



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 24 622 T2** 2009.09.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 030 670 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 24 622.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/17732**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 957 308.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/016451**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.08.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **08.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.09.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/59** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**921170 29.08.1997 US**

(73) Patentinhaber:

**University of Pittsburgh - Of the Commonwealth  
System of Higher Education, Pittsburgh, Pa., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80802 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**JOHNSON, Candace, Pittsburgh, US; TRUMP,  
Donald, Pittsburgh, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON VITAMIN D DERIVATEN ZUR VERSTÄRKUNG DER WIRKUNG VON ZYTOTOXISCHEN STOFFEN**

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

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

## Beschreibung

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Vitamin D-Derivaten zur Steigerung der Wirksamkeit von zytotoxischen Wirkstoffen.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Ein Hauptaugenmerk der biologischen und medizinischen Forschung ist auf die Bekämpfung des Wachstums neoplastischer Zellen gerichtet. Diese Forschung hat zu der Entdeckung von neuen zytotoxischen Wirkstoffen geführt, die für die Behandlung von neoplastischen Krankheiten möglicherweise nützlich sind. Beispiele zytotoxischer Wirkstoffe, die für gewöhnlich bei der Chemotherapie angewendet werden, schließen ein: Anti-metabolische Wirkstoffe, die mit der Mikrotubulus-Bildung interferieren, alkylierende Wirkstoffe, Platin-basierte Wirkstoffe, Anthracycline, antibiotische Wirkstoffe, Topoisomerase-Inhibitoren und andere Wirkstoffe.

**[0003]** Neben der bloßen Identifizierung potentiell chemotherapeutischer Wirkstoffe hat die Krebsforschung zu einer Zunahme des Wissens um die Mechanismen geführt, mit denen diese Wirkstoffe auf neoplastische Zellen, so wie auf andere Zellen, wirken. Cholecalciferol (Vitamin D), zum Beispiel, kann die Differenzierung beeinflussen und die Proliferation von zahlreichen Zelltypen, sowohl in vitro als auch in vivo, hemmen. Der aktive Metabolit von Vitamin D (1,25-Dihydroxycholecalciferol (nachfolgend "1,25D<sub>3</sub>") und Analoga (z. B. 1,25-Dihydroxy-16-en-23-yn-Cholecalciferol (Ro23-7553), 1,25-Dihydroxy-16-en-23-yn-26,27-hexafluor-19-nor-Cholecalciferol (Ro25-6760), etc.) vermitteln eine signifikante in vitro und in vivo anti-Tumor-Aktivität durch Verlangsamung des Wachstums etablierter Tumore und durch Verhindern der Induktion von Tumoren (Colston et al., *Lancet*, 1, 188 (1989); Belleli et al., *Carcinogenesis*, 13, 2293 (1992); McElwain et al., *Mol. Cell. Diff.*, 3, 31–50 (1995); Clark et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118, 190 (1992); Zhou et al., *Blood*, 74, 82–93 (1989)). Zusätzlich zum Verlangsamen des neoplastischen Wachstums, induziert 1,25D<sub>3</sub> einen Blockade der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-S-Phase im Zellzyklus (Godyn et al., *Cell Proliferation*, 27, 37–46 (1994); Rigby et al., *J. Immunol.*, 135, 2279–86 (1985); Elstner et al., *Cancer Res.*, 55, 2822–30 (1995); Wang et al., *Cancer Res.*, 56, 264–67 (1996)). Diese Eigenschaften haben zur erfolgreichen Verwendung von 1,25D<sub>3</sub> bei der Behandlung von neoplastischen Tumoren geführt (siehe Cunningham et al., *Br. J. Cancer*, 63, 4673 (1991); Mackie et al., *Lancet*, 342, 172 (1993); Bower et al., *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 32, 1257 (1991)).

**[0004]** Zusätzlich zu seinen anti-neoplastischen und Zellzyklus-blockierenden Wirkungen kann 1,25D<sub>3</sub>-Behandlung zur Hypercalcämie führen. Daher wird 1,25D<sub>3</sub> für therapeutische Anwendungen (z. B. metabolische Knochenerkrankungen) typischerweise über längere Zeit in relativ niedrigen Dosen angewendet (z. B. ungefähr 1 µg/Tag bis ungefähr 2 µg/Tag). Zur Linderung der Hypercalcämie-Effekte wurden Analoga entwickelt, die die anti-proliferative Wirkung beibehalten haben ohne eine Hypercalcämie zu induzieren (siehe z. B. Zhou et al., *Blood*, 73, 75 (1991); Binderup et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1569 (1991); Binderup et al., Seite 192 in *Proceedings of the 8th Workshop on Vitamin D*, Paris France (Norman, A. et al., Eds., Walter de Gruyter, Berlin, (1991))). Viele dieser synthetischen Analoga sind wirksamer als 1,25D<sub>3</sub> bei der Hemmung des neoplastischen Wachstums (siehe Calverley et al., "Vitamin D" in *Antitumor Steroids* (Blickenstaff, R. T., Ed., Academic Press, Orlando (1992)) für eine Übersicht über solche Analoga).

**[0005]** Die Platin-basierten Wirkstoffe werden bei chemotherapeutischen Anwendungen häufig eingesetzt. Cisplatin z. B. tötet Tumorzellen durch die Bildung von kovalenten DNA-Addukten, entweder innerhalb eines Stranges oder zwischen zwei Strängen (Sherman et al. *Chem. Rev.*, 87, 1153–81 (1987); Chu, *J. Biol. Chem.*, 269, 787–90 (1994)). Die Behandlung mit solchen Platin-basierten Wirkstoffen führt dabei zur Hemmung der DNA-Synthese (Howle et al., *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2757–62 (1970); Salles et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 555–63 (1983)). Somit sind aktiv teilende Zellen sehr sensitiv gegenüber Cisplatin (Roberts et al., *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 22, 71–133 (1979); Pinto et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 82, 4616–19 (1985)). Solche Zellen erfahren üblicherweise einen Wachstumsstopp in der G<sub>2</sub>-Phase und unterlaufen eventuell die Apoptose. Diese apoptotische Wirkung wird bei Medikament-Konzentrationen erreicht, die für eine Hemmung der DNA-Synthese nicht ausreichen (Sorenson et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 749–55 (1990)), was nahe legt, dass Platin-basierte Wirkstoffe auf neoplastische Zellen über eine Vielzahl an Mechanismen wirken. Einige Zellen zeigen auch eine gesteigerte Platin-Sensitivität, wenn sie sich in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus befinden (Krishnaswamy et al., *Mutation Res.*, 293, 161–72 (1993); Donaldson et al., *Int. J. Cancer*, 57, 847–55 (1994)). Nach Freisetzung aus dem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-S-Block verbleiben die Zellen maximal empfindlich für den Rest des Zellzyklus.

**[0006]** Andere chemotherapeutische Wirkstoffe wirken über unterschiedliche Mechanismen.

**[0007]** Wirkstoffe, die z. B. mit der Mikrotubulus-Bildung interferieren (z. B. Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Docetaxel, etc.) wirken auf neoplastische Zellen, indem sie die richtige Ausbildung des mitotischen Spindel-Apparates behindern (siehe z. B. Manfredi et al., *Pharmacol. Ther.*, 25, 83–125 (1984)). Somit wirken die Wirkstoffe, die mit der Mikrotubulus-Bildung interferieren, hauptsächlich während der mitotischen Phase des Zellzyklus (Schiff et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1561–65 (1980); Fuchs et al., *Cancer Treat. Rep.*, 62, 1219–22, (1978); Lopes et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 32, 235–42 (1993)).

**[0008]** Anti-Metabolite wirken auf verschiedene enzymatische Stoffwechselwege in wachsenden Zellen. Methotrexat (MTX) z. B. ist ein Folsäure-Analogon, das die Dehydrofolat-Reduktase hemmt. Daraus folgt, dass es die Synthese von Thymidylat und Purinen blockiert, die für die DNA-Synthese nötig sind. Somit wirkt MTX hauptsächlich auf die S-Phase des Zellzyklus, es kann aber auch die RNA-Synthese in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase beeinflussen (Olsen, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 25, 306–18 (1991)).

**[0009]** Aufgrund der Unterschiede in den biologischen Mechanismen verschiedener zytotoxischer Wirkstoffe, wurden Protokolle getestet, in denen verschiedene zytotoxische Wirkstoffe kombiniert werden (z. B. Jekunen et al., *Br. J. Cancer*, 69, 299–306 (1994); Yeh et al., *Life Sciences*, 54, 431–35 (1994)). Die Behandlungsprotokolle mit Kombinationen von Wirkstoffen sind darauf ausgerichtet, die Wirksamkeit der zytopathischen Protokolle, durch Verwendung kompatibler zytotoxischer Wirkstoffe, zu steigern. Daher ist es möglich, durch die Möglichkeit, ausreichend hohe anti-neoplastische Aktivität durch eine gegebene Kombination zytotoxischer Wirkstoffe zu erreichen, die Dosis der einzelnen zytotoxischen Wirkstoffe zu verringern, um schädliche Nebenwirkungen zu minimieren. Der Erfolg von Kombinationsprotokollen hängt häufig von der Reihenfolge der Anwendung der Medikamente ab, teilweise, weil die verschiedenen zytotoxischen Wirkstoffen während unterschiedlicher Phasen des Zellzyklus wirken (z. B. Jekunen et al., *supra*; Studzinski et al., *Cancer Res.*, 51, 3451 (1991)).

**[0010]** Es gab Versuche, Medikamenten-Kombinationsprotokolle zu entwickeln, die teilweise auf Vitamin D-Derivaten basiert waren. Z. B. wurde die hemmende Wirkung der gleichzeitigen angewendeten Kombination von 1,25D<sub>3</sub> und Platin-Medikamenten auf das Wachstum neoplastischer Zellen untersucht (Saunders et al., *Gynecol. Oncol.*, 51, 155–59 (1993); Cho et al., *Cancer Res.*, 51, 2848–53 (1991)), und ähnliche Untersuchungen haben sich auf die gleichzeitige Kombination von 1,25D<sub>3</sub> und anderen zytotoxischen Wirkstoffen konzentriert (Tanaka et al., *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, 247, 290–96 (1989)). Die Ergebnisse diese Untersuchungen waren jedoch weniger als befriedigend.

**[0011]** Weiter, beschreiben Nishio et al. (1993) die Steigerung der Sensitivität von einer humanen kleinzelligen Lungenkrebszelllinie (OC-34) gegenüber Adriamycin (ADM) durch Calcitriol (1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) in vitro (M. Nishio et al. „Calcitriol increases adriamycin sensitivity in human non-small lung cancer cells“, *Cancer Journal*, Vol. 6, No. 2, 1993, pp. 97–101).

**[0012]** Saunders et al. (1993) beschreiben die additive und synergistische Hemmung von MCF-7-Brustkrebszellen durch 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in binären Kombinationen mit Taxol, Retinsäure und Dexamethason. Saunders et al. (1993) offenbaren die simultane Behandlung von MCF-7-Brustkrebszellen mit 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und anti-Krebs-Medikamenten in vitro (Saunders et al. „Additive and synergistic growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in binary combination with taxol, retinoic acid, and dexamethasone“ *Proc. Annu. Meet. Am Assoc. Cancer Res.*, Vol. 34, 1993, p. 300).

**[0013]** Junko et al. (1991) offenbaren die Hemmung des Wachstums von humanem Brustkrebs durch die Anwendung von dem Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon 22-Oxy-1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vivo und in vitro. Junko et al. (1991) beschreiben die Behandlung von Brustkrebs durch die simultane Anwendung von Adriamycin und 22-Oxy-1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, ohne dass eine Hypercalcämie induziert wurde (Junko et al., „A novel vitamin D<sub>3</sub> analog, 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, inhibits the growth of human breast cancer in vitro and in vivo without causing hypercalcemia“, *Endocrinology*, Vol. 129, No. 2, 1991, pp. 832–837).

**[0014]** Yu et al. (1995) offenbaren eine gesteigert Anti-Tumor-Aktivität des Vitamin D-Analogons 1,25-(OH)<sub>2</sub>-16-en-23-yn-Cholecalciferol (D<sub>16,23</sub>) in Kombination mit Cisplatin (cDDP) in einem murinen Schwammzell-Karzinommodell in vivo. D<sub>16,23</sub> und cDDP wurden simultan angewendet (W-D Yu et al., *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, Vol. 36, 1995, p. 298).

**[0015]** Hashimoto et al. (1993) beschreiben eine gleichzeitige Behandlung von athymischen Mäusen, die mit

humanem Brustkarzinom implantiert wurden mit dem nicht calcämischen Analogon von Calcitriol, 22-Oxa-Calcitriol (OCT), und dem Anti-Östrogen Tamoxifen (Junko Abe-Hashimoto et al., Cancer Research, Vol. 53, No. 11, 1993, pp 2534–2537).

**[0016]** Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren jedoch weniger als befriedigend. Insbesondere wurde die optimale Abfolge der Medikamenten-Anwendung nicht ermittelt. Darüber hinaus würde die Anwendung dieser Vorgehensweisen in der Therapie eine Langzeit-Anwendung von hohen  $1,25D_3$  Dosen mit einigen Protokollen erfordern, was, wie erwähnt, zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann. Daher besteht weiterhin das Bedürfnis für eine verbesserte Methode zur Wirksamkeitssteigerung chemotherapeutischer Wirkstoffe, insbesondere ein Bedürfnis für eine verbesserte Kombinationstherapie, insbesondere solche, die mit Vitamin D-Derivaten durchgeführt werden.

#### KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0017]** Die vorliegende Erfindung offenbart die Verwendung von einem Vitamin D-Derivat und einem zytotoxischen Wirkstoff bei Herstellung von einem Medikament zur Abtötung von einer neoplastischen Zelle in vivo, wobei (a) zunächst ein Vitamin D-Derivat und (b) nachfolgend der zytotoxische Wirkstoff der Zelle verabreicht wird. Wenn diese Strategie auf einen intakten Tumor angewendet wird, liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, um das Wachstum des Tumors durch zunächst die Anwendung des Vitamin D-Derivats auf den Tumor und durch nachfolgende Anwendung des zytotoxischen Wirkstoffs zu verlangsamen.

**[0018]** Bei einigen Anwendungen ist die vorliegende Erfindung nützlich für eine Therapie, insbesondere bei der Behandlung von neoplastischen oder Krebs-Erkrankungen. Bei anderen Anwendungen, liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel für die weitere Forschung, die Themen einschließt, wie das neoplastische Zellwachstum, die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus und die Mechanismen und Wirksamkeit der Zytotoxizität und Chemotherapie. In dieser Hinsicht ist die Erfindung für die Entwicklung von ausgereifteren Therapien nützlich. Die Erfindung kann am besten mit Bezug auf die begleitenden Abbildungen sowie der folgenden genauen Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen verstanden werden.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

**[0019]** [Fig. 1](#) zeigt graphisch die Wirkung von Ro23-7553 auf die in vitro Cisplatin-vermittelte Zytotoxizität. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD für den überlebenden Anteil von 3 Wiederholungen eines repräsentativen Experiments, das 2–3 Mal wiederholt wurde. Werte, die signifikant verschieden sind von Cisplatin alleine oder gleichzeitiger Cisplatin- und Ro23-7553-Anwendung, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \* $p < 0.001$  (ANOVA).

**[0020]** [Fig. 2](#) ist eine graphische Darstellung der Dosis-abhängigen Wirkung von Cisplatin, einer Ro23-7553 Vorbehandlung folgend, in vivo klonogene Tumorzellen abzutöten. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD für den überlebenden Anteil der gesamten klonogenen Zellen/g Tumor eines repräsentativen Experiments, das 2–3 Mal wiederholt wurde. Werte, die signifikant verschieden von Cisplatin alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \* $p < 0.001$  (ANOVA).

**[0021]** [Fig. 3](#) zeigt graphisch die Steigerung der Cisplatin-vermittelten Tötung von Tumorzellen, auf eine Vorbehandlung mit niedrigen Dosen an Ro23-7553 folgend. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD für den überlebenden Anteil der gesamten klonogenen Zellen/g Tumor (3–5 Mäuse/Behandlungsgruppe) aus einem repräsentativen Experiment, das 2–3 Mal wiederholt wurde. Werte, die signifikant verschieden von Ro23-7553 oder Cisplatin alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \* $p < 0.001$  (ANOVA).

**[0022]** [Fig. 4](#) ist eine graphische Darstellung der Wirkung von Ro23-7553-Behandlung auf das anteilige Tumolvolumen vor Cisplatin-Behandlung. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD für 8–10 Tiere aus einem repräsentativen Experiment, das 2–3 mal wiederholt wurde. Werte, die signifikant von Cisplatin alleine verschieden sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \* $p < 0.001$  (ANOVA). Die gepunktete Linie entspricht der vierfachen Kontroll-Tumorgroße vor Behandlung.

**[0023]** [Fig. 5](#) ist eine graphische Darstellung der Wirkung von Carboplatin-vermittelter Zytotoxizität nach Vorbehandlung der Zellen mit  $1,25D_3$ . Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD (3 Wiederholungen). Werte, die signifikant verschieden von Cisplatin alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \* $p < 0.001$  (ANOVA).

**[0024]** Die [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) zeigen graphisch die Ergebnisse der Dosis-abhängigen, Carboplatin-vermit-

telten Zytotoxizitäts-Tests unter Verwendung von 1,25D<sub>3</sub>-Vorbehandlung. [Fig. 6a](#) zeigt die Ergebnisse mit variierenden Carboplatin-Dosen. [Fig. 6b](#) zeigt die Ergebnisse mit variierenden 1,25D<sub>3</sub>-Dosen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD der gesamten klonogenen Zellen/g Tumor (3–5/Gruppe). Werte, die signifikant verschieden von 1,25D<sub>3</sub> oder Carboplatin alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \*p < 0.001 (ANOVA).

**[0025]** [Fig. 7](#) ist eine graphische Darstellung der Wirkung von 1,25D<sub>3</sub>-Vorbehandlung auf die Paclitaxel-vermittelte Tumor-Zytotoxizität. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD (3 Wiederholungen). Werte, die signifikant verschieden von Paclitaxel alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \*p < 0.001 (ANOVA).

**[0026]** [Fig. 8](#) ist eine graphische Darstellung der durch Paclitaxel-vermittelten, dosisabhängigen, in vivo Zytotoxizität auf klonogene Tumorzellen in Kombination mit 1,25D<sub>3</sub>-Vorbehandlung. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD der gesamten klonogenen Zellen/g Tumor (3–5 Mäuse/Behandlungsgruppe). Werte, die signifikant verschieden von Paclitaxel alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \*p < 0.001 (ANOVA).

**[0027]** [Fig. 9](#) ist eine graphische Darstellung die Steigerung der in vivo Wirkungen durch die Paclitaxel-Vorbehandlung. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD für 8–10 Tiere. Werte, die signifikant verschieden von Paclitaxel alleine sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet: \*p < 0.001 (ANOVA).

#### BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0028]** Der Ausdruck „zytotoxischer Wirkstoff“, so wie er hier und in den anhängenden Patentansprüchen verwendet wird, bezieht sich auf irgendeine Verbindung, die den Zelltod durch irgendeinen Mechanismus vermittelt, einschließlich, aber nicht begrenzt auf die Hemmung des Stoffwechsels oder der DNA-Synthese, Interferenz mit der Organisation des Zytoskeletts, Destabilisierung oder chemische Modifikation von DNA, Apoptose etc. Eine Verbindung ist ein „Analogon“ einer biologisch aktiven Verbindung, wenn das Analogon einige, aber nicht notwendigerweise alle der physiologischen Antworten der biologisch aktiven Verbindung induziert, wenn sie in vivo angewendet wird. „Neoplastisch“ bezeichnet einen Zelltyp, der eine unkontrollierte Proliferation zeigt. Im Allgemeinen zeigt die mitotische Nachkommenschaft einer neoplastischen Zelle auch einen neoplastischen Charakter und differenziert in vivo als Antwort auf physiologisch normale (d. h. nicht-pathologische) endogene (d. h. nicht-exogene oder invasive) Umgebungsbedingungen nicht aus. Neoplastische Zellen schließen Krebszellen und transformierte Zellen ein. Neoplastische Zellen können isoliert werden (z. B. eine einzelne Zelle in Kultur oder eine metastatische oder gestreute neoplastische Zelle in vivo) oder in einem Agglomerat vorkommen, entweder homogen oder in heterogener Kombination mit anderen Zelltypen (neoplastische oder andere) in einem Tumor oder anderen Zellverbänden. In dieser Hinsicht schließt ein Tumor jeden Verband an Zellen (neoplastische oder andere) ein, in denen zumindest einige der Zellen physikalisch mit mindestens einigen anderen Zellen des Verbandes über eine gemeinsame extrazelluläre Matrix verbunden sind. Somit schließt ein Tumor Gewebe ein, dass in vivo gewachsen ist und auch Zusammenlagerungen von in vitro gebildeten Zellen, wie Kolonien.

**[0029]** Die vorliegende Erfindung offenbart die Verwendung von einem Vitamin D-Derivat und einem zytotoxischen Wirkstoff bei der Herstellung von einem Medikament zum Abtöten einer neoplastischen Zelle, wobei zunächst das Vitamin D-Derivat und nachfolgend der zytotoxische Wirkstoff der Zelle verabreicht wird.

**[0030]** Die Zelle kann einzeln vorliegen und aus anderen ähnlichen Zellen isoliert werden (wie eine einzelne Zelle in Kultur oder eine metastatische oder gestreute neoplastische Zelle in vivo) oder die Zelle kann ein Mitglied einer Zellverbandes sein (z. B. innerhalb eines Tumors).

**[0031]** Wenn die Zelle sich innerhalb eines Tumors befindet, liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel zur Verlangsamung des Tumorwachstums durch zunächst der Anwendung von einem Vitamin D-Derivat und nachfolgend durch die Anwendung von einem zytotoxischen Wirkstoff auf den Tumor. Durch den zytotoxischen Effekt auf einzelne Zellen vermindert oder entfernt die vorliegende Erfindung die Zahl der Zellen, die über die Zeit der Tumormasse hinzugefügt werden. Vorzugsweise bewirkt die vorliegende Erfindung eine Abnahme der Zellzahl innerhalb eines Tumors, und am meisten bevorzugt führt sie zu einer teilweisen oder vollständigen Zerstörung des Tumors (z. B. durch Abtöten eines Teils oder fast aller Zellen eines Tumors).

**[0032]** Wenn die Zeile mit einer neoplastischen Krankheit in einem Säuger (z. B. einem Menschen) in Zusammenhang steht, ermöglicht die Erfindung die Verwendung von einem Vitamin D-Derivat und einem zytotoxischen Wirkstoff bei der Herstellung eines Medikaments zum Abtöten von neoplastischen Zellen in vivo durch zunächst der Anwendung von einem Vitamin D-Derivat und nachfolgend von einem zytotoxischen Wirkstoff auf den Säuger.

**[0033]** Dieser Ansatz ist bei der Behandlung von Säugern wirksam, die einen intakten oder gestreuten Krebs aufweisen. Wenn die Zellen z. B. gestreute Zellen sind (z. B. metastatische Neoplasie), können die zytopathischen Wirkungen der vorliegenden Erfindung die weitere Streuung neoplastischer Zellen innerhalb des Säugers reduzieren oder wesentlich unterbinden, womit auch die Wahrscheinlichkeit reduziert oder minimiert wird, dass solche Zellen proliferieren, um neue Tumoren innerhalb des Säugers zu bilden. Dadurch, dass das Wachstum von Tumoren, einschließlich neoplastischer Zellen, verlangsamt wird, vermindert die vorliegende Erfindung weiter die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen solcher Tumoren gelegentlich metastasieren oder streuen. Selbstverständlich schwächt die vorliegende Erfindung die pathogenen Wirkungen solcher Tumoren innerhalb eines Säugers ab, wenn durch die vorliegende Erfindung eine tatsächliche Abnahme in der Tumorgroße erreicht wird (und insbesondere, wenn der Tumor entfernt wird). Eine andere Anwendung kann in der Hoch-Dosis-Chemotherapie liegen, die eine Transplantation von Knochenmark oder dessen Wiederaufbau (z. B. um leukämische Erkrankungen zu behandeln) erforderlich macht, um die Wahrscheinlichkeit zu vermindern, dass neoplastische Zellen übrigbleiben oder erfolgreich wieder wachsen.

**[0034]** Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass die vorliegende Erfindung die Zytotoxizität von neoplastischen Zellen durch Induktion eines  $G_0/G_1$ -S-Phase-Blocks in dem Zellzyklus auslöst, wie hier beschrieben. Die Zellen sind gegenüber zytotoxischen Wirkstoffen sensitiviert, die fähig sind, auf Zellen in einem solchen blockierten Stadium zu wirken. Alternativ kann die synchronisierte Freisetzung der Zellen aus dem Block die Zellen insgesamt empfindlicher für die Wirkungen der Wirkstoffe machen, die später im Zellzyklus wirken. Somit sind für die Anwendung in der vorliegenden Erfindung jegliche Vitamin D-Derivate geeignet, die, nach Vorbehandlung, die zytotoxischen Wirkungen der chemotherapeutischen Wirkstoffe verstärken. Das Vitamin D-Derivat kann z. B. Vitamin D oder sein natürlicher Metabolit ( $1,25D_3$ ) sein. Wie hier jedoch diskutiert, haben viele Vitamin D-Derivate eine stärkere Anti-Tumor-Aktivität als der native Metabolit; somit kann das Vitamin D-Derivat solch ein Analogon von  $1,25D_3$  sein. Weiter kann das Vitamin D-Derivat ein nicht-hypercalcämisches Analogon von  $1,25D_3$  sein, wenn die vorliegende Erfindung für therapeutische Anwendungen verwendet wird, da solche Analoga die hypercalcämischen Wirkungen einer Vitamin D-basierten Therapie verringern oder großteils ausschalten können.

**[0035]** Das Vitamin D-Derivat kann den Zellen oder Tumoren auf jede geeignete Weise zur Verfügung gestellt werden, die natürlich von der gewünschten Anwendung der vorliegenden Erfindung abhängig ist. Für in vitro Anwendungen z. B. kann das Vitamin D-Derivat dem Kulturmedium zugefügt werden (z. B. anfangs mit dem Medium vermischt oder über die Zeit zugefügt). Für in vivo Anwendungen kann das Vitamin D-Derivat zur Anwendung auf die Zelle oder den Tumor mit einem geeigneten Träger vermischt werden. Für eine systemische Freisetzung kann das Vitamin D-Derivat somit durch subkutane Injektion, intravenös, oral oder durch andere geeignete Mittel bereitgestellt werden. Natürlich kann das Vitamin D-Derivat topisch angewendet werden (z. B. durch Auftragen von einer Salbe oder Creme auf einen Tumor, die das Vitamin D-Derivat enthält oder durch Injektion einer Lösung, die ein Vitamin D-Derivat enthält in einen Tumor hinein).

**[0036]** Wie schon erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einem Vitamin D-Derivat für die Vorbehandlung von Zellen oder Tumoren. Jede Dauer einer Vorbehandlung kann in der vorliegenden Erfindung angewendet werden; die genaue Dauer für die Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat wird variieren und von der Anwendung der vorliegenden Erfindung abhängen. Bei therapeutischen Anwendungen, z. B., kann eine Vorbehandlung so kurz, wie ungefähr 1 Tag sein und so lang, wie ungefähr 5 Tage sein; bevorzugter ist, dass die Vorbehandlungsdauer zwischen 2 und 4 Tage beträgt (z. B. ungefähr 3 Tage).

**[0037]** Die Dosis des Vitamin D-Derivats, das den Zellen geliefert wird, kann in Abhängigkeit von der gewünschten Anwendung variieren. Für Forschungszwecke z. B., kann die Dosis erheblich schwanken, da die Dosis-Wirkungs-Analyse ein Parameter in einer bestimmten Untersuchung sein kann. Für therapeutische Anwendungen können höhere als übliche Dosen (wie oben diskutiert) von dem Vitamin D-Derivat in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, ohne ein wesentliches Hypercalcämie-Risiko, da die Vorbehandlungsdauer so kurz ist in Vergleich mit Standard-Vitamin D-basierten Therapien. So kann z. B. einem humanen Patienten, der sich einer Behandlung unterzieht, so wenig wie  $1 \mu\text{g}/\text{Tag}$  von dem Vitamin D-Derivat (eine Dosis die, wie oben erwähnt, innerhalb des normalen Dosisbereichs für  $1,25D_3$  liegt) angewendet werden, während die maximale Menge so hoch wie ungefähr  $20 \mu\text{g}/\text{Tag}$  (oder noch höher in einigen Patienten) sein kann. Vorzugsweise werden jedoch zwischen ungefähr  $4 \mu\text{g}/\text{Tag}$  und ungefähr  $15 \mu\text{g}/\text{Tag}$  (z. B. zwischen ungefähr  $7 \mu\text{g}/\text{Tag}$  und ungefähr  $12 \mu\text{g}/\text{Tag}$ ) von dem Vitamin D-Derivat dem Patienten zugeführt. Typischerweise wird die Menge an zugefügtem Vitamin D-Derivat nicht so groß sein, dass damit ein signifikantes Risiko verbunden ist, eine Hypercalcämie zu verursachen oder andere toxischen Nebeneffekte auszulösen. Daher können noch höhere Mengen verwendet werden, wenn nicht-hypercalcämische Vitamin D-Derivate verwendet werden. So können  $30 \mu\text{g}/\text{Tag}$  oder mehr (z. B. ungefähr  $40 \mu\text{g}/\text{Tag}$  oder sogar  $50 \mu\text{g}/\text{Tag}$  oder mehr) nicht-hypercalcämi-

sches Vitamin D-Derivat während einer Vorbehandlung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung einem human Patienten zugefügt werden. Natürlich hängt die genaue Dosis des Vitamin D-Derivats von der Größe des Patienten, dem Modus und dem zeitlichen Ablauf der Freisetzung ab. Die Bestimmung solcher Dosen ist im Stand der Technik gut bekannt.

**[0038]** Nach Vorbehandlung mit dem Vitamin D-Derivat folgt die Verwendung von einem zytotoxischen Wirkstoff, entsprechend der vorliegenden Erfindung. Nach der Vorbehandlung kann der zytotoxische Wirkstoff entweder alleine oder in Kombination mit einer kontinuierlichen Anwendung von einem Vitamin D-Derivat, auf die Vorbehandlung folgend, angewendet werden. Jeder zytotoxische Wirkstoff kann in der vorliegenden Erfindung angewendet werden, wie erwähnt, sind viele für die Chemotherapie geeignete Wirkstoffe im Stand der Technik bekannt. Der zytotoxische Wirkstoff kann z. B. ein Anti-Metabolit sein (z. B. 5-Fluorouracil (5-FU), Methotrexat, (MTX), Fludarabin) ein Anti-Mikrotubus-Wirkstoff (z. B. Vincristin, Vinblastin, Taxan (wie Paclitaxel oder Docetaxel), ein alkylierender Wirkstoff (z. B. Cyclophosphamid, Melphalan, Bischloroäthylnitrohamstoff (BCNU), Platin-Wirkstoffe (z. B. Cisplatin (auch cDDP genannt), Carboplatin, Oxaliplatin, JM-216, CI-973), Anthracycline (z. B. Doxorubicin, Daunorubicin, antibiotische Wirkstoffe (z. B. Mitomycin-C), Topoisomerase-Hemmstoffe (z. B. Etoposid, Camptothecin) oder andere zytotoxische Wirkstoffe. Die Wahl des zytotoxischen Wirkstoffs hängt von der Anwendung der vorliegenden Erfindung ab. Für Forschungszwecke kann jeder möglicherweise zytotoxische Wirkstoff (sogar ein neuer zytotoxischer Wirkstoff) verwendet werden, um die Wirkungen des Wirkstoffs auf die Zellen oder Tumoren zu untersuchen, die mit Vitamin D-Derivaten vorbehandelt wurden. Für therapeutische Anwendungen hängt die Auswahl eines geeigneten zytotoxischen Wirkstoffs oft von Patienten-spezifischen Parametern ab; die Auswahl eines Behandlungsschemas für die Zytotoxine nach einem bestimmten chemotherapeutischen Protokoll ist jedoch im Stand der Technik gut bekannt.

**[0039]** In vielen Beispielen bewirkt die Vorbehandlung von Zellen oder Tumoren mit dem Vitamin D-Derivat vor der Behandlung mit dem zytotoxischen Wirkstoff einen additiven und (wie in den folgenden Beispielen beschrieben) häufig einen synergistischen Grad des Zelltods. Solche Synergien werden oft mit zytotoxischen Wirkstoffen erhalten, die geeignet sind, auf Zellen in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zu wirken, und solche zytotoxischen Wirkstoffe sind bevorzugt für die Verwendung in den vorliegenden Methoden der Erfindung. Beispiele solcher bevorzugter zytotoxischer Wirkstoffe sind Platin-basierte Wirkstoffe, Paclitaxel und Cyclophosphamid.

**[0040]** Die folgenden Beispiele zeigen die Wirksamkeit der vorliegenden Erfindung. Insbesondere zeigen die Beispiele, dass die Vorbehandlung neoplastischer Zellen mit 1,25D<sub>3</sub> oder seinen nicht-hypercalcämischen Analoga, die Wirksamkeit zahlreicher traditioneller zytotoxischer Wirkstoffe verstärken kann, und dass so eine Verstärkung effektiver ist als die gleichzeitige Anwendung. Diese Beispiele sind hier für rein illustrative Zwecke eingeschlossen und sollten nicht so interpretiert werden, dass sie auch nur einen Aspekt der beanspruchten Erfindung einschränken.

#### BEISPIEL 1

**[0041]** Die folgenden Beispiele erläutern die Materialien und allgemeinen Verfahren, die in den folgenden Beispielen verwendet wurden.

**[0042]** Weibliche C3H/HeJ-Inzucht-Mäuse im Alter von 6–10 Wochen wurden von Jackson Laboratories erhalten. Die Mäuse waren frei von Virus-Antikörpern, Alter und Gewicht waren der experimentellen Verwendung angepasst und die Mäuse wurden mit einer ausgewogenen Nager-Diät gefüttert.

**[0043]** SCCVII/SF-Zellen, eine schnell wachsende, nicht-metastasierende schwammige Nager-Tumorzelllinie, wurde in vivo in C3H/HeJ Mäusen durch subkutane Inokulation von  $5 \times 10^5$  Gewebekulturzellen, die sich in der log-Phase befanden, in die rechte Flanke des Tieres aufrecht erhalten, wie vorher beschrieben (McElwain et al., Mol. Cell. Diff. 3, 31–50, 1995). Die SCCVII/SF-Zelllinie wurde in vitro in RPMI-1640 gehalten, angereichert mit 12.5% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin-Streptomycinsulfat.

**[0044]** 1,25D<sub>3</sub> und das nicht-hypercalcämische Analogon davon, Ro23-7553, wurden anfänglich in der reinen Pulverform, in einem verschlossenen, lichtgeschützten Gefäß bei 4°C aufbewahrt. Zur Verwendung wurde jeder Wirkstoff in 100% Athylalkohol rekonstituiert und aufbewahrt, wie beschrieben (McElwain et al., Mol. Cell. Diff. 3, 31–50 (1995)). Die zytotoxischen Wirkstoffe (Carboplatin, Cisplatin (d. h. cDDP) und Paclitaxel) wurden in 0.9% Salzlösung verdünnt und i. p. in unterschiedlichen Dosen in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml während der experimentellen Protokolle injiziert.

**[0045]** Die in vitro Toxizität von Medikamenten auf Tumorzellen wurde mit dem in vitro klonogenen Test mit kleinen Modifikationen, wie hier beschrieben, ermittelt (McElwain et al., Mol. Cell. Diff., 3, 31–50 (1995)). Kurz gefasst wurden Nager-SCCVII/SF-Zellen entweder mit 2 nM oder 4 nM 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 vorbehandelt. Während 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 über längere Zeit in Zellkulturmedien nicht stabil sind, wurden antiproliferative Wirkungen nach 24 Stunden, 48 Stunden bzw. 7 Tage Inkubationszeit ermittelt (McElwain et al., supra). Nach einer 48-stündigen Inkubation mit 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 wurden die Zellen für 2 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des zytotoxischen Wirkstoffs behandelt, mit RPMI 1640 plus FKS gewaschen und in unterschiedlichen Konzentrationen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach einer 7-tägigen Inkubation bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, wurden die Einzel-Zellschichten mit Salzlösung gewaschen, mit 100% Methanol fixiert, mit 10% Giemsa gefärbt und die Kolonien wurden mittels Lichtmikroskopie ausgezählt. Der überlebende Anteil wurde so berechnet, dass die Teilungseffizienz behandelter Zellen durch die Teilungseffizienz unbehandelter Kontroll-Zellen geteilt wurde.

**[0046]** Die Wirkung von 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 alleine und/oder in Kombination mit verschiedenen zytotoxischen Wirkstoffen auf Tumorzellen in vivo wurde durch eine Modifikation des in vivo klonogenen Tumorzellen-Überlebenstest ermittelt, bei dem die Tumoren herausgeschnitten werden (Johnson et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 32, 339–46 (1993)). Kurz gefasst wurden Tiere mit SCCVII/SF-Tumoren am Tag 14 nach Implantation für 3 Tage i. p. mit 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 bei einer Dosis von entweder 0.5 mg/kg/Tag oder unterschiedlichen Dosen von 0,03125–0,5 mg/kg/Tag behandelt. Am Tag 3 erhielten die Tiere auch eine i. p. Dosis von entweder 6 mg/kg oder unterschiedlicher Dosen von 1–6 mg/kg zytotoxischen Wirkstoff. Nach 24 Stunden wurden Aliquots der zerkleinerten Tumore für 60 min bei Raumtemperatur enzymatisch mit einer Mischung aus Typ 1 Kollagenase (37,5 mg/ml), DNase (55 mg/ml) und EDTA (1%) dissoziiert. Die lebenden Tumorzellen (bestimmt mittels Trypanblau-Färbung) wurden dann in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Kolonien gezählt und die Zahlen klonogener Zellen pro Gramm Tumor ermittelt. Der Mittelwert ± Standardabweichung (SD) der Zellernte, der Zellteilungseffizienz und der mittleren Zahl klonogener Zellen betrug für die Kontroll-Tumoren (keine Behandlung, n = 40) durchschnittlich  $139,4 \pm 38,2 \times 10^6$  lebende Tumorzellen/g Tumor,  $27,0 \pm 0,56\%$  bzw.  $37,5 \pm 13,3 \times 10^6$  klonogene Tumorzellen/g Tumor. Der überlebende Anteil pro Gramm Tumor ist definiert als die Zahl klonogener Tumorzellen pro Gramm des behandelten Tumors geteilt durch die Zahl der klonogenen Tumorzellen pro Gramm des Kontroll-Tumors (unbehandelt). Dieser Test stellt ein genaues Maß dar, mit dem die in vivo Anti-Tumor-Aktivität gemessen werden kann. Ein überlebender Anteil von weniger als 0,1 korreliert mit der tatsächlichen Abnahme im Tumolvolumen und einer gesteigerten Verzögerung des erneuten Wachstums des Tumors (Braunschweiger et al., Cancer Res. 48, 6011–6016 (1988); Braunschweiger et al., Cancer Res. 51, 5454–5460 (1991)).

**[0047]** Die Wirkung von 1,25D<sub>3</sub> oder Ro23-7553 alleine und/oder in Kombination mit verschiedenen zytotoxischen Wirkstoffen auf Tumorzellen in vivo wurde ferner dadurch ermittelt, dass die Verzögerung im Tumorstadium (Tumor-Wiederwachstums-Test) gemessen wurde. SCCVII/SF-Tumorzellen ( $5 \times 10^5$ ) wurden subkutan in die Flanke eines Beines von C3H/HeJ-Mäusen injiziert. Am Tag 9 nach Implantation, wenn die Tumoren fühlbar waren (ungefähr  $5 \times 5$  mm), wurden die Tiere zufällig für die Behandlung ausgewählt und mit niedrigen Dosen Ro23-7553 (0,214 µg/kg/Tag) oder 1,25D<sub>3</sub> (0,2 µg/Maus) i. p. unter Verwendung einer mikro-osmotischen Pumpe für eine kontinuierliche Freisetzung über 7 Tage behandelt. Nach 7 Tagen wurden 6 mg/kg zytotoxischer Wirkstoff i. p. injiziert. Kontroll-Tiere erhielten entweder jede Behandlung mit nur einer Substanz alleine oder keine Behandlung. Die Kontroll-Tiere, die nicht behandelt waren, wurden mit Träger (PBS) alleine injiziert oder es wurden Placebo-Pumpen implantiert. Das Tumorstadium wurde gemessen, indem der Tumor-Durchmesser mittels Schieblehre dreimal die Woche gemessen wurde. Die Tumorstadien wurden nach folgender Formel berechnet:  $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 / 2$ . Die Volumina nach der Behandlung wurden als Anteil des Volumens vor der Behandlung, zum Zeitpunkt der ersten Behandlung, ausgedrückt. Die Verzögerung des Wiederwachstums der Tumoren wurde als der Mittelwert ± Standardabweichung aus dem Unterschied in der Zeit, die Kontroll- und behandelte Tumoren benötigten, damit sich ihr Volumen gegenüber den Volumina vor der Behandlung vervierfachte, ermittelt.

## BEISPIEL 2

**[0048]** Dieses Beispiel zeigt das Ausmaß, mit dem Tumorzellen durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat empfindlicher gegenüber den Wirkungen einer herkömmlichen, zytotoxischen Cisplatin-Therapie reagieren.

**[0049]** Cisplatin (d. h. cDDP) und Ro23-7553 wurden alleine und in Kombination mit dem in vitro klonogenen Test unter Verwendung der SCCVII/SF-Tumorzelllinie, wie oben beschrieben, untersucht. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, steigert die Vorbehandlung von Zellen mit sowohl 2 als auch 4 nM Ro23-7553 die klonogene Zelltötung

signifikant, verglichen mit Cisplatin alleine oder bei gleichzeitiger Anwendung (d. h. ohne Vorbehandlung). Eine signifikante Steigerung der Cisplatin-vermittelten Zytotoxizität wurde sogar bei niedrigen Cisplatin-Dosen beobachtet.

### BEISPIEL 3

**[0050]** Dieses Beispiel zeigt die Steigerung der in vivo Cisplatin-vermittelten Anti-Tumor-Aktivität durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat.

**[0051]** Der klonogene Zelltötungs-Test, bei dem die Tumoren herausgeschnitten werden, wurde angewendet, wobei Tiere mit SCCVII/SF-Tumoren am Tag 14 nach Implantation für 3 Tage i. p. mit 0,5 mg/kg/Tag Ro23-7553 behandelt wurden. Am dritten Tag erhielten die Tiere unterschiedliche Dosen Cisplatin. Nach 24 Stunden wurden die Tumoren geerntet, dissoziiert und für eine 7-tägige Inkubation ausplattiert. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, führt eine 3-tägige Vorbehandlung mit Ro23-7553 vor Cisplatin-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme der klonogenen Zelltötung, verglichen mit Tieren, die mit Cisplatin oder Ro23-7553 alleine behandelt wurden. Eine signifikante Zunahme in der klonogenen Tumorzelltötung wurde bei jeder getesteten Cisplatin-Dosis beobachtet, im Vergleich zu Cisplatin alleine.

**[0052]** Um die Wirkung unterschiedlicher Ro23-7553-Dosen in diesem Test zu ermitteln, wurden Mäuse mit SCC-Tumoren täglich für 3 Tage mit Dosen von 0,031215 mg/kg/Tag bis 0,5 mg/kg/Tag Ro23-7553 behandelt. Am Tag 3 wurde 6 mg/kg Cisplatin angewendet. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, war Ro23-7553 sogar bei der geringsten der getesteten Dosen fähig, die Cisplatin-vermittelte Tumorzelltötung signifikant zu steigern, verglichen mit Cisplatin oder Ro23-7553 alleine. Bei keinem der Versuche und bei keiner der angewendeten Ro23-7553-Dosen wurden die Tiere hypercalcämisch.

### BEISPIEL 4

**[0053]** Dieses Beispiel zeigt die Steigerung der in vivo Cisplatin-vermittelten Anti-Tumor-Aktivität durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat.

**[0054]** Der Tumor-Wiederwachstums-Test wurde verwendet, wobei Mäuse mit SCCVII/SF-Tumoren (Tag 9 nach Implantation) mit Ro23-7553, kontinuierlich angewendet, behandelt wurden. Am Ende der Ro23-7553-Behandlung wurden 6 mg/kg Cisplatin i. p. injiziert. Die Tiere ohne Behandlung oder mit Einzelsubstanz-Behandlung wurden in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe mit Träger (PBS) injiziert oder es wurden Placebo-Pumpen implantiert. Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, zeigten die Tiere eine signifikante Abnahme in dem anteiligen Tumolvolumen, wenn sie mit Ro23-7553 vor Cisplatingabe behandelt wurden, verglichen mit Behandlungen mit dem jeweiligen Wirkstoff alleine. Zum Zeitpunkt als die Verzögerung des Tumor-Wiederwachstums untersucht wurde (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Differenz in der Zeit, die behandelte und Kontroll-Tumoren benötigen, damit das Volumen sich gegenüber dem Start der Behandlung vervierfacht, in [Fig. 4](#) durch die gepunktete Linie dargestellt), konnte eine signifikante Zunahme in den Tieren beobachtet werden, die mit Ro23-7553 plus Cisplatin behandelt wurden, verglichen mit entweder Cisplatin oder Ro23-7553 alleine. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Wirkung von Ro-23-7553 und Cisplatin auf die Verzögerung des Tumor-Wiederwachstums

Behandlung	Verzögerung des Tumor-Wiederwachstums
Ro23-7553	1,8 $\pm$ 0,8
Cisplatin (6 mg/kg)	4,4 $\pm$ 0,3
Ro23-7553/Cisplatin	7,7 $\pm$ 0,4

### BEISPIEL 5

**[0055]** Dieses Beispiel zeigt das Ausmaß, mit dem Tumorzellen durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat empfindlicher gegenüber den Wirkungen einer herkömmlichen, zytotoxischen Carboplatin-Therapie reagieren.

**[0056]** Carboplatin (d. h. CBDCA) und 1,25D<sub>3</sub> wurde alleine und in Kombination mit dem in vitro klonogenen Test, wie oben beschrieben, untersucht. Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, steigert die Vorbehandlung der Zellen mit 2 nM

1,25D<sub>3</sub> für 48 Stunden die klonogene Zelltötung signifikant, verglichen mit Carboplatin alleine oder bei gleichzeitiger Anwendung (d. h. keine Vorbehandlung) von Carboplatin in Kombination mit 1,25D<sub>3</sub>.

## BEISPIEL 6

**[0057]** Dieses Beispiel zeigt die Steigerung der in vivo Carboplatin-vermittelten Anti-Tumor-Aktivität durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat.

**[0058]** Der klonogene Zelltötungstest, bei dem die Tumoren herausgeschnitten werden, wurde verwendet, wobei Tiere mit SCCVII/SF-Tumoren 14 Tage nach Implantation für 3 Tage mit 0,5 mg 1,25D<sub>3</sub>/kg/Tag i. p. behandelt wurden. Am dritten Tag erhielten die Tiere unterschiedliche Carboplatin-Dosen. Nach 24 Stunden wurden die Tumoren geerntet, dissoziiert und für eine 7-tägige Inkubation ausplattiert. Wie in [Fig. 6a](#) gezeigt, bewirkt die Vorbehandlung für 3 Tage mit 1,25D<sub>3</sub> vor Carboplatin-Anwendung eine signifikante Zunahme der klonogenen Zelltötung im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit Carboplatin oder 1,25D<sub>3</sub> alleine behandelt wurden. Eine signifikante Zunahme in der klonogenen Tumorzelltötung wurde bei jeder der getesteten Carboplatin-Dosen beobachtet.

**[0059]** In einem zweiten Experiment wurde der klonogene Zelltötungstest verwendet, bei dem die Tumoren herausgeschnitten werden, wobei Tiere mit SCCVII/SF-Tumoren 14 Tage nach Implantation für 3 Tage i. p. mit unterschiedlichen Dosen 1,25D<sub>3</sub> behandelt wurden. Am dritten Tag erhielten die Tiere 50 mg/kg/Tag Carboplatin. Nach 24 Stunden wurden die Tumoren geerntet, dissoziiert und für eine 7-tägige Inkubationsdauer ausplattiert. Wie in [Fig. 6b](#) gezeigt, bewirkt die Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub> vor Carboplatin-Anwendung eine signifikante Steigerung der klonogenen Zelltötung, sogar bei der niedrigsten 1,25D<sub>3</sub> Dosis. Eine signifikante Zunahme in der klonogenen Tumorzelltötung wurde auch bei jeder getesteten Carboplatin-Dosis beobachtet, verglichen mit Carboplatin alleine. Keines der Tiere wurde durch irgendeine der getesteten 1,25D<sub>3</sub> Dosen hypercalcämisch.

## BEISPIEL 7

**[0060]** Dieses Beispiel zeigt das Ausmaß, mit dem Tumorzellen durch Vorbehandlung mit einem Vitamin D-Derivat empfindlicher gegenüber den Wirkungen einer herkömmlichen, zytotoxischen Paclitaxel-Therapie reagieren.

**[0061]** Paclitaxel und 1,25D<sub>3</sub> wurde alleine und in Kombination mit dem in vitro klonogenen Test, wie oben beschrieben, untersucht. Wie in [Fig. 7](#) gezeigt, steigert die Vorbehandlung der Zellen mit 1,25D<sub>3</sub> die klonogene Zelltötung signifikant, verglichen mit 1,25D<sub>3</sub> alleine. Es wurde auch beobachtet, dass die gleichzeitig Gabe von 1,25D<sub>3</sub> und Paclitaxel nicht in einer Steigerung der klonogenen Zelltötung, verglichen mit Paclitaxel alleine, führt.

## BEISPIEL 8

**[0062]** Dieses Beispiel zeigt die Steigerung der Paclitaxel-vermittelten in vivo Anti-Tumor-Aktivität durch Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>.

**[0063]** Der klonogene Zelltötungstest, bei dem die Tumoren herausgeschnitten werden, wurde verwendet, wobei Tier mit SCCVII-SF-Tumoren am Tag 11 nach Implantation für 3 Tage i. p. mit 0,2 µg/Tag 1,25D<sub>3</sub> behandelt wurden. Am dritten Tag erhielten die Tiere unterschiedliche Paclitaxel-Dosen. Nach 24 Stunden wurden die Tumoren geerntet, dissoziiert und für eine 7-tägige Inkubation ausplattiert. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt ist, führt die Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub> für 3 Tage vor der Paclitaxel-Anwendung zu einer signifikanten Zunahme der klonogenen Zelltötung, verglichen mit Tieren, die mit Paclitaxel alleine behandelt waren. Eine signifikante Zunahme in der klonogenen Zelltötung wurde bei jeder getesteten Paclitaxel-Dosis beobachtet, verglichen mit Paclitaxel alleine. Keines der Tiere wurde während dieser Behandlungen hypercalcämisch.

## BEISPIEL 9

**[0064]** Dieses Beispiel zeigt die Steigerung der in vivo Paclitaxel-vermittelten Anti-Tumor-Aktivität durch Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>.

**[0065]** Der Tumor-Wiederwachstumstest wurde angewendet, wobei Mäuse mit SCCVII/SF-Tumoren (Tag 7 nach Implantation) mit 0,2 µg 1,25D<sub>3</sub>/Maus kontinuierlich behandelt wurden. Am Ende der 1,25D<sub>3</sub> – Anwen-

ung wurden 40 mg/kg Paclitaxel i. p. injiziert. In Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe wurden die nicht behandelten oder mit einzelnen Wirkstoffen behandelten Tiere mit Träger (PBS) injiziert oder es wurden Placebo-Pumpen implantiert. Wie in [Fig. 9](#) gezeigt, zeigten die Tiere eine signifikante Abnahme in dem Anteiligen Tumolvolumen, wenn sie mit  $1,25D_3$  vor Paclitaxel-Anwendung vorbehandelt waren, verglichen mit den Behandlungen mit den jeweiligen Wirkstoffen alleine.

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Vitamin D-Derivats und eines zytotoxischen Wirkstoffs zur Herstellung von Medikamenten für die Abtötung von einer Zelle in vivo, wobei (a) zunächst das Vitamin D-Derivat und (b) nachfolgend der zytotoxische Wirkstoff der Zelle verabreicht wird, wobei die Zelle eine neoplastische Zelle ist.

2. Verwendung eines Vitamin D-Derivats und eines Platin-basierten zytotoxischen Wirkstoffs zur Herstellung von Medikamenten für die Abtötung von einer Zelle, wobei (a) zunächst das Vitamin D-Derivat und (b) nachfolgend der Platin-basierte zytotoxische Wirkstoff der Zelle verabreicht wird, wobei die Zelle eine neoplastische Zelle ist.

3. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei sich die Zelle innerhalb eines Tumors befindet.

4. Die Verwendung eines Vitamin D-Derivats und eines zytotoxischen Wirkstoffs zur Herstellung von Medikamenten für die Verlangsamung des Tumorwachstums in vivo, wobei (a) zunächst das Vitamin D-Derivat und (b) nachfolgend der zytotoxische Wirkstoff dem Tumor verabreicht wird.

5. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 3–4, wobei der zytotoxische Wirkstoff ein Platin-basierter zytotoxischer Wirkstoff ist.

6. Die Verwendung eines Vitamin D-Derivats und eines Platin-basierten zytotoxischen Wirkstoffs zur Herstellung von Medikamenten für die Verlangsamung des Tumorwachstums, wobei (a) zunächst das Vitamin-D-Derivat und (b) nachfolgend der Platin-basierte zytotoxische Wirkstoff dem Tumor verabreicht wird.

7. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1–6, wobei das Vitamin D-Derivat  $1,25D_3$  ist.

8. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1–6, wobei das Vitamin D-Derivat ein Analogon von  $1,25D_3$  ist.

9. Die Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Analogon ein nicht-hyperkalzämisches Analogon ist.

10. Die Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Analogon Ro23-7553 oder Ro24-5531 ist.

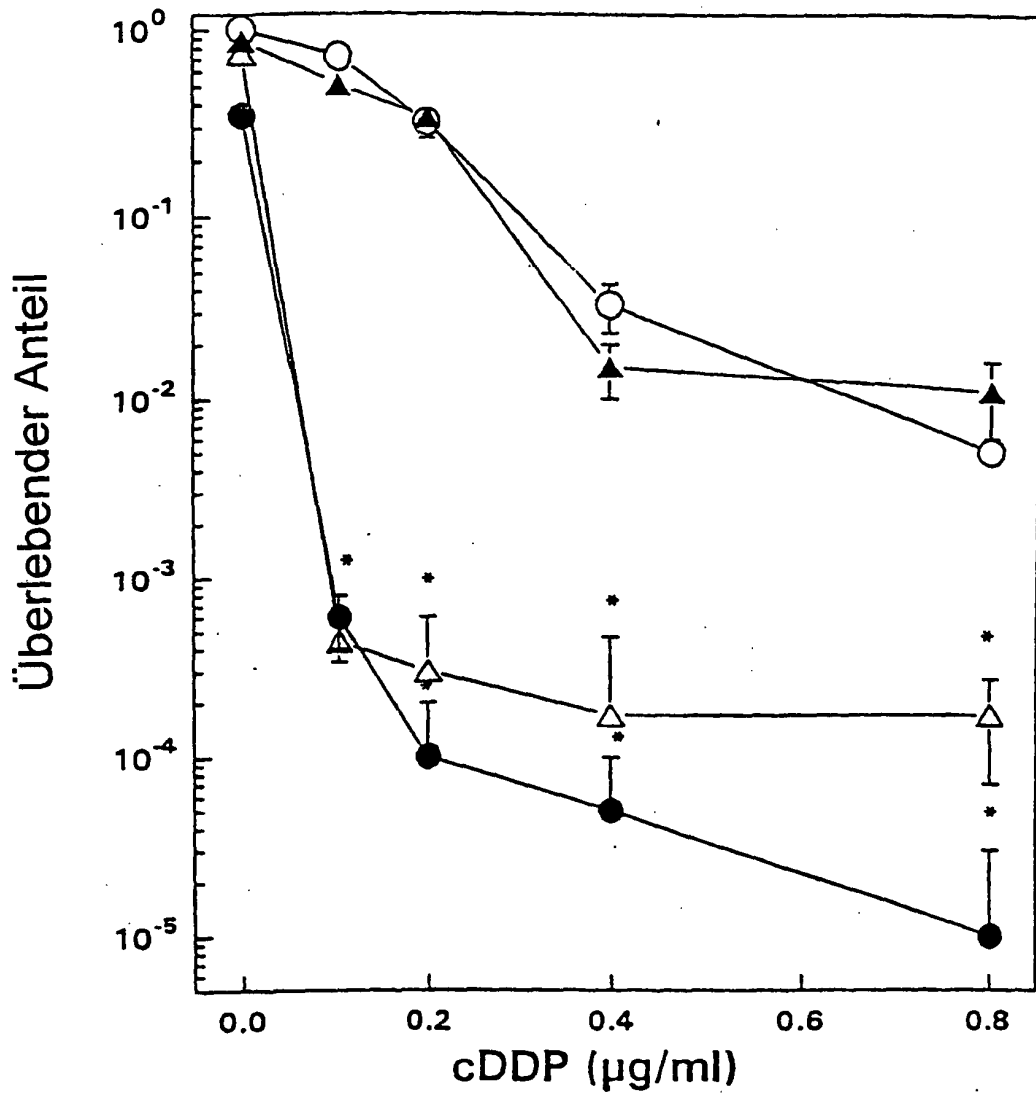
11. Die Verwendung nach Anspruch 1–10, wobei der zytotoxische Wirkstoff selektiv auf Zellen in der  $G_0$ - $G_1$ -Phase des Zellzyklus wirkt.

12. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1–11, wobei der zytotoxische Wirkstoff ein Carboplatin oder ein Cisplatin ist.

13. Die Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 4, wobei der zytotoxische Wirkstoff Paclitaxel oder Cyclophosphamid ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

**LEGENDE:**

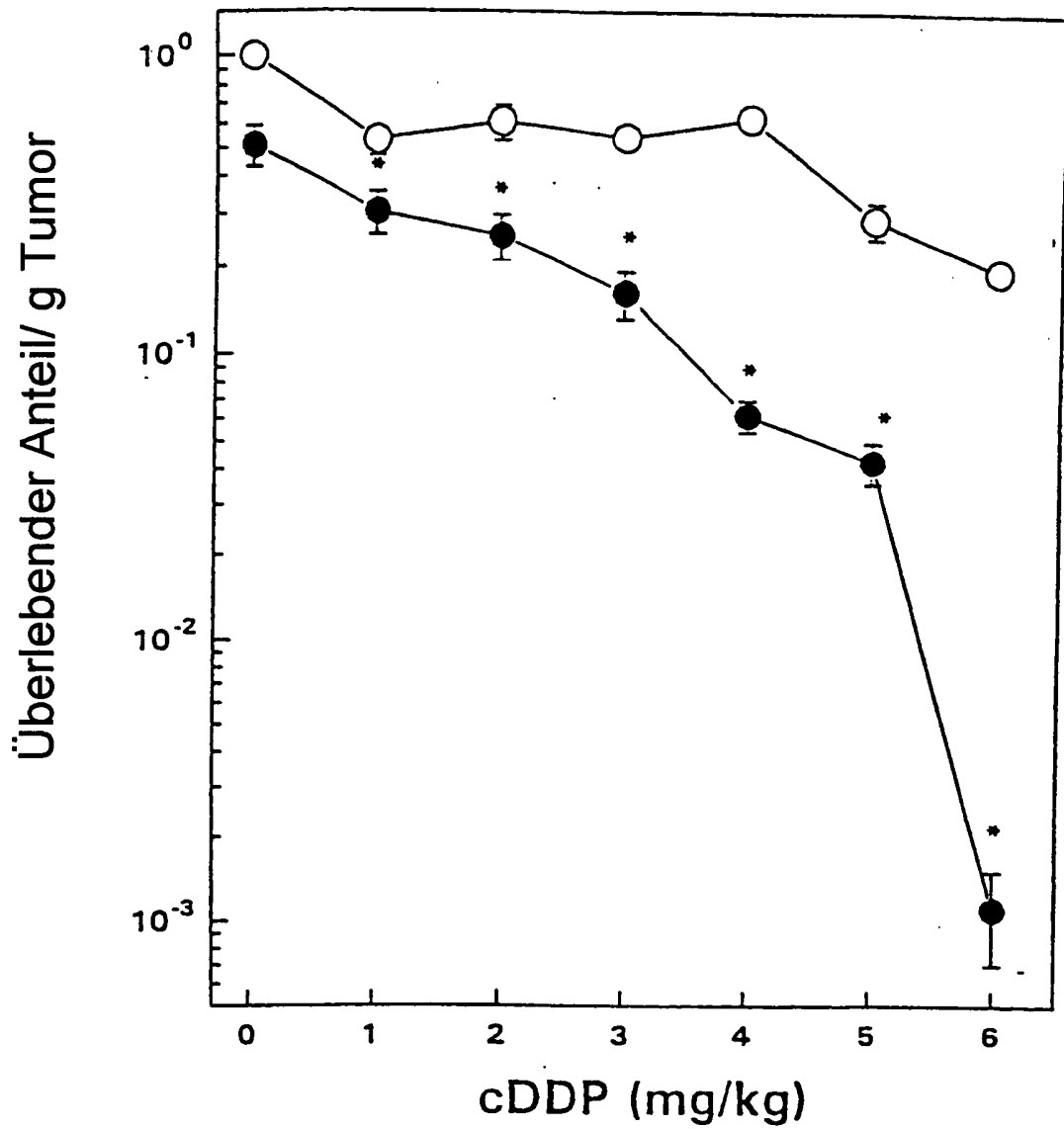
○ = cDDP alleine

▲ = Gleichzeitige Gabe von cDDP und Ro23-7553 (4 µM)

△ = Vorbehandlung mit 2 µM Ro23-7553, dann cDDP

● = Vorbehandlung mit 4 µM Ro23-7553, dann cDDP

**Figur 1**

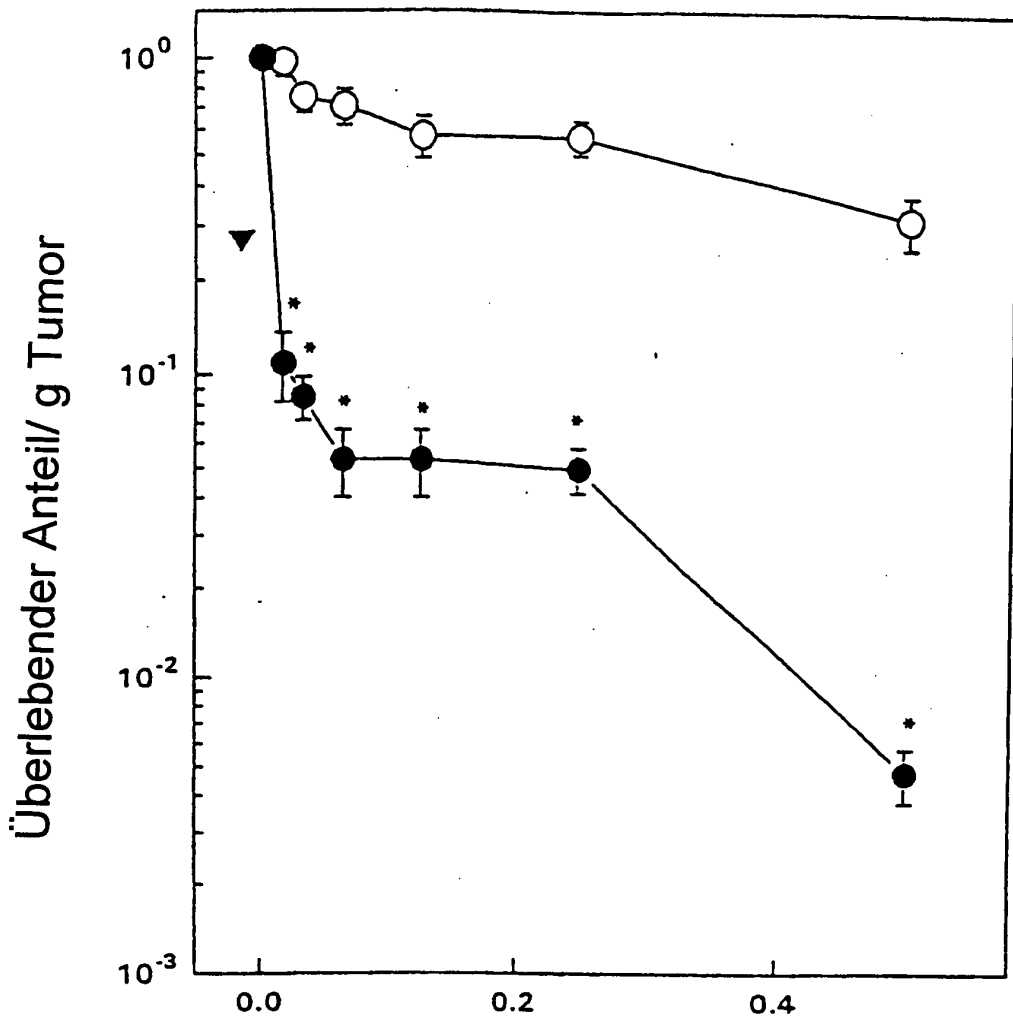


**LEGENDE:**

○ = Vorbehandlung mit Ro23-7553, dann cDDP

● = cDDP alleine

**Figur 2**



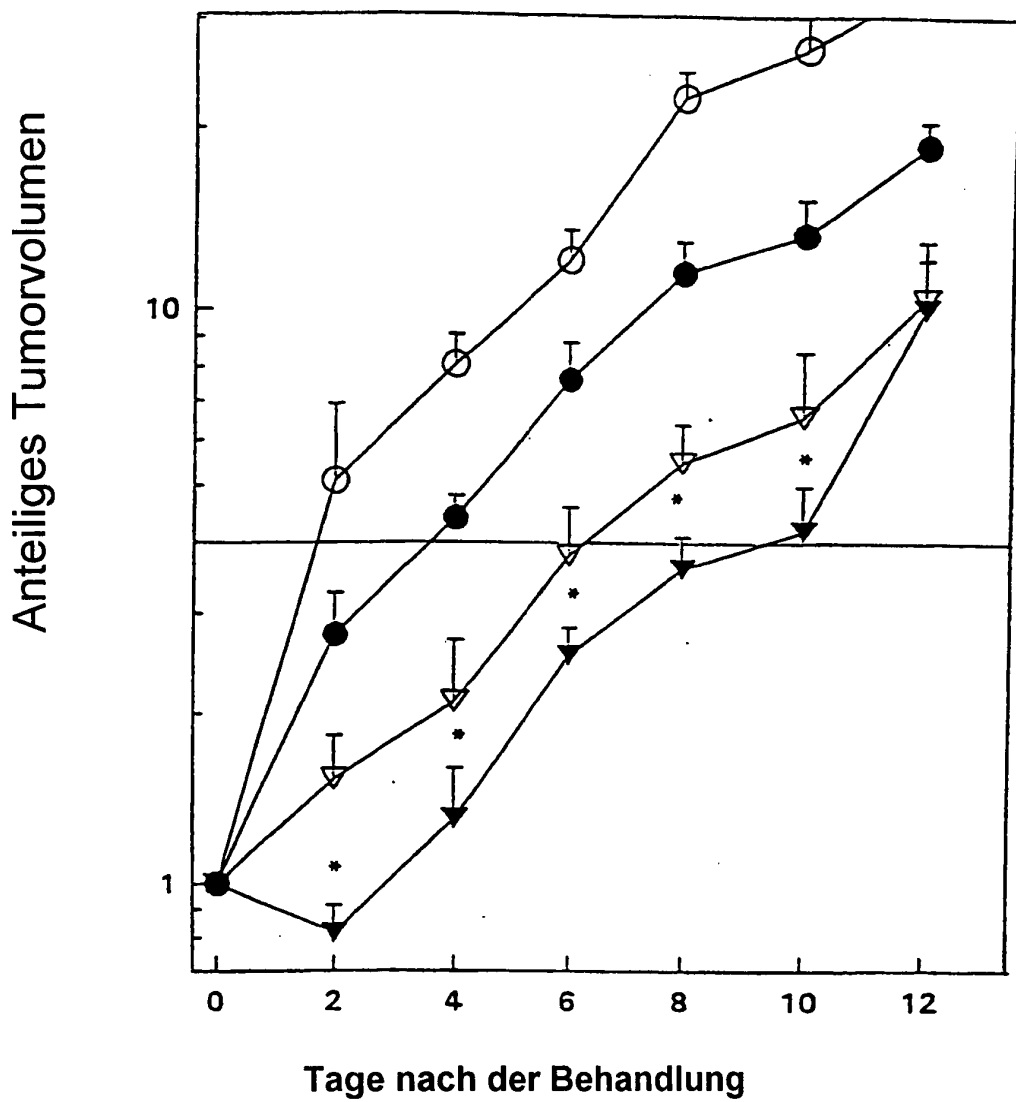
**LEGENDE:**

○ = Ro23-7553 alleine

● = Vorbehandlung mit Ro23-7553, dann cDDP

▼ = cDDP alleine

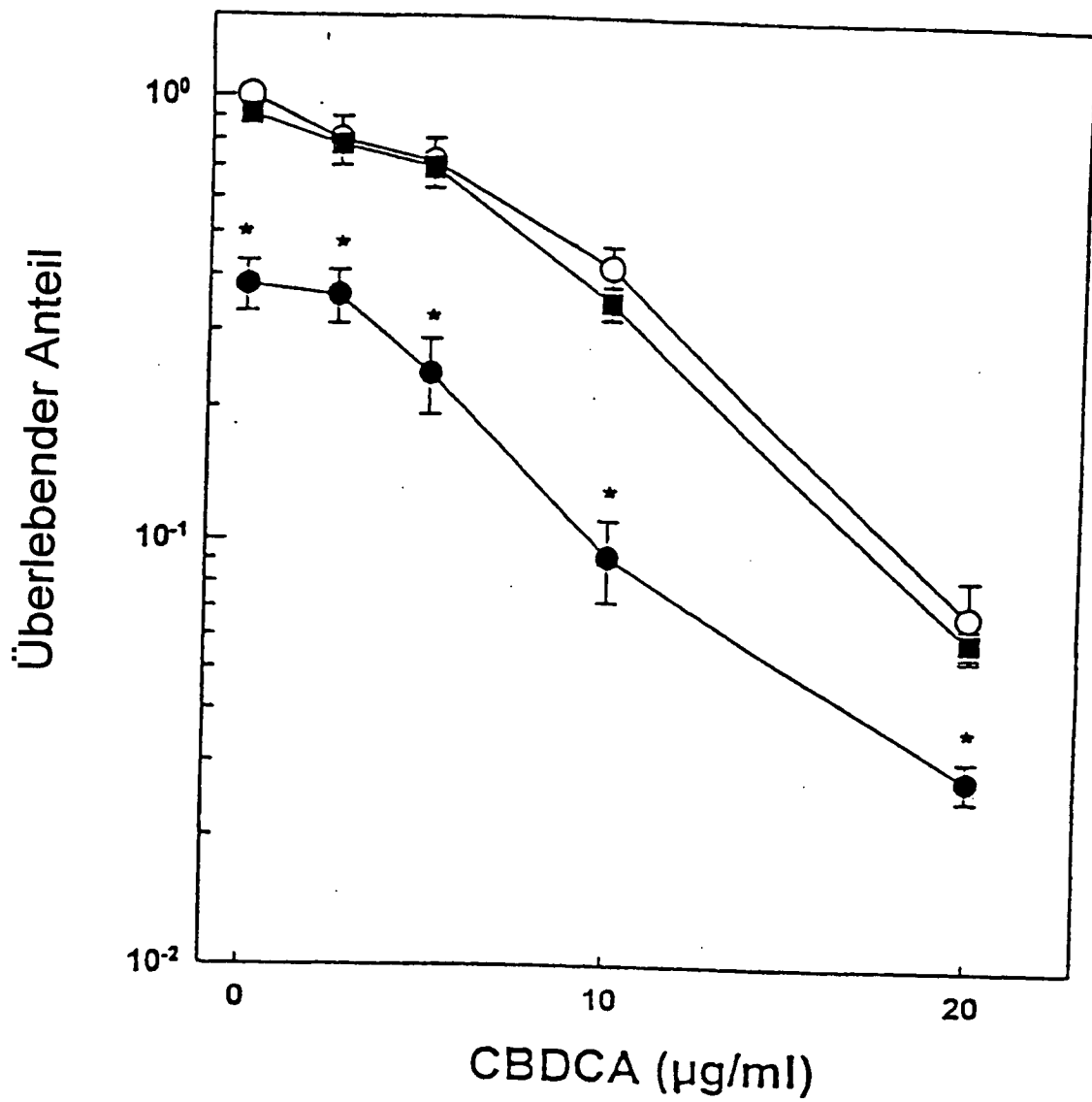
**Figur 3**



**LEGENDE:**

- = Unbehandelt (Kontrolle)
- ▼ = Ro23-7553 und cDDP
- ▽ = cDDP alleine
- = Ro23-7553 alleine

**Figur 4**



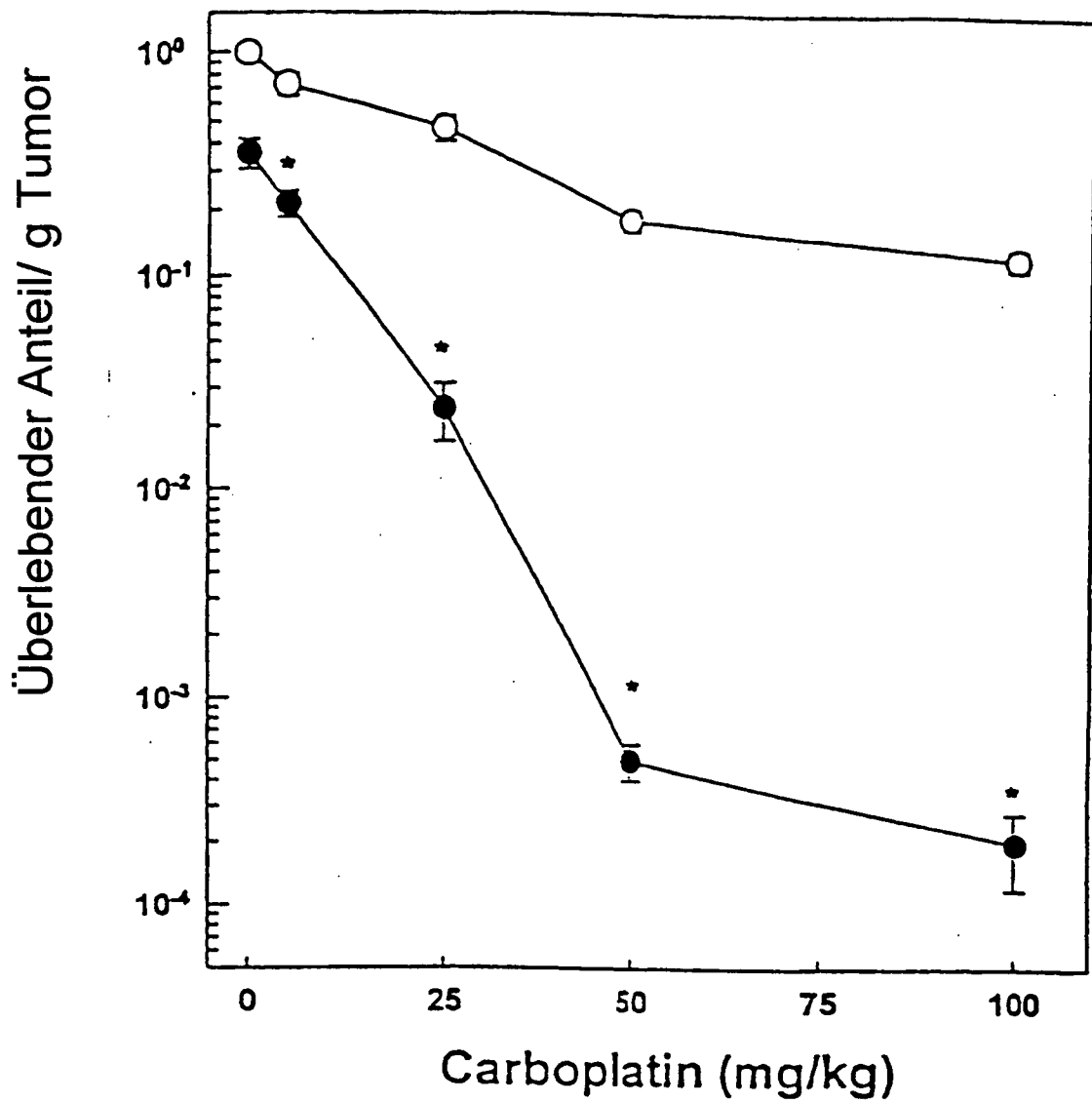
**LEGENDE:**

○ = Carboplatin

● = Vorbehandlung mit Carboplatin, dann 1,25D<sub>3</sub>

■ = Gleichzeitige Gabe von Carboplatin und 1,25D<sub>3</sub>

**Figur 5**

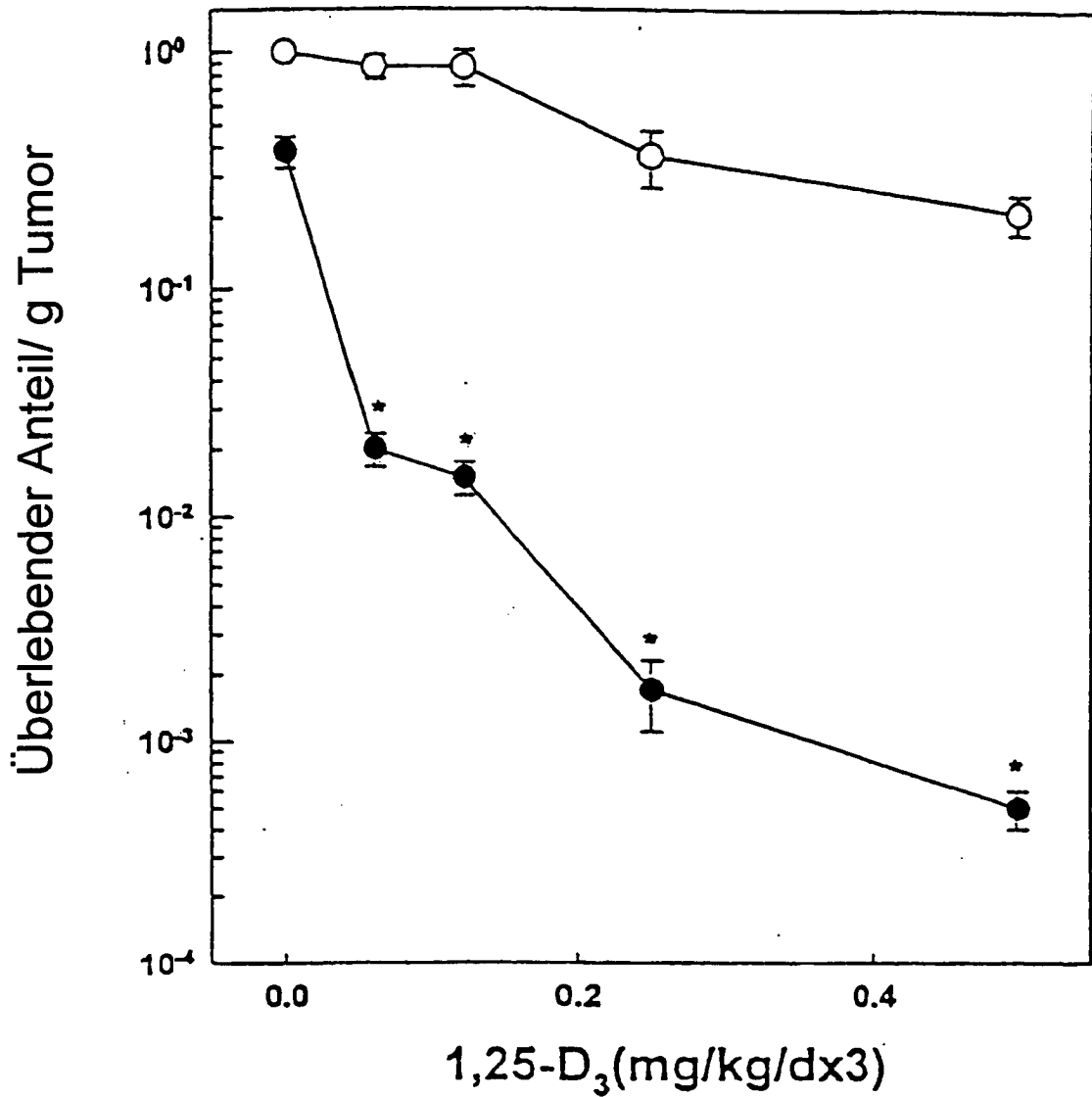


**LEGENDE:**

○ = Carboplatin alleine

● = Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>, dann Carboplatin

**Figur 6a**

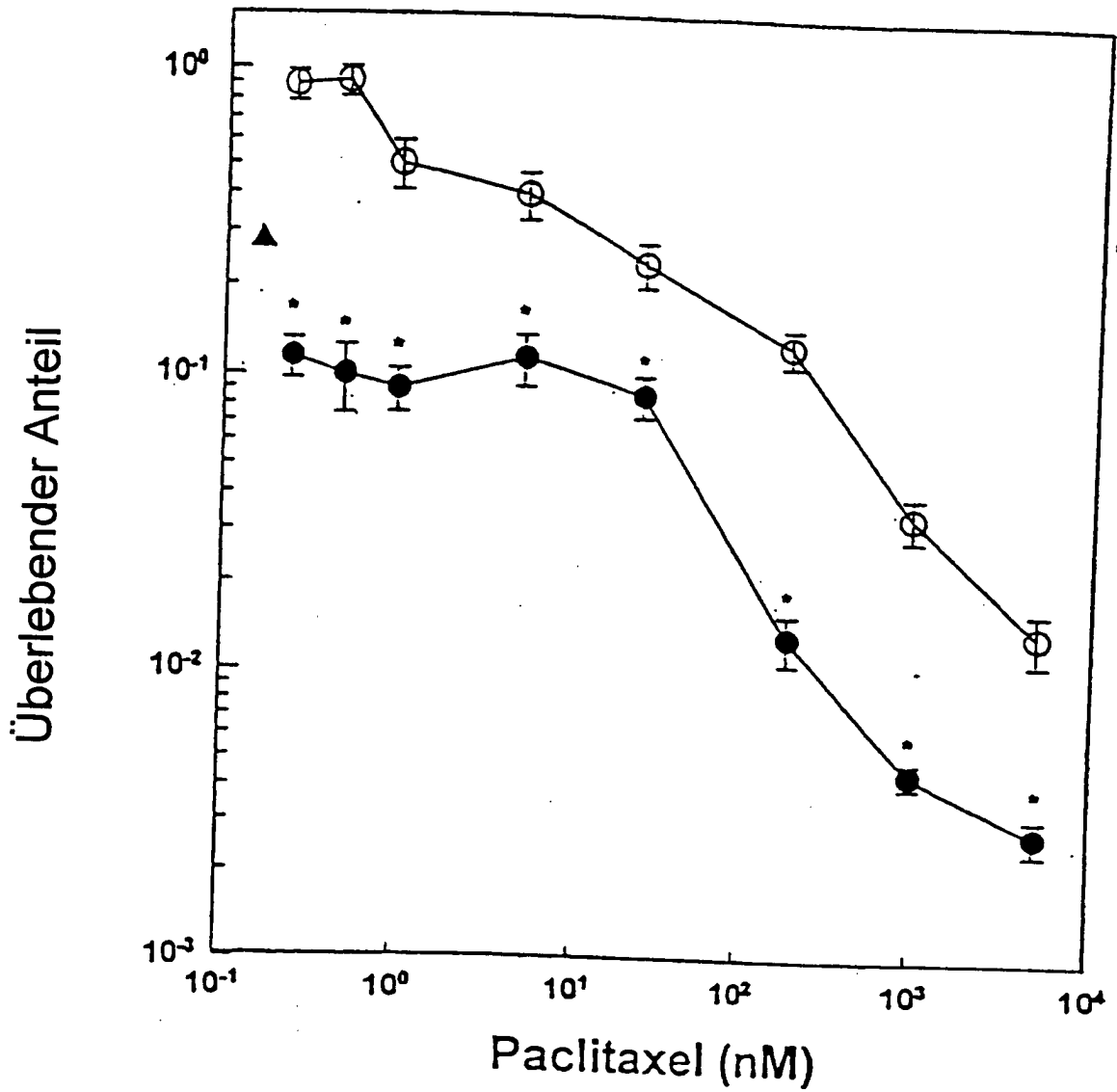


**LEGENDE:**

○ = 1,25D<sub>3</sub> alleine

● = Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>, dann Carboplatin

**Figur 6b**



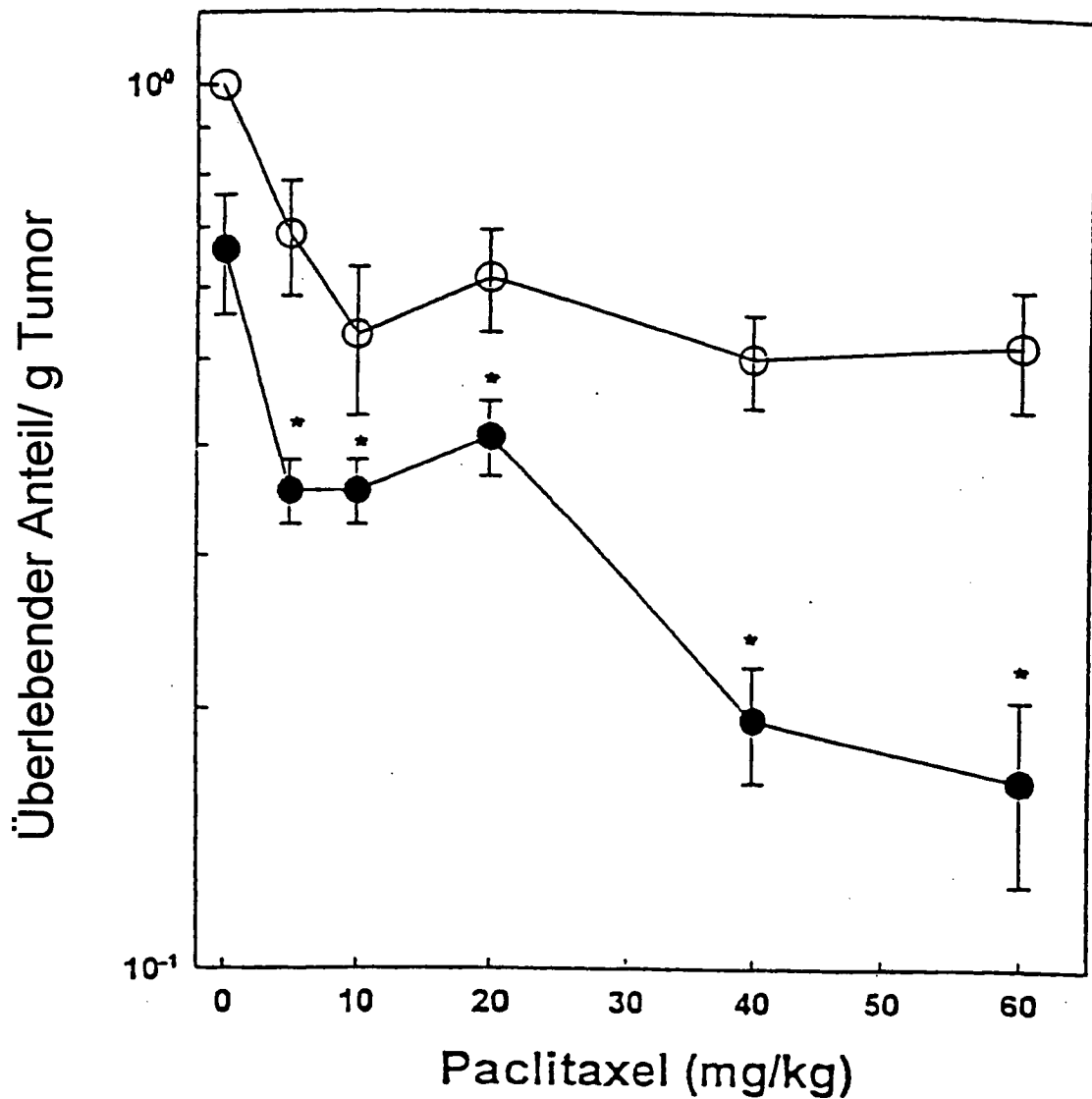
**LEGENDE:**

O = Paclitaxel alleine

▲ = 1,25D<sub>3</sub> alleine

● = Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>, dann Paclitaxel

**Figur 7**

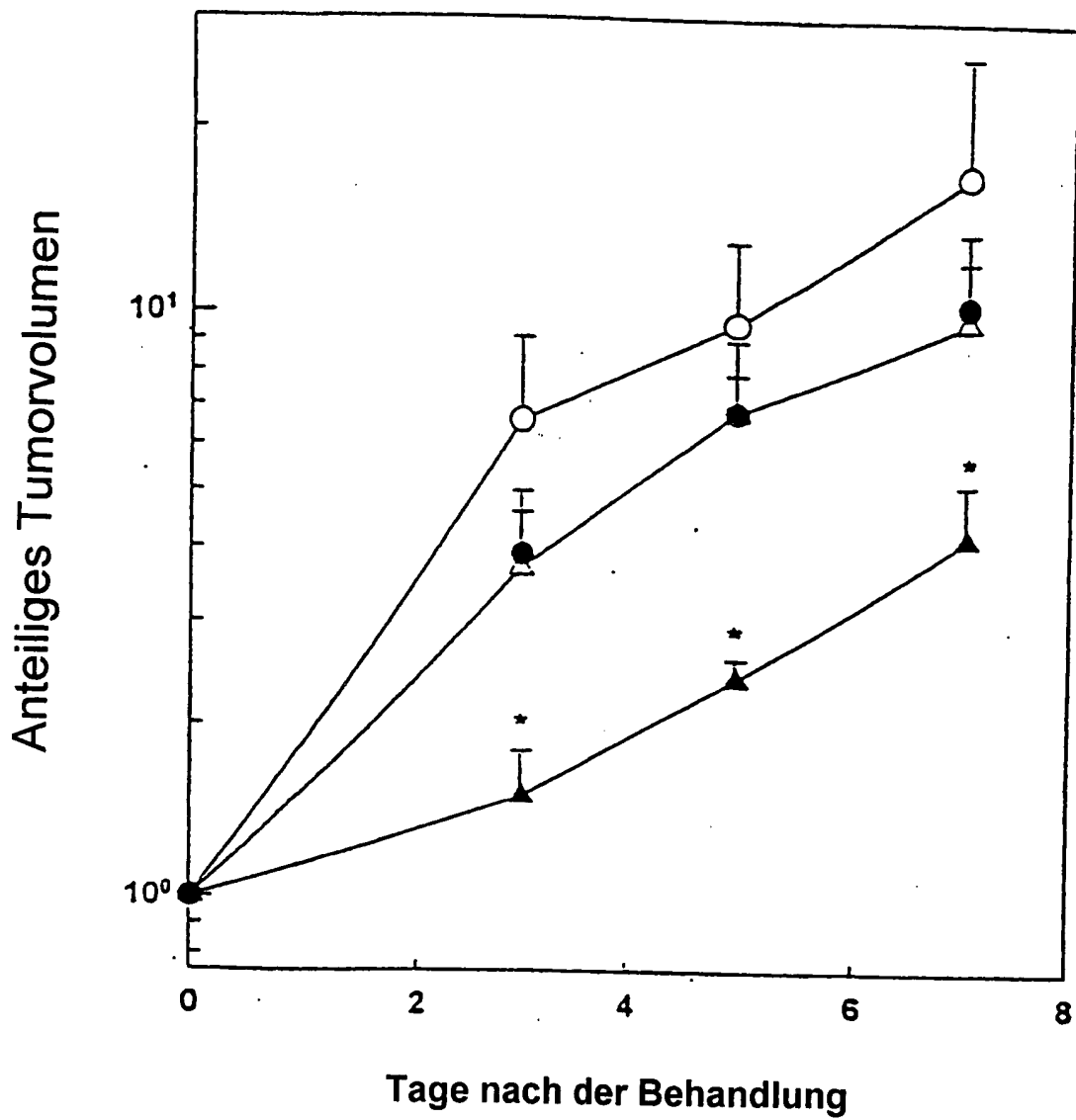


**LEGENDE:**

O = Paclitaxel alleine

● = Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>, dann Paclitaxel

**Figur 8**



**LEGENDE:**

- = Unbehandelt (Kontrolle)
- ▲ = Vorbehandlung mit 1,25D<sub>3</sub>, dann Paclitaxel
- △ = Paclitaxel alleine
- = 1,25D<sub>3</sub> alleine

**Figur 9**