abgabevehikel werden verwendet, um Neoplasmen zu behandeln. Die Abgabe von formuliertem Wirkstoff an einer Tumorstelle wird durch Verabreichung von Liposomen oder anderen parti-

kulierten Abgabesystemen erreicht. Bevorzugt haben die Liposomen einen Durchmesser von weniger als 200 nm. Im Allgemeinen ist das Tumorgefäßsystem aufgrund von Fenestrationsen oder Lücken im Endothel durchlässiger als ein normales Gefäßsystem. Dies erlaubt es Abgabevehikeln mit einem Durchmesser von 200 nm oder weniger, die diskontinuierliche Endothelzellschicht und die darunter liegende Basalmembran, die die Gefäße umgeben, die einen Tumor mit Blut versorgen, zu penetrieren. Die selektive Akkumulation der Abgabevehikel in Tumorstellen nach der Extravasation führt zu verstärkter Wirkstoffabgabe und therapeutischer Wirksamkeit. Da die Träger extravasieren, kann angenommen werden, dass das im Blut bestimmte Träger-Wirkstoff-zu-Wirkstoff-Verhältnis zu dem Träger-Wirkstoff-zu-Wirkstoff-Verhältnis im extravaskulären Raum vergleichbar sein wird.

Verabreichung von Abgabevehikelzusammensetzungen

[0131] Wie oben erwähnt, können erfindungsgemäße Abgabevehikelzusammensetzungen warmblütigen Tieren einschließlich Menschen sowie domestizierten Vogelarten verabreicht werden. Für die Behandlung menschlicher Leiden wird ein qualifizierter Arzt bestimmen, wie die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen hinsichtlich der Dosis, des Zeitplans und des Verabreichungsweges unter Verwendung etablierter Protokolle eingesetzt werden sollten. Derartige Anwendungen können auch eine Dosissteigerung nutzen, sollten in erfindungsgemäße Abgabevehikelzusammensetzungen eingekapselte Mittel eine reduzierte Toxizität auf gesunde Gewebe des Subjekts aufweisen.

[0132] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen werden bevorzugt parenteral, d.h. intraarteriell, intravenös, intraperitoneal, subkutan oder intramuskulär verabreicht. Stärker bevorzugt werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen durch eine Bolusinjektion intravenös oder intraperitoneal verabreicht. Für Beispiele siehe Rahman, et al., US-Patent Nr. 3,993,754, Sears, US-Patent Nr. 4,145,410; Papahadjopoulos, et al., US-Patent Nr. 4,235,871; Schneider, US-Patent Nr. 4,224,179; Lenk, et al., US-Patent Nr. 4,522,803; und Fountain, et al., US-Patent Nr. 4,588,578.

[0133] In anderen Verfahren können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen durch direkte Applikation der Zubereitung auf das Gewebe mit dem Zielgewebe in Kontakt gebracht werden. Diese Anwendung kann durch topische, „offene“ oder „geschlossene“ Verfahrensweisen durchgeführt werden. Mit „topisch“ ist die direkte Applikation der pharmazeutischen Zubereitung auf ein gegenüber der Umwelt exponiertes Gewebe, wie z.B. die Haut, die Oropharynx, den äußeren Gehörgang, und dergleichen gemeint. „Offene“ Verfahrensweisen, sind jene Verfahrensweisen, die Inzisieren der Haut eines Patienten und direktes Sichtbarmachen der darunter liegenden Gewebe, auf die die pharmazeutischen Zusammensetzungen aufgetragen werden, umfassen. Dies wird im Allgemeinen durch einen chirurgischen Eingriff, wie z.B. eine Thorakotomie, um die Lungen zu erreichen, abdominale Laparotomie, um die abdominalen Eingeweide zu erreichen, oder einen anderen direkten operativen Ansatz am Zielgewebe bewerkstelligt. „Geschlossene“ Verfahrensweisen sind invasive Verfahrensweisen, bei denen die inneren Zielgewebe nicht direkt visualisiert bzw. sichtbar gemacht werden, sondern über das Einführen von Instrumenten durch kleine Wunden in der Haut erreicht werden. Beispielsweise können die Zubereitungen durch eine Spülung durch eine Kanüle („needle lavage“) an das Peritoneum verabreicht werden. Gleichmaßen können die pharmazeutischen Zubereitungen an die Hirnhäute oder das Rückenmark durch Infusion während einer Lumbalpunktion, gefolgt von einer geeigneten Lagerung des Patienten, wie allgemein für die Rückenmarksanästhesie oder Metrazamid-Bildgebung des Rückenmarks praktiziert wird, verabreicht werden. Alternativ können die Zubereitungen über endoskopische Vorrichtungen verabreicht werden.

[0134] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die erfindungsgemäße Abgabevehikel umfassen, werden gemäß Standardtechniken hergestellt und können Wasser, gepuffertes Wasser, 0,9%-ige Kochsalzlösung, 0,3% Glycin, 5% Dextrose und dergleichen, einschließlich Glycoproteine für eine erhöhte Stabilität wie z.B. Albumin, Lipoprotein, Globulin und dergleichen, umfassen. Diese Zusammensetzungen können durch herkömmliche, gut bekannte Sterilisationstechniken sterilisiert werden. Die resultierenden wässrigen Lösungen können für die Verwendung abgepackt werden oder unter aseptischen Bedingungen filtriert und lyophilisiert werden, wobei die lyophilisierte Zubereitung vor der Verabreichung mit einer sterilen wässrigen Lösung kombiniert wird. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie sie erforderlich sind, um physiologische Bedingungen zu approximieren, wie z.B. pH-Einstellungs- und Pufferungsmittel, Tonizitätseinstellungsmittel und dergleichen, wie z.B. Natriumacetat, Natriumlactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid und dergleichen. Zusätzlich kann die Abgabevehikelsuspension Lipid schützende Mittel umfassen, die Lipide bei der Lagerung gegen Schäden durch freie Radikale und Lipidperoxidation schützen. Lipophile Quencher für freie Radikale, wie z.B. alpha-Tocopherol und wasserlösliche eisenspezifische Chelatoren, wie z.B. Ferrioxamin, sind dazu geeignet.

[0135] Die Konzentration der Abgabevehikel in den pharmazeutischen Formulierungen kann stark variieren, z.B. von weniger als 0,05 Gew.-%, normalerweise bei oder wenigstens näherungsweise 2–5% bis zu so viel wie 10 bis 30 Gew.-% und wird in Übereinstimmung mit der speziellen ausgewählten Verabreichungsweise hauptsächlich in Abhängigkeit von den Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten und dergleichen gewählt. Die Konzentration kann z.B. erhöht werden, um die Flüssigkeitsbelastung, die mit der Behandlung verbunden ist, zu verringern. Alternativ können Abgabevehikel, die aus reizenden Lipiden bestehen, auf niedrige Konzentrationen verdünnt werden, um eine Entzündung an der Verabreichungsstelle zu verringern. Für eine Diagnose wird die Menge der verabreichten Vehikel von der speziellen verwendeten Markierung, dem zu diagnostizierenden Krankheitszustand und der Beurteilung des Arztes abhängen.

[0136] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen werden bevorzugt intravenös verabreicht. Die Dosierung für die Abgabevehikelformulierungen wird von dem Verhältnis von Wirkstoff zu Lipid und der auf Alter, Gewicht und Zustand des Patienten basierenden Meinung des verabreichenden Arztes abhängen.

[0137] Zusätzlich zu pharmazeutischen Zusammensetzungen können geeignete Formulierungen zur tiermedizinischen Verwendung hergestellt werden und dem Subjekt auf eine geeignete Weise verabreicht werden. Bevorzugte tiermedizinische Subjekte umfassen Säugetiere, z.B. nicht-humane Primaten, Hunde, Katzen, Rinder, Pferde, Schafe und domestiziertes Geflügel. Die Subjekte können auch Labortiere, wie z.B. insbesondere Ratten, Kaninchen, Mäuse und Meerschweinchen, umfassen.

Bewertung der therapeutischen Aktivität in vivo

[0138] Die therapeutische Aktivität von Abgabevehikelzusammensetzungen, die zwei oder mehr eingekapselte Mittel umfassen, kann nach Verabreichung an ein Tiermodell gemessen werden. Vorzugsweise umfasst das Tiermodell einen Tumor, obwohl Abgabevehikelzusammensetzungen anderen Tiermodellen anderer Erkrankungen verabreicht werden können. Nagerarten wie z.B. Mäuse und Ratten mit entweder Inzucht-, Fremdzucht- oder hybrider Abstammung, einschließlich immunkompetenter und immunkompromittierter sowie Knockout- oder transgene Modelle, können verwendet werden.

[0139] Modelle können aus soliden oder nicht-soliden Tumoren, als Zellsuspensionen, Bries- oder Tumorforgane implantiert in subkutane, intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, intrathekale oder orthotopische Regionen, bestehen. Tumore können auch über die Anwendung oder Verabreichung von tumorigenen/karzinogenen Mitteln etabliert werden oder können spontan in geeigneten gentechnisch veränderten Tieren entstehen gelassen werden. Tumortypen können aus Tumoren mit ektodermalen, mesodermalen oder endodermalem Ursprung, wie z.B. Karzinome, Sarkome, Melanome, Gliome, Leukämien und Lymphome, bestehen.

[0140] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Maus-Tumormodelle verwendet. Humane xenotransplantierte solide Tumore, die in immunkompromittierten Mäusen wachsen gelassen werden, können verwendet und auf der Basis von definierten genetischen und Wachstumsmerkmalen ausgewählt werden. Die in diesen Experimenten verwendeten Tumorzellen können gentechnisch verändert oder ausgewählt sein, sodass sie bevorzugte Eigenschaften exprimieren, und werden in Mäuse injiziert.

[0141] Sobald die Tumore bis zu einer tastbaren (messbaren) Größe gewachsen sind, können die Abgabevehikelzusammensetzungen, bevorzugt intravenös, verabreicht werden und ihre Wirkungen auf das Tumorstadium überwacht werden. Die beabsichtigten therapeutischen Behandlungen können aus einzelnen Bolus- oder „Push“-Verabreichungen oder mehrfachen oder kontinuierlichen Verabreichungen über mehrere Tage oder Wochen bestehen und können auf einem beliebigen geeigneten Weg, wie z.B. den oralen, nasalen, subkutanen, intravenösen, intraperitonealen, intrathekalen, intratumoralen Wegen, unter Verwendung von Spritzen, Tabletten, Flüssigkeiten und Pumpen (z.B. osmotisch) erfolgen. Die Dosis- und Zeitplanabhängigkeit können bewertet werden, um die maximale Antitumor-Aktivität, die erreicht werden kann, zu bestimmen.

[0142] Es können verschiedene Verfahren zur Bestimmung der therapeutischen Aktivität in Tiermodellen, die einen Tumor umfassen, eingesetzt werden. Dies umfasst Bewertungsverfahren für Modelle mit soliden Tumoren und Bewertungsverfahren für Modelle mit nicht-soliden Tumoren.

[0143] Bewertungsverfahren für Modelle mit soliden Tumoren umfassen die Messung von Tumorstadium (Masse), Tumorgewichtsinhibition (TWI%), Tumorstadiumverzögerung (T-C), Tumorstadiumregression, Zellabtötung und klonogene Assays.

[0144] Die Tumolvolumenmessungen werden bestimmt aus mit einem Messschieber durchgeführten Messungen rechtwinkliger Längen- und Breitenmessungen (häufig können auch Höhenmessungen erhalten werden). Das Tumolvolumen (ml) oder die Tumormasse (g) wird berechnet aus: $\text{Volumen} = (\text{Länge} \times \text{Breite}^2/2)$; oder $\text{Volumen} = \pi/6 \times (\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe})$. Die Daten werden unter Berücksichtigung der Zeit aufgetragen.

[0145] Die Tumorgewichtsinhibierung (TWI%) wird bestimmt durch Messen des mittleren Tumorgewichts einer behandelten Gruppe geteilt durch das mittlere Tumorgewicht einer Kontrollgruppe, minus 1×100 zu einem definierten Zeitpunkt.

[0146] Die Tumorstadiumswachstumsverzögerung (T-C) wird gemessen als die mediane Zeit in Tagen, damit eine behandelte Gruppe (T) eine willkürlich festgelegte Tumorgroße erreicht (z.B. 300 mg) minus der medianen Zeit in Tagen, damit die Kontrollgruppe die gleiche Tumorgroße erreicht.

[0147] Die Tumorregression als Behandlungsergebnis kann auch als ein Mittel zum Bewerten eines Tumormodells verwendet werden. Die Ergebnisse werden als Verringerungen der Tumorgroße (Masse) über die Zeit angegeben.

[0148] Zellabtötungsverfahren der Bewertung von Modellen mit soliden Tumoren können das wiederholte Vermessen mit Messschiebern umfassen, bis alle eine vorher bestimmte Größe überschreiten (z.B. 200 mg). Dann können das Tumorstadiumswachstum und die Tumorverdoppelungszeit beurteilt werden. \log_{10} -Zell-Abtötungsparameter können dann wie folgt berechnet werden:

$$\log_{10}\text{-Zellabtötung/Dosis} = (T-C)/((3,32)(T_d)(\text{Anzahl an Dosen}))$$

$$\log_{10}\text{-Zellabtötung (insgesamt)} = (T-C)/((3,32)(T_d))$$

$$\log_{10}\text{-Zellabtötung (netto)} = ((T-C) - (\text{Dauer von } R_x))/((3,32)(T_d))$$

wobei:

(T-C) = Tumorstadiumswachstumsverzögerung
 T_d = Tumorverdoppelungszeit

[0149] Klonogene Assays drücken die Wirksamkeit der Therapie aus. Diese Assays umfassen Exzisionsassays und Charakterisierung von Zellsuspensionen aus soliden Tumoren.

[0150] Exzisionsassays werden verwendet, um zu bestimmen, welcher Anteil an Zellen in einer aus Tumoren hergestellten Suspension ein unbeschränktes Proliferationspotential (d.h. sie sind klonogen) hat. Es gibt drei Typen von Exzisionsassays:

- i) TD50- oder Endpunktverdünnungsassays: Bestimmung der Anzahl an Zellen, die erforderlich sind, um Tumorstadiumswachstum aus Inokula in vivo zu erzeugen.
- ii) in vivo-Kolonieassay: Beurteilung der Fähigkeit einzelner Zellen, Knötchen (Kolonien) z.B. in der Lunge zu bilden.
- iii) in vitro-Kolonieassay, Untersuchung der Fähigkeit einzelner Zellen, entweder in Flüssigmedien, wenn sich Kolonien auf der Kunststoff- oder Glasoberfläche von Kulturschalen bilden, oder in halbfesten Medien, wie z.B. Agar, in denen sich Kolonien in Suspension bilden, zu Kolonien heranzuwachsen.

[0151] Die Charakterisierung von Zellsuspensionen aus soliden Tumoren ist erforderlich für klonogene Assays in vivo und in vitro, Durchflusszytometriemessungen und für zahlreiche biochemische und molekulare Untersuchungen, die auf einer Pro-Zelle-Basis durchgeführt werden. Die Präparation erfolgt durch eine Anzahl an Verfahren, wie z.B. enzymatische, mechanische, chemische Verfahren und Kombinationen davon und durch oberflächenaktive Mittel („surface activity agents“). Die Bewertungen können Zellausbeute, Zellmorphologie, Tumorzellklonalität, Retention biochemischer oder molekularer Merkmale umfassen.

[0152] Bewertungsverfahren für Modelle mit nicht-soliden Tumoren umfassen Messungen der Erhöhung der Lebensdauer (ILS%), Tumorstadiumswachstumsverzögerung (T-C), Langzeitüberlebende (Heilung).

[0153] Die Erhöhung der Lebensdauer (ILS%) misst die prozentuale Erhöhung der Lebensdauer von behandelten Gruppen gegenüber Kontroll- oder unbehandelten Gruppen. Die Tumorstadiumswachstumsverzögerung (T-C) misst die mediane Zeit in Tagen für das Überleben der behandelten Gruppe (T) minus der medianen Zeit für

das Überleben der Kontrollgruppe (C). Langzeitüberlebende (Heilung) messen Behandlungsgruppen, die die Überlebenszeiten von unbehandelten oder Kontrollgruppen bis zu und mehr als dreimal überleben.

[0154] Verfahren zur Bestimmung der therapeutischen Aktivität in von Krebs betroffenen Menschen umfassen Messungen von Überlebens- und Ersatzendpunkten. Die Zeit, zu der das Überleben vernünftigerweise bewertet wird, hängt von dem fraglichen Tumor ab. Beispielsweise können die Überlebensraten für Patienten mit geringgradigen Lymphomen z.B. fünf oder zehn Jahre nach der Diagnose untersucht werden, wohingegen das Überleben von Patienten mit aggressiven Erkrankungen, wie z.B. fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, am Besten 6 bis 12 Monate nach der Diagnose bewertet wird.

[0155] Verfahren zur Bestimmung der therapeutischen Aktivität unter Verwendung von Ersatzendpunkten umfassen Messen von vollständiger Antwort bzw. Reaktion-(CR), partieller Antwort (PR), progressionsfreiem Überleben (PFS), Zeit-bis-zur-Progression (TTP) oder Dauer der Antwort (DOR), Plasma- und Urinmarkern, Enzyminhibierung und/oder Rezeptorstatus, Änderungen der Genexpression und Lebensqualität (QOL).

[0156] Eine vollständige Antwort bzw. Reaktion bedeutet das Verschwinden aller bekannten Erkrankungsstellen ohne Entwicklung einer neuen Erkrankung für eine Zeitdauer, die für den behandelten Tumortyp zutreffend ist. Die Beurteilungen beruhen auf einer Vielfalt an Untersuchungen wie z.B. jenen, die oben angegeben sind.

[0157] Eine teilweise Antwort ist eine wenigstens 50%-ige Abnahme der Summe der Produkte der zweidimensionalen Messung aller Läsionen, wobei für eine für den behandelten Tumortyp zutreffende Zeitdauer keine neue Erkrankung auftritt. Die Beurteilungen beruhen auf einer Vielfalt an Untersuchungen (CT-Scan, MRT, Ultraschall, PET-Scan, Knochenscan, physische bzw. physikalische Untersuchung) von Patienten.

[0158] Progressionsfreies Überleben (PFS): Dauer ab der Behandlung, in der ein Patient überlebt und in der es kein neues Wachstum eines bestehenden Tumors oder Auftreten neuer Tumormassen gibt. Das PFS kann entweder als die Zeitdauer oder als der Anteil von Patienten, die überleben und zu einer gegebenen Zeit nach der Diagnose progressionsfrei sind, ausgedrückt werden.

[0159] Die Zeit-bis-zur-Progression (TTP) oder die Dauer der Antwort (DOR) beziehen sich auf eine Zeitdauer von der Behandlung bis zu einer Progression von Tumorwachstum, gemessen entweder als eine Erhöhung der Größe bestehender Tumormassen oder als das Auftreten neuer Tumormassen.

[0160] Plasma- und Urinmarker umfassen Messen von Markern, wie z.B., aber nicht beschränkt auf, die folgenden Marker: Prostata-spezifisches Antigen (PSA) und karzinoembryonales Antigen (CEA).

[0161] Enzyminhibierung und/oder Rezeptorstatus. Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B., aber nicht beschränkt auf, Tyrosinkinaserzeptoren, EGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor, Her-1- und Her-2-Rezeptoren. Enzyme, wie z.B., aber nicht beschränkt auf, Integrin-gebundene Kinasen, Proteinkinasen und dergleichen.

[0162] Änderungen in der Genexpression umfassen die serielle Untersuchung der Genexpression (Genomik) und der Änderungen in der Proteinexpression (Proteomik).

[0163] Die Lebensqualität (QOL) umfasst Verfahren, wie z.B. das EORTC QLQ-C30-Bewertungsverfahren, das Ausbeutebewertungen („yields scores“) für fünf funktionelle Skalen (physisch, Rolle, kognitiv, sozial und emotional), drei Symptomskalen (Übelkeit, Schmerz und Erschöpfung) und eine globale Gesundheits- und Lebensqualitätsskala bewertet. Das Maß ergibt auch Einzelpositionsbewertungen („single-item ratings“) zusätzlicher Symptome, die allgemein von Krebspatienten berichtet werden (Dyspnoe, Appetitverlust, Schlafstörung, Verstopfung und Diarrhö) sowie die empfundene finanzielle Auswirkung der Erkrankung und ihrer Behandlung.

[0164] Die folgenden Beispiele werden zum Zweck der Erläuterung angegeben und dienen nicht dem Zweck der Beschränkung des Umfangs der Erfindung.

BEISPIELE

[0165] Die nachstehenden Beispiele setzen die folgenden Verfahren zur Bestimmung der Cytotoxizität und zur Bewertung nicht-antagonistischer Wirkungen ein.

Cytotoxizitätsassay

[0166] In den nachstehenden Beispielen wurde das Tetrazolium-basierte colorimetrische MTT-Cytotoxizitätsassay-Standardprotokoll (Mosmann, et al., J. Immunol Methods (1983) 65(1-2): 55–63) verwendet, um das Ergebnis für den Anteil affizierter Zellen zu bestimmen. Kurz gesagt, reduzieren lebensfähige Zellen das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Diethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazan, das spektralphotometrisch abgelesen bzw. bestimmt werden kann. Zellen, wie z.B. humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom(NSCLC)-Zellen vom Typ H460, die in 25 cm²-Kolben gezüchtet wurden, werden passagiert (Passagenzahl < 20), in frischem RPMI-Zellkulturmedium suspendiert und bei einer Konzentration von 1000 Zellen pro Well in 100 µL pro Well in 96-Well-Zellkulturplatten gegeben. Die Zellen werden dann 24 Stunden lang bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren gelassen. Am folgenden Tag werden serielle Wirkstoffverdünnungen in 12-Well-Kulturplatten hergestellt. Die Mittel, die vorher in verschiedenen Lösungen hergestellt wurden, werden in frischen RPMI-Zellkulturmedien verdünnt. Die Mittel werden an die entsprechenden oder spezifizierten Wells für einzelne Mittel (20 µL) und bei Zwei-Mittel-Kombinationen in spezifisch festgelegtem Verhältnis (Inkrementen bzw. Schritte von 20 µL) verabreicht, wobei ein lateinisches Quadrat-Schema oder ein „Schachbrett“-Verfahren verwendet werden. Die Well-Gesamtvolumen werden mit frischem Medium auf 200 µL aufgefüllt. Die Wirkstoffexposition erfolgt für eine Dauer von 72 Stunden.

[0167] Nach der Wirkstoffexposition wird MTT-Reagens (1 mg/ml in RPMI) bei einem Volumen von 50 µl pro Well zu jedem Well zugegeben und 3–4 Stunden lang inkubiert. Die Well-Inhalte werden dann abgesaugt und 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) wird zu jedem Well zugegeben, um die Zellen aufzubrechen und um das Formazan-Präzipitat in den Zellen zu solubilisieren. Die 96-Well-Platten werden auf einem Plattenschüttler geschüttelt und in einem Mikroplattenspektralphotometer, das auf eine Wellenlänge von 570 nm eingestellt ist, abgelesen bzw. ausgewertet. Die optische Dichte(OD)-Ablesungen werden aufgezeichnet und die OD-Werte der Leerwert-Wells (die nur Medium enthalten) werden von allen Wells, die Zellen enthalten, subtrahiert. Das Überleben der Zellen nach der Exposition gegenüber Mitteln ist als ein prozentualer Anteil der Kontroll-Well (gegenüber dem Wirkstoff nicht exponierte Zellen) basiert. Alle Wells werden in dreifacher Ausfertigung ausgeführt und es werden Mittelwerte berechnet.

Mittelwirkungs-Analyse bzw. Median-Effekt-Analyse für Wirkstoffkombinationen

[0168] Für die Wirkstoffkombinationsanalyse wurde das Softwareprogramm CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), basierend auf dem Mittelwirkungs-Prinzip bzw. Median-Effekt-Prinzip nach Chou und Talalay, eingesetzt. Die festgelegten Verhältnisse für die 2-Mittel-Kombinationen werden anfänglich von den IC₅₀:IC₅₀-Verhältnissen aus den Einzel-Mittel-Cytotoxizitätsprofilen abgeleitet. Nachfolgend werden relevantere festgelegte Verhältnisse (z.B. im Bereich von 10:1 bis 1:10; Molverhältnisse) auf der Grundlage von Überlegungen für Formulierungszwecke gewählt. Ausgehend von den Mittelwerten, die auf der Grundlage von Mittel-Wirkungen auf das Überleben von Zellen berechnet wurden, werden Dosen und jeweilige anteilige Wirkungswerte in das CalcuSyn-Computerprogramm eingegeben. Die Software bestimmt dann auf der Grundlage der Kombinationsindex(CI)-Werte, ob die Wirkstoffkombinationen synergistisch, additiv oder antagonistisch sind.

Beispiel 1

Mehrfache Darstellung der Dosis-Wirkungs-Analyse

[0169] Die quantitative Analyse der Beziehung zwischen einer Menge (Dosis oder Konzentration) an Wirkstoff und seiner biologischen Wirkung, sowie die gemeinsame Wirkung von Wirkstoffkombinationen können in einer Anzahl unterschiedlicher Weisen gemessen und angegeben werden. **Fig. 2** illustriert 5 derartige Verfahren, wobei als ein Beispiel eine Kombination aus Irinotecan und Carboplatin verwendet wird.

[0170] Auf der Grundlage der Theorie der Dosis-Wirkungs-Analyse nach Chou und Talalay ist eine „Mittelwirkungs-Gleichung“ bzw. „Median-Effekt-Gleichung“ verwendet worden, um eine Anzahl biochemischer Gleichungen zu berechnen, die auf dem Fachgebiet ausgiebig verwendet werden. Ableitungen dieser Gleichung haben Gleichungen höherer Ordnung ergeben, wie zum Beispiel jene, die verwendet werden um den Kombinationsindex (CI) zu berechnen. Wie vorher erwähnt, kann der CI verwendet werden, um zu bestimmen, ob Kombinationen von mehr als einem Wirkstoff und verschiedene Verhältnisse jeder Kombination antagonistisch, additiv oder synergistisch sind. CI-Diagramme werden typischerweise mit dem CI, der die y-Achse darstellt, gegen den Anteil affizierter Zellen oder des affizierten Anteils (f_a) auf der x-Achse dargestellt. **Fig. 2A** zeigt, dass ein 10:1-Molverhältnis von Irinotecan/Carboplatin antagonistisch ist (CI > 1,1), während 1:1 und 10:1 eine synergistische Wirkung (CI < 0,9) haben.

[0171] Die Anmelder haben auch ein alternatives Verfahren zum Darstellen der Abhängigkeit des CI von den verwendeten Wirkstoffverhältnissen entworfen. Der maximale CI-Wert wird gegen jedes Verhältnis aufgetragen, um Trends bei Verhältnis-spezifischen Wirkungen für eine bestimmte Kombination besser darzustellen, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt. Das CI-Maximum ist der bei einem einzelnen f_a -Wert (zwischen 0,2 und 0,8) genommene CI-Wert, wobei die größte Differenz der CI-Werte für die Wirkstoffe bei verschiedenen Kombinationen beobachtet wurde.

[0172] Da die Konzentrationen der für ein individuelles Verhältnis verwendeten Wirkstoffe einer Rolle beim Bestimmen der Wirkung (d.h. Synergismus oder Antagonismus) spielen, kann es auch wichtig sein, den CI bei verschiedenen Konzentrationen zu vermessen. Diese Konzentrationen, auch bezeichnet als „wirksame Dosen“ bzw. „effektive Dosen“ (ED) nach Chou-Talalay, sind die Wirkstoffkonzentration, die erforderlich ist, um einen bestimmten Prozentsatz der Zellen in einem in vitro-Assay zu affizieren, d.h., ED_{50} ist die Wirkstoffkonzentration, die erforderlich ist, um 50% der Zellen relativ zu einer Kontrolle oder unbehandelten Zellpopulation zu affizieren. Wie in [Fig. 2C](#) dargestellt, werden Konzentration-Wirkung-Trends zwischen den verschiedenen Verhältnissen leicht festgestellt. Die gezeigten Fehlerbalken stellen eine bzw. eine einfache Standardabweichung um den Mittelwert dar und werden direkt durch das CalcuSyn-Programm bestimmt.

[0173] Eine synergistische Wechselwirkung zwischen zwei oder mehr Wirkstoffen hat den Nutzen, dass sie die erforderliche Menge jedes Wirkstoffs verringern kann, um in einer positiven Wirkung zu resultieren, was auch als „Dosisverringerung“ bekannt ist. Der „Dosis-Verringerungsindex“ (DRI) von Chou und Talalay ist ein Maß dafür, wie stark die Dosis jedes Wirkstoffs in einer synergistischen Kombination bei einem gegebenen Wirkungslevel im Vergleich zu den Dosen für jeden Wirkstoff allein reduziert werden kann. Der DRI ist in klinischen Situationen wichtig gewesen, bei denen eine Dosisverringerung zu verringerter Toxizität für den Wirt führt, während die therapeutische Wirksamkeit beibehalten wird. Das Diagramm in [Fig. 2D](#) zeigt, dass die Konzentrationen von Irinotecan und Carboplatin, die erforderlich sind, um selbstständig eine 90%-ige Zellabtötung zu erreichen, signifikant höher sind, als ihre individuellen Konzentrationen, die erforderlich sind, wenn sie in einem nicht-antagonistischen Verhältnis kombiniert werden.

[0174] Weiterhin können die oben genannten Daten in einem klassischen Isobologramm ([Fig. 2E](#)) dargestellt werden. Isobologramme haben den Vorteil, dass sie bei verschiedenen ED-Werten generiert werden können; jedoch wird es schwieriger, sie zu lesen, wenn mehr Wirkungslevel für die Interpretation ausgewählt werden. Aus diesem Grund werden die Daten in den unten stehenden Beispielen im Allgemeinen in Übereinstimmung mit den in den [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) gezeigten Diagrammtypen dargestellt.

Beispiel 2

CI ist von Konzentrationen abhängig

[0175] Wirkstoffkombinationen von Irinotecan und 5-Fluoruracil (5-FU) bei Molverhältnissen von 1:1 und 1:10 und Etoposid und Carboplatin bei Molverhältnissen von 10:1 und 1:10 wurden auf additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen untersucht, wobei der Tetrazolium-basierte colorimetrische MTT-Cytotoxizitätsstandardassay und die Median-Effekt-Analyse verwendet wurden, wie in den vorangehenden Beispiel-Abschnitten beschrieben. HT29- oder MCF-7-Zellen wurden gegenüber einzelnen Mitteln sowie Mitteln in Kombination mit definierten Verhältnissen exponiert. Für einzelne Mittel und Kombinationen wurden acht Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt. Die Werte für die optische Dichte wurden aus dem MTT-Assay erhalten, in einen prozentualen Anteil der Kontrolle umgewandelt, gemittelt und dann in Werte für den affizierten Anteil umgewandelt. Die Dosiswerte und Werte für den affizierten Anteil wurden in CalcuSyn eingegeben, wodurch das CI-gegen- f_a -Diagramm, gezeigt in [Fig. 3](#), erhalten wurde.

[0176] [Fig. 3A](#) zeigt, dass Irinotecan und 5-FU in einem Molverhältnis von 1:1 über den gesamten Konzentrationsbereich nicht-antagonistisch waren, wie es durch die Dosis für den affizierten Anteil („fraction-affected dose“) gemessen wurde. Im Gegensatz dazu waren die gleichen zwei Wirkstoffe bei einem Molverhältnis von 1:10 bei niedrigen Konzentrationen nicht-antagonistisch, bei höheren Konzentrationen jedoch antagonistisch. Wie in [Fig. 3B](#) ersichtlich ist, waren Etoposid und Carboplatin in einem Molverhältnis von 10:1 über den gesamten Konzentrationsbereich antagonistisch. Im Gegensatz dazu waren Etoposid und Carboplatin in einem 1:10-Molverhältnis bei niedrigen Konzentrationen antagonistisch, während sie bei höheren Konzentrationen nicht-antagonistisch waren.

[0177] Es wurde auch gezeigt, dass Cisplatin und Edelfosin in Molverhältnissen von 10:1 und 1:1 verschiedene Kombinationswirkungen in H460-Zellen aufweisen, wie es durch das Auftragen von CI gegen f_a zusam-

mengefasst wird. Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, war die Kombination in einem 10:1-Molverhältnis für näherungsweise 50% des Bereichs für den affizierten Anteil („fraction affected range“) bei niedrigen Konzentrationen nicht-antagonistisch und bei höheren Konzentrationen antagonistisch, während ein 1:1-Molverhältnis Synergie über den gesamten Konzentrationsbereich zeigte.

[0178] Diese Ergebnisse zeigen folglich, dass eine Synergie nicht nur vom Verhältnis der Mittel zueinander, sondern auch von ihren Konzentrationen hochgradig abhängig ist.

Beispiel 3

Bestimmung des CI für verschiedene Zwei-Wirkstoff-Kombinationen

[0179] Verschiedene Wirkstoffkombinationen, die in der nachstehenden Tabelle dargestellt sind, wurden auf additive, synergistische oder antagonistische Effekte untersucht, wobei das MTT-Cytotoxizitätsassay-Protokoll und die Median-Effekt-Analysenverfahrensweise, die oben stehend beschrieben sind, angewendet wurden. Ergebnisse aus den CI-gegen- f_a -Diagrammen sind nachstehend tabelliert. Der ungefähre prozentuale Anteil des f_a -Bereichs, der eine nicht-antagonistische Wirkung zeigte, ist anschließend an das Verhältnis in Klammern angegeben. Die Messungen wurden zwischen f_a -Werten von 0,2 und 0,8 durchgeführt und der prozentuale Anteil dieses f_a -Bereichs, der eine synergistische oder additive Wirkung (nicht-antagonistisch) aufwies, wurde durch Bestimmung des prozentualen Anteils der unter einen CI-Wert von 1,1 fallenden Kurve berechnet. Die Daten stammen von wenigstens einem Experiment, das in dreifacher Wiederholung durchgeführt wurde.

Wirkstoffkombination	Zelllinie	Molverhältnis [% synergistisch oder additiv ^a]
Irinotecan:5-FU	H460	1:10 [83%], 1:1 [17%], 10:1 [100%]
Irinotecan:5-FU	MCF-7	1:10 [48% additiv ^b], 1:1 [58%], 10:1 [90%]
Irinotecan:5-FU	HT29	1:10 [75%], 1:1 [100%]
FUDR:Irinotecan	HCT-116	1:10 [0%], 1:5 [92%], 1:1 [100%], 5:1 [100%], 10:1 [100%]
FUDR:Irinotecan	HT29	1:10 [40%], 1:5 [73%], 1:1 [100%], 5:1 [100%], 10:1 [95%]
5-FU:Carboplatin	H460	1:10 [48%], 1:1 [100%], 10:1 [100%]
FUDR:Carboplatin	H460	1:10 [37%], 1:5 [100%], 1:1 [100%], 5:1 [100% additiv ^b], 10:1 [100% additiv ^b]
Irinotecan:Carboplatin	H460	1:10 [0%], 1:1 [13%], 10:1 [100% additiv ^b]
Irinotecan:Carboplatin	A549	1:10 [0%], 1:1 [100%], 10:1 [100%]
Cisplatin:Irinotecan	H460	1:10 [100%], 1:1 [56%], 10:1 [100% additiv ^b]
Cisplatin:Irinotecan	MCF-7	1:10 [100%], 1:1 [92%], 10:1 [50%]
Etoposid:Carboplatin	H460	1:10 [55%], 1:1 [76% additiv ^b], 10:1 [0%]
Etoposid:Carboplatin	MCF-7	1:10 [65%], 1:1 [30%], 10:1 [0%]
Carboplatin:Taxol	H460	1:10 [100%], 1:1 [100%], 1:100 [0%]
Carboplatin:Taxol	MCF-7	1:10 [100%], 1:1 [43%], 1:100 [0%]
Taxol:Doxorubicin	H460	1:5 [52%], 1:1 [37% additiv ^b], 1:10 [22%]
Taxol:Doxorubicin	MCF-7	1:5 [70%], 1:1 [100%], 1:10 [63%]
Camptothecin:Taxol	H460	1:1 [0%], 1:10 [100%]
Doxorubicin:Vinorelbin	H460	20:1 [0%], 1:1 [100%]
Cisplatin:Etoposid	H460	50:1 [0%], 1:1 [100%]
Cisplatin:Etoposid	MCF-7	25:1 [0%], 1:1 [100%]
Suramin:Vinorelbin	H460	10:1 [0%], 20.000:1 [72%]
Cisplatin:Edelfosin	H460	10:1 [72%], 1:1 [100%]
Cisplatin:Safingol	H460	1:1 [0%], 0,1:1 [100%]
Cisplatin:Safingol	MCF-7	1:1 [58%], 0,1:1 [100%]
Cisplatin:β-Sitosterol	H460	10:1 [0%], 0,1:1 [100%]
Cisplatin:β-Sitosterol	MCF-7	10:1 [34%], 0,1:1 [100%]
Cisplatin:Suramin	H460	1:100 [37%], 1:40 [0%]
Vinorelbin:Cisplatin	H460	1:500 [0%], 1:200 [8% additiv ^b]
Vinorelbin:Edelfosin	H460	1:10 [0%], 1:1 [0%]

Wirkstoffkombination	Zelllinie	Molverhältnis [% synergistisch oder additiv ^a]
Doxorubicin:Cytosin-Arabinosid	H460	1:0,45 [0%]
Doxorubicin:Methotrexat	H460	1:0,36 [0%]

^a „% synergistisch oder additiv“ wird als der prozentuale Anteil des f_a -Bereichs, der auf einem Diagramm der Form CI gegen affizierter Anteil (f_a), basierend auf dem Chou-Talalay-Verfahren, zwischen f_a -Werten von 0,2 bis 0,8 nicht in den antagonistischen Bereich (CI-Werte > 1,1 sind antagonistisch) fällt, berechnet. Der CI wurde durch Eingeben von Dosis- und f_a -Werten in CalcuSyn gemessen.

^b Der Datensatz für dieses Verhältnis war im „additiven“ Bereich (CI zwischen 0,9 und 1,1).

Beispiel 4

Synergismus von Carboplatin und Daunorubicin

[0180] Die oben angegebene Verfahrensweise zum Messen additiver, synergistischer oder antagonistischer Wirkungen wurde unter Verwendung von Carboplatin/Daunorubicin bei Molverhältnissen von 10:1, 1:1 und 1:10 in H460-Zellen und bei Verhältnissen von 10:1 und 1:1 in MCF-7-Zellen wiederholt. Ein Kombinationsindex wurde für jede Dosis bestimmt, indem CI-gegen- f_a -Kurven erzeugt wurden, wie es oben beschrieben ist, und dann der CI bei f_a -Werten von 0,50, 0,75 und 0,90 bestimmt wurde (um CI-Werte bei ED50, ED75 bzw. ED90 zu erhalten). Die Standardabweichungen wurden mittels des CalcuSyn-Programms berechnet. Wie im eingesetzten Feld von [Fig. 5A](#) gezeigt, zeigen Carboplatin und Daunorubicin bei einem Molverhältnis von 10:1 eine synergistische Wechselwirkung bei ED50-, ED75- und ED90-Werten in MCF-7-Zellen. Wie es in dem eingesetzten Feld von [Fig. 5A](#) weiter gezeigt ist, sind Carboplatin und Daunorubicin bei einem Molverhältnis von 1:1 nach Beurteilung anhand der mittleren CI-Werte bei ED75 und ED90 synergistisch, während sie bei ED50 additiv sind. Bei H460-Zellen enthüllt eine Auftragung des CI-Maximums gegen das Molverhältnis von Carboplatin/Daunorubicin, dass die Wirkstoffe bei einem Molverhältnis von 10:1 synergistisch sind, während bei einem Molverhältnis von 1:1 eine leicht antagonistische Wirkung beobachtet wird. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei einem Verhältnis von 1:10 eine stark antagonistische Wirkung ([Fig. 5A](#)). Die Daten sind in [Fig. 5B](#) auch als CI gegen den Anteil affizierter H460-Zellen aufgetragen worden, um die Wirkung der Konzentration auf die Synergie besser darzustellen. Ein Molverhältnis von 1:1 von Carboplatin/Daunorubicin ist bei Werten für den affizierten Anteil von bis zu 0,42 nicht-antagonistisch. Bei einem Verhältnis von 10:1 wird über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten (größer als 0,2) Synergie beobachtet und ein Verhältnis von 1:10 ist bei allein f_a -Werten antagonistisch. Das eingesetzte Feld von [Fig. 5B](#) zeigt, dass bei einem Verhältnis von 10:1 in H460-Zellen Synergie (nach Beurteilung anhand der mittleren CI-Werte) bei ED50, 75 und 90 beobachtet wird, und bei einem Verhältnis von 1:1 wird Additivität bei der ED50 gezeigt. Bei einem Verhältnis von 1:10 ist Carboplatin/Daunorubicin bei ED50-, 75- und 90-Werten stark antagonistisch. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse würden Carboplatin und Daunorubicin in einem Molverhältnis von 1:10 nicht für weitere Formulierungs- und in vivo-Studien ausgewählt werden, da bei allen gemessenen ED-Werten und über den gesamten f_a -Bereich in den CI-gegen- f_a -Diagrammen Antagonismus beobachtet wird. Für Formulierungs- und Wirksamkeitsstudien werden Molverhältnisse von 10:1 und 1:1 Carboplatin:Daunorubicin gewählt, da die Wirkstoffe bei jedem dieser Verhältnisse synergistische Wirkungen über wenigstens 5% des f_a -Bereichs (bei dem mehr als 1% der Zellen affiziert werden) zeigen.

Beispiel 5

Aufrechterhaltung des Synergismus von Carboplatin und Daunorubicin in vivo

[0181] Carboplatin und Daunorubicin wurden in Molverhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 (Carboplatin/Daunorubicin) in ein einziges cholesterinfreies Liposom co-geladen. DSPC wurde in Chloroform gelöst und DSPG wurde in Chloroform/Methanol/Wasser (50:10:1 Vol/Vol) mit Spuren Mengen an ¹⁴C-CHE gelöst. Die Lösungen wurden in einem Molverhältnis von 80:20 (DSPC/DSPG) kombiniert. Das Lösungsmittel wurde unter einem N₂-Gasstrom entfernt, während die Temperatur bei mehr als 60°C gehalten wurde. Der Lipidfilm wurde dann für 2 Minuten in eine Vakuumpumpe gegeben und nachfolgend in reinem Chloroform erneut gelöst. Das Chloroform wurde dann wie oben entfernt. Die resultierenden Lipidfilme wurden über Nacht unter Vakuum belassen, um jegliches restliches Lösungsmittel zu entfernen, worauf eine Rehydratation in 150 mM CuSO₄, pH 7,4 (pH mit Triethanolamin eingestellt), enthaltend 80 mg/ml Carboplatin mit 4% (V/V) DMSO, um die Carboplatin-Löslichkeit zu erhöhen, folgte. Die resultierenden multilamellaren Vesikel (MLVs) wurden bei 70°C durch zwei gestapelte Filter der Porengröße 80 und 100 nm für eine Gesamtzahl von 10 Passagen extrudiert. Die

Proben wurden unter Verwendung von Tangentialfluss-Dialyse in Kochsalzlösung und dann in 300 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 30 mM EDTA, pH 7,4 (SHE) überführt („exchanged“). Daunorubicin (mit Spuren Mengen an ^3H -Daunorubicin) wurde durch Inkubation bei 60°C für 5 Minuten bei Wirkstoff-zu-Lipid-Verhältnissen zum Erreichen von Carboplatin/Daunorubicin-Molverhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 in die Liposomen geladen. Nachfolgend wurde jede Probe durch Tangentialfluss in Kochsalzlösung umgepuffert. Um das Ausmaß der Wirkstoffbeladung zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen, wurden während der Herstellung der co-beladenen Formulierung die Daunorubicin- und Lipidkonzentrationen mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Die Carboplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Balb/c-Mäusen wurden intravenös 8 mg/kg Carboplatin verabreicht und Daunorubicin wurde bei 1,2 mg/kg, 6 mg/kg und 12 mg/kg für Molverhältnisse von 10:1, 5:1 bzw. 1:1 Carboplatin/Daunorubicin in der co-beladenen Formulierung dosiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Flüssigkeitsszintillationszählung wurde verwendet, um Plasma-Daunorubicin- und -Lipid-Konzentrationen zu quantifizieren; Plasma-Carboplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Für die Quantifizierung mittels Atomabsorptionsspektrometrie wurden die Proben in 0,1% Salpetersäure verdünnt, so dass sie in den linearen Bereich einer Standardkurve fallen.

[0182] Ergebnisse in [Fig. 6](#), in der die mittlere Plasma-Wirkstoffkonzentration (+/- Standardabweichung, SD) zu den spezifizierten Zeiten aufgetragen ist, weisen darauf hin, dass die co-beladenen liposomalen Formulierungen, die Carboplatin und Daunorubicin in einem Molverhältnis von 10:1 enthielten, das Verhältnis der Wirkstoffe nach intravenöser Verabreichung aufrechterhielten, da die molaren Plasmakonzentrationen von Carboplatin in der zehnfachen Konzentration von Daunorubicin vorlagen. Die Ergebnisse in den [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) zeigen, dass Molverhältnisse von Carboplatin zu Daunorubicin von 10:1, 5:1 und 1:1, formuliert in DSPC/DSPG-Liposomen, im Blutkompartiment über den 24-Stunden-Zeitverlauf (3 Mäuse pro Zeitpunkt) nach intravenöser Verabreichung der in diesen Verhältnissen hergestellten Formulierungen aufrechterhalten wurden ([Fig. 7B](#) hebt die anschließend an die Verabreichung der 1:1-Carboplatin/Daunorubicin-Formulierung erhaltenen Ergebnisse deutlicher hervor). Diese Ergebnisse zeigen somit, dass koordinierte bzw. geordnete Freisetzungskinetiken der zwei Wirkstoffe bei einer Vielzahl an Molverhältnissen erreicht werden können.

[0183] Carboplatin und Daunorubicin wurden auch in DSPC/SM/DSPE-PEG2000(90:5:5 mol%)-Liposomen co-formuliert um zu bestimmen, ob auch unter Verwendung dieser Formulierung eine geordnete Freisetzung der Wirkstoffe in vivo erreicht werden könnte. Es wurde ein Molverhältnis von 10:1 gewählt, das in Beispiel 4 als synergistisch bestimmt worden war.

[0184] Lipidfilme (mit Spuren Mengen an ^{14}C -CHE) wurden wie oben beschrieben durch Solubilisieren der Lipide in Chloroform, Entfernen des Chloroforms unter N_2 -Gas und Eingeben der Proben in eine Vakuumpumpe über Nacht hergestellt. Die resultierenden Lipidfilme wurden in 150 mM CuSO_4 , 20 mM Histidin, pH 7,4 (pH mit Triethanolamin eingestellt), enthaltend 40 mg/ml Carboplatin, hydratisiert. MLVs wurden bei 70°C durch zwei gestapelte bzw. geschichtete Filter („stached filters“) mit Porengrößen von 100 nm für eine Gesamtzahl von zehn Passagen extrudiert. Die Proben wurden dann durch Tangentialfluss-Dialyse in 300 mM Saccharose, 20 mM HEPES, pH 7,4 überführt, um nicht-verkapselte Metalllösung (oder Carboplatin) zu entfernen. Die Daunorubicin-Beladung (mit Spurenkonzentrationen an ^3H -Daunorubicin) wurde bei 60°C für 5 Minuten bei einer Wirkstoffkonzentration zum Erreichen eines Molverhältnisses von Carboplatin/Daunorubicin von 10:1 durchgeführt. Um das Ausmaß der Wirkstoffbeladung zu bestimmen, wurden die Daunorubicin- und Lipidkonzentrationen mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen; die Carboplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Männlichen SCID/rag2-Mäusen wurden intravenös 2,25 mg/kg Daunorubicin und 15 mg/kg Carboplatin der in DSPC/SM/DSPE-PEG2000-Liposomen co-geladenen Kombination verabreicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die Plasma-Carboplatin- und Daunorubicin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bzw. Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

[0185] Die in [Fig. 8](#), in der die mittlere Plasma-Wirkstoffkonzentration (+/- Standardabweichung, SD) zu den angegebenen Zeitpunkten aufgetragen ist, angegebenen Ergebnisse enthüllen, dass Carboplatin und Daunorubicin anschließend an die intravenöse Formulierung mit der gleichen Rate aus dem Plasmakompartiment eliminiert wurden, wenn sie in DSPC/SM/DSPE-PEG2000-Liposomen formuliert waren. Carboplatin und Daunorubicin wurden somit in einem Molverhältnis von 10:1 gehalten, da die Plasmakonzentration von Carboplatin (nmol/ml) während des Zeitverlaufs ungefähr das Zehnfache der von Daunorubicin (nmol/ml) betrug. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Vielzahl an Formulierungen eingesetzt werden kann, um die Pharmakokinetiken

von zwei Wirkstoffen, die in einem einzigen Liposom eingekapselt sind, zu ordnen bzw. zu koordinieren, so dass ähnliche pharmakokinetische Freisetzungprofile erhalten werden.

Beispiel 6

Wirksamkeit von liposomalem Carboplatin und Daunorubicin

[0186] DSPC/DSPG-Liposomen (80:20 mol%), co-verkapselt mit Daunorubicin und Carboplatin in einem Molverhältnis von 1:1 (das für die Formulierung in Beispiel 4 gewählt worden war), wurden hergestellt, wie es in Beispiel 5 beschrieben ist, abgesehen davon, dass die Lipidfilme in einer Lösung von 150 mM CuSO_4 , pH 7,4 (pH mit Triethanolamin eingestellt), enthaltend 25 mg/ml Carboplatin, hergestellt wurden. Die Lipidfilme wurden auch erneut gelöst, nachdem sie in Chloroform getrocknet worden waren, um Methanol oder Wasser zu entfernen, und dann wurde das Lösungsmittel entfernt, wie es vorher beschrieben wurde.

[0187] Wie in der Methode von Beispiel 26 wurden Wirksamkeitsstudien durchgeführt, indem zuerst H460-Zellen (1×10^6 Zellen) subkutan in die Flanke weiblicher SCID/rag2-Mäuse inokuliert wurden. Die Tumore wurden bis zu einer Größe von näherungsweise 50 mg ($0,05 \text{ cm}^3$) wachsen gelassen; zu diesem Zeitpunkt (Tag 12) wurden die Formulierungen über die Schwanzvene injiziert. Die Tiere (4 Mäuse pro Gruppe) wurden mit drei Injektionen behandelt, wobei die Injektionen an jedem vierten Tag gegeben wurden (q4d-Zeitplan; an den Tagen 12, 16 und 20). Das Tumorstadium wurde durch direkte Messschieber-Messungen bestimmt. Die Mäuse wurden mit Kochsalzlösung, freiem Wirkstoffcocktail in einem Molverhältnis von 1:1 oder einer liposomalen Formulierung von Carboplatin/Daunorubicin in einem Molverhältnis von 1:1 behandelt. Für sowohl die freie als auch die Liposom-formulierte Behandlung waren die Dosen 6,6 mg/kg Carboplatin und 10 mg/kg Daunorubicin. Die Lipiddosen waren 260 mg/kg Lipid für Liposom-formulierte Proben.

[0188] Die in [Fig. 9](#) dargestellten Ergebnisse (die Punkte stellen mittlere Tumorgöße \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM), bestimmt an dem spezifizierten Tag, dar) zeigen, dass die Verabreichung von liposomalem Carboplatin und Daunorubicin in einem Molverhältnis von 1:1 die Wirksamkeit in Bezug auf freien Wirkstoffcocktail und Kochsalzlösungskontrollen erhöhte.

[0189] Die Wirksamkeit wurde auch in Sphingomyelin enthaltenden Liposomen, die mit Carboplatin und Daunorubicin in einem Molverhältnis von 10:1 (in Beispiel 4 als synergistisch bestimmt) co-beladen waren, untersucht, um zu untersuchen, ob die bei DSPC/DSPG-Liposomen beobachteten starken Verbesserungen der Wirksamkeit auch unter Verwendung dieser Formulierung erreicht werden könnten. Gemäß der in Beispiel 5 dargelegten Verfahrensweise wurden Carboplatin und Daunorubicin in DSPC/SM/DSPE-PEG2000(90:5:5 mol%)-Liposomen co-formuliert, abgesehen davon, dass die Liposomen zehnmal durch ein Filter mit 80 nm und 100 nm Porengröße extrudiert wurden. Vor dem Laden von Daunorubicin wurden die Proben auch durch Dialyse bei konstantem Volumen anstatt Tangentialfluss-Dialyse in SHE-Puffer umgepuffert. Wie in Beispiel 26 dargelegt, wurden H460-Tumor tragenden weiblichen SCID/rag2-Mäusen (4 Mäuse pro Gruppe) 15 mg/kg Carboplatin und 2,25 mg/kg Daunorubicin für den Liposomen-formulierten Wirkstoff und den freien Wirkstoffcocktail an den Tagen 14, 18 und 22 verabreicht. Der liposomale Wirkstoff wurde bei einer Lipiddosis von 375 mg/kg verabreicht.

[0190] Die in [Fig. 10](#) angegebenen Ergebnisse (die Punkte stellen die mittlere Tumorgöße \pm SEM, bestimmt an dem angegebenen Tag, dar) zeigen, dass liposomales Carboplatin und Daunorubicin, eingekapselt in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis von 10:1 in Sphingomyelin enthaltenden Liposomen, eine wesentlich erhöhte Wirksamkeit in Bezug auf Kontrollen, die aus freiem Wirkstoff und Kochsalzlösung bestanden, aufweisen.

Beispiel 7

Synergismus von Cisplatin und Daunorubicin

[0191] Cisplatin/Daunorubicin-Kombinationen wurden unter Verwendung der oben beschriebenen Methoden auf additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen untersucht. Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) zusammengefasst. Wie in [Fig. 11A](#) gezeigt, wurde bei einem Cisplatin/Daunorubicin-Molverhältnis von 10:1 Synergie über den gesamten f_a -Bereich beobachtet, während die Molverhältnisse von 1:1 Antagonismus über den gesamten f_a -Bereich zeigten. [Fig. 11B](#), eine Auftragung des CI-Maximums (CI max) gegen das Cisplatin-zu-Daunorubicin-Verhältnis, erläutert weiterhin die Abhängigkeit des Kombinationsverhältnisses der zwei Mittel vom Kombinationsindex. Diese Ergebnisse zeigen, dass der CI max-Wert bei einem Molverhältnis von 10:1 syner-

gistisch ist, während der CI max-Wert bei Molverhältnissen von 1:1 und 1:10 antagonistisch ist.

Beispiel 8

Aufrechterhaltung des Synergismus von Cisplatin und Daunorubicin in vivo

[0192] Cisplatin und Daunorubicin wurden in einem Molverhältnis von 10:1, das in Beispiel 7 als nicht-antagonistisch identifiziert wurde, in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen co-geladen.

[0193] Cisplatin wurde passiv in Liposomen eingeschlossen, indem zuerst der Wirkstoff (bei 40 mg/ml) in einer Lösung, bestehend aus 150 mM CuCl₂, 20 mM Histidin (pH 7,4, pH mit Triethanolamin eingestellt) plus 4% (V/V) DMSO, solubilisiert wurde und die resultierende Lösung dann auf 80°C erhitzt wurde, um die Löslichkeit von Cisplatin zu erhöhen. Die Cisplatin-Lösung wurde dann bei 80°C zu einem Lipidfilm, bestehend aus DMPC und Cholesterin mit Spurenkonzentrationen von ¹⁴C-CHE, gegeben. Die hydratisierten Lipidfilme wurden bei 80°C durch zwei 100-nm-Filter extrudiert und die Liposomen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei der Abkühlung wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 2000 × g fünf Minuten lang zentrifugiert, um nicht-verkapseltes Cisplatin zu pelletisieren, und der Überstand wurde gesammelt. Die Entfernung überschüssiger Metallionen wurde mittels Passage durch eine Gelfiltrationssäule vom Typ Sephadex G-50 und Sammlung der Liposomenfraktion durchgeführt.

[0194] Die mit Cisplatin beladenen Liposomen wurden weiter mit Daunorubicin (markiert mit Spurenkonzentrationen an ³H-Daunorubicin) bei einem Cisplatin-Daunorubicin-Molverhältnis von 10:1 beladen, indem die Liposomen mit dem Wirkstoff bei 60°C 15 Minuten lang inkubiert wurden. Um das Ausmaß der Wirkstoffbeladung zu bestimmen, wurden die Cisplatin-Konzentrationen mittels Atomabsorptionsspektrometrie und die ³H-Daunorubicin- und Lipid-Konzentrationen mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

[0195] Um festzustellen, ob durch diese Formulierung eine geordnete bzw. koordinierte Freisetzung erreicht wurde, wurden die beladenen Liposomen in die Schwanzvene männlicher SCID/rag2-Mäuse bei 5,0 mg/kg Cisplatin und 1,0 mg/kg Daunorubicin pro Maus injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in mit EDTA beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die liposomalen Lipid- und Daunorubicin-Konzentrationen in Plasma wurden beide mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt und die Cisplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen.

[0196] Die in [Fig. 12](#) dargestellten Ergebnisse (die Punkte stellen die mittlere Wirkstoffkonzentration in Plasma +/- SD, bestimmt zu dem angegebenen Zeitpunkt, dar) weisen darauf hin, dass eine koordinierte Freisetzung von Daunorubicin und Cisplatin erreicht wurde, da die Konzentrationen im Plasma (µmol/ml) zu den Zeitpunkten, an denen die Messungen durchgeführt wurden, in einem Molverhältnis von 10:1 aufrechterhalten wurden.

[0197] Obwohl Liposomen durch das oben beschriebene Verfahren mit Cisplatin und Daunorubicin co-beladen werden können, können andere Techniken eingesetzt werden, um die Wirkstoffe in ein einziges Liposom zu laden. Ein alternatives Verfahren setzt die Verwendung eines pH-Gradienten zum Laden von Daunorubicin nach passivem Einschließen von Cisplatin zusammen mit Citrat, pH 4,0, und Erstellung eines pH-Gradienten über die Membran hinweg durch Pufferaustausch, ein. Diese Technik kann wie folgt durchgeführt werden: Lipidfilme bestehend aus DSPC/Chol (55:45 mol%) werden wie oben beschrieben zusammen mit Spurenmenngen an ³H-CHE hergestellt. Eine Cisplatin-Lösung wird durch Auflösen von Cisplatin-Pulver in 150 mM NaCl und 150 mM Citrat (pH 4) hergestellt. Um die Löslichkeit von Cisplatin in dem Puffer zu maximieren, wird die Lösung auf 65°C erhitzt und zu den Lipidfilmen gegeben. Die resultierenden MLVs werden bei 65°C durch zwei Filter mit einer Porengröße von 100 nm für eine Gesamtzahl von 10 Passagen filtriert. Nichtverkapseltes Cisplatin wird dann durch Zentrifugation der Lösung bei 2000 × g für 10 Minuten aus der Formulierung entfernt. Der resultierende Überstand, der liposomales Cisplatin enthält, wird durch eine Säule vom Typ Sephadex G-50 hindurchgeleitet, die mit 150 mM NaCl und 20 mM HEPES (pH 7,4) voräquilibriert ist, um jegliches restliches nicht-eingeschlossenes Cisplatin zu entfernen und um einen pH-Gradienten über die Doppelschicht hinweg zu etablieren.

[0198] Nachfolgend wird Daunorubicin in die Liposomen geladen, indem die Liposomen zuerst bei 60°C fünf Minuten lang inkubiert werden, um ein thermisches Gleichgewicht bzw. eine thermische Äquilibration zu erreichen, und dann wird Daunorubicin in einem Wirkstoff/Lipid-Molverhältnis von 0,1:1 zu der Lipidformulierung zugegeben, während eine Vortex-Behandlung erfolgt. Um das Ausmaß der Wirkstoffbeladung zu verschiede-

nen Zeitpunkten zu bestimmen, wird die Konzentration von Daunorubicin durch Solubilisieren der Liposomen mit OGP und Messen der Absorption von Daunorubicin bei 480 nm bestimmt. Die Cisplatin-Konzentration der Formulierung wird unter Verwendung von Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Die Lipidkonzentrationen werden mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

[0199] Ein alternatives Mittel zum Koordinieren der Freisetzungskinetiken der zwei Wirkstoffe kann erreicht werden, indem jeder Wirkstoff in einem separaten Träger formuliert wird. Dies wurde durch Formulierung von Cisplatin in DMPC/Cholesterin-Liposomen und von Daunorubicin in DSPC/DSPE-PEG2000-Liposomen und intravenösem Verabreichen dieser an Mäuse in einem Molverhältnis von 10:1 gezeigt.

[0200] Liposomales Cisplatin wurde hergestellt, indem zuerst Cisplatin (8,5 mg/ml) in 150 mM NaCl bei 80°C gelöst wurde. Diese Lösung wurde dann zu einem DMPC/Cholesterin(55:45 mol%)-Lipidfilm, enthaltend Spuren Mengen an ^3H -CHE, gegeben und hydratisieren gelassen. Die resultierenden MLVs wurden bei 80°C durch zwei Filter mit 100 nm Porenweite extrudiert und die Liposomen wurden nachfolgend durch Tangentialfluss-Dialyse in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,4) (HBS) überführt, um überschüssige Metallionen zu entfernen. Die Liposomen wurden zentrifugiert, um nach der Extrusion jegliches nicht-verkapseltes Cisplatin zu pelletisieren. Die Cisplatin-Konzentration wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und die Lipidkonzentrationen wurden mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

[0201] Liposomales Daunorubicin wurde durch Hydratisierung eines Lipidfilms, bestehend aus DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 mol%) und Spuren Mengen an ^{14}C -CHE, mit einer Lösung von 300 mM CuSO_4 hergestellt. Die resultierenden MLVs wurden bei 70°C für zehn Passagen durch zwei gestapelte Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert. Nach der Extrusion wurden die Liposomen durch Tangentialfluss-Dialyse in HBS (pH 7,4) überführt. Das Laden von Daunorubicin (mit Spurenkonzentrationen von ^3H -Daunorubicin) wurde durch Zugabe von Daunorubicin bis zu einem endgültigen Wirkstoff/Lipid-Gewichtsverhältnis von 0,1 und Halten der Lösung bei 60°C für 10 Minuten gestartet. Das Ausmaß der Wirkstoffbeladung wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt, um ^3H -Daunorubicin- und ^{14}C -CHE-Konzentrationen zu messen.

[0202] Männlichen SCID/rag2-Mäusen wurde intravenös liposomales Cisplatin in einer Wirkstoffdosis von 2 mg/kg und liposomales Daunorubicin in einer Wirkstoffdosis von 0,375 mg/kg injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die Plasma-Cisplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und die Daunorubicin-Konzentrationen wurden mittels Szintillationszählung bestimmt.

[0203] Die in [Fig. 13](#) gezeigten Ergebnisse (die Punkte stellen mittlere Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt in Plasma, +/- SD zu den spezifizierten Zeitpunkten dar) zeigen, dass Cisplatin und Daunorubicin, formuliert in separaten Liposomen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Verabreichung in einem Molverhältnis von 10:1 gehalten wurden.

Beispiel 9

Wirksamkeit von liposomalem Cisplatin und Daunorubicin

[0204] Die Wirksamkeit von Cisplatin und Daunorubicin, formuliert mit separaten Liposomen, wurde in SCID/rag2-Mäusen (H460-Xenotransplantatmodell) bestimmt, wie in Beispiel 26 ausgeführt. H460-Tumor-tragende Mäuse (4 Mäuse pro Gruppe) wurden mit Kochsalzlösung oder mit Cisplatin/Daunorubicin in einem Molverhältnis von 10:1, das in vitro in Beispiel 7 als nicht-antagonistisch identifiziert worden war, behandelt. Cisplatin und Daunorubicin wurden in DMPC/Chol(55:45 mol%)- bzw. DSPC/DSPE-PEG2000(95:5 mol%)-Liposomen formuliert, wie es in Beispiel 8 angegeben ist, abgesehen davon, dass die DMPC/Chol-Liposomen nach der Extrusion gegen HBS dialysiert wurden. Mit der Wirkstoffkombination behandelte Tiere erhielten die Mittel entweder als einen Cocktail der freien Mittel (Cocktail; 10:1, Molverhältnis) oder durch Co-Verabreichung von liposomalem Daunorubicin und liposomalem Cisplatin (Liposomenformulierung; Molverhältnis von 10:1) an den Tagen 14, 17 und 21. Bei den freien als auch bei den formulierten Behandlungen waren die Dosen 2,0 mg/kg Cisplatin und 0,375 mg/kg Daunorubicin. Die Lipiddosen waren 400 mg/kg für liposomales Cisplatin und 3,75 mg/kg für liposomales Daunorubicin.

[0205] [Fig. 14](#) zeigt die Ergebnisse, wobei jeder Datenpunkt die mittlere Tumorgöße +/- SEM, die an dem spezifizierten Tag bestimmt wurde, darstellt. Die Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) inhibierte das Tumorstadium nicht; gleichermaßen zeigte der freie Cocktail (gefüllte umgekehrte Dreiecke) nur eine leichte

Wirkung auf das Tumorwachstum. Im Vergleich dazu inhibierte die liposomale Formulierung (ungefüllte Dreiecke) das Tumorwachstum über einen Zeitraum von wenigstens 32 Tagen.

Beispiel 10

Wirkung der liposomalen Verabreichung einer Wirkstoffkombination in einem antagonistischen Molverhältnis

[0206] Cisplatin und Daunorubicin wurden in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen in einem Molverhältnis von 1:1 co-geladen, das in Beispiel 7 als antagonistisch bestimmt worden war. Cisplatin wurde passiv eingeschlossen und Daunorubicin wurde aktiv eingeschlossen, um ein Cisplatin/Daunorubicin-Molverhältnis von 1:1 zu erreichen. Die in Beispiel 8 dargelegte Verfahrensweise wurde eingesetzt, um die Wirkstoffe in ein einziges Liposom zu laden.

[0207] Um festzustellen, ob durch Formulierung in DMPC/Chol-Liposomen eine koordinierte Freisetzung erreicht wurde, wurden die beladenen Liposomen bei 2 mg/kg Cisplatin und 3,75 mg/kg Daunorubicin in die Schwanzvene von Balb/c-Mäusen injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die Lipid- und Daunorubicin-Plasmakonzentrationen wurden beide mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt und die Cisplatin-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Die in [Fig. 15](#) zusammengefassten Ergebnisse (Datenpunkte stellen die mittleren Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt in Plasma, \pm SD zu den spezifizierten Zeitpunkten dar) zeigen, dass Daunorubicin und Cisplatin mit der gleichen Rate bzw. Geschwindigkeit aus dem Plasma eliminiert wurden, somit wurden die Konzentrationen in Plasma (nmol/ml) in einem Molverhältnis von 1:1 aufrechterhalten (siehe eingesetztes Feld in [Fig. 15](#)).

[0208] Wirksamkeitsstudien wurden durchgeführt, wie es in Beispiel 26 beschrieben ist, wobei H460-Tumor-tragende weibliche SCID/rag2-Mäuse Dosen von 2,5 mg/kg Cisplatin, 4,7 mg/kg Daunorubicin, entweder im Cocktail oder in liposomaler Formulierung, und 52,83 mg/kg Lipid an den Tagen 11, 15 und 19 erhielten.

[0209] Die Wirksamkeitsergebnisse in [Fig. 16](#) (Datenpunkte stellen die mittlere Tumorgroße \pm SEM, bestimmt an dem spezifizierten Tag, dar) zeigen, dass die Behandlung mit Daunorubicin und Cisplatin bei einem antagonistischen Verhältnis beim Verringern des Tumorwachstums unwirksam ist, im Vergleich zu Ergebnissen bei einem nicht-antagonistischen Verhältnis (Molverhältnis von 10:1) der Mittel, bei dem das Tumorwachstum wesentlich inhibiert war (siehe [Fig. 14](#)). Diese Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung der Auswahl von Wirkstoffkombinationen in Verhältnissen, die nicht-antagonistische Wirkungen über einen Konzentrationsbereich in vitro aufweisen. Es sollte bemerkt werden, dass die in [Fig. 16](#) verwendeten Wirkstoffdosen (2,5 mg/kg Cisplatin und 4,7 mg/kg Daunorubicin) tatsächlich höher sind als jene, die in [Fig. 14](#) verwendet wurden (2 mg/kg Cisplatin, 0,375 mg/kg Daunorubicin).

Beispiel 11

Synergismus von Cisplatin und Topotecan

[0210] Die oben angegebene Verfahrensweise (siehe Beispiel 1) zur Bestimmung synergistischer, additiver oder antagonistischer Wirkungen wurde unter Verwendung von Cisplatin/Topotecan, sowohl bei einem Molverhältnis von 10:1 als auch bei einem Molverhältnis von 1:1, wiederholt. Wie in [Fig. 17A](#) gezeigt, hat Cisplatin/Topotecan bei einem Molverhältnis von 10:1 eine nicht-antagonistische Wechselwirkung über einen breiten Bereich von Dosierungen, die 5% bis 99% der Zellen affizieren ($f_a = 0,05$ bis $f_a = 0,99$). Im Gegensatz dazu war Cisplatin/Topotecan bei einem Molverhältnis von 1:1 über den gleichen f_a -Bereich stark antagonistisch ([Fig. 17A](#)).

[0211] Diese Wirkung der Konzentration wurde auch durch Berechnung eines CI-Maximums für verschiedene Molverhältnisse von Cisplatin/Topotecan belegt. Wie in [Fig. 17B](#) gezeigt, scheint eine antagonistische Wirkung bei einem Molverhältnis von 1:1 maximiert zu sein und nicht-antagonistische Wirkungen sind offensichtlich, wenn einer der Wirkstoffe im Überschuss vorliegt.

Aufrechterhaltung des Synergismus von Cisplatin und Topotecan in vivo

[0212] Cisplatin und Topotecan wurden in DMPC/Chol- bzw. DSPC/Chol-Liposomen formuliert und in einem Molverhältnis von 10:1, das in Beispiel 11 als synergistisch identifiziert worden war, intravenös in Mäuse injiziert.

[0213] Liposomales Cisplatin wurde durch Hydratisierung eines Lipidfilms, bestehend aus DMPC und Cholesterin (55:45 mol%), mit einer Lösung, bestehend aus 150 mM NaCl und 8,5 mg/ml Cisplatin, hergestellt. Die resultierenden MLVs wurden bei 80°C durch 10 Passagen durch zwei gestapelte Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert. Nach der Extrusion wurde die Probe abgekühlt und präzipitiertes Cisplatin wurde durch Zentrifugation entfernt. Das zurückbleibende lösliche Cisplatin, das nicht in den Liposomen verkapselt war, wurde durch Dialyse gegen HBS entfernt. Nach der Entfernung von nicht-verkapseltem Cisplatin wurde die Konzentration des Wirkstoffs durch Atomabsorptionsspektrometrie gemessen.

[0214] Liposomales Topotecan wurden durch Hydratisierung eines Lipidfilms, bestehend aus DSPC und Cholesterin (55:45 mol%), mit einer 300 mM MnSO_4 -Lösung hergestellt. Die resultierenden MLVs wurden bei 65°C durch zehn Passagen durch zwei gestapelte 100-mM-Filter extrudiert. Nach der Extrusion wurden die Liposomen durch Gelfiltrationschromatographie in SHE-Puffer (300 mM Saccharose, 20 mM HEPES und 30 mM EDTA, pH 7,4) umgepuffert. Das Laden von Topotecan wurde durch die Zugabe von 1 µg A23187/µmol Lipid (A23187 ist ein kationischer Ionophor, der den Austausch eines zweiwertigen Metallions gegen zwei Protonen über eine Doppelschicht hinweg vermittelt) und Topotecan bis zu einem endgültigen Topotecan/Lipid-Verhältnis von 0,08 (G/G) und dann Halten der Lösung bei 65°C für 15 Minuten gestartet. Das Ausmaß der Topotecan-Beladung wurde dann durch die Absorption bei 380 nm nach der Abtrennung von verkapseltem und nicht-verkapseltem Wirkstoff unter Verwendung von Gelfiltrationschromatographie und Solubilisierung in Triton X-100 gemessen.

[0215] Die Zubereitungen wurden intravenös über die Schwanzvene in weibliche SCID/rag2-Mäuse injiziert. Die Dosen der liposomalen Formulierungen waren 5 mg/kg Cisplatin und 0,758 mg/kg Topotecan. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Flüssigkeitsszintillationszählung wurde verwendet, um radioaktiv markiertes Lipid zu quantifizieren. Cisplatin wurde unter Verwendung von Atomabsorptionsspektrometrie gemessen, während Topotecan mittels Fluoreszenzspektroskopie (Anregung bei 380 nm und Emission bei 518 nm) nach Zerstörung bzw. Aufbrechen der Liposome mit einem Überschuss an Detergenz gemessen wurde.

[0216] [Fig. 18](#) (Datenpunkte stellen mittlere Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt in Plasma, +/- SD zu den spezifizierten Zeitpunkten dar) zeigt, dass die Plasmakonzentrationen von Cisplatin und Topotecan in einem Molverhältnis von 10:1 aufrechterhalten wurden, da die Plasmakonzentrationen von Cisplatin zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung ungefähr das Zehnfache derjenigen von Topotecan waren, wenn sie in den obenstehend beschriebenen Liposomen abgegeben wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkstoffretentions- und Liposomeneliminierungsscharakteristiken der zwei verkapselten Wirkstoffe in zwei verschiedenen Liposomen koordiniert werden können, so dass koordinierte Wirkstoffeliminierungsraten realisiert werden. Das eingesetzte Feld von [Fig. 18](#) zeigt, dass die nach intravenöser Verabreichung in Plasma vorliegenden Cisplatin-zu-Topotecan-Molverhältnisse (+/- SD) über die Zeit hinweg nur wenig variieren.

[0217] Cisplatin und Topotecan können auch in einem einzigen Liposom formuliert werden, um sicherzustellen, dass nicht-antagonistische Verhältnisse in vivo aufrechterhalten werden. Dies kann durch passiven Einschluss von Cisplatin, gefolgt von Ionophor-vermitteltem Laden von Topotecan, durchgeführt werden. Zuerst wird eine Cisplatin-Lösung hergestellt, indem Cisplatin-Pulver in einer 150 mM MnCl_2 -Lösung aufgelöst wird. Um die Löslichkeit von Cisplatin in der MnCl_2 -Lösung zu maximieren, wird die Lösung auf 65°C erhitzt. Ein Lipidfilm, bestehend aus DSPC/Chol (55:45 mol%) zusammen mit Spuren Mengen an ^3H -CHE, wird mit der Cisplatin/ MnCl_2 -Lösung hydratisiert. Die resultierenden MLVs werden bei 65°C für eine Gesamtzahl von 10 Passagen durch zwei 100 nm-Filter extrudiert. Unlösliches Cisplatin wird dann durch Abkühlung der Formulierung auf Raumtemperatur und Zentrifugieren der Lösung bei $2.000 \times g$ aus der Formulierung entfernt. Der resultierende Überstand, der liposomales und lösliches, aber nicht-verkapseltes, Cisplatin enthält, wird über Nacht bei Raumtemperatur gegen SHE-Puffer, 300 mM Saccharose, 20 mM HEPES und 30 mM EDTA (pH 7,4) dialysiert.

[0218] Nachfolgend wird Topotecan unter Verwendung eines Ionophor-vermitteltem Protonengradienten in die Liposome geladen. Die Wirkstoffaufnahme wird durchgeführt bei einem Wirkstoff-zu-Lipid-Gewichtsverhältnis von 0,08:1 (G/G). Der zweiwertige Kationenionophor A23187 (1 µg Ionophor/µmol Lipid) wird zu den Liposomen gegeben und das Gemisch wird dann 15 Minuten lang bei 60°C inkubiert, um den Einbau von A23187 in die Doppelschicht zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. Nachfolgend wird Topotecan zugegeben und das Gemisch wird 60 Minuten lang bei 60°C inkubiert, um die Wirkstoffaufnahme zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. Nicht-verkapseltes Topotecan und A23187 werden durch Dialysieren der Probe gegen 300 mM Saccharose aus der Zubereitung entfernt. Das Ausmaß der Topotecan-Beladung wird mittels Messung der Absorption bei 380 nm quantifiziert. Die Cisplatin-Konzentrationen werden mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen und die Lipidkonzentrationen durch Flüssigkeit-szintillationszählung.

Beispiel 13

Wirksamkeit von liposomalen Cisplatin und Topotecan

[0219] Die Wirksamkeit von in separate Liposomen geladenem Cisplatin und Topotecan wurde durch Formulieren der zwei Wirkstoffe in separaten Liposomen und Verabreichen der Formulierung in einem Molverhältnis von 10:1, das in Beispiel 11 als nicht-antagonistisch identifiziert wurde, untersucht. Liposomales Cisplatin wurde passiv in DMPC/Chol-(55:45 mol%)-Liposomen eingeschlossen, wie es in der Verfahrensweise von Beispiel 12 beschrieben ist. Topotecan wurde in DSPC/Chol (55:45 mol%) formuliert, wie es ebenfalls in Beispiel 12 beschrieben ist, abgesehen davon, dass die Beladung von Topotecan bis zu einem endgültigen Topotecan/Lipid-Gewichtsverhältnis von 0,1 (G/G) erfolgte. Anschließend an die Beladung wurde der äußere Puffer gegen HBS ausgetauscht.

[0220] Wirksamkeitsstudien wurden durchgeführt, wie es in Beispiel 26 ausgeführt ist, wobei H460-Tumor-tragende weibliche SCID/rag2-Mäuse (4 Mäuse pro Gruppe) intravenös (an Tagen 13, 17, 21) mit Kochsalzlösung (Kontrolle), freiem Cocktail oder einem liposomalen Gemisch von Cisplatin/Topotecan in einem Molverhältnis von 10:1, das in Beispiel 11 als nicht-antagonistisch identifiziert worden war, behandelt wurden. Die Dosen waren sowohl für die freien als auch die Liposomen-formulierten Behandlungen 1,6 mg/kg Cisplatin und 0,25 mg/kg Topotecan. Die Lipiddosen waren 250 mg/kg aus der Cisplatin-Formulierung plus 2,5 mg/kg aus den Topotecan-Formulierungen.

[0221] [Fig. 19](#) zeigt die Ergebnisse (Datenpunkte stellen die mittlere Tumorgroße \pm SEM, bestimmt an dem spezifizierten Tag, dar). Die Kochsalzlösungskontrolle (gefüllte Kreise) und der Cocktail aus Cisplatin/Topotecan 10:1 (gefüllte Dreiecke) brachten das Tumolvolumen nicht wirksam zum Stillstand. Die liposomale Zubereitung von Cisplatin/Topotecan 10:1 (ungefüllte Dreiecke) beugte jedoch der Erhöhung des Tumolvolumens für eine Zeitdauer von wenigstens 35 Tagen vor.

Beispiel 14

Synergismus von Cisplatin und Irinotecan

[0222] Kombinationen von Cisplatin und Irinotecan in Molverhältnissen von 1:1, 10:1, 1:5 und 1:10 wurden auf Synergie, Additivität oder Antagonismus gemäß den oben beschriebenen Methoden (siehe Beispiel 1) untersucht. Die in [Fig. 20A](#) zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Molverhältnisse von 10:1, 1:5 und 1:10 über den gesamten Bereich der f_a -Werte nicht-antagonistisch waren, während ein Verhältnis von 1:1 über einen wesentlichen Bereich der f_a -Werte antagonistisch war. [Fig. 20B](#) illustriert ferner die Abhängigkeit des Verhältnisses von der Natur der Kombinationswirkung, wie es durch Auftragung des Kombinationsindex-Maximums gegen das Cisplatin-zu-Irinotecan-Molverhältnis zusammengefasst wird.

Beispiel 15

Aufrechterhaltung des Synergismus von Cisplatin und Irinotecan in vivo

[0223] Cisplatin und Irinotecan wurden in DSPC/DSPG(80:20 mol%)-Liposomen co-geladen, die hergestellt wurden, wie es in Beispiel 5 beschrieben ist, abgesehen davon, dass die Lipidfilme in 225 mM Kupfer (75 mM CuCl_2 , 150 mM CuSO_4 , Triethanolamin (TEA), pH 6,8), enthaltend 6,0 mg/mL Cisplatin, rehydratisiert wurden. Die liposomale Cisplatin-Konzentration nach Extrusion und Entfernung von nicht-verkapseltem Wirkstoff war 0,025 mol Cisplatin/mol Lipid. Die resultierenden Liposomen wurden über Nacht gegen SHE, pH 6,8, dialysiert. Dann wurde Irinotecan zu der Zubereitung zugegeben und die Liposomen wurden bei 45°C 1,5 Std. lang inku-

biert. Die Liposomen luden 60% des zugegebenen Irinotecans auf, wie mittels HPLC festgestellt wurde. Die Liposomen wurden dann durch Tangentialfluss in 0,9% Kochsalzlösung umgepuffert. Nach dem Tangentialfluss behielten die Liposomen näherungsweise 80% des ursprünglichen Cisplatin und Irinotecans zurück. Die Untersuchung von Cisplatin und Irinotecan, bestimmt mittels Atomabsorptionsspektrometrie bzw. HPLC-Untersuchung, zeigte an, dass die endgültige Zubereitung ein Cisplatin-zu-Irinotecan-Molverhältnis von 1:3 hatte. SCID/rag2-Mäusen wurden intravenös 2 mg/kg Cisplatin und 38,6 mg/kg Irinotecan verabreicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die Plasma-Irinotecan- und Cisplatin-Konzentrationen wurden mittels HPLC bzw. Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

[0224] Die Ergebnisse in [Fig. 21](#) (Datenpunkte stellen die mittleren Wirkstoffkonzentrationen, bestimmt in Plasma, +/- SD zu den spezifizierten Zeitpunkten dar) zeigen, dass nach der intravenösen Injektion von Formulierungen, die Cisplatin und Irinotecan co-geladen in DSPC/DSPG-Liposomen, enthalten, die Raten der Wirkstoffelimination vergleichbar waren und nicht-antagonistische molare Wirkstoffverhältnisse über den 24-Stunden-Zeitverlauf nach der Verabreichung aufrechterhalten werden konnten.

[0225] Eine koordinierte Freisetzung von liposomalen Cisplatin und Irinotecan in vivo wurde auch durch Formulieren der zwei Wirkstoffe in separaten Abgabehikeln und Verabreichen der Wirkstoffe in einem Molverhältnis von 1:5 (Cisplatin/Irinotecan) erreicht.

[0226] Liposomales Cisplatin wurde gemäß der oben beschriebenen passiven Beladungstechnik hergestellt. Lipidfilme, bestehend aus DMPC/Chol (55:45 mol%), wurden mit einer 150 mM NaCl-Lösung, enthaltend 8,5 mg/mL Cisplatin, hydratisiert, dann wie oben beschrieben extrudiert. Die Liposomen wurden wie oben nach Zentrifugation im Überstand gesammelt, dann durch Tangentialfluss-Dialyse in HBS überführt.

[0227] Liposomales Irinotecan wurde durch Hydratisieren von Lipidfilmen, bestehend aus DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 mol%) mit einer Lösung, bestehend aus 150 mM CuCl₂, 20 mM Histidin, pH 6,8 (pH mit TEA eingestellt), hergestellt. Die resultierenden MLVs wurden bei 65°C durch zwei gestapelte Filter mit einer 100 nm-Porengröße extrudiert und durch Tangentialfluss in HBS umgepuffert. Die extrudierten Liposomen wurden bei einem 0,1:1 Wirkstoff-zu-Lipid-Gewichtsverhältnis 1 Minute lang bei 60°C mit Irinotecan beladen. Das Ausmaß der Beladung mit Irinotecan wurde über die Absorption bei 370 nm nach Solubilisierung in Triton X-100 bestimmt; die Lipidkonzentrationen wurden mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

[0228] Liposomales Cisplatin wurde an männliche SCID/rag2-Mäusen bei einer Wirkstoffdosis von 2,0 mg/kg verabreicht und liposomales Irinotecan wurde den Mäusen bei 20 mg/kg verabreicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Die Plasma-Irinotecan-Konzentrationen wurden mittels HPLC gemessen und Cisplatin wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen.

[0229] Cisplatin und Irinotecan, zusammen in diesen liposomalen Formulierungen in diesem synergistischen Verhältnis (Molverhältnis von 1:5) verabreicht, halten dieses Verhältnis nach der intravenösen Verabreichung bei 1:5, was dadurch festgestellt wurde, dass die Plasmakonzentrationen von Irinotecan (nmol/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten ungefähr das Fünffache der von Cisplatin (nmol/ml) waren ([Fig. 22](#)).

Beispiel 16

Wirksamkeit von liposomalem Cisplatin und Irinotecan

[0230] Wirksamkeitsstudien wurden an liposomalem Cisplatin und Irinotecan, die in separaten Liposomen formuliert waren, durchgeführt. Cisplatin wurde passiv in DMPC/Chol(55:45 mol%)-Liposomen eingeschlossen und Irinotecan wurde in DSPC/DSPE-PEG2000(95:5 mol%)-Liposomen geladen, wie es in Beispiel 5 angegeben ist. Liposomales Cisplatin und Irinotecan wurden H460-Tumor-tragenden SCID/rag2-Mäusen gemäß den in Beispiel 26 beschriebenen Methoden in einem Molverhältnis von 1:5 verabreicht, das in Beispiel 14 als nicht-antagonistisch bestimmt worden war. Liposomales Cisplatin und Irinotecan wurden (4 Mäuse pro Gruppe an den Tagen 14, 18 und 22) in dem nicht-antagonistischen Molverhältnis von 1:5 bei Dosen von 1 mg/kg Cisplatin, 10 mg/kg Irinotecan und 130 mg/kg Lipid (ungefüllte Quadrate); 2,5 mg/kg Cisplatin, 25 mg/kg Irinotecan und 175 mg/kg Lipid (ungefüllte aufrechte Dreiecke) oder 5 mg/kg Cisplatin, 50 mg/kg Irinotecan und 250 mg/kg Lipid (ungefüllte umgekehrte Dreiecke) verabreicht. Freies Cisplatin/Irinotecan wurde zu 1 mg/kg Ci-

splatin und 10 mg/kg Irinotecan dosiert, was ein Molverhältnis von 1:5 (gefüllte Quadrate) widerspiegelt.

[0231] [Fig. 23](#) (Datenpunkte stellen die mittlere Tumorgröße \pm SEM, bestimmt an dem spezifizierten Tag, dar) stellt dar, dass das Tumorwachstum für die liposomalen Zubereitungen in Bezug auf mit dem freien Wirkstoffcocktail und Kochsalzlösung behandelte Mäuse wesentlich unterdrückt war.

Beispiel 17

Synergismus von Wirkstoff- und Lipidkombinationen

[0232] Kombinationen, die Vinorelbin in einem Molverhältnis von 1:1 mit verschiedenen potentiell therapeutischen Lipiden, die in die Lipiddoppelschicht eingebaut bzw. eingearbeitet sind, wie zum Beispiel POPS (umgekehrte Dreiecke), DPPS (aufrechte Dreiecke), DLPS (Kreise), DSPS (Rauten) oder DOPS (Quadrate), umfassen, wurden unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens (siehe Beispiel 1) auf additive, synergistische oder antagonistische Wirkung untersucht.

[0233] Die Ergebnisse in [Fig. 24](#) zeigen, dass alle an H460-Zellen untersuchten Kombinationen von Vinorelbin und Lipiden Synergie über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten aufweisen. Insbesondere weisen die Kombinationen von Vinorelbin mit DLPS, DSPS und DOPS Synergie bei der Mehrheit der f_a -Werte, am bemerkenswertesten zwischen $f_a = 0,2$ und $f_a = 0,8$, auf.

Beispiel 18

Pharmakokinetiken von liposomalem Vinorelbin und Phosphatidylserin

[0234] Liposomen, die aus SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 (35:45:10:10 mol%) bestehen, wurden hergestellt und mit Vinorelbin beladen, wie folgt:

Lipide wurden zu 100 mg/ml in Chloroform gelöst und dann in den entsprechenden Mengen kombiniert. Die Ausnahme dazu ist DPPS, das zu 25 mg/ml unter Verwendung von CHCl_3 /Methanol/ H_2O /Zitratpuffer (20:10,5:1:1 V/V) gelöst wurde. Spuren Mengen des radioaktiven Lipids ^3H -CHE wurden zu diesem Zeitpunkt zugegeben, um das Lipid über den Formulierungsprozess zu verfolgen. Das Chloroform wurde unter einem N_2 -Gasstrom entfernt, bis sehr wenig Lösungsmittel verblieb. Die resultierenden Lipidfilme wurden über Nacht unter Vakuum belassen, um jegliches restliches Lösungsmittel zu entfernen. Die Lipidfilme wurden in Citratpuffer (300 mM, pH 4,0) rehydratisiert und die resultierenden MLVs wurden bei 65°C für eine Gesamtzahl von 10 Passagen durch zwei Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert.

[0235] Vinorelbin wurde in diese Formulierung geladen, wobei das pH-Gradienten-Beladungsverfahren durch Herauftitrieren des pHs des äußeren Puffers unter Verwendung von 0,2 M Na_2HPO_4 verwendet wurde. Eine bekannte Menge Liposomen wurde mit der entsprechenden Menge Vinorelbin (Wirkstoff/Lipid-Gewichtsverhältnis (G/G) von 0,1) kombiniert und bei 60°C 15 Minuten lang inkubiert. Um einen pH-Gradienten zu etablieren, wurde das zehnfache Volumen des Citratpuffers an 0,2 M Na_2HPO_4 zugegeben. Vinorelbin wurde in die Liposomen geladen, um ein Vinorelbin/Phosphatidylserin-Molverhältnis zu erreichen, das in Beispiel 17 als nicht-antagonistisch identifiziert worden war.

[0236] Das Detergenz OGP wurde verwendet, um die Vinorelbin-beladenen Liposomen zu solubilisieren; die Wirkstoffkonzentrationen wurden über die Absorption bei 270 nm gemessen und Flüssigkeitsszintillationszählung wurde verwendet, um Lipid zu quantifizieren.

[0237] Die resultierenden Vinorelbin-beladenen Liposomen und freies Vinorelbin wurden SCID/rag2-Mäusen in einer Wirkstoffdosis von 10 mg/kg intravenös verabreicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobehälter gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen transferiert. Das Blut wurde unter Verwendung von Szintillationszählung auf verbleibenden liposomalen ^3H -CHE-Marker untersucht. Die Plasmakonzentrationen von Vinorelbin wurden mittels HPLC untersucht.

[0238] Die [Fig. 25A](#) und [Fig. 25B](#) zeigen, dass SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000-Liposomen, die Vinorelbin einkapseln, wesentlich erhöhte Plasma-Wirkstoffkonzentrationen in Bezug auf die Verabreichung von freiem Vinorelbin aufweisen. Die mittlere Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,112 $\mu\text{g h/ml}$ für freies Vinorelbin wurde durch die Formulierung in den Liposomen auf 125,3 $\mu\text{g h/ml}$ erhöht, was eine 1.120-fache Erhöhung der mittleren AUC darstellt.

Beispiel 19

Wirksamkeit von liposomalem Phosphatidylserin und Vinorelbin in dem humanen H460-Lungenkrebsmodell („H460 human lung cancer model“)

[0239] DSPC/Chol/DSPS/DSPE-PEG2000(33:45:10:10 mol%)-, SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000(35:45:10:10 mol%)- und DAPC/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000(35:45:10:10 mol%)-Liposomen wurden hergestellt und mit Vinorelbin beladen, wie in Beispiel 18 beschrieben. Phosphatidylserin und Vinorelbin lagen in den Liposomen in einem nicht-antagonistischen Molverhältnis (1:1) vor. Wirksamkeitsstudien wurden in dem humanen H460-Lungenkrebsmodell durchgeführt, wie in Beispiel 26 beschrieben.

[0240] [Fig. 26](#) zeigt für H460-Tumor-tragende Mäuse (4 Mäuse pro Gruppe), die intravenöse Verabreichung von Liposomen, bestehend aus DSPC/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 und SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 und verkapseltem Vinorelbin, erhielten, dass die Behandlung verringerte Tumorstadiumsraten relativ zu jenen, die nach Behandlung mit freiem Vinorelbin und Kochsalzlösung beobachtet wurden, erzeugte. Freies Vinorelbin wurde bei 5 mg/kg verabreicht und liposomales Vinorelbin wurde bei einer Dosis von 5 mg/kg des Wirkstoffs und 50 mg/kg Lipid an den Tagen 13, 17 und 21 nach der Tumorzellinokulation verabreicht.

[0241] [Fig. 27](#) (Datenpunkte stellen die mittlere Tumorgroße \pm SEM, bestimmt an dem spezifiziertem Tag, dar) zeigt, dass Liposomen, die aus SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000; DAPC/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 und DSPC/Chol/DSPS/DSPE-PEG2000 und verkapseltem Vinorelbin bestehen, relativ zu freiem Vinorelbin und Kochsalzlösung ein verringertes Tumorstadium über die Zeit aufweisen. Tumor-tragende Mäuse (4 pro Gruppe) wurden bei einer Vinorelbin-Dosis von 5 mg/kg (frei und liposomal) und einer Lipiddosis von 50 mg/kg für die liposomale Gruppe behandelt. Die Mäuse wurden intravenös an den Tagen 13, 17 und 21 behandelt.

Beispiel 20

Wirksamkeit von liposomalem Phosphatidylserin und Vinorelbin im murinen Leukämie-Krebsmodell

[0242] Liposomen, bestehend aus SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 (35:45:10:10 mol%), wurden hergestellt und mit Vinorelbin beladen, wie in Beispiel 18 beschrieben, abgesehen davon, dass die Liposomen durch einen Filter mit 100 nm Porengröße, der mit einem 80 nm-Filter gestapelt bzw. geschichtet war, extrudiert wurden.

[0243] P388/wt-Zellen wurden intraperitoneal in BDF-1-Mäuse inokuliert, wie es in Beispiel 27 beschrieben ist. Nachfolgend wurde weiblichen BDF-1-Mäusen intraperitoneal eines der Folgenden verabreicht: Kochsalzlösung; freies Vinorelbin (10 mg/kg) und SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000-Liposomen, geladen mit Vinorelbin (10 mg/kg Vinorelbin und 100 mg/kg Lipid). Die intraperitoneale Verabreichung von freiem und liposomalem Vinorelbin wurde am Tag 1 mit 4 Mäusen pro Behandlungsgruppe durchgeführt.

[0244] Die in [Fig. 28](#) gezeigten Überlebenskurven zeigen, dass die Verabreichung von Vinorelbin, verkapselt in Liposomen, die aus SM/Chol/DPPS/DSPE-PEG2000 bestehen, in wesentlich erhöhten Überlebensraten von BDF-1-Mäusen relativ zur Behandlung mit freiem Vinorelbin und Kochsalzlösung resultiert.

Beispiel 21

Co-Formulierung von Sphingosin und Doxorubicin

[0245] Neben Phosphatidylserin können andere therapeutische Lipide in Liposomenmembranen eingebaut bzw. eingearbeitet werden. Sphingosin und Sphingosinanaloga sind beispielsweise Lipide, die einer Formulierung in Liposomen zugänglich sind, und sie können mit einem therapeutischen Mittel, das im wässrigen Inneren eingekapselt wird (zum Beispiel Doxorubicin), co-formuliert werden. Die Herstellung einer derartigen pharmazeutischen Zusammensetzung (Sphingosin) kann wie folgt durchgeführt werden:

Eine typische liposomale Formulierung von Sphingosin besteht aus DSPC/Chol/Sphingosin (45:45:10 mol%). Lipidfilme werden hergestellt, wie es in den vorherigen Beispielen ausgeführt ist. Die Lipidfilme werden in Citratpuffer (300 mM, pH 4) rehydratisiert und die resultierenden MLVs werden bei 65°C für eine Gesamtzahl von 10 Passagen durch zwei 100 nm-Filter extrudiert. Nachfolgend wird Doxorubicin unter Verwendung des pH-Gradienten-Beladungsverfahrens in diese Formulierung geladen, indem der äußere Puffer der Liposomen durch Passage entlang einer Säule vom Typ Sephadex G-50, die mit HBS (pH 7,4) equilibriert ist, ausgetauscht wird, um einen pH-Gradienten zu etablieren.

[0246] Die Liposomen und die Doxorubicin-Lösung werden dann zusammen bei 60°C inkubiert, um die Beladung geschehen zu lassen. Um das Ausmaß der Beladung zu verschiedenen Zeiten zu bestimmen, werden 100 µL der Probe auf eine Zentrifugensäule vom Typ Sephadex G-50 („Sephadex G-50 spun column“) aufgebracht und dann zentrifugiert. Ein Wirkstoff-zu-Lipid-Verhältnis für den Eluenten der Zentrifugensäule wird generiert, wobei Flüssigkeitsszintillationszählung zum Quantifizieren von Lipid und Absorption bei 480 nm zum Quantifizieren von Doxorubicin verwendet werden. Um auf den Wirkstoff zu testen, werden die Liposomen durch Inkubation in Triton X-100 solubilisiert, bevor die Absorptionsablesungen vorgenommen werden.

Beispiel 22

Synergismus von Floxuridin (FUDR) und Irinotecan (CPT-11)

[0247] Die oben angegebene Verfahrensweise zur Messung additiver, synergistischer oder antagonistischer Wirkungen wurde unter Verwendung von FUDR/CPT-11 in Molverhältnissen von 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 und 1:10 in HT 29-Zellen wiederholt. Für jede Dosis wurde ein Kombinationsindex bestimmt, indem CI- gegen f_a -Kurven erstellt wurden, wie es oben beschrieben ist. Die Daten in [Fig. 29](#), aufgetragen als CI gegen den Anteil affizierter HT 29-Zellen, illustrieren deutlich die Wirkung der Konzentration auf die Synergie. Bei einem Verhältnis von 5:1 oder 1:1 wird Synergie über den gesamten Bereich der Werte für den affizierten Anteil (0,2 bis 0,8) beobachtet, während ein Verhältnis von 10:1 bei f_a -Werten unter 0,76 nicht-antagonistisch ist und ein Molverhältnis von 1:5 von FUDR/CPT-11 bei f_a -Werten von weniger als 0,62 nicht-antagonistisch ist. Ein Verhältnis von 1:10 ist über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten (mehr als 50%) antagonistisch. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Molverhältnis von 1:1 FUDR:CPT-11 für Formulierungs- und Wirksamkeitsstudien gewählt, da dieses Verhältnis synergistische Wirkungen über einen signifikanten Bereich von f_a -Werten (wenigstens 20%, bei denen mehr als 1% der Zellen affiziert werden) zeigte. In dem Verhältnis von 5:1 und 10:1 hergestellte Formulierungen würden ebenfalls die Erfordernisse eines definierten nicht-antagonistischen Verhältnisses über einen wesentlichen Bereich von f_a -Werten erfüllen.

Beispiel 23

Aufrechterhaltung des Synergismus von FUDR und CPT-11 in vivo

[0248] FUDR und CPT-11 wurden in DSPC/DSPG/Chol(70:20:10 mol%)-Liposomen in einem Molverhältnis von 1:1, das in Beispiel A als synergistisch identifiziert worden war, formuliert. Die Lipidfilme wurden durch Auflösen von DSPC und Cholesterin in Chloroform und DSPG in Chloroform/Methanol/Wasser (16/18/1) hergestellt. Die Lösungen wurden miteinander kombiniert, so dass das spezifizierte Molverhältnis erreicht wurde, und Spuren Mengen an ^{14}C -CHE wurden als liposomale Lipidmarkierung zugegeben. Anschließend an die Entfernung des Lösungsmittels wurden die resultierenden Lipidfilme in einer Lösung, bestehend aus 250 mM CuSO_4 und 25 mg/ml FUDR (mit Spuren Mengen an ^3H -FUDR), bei 70°C hydratisiert. Die resultierenden MLVs wurden bei 70°C durch zehn Passagen durch zwei gestapelte Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert. Nachfolgend wurden die Liposomen durch Tangentialfluss-Dialyse in SHE, pH 7,4 umgepuffert, wodurch jegliches nicht-verkapseltes FUDR und CuSO_4 entfernt wurden.

[0249] CPT-11 wurde zu diesen Liposomen zugegeben, so dass das FUDR-zu-CPT-11-Molverhältnis 1:1 sein würde. Das Laden von CPT-11 in die Liposomen wurde erleichtert, indem die Proben 5 Minuten lang bei 50°C inkubiert wurden. Nach der Beladung wurden die Proben durch Tangentialfluss-Dialyse in HBS, pH 7,4 umgepuffert, um EDTA oder nicht-verkapselten Wirkstoff zu entfernen. Das Ausmaß der CPT-11-Beladung wurde unter Verwendung von HPLC gemessen. Die FUDR- und Lipidkonzentrationen wurden unter Verwendung von Flüssigkeitsszintillation gemessen.

[0250] Die Zubereitungen wurden intravenös über die Schwanzvene in weibliche Balb/c-Mäuse injiziert. Die Dosen der liposomalen Formulierungen waren 8,38 mg/kg FUDR und 20 mg/kg CPT-11. Zu den angegebenen Zeitpunkten (3 Mäuse pro Zeitpunkt) wurde Blut durch Herzpunktion gesammelt und in EDTA-beschichtete Mikrobefüller gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und Plasma wurde in ein weiteres Röhrchen transferiert. Flüssigkeitsszintillationszählung wurde verwendet, um das radioaktiv markierte Lipid und FUDR in dem Plasma zu quantifizieren. Die CPT-11-Plasmakonzentrationen wurden mittels HPLC quantifiziert.

[0251] [Fig. 30](#) zeigt, dass die Plasmakonzentrationen von FUDR und CPT-11 in einem Molverhältnis von 1:1 aufrechterhalten wurden, da die Plasmakonzentrationen von FUDR zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung denen von CPT-11 ungefähr gleich waren, wenn sie in den oben beschriebenen Liposomen abgegeben wurden. Die Datenpunkte stellen die mittleren Wirkstoffkonzentrationen (nmol Wirk-

stoff/ml Plasma), bestimmt in Plasma, +/- Standardabweichung zu den spezifizierten Zeitpunkten dar.

Beispiel 24

Wirksamkeit von liposomalem FUDR und CPT-11

[0252] DSPC/DSPG/Chol(70:20:10 mol%)-Liposomen, co-verkapselt mit FUDR und Irinotecan in einem Molverhältnis von 1:1, wurden hergestellt, wie es in Beispiel B beschrieben ist, abgesehen davon, dass der äußere Liposomenpuffer nach der Wirkstoffbeladung gegen 0,9% NaCl ausgetauscht wurde.

[0253] Unter Verwendung der Methoden von Beispiel 26 wurden Wirksamkeitsstudien an weiblichen SCID/rag2-Mäusen, die zuvor in der Flanke subkutan mit 2×10^6 HT-29-Zellen inokuliert worden waren, durchgeführt. Die Tumore wurden wachsen gelassen, bis gemessen wurde, dass sie 180 mg (0,18 cm³) groß waren, zu dieser Zeit (Tag 21) wurden die angegebenen Formulierungen injiziert. Das Tumorstadium wurde durch direkte Messschieber-Messungen bestimmt. Die Mäuse wurden mit einer einzelnen Dosis (Pfeil) Kochsalzlösung, freiem Wirkstoffcocktail in einem Molverhältnis von 1:1 oder einer liposomalen Formulierung von FUDR/CPT-11 in einem Molverhältnis von 1:1 behandelt. Sowohl bei dem Cocktail als auch bei den liposomenformulierten Behandlungen waren die Dosen 9,25 mg/kg FUDR und 25 mg/kg CPT-11. Die Lipiddosen waren 278 mg/kg Lipid für liposomenformulierte Proben.

[0254] Die in [Fig. 31](#) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Verabreichung von FUDR und CPT-11, verkapselt in einem einzigen Liposom, in einem Molverhältnis von 1:1, eine signifikant bessere therapeutische Aktivität im Vergleich zu Tieren, denen entweder der freie Wirkstoffcocktail oder Kochsalzlösung injiziert worden waren, bereitstellte. Die Datenpunkte stellen die mittlere Tumorgroße +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Beispiel 25

Bestimmung des CI für verschiedene Drei-Wirkstoff-Kombinationen

[0255] Kombinationen, umfassend Topotecan, Cisplatin, HB5-5A (ein Analogon von Edelfosin) und Sphingosin wurden auf additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen untersucht, wobei der Tetrazolium-basierte colorimetrische MTT-Cytotoxizitäts-Standardassay (siehe Beispiele – Cytotoxizitätsassay) verwendet wurde. Die Kombinationswirkungen wurden unter Verwendung der in den vorherigen Beispielen beschriebenen Mittelwirkungs-Analyse bzw. Median-Effekt-Analyse berechnet. CI- gegen f_a -Diagramme wurden erzeugt, wie es in den vorangehenden Beispielen beschrieben ist und CI-Werte, die f_a -Werten bei 0,5, 0,75 und 0,90 entsprechen (wiedergegeben durch ED50, 75 und 90) sind in der unten stehenden Tabelle angegeben:

MITTEL 1	MITTEL 2	MITTEL 3	FESTGELEGTES VERHÄLTNIS	KOMBINATIONSINDEX ^a		
				ED50 ^b	ED75	ED90
Topotecan	Cisplatin	HB5-5A	1:10:1	0,56	0,34	0,26
Topotecan	Cisplatin	HB5-5A	1:10:10	0,73	0,53	0,43
Topotecan	Cisplatin	HB5-5A	1:10:100	2,22	1,78	1,45
Topotecan	Cisplatin	Sphingosin	1:10:1	0,23	0,12	0,07
Topotecan	Cisplatin	Sphingosin	1:10:10	0,47	0,34	0,29
Topotecan	Cisplatin	Sphingosin	1:10:100	1,22	0,95	0,76

^a Der Kombinationsindex (CI) wird verwendet, um Synergie (CI < 0,9) oder Additivität (CI zwischen 0,9 und 1,1), basierend auf der Chou-Talalay-Theorie der Dosis-Wirkungs-Analyse, zu bestimmen. Die Werte werden unter Verwendung der CalcuSyn-Software berechnet.

^b ED50, ED75, ED90 beziehen sich auf die Dosis des/der Mittel(s), die 50, 75 bzw. 90% der gemessenen Reaktion bzw. Antwort affiziert.

Herstellung von Tumormodellen, Zellpräparationen und Implantation für eine solider subkutaner Tumor-Methode

[0256] Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen vom Typ H460 werden vom DCTC-Tumor Repository des NCI bezogen. Die Zellen werden für bis zu 20 Passagen in Gewebekultur gehalten. Nach 20 Passagen werden neue Zellen aus einem gefrorenen Vorrat, der in flüssigem Stickstoff gelagert wird, expandiert. Wenn die kultivierten Zellen eine Konfluenz von 80–90% erreichen, werden sie mit ausgewogener Hanks-Salzlösung („Hanks Balanced Salt Solution“) gespült und die adhärennten Zellen werden mit einer 0,25%igen Trypsinlösung entfernt. Die Zellen werden auf einem Hämocytometer ausgezählt und mit Medien auf eine Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml verdünnt.

[0257] Ein Haarstreifen von ungefähr $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ wird unter Verwendung einer elektrischen Haarschneidemaschine an der unteren Rückenregion jeder Maus rasiert. Unter Verwendung einer 28 g-Nadel werden die Mäuse am Tag 0 mit 1×10^6 Tumorzellen (ein Inoculum/Maus) in einem Volumen von 50 μL inokuliert.

[0258] Wenn die Tumore eine definierte Größe von ungefähr 0,50 bis 0,100 cm^3 erreichen, entweder einen Tag vor der Behandlung oder am Tag der Behandlung (~ Tag 10–14), werden alle Tumore vermessen. Nach dem Auswählen der geeigneten Tumorgößen, wobei kleine oder große Tumore ausgeschlossen werden, werden die Tumore zufällig bzw. statistisch (auf Gruppen) verteilt ($n = 4$) und das mittlere Tumolvolumen der Gruppen wird bestimmt.

[0259] Die Mäuse werden in entsprechenden Behandlungsgruppen organisiert und diese setzen sich aus Kontroll- und Behandlungsgruppen, wie zum Beispiel Kochsalzlösungskontrolle, Vehikelkontrolle, Positivkontrolle und verschiedene Verdünnungen der Testartikel bzw. Testgegenstände zusammen.

[0260] Die Behandlungsgruppen sind wie folgt:

GRUPPE	MÄU- SE/GRUP PE	BEHANDLUNG	DOSIS (MG/KG)	ZEITPLAN ^a	VOLUMEN- INJEKTION
1	4	Kochsalzlösungs- kontrolle	N/A	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$
2	4	Vehikelkontrolle	20	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$
3	4	Positivkontrolle	10	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$
4	4	zu testendes Mittel (niedrige Dosis)	5	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$
5	4	zu testendes Mittel (mittlere Dosis)	10	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$
6	4	zu testendes Mittel (hohe Dosis)	20	q4dx3	10 $\mu\text{L/g}$

^a Alternative Dosierungszeitpläne können in Betracht gezogen werden, zum Beispiel eine einzelne Dosis oder 3 Dosen alle 4–7 Tage.

[0261] Den Mäusen wird intravenös das Probenvolumen injiziert, das erforderlich ist, um den Tieren, die auf der Grundlage individueller Mäusegewichte verschriebene Dosis (10 $\mu\text{L/g}$, wie angegeben) zu verabreichen.

[0262] Die Tumorstadiumsmessungen wurden unter Verwendung von Messschiebern, beginnend am Tag der Behandlung, überwacht. Tumorstadiumsmessungen (mm) werden ausgehend von der längsten Achse ge-

macht und Breitenmessungen (mm) werden rechtwinklig zu dieser Achse sein. Aus den Längen- und Breitenmessungen können die Tumorumfänge (cm^3) nach der Gleichung $(L \times B^2/2)/1000$ berechnet werden. Die Tiergewichte werden zum Zeitpunkt der Tumormessung aufgenommen.

[0263] Individuelle Körpergewichte von Mäusen werden an verschiedenen Tagen (im Allgemeinen mit zwei Tagen Abstand, wie zum Beispiel Montag, Mittwoch und Freitag) während der Wirksamkeitsuntersuchung für eine Zeitdauer von 14 Tagen nach der letzten Dosierung aufgezeichnet.

[0264] Alle Tiere werden wenigstens einmal täglich, wenn es als notwendig eingeschätzt wird öfter, während der Vorbehandlungs- und Behandlungsperioden hinsichtlich Mortalität und Morbidität beobachtet. Insbesondere beruhen Zeichen schlechter Gesundheit auf Verlust von Körpergewicht, Änderung des Appetits, rauem Fell, fehlendem Putzen, Verhaltensänderungen, zum Beispiel verändertem Gang, Lethargie und starken Manifestationen von Stress.

[0265] Sollten Zeichen starker Toxizität oder tumorbedingter Krankheit festgestellt werden, werden die Tiere getötet (CO_2 -Erstickung) und es wird eine Nekropsie durchgeführt, um andere Anzeichen von Toxizität zu beurteilen. Moribunde Tiere müssen aus Gründen der Menschlichkeit getötet werden und die Entscheidung zur Tötung wird im Ermessen des Tierpflegers („Animal Care Technician“) und des Untersuchungsdirektors/Leiters liegen. Jeder Befund und alle diese Befunde werden als Rohdaten aufgezeichnet werden und die Todeszeit wird als der folgende Tage eingetragen werden.

[0266] Die Daten werden entweder in Form einer Tabelle oder Figur bzw. Zeichnung dargestellt wie folgt:

1. Auftragung der Tumorumfänge einzelner Mäuse unter Bezug auf jede Gruppe, vor dem Behandlungsbeginn und nach der Gruppierung.
2. Mittlere Körpergewichte für jede Gruppe als Funktion der Zeit.
3. Mittlere Tumorumfänge für jede Gruppe als Funktion der Zeit.
4. Rohdaten, einschließlich Figuren und Tabellen, werden erzeugt und umfassen Tumorumfang vs. Zeit, Tumorumfangsinhibition und Tumorumfangsverzögerung.
5. Zusammenfassung abnormaler oder bemerkenswerter Beobachtungen.

Beispiel 27

Herstellung von Tumormodellen, Zellpräparationen und Implantation für eine intraperitonealer Tumor-Methode

[0267] Mäuse werden entsprechend dem Körpergewicht gruppiert. Die Tiere ($n = 4$) werden inokuliert (Tag = 0) mit 1×10^6 P388-Zellen, die in einem Volumen von 500 μL mit einer 25 g-Nadel in die Peritonealhöhle von BDF-1-Mäusen implantiert werden. P388-Zellen aus der ATCC-Tumorbank werden als Aszitesflüssigkeit in den BDF-1-Mäusen gezogen bzw. aufrechterhalten, welche wöchentlich auf neue Mäuse passagiert werden. Die Mäuse werden getötet und die Asziteszellen werden durch die Bauchdecke mit einer 20 g-Nadel entfernt. Die für das Experiment verwendeten Zellen werden innerhalb von Passage 3–20 verwendet. Nach 20 Passagen in den Mäusen werden neue Zellen aus dem gefrorenen Vorrat in flüssigem Stickstoff herangeführt und es werden Mäuse inokuliert. Für Experimente werden die Zellen mit Hanks ausgewogener Salzlösung gewaschen, auf einem Häemocytometer ausgezählt und mit HBSS auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt.

[0268] Untersuchungsgruppen werden zufällig bzw. statistisch erstellt, nachdem allen Mäusen Tumorzellen verabreicht worden sind. Die erforderlichen Gruppierungen sind ähnlich zu denen, die für die Untersuchungen solider Tumore durchgeführt wurden (siehe Beispiel 26).

[0269] Den Mäusen wird intravenös oder intraperitoneal das Probenvolumen injiziert, das erforderlich ist, um die den Tieren auf der Grundlage individueller Mäusegewichte verschriebene Dosis (10 $\mu\text{L/g}$, wie angegeben) zu verabreichen. Bei intraperitonealen Tumoren beginnen die Verabreichungen im Allgemeinen einen Tag nach der Tumorzelleninokulation.

[0270] Das Wohlbefinden der Tiere wird täglich genau überwacht. Anzeichen für schlechte Gesundheit und die Progression der Morbidität werden genau überwacht, wie es in Beispiel 26 beschrieben ist. Die Tiere werden zur Untersuchungszeit gewogen.

[0271] Nach der Tötung von jeglichen Mäusen werden grobe Nekropsien durchgeführt, um das Ausmaß der Tumorblasten und/oder physiologisch beobachtbarer Veränderungen im Erscheinungsbild von Organen zu

bewerten. Die Befunde werden aufgezeichnet.

[0272] Gruppenkörpergewichte werden von Montag bis Freitag während der Wirksamkeitsuntersuchung für eine Zeitdauer von 14 Tagen nach der letzten Dosierung aufgezeichnet.

[0273] Alle Tiere werden wenigstens einmal täglich, wenn für notwendig erachtet öfter, während der Vorbehandlungs- und Behandlungsperioden hinsichtlich Mortalität und Morbidität beobachtet. Insbesondere beruhen Anzeichen schlechter Gesundheit auf Verlust von Körpergewicht, Veränderung des Appetits, Verhaltensänderungen, wie zum Beispiel verändertem Gang, Lethargie und starken Manifestationen von Stress. Sollten Zeichen starker Toxizität oder tumorbedingter Erkrankung festgestellt werden, werden die Tiere getötet (CO₂-Erstickung) und es wird eine Nekropsie durchgeführt, um andere Anzeichen von Toxizität zu beurteilen. Moribunde Tiere müssen aus Gründen der Menschlichkeit getötet werden und die Entscheidung über die Tötung wird im Ermessen des Tierpflegers und des Untersuchungsleiters liegen. Diese Befunde werden als Rohdaten aufgezeichnet und die Todeszeit wird am folgenden Tag eingetragen.

[0274] Die Daten werden in Tabellen oder Figuren dargestellt und umfassen die mittleren Körpergewichte für jede Gruppe als Funktion der Zeit und die Erhöhung der Lebensdauer.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung, die partikulierte Abgabevehikel umfasst, die damit assoziiert wenigstens ein erstes antineoplastisches Mittel und ein zweites antineoplastisches Mittel haben, wobei das erste und das zweite Mittel in einem Molverhältnis sind, das eine nicht-antagonistische, cytotoxische oder cytostatische Wirkung aufweist, und wobei das erste und zweite Mittel mit den Abgabevehikeln assoziiert sind, um bei Verabreichung ein nicht-antagonistisches Verhältnis im Blut aufrecht zu erhalten.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Abgabevehikel einen Durchmesser von 4 bis 6.000 nm haben.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Abgabevehikel einen mittleren Durchmesser zwischen 4,5 und 500 nm haben.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die Vehikel einen mittleren Durchmesser von weniger als 250 nm haben.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Abgabevehikel einen Durchmesser von 4 µm bis 50 µm haben.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Abgabevehikel umfassen:

Lipidträger und/oder
Liposome und/oder
Lipidmizellen und/oder
Lipoproteinmizellen und/oder
Lipid-stabilisierte Emulsionen und/oder
Cyclodextrine und/oder
Blockcopolymermizellen und/oder
Polymermikropartikel und/oder
Polymernanopartikel und/oder
Polymerlipidhybridsysteme und/oder
derivatisierte Einzelkettenpolymere.

7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das erste und das zweite Mittel co-verkapselt sind.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Molverhältnis des ersten Mittels zu dem zweiten Mittel eine nicht-antagonistische, cytotoxische oder cytostatische Wirkung für relevante Zellen in Kultur über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs aufweist, bei dem > 1% der Zellen in einem in vitro-Assay auf die cytotoxische oder cytostatische Wirkung affiziert werden.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei die nicht-antagonistische Wirkung über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs gezeigt wird, bei dem 10–90% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei die nicht-antagonistische Wirkung über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs gezeigt wird, bei dem 20–80% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die nicht-antagonistische Wirkung über wenigstens 20% des Konzentrationsbereichs gezeigt wird, bei dem 20–80% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden.
12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, die, wenn sie einem Subjekt verabreicht wird, eine therapeutische Aktivität bereitstellt, die größer ist als die, die erreicht wird, wenn die Mittel im selben Verhältnis, aber nicht assoziiert mit Abgabeverfahren, verabreicht werden.
13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei wenigstens eines der Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem DNA-schädigenden Mittel, einem DNA-Reparaturinhibitor, einem Topoisomerase-I-Inhibitor, einem Topoisomerase-II-Inhibitor, einem Zell-„Checkpoint“-Inhibitor, einem CDK-Inhibitor, einem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor, einem cytotoxischen Mittel, einem Apoptose-induzierenden Mittel, einem Antimetaboliten, einem Zellzykluskontrollinhibitor, einem therapeutischen Lipid, einem Telomeraseinhibitor, einem anti-angiogenen Mittel, einem mitochondrialen Gift, einem Signaltransduktionsinhibitor und einem Immunogens.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei das erste Mittel ein cytotoxisches Mittel ist und das zweite Mittel ein Zellzyklusinhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein DNA-schädigendes Mittel ist und das zweite Mittel ein DNA-Reparaturinhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein Topoisomerase-I-Inhibitor ist und das zweite Mittel ein S/G₂- oder ein G₂/M-„Checkpoint“-Inhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein G₁/S-„Checkpoint“-Inhibitor oder ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor ist und das zweite Mittel ein G₂/M-„Checkpoint“-Inhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein Rezeptorkinaseinhibitor ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Apoptose-induzierendes Mittel ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Apoptose-induzierendes Mittel ist und das zweite Mittel ein Zellzykluskontrollmittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Telomeraseinhibitor ist und das zweite Mittel ein Zellzykluskontrollinhibitor ist oder
wobei das erste und das zweite Mittel Antimetaboliten sind oder
wobei das erste und zweite Mittel cytotoxische Mittel sind oder
wobei das erste Mittel ein therapeutisches Lipid ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Topoisomerase-I-Inhibitor ist und das zweite Mittel ein DNA-Reparaturinhibitor ist oder
wobei das Apoptose-induzierende Mittel ein Serin-haltiges Lipid ist.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 14,
wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Idarubicin ist und das zweite Mittel AraC oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Oxaliplatin ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Gemcitabin ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Methotrexat ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Paclitaxel ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Etoposid ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Docetaxel oder Paclitaxel ist und das zweite Mittel Doxorubicin ist oder
wobei das erste Mittel Doxorubicin ist und das zweite Mittel Vinorelbin ist oder
wobei das erste Mittel Carboplatin ist und das zweite Mittel Vinorelbin ist oder
wobei das erste Mittel 5-FU oder FUDR ist und das zweite Mittel Gemcitabin ist.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder wobei das erste Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist.

17. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Verfahren umfasst:
- a) Bestimmung eines Molverhältnisses des ersten und des zweiten Mittels in einem relevanten Zellkulturassay auf cytotoxische oder cytotatische Aktivität, das über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs, über den mehr als 1% Zellen durch das genannte Verhältnis der Mittel affiziert werden, nicht-antagonistisch ist, und
 - b) Einkapseln eines Molverhältnisses von Mitteln, das in Schritt a) als nicht-antagonistisch bestimmt wurde, mit den genannten Abgabevehikeln.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die nicht-antagonistische Wirkung über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs gezeigt wird, bei dem 10–90% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die nicht-antagonistische Wirkung über wenigstens 5% des Konzentrationsbereichs gezeigt wird, bei dem 20–80% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die synergistische Wirkung über wenigstens 20% des Konzentrationsbereichs, bei dem 20–80% der Zellen in dem in vitro-Assay affiziert werden, gezeigt wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die genannte Bestimmung ein Testen wenigstens eines Verhältnisses der Mittel bei einer Vielzahl von Konzentrationen und Anwenden eines Algorithmus zur Errechnung einer synergistischen, additiven oder antagonistischen Wirkung für das Verhältnis über einen Bereich von Konzentrationen verwendet.
22. Verfahren nach Anspruch 21, das ein Testen einer Vielzahl von Verhältnissen verwendet und wobei der Algorithmus das Chou-Talalay-Mittelwirkungs-Verfahren ist.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei wenigstens eines der Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem DNA-schädigenden Mittel, einem DNA-Reparaturinhibitor, einem Topoisomerase-I-Inhibitor, einem Topoisomerase-II-Inhibitor, einem „Checkpoint“-Inhibitor, einem CDK-Inhibitor, einem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor, einem cytotoxischen Mittel, einem Apoptose-induzierenden Mittel, einem Antimetaboliten, einem Zellzykluskontrollinhibitor, einem therapeutischen Lipid, einem Telomeraseinhibitor, einem anti-angiogenen Mittel, einem mitochondrialen Gift, einem Signaltransduktionsinhibitor und einem Immunagens.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das erste Mittel ein cytotoxisches Mittel ist und das zweite Mittel ein Zellzyklusinhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein DNA-schädigendes Mittel ist und das zweite Mittel ein DNA-Reparaturinhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein Topoisomerase-I-Inhibitor ist und das zweite Mittel ein S/G₂- oder ein G₂/M-„Checkpoint“-Inhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein G₁/S-„Checkpoint“-Inhibitor oder ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor ist und das zweite Mittel ein G₂/M-„Checkpoint“-Inhibitor ist oder
wobei das erste Mittel ein Rezeptorkinaseinhibitor ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Apoptose-induzierendes Mittel ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Apoptose-induzierendes Mittel ist und das zweite Mittel ein Zellzykluskontrollmittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Telomeraseinhibitor ist und das zweite Mittel ein Zellzykluskontrollinhibitor ist oder
wobei das erste und das zweite Mittel Antimetaboliten sind oder
wobei das erste und zweite Mittel cytotoxische Mittel sind oder
wobei das erste Mittel ein therapeutisches Lipid ist und das zweite Mittel ein cytotoxisches Mittel ist oder
wobei das erste Mittel ein Topoisomerase-I-Inhibitor ist und das zweite Mittel ein DNA-Reparaturinhibitor ist oder
wobei das Apoptose-induzierende Mittel ein Serin-haltiges Lipid ist.
25. Verfahren nach Anspruch 24,
- wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
 - wobei das erste Mittel Cisplatin ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
 - wobei das erste Mittel Idarubicin ist und das zweite Mittel AraC ist oder
 - wobei das erste Mittel Oxaliplatin ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
 - wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
 - wobei das erste Mittel Gemcitabin ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder

wobei das erste Mittel Methotrexat ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder
wobei das erste Mittel Paclitaxel ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Etoposid ist und das zweite Mittel Cisplatin (oder Carboplatin) ist oder
wobei das erste Mittel Docetaxel oder Paclitaxel ist und das zweite Mittel Doxorubicin ist oder
wobei das erste Mittel Adriamycin ist und das zweite Mittel Vinorelbin ist oder
wobei das erste Mittel Carboplatin ist und das zweite Mittel Vinorelbin ist oder
wobei das erste Mittel 5-FU oder FUDR ist und das zweite Mittel Gemcitabin ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das erste Mittel Irinotecan ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist oder wobei das erste Mittel Cisplatin ist und das zweite Mittel 5-FU oder FUDR ist.

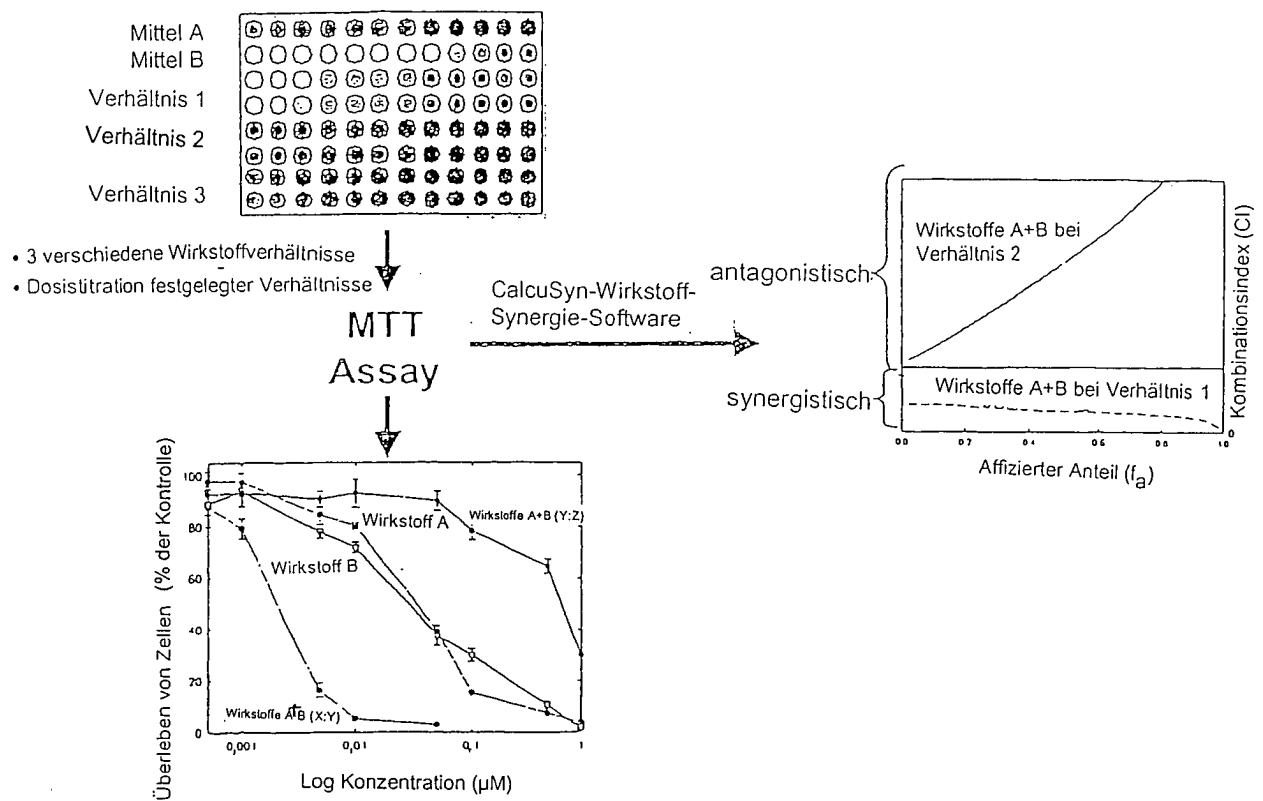
27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Verwendung in der Behandlung eines Krankheitszustandes bei einem Subjekt.

28. Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei das Subjekt ein Mensch ist.

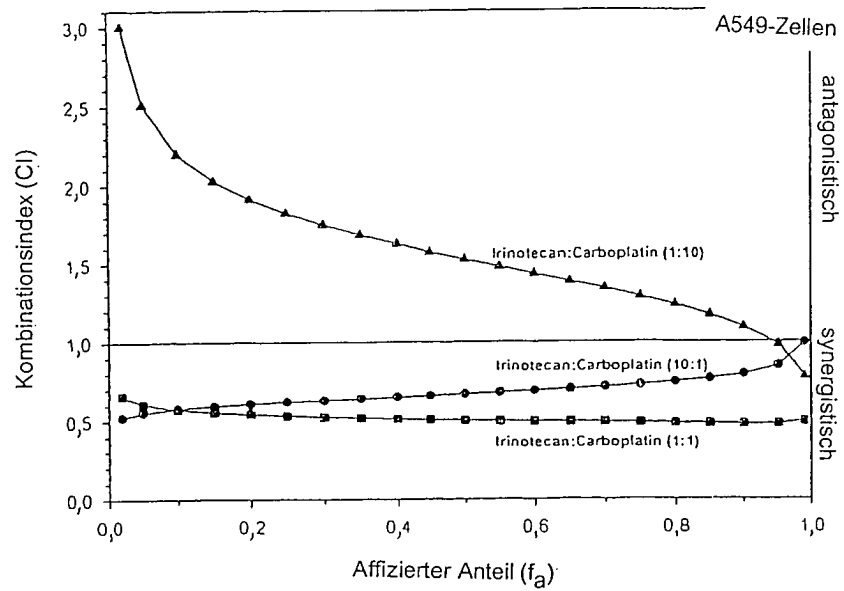
29. Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei das Subjekt ein nicht-menschlicher Säuger oder ein Vogel ist.

Es folgen 34 Blatt Zeichnungen

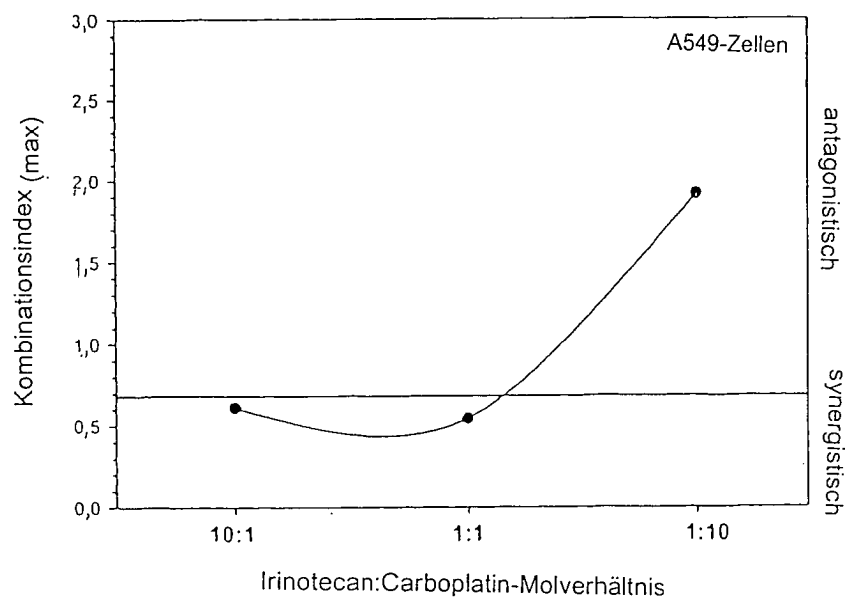
Anhängende Zeichnungen



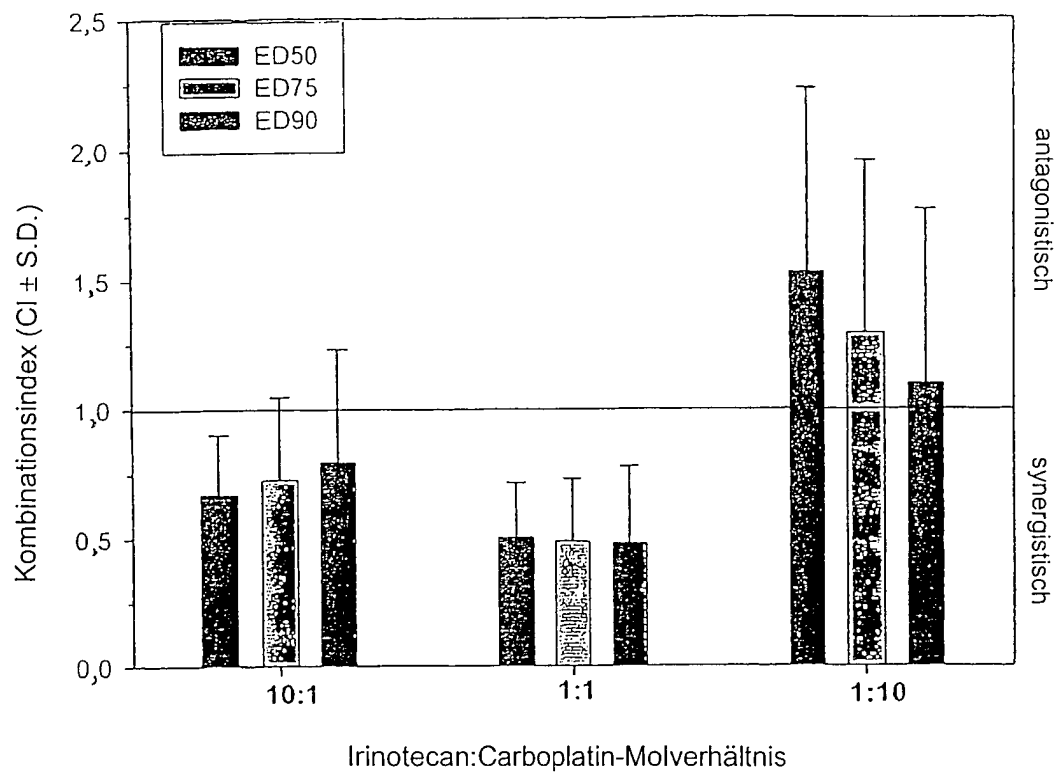
FIGUR 1



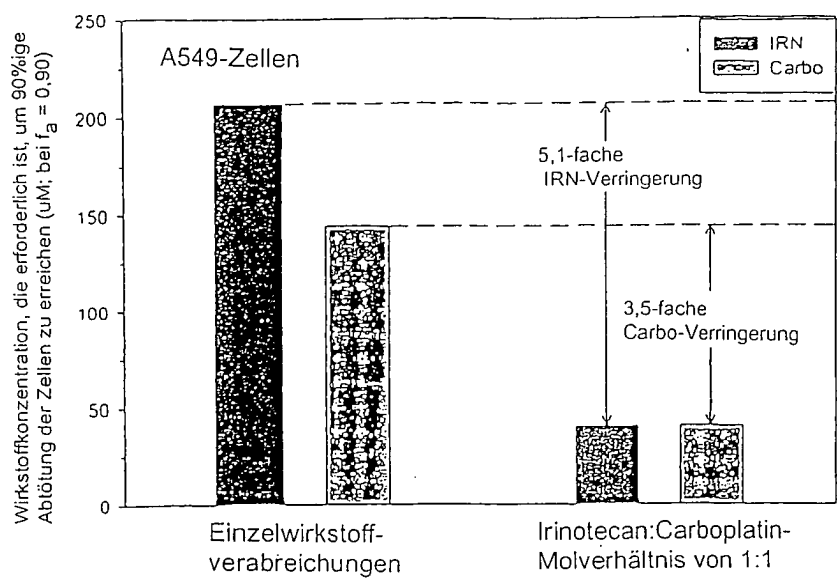
FIGUR 2A



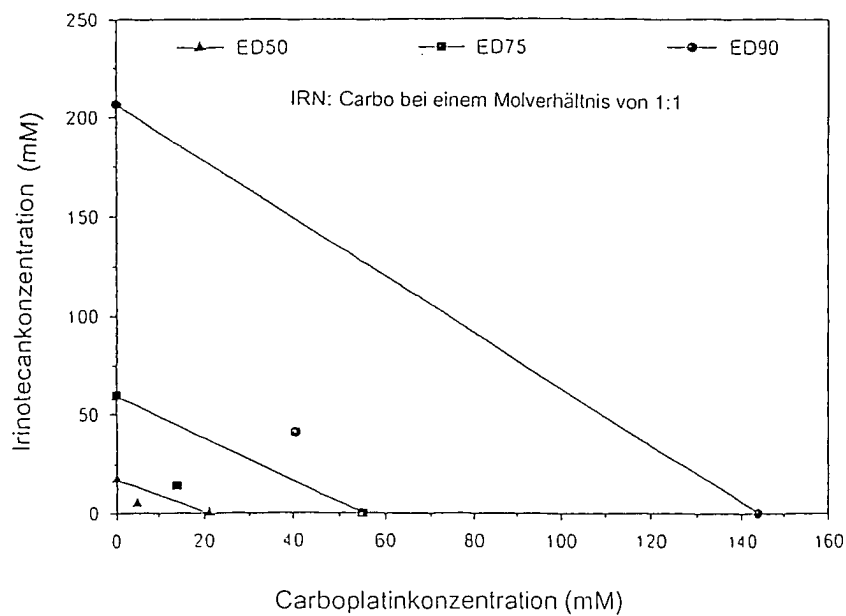
FIGUR 2B



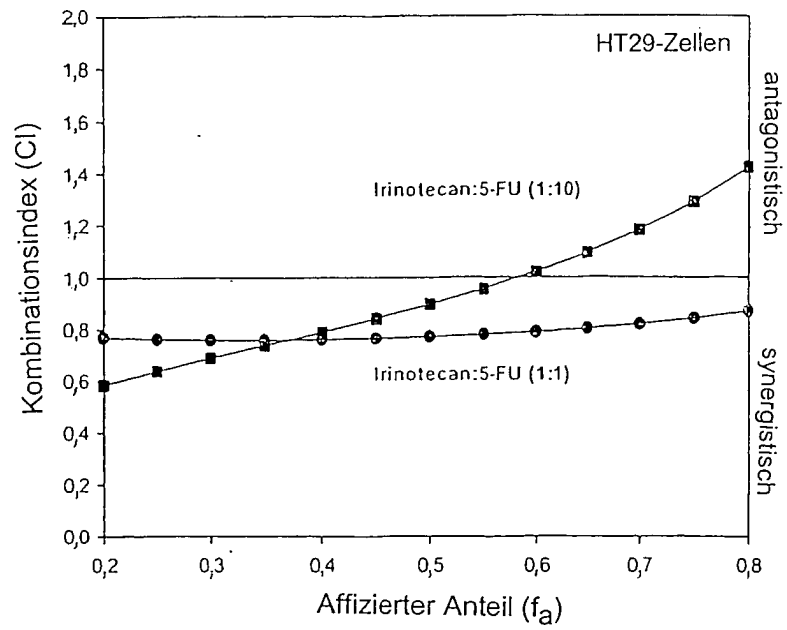
FIGUR 2C



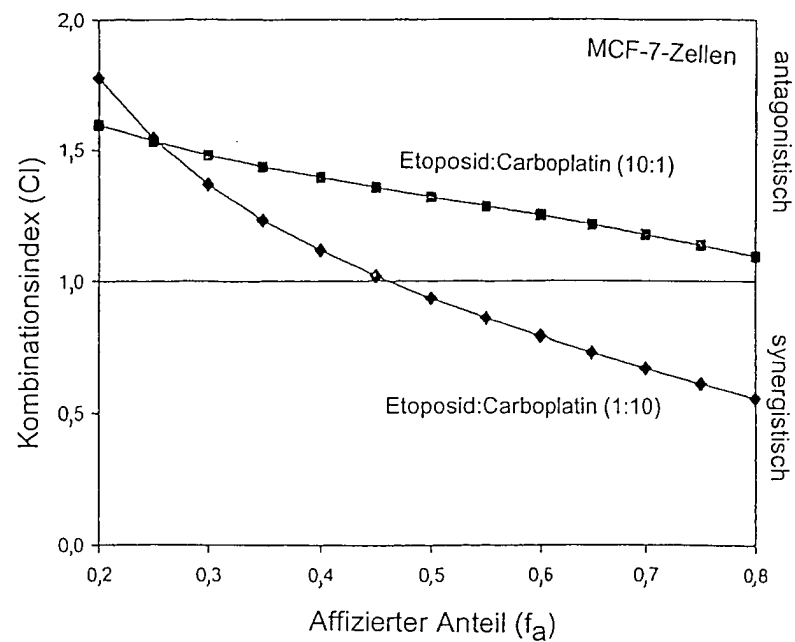
FIGUR 2D



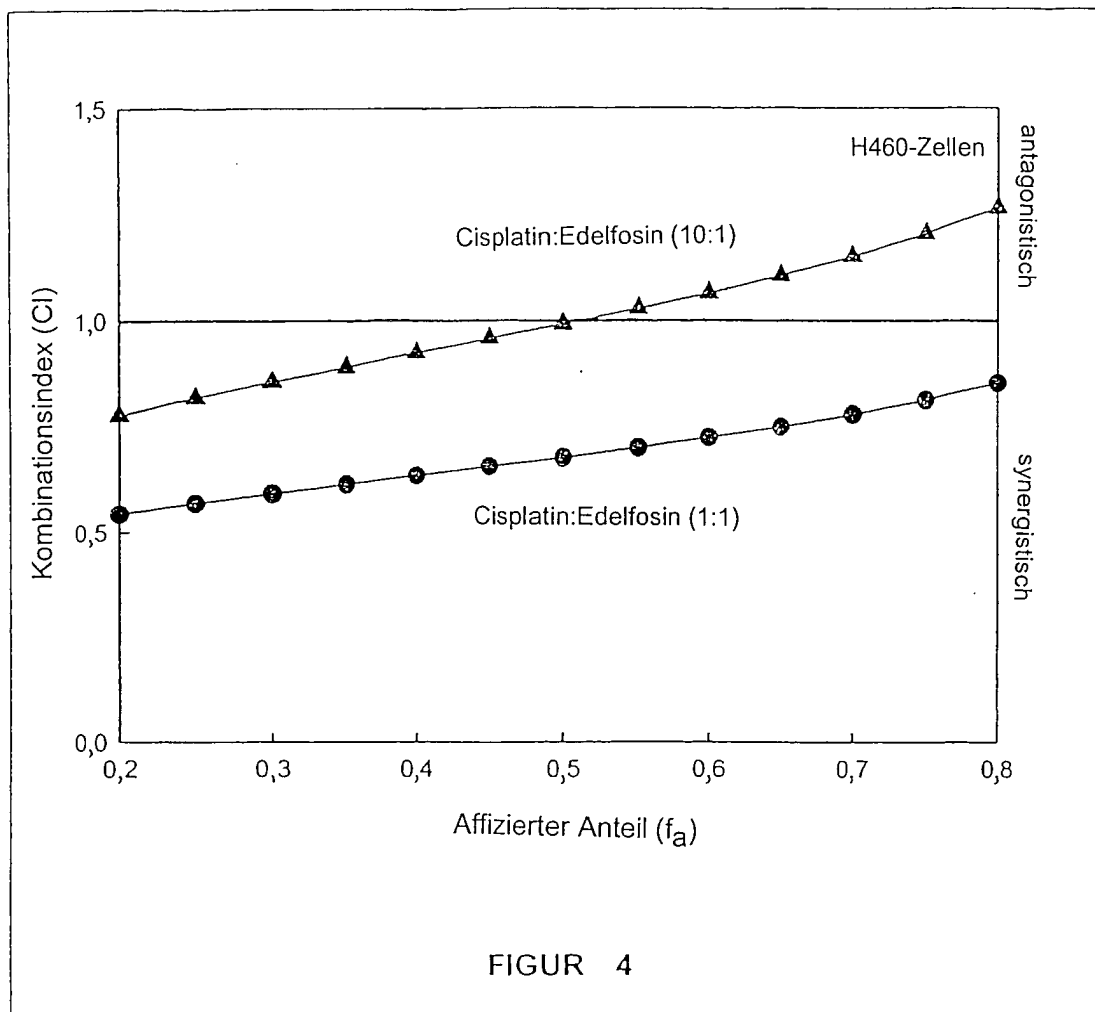
FIGUR 2E

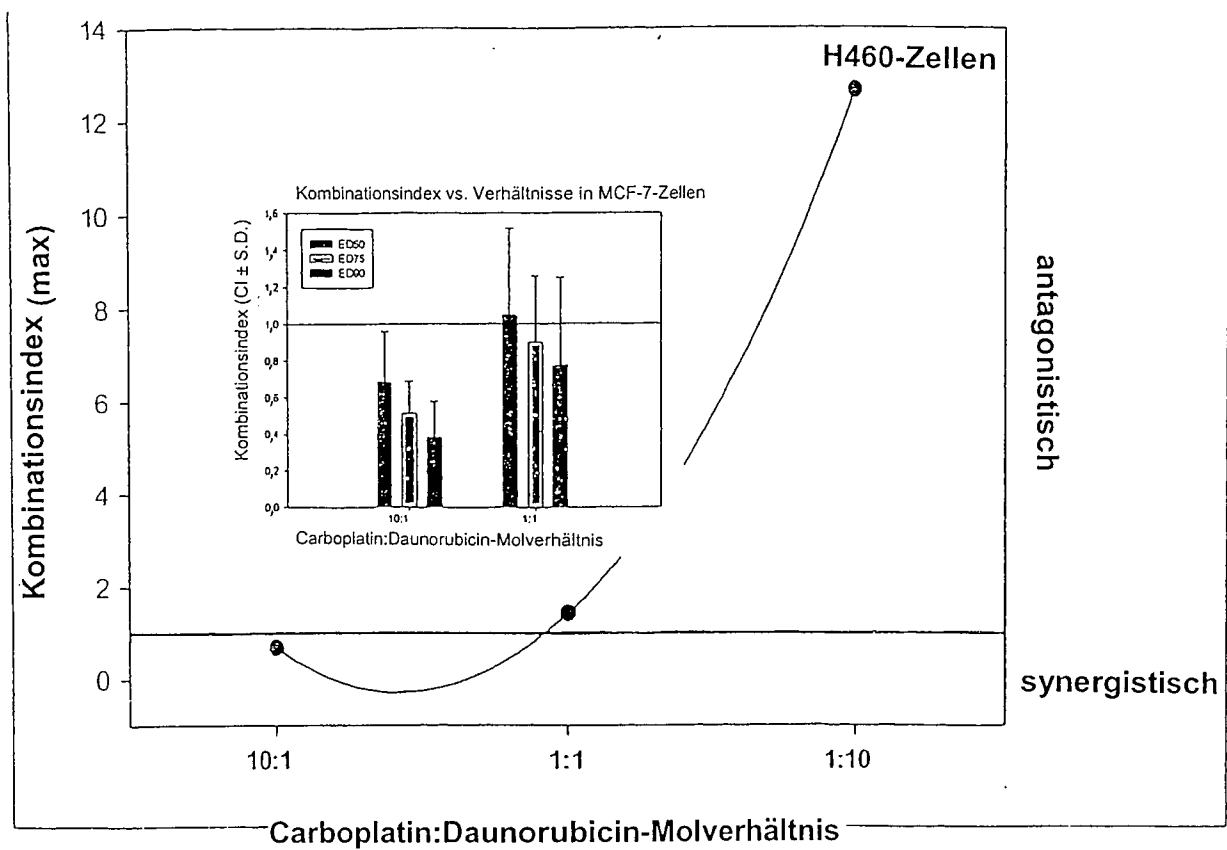


FIGUR. 3A

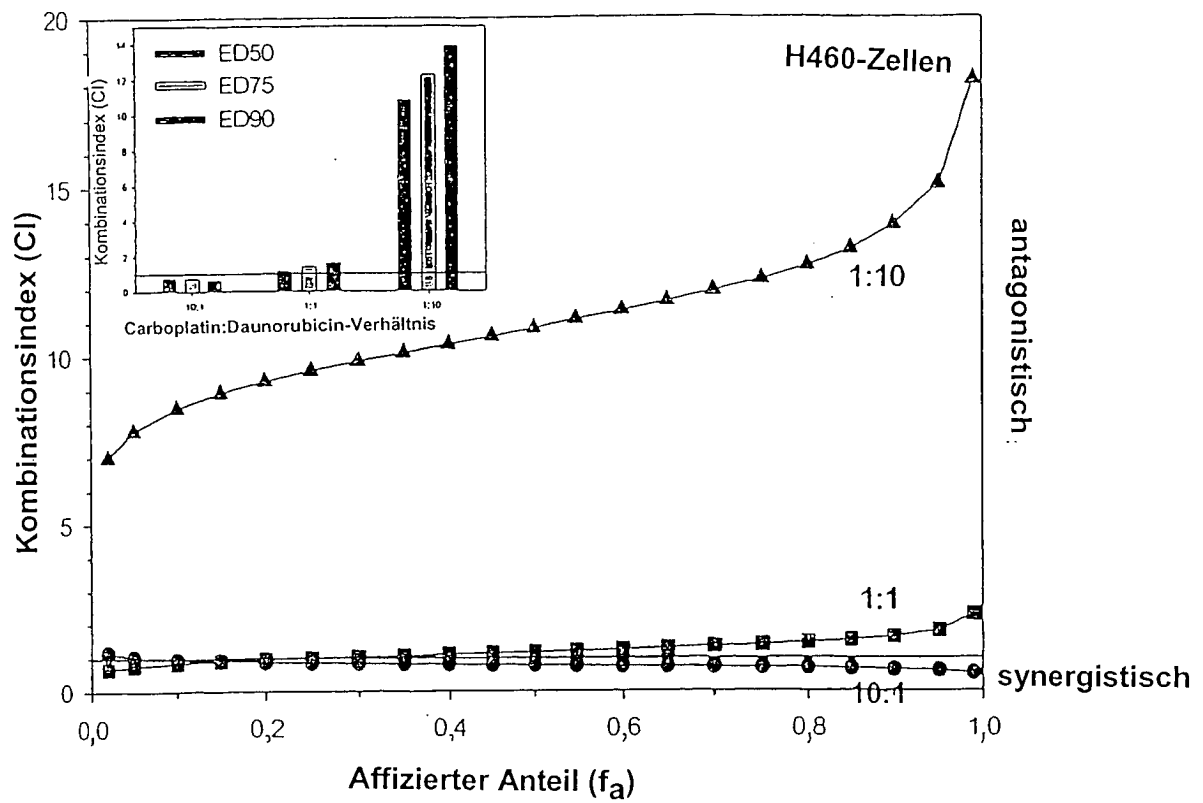


FIGUR 3B

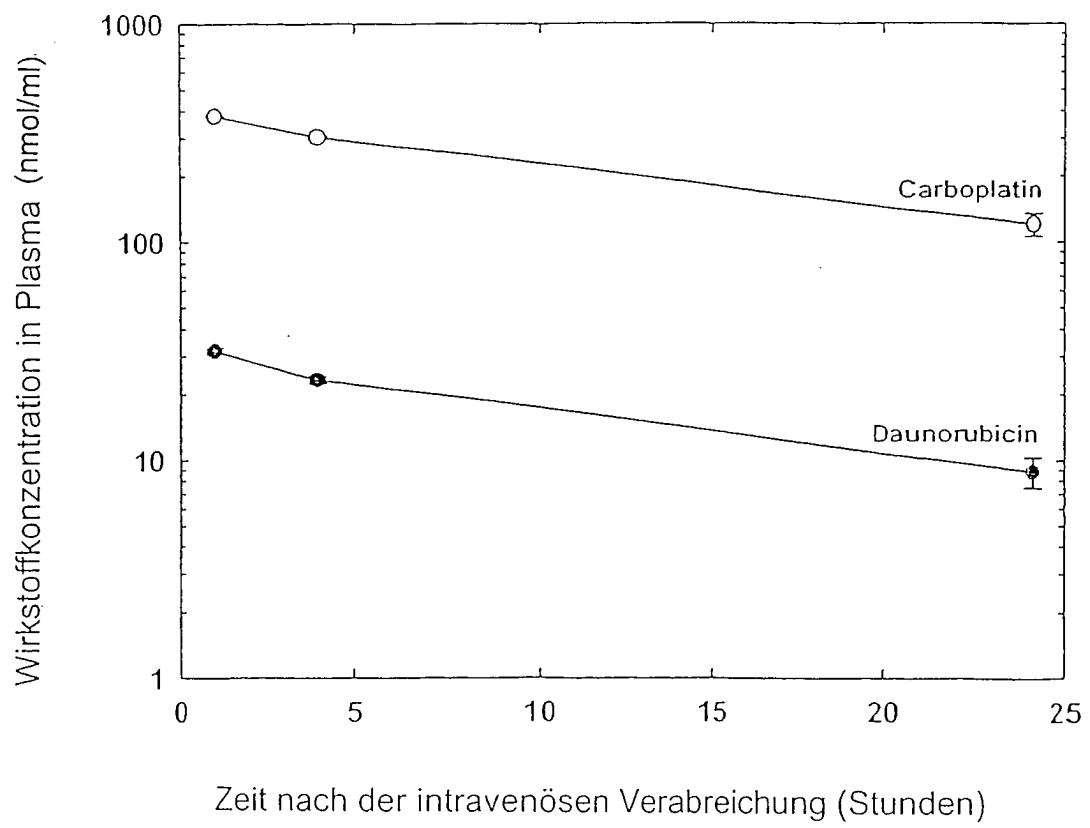




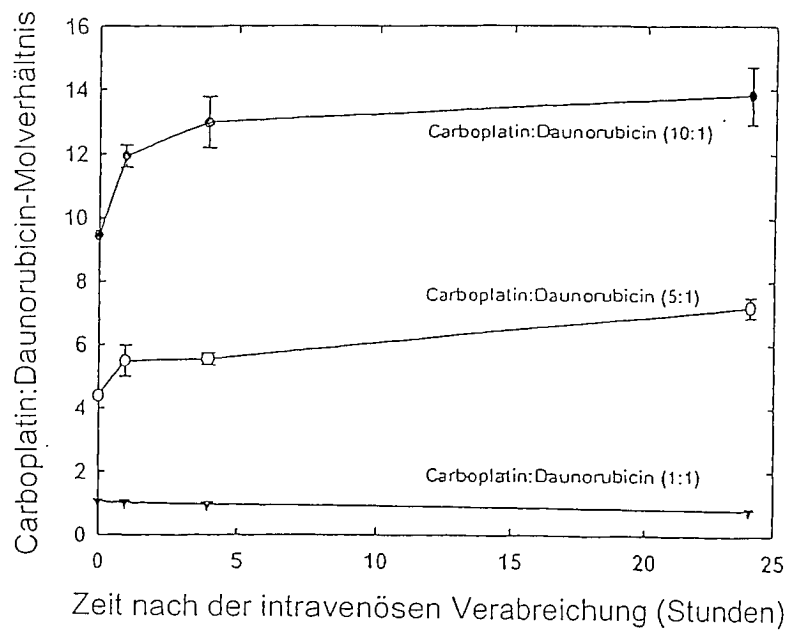
FIGUR 5A



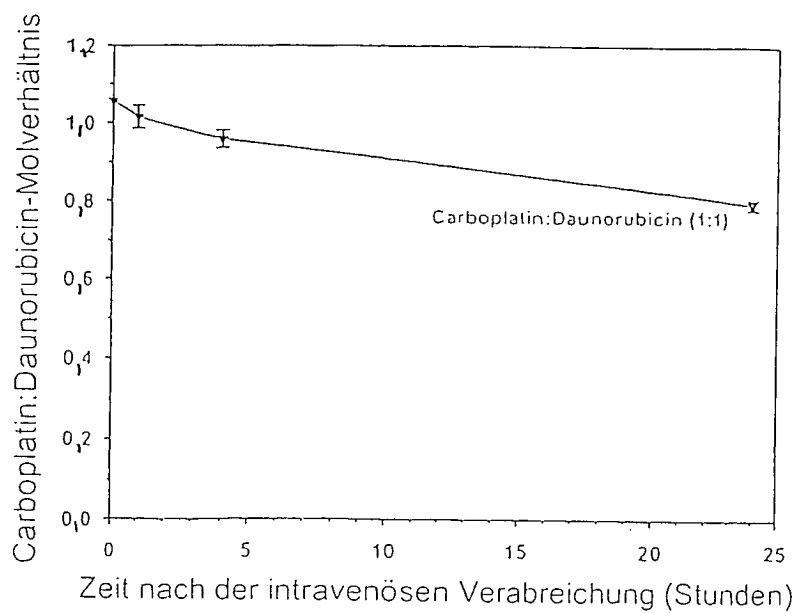
FIGUR 5B



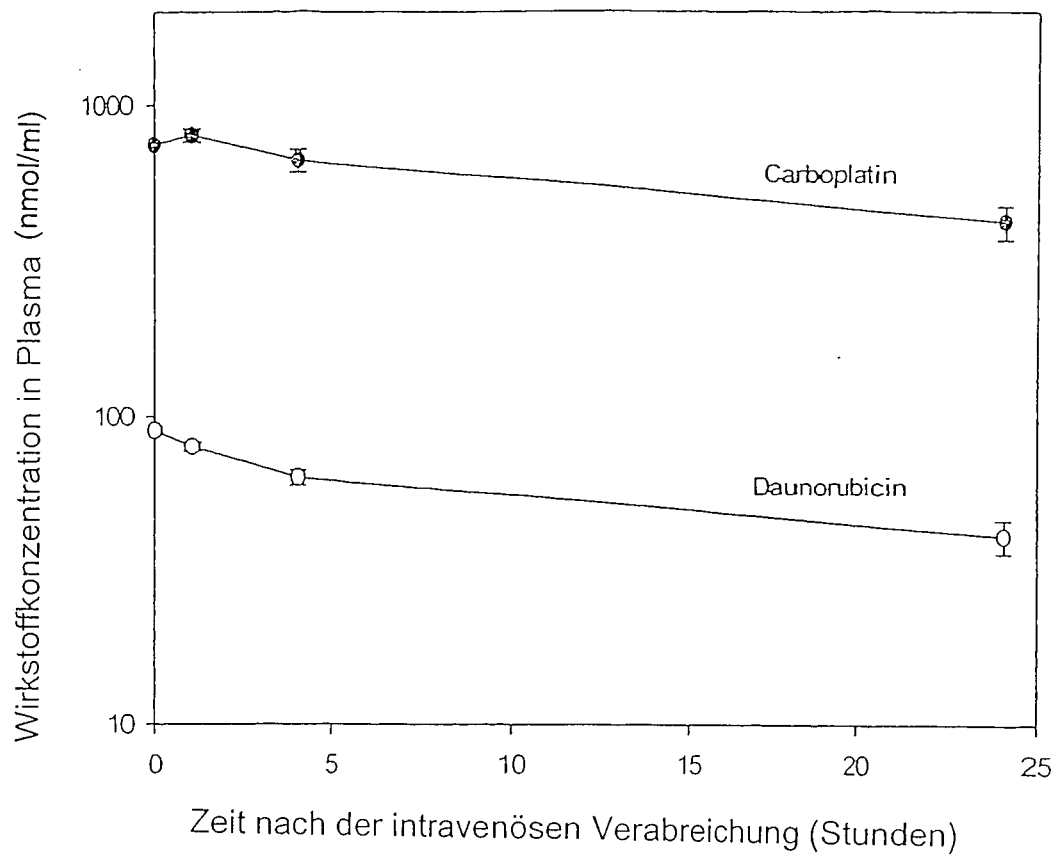
FIGUR. 6



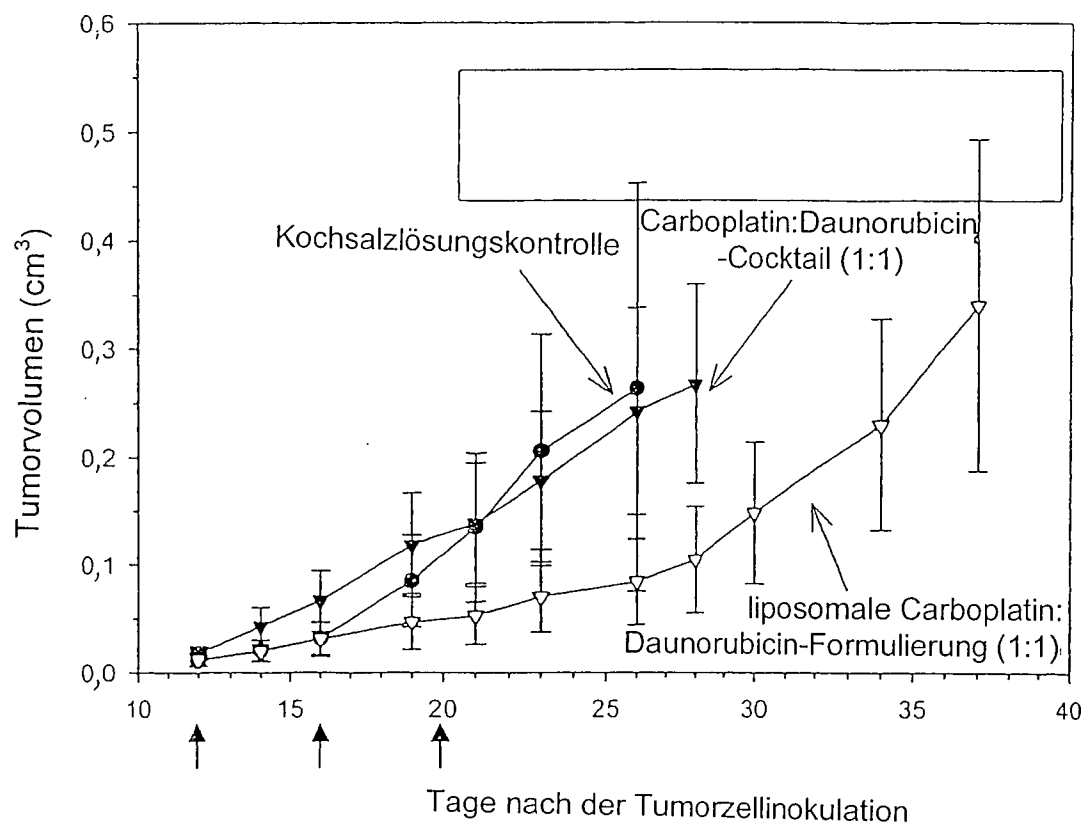
FIGUR 7A



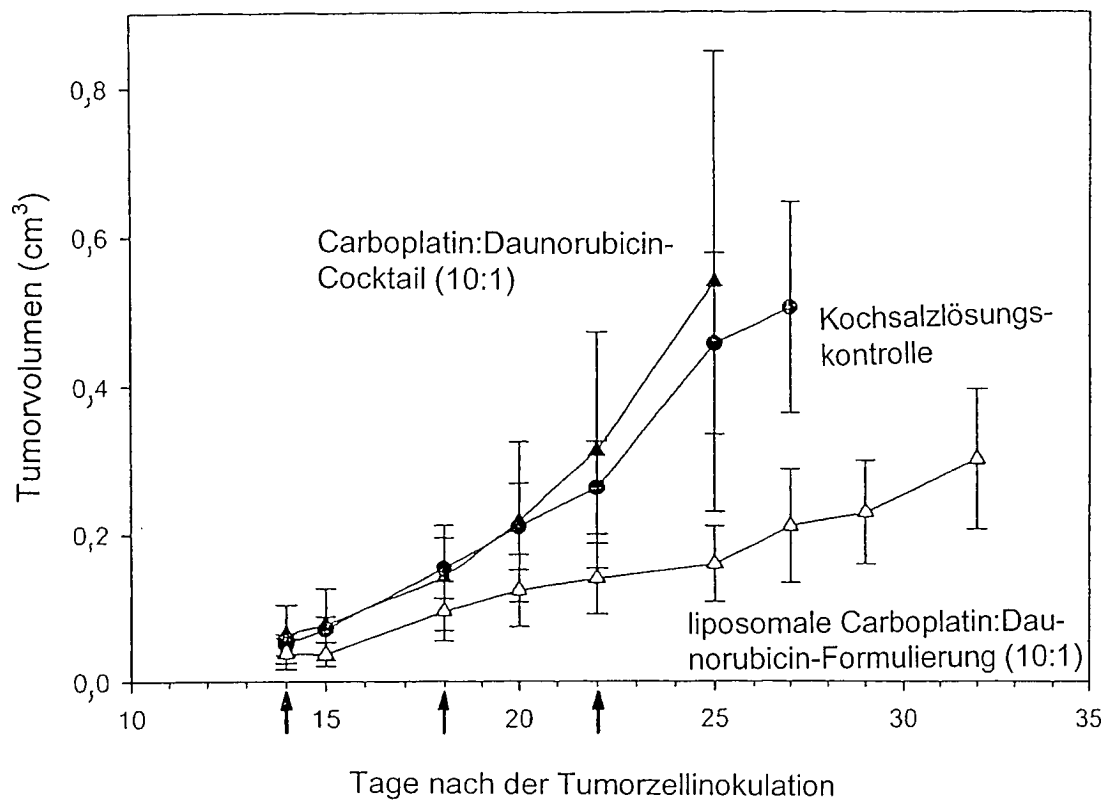
FIGUR 7B



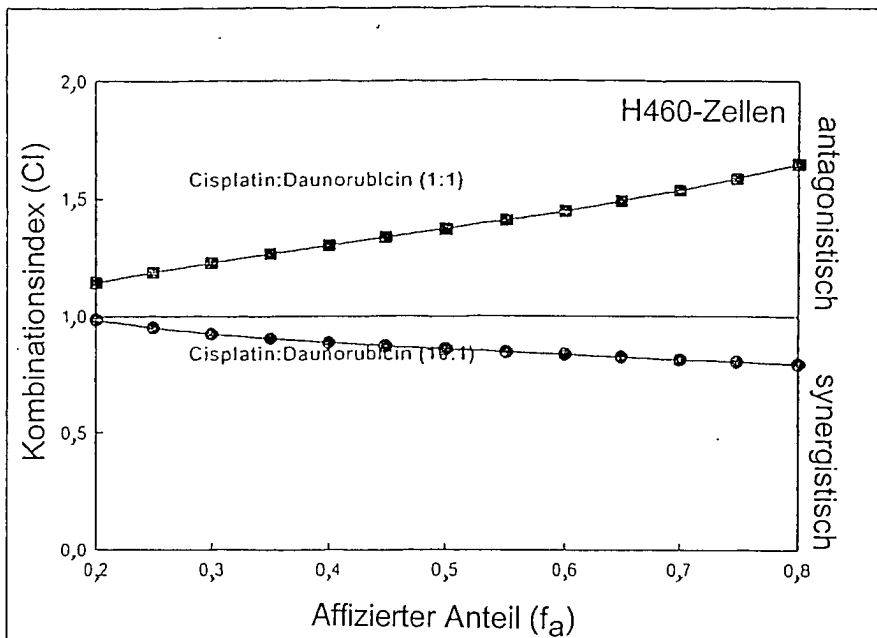
FIGUR 8



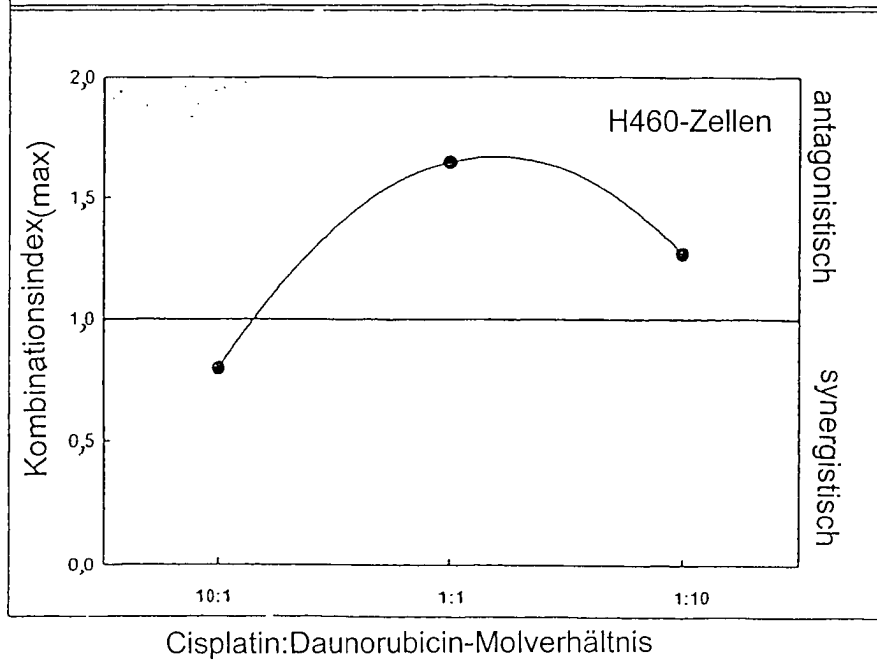
FIGUR 9



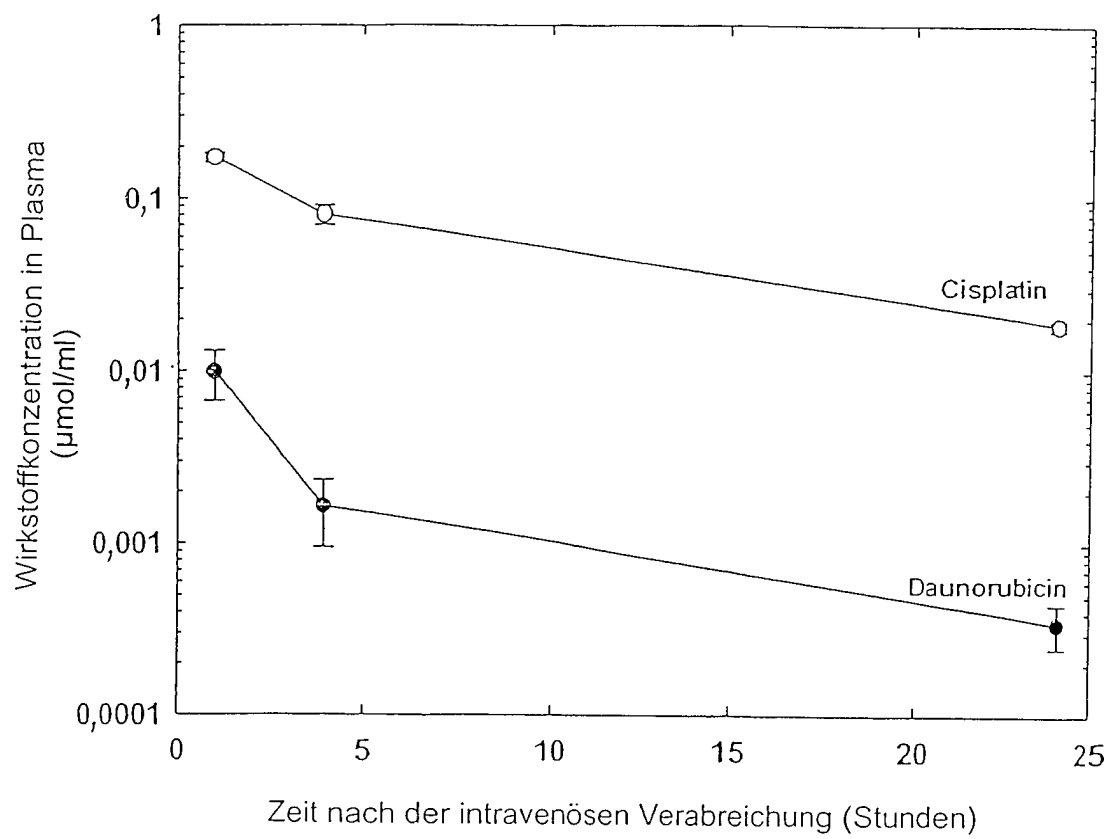
FIGUR 10



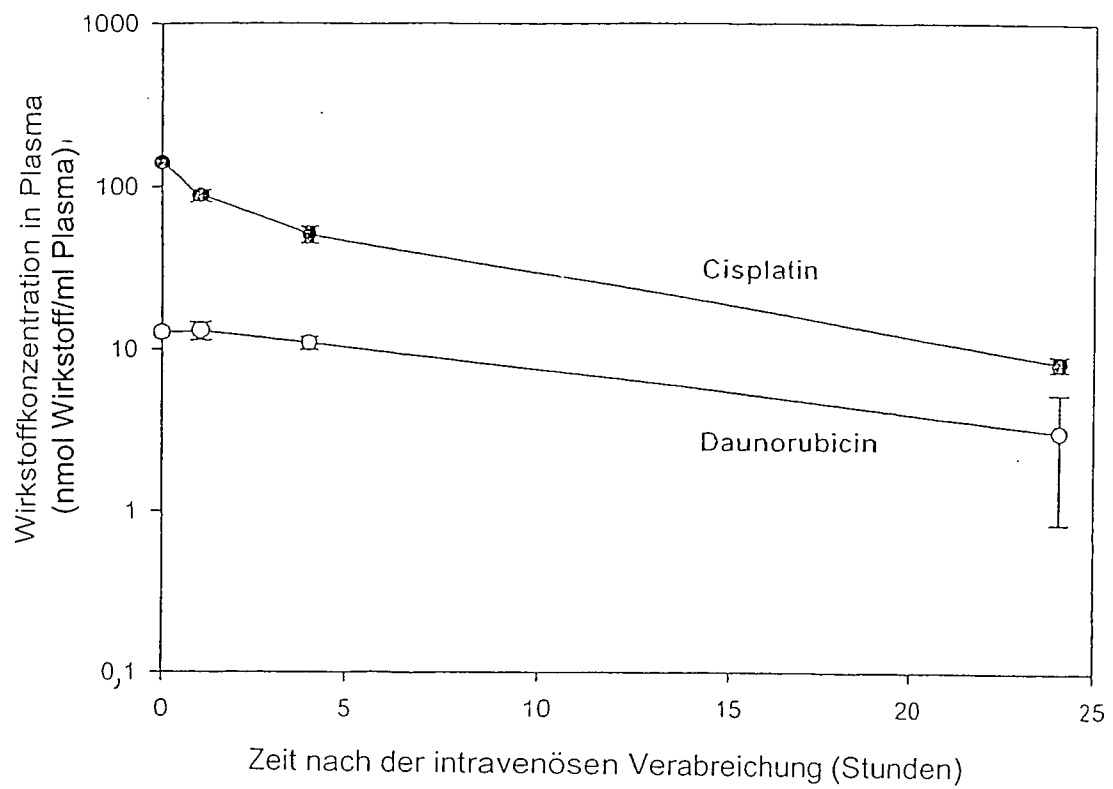
FIGUR 11A



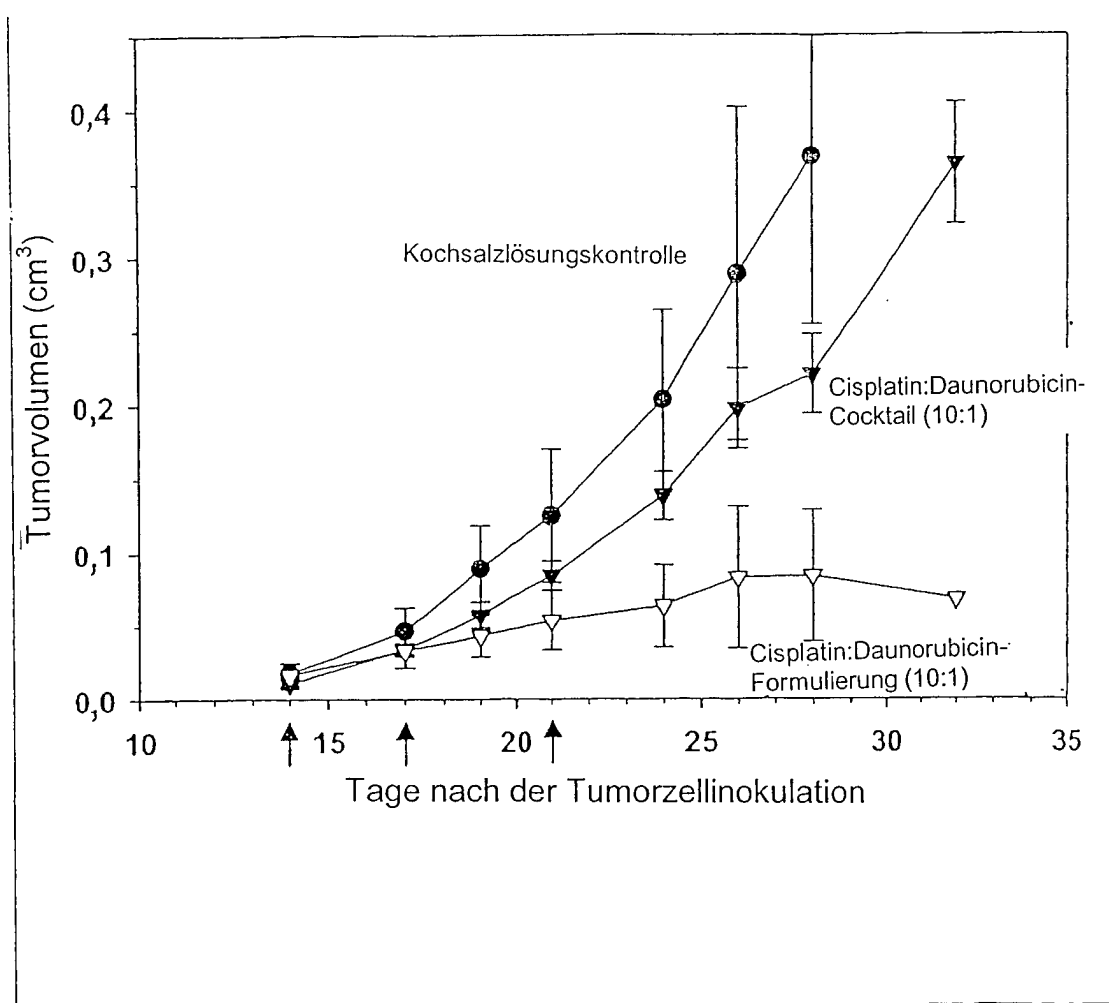
FIGUR 11B



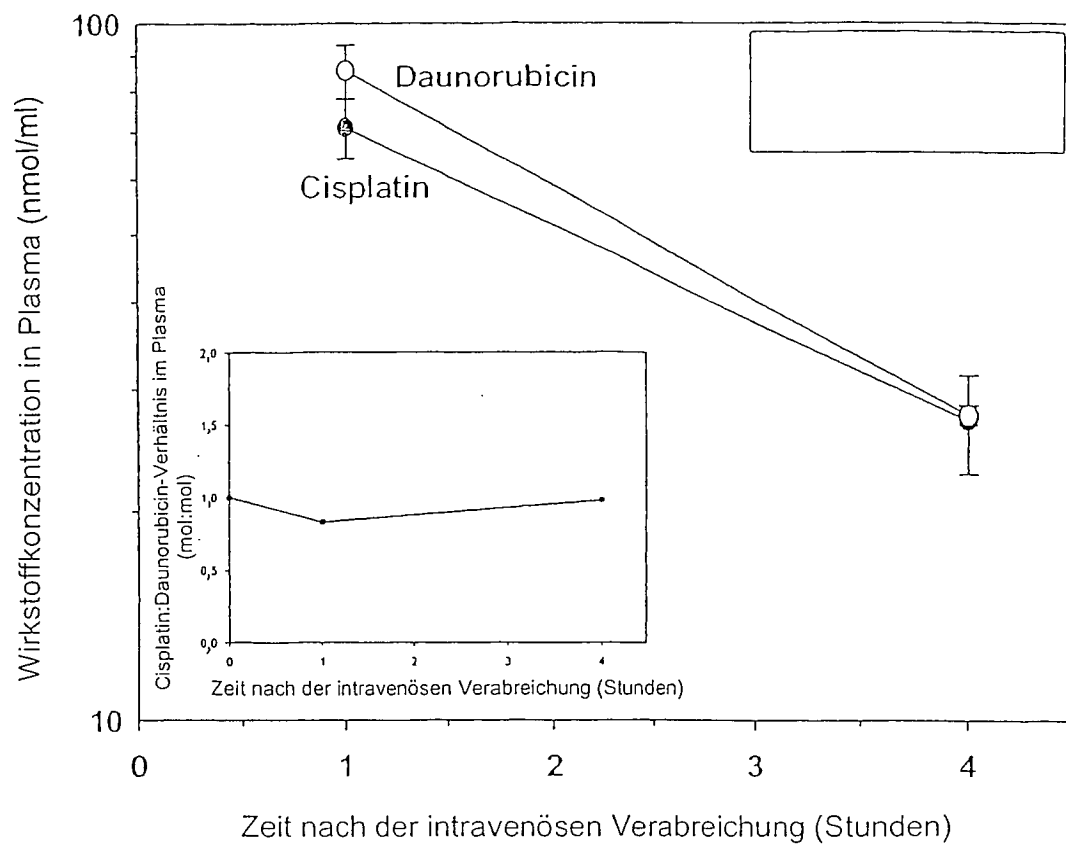
FIGUR 12



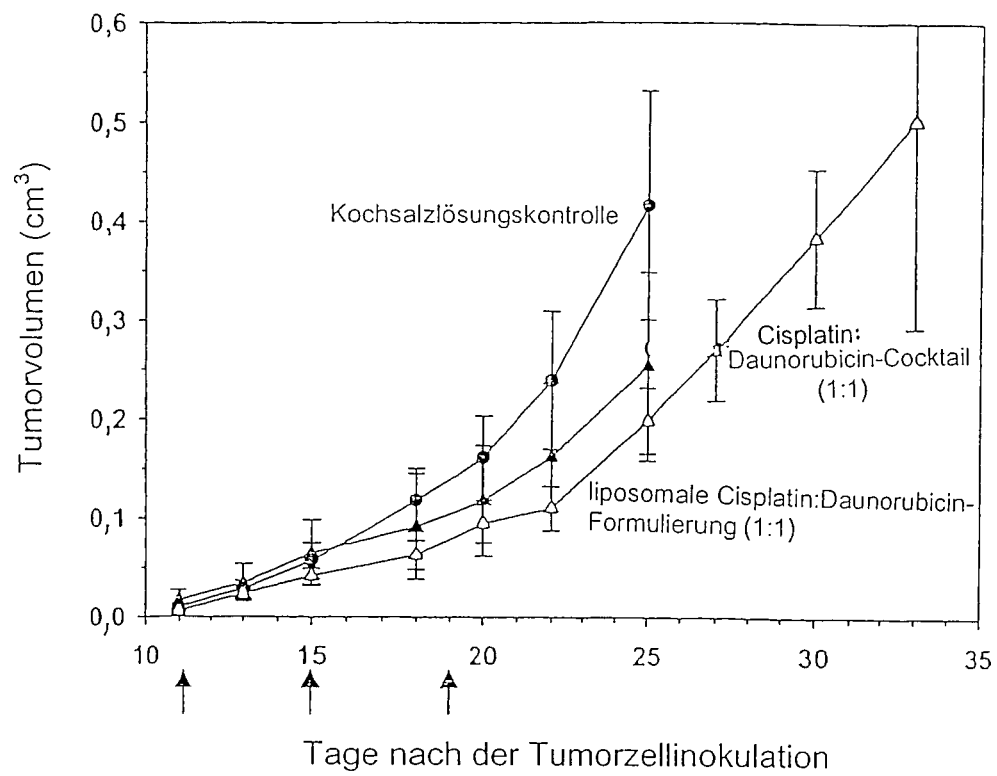
FIGUR 13



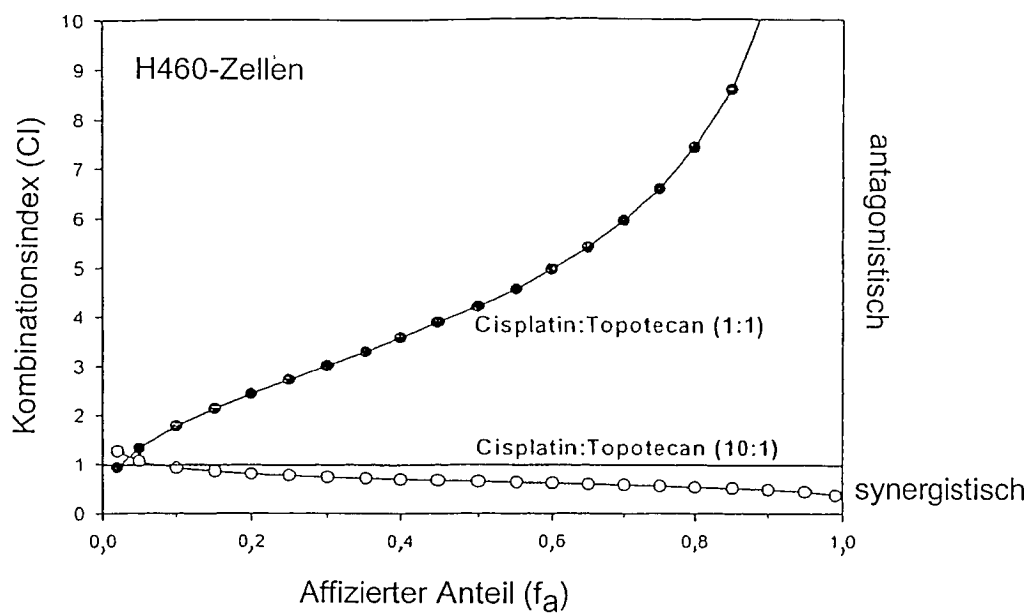
FIGUR 14



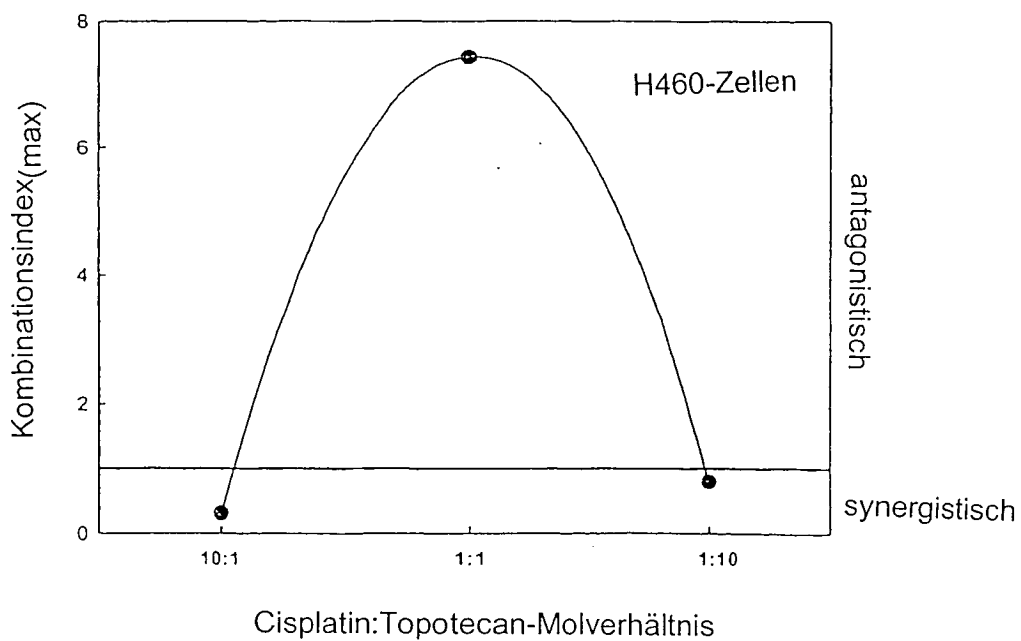
FIGUR 15



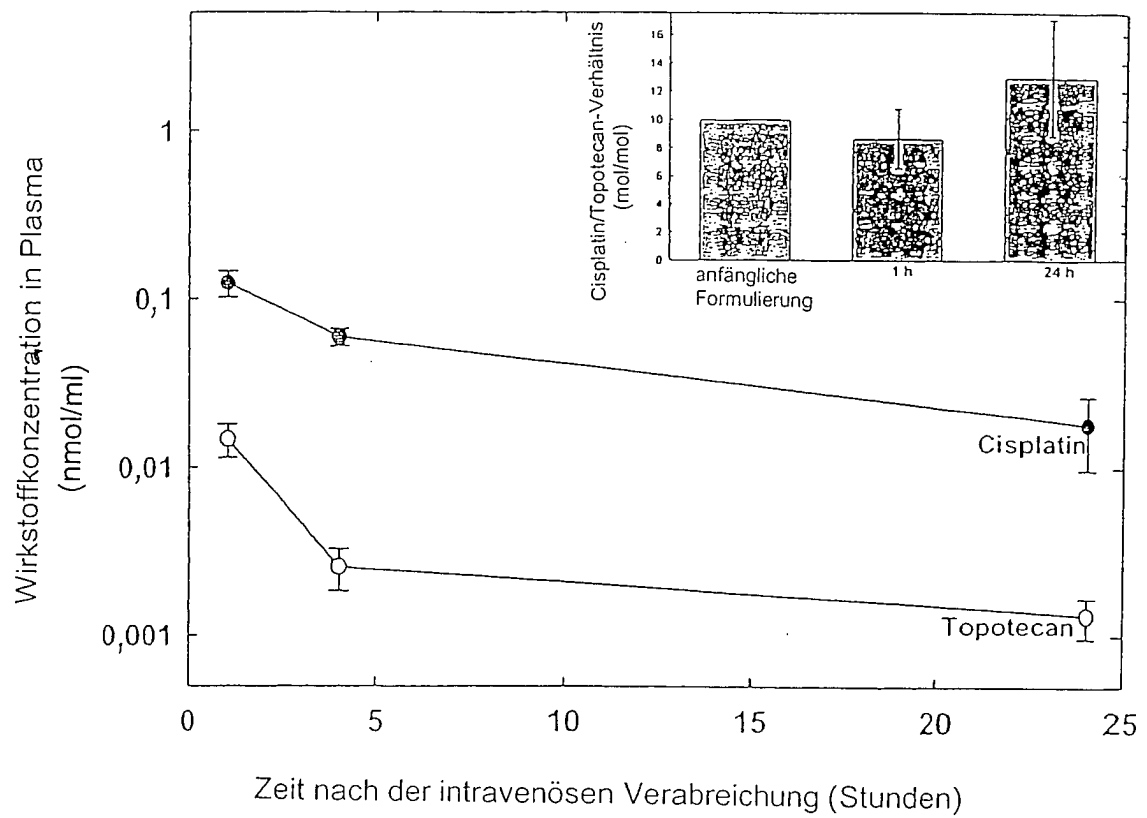
FIGUR 16



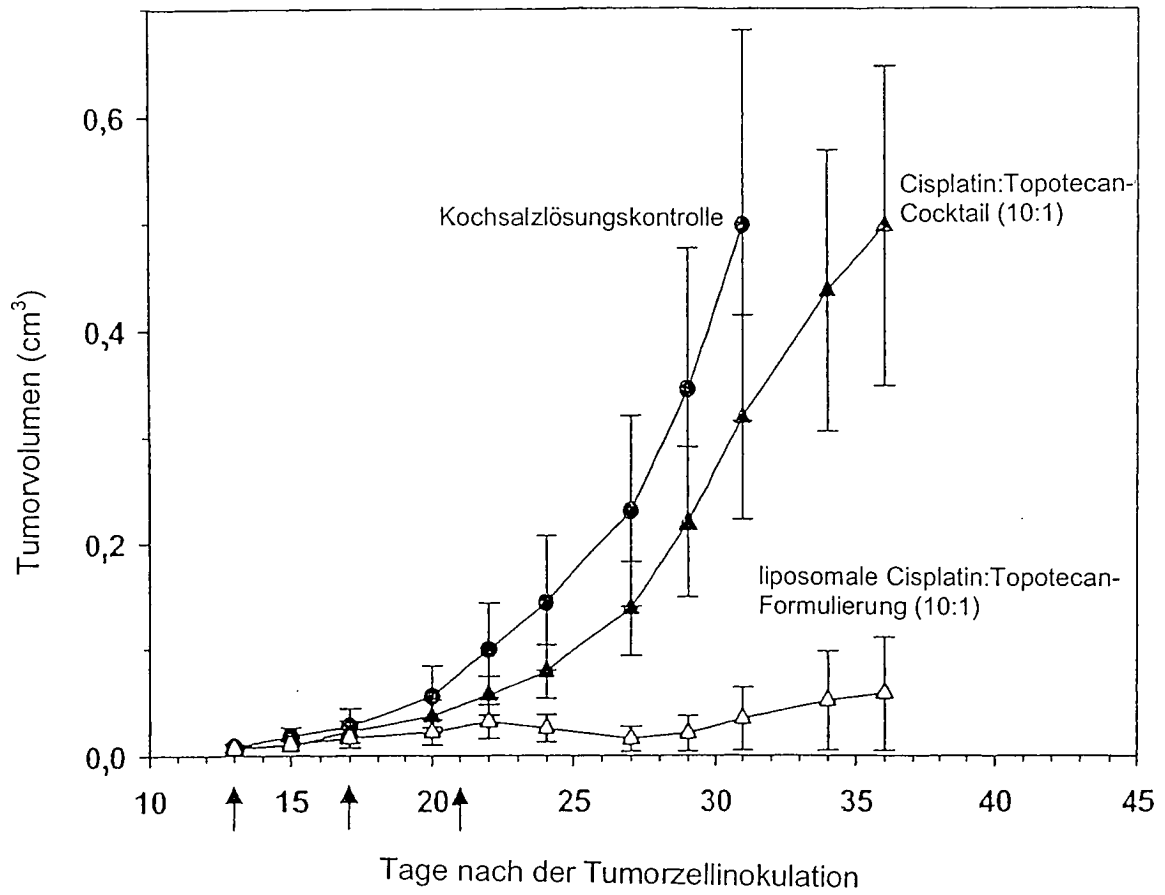
FIGUR 17A



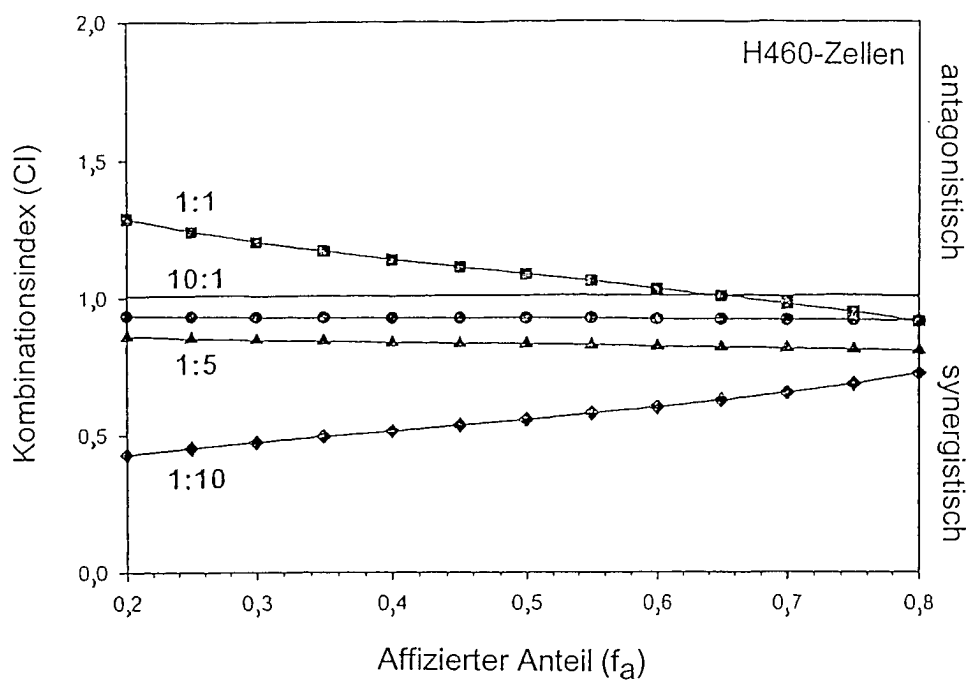
FIGUR 17B



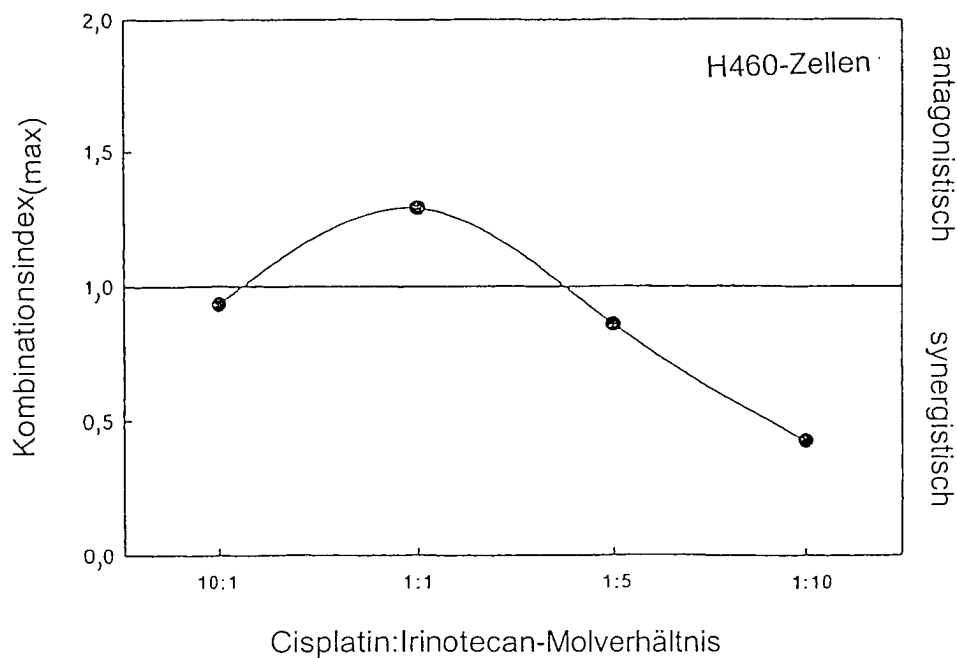
FIGUR 18



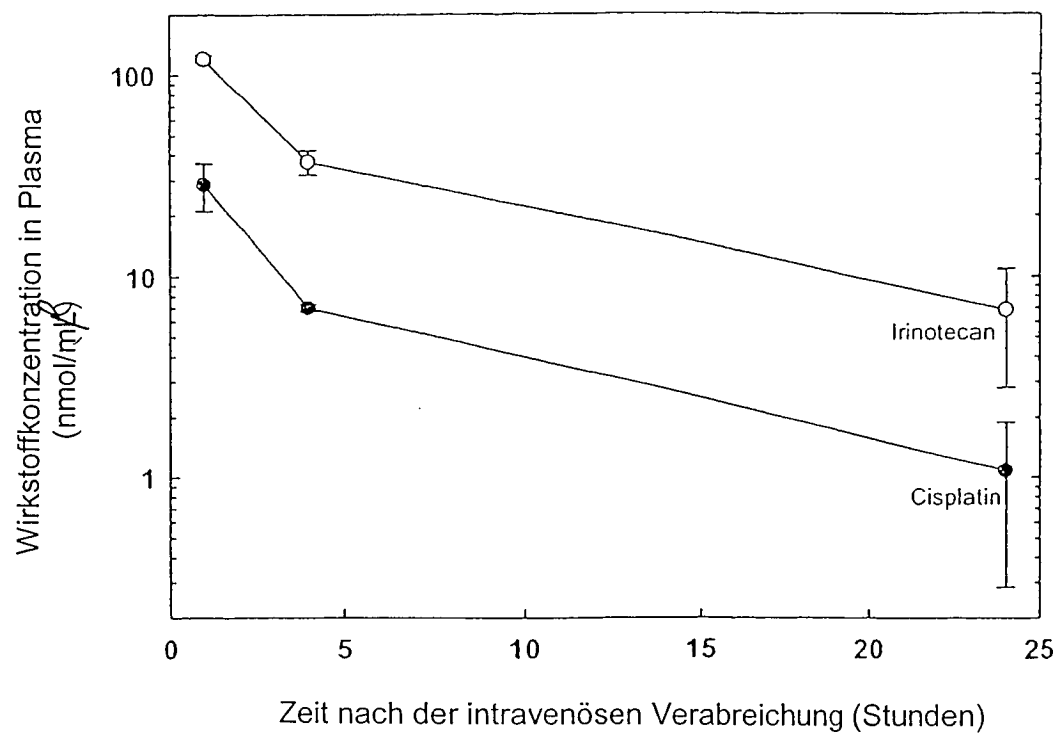
FIGUR 19



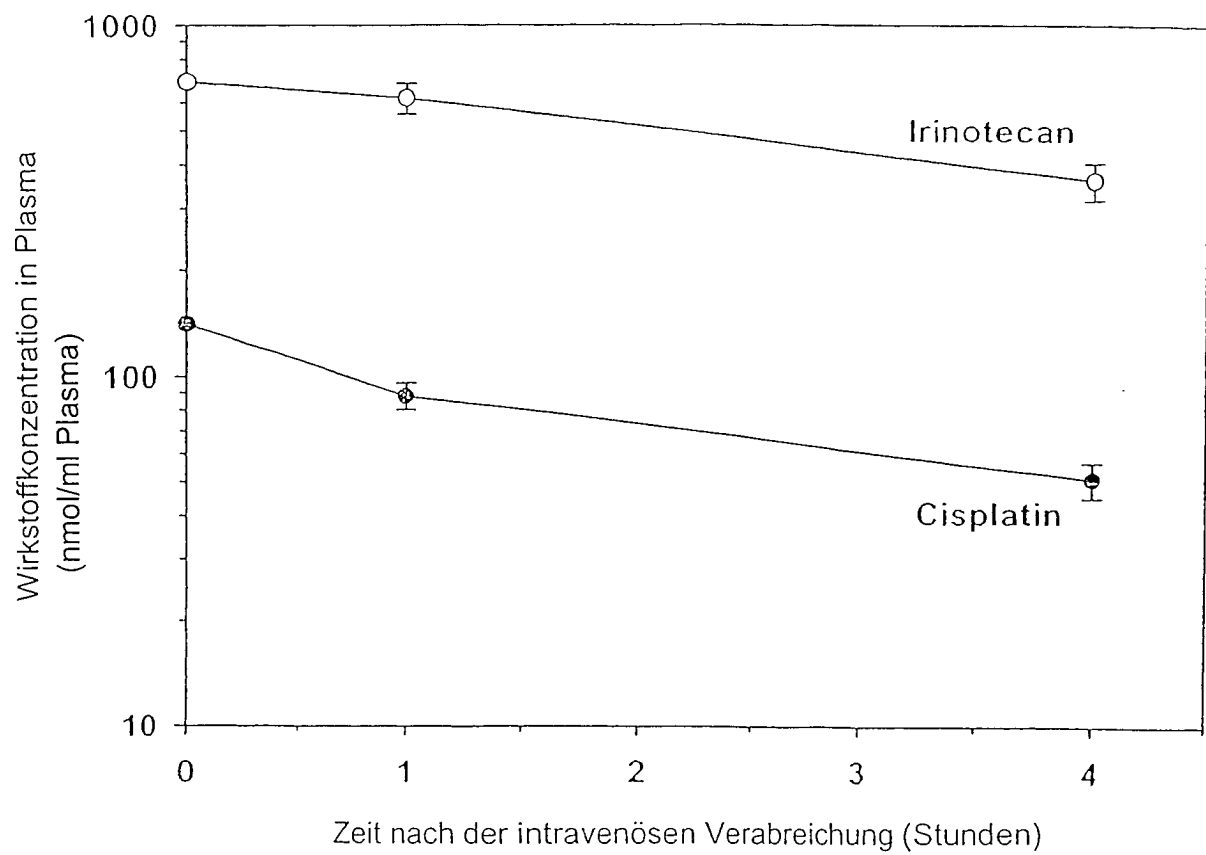
FIGUR 20A



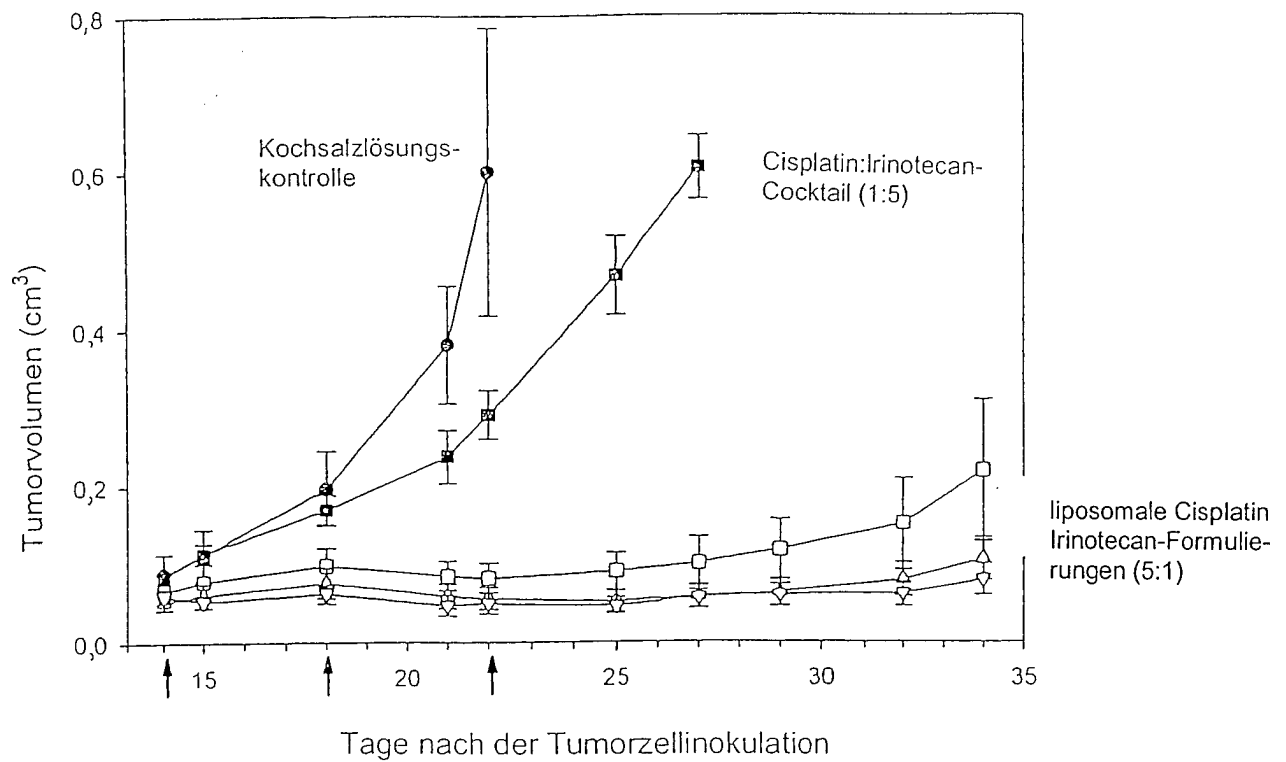
FIGUR 20B



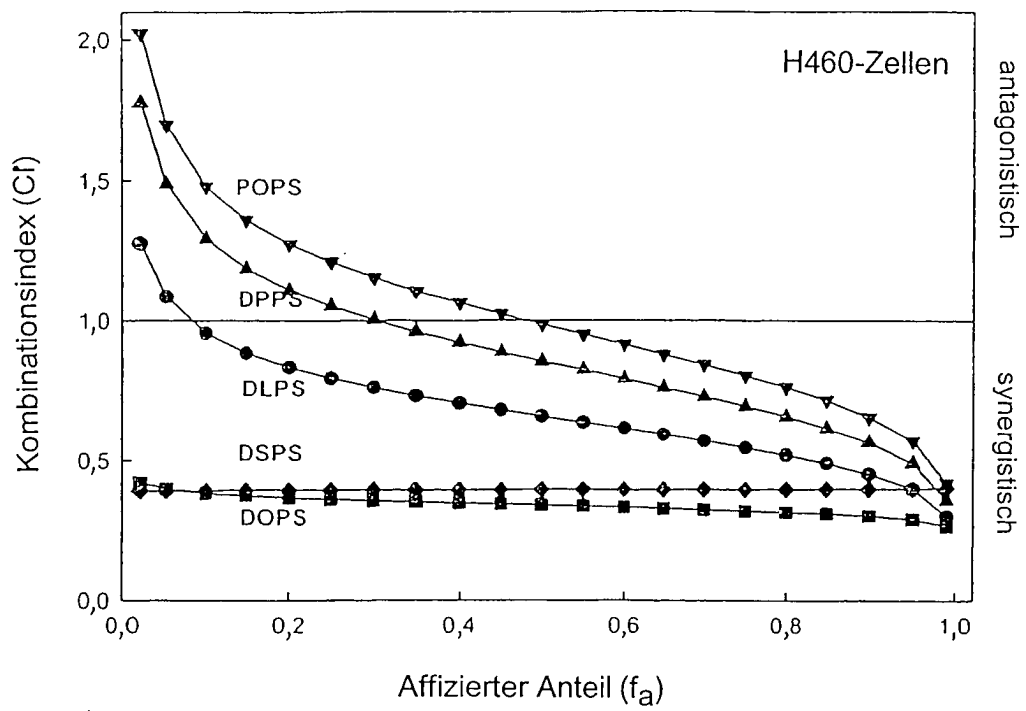
FIGUR 21



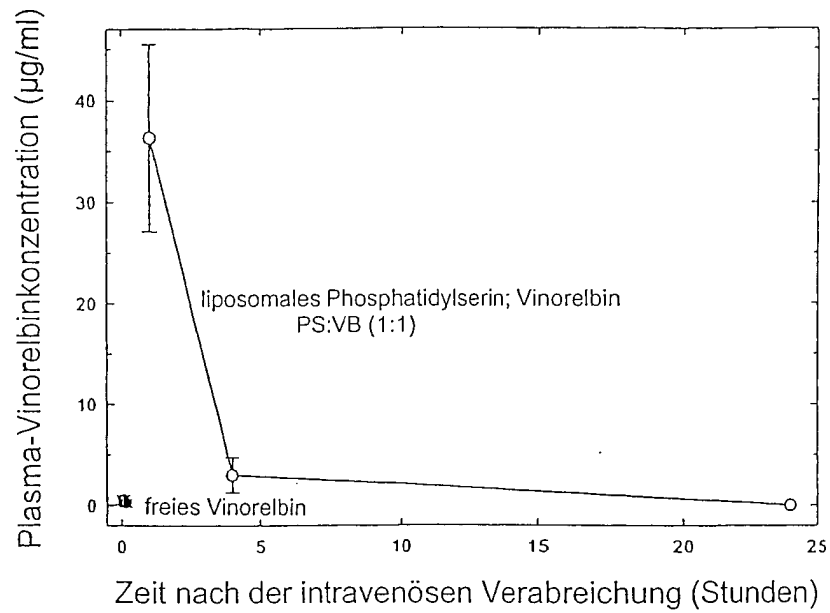
FIGUR 22



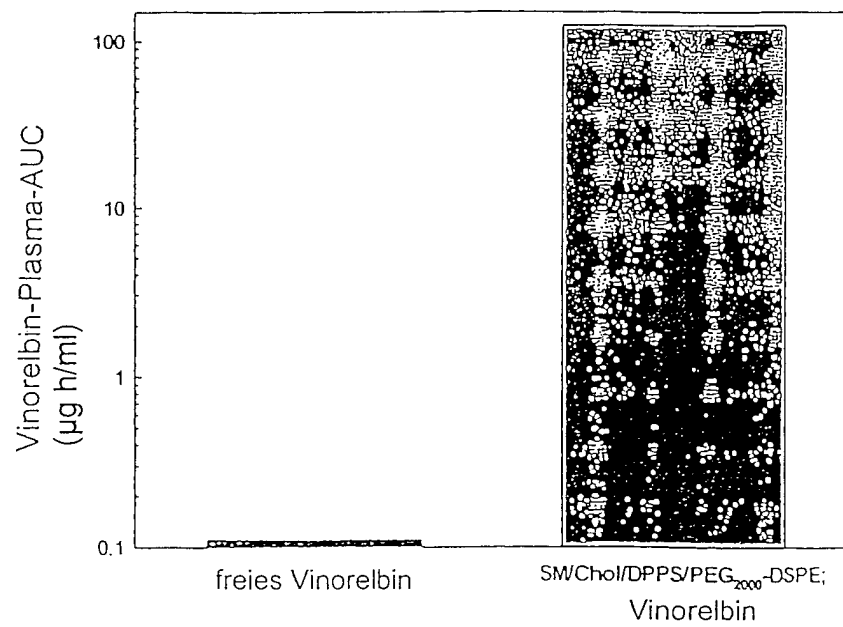
FIGUR 23



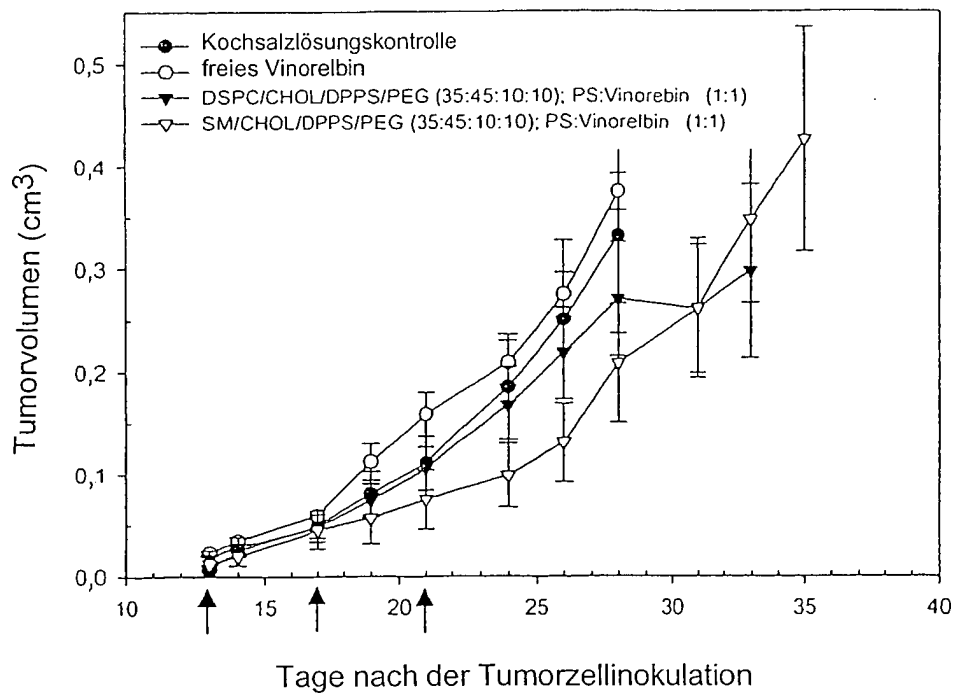
FIGUR 24



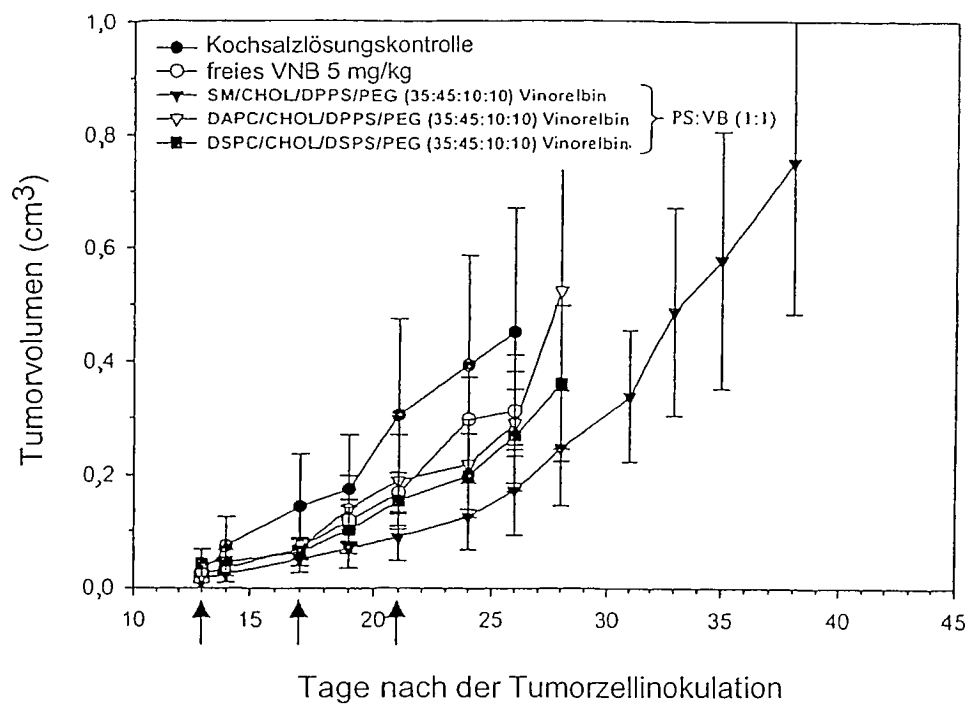
FIGUR 25A



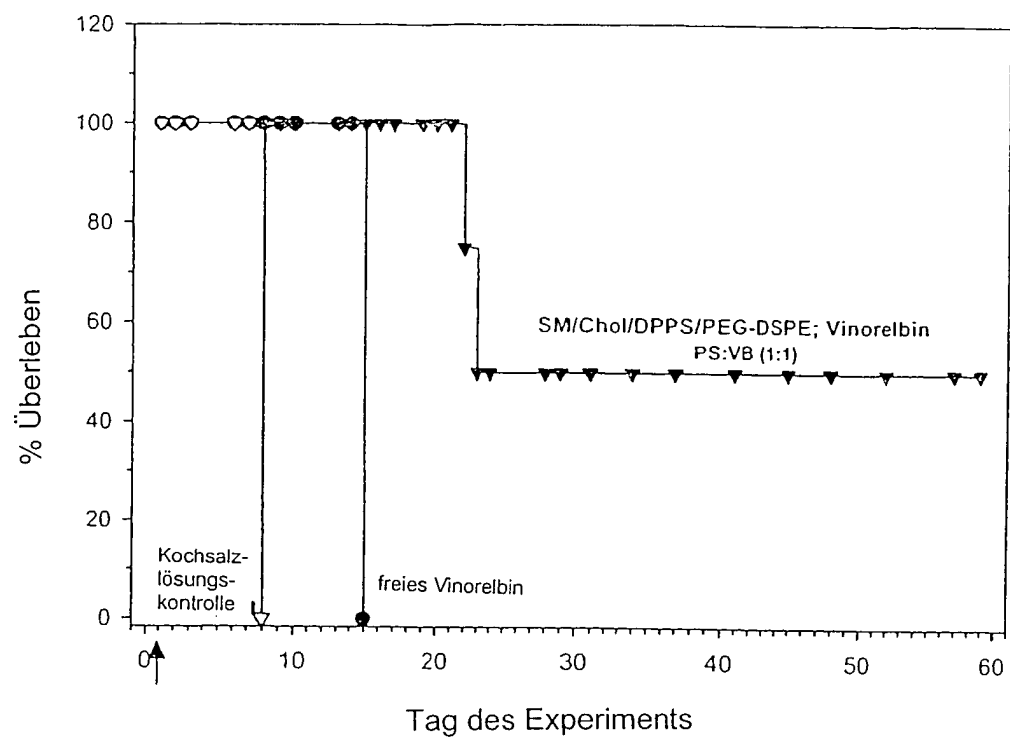
FIGUR 25B



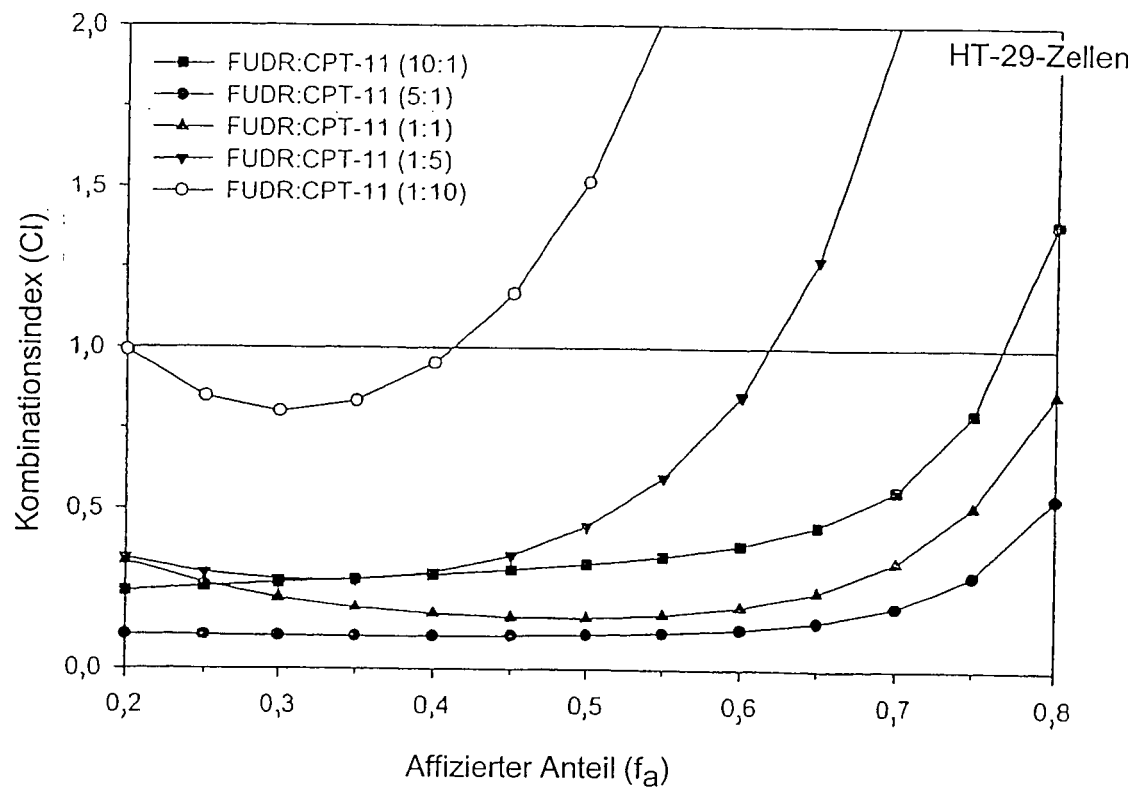
FIGUR 26



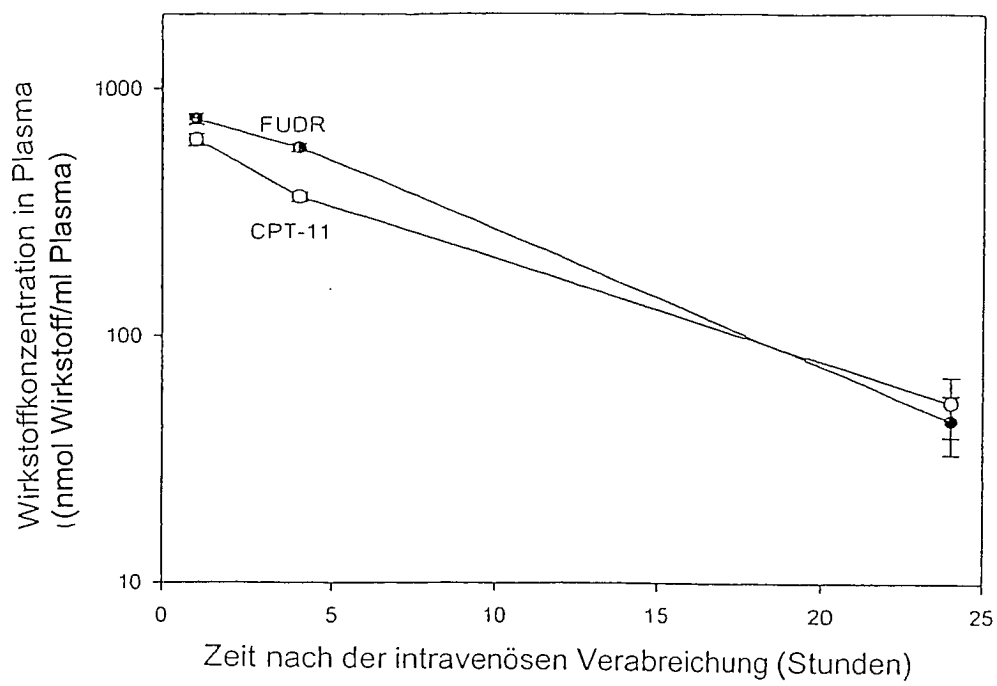
FIGUR 27



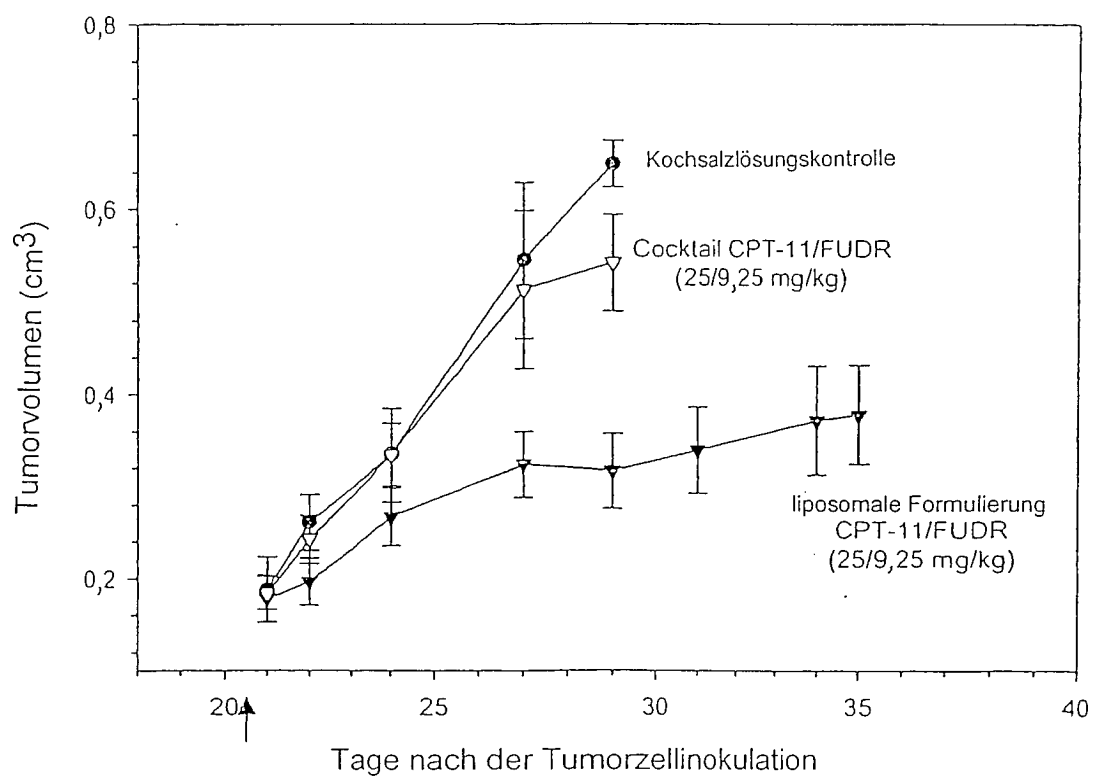
FIGUR 28



FIGUR 29



FIGUR 30



FIGUR 31