



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 770 T2** 2007.09.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 246 617 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 770.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/33103**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 983 965.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/039762**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.10.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/549** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

169122 P	06.12.1999	US
169127 P	06.12.1999	US
169128 P	06.12.1999	US

(73) Patentinhaber:

Rhode Island Hospital, Providence, R.I., US

(74) Vertreter:

Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**CALABRESI, Paul, Barrington, RI 02806, US;
DARNOWSKI, James, Barrington, RI 02806, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON TAUROLIDIN ODER TAURULTAM ZUR HERSTELLUNG EINES MEDIKA-
MENTS ZUR BEHANDLUNG VON OVARIALKARZINOMEN**

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

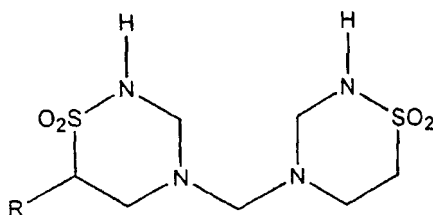
[0001] Die Erfindung betrifft die Therapie von Eierstockkrebs. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Taurolidin oder Taurultam zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von oder Prophylaxe vor Eierstockkrebs.

[0002] Trotz Fortschritten bei der Identifizierung chemotherapeutischer Mittel zum Inhibieren des Wachstums von Krebszellen bleibt Krebs eine schreckliche Krankheit mit einer hohen Sterblichkeitsrate. Ein signifikantes Problem der chemotherapeutischen Mittel ist die geringe Spezifität. Viele Antikrebsmittel unterscheiden nicht hinreichend zwischen normalen Zellen und Krebszellen. Als eine Folge haben diese oft unerwünschte ernste Nebenwirkungen.

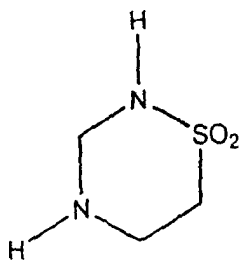
[0003] Die WO 92/00743 betrifft die Verwendung von Taurolidin und/oder Taurultam zur Behandlung von Tumoren im Allgemeinen. Die WO 98/52572 betrifft die Verwendung von Taurolidin zur Behandlung von Leukämien.

[0004] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung von Taurolidin oder Taurultam zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von oder Prophylaxe vor Eierstockkrebs, wie sie in Anspruch 1 unten beansprucht wird, zur Verfügung gestellt.

[0005] Die Erfindung sorgt für die Inhibition des Tumorwachstums in einem Säugetier mit wenigen oder ohne schädliche Nebenwirkungen, indem dem Säugetier eine Zusammensetzung verabreicht wird, welche eine aktive Taurolidin- oder Taurultamverbindung enthält. Die Verbindung kann verabreicht werden, um direkt mit einer Tumorzelle in einer Dosis in Kontakt zu treten, die ausreicht, um den Zelltod durch Apoptose zu induzieren. Vorzugsweise kann die Verbindung in einer Weise und in einer Dosis verabreicht werden, welche bevorzugt einen apoptotischen Tod im Vergleich zu einem nekrotischen Tod induziert. Die zu verabreichende Verbindung ist Taurolidin oder Taurultam:



Taurolidin



Taurultam

[0006] Die Verbindungen können allein oder in Kombination mit anderen antineoplastischen Mitteln verabreicht werden. Vorzugsweise töten die parallel verabreichten Mittel Tumorzellen durch einen Mechanismus, der von der Apoptose verschieden ist. Beispielsweise wird ein Antimetabolit, ein Purin- oder Pyrimidinanalogon, ein Alkylierungsmittel, Vernetzungsmittel (z.B. eine Platinverbindung) und interkalierendes Mittel und/oder ein Antibiotikum in einem Kombinationstherapieregime verabreicht. Das parallel verabreichte Arzneimittel kann vor, nach oder gleichzeitig mit einer Taurolidin- oder Taurultamverbindung verabreicht werden.

[0007] Der Tumor kann ein arzneimittelresistenter Tumor, z.B. ein Tumor mit multipler Arzneimittelresistenz (MDR), in einem Säugetier sein, wobei dem Säugetier eine Taurolidin- oder Taurultamverbindung verabreicht wird. Der zu behandelnde Tumor kann ein Karzinom sein. Der arzneimittelresistente Tumor kann ein solider Tumor sein.

[0008] Vorzugsweise kann die Verbindung, d.h. Taurolidin oder Taurultam, in einer Weise verabreicht werden, welche einen direkten Kontakt mit der Oberfläche der Tumorzelle erlaubt. Die Verbindung bindet an eine Komponente, z.B. einen Zelloberflächen-Polypeptidliganden oder einen anderen Zelloberflächenanteil, um eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade zu starten, welche in dem Zelltod durch Apoptose gipfelt. Alternativ wird die langsame Freisetzung der Verbindung an irgendein Gewebe erreicht, indem eine Arzneimittel-beladene Matrix in direktem Kontakt mit oder benachbart zu dem Ort des Tumors implantiert wird.

[0009] Die Verbindungen können zur Verabreichung, um direkt Krebszellen zu kontaktieren, z.B. in der Form einer wässrigen Lösung formuliert sein.

[0010] Es folgt eine beispielhafte Beschreibung nur mit Bezug auf die begleitenden Zeichnungen von Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

[0011] In den Zeichnungen:

[0012] ist [Fig. 1](#) ein Schaubild der Struktur von Taurolidin und von dessen Hauptabbauprodukten oder Metaboliten (Taurultam, Taurinamid und Taurin). Beim Abbau erzeugt jedes Molekül von Taurolidin 3 Methylohaltige Anteile, die an den antibiotischen und anti-Endotoxin-Aktivitäten von Taurolidin beteiligt sind.

[0013] ist [Fig. 2](#) ein Balkendiagramm, welches die Wirkung einer 48 h-Exposition an Taurolidin auf das Erscheinen von DNA-Trümmern in PA-1-, SKOV-3- und NIH-3T3-Zellen zeigt. Drei $\times 10^5$ Zellen wurden in Plastikgewebekulturkolben angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin zugegeben, um Endkonzentrationen von 25 μM , 50 μM oder 100 μM zu erzielen. Kontrollkulturen erhielten ein geeignetes Volumen von Kollidin-17P. Nach einem 48 h-Zeitraum der Taurolidinexposition wurden Zellen geerntet und mit Propidiumiodid angefärbt. Der Prozentsatz an DNA-Trümmern in dem sub-G₀/G₁-Bereich wurde unter Verwendung von zytofluorometrischen Techniken festgestellt. Jeder Balken stellt den Mittelwert (\pm SE) von drei Bestimmungen dar. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

[0014] ist [Fig. 3](#) ein Balkendiagramm, welches die Wirkung einer 24 h-Exposition an Taurolidin auf die Externalisierung von Membranphosphatidylserin in PA-1-, SKOV-3- und NIH-3T3-Zellen zeigt. Drei $\times 10^5$ Zellen wurden in Plastikgewebekulturkolben angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin zugegeben, um Endkonzentrationen von 25 μM , 50 μM oder 100 μM zu erzielen. Kontrollkulturen erhielten ein geeignetes Volumen von Kollidin-17P. Nach zusätzlichen 24 h wurden Zellen geerntet und die Externalisierung von Phosphatidylserin bestimmt, indem die Annexin-V-FITC-Bindung unter Verwendung von zytofluorometrischen Techniken festgestellt wurde. Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm SEM von vier Bestimmungen dar. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

[0015] ist [Fig. 4](#) eine Photographie, welche die Ergebnisse einer Western Blot-Analyse der Wirkung einer 24 h-Exposition an 50 oder 100 μM Taurolidin auf die PARP-Expression und das Erscheinen eines Haupt-PARP-Spaltungsprodukts in PA-1-, SKOV-3- und NIH-3T3-Zellen zeigt. Zwei $\times 10^6$ Zellen wurden in 150 cm^2 -Gewebekulturkolben angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin in Konzentrationen von 50 μM oder 100 μM zugegeben. Nach zusätzlichen vierundzwanzig Stunden wurden Zellen geerntet, die Zellenzahl bestimmt, und Aliquots, die von gleichen Zellenzahlen abgeleitet waren, von jeder Expositionsbedingung erzeugt. Die gesamten Proteine aus diesen Ganzzelllysaten wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulosefilter überführt. Die Filter wurden dann einem Immunoblot unterzogen, um intaktes PARP-Protein und Spaltungsfragmente nachzuweisen, indem der monoklonale anti-PARP-Mausantikörper Klon C-2-10 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) verwendet wurde. Die resultierenden Protein-Antikörper-Komplexe wurden durch Chemilumineszenztechniken sichtbar gemacht.

[0016] ist [Fig. 5](#) ein Balkendiagramm, welches die Auswirkung der verzögerten Verabreichung eines einzelnen 3 Tage (3 d)-intraperitonealen (i.p.)-Bolusinjektionsregimes von Taurolidin (20 mg/Maus/Injektion) auf das Auftreten von i. p. menschlichen Tumorfremdtransplantaten (tumor xenografts) in weiblichen Nacktmäusen nach der i.p.-Verabreichung von 5×10^6 menschlichen SKOV-3-Eierstocktumorzellen zeigt. Die Taurolidintherapie wurde am Tag der Tumorzellinokulation oder bis zu 5 d danach begonnen. Vierzehn Tage nach der letzten Taurolidininjektion wurden Mäuse in allen Gruppen geopfert und die Bauchhöhle auf das Vorliegen von Tumoren untersucht. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt, und die Gesamtzahl an Tieren in jeder Gruppe reichte von 15–21.

[0017] ist [Fig. 6](#) ein Balkendiagramm, welches die Auswirkung der verzögerten Verabreichung eines einzelnen 3 d-i.p.-Bolusinjektionsregimes von Taurolidin (20 mg/Maus/Injektion) auf das Gewicht von i. p. menschl-

chen Tumorfremdtransplantaten in weiblichen Nacktmäusen nach der i.p.-Verabreichung von 5×10^6 menschlichen SKOV-3-Eierstocktumorzellen zeigt. Die Tauroolidintherapie wurde am Tag der Tumorzellinokulation oder bis zu 5 d danach begonnen. Vierzehn Tage nach der letzten Tauroolidininjektion wurden Mäuse in allen Gruppen geopfert, i.p. Eierstocktumorfremdtransplantate entfernt und der Tumor gewogen. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt, und die Gesamtzahl an Tieren in jeder Gruppe reichte von 15–21. Jeder Balken repräsentiert das mittlere (\pm SE) Tumorgewicht von 15–21 Tieren. *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

[0018] Es wurde gefunden, dass Tauroolidin und Taurultam sichere und wirksame antineoplastische Mittel sind, welche vorzugsweise den apoptotischen Tod in Krebszellen induzieren. Die Verbindungen induzieren den apoptotischen Tod von Tumorzellen.

Therapeutische Verbindungen

[0019] Es wurde gefunden, dass Tauroolidin für Krebszellen selektiv toxisch ist, ohne normale Zellen (d.h. nichtkrebsartige) Zellen zu töten. Tauroolidin, Taurultam oder Derivate oder Metaboliten von diesen weisen eine hohe Affinität auf für und binden selektiv an einen Anteil auf der Oberfläche einer Krebszelle (z.B. einen Phosphatidylserinrezeptor) und induzieren Apoptose in dieser Zelle, was wiederum zu Zytotoxizität führt. Eine Aufnahme der Verbindung in die Zelle kann zur Induktion des apoptotischen Todes einer Krebszelle nicht notwendig sein.

[0020] Die Zytotoxizität oder der Zelltod können entweder durch Nekrose oder Apoptose stattfinden. Die Nekrose, welche nicht genetisch gesteuert ist, ist gewöhnlich das Ergebnis einer physikalischen oder chemischen Verletzung. Die Apoptose ist genetisch gesteuert und ist eine zelluläre Antwort auf spezifische Reize, z.B. ein an der Zelloberfläche erzeugtes Signal. Die Nekrose beinhaltet die Zerstörung von zytoplasmatischen Organellen und einen Verlust der Plasmamembranintegrität, wogegen Zellen, die eine Apoptose durchmachen, ein Schrumpfen der Zelle, ein Blebbing der Membran, Kondensation und Fragmentation von Chromatin zeigen. Nach der DNA-Schädigung in dem Caspaseenzym-Stoffwechselweg gibt es eine Reihe von Vorfällen, die auftreten, welche eine Calciumaktivierung und Calpain-Enzyme beinhalten, was weiterhin zu anderen zellulären Änderungen und der Regulation von zytoplasmatischen Enzymen führt.

[0021] Ein Hauptunterschied zwischen der Nekrose und der Apoptose in vivo ist die Eliminierung der apoptotischen Zelle bevor eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Im Gegensatz zu der Apoptose von Zellen verursacht die Nekrose von Zellen eine Entzündung. Somit bietet die Induktion der Zytotoxizität von Krebszellen durch Apoptose beträchtliche Vorteile gegenüber der Induktion des Zelltods durch herkömmliche chemotherapeutische Mittel, da der apoptotische Tod mit einer minimalen Schädigung für die umgebenden Zellen oder das Gewebe verbunden ist. Anders als viele herkömmliche chemotherapeutische Mittel sind Tauroolidin- oder Taurultamverbindungen, die gemäß der Erfindung verabreicht werden, zytotoxische Mittel, welche die Apoptose von Krebszellen (aber nicht von normalen nichtkrebsartigen Zellen) induzieren, um sicher die Tumorbeltung in einem Säugetier, das an Krebs leidet, zu verringern.

Funktionale Charakterisierung von Tauroolidin

[0022] Tauroolidin (TaurolinTM) wird chemisch als Bis-(1,1-dioxoperhydro-1,2,4-thiadiazinyl-4)methan identifiziert ([Fig. 1](#)). Es ist ein relativ kleines dimeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 284 (Knight et al., 1983, J. Pharm. Sci. 72: 705–707). Eine frühe Feststellung von dessen antibiotischer Aktivität zeigte, dass es gegenüber einem breiten Spektrum von aeroben und anaeroben Bakterienstämmen eine bakterizide Aktivität besaß. Die minimale Konzentration, die benötigt wurde, um das Bakterienzellwachstum (MIC) zu inhibieren, reichte von 0,01 bis 1 mg/ml, was von dem ausgewerteten Bakterienstamm abhing. Frühe Studien zeigten ebenfalls, dass Tauroolidin eine Aktivität gegenüber klinisch relevanten Pilzen aufwies. Die Konzentration, die benötigt wurde, um eine antifungale Aktivität auszuüben, ist ungefähr äquivalent zu der, die benötigt wird, um dessen antibakterielle Aktivität zu erzeugen.

[0023] Die antibiotische Aktivität von Tauroolidin hängt von einer chemischen Reaktion ab, die der Erzeugung von aktiven Methylolgruppen, die bei der Zersetzung des Tauroolidinstammoleküls gebildet werden ([Fig. 1](#)), nachgeordnet ist. Biochemische und morphologische Studien zeigten, dass von Tauroolidin abgeleitete Methylolgruppen-haltige Anteile mit Komponenten der Bakterienzellwand zu reagieren schienen. Das Ergebnis dieser chemischen Reaktion ist, dass eine Exposition an dieses Mittel signifikant die Fähigkeit der Mikroorganismen inhibiert, an biologischen Oberflächen wie z.B. Epithelzellen zu haften. Eine Exposition an Tauroolidin zerstörte die Struktur und verringerte die Anzahl an Fimbrien der Bakterienzelle, was anscheinend die Agglutination dieser Strukturen widerspiegelt. Es wird angenommen, dass die Modifikation dieser Oberflächenstrukturen

für die Fähigkeit von Taurolidin verantwortlich ist, die Anhaftung der Bakterienzelle zu stören. Zusätzlich zu dieser direkten Wirkung auf Komponenten der Bakterienzellwand besitzt Taurolidin ebenfalls eine anti-Endotoxin-Aktivität durch eine Verringerung der Synthese und Aktivität von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Taurolidin verringert ebenfalls das Ausmaß und die Schwere von postoperativen peritonealen Anhaftungen und ist klinisch, durch Lavage, nach einer Bauchraumoperation verabreicht worden, um postoperative Infektionen und Anhaftungen zu verringern wie auch um Peritonitis zu behandeln.

[0024] Taurolidin ist ein synthetisches Breitbandantibiotikum, das ebenfalls antifungale Aktivität besitzt. Mechanistisch reagiert es mit Komponenten der Bakterienzellmembran, um die Anhaftung von Bakterienzellen an Epithelzelloberflächen zu verhindern. Die Schlüsselrolle der Zellanhaftung bei dem Wachstum und der Entwicklung menschlicher solider Tumore bedenkend wurden Studien begonnen, um die zytotoxische Aktivität dieses Mittels gegenüber dem Wachstum einer Gruppen, bestehend aus 12 ausgewählten menschlichen und Maustumorzelllinien, festzustellen. Die Feststellung der wachstumsinhibitorischen Aktivität einer 3 d-Taurolidinexposition zeigte, dass dieses Mittel das Wachstum aller ausgewerteten Zelllinien mit IC_{50} s, die von 9,6–34,2 μ M reichten, inhibierte. Studien, um den (die) zugrunde liegenden Mechanismus(en) zu identifizieren, die für diese Wirkung verantwortlich waren, wurden in NIH-3T3-Mausfibroblasten und den menschlichen Eierstocktumorzelllinien PA-1 und SKOV-3 durchgeführt. Anfängliche Studien stellten die Wirkung einer 48 h-Exposition an Taurolidin auf die Zellzyklusverteilung fest. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass während Taurolidin eine geringe Wirkung auf den Zellzyklus in PA-1-Zellen aufwies, es in SKOV-3-Zellen den Prozentsatz an Zellen in der G_0/G_1 -Phase verringerte und den Prozentsatz an Zellen in sowohl S als auch G_2/M erhöhte. Bei diesen menschlichen Tumorzelllinien erhöhte die Taurolidinexposition signifikant DNA-Trümmer in dem sub- G_0/G_1 -Bereich, was eine Auswirkung ist, die mit einer Induktion von Apoptose konsistent ist. Im Gegensatz dazu erhöhte Taurolidin in NIH-3T3-Zellen den Prozentsatz an Zellen in der S-Phase, verringerte den Prozentsatz an Zellen in G_0/G_1 und erhöhte die DNA-Trümmer im sub- G_0/G_1 -Bereich nicht. Weitere Studien der Beziehung zwischen der Taurolidinexposition und der Tumorzellapoptose stellten nach einer 24 h-Exposition an Taurolidin eine Externalisierung von Phosphatidylserin fest, wobei die Annexin-V-Bindung als ein Zelloberflächenmarker verwendet wurde. Diese Studien zeigten, dass Taurolidin den Prozentsatz an Annexin-V-positiven Zellen in PA-1- und SKOV-3-Zellen 4- bzw. 3fach erhöhte. Im Gegensatz dazu erhöhte die Taurolidinexposition in NIH-3T3-Zellen leicht ($\sim 5\%$) die Annexin-V-Bindung. Komplementäre Studien bestimmten, ob eine 48 h-Exposition an entweder 50 oder 100 μ M Taurolidin die PARP-Spaltung in diesen Zellmodellen beeinflusste, und zeigte, dass Taurolidin sowohl in PA-1- als auch SKOV-3-Zellen die PARP-Spaltung induzierte. Insgesamt zeigen diese in vitro-Ergebnisse, dass Taurolidin eine für Tumorzellen zytotoxische Aktivität besitzt, welche mit dessen Fähigkeit korreliert, spezifisch Apoptose zu induzieren. Schließlich wurden Studien an Mäusen durchgeführt, um die antineoplastische Aktivität dieses Mittels festzustellen. Anfängliche Studien stellten die Toxizität von 3 aufeinander folgenden täglichen i.p.-Bolinjektionen von Taurolidin bei Dosen, die von 5 mg/Injekt./Maus–30 mg/Injekt./Maus reichten, fest. Die Dosis von 20 mg/Injekt. erzeugte eine Sterblichkeit von $\sim 10\%$ und wurde in diesem Modell als die MTD identifiziert. Die Verabreichung dieses Taurolidinregimes an Nacktmäuse, welche i.p. menschliche Eierstocktumorfremdtransplantate trugen, führte zu einer signifikanten Inhibition von sowohl der Tumorbildung als auch des -wachstums. Diese Funde zeigen, dass Taurolidin eine neue Klasse von antineoplastischen Mitteln repräsentieren kann, und sie werden im Lichte ihrer klinischen Bedeutungen diskutiert.

[0025] Die Erfindung basiert auf dem Fund, dass zusätzlich zu den oben diskutierten Aktivitäten Taurolidin selektiv und verlässlich das Tumorzellwachstum inhibiert und Tumorzellen selektiv tötet, indem Apoptose induziert wird. Es wurde nun gefunden, dass Taurolidin wenigstens 28 verschiedene menschliche Tumorzelllinien, einschließlich Eierstock-, Brust-, Gehirn-, Darm-, Prostata-, Harnblasen- und Lungentumoren wie auch Melanomen, Mesotheliomen, Laryngealkarzinomen, Leukämien und Lymphomen, tötet. Zusätzlich wurden mehrfach arzneimittelresistente Gliomzellen und myelodysplastische Syndromzellen (ein präkanzeröser Zelltyp) durch Taurolidin getötet. Die Inhibition des Tumorzellwachstums und die Induktion des apoptotischen Tumorzelltods tritt bei Taurolidinkonzentrationen auf, die signifikant niedriger sind als jene, welche für eine antibiotische Aktivität benötigt werden. Beispielsweise wird Taurolidin für antineoplastische Anwendungen in einer Dosis verabreicht, die wenigstens 10% geringer, vorzugsweise wenigstens 20% geringer, insbesondere wenigstens 50% geringer und bis zu einer logarithmischen Einheit geringer ist als die Dosis, die für eine antibakterielle oder antiadhäsive Aktivität benötigt wird.

[0026] Taurolidin ist für Tumorzellen (nicht aber normale Nichttumorzellen), unabhängig von dem Ursprung des Tumors, toxisch. Die Apoptose von Tumorzellen wird nach einer Inkubation mit Taurolidin für so wenig wie eine Stunde in Kultur induziert.

[0027] Taurolidin ist ebenfalls in einer Kombinationstherapie nützlich. Die Daten zeigen, dass Taurolidin nütz-

lich ist, um die Zytotoxizität anderer chemotherapeutischer Mittel und/oder einer Strahlentherapie zu erhöhen, indem gewisse Typen von Krebszellen veranlasst werden, in die „S“-Phase einzutreten.

Taurolidin und Angiogenese

[0028] Patienten mit metastasierendem Darmkrebs wurden mit Taurolidin behandelt, und mehrere Faktoren, welche die Angiogenese steuern, wurden gemessen. Es wurde gefunden, dass vier Faktoren, welche das Wachstum von Blutgefäßen steuern (Gewebeekrosefaktor (TNF); Interleukine 1, 6 und 10; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF); und Tumorstromafaktor β (TGF)), bei mit Taurolidin behandelten Versuchspersonen im Vergleich zu Versuchspersonen, die ein Placebo erhielten, verringert waren. Diese Daten zeigen, dass Taurolidin ein Antiangiogenesemittel ist. (Die Verwendung von Taurolidin oder Taurultam zur Behandlung von Krebsarten außer Eierstockkrebs wird hierin nicht beansprucht).

Therapeutische Verabreichung

[0029] Eine wirksame Menge einer therapeutischen Verbindung beträgt vorzugsweise von ca. 0,1 mg/kg bis ca. 150 mg/kg. Jedoch können aufgrund der geringen Toxizität von Taurolidin- und Taurultamverbindungen höhere Dosen ohne schädliche Nebenwirkungen verabreicht werden. Eine Dosis, die wirksam ist, um die Apoptose von Krebszellen zu induzieren, liegt in einer Größenordnung niedriger als Dosen, die zu antiseptischen, antibakteriellen, antitoxischen oder Antiadhäsionszwecken verabreicht werden. Eine apoptotische Dosis von Taurolidin oder Taurultam, die wirksam ist, um die Apoptose zu induzieren (z.B. 0,5 μ g/dl), ist ebenfalls signifikant geringer als Dosen, die früher als potentiell nützlich bei der Behandlung gewisser Krebsarten vorgeschlagen wurden (z.B. 150–450 mg/kg). Wirksame Dosen variieren, wie von den Fachleuten auf dem Gebiet anerkannt wird, in Abhängigkeit von dem Verabreichungsweg, der Arzneimittelträgerverwendung und der parallelen Verabreichung mit anderen therapeutischen Behandlungen einschließlich der Verwendung von anderen Antitumormitteln (z.B. einem Antimetaboliten, einem Purin- oder Pyrimidinanalogon, einem Alkylierungsmittel, Vernetzungsmittel, interkalierenden Mittel oder einem Antibiotikum) und einer Strahlentherapie.

[0030] Ein therapeutisches Regime wird durchgeführt, indem ein Säugetier, z.B. ein menschlicher Patient, welcher an einem Krebs oder Metastasen leidet (oder das Risiko aufweist, diese zu entwickeln), unter Verwendung von Standardmethoden identifiziert wird. Beispielsweise wird Taurolidin oder Taurultam einem Individuum, bei welchem ein Krebs diagnostiziert wurde, oder einem Individuum, bei dem ein präkanzeröser Zustand diagnostiziert wurde, verabreicht. Die pharmazeutische Verbindung kann einem solchen Individuum unter Verwendung von Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind, verabreicht werden. Vorzugsweise kann die Verbindung oral, topisch oder parenteral, z.B. subcutan, intraperitoneal, intramuskulär und intravenös, verabreicht werden. Eierstockkrebs kann durch Intraperitoneal-Lavage unter Verwendung einer pharmazeutisch verträglichen Lösung von Taurolidin oder Taurultam behandelt werden. Die Verbindung kann prophylaktisch, nach der Entdeckung eines rekurrenden Tumors oder zur Zeit der Operation verabreicht werden. Die Verbindung kann als eine Komponente eines Cocktails von chemotherapeutischen Arzneimitteln formuliert werden, um einen primären Eierstockkrebs zu behandeln oder rekurrende Tumore zu verhindern. Beispiele für Formulierungen, die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, beinhalten wässrige Lösungen des aktiven Mittels in einer isotonischen Salzlösung, eine 5% Glucoselösung oder einen anderen pharmazeutisch verträglichen Standardträger. Standardmäßige Solubilisierungsmittel wie z.B. PVP oder Cyclodextrine werden ebenfalls als pharmazeutische Träger zur Beförderung der therapeutischen Verbindungen benutzt.

[0031] Die hierin beschriebenen therapeutischen Verbindungen werden zu Zusammensetzungen für andere Verabreichungswege formuliert, indem herkömmliche Methoden benutzt werden. Beispielsweise können Taurolidin oder Taurultam in einer Kapsel oder einer Tablette zur oralen Verabreichung formuliert werden. Kapseln können irgendwelche standardmäßigen pharmazeutisch verträglichen Materialien wie z.B. Gelatine oder Cellulose enthalten. Tabletten können gemäß herkömmlichen Verfahren formuliert werden, indem Mischungen einer therapeutischen Verbindung mit einem festen Träger und einem Gleitmittel verpresst werden. Beispiele für feste Träger beinhalten Stärke und Zuckerbentonit. Die Verbindung wird in der Form einer Tablette mit harter Hülle oder einer Kapsel, welche ein Bindemittel, z.B. Lactose oder Mannitol, einen herkömmlichen Füllstoff und ein Tablettierungsmittel enthält, verabreicht. Andere Formulierungen beinhalten eine Salbe, Paste, Spray, Pflaster, Creme, Gel, resorbierbaren Schwamm oder Schaum. Solche Formulierungen werden hergestellt, indem Methoden verwendet werden, die im Stand der Technik wohlbekannt sind.

[0032] Taurolidin- oder Taurultamverbindungen sind bei direktem Kontakt der Verbindung mit der Krebszelle wirksam. Dementsprechend kann die Verbindung topisch verabreicht werden. Die Verbindungen können verabreicht werden, indem eine feste oder resorbierbare Matrix, welche die Verbindung langsam in benachbarte

und umgebende Gewebe des Patienten freisetzt, implantiert wird.

Zytotoxizität der Taurolidin- und Taurultamverbindungen

[0033] Die zytotoxische Aktivität von Taurolidin wurde in vitro gegenüber dem Wachstum einer Vielzahl von menschlichen Krebszelllinien wie auch „normalen“ NIH 3T3-Fibroblasten ausgewertet, und es wurde gefunden, dass dieses eine apoptotische Zytotoxizität induziert. Die neoplastischen Zelllinien, die in dem Überblick verwendet wurden, waren Standard-Tumorzelllinien, z.B. die menschliche Eierstockzelllinie PA-1, die menschliche Eierstockzelllinie SKOV-3, die menschliche Darmtumorzelllinie HT29, die menschliche Prostata-Tumorzelllinie DU145, die menschliche Glioblastomzelllinie U251, die menschliche Glioblastomzelllinie U251-MDR, die mit DNA, welche MDR codiert, transfiziert war, die menschliche Glioblastomzelllinie T98G, die menschliche Leukämiezelllinie SP-1 und die menschliche Leukämiezelllinie Daudi.

[0034] Die Daten zeigten, dass Taurolidin das Wachstum menschlicher Krebszellen inhibierte. Überraschenderweise betrug die Konzentration von Taurolidin, die benötigt wurde, um das Tumorzellwachstum nach einer 3-tägigen Exposition an die Verbindung zu inhibieren (IC_{50}), ungefähr 12,5 μ M–50 μ M. Diese Konzentration ist wenigstens 1000fach niedriger als Konzentrationen, die verwendet werden, um das Bakterienzellwachstum zu inhibieren.

[0035] Taurolidin und Krebszellen wurden gleichzeitig zu Kolben zugegeben, und das Zellwachstum wurde 3 Tage später festgestellt. Parallele Studien wurden durchgeführt, um festzustellen, ob eine Störung der Zellanhaftung bei der zytotoxischen Aktivität eine Rolle spielte. Tests wurden durchgeführt, um die Fähigkeit von Taurolidin festzustellen, das Wachstum von menschlichen Eierstocktumorzellen zu inhibieren, nachdem diese etabliert wurden und in vitro als getrennte Kolonien wuchsen. Die Daten zeigten, dass eine 24 Stunden-Exposition an 50 μ M Taurolidin eine signifikante zytotoxische Wirkung gegenüber dem Wachstum von etablierten Tumorzellen erzeugte. Die Daten zeigten, dass die zytotoxische/zytostatische Aktivität von Taurolidin nicht auf der Inhibition der Tumorzellanhaftung beruht.

[0036] Der Mechanismus, durch welchen Taurolidin eine Zytotoxizität erzeugt, wurde ausgewertet. Kinetiken des Zellzyklus und die Zellzyklusverteilung von Tumorzellen wurden nach einer 24 Stunden-Exposition an Taurolidin untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl in PA1- als auch 3T3-Zellen die Taurolidinexposition die Kinetiken des Zellzyklus störte und den Prozentsatz an Zellen in sowohl der S- als auch der G2/M-Phase signifikant verringerte. Die Exposition von menschlichen PA1-Eierstockzellen an dieses Regime von Taurolidin induzierte ebenfalls einen hohen Grad an DNA-Fragmentierung, was die Induktion von Apoptose anzeigt. Diese DNA-Fragmentierung wurde bei normalen 3T3-Zellen nicht beobachtet.

[0037] Um weiterhin die Möglichkeit auszuwerten, dass eine Exposition an 50 μ M Taurolidin in der Lage war, die Apoptose spezifisch in menschlichen Eierstocktumorzellen, nicht aber in normalen Fibroblasten zu induzieren, wurden Studien unternommen, um die DNA-Fragmentierung als eine Funktion der Taurolidinexposition durch Verwendung einer Agarosegelelektrophorese auszuwerten. Die Ergebnisse bestätigten, dass bei Eierstocktumorzellen die Exposition an Taurolidin zu einer offenen DNA-Fragmentierung führte, welche bei 3T3-Zellen, die einer identischen Taurolidinbehandlung ausgesetzt wurden, nicht ersichtlich war.

[0038] Die zytotoxische Aktivität von Taurultam wurde in vitro ausgewertet, indem dieselben menschlichen Krebszelllinien, wie sie oben beschrieben sind, verwendet wurden. Die Daten zeigten, dass Taurultam in derselben Weise wie Taurolidin einen apoptotischen Tod von Krebszellen, nicht aber von normalen Kontrollzellen induzierte. Die zytotoxische Aktivität von Taurultam betrug ungefähr 75% der Aktivität, die mit Taurolidin beobachtet wurde.

[0039] Der apoptotische Tod wird von dem Tod durch andere Mechanismen unterschieden, indem Methoden verwendet werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Eine andere frühe Folge der Induktion der Apoptose ist die Spaltung der Proteinpoly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) durch zelluläre Caspasen. Auf Western Blot basierende Studien wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob eine Exposition an Taurolidin zu einer PARP-Spaltung führte. Die Ergebnisse zeigten, dass eine PARP-Spaltung in 3T3-Zellen nicht ersichtlich war, wenn eine Exposition an dasselbe Taurolidinregime stattfand. Die Apoptose wird ebenfalls nachgewiesen, indem bekannte Methoden wie z.B. die Bestimmung von Caspaseaktivierung, bax/bcl2-Verhältnissen und fas und fas-1 Wechselwirkungen verwendet wurden. Andere Methoden der Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose (z.B. eine auf Fluoreszenz basierende Methode, die in dem U.S.-Patent Nr. 5,976,822 beschrieben wird) werden verwendet, um den Mechanismus des Todes oder die Dosis, bei welcher eine Verbindung Apoptose im Vergleich zu Nekrose induziert, zu bestimmen.

[0040] Die Antitumoraktivität einer Verbindung wird ebenfalls ausgewertet, indem ein standardmäßiger kolorimetrischer MTS-Test verwendet wird. Ergebnisse, die mit verschiedenen Typen von Tumorzellen (primären Zellen oder Zelllinien) erhalten werden, werden mit jenen verglichen, die unter Verwendung normaler Zellen erhalten werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen in jeder Zelllinie wird abgeschätzt, indem die zelluläre Umwandlung eines Tetrazoliumsals nach Inkubieren der Zellen in einer Lösung, die eine Testverbindung enthält, in einer Platte mit 96 Vertiefungen gemessen wird. IC_{50} -Werte, die unter Verwendung der identischen Testverbindung mit normalen Zellen und Zellen einer bestimmten Tumorzelllinie erhalten wurden, werden verglichen und deren Verhältnis (IC_{50} normale Zelle/ IC_{50} Krebszelle) zeigt die Krebsselektivität der Testverbindung an. Eine Zunahme bei dem Verhältnis IC_{50} normale Zelle/ IC_{50} Krebszelle spiegelt eine höhere Selektivität der Testverbindung, um die Krebszelle zu töten, wider.

[0041] Die Antitumoraktivität einer Verbindung wird ebenfalls in vivo ausgewertet, indem z.B. ein Tumorfremdtransplantatregressionstest verwendet wird. Beispielsweise werden Tiere, welche etablierte Tumore tragen, für einen Zeitraum von drei Wochen mit einer Testverbindung behandelt. Das Wachstum der Tumore und die allgemeine Gesundheit des Tieres werden während der Dreiwochenbehandlung und für zwei weitere Wochen nach der Behandlung überwacht, um festzustellen, ob ein erneutes Tumorwachstum auftritt. Die antineoplastische Aktivität von Taurolidin wird bei athymischen (nackten) Mäusen bestimmt, welche fortgeschrittene und/oder metastasierende Fremdtransplantate tragen. Taurolidinregimes mit einer einzelnen und mehreren Dosen werden in athymischem (nackten) Mäusen ausgewertet. Bei der Identifizierung von Dosisregimes wird die antineoplastische Aktivität in athymischen (nackten) Mäusen, die Fremdtransplantate von menschlichen Krebszellen, z.B. Eierstockkrebs, tragen, festgestellt.

Behandlung von Eierstockkrebs

[0042] Über 80% der Patienten, bei denen Eierstockkrebs diagnostiziert wurde, erleiden nach einer therapeutischen Intervention im Hinblick auf den primären Tumor rekurrende Tumore. Selbst eine Ansprechrate von 5%, z.B. eine 5% Verringerung beim Tumorwachstum, würde zu einem klinischen Nutzen führen. Die Ansprechrate ist definiert als eine Verringerung bei der Tumorgroße oder bei der Anzahl der Metastaseherde. Beispielsweise wird eine Verringerung bei der Tumorgroße bestimmt, indem eine Abnahme bei der Größe der größten neoplastischen Läsion, z.B. durch ein Sonogramm oder durch eine Messung unter Verwendung eines Tasters (caliper), bestimmt wird.

[0043] Ein Standardmausmodell von Eierstockkrebs wurde verwendet, um die Wirkung von Taurolidin auf rekurrenden Eierstockkrebs zu untersuchen. Holland Sprague-Dawley-Mäusen wurden 5×10^6 Tumorzellen (z.B. die menschliche SKOV-3-Eierstocktumorzelllinie) injiziert, um einen Zustand eines fortgeschrittenen Eierstockkrebses zu imitieren. Taurolidin wurde 5 Tage später durch Intraperitoneal-Lavage verabreicht. Taurolidin wurde 3mal täglich für 4 Tage mit einer Dosis von 30 mg/Tag verabreicht. Wenigstens eine 75–80%ige Verringerung der Tumorherde wurde beobachtet. Diese Daten zeigen, dass die Verabreichung von Taurolidin die Eierstocktumorbelastung und das Rekurren von Tumoren verringert.

Behandlung von arzneimittelresistenten Tumoren

[0044] Es wurde gefunden, dass Taurolidin besonders wirksam ist, um Tumorzellen zu töten, welche widerstandsfähig gegenüber einer Zytotoxizität durch andere bekannte chemotherapeutische Mittel sind. Glioblastomzellen wurden mit einem Gen transfiziert, das eine multiple Arzneimittelresistenz (MDR) codierte. Die transfizierten Zellen waren 100–1000fach resistent gegenüber standardmäßigen chemotherapeutischen Mitteln, z.B. Adriamycin. Nicht transfizierte Glioblastomzellen, die mit einer Standarddosis (z.B. 1 μ M) Adriamycin kultiviert wurden, wurden getötet, aber MDR-transfizierte Glioblastomzellen, die mit 1 μ M des Arzneimittels in Kontakt gebracht wurden, waren resistent. Eine signifikante Zytotoxizität der MDR-transfizierten Glioblastomzellen wurde nach Kontakt mit der Verbindung (z.B. Taurolidin in einer Dosis von 50 μ M) beobachtet. Diese Daten zeigen, dass die hierin beschriebene Verbindung ihre zytotoxische Aktivität über einen Mechanismus ausübt, der von dem der standardmäßigen chemotherapeutischen Mittel verschieden ist. Demgemäß führt eine Kombinationstherapie, bei welcher eine Taurolidin- oder Taurultamverbindung vor, nach oder zusammen mit einem anderen chemotherapeutischen Mittel (z.B. einem Antimetaboliten, einem tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder einem antiangiogenen Mittel) verabreicht wird, zu einem verbesserten klinischen Ergebnis für Patienten, die an einem malignen Zustand leiden, welcher durch eine gemischte Population von Tumorzellen (z.B. jene, welche durch standardmäßige chemotherapeutische Mittel getötet werden, und jene, welche MDR sind) gekennzeichnet ist. (Wie bereits erwähnt wird die Verwendung von Taurolidin oder Taurultam zur Behandlung von Krebsarten außer Eierstockkrebs hierin nicht beansprucht).

Beispiel 1: Zytotoxische und mechanistische Auswertung von antineoplastischen Mitteln

[0045] Es wurde gefunden, dass Taurolidin beim Inhibieren des Wachstums einer Vielzahl von menschlichen Tumorzelllinien in vitro aktiv ist. Menschliche PA-1- und SKOV-3-Eierstocktumorzelllinien und NIH-3T3-Mausfibroblasten wurden verwendet, um den Mechanismus der Antitumoraktivität zu bestimmen. Die Studien zeigten, dass diese Wirkung mit Veränderungen bei DNA-Struktur, Zellmembrankomponenten und Proteinspaltung verbunden war, die mit der Induktion von Apoptose insbesondere in Tumorzellen konsistent waren. Die antineoplastische Auswertung von Taurolidin in Nacktmäusen, welche intraperitoneale Fremdtransplantate menschlicher Eierstocktumore trugen, zeigten, dass dieses Mittel die Tumorentwicklung und das -wachstum in vivo signifikant inhibierte.

[0046] Um die neoplastische Aktivität zu studieren, wurde Taurolidin als 2%ige Lösung in 5% Kollidon 17PF formuliert. Standardzellkulturwachstumsmedium (z.B. Hochglucose DMEM, RPMI 1640, McCoy's 5A und F12K), Trypsin und fötales Rinderserum (FBS) wurden alle bei GIBCO/Life Technologies (Grand Island, NY) gekauft. Die Externalisierung von Phosphatidylserin durch Zellen wurde ausgewertet, indem das ApoAlert® Annexin-V/FITC-Testkit verwendet wurde, welches bei Clontech (Palo Alto, CA) gekauft wurde. Reagenzien für die SDS-PAGE wurden bei BioRad Laboratories (Richmond, CA) gekauft. Ein monoklonaler Mausantikörper (Klon C-2-10) gegen menschliches PARP wurde bei Zymed Laboratories (San Francisco, CA) gekauft. Alle anderen Chemikalien wurden bei Sigma (St. Louis, MO) gekauft.

[0047] Studien, um die zytotoxische Aktivität von Taurolidin festzustellen, wurden, indem eine Gruppe von menschlichen Zelllinien solider Tumore verwendet wurden, wie auch in NIH 3T3-Mausfibroblasten durchgeführt. Umfasst von der Gruppe der Tumorzelllinien waren Eierstocktumorzellen (PA-1 und SKOV-3) und zum Vergleich Darmtumorzellen (HCT-8, HCT-15 und HT-29), Lungentumorzellen (H-157, A-549 und H-596), Prostataumorzellen (DU-145), Gliomzellen (U-251) und Melanom[zellen] (MNT-1). Die Mausmelanom-B16F10-Zelllinie wurde ebenfalls getestet. Diese Zelllinien sind leicht, z.B. von der American Type Culture Collection (ATCC), verfügbar. Zellen wurden in einem geeigneten Wachstumsmedium bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator in einer Atmosphäre von 5% CO kultiviert. Unter diesen Wachstumsbedingungen betrug die Verdopplungszeit aller Zelllinien 20–28 h.

[0048] Studien, um in vivo die Toxizität und therapeutische Wirksamkeit festzustellen, wurden bei 6–12 Wochen alten weiblichen homozygoten athymischen (Hsd:athymic nude nu/nu) Mäusen durchgeführt, welche von Harlan (Indianapolis, IN) erhalten wurden.

[0049] Um die Inhibition des Zellwachstums auszuwerten, wurden subkonfluente Kulturen von geeigneten Zelllinien durch Trypsinierung geerntet und in Medium bei einer Zelldichte von $1-5 \times 10^4$ Zellen/ml resuspendiert. Ein ml dieser Zellsuspension wurde zu jeder Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen zugegeben, welche 3 ml eines geeigneten Mediums plus Serum enthielten. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin zu jeder Vertiefung in einem Volumen von 40 µl zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,1–200 µM zu erzielen. Kontrollvertiefungen erhielten nur 40 µl 5% Kollidon 17PF. Zweiundsiebzig Stunden später wurden alle Zellen durch Trypsinierung geerntet und die Zellenzahl elektronisch bestimmt, indem ein Coulter Modell Z1-Teilchenzähler (Coulter Corp., Miami, FL) verwendet wurde, um die Inhibition des Zellwachstums festzustellen. Jedes Experiment wurde im Doppel durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

[0050] Für Flusszytometriestudien wurden 1×10^6 PA-1-, SKOV-3- oder NIH-3T3-Zellen für 24 h in einem geeigneten Medium, das Serum enthielt, inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin in einem Volumen von 40 µl zugegeben, um eine Endkonzentration von 25, 50 oder 100 µM zu erzielen. Kontrollkulturen für jede Zelllinie wurden in Medium inkubiert, welches nur 40 µl 5% Kollidon 17PF enthielt. Achtundvierzig Stunden später wurden alle Zellen durch Trypsinierung geerntet und zur zytofluorometrischen Analyse durch Standardmethoden vorbereitet. Beispielsweise wurden geerntete Zellen in eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung bei einer Endzelldichte von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen mit einer Lösung von 0,05 mg/ml Propidiumiodid, 0,6% Igepal und 1% Natriumcitrat angefärbt. Eine Flusszytometrie wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson, Plymouth, England) durchgeführt, wobei das Programm ModFit LT (Becton Dickinson) verwendet wurde. Eine statistische Analyse wurde mit dem nicht parametrischen Kruskal Wallis ANOVA-Test durchgeführt, worauf ein Dunn's Mehrfachvergleichstest unter Verwendung von Instat folgte.

[0051] Die Externalisierung von Zellmembranphosphatidylserin als eine Folge der potentiellen Induktion von Apoptose wurde durch Flusszytometriemethoden festgestellt, indem das ApoAlert® Annexin-V/FITC-Testkit verwendet wurde. Kurz gesagt wurden 1×10^6 Zellen für 24 h in Gewebekulturmedium, welches Serum ent-

hielt, inkubiert. Danach wurde Taurolidin zugegeben, um eine Endkonzentration von 25, 50 oder 100 μM zu erzielen. Kontrollkulturen erhielten nur 5% Kollidon 17PF. Vierundzwanzig Stunden später wurden alle Zellen durch Trypsinierung geerntet. Die geernteten Zellen wurden in 200 μl Bindungspuffer resuspendiert und dann für 5–15 min in einer Lösung, die 1 $\mu\text{g/ml}$ Annexin-V FITC enthielt, bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden dann analysiert, um die Annexin-V-Bindung durch zytofluorometrische Techniken, welche ein FACScan benutzten, wobei das ModFit LT-Programm mit statistischer Analyse wie oben beschrieben verwendet wurde, zu quantifizieren.

[0052] Eine Western Blot-Analyse wurde verwendet, um die PARP-Spaltung festzustellen. Zwei $\times 10^6$ Zellen wurden in getrennten 75 cm^2 -Gewebekulturkolben, welche 20 ml Gewebekulturmedium plus Serum enthielten, angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin in Konzentrationen von 50 μM oder 100 μM zugegeben. Vierundzwanzig Stunden nach der Zugabe von Taurolidin wurden die Zellen geerntet, die Zellenzahl bestimmt und Aliquots, welche eine gleiche Zellenzahl enthielten, wurden von jeder Expositionsbedingung erzeugt. Die Gesamtproteine aus Ganzzelllysaten, die von diesen Aliquots erzeugt wurden, wurden durch SDS-PAGE getrennt und elektrisch auf Nitrocellulosefilter überführt. Die Filter wurden dann verarbeitet, um intaktes PARP-Protein und Spaltungsfragmente nachzuweisen; indem der monoklonale anti-PARP-Mausantikörper Klon. C-2-10 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) verwendet wurde. Die resultierenden Protein-Antikörper-Komplexe wurden durch standardmäßige Chemilumineszenztechniken sichtbar gemacht.

[0053] Um die Taurolidin-induzierte Toxizität auszuwerten, wurden die Mäuse in Gruppen von 5–8 Tieren aufgeteilt. Danach wurden alle Mäuse gewogen und die Therapie, bestehend aus einer einzelnen i.p.-Bolusinjektion von Taurolidin an 3 aufeinander folgenden Tagen, wurde begonnen. Die ausgewerteten Taurolidindosen waren 5, 10, 15, 20, 25 und 30 mg/Maus/Injektion und wurden, außer für die Injektionen von 25 (1,25 ml) und 30 mg/Maus (1,5 ml), in einem Volumen von 1 ml verabreicht. Taurolidin zur Injektion wurde ausgehend von der 2%igen Taurolidinlösung durch die Zugabe von 5% Kollidon 17PF verdünnt. Kontrolltiere erhielten 1 ml-Injektionen von nur 5% Kollidon 17PF. Die Tiere wurden täglich untersucht und das Körpergewicht zweimal wöchentlich aufgezeichnet. Eine Verringerung des Körpergewichts um mehr als 10% wurde als signifikant betrachtet. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) wurde als die Dosis betrachtet, welche eine Sterblichkeit von ~10% erzeugte.

[0054] Um die therapeutische Wirksamkeit auszuwerten, erhielten Mäuse eine einzelne intraperitoneale Injektion von 5×10^6 SKOV-3-Zellen in einem Volumen von 0,5 ml. Unmittelbar danach wurden die Mäuse zufällig in Behandlungsgruppen von 7 Tieren aufgeteilt. Die Taurolidintherapie, bestehend aus einer einzelnen i.p.-Bolusinjektion von 20 mg Taurolidin an 3 aufeinander folgenden Tagen, wurde entweder unmittelbar nach der Tumorzellinokulierung oder zu ausgewählten Zeitabschnitten nach der Tumorzellinokulierung (≤ 5 d) begonnen. Kontrolltiere erhielten 1 ml-Injektionen von nur 5% Kollidon 17PF. Die Tiere wurden täglich untersucht und das Körpergewicht zweimal wöchentlich aufgezeichnet. Vierzehn Tage nach der letzten Taurolidininjektion wurden Mäuse in allen Gruppen durch CO_2 -Erstickung geopfert, alle i.p. Tumorherde entfernt und das Tumorgewicht bestimmt. Das mittlere Tumorgewicht für jede Behandlungsgruppe wurde berechnet, und eine statistische Analyse der Unterschiede bei dem mittleren Tumorgewicht zwischen den Behandlungsgruppen setzte den Studenten-t-Test ein. p-Werte von $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

Taurolidin inhibiert das Tumorzellwachstum

[0055] Die Fähigkeit von Taurolidin, das Zellwachstum zu inhibieren, wurde in einer Gruppe von neoplastischen menschlichen und Mauszelllinien, welche aus 13 verschiedenen Linien, die 6 verschiedene Tumortypen repräsentierten, zusammengesetzt war, festgestellt. Die Ergebnisse dieses Überblicks zeigten, dass eine 3 d-Exposition an Taurolidin das Zellwachstum bei jeder untersuchten Zelllinie inhibierte (Tabelle 5).

[0056] Die IC_{50} von Taurolidin gegenüber dem Wachstum einer ausgewählten neoplastischen menschlichen oder Mauszelllinie wurde wie folgt ausgewertet. Zellen wurden bei einer Dichte von $1-5 \times 10^4$ Zellen in jeder Vertiefung eines Gewebekulturkolbens mit 6 Vertiefungen angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin in Konzentrationen zugegeben, die von 1–100 μM reichten. Nach drei Tagen wurden Zellen durch Trypsinierung geerntet und die Zellenzahl elektronisch bestimmt. Die Zellwachstumsinhibition wurde durch Vergleich mit nicht an Taurolidin exponierten Kontrollkulturen bestimmt. Der IC_{50} wurde als die Konzentration berechnet, welche benötigt wurde, um die Zellenzahl um 50% zu inhibieren. Jeder IC_{50} -Wert stellt den Mittelwert \pm SE von 4–8 Bestimmungen dar.

Tabelle 5

<u>Ursprungsort des Tumors</u>	<u>Zelllinie</u>	<u>IC₅₀ (µM)</u>
Eierstock	PA-1	11,4 ± 1,8
	SKOV-3	31,6 ± 7,0
Prostata (Vergleichsbeispiel)	DU-145	9,8 ± 0,8
Gehirn (Vergleichsbeispiel)	U-251	20,1 ± 2,7
Darm (Vergleichsbeispiel)	HT-29	18,6 ± 1,0
	HCT-8	11,5 ± 0,5
	HCT-15	9,6 ± 3,0
Melanom (Vergleichsbeispiel)	B16-F10	30,1 ± 2,6
	MNT-1	22,1 ± 2,1
Lunge (Vergleichsbeispiel)	H-157	32,2 ± 5,6
	A-549	26,8 ± 7,2
	H-596	34,2
Mausfibroblasten (Vergleichsbeispiel)	NIH-3T3	11,9 ± 1,8

[0057] Überraschenderweise waren die beobachteten IC₅₀s für jede Zelllinie bemerkenswert ähnlich und variierten über den relativ engen Bereich von ~10 µM (PA-1, DU-145, HCT-8, HCT-15, B16F10 und NIH-3T3) bis ~35 µM (H-596).

[0058] Die Studien haben die Wirkung von Taurolidin auf die Tumorzellproliferation festgestellt. Die Inhibition der Proliferation konnte entweder die Folge eines Aufhaltens des Wachstums oder des Zelltods sein. Daher wurden die Studien als nächstes darauf konzentriert, den Mechanismus(en) zu identifizieren, durch welchen Taurolidin die Inhibition des Zellwachstums induzierte. Diese Studien wurden in den menschlichen Eierstocktumorzelllinien PA-1 und SKOV-3 und in NIH-3T3-Mausfibroblasten durchgeführt. Studien, die herkömmliche Flusszytometrietekniken einsetzten, stellten die Wirkung einer 48 h-Exposition an Taurolidin auf die Zellzyklusverteilung in sowohl den menschlichen PA-1- als auch den SKOV-3-Eierstocktumorzelllinien fest. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass eine Exposition an dieses Mittel kein konsistentes Muster von Zellzyklusveränderungen induzierte.

[0059] Die Auswirkung einer 48 h-Exposition an ausgewählte Konzentrationen von Taurolidin auf die Zellzyklusverteilung in menschlichen Eierstocktumorzellen (PA-1 und SKOV-3) und Mausfibroblasten (NIH-3T3) wurde wie folgt durchgeführt. Drei × 10⁵ Zellen wurden in Plastikgewebekulturkolben angeimpft. Vierundzwanzig Stunden später wurde Taurolidin zugegeben, um Endkonzentrationen von 25 µM, 50 µM oder 100 µM zu erzielen. Kontrollkulturen erhielten ein geeignetes Volumen an Kollidin-17P. Nach zusätzlichen 48 h wurden Zellen geerntet, mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellzyklusverteilung festgestellt, indem zytofluorometrische Techniken verwendet wurden. Jeder Wert stellt den Prozentsatz an Zellen in den angegebenen Zellzyklusphasen dar und ist der Mittelwert ± SEM von drei Bestimmungen.

Tabelle 6

Zelllinie/Arzneimittelexposition	Zellzyklusverteilung (%)		
	G ₀ G ₁	S	G ₂ /M
NIH-3T3			
48 h - 0 µM Taurolidin	46,1 ± 9,2	45,0 ± 5,9	9,0 ± 3,3
48 h - 25 µM Taurolidin	42,5 ± 9,6	44,9 ± 5,6	13,0 ± 4,0
48 h - 50 µM Taurolidin	33,9 ± 10,2	44,3 ± 5,9	21,8 ± 4,6
48 h - 100 µM Taurolidin	25,8 ± 1,7	63,2 ± 9,8	11,0 ± 11,0
PA1			
48 h - 0 µM Taurolidin	29,9 ± 1,5	47,7 ± 1,0	22,5 ± 0,5
48 h - 25 µM Taurolidin	28,4 ± 0,5	46,8 ± 0,6	24,7 ± 0,9
48 h - 50 µM Taurolidin	23,7 ± 2,2	39,5 ± 12,5	36,8 ± 12,4
48 h - 100 µM Taurolidin	28,4 ± 5,6	44,5 ± 23,5	27,2 ± 17,9
SKOV-3			
48 h - 0 µM Taurolidin	46,7 ± 1,3	38,8 ± 4,1	13,5 ± 3,6
48 h - 25 µM Taurolidin	45,8 ± 2,7	41,9 ± 4,2	12,3 ± 3,1
48 h - 50 µM Taurolidin	30,7 ± 9,4	45,5 ± 12,4	30,3 ± 10,5
48 h - 100 µM Taurolidin	19,9 ± 6,1	54,2 ± 8,6	25,9 ± 7,8

[0060] Insbesondere bei PA-1-Zellen hatte eine 48 h-Exposition an bis zu 100 µM Taurolidin eine geringe Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung. Tatsächlich war der Prozentsatz an Zellen in den G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phasen trotz Exposition an Taurolidin im Wesentlichen unverändert. Alternativ führte die Exposition an Taurolidin bei SKOV-3-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme bei dem Prozentsatz an Zellen in G₀/G₁, erhöhte aber den Prozentsatz an Zellen in sowohl der S-Phase als auch G₂/M. Wichtig ist, dass sowohl bei PA-1- als auch SKOV-3-Zelllinien die Exposition an Taurolidin ebenfalls zu dem Erscheinen von DNA-Trümmern in dem sub-G₀G₁-Bereich führte, was ein Effekt war, der von der Taurolidinkonzentration abhängig war (Fig. 2). Wie bei der SKOV-3-Zelllinie senkte ein Exponieren von NIH-3T3-Zellen an Taurolidin den Prozentsatz an Zellen in G₀/G₁ und erhöhte den Prozentsatz an Zellen in S in einer konzentrationsabhängigen Weise. Anders jedoch als bei den menschlichen Eierstocktumorzellen festgestellt, beeinflusste die Exposition an Taurolidin bei NIH-3T3-Zellen das Erscheinen von DNA-Trümmern in dem sub-G₀G₁-Bereich nicht signifikant (Fig. 2).

[0061] Die DNA-Spaltung in einzelne Fragmente ist ein spätes Ereignis in dem Prozess der Apoptose. Das Erscheinen von DNA-Trümmern in dem sub-G₀/G₁-Bereich 48 h nach der Exposition an Taurolidin könnte eine Folge der mit der Apoptose verbundenen DNA-Fragmentierung sein. Um diese Möglichkeit auszuwerten, haben Studien als nächstes die Fähigkeit von Taurolidin, die Externalisierung von Phosphatidylserin auf Zellmembranen zu erhöhen, festgestellt, welche ein Ereignis ist, das früher in dem apoptotischen Prozess auftritt. Diese Studien basierten auf Fluorozytometrie und setzten einen fluoreszierenden Antikörper-Bindungstest (Annexin-V) ein, um die Externalisierung von Phosphatidylserin festzustellen. Die Ergebnisse der Studien (die in Fig. 3 gezeigt sind) zeigten, dass sowohl bei den menschlichen PA-1- als auch den SKOV-3-Eierstocktumorzelllinien eine 24 h-Exposition an Taurolidin eine signifikante, von der Taurolidinkonzentration abhängige Zunahme bei der Annexin-V-Bindung um ein 4- bzw. 3-faches induzierte. Im Gegensatz dazu führte die Exposition an Taurolidin bei NIH-3T3-Zellen zu einer nicht signifikanten Zunahme (~5%) bei der Antikörperbindung. Diese Daten unterstützten die Ergebnisse aus den Zellzyklusstudien wie auch die Beobachtung, dass die Exposition an Taurolidin in PA-1- und SKOV-3-Zellen, nicht aber in NIH-3T3-Zellen, Apoptose induzierte. Die Ergebnisse zeigen, dass Taurolidin vorzugsweise in Tumorzellen im Vergleich zu Nichttumorzellen Apoptose (und apoptotischen Tod) induziert.

[0062] Um die Induktion von Apoptose durch Taurolidin weiter zu bestätigen, wurde die Beziehung zwischen der Exposition an Taurolidin und der PARP-Spaltung festgestellt. PARP ist ein Kernprotein, das eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Reparatur von sowohl Einzel- als auch Doppelstrang-DNA-Brüchen spielt. Zusätzlich ist ein Schlüsselereignis in dem apoptotischen Prozess die Spaltung, welche durch Caspase 3 und Caspase 9 vermittelt wird, und die folgende katalytische Deaktivierung dieses Proteins. Um zu bestimmen, ob

die Exposition an Taurolidin zu einer PARP-Spaltung in Eierstocktumorzellen führte, wurde eine Western Blot-Analyse mit Ganzzelextrakten von PA-1-, SKOV-3- und NIH-3T3-Zellen nach einer 24 h-Exposition an entweder 50 oder 100 µM Taurolidin durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse, welche in dem repräsentativen Western Blot, der in [Fig. 4](#) enthalten ist, dargestellt werden, zeigten, dass in PA-1- und SKOV-3-Zellen eine Exposition an entweder 50 µM oder 100 µM Taurolidin zu einer PARP-Spaltung führte. Im Gegensatz dazu gab es in NIH-3T3-Zellen nach der Exposition an Taurolidin wenig Beweise für dieses proteolytische Ereignis. Diese Daten bestätigen, dass Taurolidin in Tumorzellen, nicht aber in Nichttumorzellen, Apoptose induziert.

[0063] In Anbetracht der bevorzugten Induktion des apoptotischen Todes in Tumorzellen im Vergleich zu normalen nichtneoplastischen Zellen wurde Taurolidin Tumor-tragenden Tieren verabreicht, um die antineoplastische Aktivität weiter auszuwerten. Studien wurden begonnen, um die antineoplastische Aktivität von Taurolidin in Nacktmäusen, welche i.p. menschliche Eierstocktumorfremdtransplantate trugen, auszuwerten. In vivo-Studien wurden geplant, um das Regime bei der maximal tolerierten Dosis (MTD) von Taurolidin in weiblichen Nacktmäusen zu identifizieren und die Toxizität festzustellen. Die Toxizität wurde ausgewertet, indem Änderungen beim Körpergewicht und die Sterblichkeit nach einem 3 d-i.p.-Bolusinjektionsregime gemessen wurden. Tägliche 1 ml-Injektionen gaben Dosen ab, die von 5 mg/Maus/Tag–30 mg/Maus/Tag reichten. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass bei täglichen Dosen unter 15 mg/Maus (~650 mg/kg) Taurolidin gut vertragen wurde (Tabelle 7).

[0064] Die Taurolidin-induzierte Toxizität in athymischen (nackten) weiblichen Mäusen wurde wie folgt ausgewertet. Gruppen von 5–10 Mäusen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen Taurolidin injiziert. Die ausgewerteten Taurolidindosen reichten von 5–30 mg/Maus/Injektion und wurden intraperitoneal in einem Volumen von 1 ml abgegeben (mit der Ausnahme der 25 und 30 mg-Dosen, welche aufgrund einer begrenzten Löslichkeit in einem Volumen von 1,25 bzw. 1,5 ml abgegeben wurden). Während des Injektionsregimes, und danach täglich für 30 d, wurden die Mäuse gewogen und untersucht. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und die Sterblichkeits- und Gewichtsverlustdaten zusammengekommen.

Tabelle 7

Taurolidindosis (mg/Maus/Injekt.)	n	Gewichtsverlust (Nadir %)	Sterblichkeit (%)
Keine (Vehikelkontrolle)	24	-1,2	0
5	17	-1,2	0
10	17	-1,7	6%
15	17	-7,1	0
20	46	-12,2	13%
25	17	-16,3	47%
30	10	-24,5	100%

[0065] Der maximale Körpergewichtsverlust als eine Folge dieses Dosisregimes betrug 7%, und das Körpergewicht kehrte innerhalb von sieben Tagen nach Abschluss der Injektionsbehandlung auf Werte vor der Injektion zurück. Mit Regimes, die Dosen von 20 mg/Maus oder mehr einsetzten, wurde eine signifikantere Toxizität beobachtet (Tabelle 3). Insbesondere betrug der auf den Tiefpunkt bezogene (nadir) Gewichtsverlust für Behandlungen, die 20, 25 oder 30 mg/Maus einsetzten, -12%, -16% bzw. -25%. Zusätzlich führten die Behandlungen mit diesen Taurolidindosen zu 15%, 43% bzw. 100% Sterblichkeit.

[0066] Auf der Basis der Toxizitätsstudien wurde eine 3tägige 1 ml-i.p.-Injektion von Taurolidin mit einer Dosis von 20 mg/Maus als die MTD ausgewählt. Studien haben als nächstes die antineoplastische Aktivität dieses Regimes in Mäusen, welche i.p. menschliche Eierstocktumorfremdtransplantate trugen, die von der SKOV-3-Zelllinie abgeleitet waren, ausgewertet. Den Mäusen wurden i.p. 5×10^6 SKOV-3-Zellen injiziert. Eine

Taurolidintherapie, welche das 3 d 20 mg/Maus Dosisregime einsetzte, wurde bis zu 5 d nach der Tumorzellinjektion begonnen. Vierzehn Tage nach der Beendigung der Taurolidintherapie wurden Mäuse geopfert und alle i.p.-Tumore entfernt und gewogen. Die Ergebnisse dieser Studie, die in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) zusammengefasst sind, zeigten, dass die Taurolidintherapie, wenn sie am Tag der Tumorzellinjektion begonnen wurde, in hohem Maße wirksam war und die Tumorbildung ([Fig. 5](#)), die Entwicklung von Aszites und das Wachstum ([Fig. 6](#)) inhibierte.

[0067] Die Wirkung eines einzigen 3 d-i.p.-Bolusinjektionsregimes von Taurolidin (20 mg/Maus/Injektion, beginnend mit dem Tag der Tumorzellinjektion) auf das Gesamterscheinungsbild von Mäusen, welche i.p. Fremdtransplantate von menschlichen SKOV-3-Eierstocktumorzellen trugen, wurde ausgewertet. Neunzehn Tage nach der Tumorzellinjektion betrug das mittlere Tumorgewicht bei Kontrollmäusen (kein Taurolidin) ungefähr 1,7 g. Zusätzlich wurde gefunden, dass Kontrolltiere bis zu 7 ml Aszitesflüssigkeit enthalten. Das mittlere Tumorgewicht in der mit Taurolidin behandelten Gruppe (einzelnes Regime von Taurolidin) betrug weniger als 50 mg, und es gab kein Anzeichen einer Bildung von Aszites. Es wurde ebenfalls gefunden, dass eine signifikante Anzahl dieser mit Taurolidin behandelten Tiere tumorfrei war.

[0068] Wenn die Therapie am Tag der Tumorzellinjektion begonnen wurde, wiesen ~80% der behandelten Mäuse bei der Opferung kein Anzeichen einer Krankheit auf. Weiterhin war die mittlere Tumorgroße bei behandelten Mäusen mit Tumoren ungefähr 40fach kleiner als bei Kontrollmäusen (vehikelbehandelt). Selbst wenn die Taurolidintherapie für bis zu 3 d nach der Tumorzellinjektion verzögert wurde, waren ungefähr 10 Prozent der Mäuse bei der Opferung tumorfrei, und die mittlere Tumorgroße in behandelten Mäusen war wiederum signifikant kleiner als bei den Kontrollen. Die Initiierung dieses einzigen Zyklus der Taurolidintherapie 5 d nach der Tumorzellinjektion (d.h. bei Mäusen mit etablierten i.p. Eierstocktumoren) was immer noch dazu in der Lage, das Tumorwachstum signifikant zu inhibieren.

[0069] Die hierin angegebenen Daten zeigen, dass eine Klasse von Verbindungen, welche durch Taurolidin veranschaulicht werden, eine potente antineoplastische Aktivität besitzt, indem diese selektiv das Tumorzellwachstum inhibieren und spezifisch Apoptose in Tumorzellen induzieren. Überraschenderweise wurde gefunden, dass der zytotoxische IC_{50} von Taurolidin in dem Bereich von 10–50 μ M, ungefähr 100fach niedriger als der, welcher für dessen antibiotische Wirkungen benötigt wird, liegt. Dieser Unterschied bei den wirksamen Konzentrationen in Verbindung mit der beobachteten niedrigen klinischen Toxizität von Taurolidin zeigt, dass diese Klasse von Verbindungen als ein sicheres, klinisch gut verträgliches Antineoplastikum nützlich ist.

[0070] Die Daten zeigten, dass eine Exposition an Taurolidin die Proliferation und Lebensfähigkeit aller Tumorzelllinien, die in einer großen Gruppe von Zelllinien solider Tumore ausgewertet wurden, wirksam inhibierte. Taurolidin induzierte Apoptose in neoplastischen Zellen, was anzeigt, dass dessen Wirkungsmechanismus nicht einfach eine Inhibition von Zelloberflächenadhäsionskomponenten oder -prozessen ist. Die Exposition an Taurolidin führt zu der Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9, einer Zerstörung der Integrität der Mitochondrienmembran, welche von einem Cytochrom C-Ausfluss aus diesen Organellen begleitet ist, und der Spaltung von PARP-Protein.

[0071] Es wurde gefunden, dass die Fähigkeit von Taurolidin, Apoptose zu induzieren, für Tumorzellen spezifisch ist. Diese Beobachtung wurde bestätigt, indem normale (Nichttumor-)Primärzellen, die aus Tieren stammten, von denen bekannt war, dass diese frei von Tumoren waren, verwendet wurden. Die zytotoxische und apoptotische Aktivität von Taurolidin in normalen Mausknorpelmarkskulturen wie auch in aktivierten menschlichen T-Zellkulturen wurde ausgewertet. In beiden Normalzellmodellen war Taurolidin in dem Hoch μ M-Bereich nicht zytotoxisch und erzeugte keine zellulären Veränderungen, die mit der Induktion von Apoptose konsistent waren. In normalem Mausknorpelmark wurden Konzentrationen in dem mM-Bereich benötigt, um die Zellproliferation zu inhibieren. Diese Funde zeigen, dass Taurolidin (oder einer seiner Metaboliten) auf ein tumorzellspezifisches Target zugreifen, welches in der Lage ist, die Tumorzellapoptose zu induzieren.

Beispiel 2: Klinische Anwendung

[0072] Taurolidin wurde durch i.p.-Lavage unmittelbar nach einer Operation zur Entfernung rekurrender Eierstocktumore verabreicht. Bis heute ist Taurolidin von diesen Patienten gut vertragen worden.

[0073] Diese Daten zeigen, dass Taurolidin und Derivate oder Metaboliten von diesem nützlich sind, um das Tumorwachstum zu inhibieren oder anzuhalten und die Lebenserwartung von Tumorpatienten zu verlängern.

Patentansprüche

1. Verwendung von Taurolidin oder Taurultam zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prophylaxe von Eierstockkrebs in einem Säugetier durch Inhibierung von Tumorwachstum, wobei das Arzneimittel in einer Dosis verabreicht werden soll, die ausreichend ist, um Tod von Tumorzellen durch Apoptose zu induzieren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Tumor ein Gen exprimiert, welches eine multiple Arzneimittelresistenz (multiple drug resistance) kodiert.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Arzneimittel verabreicht werden soll, um direkt die Oberfläche einer Tumorzelle zu kontaktieren.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, wobei das Arzneimittel in einer Dosis verabreicht werden soll, bei welcher eine Tumorzelle bevorzugt Apoptose anstatt Nekrose erleidet.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Medikament vor, gleichzeitig mit oder nach Verabreichung eines Chemotherapiemittels verabreicht werden soll, das gewählt ist aus Antimetabolit, Purin- oder Pyrimidinanalogon, Alkylierungsmittel, interkalierendes Mittel, kreuzvernetzendes Mittel und Antibiotikum.
6. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Tumorzelle einem soliden Tumor entstammt.
7. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Tumorzelle ein Karzinom ist.
8. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Arzneimittel als Arzneimittel-beladene Matrix zur Implantation in direktem Kontakt mit oder benachbart zu dem Ort des Tumors formuliert ist.
9. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Arzneimittel zur intraperitonealen Injektion formuliert ist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei das Arzneimittel eine Intraperitoneal-Lavage einer pharmazeutisch verwendbaren Lösung von Taurolidin oder Taurultam aufweist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

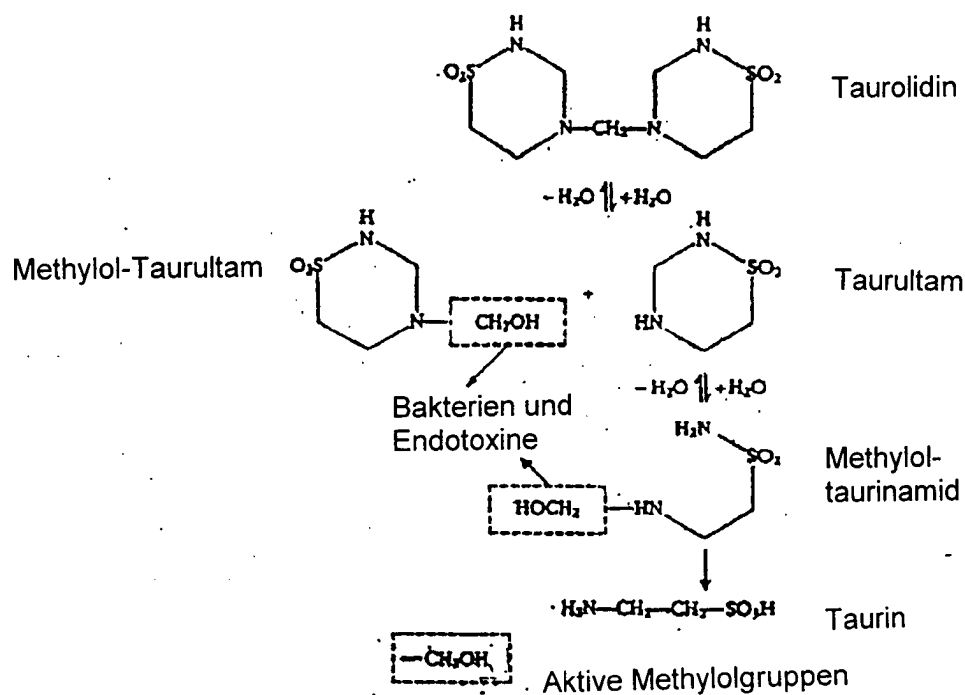


FIG. 2

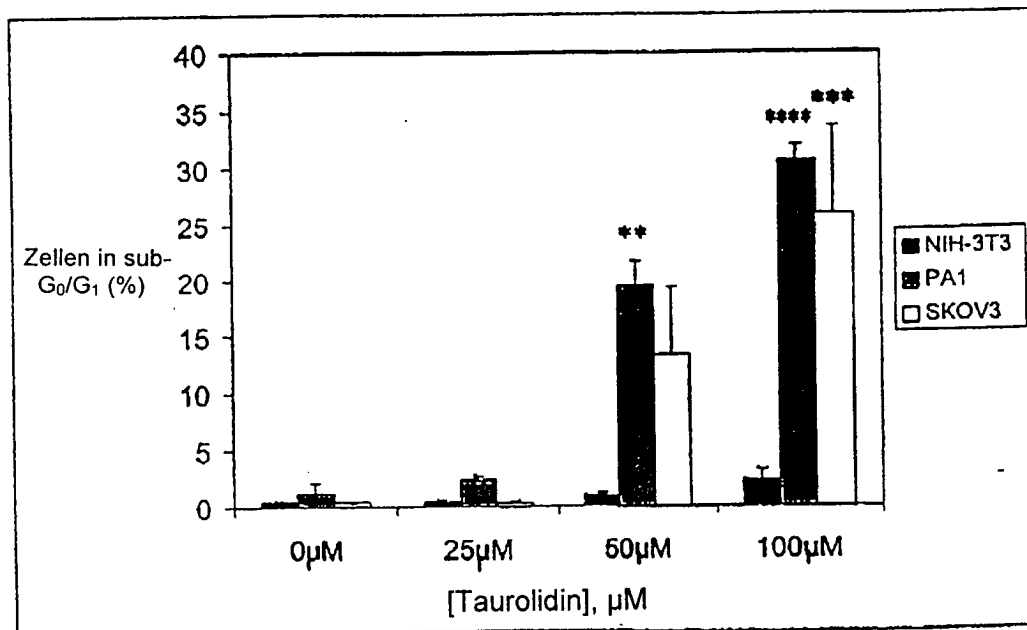


FIG. 3

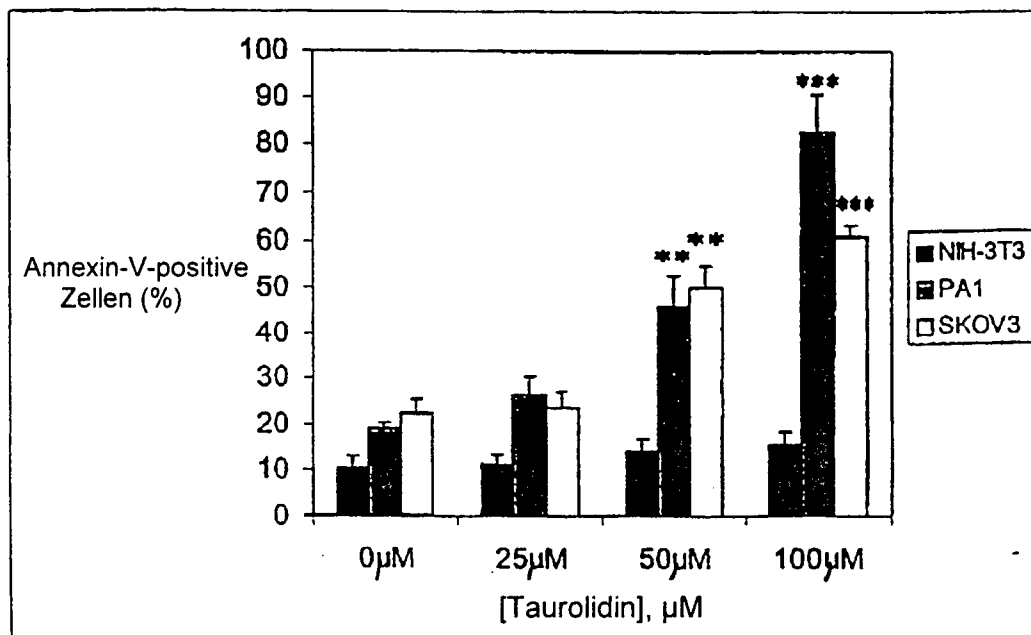


FIG. 4

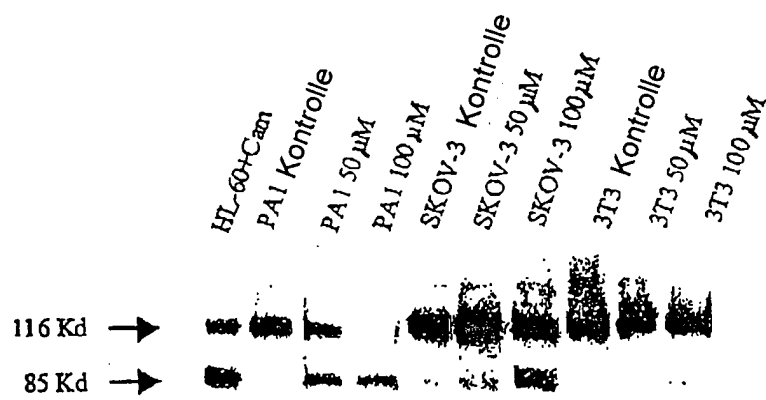


FIG. 5

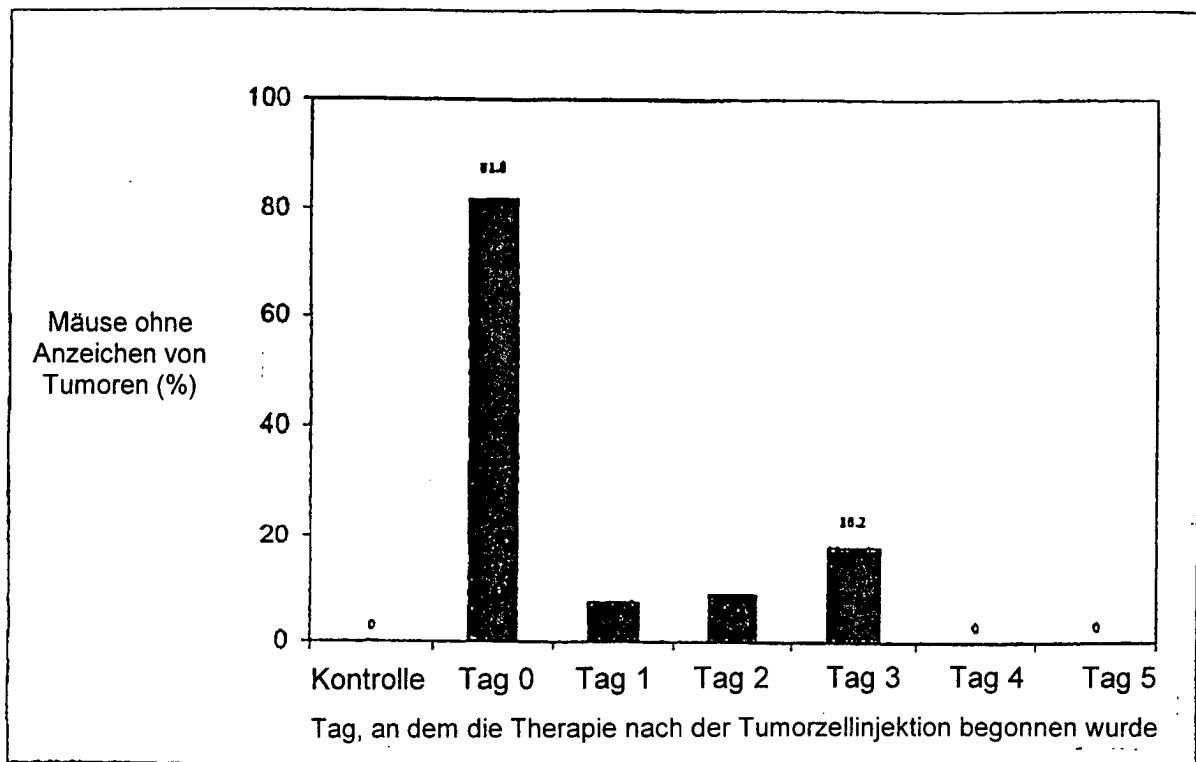


FIG. 6

