



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 34 024 T2** 2006.12.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 971 585 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 34 024.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/00332**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 902 437.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/031224**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A01N 37/18** (2006.01)

A61K 31/65 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

783655 15.01.1997 US

(73) Patentinhaber:

**The Research Foundation of State University of
New York, Albany, N.Y., US; University of Miami,
Miami, Fla., US**

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GOLUB, M., Lorne, Smithtown, NY 11781, US;
McNAMARA, F., Thomas, Port Jefferson, NY
11777, US; RAMAMURTHY, S., Nungavaram,
Smithtown, NY 11787, US; LEE, Hsi-Ming,
Setauket, NY 11733, US; SIMON, Sanford, Stony
Brook, NY 11790, US; LOKESHWAR, L.,
Balakrishna, Miami, FL 33176, US; SELZER, G.,
Marie, Fort Lauderdale, FL 33308, US; BLOCK, L.,
Normal, Miami, FL 33156, US**

(54) Bezeichnung: **TETRACYCLINE VERBINDUNGEN ZUR BEHANDLUNG VON SPEZIFISCHEN KREBSARTEN**

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] Bei der Anmeldung handelt es sich um eine Continuation-in-part-Anmeldung der US-Anmeldung SN 08/783,655 (Anmeldetag 15. Januar 1997).

[0002] Die Erfindung wurde von der Regierung mit Grant No. R37-DE03987, gewährt von National Institutes of Health über das National Institute of Dental Research, und durch Grant-No. R29-CA61038, gewährt von National Institutes of Health, gefördert. Die Regierung hat bestimmte Rechte an der Erfindung.

Hintergrund der Erfindung

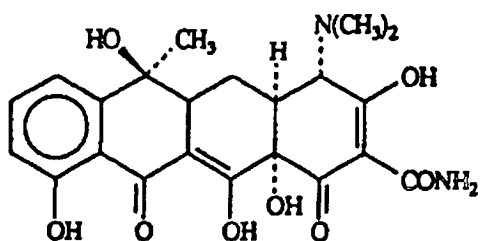
[0003] Die Erfindung betrifft die Verringerung des Wachstums von Krebs in biologischen Systemen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Hemmung der Invasivität und Metastasierung von festen Tumoren bei Säugern.

[0004] Krebs, der in zahllosen Erscheinungsformen auftritt, stellt nach wie vor eine ernsthafte Bedrohung für den Menschen dar. Obgleich Fortschritte in der Prophylaxe und Therapie von Krebs gemacht wurden, einschließlich der besonderen Erfolge gegen das Hodgkin-Lymphom und bestimmte andere Formen, sind zahlreiche Krebstypen einer Behandlung durch vorherrschende Verfahren im wesentlichen nicht zugänglich. Typischerweise wird Krebs durch Chemotherapie, bei der dem Patienten hochgradig toxische Chemikalien verabreicht werden, oder durch Radiotherapie, bei der auf den Patienten toxische Strahlungsdosen gerichtet werden, behandelt. Obgleich diese "zytotoxischen" Behandlungen üblicherweise die Abtötung einer großen Anzahl von Krebszellen bewirken, wird auch eine außerordentlich große Anzahl an gesunden Zellen abgetötet, was beim Patienten zu akuten Schwächungssymptomen, einschließlich Übelkeit, Diarrhö, Überempfindlichkeit gegen Licht, Haarverlust und dergl., führt. Die Nebenwirkungen dieser zytotoxischen Verbindungen senken die Frequenz und die Dosierung, mit der sie verabreicht werden können. Derartige Nebenwirkungen können in gewissem Umfang durch Verwendung von Verbindungen, die selektiv auf Zyklus-Zellen gerichtet sind, gemildert werden, d. h. unter Verwendung von Verbindungen, die die DNA-Replikation oder andere Wachstumsvorgänge in Zellen, die einer aktiven Reproduktion unterliegen, stören. Da Krebszellen durch ihre außerordentliche Fähigkeit zur Vermehrung gekennzeichnet sind, wird durch derartige Verfahren bevorzugt ein größerer Anteil an Krebszellen, verglichen mit gesunden Zellen, abgetötet, wobei aber die Zytotoxizität und die Nebenwirkungen als Problem verbleiben.

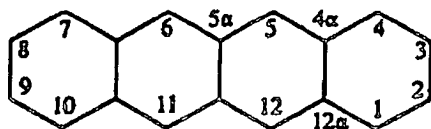
[0005] Zu weiteren neueren Entwicklungen gehören Bemühungen zur Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Onkogene oder HLA-Spezifitäten sind, um Krebszellen mit hoher Präzision zu identifizieren. Jedoch sind diese Verfahren sehr teuer und äußerst arbeitsaufwändig, wobei sie noch nicht den angestrebten Wirkungsgrad erreichen. Tatsächlich wurde berichtet, dass derartige Verfahren nur bei einer geringen Subpopulation der behandelten Patienten wirksam sind.

[0006] Das Gebiet der Krebsforschung, das sich mit den Mechanismen der Invasion von Tumorzellen befasst, hat stark vom Konzept von Liotta und Kollegen profitiert (vergl. z. B. Yamamoto et al. (1996); Emmert-Buck et al. (1994)). Dieses Modell beschreibt den invasiven Vorgang als einen logischen Ablauf von Ereignissen, woran drei unterscheidbare Stadien beteiligt sind: Anhaftung von Tumorzellen an einer extrazellulären Matrix (ECM), proteolytischer Verdau der Matrix und Bewegung von Zellen durch die proteolytisch abgebaute Barriere. Ein Schlüsselfaktor bei diesem Vorgang ist die Regulierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs; einschließlich der Gelatinasen A und B; MMP-2 bzw. MMP-9 und MMP-3 (Lokeshwar et al., 1993a)), die eine Hauptrolle beim Abbau von ECM während der Invasion spielen.

[0007] Tetracyclin und eine Anzahl von chemisch damit verwandten Verbindungen bilden eine besonders erfolgreiche Klasse von Antibiotika. Bestimmte Tetracyclin-Verbindungen, einschließlich Tetracyclin selbst sowie Sporocyclin und dergl., sind Breitbandantibiotika mit Eignung gegen eine Vielzahl von Bakterien. Die Ausgangsverbindung, nämlich Tetracyclin, weist die folgende allgemeine Struktur auf:



[0008] Das Nummerierungssystem für den Kern mit mehreren Ringen ist nachstehend angegeben:



[0009] Tetracyclin sowie das 5-OH-Derivat (Terramycin) und das 7-Cl-Derivat (Aureomycin) kommen in der Natur vor und stellen gut bekannte Antibiotika dar. Halbsynthetische Derivate, wie 7-Dimethylaminotetracyclin (Minocyclin) und 6 α -Desoxy-5-hydroxy-tetracyclin (Doxycyclin) stellen ebenfalls bekannte Antibiotika dar. Natürliche Tetracycline können ohne Verlust ihrer antibiotischen Eigenschaften modifiziert werden, wobei aber bestimmte Elemente der Struktur erhalten bleiben müssen, um dies zu erreichen. Die Modifikationen, die gegebenenfalls an der Tetracyclin-Grundstruktur vorgenommen werden können, werden von L. A. Mitscher (1978) in einem Übersichtsartikel beschrieben. Gemäß Mitscher kann die Modifikation an den Positionen 5–9 des Tetracyclin-Ringsystems vorgenommen werden, ohne den vollständigen Verlust von antibiotischen Eigenschaften zu verursachen.

[0010] Jedoch führen Veränderungen an der Grundstruktur des Ringsystems oder ein Ersatz von Substituenten an den Positionen 1–4 oder 10–12 im allgemeinen zu synthetischen Tetracyclinen, die eine geringere oder im wesentlichen gar keine antibakterielle Aktivität besitzen. Beispielsweise wird 4-De-(dimethylamino)-tetracyclin allgemein als nicht-antibakterielles Tetracyclin angesehen.

[0011] Kürzlich wurde festgestellt, dass Tetracycline, die rasch resorbiert werden und eine verlängerte Plasma-Halbwertszeit besitzen, biologische Wirkungen ausüben, die unabhängig von ihrer antimikrobiellen Aktivität sind (Golub et al., 1991, Golub et al., 1992, Uitto et al., 1994). Derartige Wirkungen umfassen eine Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen (abgekürzt "MMPs"), einschließlich Collagenasen (MMP-1; MMP-8, MMP-13) und Gelatinasen (MMP-2; MMP-9), sowie eine Verhinderung einer pathologischen Gewebeerstörung (Golub et al., 1991). Neue Untersuchungen lassen darauf schließen, dass bei einigen Systemen bestimmte Tetracycline und Inhibitoren von Metalloproteinasen die Weiterentwicklung von Tumoren (DeClerck et al., 1994) oder die Angiogenese (WIPO-Veröffentlichung WO 92/12717; Maragoudakis et al., 1994) hemmen können. Zucker et al. (1985) haben gezeigt, dass Minocyclin in vitro die Aktivität von Melanomzellen hemmen kann. Bestimmte Tetracycline können zytostatische Wirkungen gegen einige Tumoren ausüben (Kroon et al., 1984; van den Bogert et al., 1986).

[0012] Das US-Patent 5 308 839 (Golub et al.) beschreibt eine Zusammensetzung, die das nicht-steroidale, entzündungshemmende Mittel Tenidap und 4-Dedimethylaminotetracyclin, das als anti-Metalloproteinase wirkt, jedoch nicht antimikrobiell wirkt, enthält. Die Zusammensetzung wird verwendet, um eine Verringerung des Knochenverlustes bei Säugern zu bewirken, die sich bei gewebeerstörenden Zuständen im Zusammenhang mit einer übermäßigen Metalloproteinase-Aktivität ergeben, z. B. bei rheumatoider Arthritis. Unter den in dieser Druckschrift erwähnten Zuständen befindet sich metastatischer Krebs.

[0013] Das US-Patent 5 321 017 (Golub et al.) beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Säugern, die an rheumatoider Arthritis und anderen gewebeerstörenden Zuständen in Verbindung mit einer übermäßigen Metalloproteinase-Aktivität (z. B. metastatischer Krebs) leiden, wobei das Verfahren die Verabreichung eines Tetracyclins, das als anti-Metalloproteinase wirkt, jedoch keine antimikrobielle Wirkung besitzt, und einer Menge des nicht-steroidalen, entzündungshemmenden Mittels Flurbiprofen umfasst, die bei Kombination mit der wirksamen Menge der anti-Metalloproteinase Tetracyclin zu einer signifikanten Verringerung der Gewebeerstörung und/oder des Knochenverlustes führt.

[0014] Fuska et al., Experientia, 1974, führen aus, dass die Tetracycline CMT-7 und CMT-9 eine Hemmwirkung auf Ehrlich-Ascites-Karzinom und HeLa-Zellen ausüben.

[0015] Jedoch kann die Verwendung von Tetracyclin-Antibiotika trotz ihrer allgemeinen Wirksamkeit bei der Behandlung von Infektionen zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Beispielsweise kann eine Langzeitverabreichung von antibiotischen Tetracyclinen zur Verringerung oder Beseitigung der gesunden mikrobiellen Flora, z. B. der Darmflora, führen und kann zur Bildung von antibiotisch resistenten Organismen oder zum übermäßigen Wachstum von Hefen und Pilzen führen. Demzufolge werden chemisch modifizierte Tetracycline, bei denen die antimikrobielle Aktivität abgeschwächt oder beseitigt ist, möglicherweise zur Verwendung bei Anwendungen bei denen eine anti-collagenolytische Aktivität indiziert ist, bevorzugt.

[0016] Im Hinblick auf die vorstehenden Ausführungen ist es klar, dass ein Bedürfnis besteht, vorhandene Methoden zur Hemmung der Invasivität und Metastasierung von Krebszellen zu ergänzen. Die derzeitigen

Wege stützen sich auf hochgradig zytotoxische Verbindungen, die eine Schwächung der Patienten hervorru-
fen, oder sie bedienen sich einer Methodik, die teuer und schwer durchführbar ist und deren Ergebnisse nicht
vorhersagbar sind.

[0017] Demzufolge besteht eine der Aufgaben der Erfindung in der Überwindung der vorstehenden Be-
schränkungen bei der Krebsbehandlung, indem eine Verbindung bereitgestellt wird, die die für Krebszellen
charakteristischen Wachstumsvorgänge, einschließlich Invasivität und Metastasierung, hemmen sowie eine
Regression von primären Tumoren herbeiführen. Insbesondere ist es erstrebenswert, neue Verbindungen und
Verfahren gegen Krebs aufzufinden, die das Krebswachstum spezifisch und mit relativ hoher Aktivität hem-
men, d. h. die in Dosen aktiv sind, bei denen im wesentlichen keine schädlichen Nebenwirkungen auftreten.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0018] Es wurde nunmehr festgestellt, dass diese und weitere Aufgaben durch die vorliegende Erfindung, die
eine Verwendung gemäß der Definition in den Ansprüchen bereitstellt, gelöst werden können.

[0019] Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des Wachstums von Krebs bei ei-
nem Säuger durch Verabreichung einer den Krebs hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus
folgender Gruppe ausgewählt ist, an den Säuger:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
Tetracyclinpyrazol (CMT-5),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und
4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

[0020] Eine besonders bevorzugte Tetracyclinverbindung ist 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-te-
tracyclin (CMT-3).

[0021] Die Erfindung eignet sich zur Hemmung des Wachstums von Krebsarten, wie Karzinomen, z. B. Kar-
zinomen von Lunge, Prostata, Brust, Eierstöcken, Hoden oder Kolon, sowie von Melanomen.

[0022] Die Erfindung kann die Hemmung der zellulären Proliferation des Krebses, die Hemmung des Invasi-
vität des Krebses und/oder die Hemmung der Metastasierung des Krebses umfassen.

[0023] Die Tetracyclinverbindung kann in einer Menge verabreicht werden, die dazu ausreicht, spezifisch die
Expression einer Matrix-Metalloproteinase durch Krebszellen oder deren Aktivität in der extrazellulären Matrix
zu hemmen.

[0024] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform eignet sich die Erfindung zur Hemmung einer Matrix-Me-
talloproteinase, bei der es sich um eine Gelatinase, z. B. Gelatinase A oder Gelatinase B, handelt.

[0025] Die Erfindung kann ferner die Behandlung des Säugers mit einer begleitenden antineoplastischen Be-
handlungsart umfassen. Die begleitende antineoplastische Behandlungsart kann eine Chemotherapie, einen
chirurgischen Eingriff und/oder eine Radiotherapie umfassen.

[0026] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des Wachstums von
Krebs bei einem Säuger durch Verabreichen einer den Krebs hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung,
die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist, an den Säuger:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4) und
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und
4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

[0027] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung der Proliferation von Krebszellen durch Kontaktieren der Krebszellen mit einer die Proliferation hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8)
4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6) und
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7).

[0028] Vorzugsweise handelt es sich bei der Tetracyclinverbindung um
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3) oder
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8).

[0029] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des invasiven Potentials von Krebszellen durch Kontaktieren der Krebszellen mit einer die Invasion hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8) und
Tetracyclinonitril (CMT-2).

[0030] Vorzugsweise handelt es sich bei der Tetracyclinverbindung um 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3).

[0031] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des metastatischen Potentials von Krebszellen durch Kontaktieren der Krebszellen mit einer die Metastasierung hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1) und
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3).

[0032] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Behandlung eines Krebszustands, der durch eine übermäßige gelatinolytische Aktivität gekennzeichnet ist, durch Verabreichen einer Menge einer Tetracyclinverbindung, die eine Hemmung der übermäßigen gelatinolytischen Aktivität bewirkt, an einen Säuger.

[0033] Bei dieser Ausführungsform kann der Krebs durch eine übermäßige Aktivität von Gelatinase A gekennzeichnet sein, wobei die Tetracyclinverbindung aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4) und
Tetracyclinonitril (CMT-2).

[0034] Insbesondere handelt es sich bei der Tetracyclinverbindung um:

4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) oder
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3).

[0035] Alternativ kann bei dieser Ausführungsform der Krebszustand durch eine übermäßige Aktivität der Gelatinase B gekennzeichnet sein, wobei die Verbindung aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird:

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1) und
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6).

[0036] Insbesondere handelt es sich in diesem Fall bei der Tetracyclinverbindung um: 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3) oder 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4).

[0037] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des Auftretens eines Tumors beim Säuger durch

(a) Nachweisen eines Genprodukts oder eines Metaboliten, die mit einer Prädisposition für einen Krebs in Verbindung stehen in einer biologischen Probe des Säugers, bevor irgendwelche spezifischen krebsartigen Läsionen festgestellt werden; und

(b) Verabreichen einer das Auftreten des Tumors hemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist, an den Säuger:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4) und
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und
4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

[0038] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung der gelatinolytischen Aktivität, die mit einem krebsartigen Tumor verbunden ist, bei einem Säuger, durch Verabreichung einer Menge einer Tetracyclinverbindung, die zur Hemmung der gelatinolytischen Aktivität wirksam ist, an den Säuger.

[0039] Die gelatinolytische Aktivität kann sich vom krebsartigen Tumor und/oder von normalem Gewebe ableiten. Wenn normales Gewebe beteiligt ist, kann es sich beim normalen Gewebe um epitheliales oder stromales Gewebe handeln.

[0040] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des Wachstums von Krebs bei einem Säuger durch topische Verabreichung einer krebshemmenden Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist, an den Säuger:

Tetracyclinonitril (CMT-2) und
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6).

[0041] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Abtötung von Krebszellen durch Kontaktieren von Krebszellen mit einer zytotoxischen Menge einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und
4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

[0042] Bei dieser Ausführungsform kann es sich bei den Krebszellen um Zellen eines Sarkoms oder eines Karzinoms, z. B. eines Adenocarcinoms, handeln. Beispielsweise kann das Verfahren zur Abtötung von Zellen eines Karzinoms von Prostata, Brust, Eierstöcken, Hoden, Lunge, Kolon oder Brust verwendet werden. Vorzugsweise handelt es sich bei den Krebszellen um Zellen eines Karzinoms der Prostata und bei der Tetracyclinverbindung um 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3).

[0043] Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Hemmung des Wachstums von Krebs bei einem Säuger durch Verabreichen einer Menge einer Tetracyclinverbindung, die ausreicht, eine differenzielle Zytotoxizität in Zellen des Krebses herbeizuführen, an den Säuger, wobei die Tetracyclinverbindung aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und
 4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

[0044] Die Erfindung betrifft die Abtötung von Krebszellen oder die Hemmung des Wachstums oder der Metastasierung von Krebs, wobei Nebenwirkungen, die üblicherweise mit einer Behandlung mit antineoplastischen Chemotherapeutika verbunden sind, vermieden oder gemildert werden. Diese und weitere Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden ausführlichen Beschreibung und den Beispielen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0045] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung wurden zu Erläuterungs- und Beschreibungszwecken ausgewählt, sollen aber den Schutzbereich der Erfindung in keiner Weise einschränken. Die bevorzugten Ausführungsformen bestimmter Aspekte der Erfindung sind in den beigefügten Zeichnungen dargestellt.

[0046] [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1D](#) sind vier Elektrophoretogramme zur Darstellung der zymographischen Analyse von konditionierten Medien, die aus Prostata-Krebszellen in vitro erhalten wurden, wobei die Wirkungen von CMT-3 und Doxycyclin auf die MMP-Aktivität dargelegt werden: TSU-PR1-Prostata-Tumorzellen behandelt mit CMT-3 ([Fig. 1A](#)) oder Doxycyclin ([Fig. 1B](#)); MAT-LyLu-Prostata-Tumorzellen, behandelt mit CMT-3 ([Fig. 1C](#)) oder Doxycyclin ([Fig. 1D](#)).

[0047] Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) sind Diagramme zur Darstellung der dosisabhängigen in vitro-Hemmung der zellulären Proliferation durch Tetracyclin-Derivate in: LNCaP-Tumorzellen ([Fig. 2A](#)); TSU-PR1-Tumorzellen ([Fig. 2B](#)); und MAT-LyLu-Tumorzellen ([Fig. 2C](#)).

[0048] Die [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3D](#) sind Diagramme zur Darstellung der dosisabhängigen in vitro-Hemmung der zellulären Proliferation durch Tetracyclin-Derivate in: DU-145-Tumorzellen ([Fig. 3A](#)); PC-3-Tumorzellen ([Fig. 3B](#)); BPH-1-nicht-tumorigene Prostata-Epithelzellen ([Fig. 3C](#)); und FHS733 normale humane Fibroblasten ([Fig. 3D](#)).

[0049] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) sind Diagramme zur Darstellung der dosisabhängigen in vitro-Induktion der Zytotoxizität von Tetracyclin-Derivaten in Dunning MAT-LyLu-Tumorzellen (ein Ratten-Prostata-Krebsmodell) bei: Belastung von 24 h ([Fig. 4A](#)); und Belastung von 48 h ([Fig. 4B](#)).

[0050] [Fig. 5A](#) ist ein Histogramm zur vergleichenden Darstellung der Kapazität von CMT-Verbindungen zur in vitro-Hemmung der Invasivität von TSU-PR1-Tumorzellen (eine humane Prostata-Krebszellenlinie); [Fig. 5B](#) ist ein Histogramm zur vergleichenden Darstellung der Kapazität von CMT-Verbindungen zur in vitro-Hemmung der Invasivität von MAT-LyLu-Tumorzellen.

[0051] [Fig. 6](#) ist ein Histogramm zur Darstellung der Hemmung der MAT-LyLu-Tumormetastasierung durch Tetracyclinverbindungen.

[0052] [Fig. 7A](#) ist ein Histogramm zum Nachweis der Kapazität von CMT-3 zur Verringerung des Auftretens von Tumoren im Anschluss an eine Implantation von MAT-LyLu-Tumorzellen bei Testtieren; [Fig. 7B](#) ist ein Histogramm zur Erläuterung der Hemmung der MAT-LyLu-Tumor-Metastasierung durch Tetracyclinverbindungen.

[0053] [Fig. 8](#) ist ein Histogramm zur Erläuterung der Beziehung zwischen der Hemmung der Invasivität von Melanomzellen und der Dosierung von chemisch modifizierten Tetracyclinen.

[0054] Die [Fig. 9A](#) bis [Fig. 9D](#) sind Diagramme zur Erläuterung der dosisabhängigen Zytotoxizität von CMT-3 in normalen stromalen Prostatazellen ([Fig. 9A](#)); LNCaP-Tumorzellen ([Fig. 9B](#)); PC-3-Tumorzellen ([Fig. 9C](#)); und DU-145-Tumorzellen ([Fig. 9D](#)).

[0055] [Fig. 10A](#) ist ein Histogramm zur Darstellung der dosisabhängigen, durch Tetracyclin induzierten Erzeugung von Nucleosomen durch MAT-LyLu-Zellen; [Fig. 10B](#) zeigt die zeitabhängige, CMT-3-induzierte Erzeugung von Nucleosomen durch MAT-LyLu-Zellen.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0056] In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Hemmung des Wachstums von Krebs, einschließlich Vorgängen der zellulären Proliferation, der Invasivität und Metastasierung in biologischen Systemen. Die Erfindung umfasst die Verwendung einer Tetracyclinverbindung als Inhibitor des Wachstums von Krebs. Vorzugsweise wird sie zur Hemmung oder Verringerung der Krebszellproliferation, Invasivität, Metastasierung oder des Auftretens von Tumoren bei lebenden Tieren, wie Säugern, verwendet. Sie ist auch leicht zur Verwendung in Testsystemen anwendbar, z. B. beim Testen des Wachstums von Krebszellen und beim Testen von deren Eigenschaften.

[0057] Die erfindungsgemäß geeigneten Verbindungen weisen eine erstrebenswerte, jedoch unübliche Kombination von physikochemischen Eigenschaften auf, einschließlich Aktivität, biologische Verfügbarkeit, Löslichkeit und Verringerung von Nebenwirkungen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind die Verbindungen besonders für die Behandlung von Krebs wünschenswert.

[0058] Derartige Verbindungen umfassen beispielsweise solche, denen die Dimethylaminogruppe in Position 4 der Tetracyclin-Ringstruktur fehlt, z. B.

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7),
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9),
 4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10),
 4-De-(dimethylamino)-5-oxytetracyclin,
 5 α ,6-Anhydro-4-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin,
 4-De-(dimethylamino)-11-hydroxy-12 α -desoxytetracyclin,
 12 α -Desoxy-4-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin und
 12 α ,4 α -Anhydro-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin.

[0059] Zu weiteren Beispielen für Tetracycline, die im Hinblick auf eine verringerte antimikrobielle Aktivität modifiziert sind, gehören 6- α -Benzylthiomethylentetracyclin, das mono-N-alkylierte Amid von Tetracyclin, 6-Fluor-6-demethyltetracyclin, 11 α -Chlortetracyclin, Tetracyclinonitril (CMT-2) und Tetracyclinpyrazol (CMT-5).

[0060] Zu bevorzugten Tetracyclinverbindungen gehören:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4) und
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8).

[0061] Bei der besonders bevorzugten Tetracyclinverbindung handelt es sich um 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3). Kombinationen dieser Verbindungen können verwendet werden. Doxycyclin fällt nicht unter die Erfindung.

[0062] Diese Verbindungen weisen ihre krebshemmenden Eigenschaften in Konzentrationen auf, die im Vergleich zu bekannten chemotherapeutischen Mitteln zu geringeren Nebenwirkungen führen und in einigen Fällen im wesentlichen frei von derartigen Nebenwirkungen sind. Beispielsweise weisen die geeigneten Konzentrationen der Verbindungen keine signifikante antimikrobielle Aktivität auf. Diese Tetracyclinverbindungen eignen sich für längere Behandlungsmaßnahmen, bei denen andere Verbindungen unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen würden. Ferner wird angenommen, dass die Eigenschaften der Hydrophilizität und Hydrophobizität bei diesen Verbindungen gut ausgewogen sind, was ihre Eignung sowohl in vitro als auch insbesondere in vivo verstärkt, während andere Verbindungen, bei denen ein derartiges Gleichgewicht fehlt, wesentlich weniger wertvoll sind. Speziell weisen die Verbindungen einen geeigneten Lösungsgrad in wässrigen Medien auf, um eine Resorption und biologische Verfügbarkeit im Körper zu gewährleisten, wobei sie auch einen solchen Löslichkeitsgrad in Lipiden aufweisen, um eine Durchquerung der Zellmembran zu einer mutmaßlichen Wirkungsstätte zu ermöglichen. Die Verbindungen sind maximal wirksam, wenn sie an die Tumorstelle abgegeben werden können und in die Tumorzellen gelangen können.

[0063] Bei der Behandlung bestimmter lokalisierter Krebsarten kann der Grad der Hydrophilizität der nicht-an-

timikrobiellen Tetracyclinverbindung von geringerer Bedeutung sein. Derartige Verbindungen, wie Tetracyclinnitril (CMT-2) und 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6), die eine geringe Löslichkeit in wässrigen Systemen haben, können bei der direkten oder topischen Behandlung von Hautkrebsarten, z. B. Melanomen oder basalen Zellkarzinomen, oder unter Implantation in das Gehirn zur topischen Behandlung von Gehirntumoren verwendet werden. Tierexperimente, bei denen erwachsenen Ratten auf oralem Wege durch eine Sonde diese beiden CMTs verabreicht werden, haben keine nachweisbaren Blutspiegel dieser Verbindungen ergeben, was das Fehlen einer systemischen Absorption und/oder eine außerordentlich rasche Ausscheidung zeigt.

[0064] Diese Ausführungsform der Erfindung wurde auf der Grundlage einer unerwarteten Feststellung der Anmelderin entwickelt, nämlich dass bestimmte Tetracyclinverbindungen, die chemisch so modifiziert sind, dass im wesentlichen die gesamte antimikrobielle Aktivität beseitigt ist, in wirksamer Weise die Proliferation, Invasivität oder Metastasierung von Krebszellen sowohl in vitro als auch in vivo hemmen. Darunter besitzt ein bevorzugtes CMT, d. h. 6-Desmethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (auch als "CMT-3" bezeichnet) offensichtlich hervorragend ausgewogene Eigenschaften insofern, als es eine ungewöhnlich starke Aktivität bei der Hemmung des Krebswachstums, einschließlich Proliferation, Invasivität und Metastasierung von Krebszellen, besitzt. Ein weiterer Vorteil von CMT-3 besteht darin, dass es eine unerwartet lange Serum-Halbwertszeit (etwa 28 Stunden) aufweist. Daher ist bei CMT-3 möglicherweise nur eine periodische Verabreichung erforderlich, z. B. einmal oder zweimal pro Woche.

[0065] Bei einer weiteren Ausführungsform bewirkt die Erfindung die Hemmung der enzymatischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen, wie Collagenasen und Gelatinasen, in Verbindung mit krebserregenden Tumoren bei Säugern. Die gelatinolytische Aktivität, die gehemmt werden kann, kann sich von einer Gelatinase-Expression durch den krebserregenden Tumor oder von einem normalen, d. h. nicht-krebserregenden Gewebe ableiten. Insbesondere kann sich die Gelatinase-Aktivität von normalen Geweben, wie Epithelgewebe oder Stromagewebe ableiten. Insbesondere kann die Erfindung zur Hemmung der übermäßigen gelatinolytischen Aktivität, die mit derartigen Tumoren verbunden ist, eingesetzt werden. Die Gelatinasen, die gehemmt werden können, umfassen Gelatinase A (auch bekannt als Gelatinase vom 72 kDa-Typ; MMP-2; Typ IV-Collagenase); und Gelatinase B (auch bekannt als Gelatinase vom 92 kDa-Typ; MMP-9; Typ V-Collagenase). Diese Hemmung der beobachteten gelatinolytischen Aktivität kann auf eine Hemmung der MMP-Aktivität, auf eine Herunterregulierung der MMP-Expression oder auf irgendeine andere Wechselwirkung in Verbindung mit der Physiologie dieser Gelatinasen, z. B. eine Hemmung der Aktivierung der Vorläuferform des Enzyms, Pro-gelatinase (oder pro-MMP), zurückzuführen sein.

[0066] Obgleich die Anmelderin in bezug auf die vorliegende Erfindung sich nicht auf einen bestimmten Mechanismus festlegen will, war es für sie überraschend, dass CMTs unter anderem durch einen im Grunde unbekannten Mechanismus in Verbindung mit Krebs wirken können. Die Anmelderin hat festgestellt, dass die chemisch modifizierten Tetracycline den Expressionsgrad von Metalloproteinasen, die normalerweise mit Krebs assoziiert sind, verringern ("herunterregulieren"). Beispielsweise wurde festgestellt, dass CMT-3 die Expression von Gelatinase A durch humane kolorektale Krebszellen verringert und die Expression von Gelatinase B durch humane Brustkrebszellen hemmt. Die Anmelderin nimmt an, dass diese Feststellung erhebliche therapeutische Auswirkungen auf die Krebsbehandlung hat. Ferner sind nach dem Verständnis der Anmelderin diese CMTs und andere chemisch und funktionell verwandte Verbindungen zur Hemmung der Folgen anderer Krankheiten, die durch eine übermäßige Gelatinase-Expression oder Aktivität gekennzeichnet sind, wertvoll.

[0067] Die Erfindung betrifft die Induktion der Zytotoxizität (Zellabtötung) in Krebszellen oder die Verringerung der Lebensfähigkeit von Krebszellen. Die Zytotoxizität von Tetracyclinverbindungen kann vorzugsweise gegen Zellen von Sarkomen oder Karzinomen, z. B. Adenokarzinomen, ausgenutzt werden. Beispielsweise kann die Erfindung dazu herangezogen werden, die Zytotoxizität in Zellen von Karzinomen von Prostata, Brust, Eierstöcken, Hoden, Lunge, Kolon oder Brust zu induzieren. Der Mechanismus, durch den es zu dieser Toxizität kommt, ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch kann die selektive Abtötung von Krebszellen durch Apoptose, Nekrose, andere Mechanismen oder eine Kombination von Mechanismen erfolgen.

[0068] Die Abtötung von Krebszellen kann unter geringerer Zytotoxizität für normale Zellen oder Gewebe erfolgen, als dies bei herkömmlichen zytotoxischen Therapeutika festgestellt wird, vorzugsweise ohne wesentliche Zytotoxizität für normale Zellen oder Gewebe. Beispielsweise wurde unerwarteterweise festgestellt, dass ein Tetracyclin, z. B. CMT-3, die Zytotoxizität von Krebszellen induzieren kann, während sie nur eine geringe oder im wesentlichen gar keine Zytotoxizität bei normalen Zellen hervorruft. Somit kann CMT-3 im Gegensatz zu herkömmlichen zytotoxischen Antikrebstherapeutika, die typischerweise sämtliche wachsenden Zellen abtöten, zu einer differentiellen Zytotoxizität führen: Tumorzellen werden selektiv abgetötet, während normale

Zellen geschont werden. Somit wird gemäß einer weiteren Ausführungsform die Erfindung zur Induktion einer differentiellen Zytotoxizität bei Krebszellen relativ zu normalen Zellen oder Geweben herangezogen. Diese unerwartete differentielle Zytotoxizität in Zusammenhang mit den Tetracyclinverbindungen läuft als Ergebnis von Apoptose, Nekrose, weiteren Mechanismen oder in einer Kombination derartiger Mechanismen ab.

[0069] Die in den nachstehenden Beispielen vorgelegten Daten zeigen, dass bei mit diesen Verbindungen behandelten Krebszellen sich folgendes ergibt: eine Verringerung der extrazellulären gelatinolytischen Aktivität, in vitro eine entsprechende dosisabhängige Abnahme des invasiven Potentials der Zellen und in vivo eine Abnahme der Metastasierungsfähigkeit der Zellen. Außerdem können die Verbindungen die Abtötung von Tumorzellen induzieren, wobei sie im wesentlichen für normale Gewebe nicht zytotoxisch sind. Demzufolge können diese chemisch modifizierten Tetracycline zur Unterdrückung der Bildung und der Größe von Metastasen in Zusammenhang mit bestimmten Krebsarten verwendet werden, unterstützend bei anderen Behandlungsarten eingesetzt werden und zu einer größeren Wirksamkeit bei der Behandlung von metastatischen bzw. metastasierenden Krebsarten führen.

[0070] Die Krebsarten, die erfindungsgemäß behandelbar sind, treten bei Säugern auf. Säuger umfassen beispielsweise Menschen sowie Haustiere, wie Hunde und Katzen, Labortiere, wie Ratten und Mäuse, und landwirtschaftlich genutzte Tiere, wie Pferde und Rinder.

[0071] Tumoren oder Neoplasmen umfassen neues Wachstum von Gewebe, wobei die Vermehrung der Zellen unkontrolliert und progressiv ist. Einige dieser Wucherungen sind gutartig, während andere, die als "maligne" Wucherungen bezeichnet werden, zum Tod des Organismus führen. Maligne Neoplasmen oder "Krebsarten" unterscheiden sich von gutartigen Wucherungen darin, dass sie zusätzlich zu einer aggressiven zellulären Proliferation in umgebende Gewebe eindringen und metastasieren. Außerdem sind maligne Neoplasmen dadurch gekennzeichnet, dass sie einen größeren Verlust der Differenzierung (größere "Dedifferenzierung") und ihrer Organisation zueinander und zu ihren umgebenden Geweben zeigen. Diese Eigenschaft wird auch als "Anaplasie" bezeichnet.

[0072] Zu erfindungsgemäß behandelbaren Neoplasmen gehören sämtliche festen Tumoren, d. h. Karzinome und Sarkome. Karzinome umfassen maligne Neoplasmen, die sich von Epithelzellen ableiten und zur Infiltration (zum Eindringen) in umgebende Gewebe neigen und zu Metastasen führen. Adenokarzinome sind Karzinome, die sich von Drüsengewebe ableiten oder in denen die Tumorzellen erkennbare drüsenartige Strukturen bilden. Sarkome im weiteren Sinn umfassen Tumoren, deren Zellen in eine fibrilläre oder homogene Substanz eingebettet sind, z. B. in embryonales Bindegewebe.

[0073] Die Erfindung wird hier insbesondere in Bezug auf die Behandlung verschiedener Typen von experimentell definierten Krebsarten erläutert. Bei diesen erläuternden Behandlungen wurden dem Stand der Technik entsprechende übliche in vitro- und in vivo-Modelle herangezogen. Diese Verfahren können zum Identifizieren von Mitteln verwendet werden, von denen erwartet wird, dass sie bei in vivo-Behandlungen wirksam sind. Krebsarten, deren Invasivität oder Metastasierung mit einer MMP-Expression, insbesondere mit einer Gelatinase-Expression, verbunden sind, sind mittels der Erfindung in besonderer Weise einer Hemmung oder sogar einer Induktion der Regression zugänglich.

[0074] Somit umfassen die behandelbaren Krebsarten beispielsweise Kolonkrebs, Brustkrebs, Melanome, Prostatakarzinome oder Lungenkrebs. Die Erfindung eignet sich insbesondere zur Hemmung des Krebswachstums in Adenokarzinomen, einschließlich solche von Prostata, Brust, Hoden und Kolon. Die Erfindung eignet sich ferner zum Einsatz gegen Melanome, die sich vom melanozytischen System in der Haut und anderen Organen ableiten.

[0075] Eine Tetracyclinverbindung wird in einer Menge verwendet, die eine Verringerung des Wachstums von Krebszellen bewirkt, d. h. der zellulären Proliferation, Invasivität, Metastasierung und des Auftretens von Tumoren bei einem Säuger. Die Hemmung kann sich aus einer Hemmung der MMP-Aktivität, einer Herunterregulierung der MMP-Expression, bestimmten anderen Mechanismen, oder einer Kombination von Mechanismen ergeben. Beispielsweise hat die Anmelderin festgestellt, dass CMT-3 die Expression von MMP-2 und MMP-9 in vitro in Krebszellen hemmt. Es wird angenommen, dass sämtliche festen Krebstypen, die MMPs exprimieren oder die invasive oder metastatische Eigenschaften aufweisen, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt werden können. In einigen Fällen kann das Auftreten oder die Entwicklung von Tumorherden gehemmt oder deren Auftreten im wesentlichen verhindert werden. Daher kann das Tetracyclin als eine prophylaktische Behandlung verwendet werden, z. B. durch die Verabreichung der Tetracyclinverbindung an einen Säuger im Anschluss an den Nachweis eines Genprodukts oder eines Metaboliten in Verbindung mit einer Ver-

anlagung zu einem Krebs, jedoch bevor eine beliebige spezielle krebsartige Läsion nachgewiesen worden ist. Alternativ eignen sich die Tetracyclinverbindungen zur Verhinderung von Krebsrezidiven, beispielsweise zur Behandlung von verbleibendem Krebs im Anschluss an eine chirurgische Resektion oder eine Bestrahlungstherapie. Die erfindungsgemäß geeigneten Tetracyclinverbindungen sind insofern besonders vorteilhaft, als sie im Vergleich zu anderen Krebsbehandlungen im wesentlichen nicht toxisch sind.

[0076] Die Wirkung erfolgt über einen breiten Konzentrationsbereich, einschließlich bei Konzentrationen, die außerordentlich nieder sind. Bei der Menge der erfindungsgemäß verwendeten Tetracyclinverbindung handelt es sich um eine Menge, die in wirksamer Weise das Krebswachstum hemmt. Eine Menge einer Tetracyclinverbindung hemmt dann in wirksamer Weise das Krebswachstum, wenn sie in signifikanter Weise die zelluläre Proliferation oder das Potential der Invasivität oder der Metastasierung verringert. Die Proliferation bezieht sich auf die Fähigkeit eines Tumors zur Erhöhung seines Volumens durch Zellteilung, wobei die Messung typischerweise als "Verdopplungsrate" erfolgt. Die Hemmung der zellulären Proliferation bedeutet, dass die Wachstumsgeschwindigkeit vermindert wird. In einigen Fällen kann das Tetracyclin tatsächlich die Regression oder Verringerung der Tumormasse induzieren, wenn die Nachschubrate der Tumorzellen durch Zellteilung von der Zelltodrate übertroffen wird. Eine Invasivität bezieht sich auf das Potential eines Tumors oder von Tumorzellen zur Invasion anderer Gewebe, typischerweise durch Aufbrechen der extrazellulären Matrix von derartigen Geweben. Eine Metastasierung bezieht sich auf das Potential eines Tumors oder von Tumorzellen zur Errichtung neuer Tumorherde an Orten, die von der primären Stelle, an der die Tumorentwicklung begonnen hat, entfernt liegen. Typischerweise verläuft eine Metastasierung über einzelne Zellen oder Gruppen von Zellen, die vom primären Tumor abbrechen und durch das Blut oder die Lympheflüssigkeit wandern, um in anderen Geweben oder Organen einen neuen Tumorherd zu errichten. Ein üblicher Ort für Tumormetastasen ist die Lunge, wo das sehr feine Gefäßsystem des Lungengewebes häufig zirkulierende Tumorzellen einfangen kann, wodurch dort die Errichtung eines Tumorherds ermöglicht wird. Einige Typen von Tumoren metastasieren zu speziellen Gewebetypen. Beispielsweise können Prostata-Adenokarzinome mit hoher Spezifität im Knochen metastasieren. Die hier vorgelegten Daten liefern den Nachweis, dass das erfindungsgemäße Verfahren dazu befähigt ist, das Krebswachstum und die Rezidivierung gemäß der Definition durch beliebige oder sämtliche dieser Parameter zu hemmen.

[0077] Vorzugsweise wird die Tetracyclinverbindung in einer Menge bereitgestellt, die nur eine geringe oder gar keine antimikrobielle Aktivität besitzt. Eine Tetracyclinverbindung ist dann nicht in wirksamer Weise antimikrobiell, wenn sie nicht in signifikanter Weise das Wachstum von Mikroorganismen verhindert. Demzufolge kann eine Tetracyclinverbindung, die chemisch so modifiziert worden ist, dass ihre antimikrobiellen Eigenschaften verringert oder beseitigt sind, in vorteilhafter Weise verwendet werden. Die Verwendung von derartigen, chemisch modifizierten Tetracyclinen wird bevorzugt, da sie im Vergleich zu antimikrobiellen Tetracyclinen in höheren Konzentrationen verwendet werden können, während bestimmte Nachteile, wie ein unterschiedsloses Abtöten von nützlichen Mikroorganismen und das Auftreten von existenten Mikroorganismen, das häufig mit der Verwendung von antimikrobiellen oder antibakteriellen Mengen derartiger Verbindungen über einen längeren Zeitraum hinweg verbunden ist, vermieden werden.

[0078] Die erfindungsgemäß geeigneten Tetracyclinverbindungen üben ihre günstige Wirkung offensichtlich in dosisabhängiger Art und Weise aus. So wurde innerhalb breiter Grenzen beobachtet, dass eine Verabreichung größerer Mengen einer Tetracyclinverbindung das Wachstum von Krebszellen oder die Invasivität in größerem Maße hemmt, als dies bei einer kleineren Menge der Fall ist. Ferner wurde eine Wirksamkeit bei Dosierungen festgestellt, die unter der Konzentration, bei der normalerweise eine Toxizität in normalen Zellen auftritt, oder bei der Organismuskonzentration liegt, festgestellt. Demzufolge besteht einer der Vorteile der Erfindung darin, dass die schwächenden Nebenwirkungen, die üblicherweise bei herkömmlichen zytotoxischen Krebsbehandlungen auftreten, verringert und vorzugsweise vermieden werden.

[0079] Bei der maximalen Dosierung für ein Subjekt handelt es sich um die höchste Dosierung, die keine unerwünschten oder unerträglichen Nebenwirkungen hervorruft. Beispielsweise können die Tetracyclinverbindung(en) in einer Menge von etwa 0,1 mg/kg/Tag bis etwa 30 mg/kg/Tag und vorzugsweise von etwa 1 mg/kg/Tag bis etwa 18 mg/kg/Tag verabreicht werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung können zu Nebenwirkungen eine klinisch signifikante antimikrobielle oder antibakterielle Aktivität sowie toxische Wirkungen gehören. Beispielsweise würde eine Dosis von mehr als etwa 50 mg/kg/Tag bei den meisten Säugern, einschließlich Menschen, Nebenwirkungen hervorrufen. Auf jeden Fall lässt sich der Arzt von seinem Fachwissen leiten. Die vorliegende Erfindung umfasst ohne Beschränkungen Dosierungen, die zur Erzielung der beschriebenen Phänomene wirksam sind.

[0080] Die Erfindung kann auch ausgeführt werden, indem man zusammen mit der Tetracyclinverbindung ein

oder mehr andere chemotherapeutische Antikrebsmittel, wie beliebige herkömmliche chemotherapeutische Mittel, verwendet. Die Kombination der Tetracyclinverbindung mit derartigen anderen Mitteln kann das chemotherapeutische Verfahren verstärken. Dem Fachmann sind zahlreiche chemotherapeutische Verfahren geläufig, die in das erfindungsgemäße Verfahren einbezogen werden können. Es können beliebige chemotherapeutische Mittel verwendet werden, einschließlich Alkylierungsmittel, Antimetaboliten, Hormone und Antagonisten, Radioisotope sowie natürliche Produkte. Beispielsweise kann die nicht-antimikrobielle Tetracyclinverbindung zusammen mit Antibiotika, wie Doxorubicin und andere Anthracyclin-Analoga, Stickstofflostprodukten, wie Cyclophosphamid, Pyrimidin-Analogen, wie 5-Fluoruracil, Cisplatin, Hydroxyharnstoff, Taxol und dessen natürliche und synthetische Derivate, und dergl. verabreicht werden. Als weiteres Beispiel kann im Fall von Mischturen, wie Adenokarzinomen von Brust und Prostata, bei denen die Tumoren von Gonadotropin abhängige und von Gonadotropin unabhängige Zellen umfassen können, das Tetracyclin zusammen mit Leuprolid oder Goserilin (synthetische Peptidanaloga von LH-RH) verabreicht werden. Zu weiteren antineoplastischen Verfahren gehören die Verwendung einer Tetracyclinverbindung zusammen mit einer anderen Behandlungsmöglichkeit, z. B. einem chirurgischen Eingriff, einer Bestrahlung, der Verwendung eines anderen chemotherapeutischen Mittels und dergl., die hier als "unterstützende antineoplastische Modalitäten" bezeichnet werden. Somit kann die Erfindung zusammen mit herkömmlichen Maßnahmen eingesetzt werden, wobei sich der Vorteil von verringerten Nebenwirkungen und einer verstärkten Wirksamkeit ergibt.

[0081] Die bevorzugte erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung umfasst eine Kombination der Tetracyclinverbindung in einem geeigneten pharmazeutischen Träger (Vehikel) oder Exzipiens, wie es dem Fachmann geläufig ist.

[0082] Eine enterale Verabreichung stellt einen bevorzugten Abgabeweg für das Tetracyclin dar und Zusammensetzungen, die die Tetracyclinverbindung zusammen mit geeigneten Verdünnungsmitteln, Trägern und dergl. enthalten, lassen sich leicht zubereiten. Es können flüssige oder feste (z. B. Tabletten, Gelatinekapseln) Zubereitungen verwendet werden. Zu den Vorteilen der Erfindung gehört es, dass in zahlreichen Situationen die Tetracyclinverbindung oral abgegeben werden kann, im Gegensatz zu einer parenteralen Abgabe (z. B. Injektion, Infusion), die typischerweise bei herkömmlichen chemotherapeutischen Mitteln erforderlich ist.

[0083] Die parenterale Verwendung (z. B. eine intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion) kommt ebenfalls in Betracht. Zubereitungen unter Verwendung von herkömmlichen Verdünnungsmitteln, Trägern und dergl., die aus dem Stand der Technik bekannt sind, können zur Abgabe der Verbindung herangezogen werden.

[0084] Alternativ kann die Abgabe der Tetracyclinverbindung eine topische Anwendung umfassen. Zu Zusammensetzungen, die für eine derartige topische Anwendung als geeignet gelten, gehören Gele, Salben, Lotionen und dergl. Im Fall von Tumoren, die Herde im Innern des Körpers aufweisen, z. B. Gehirntumoren, kann die Tetracyclinverbindung über einen Träger mit verzögerter Wirkstoffabgabe, z. B. einem polymeren Material, das auf chirurgischem Wege an oder in der Nähe der Läsionsstelle implantiert wird, abgegeben werden.

[0085] Bei der Entwicklung der vorliegenden Erfindung wurden mehrere, chemisch modifizierte Tetracycline (CMTs) in bezug auf ihre Wirkung bei der Hemmung des Krebswachstums (im Vergleich zu einem handelsüblichen antibakteriellen Tetracyclin, nämlich Doxycyclin) getestet. Bei diesem Test wurde die Wirkung dieser Verbindungen auf die Krebszellenproliferation und das invasive Potential *in vitro* und in einem *in vivo*-Tumormodell auf das Tumorstadium und die Lungenkolonisierung, nämlich Ratten-Dunning-MAT-LyLu, untersucht. Bei *in vitro*-Experimenten hemmten antimikrobielles Doxycyclin und bestimmte nicht-antimikrobielle CMTs die Zellproliferation von humanen Prostata-Tumorzelllinien (PC-3, DU-145, TSU-PR1 und LNCaP) und die Dunning-Prostata-Tumorzellen ($IC_{50} = 3-120 \mu\text{g/ml}$). Doxycyclin und CMTs hemmten auch das invasive Potential um 10% bis 90%, je nach Verbindung. CMT-3 (6-Desoxy-6-demethyl-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin) stellte die wirksamste Verbindung der Tetracyclin-Analogen dar und hemmte bei $5 \mu\text{g/ml}$ das invasive Potential um 90%, eine Konzentration dieses Arzneistoffes, die *in vivo* leicht durch orale Verabreichung erreicht wird. Das Wachstum des Dunning-Tumors an der primären Stelle (s.c.) veränderte sich bei Ratten, die 21 Tage im Anschluss nach der Tumorumplantation täglich entweder mit Doxycyclin oder CMT-3 durch orale Sondenverabreichung behandelt wurden, nicht signifikant. Es gab jedoch eine signifikante Abnahme der Anzahl von Lungenmetastasen: $28,9 \pm 15,4$ Stellen/Tier in der mit dem CMT-3 behandelten Gruppe gegenüber $59,5 \pm 13,9$ Stellen/Tier bei Kontrollen ($p < 0,01$), was eine doppelt so starke Wirkung wie bei Doxycyclin bei der gleichen oralen Dosis darstellt. Eine vorherige Dosierung der Ratten 7 Tage vor der Tumorumplantation führte zu einer signifikanten Verzögerung des Tumorstadiums ($46 \pm 9,3\%$, $p < 0,05$) und zu einer Verringerung der Metastasierung. Ferner trat eine Tumorremission (Hemmung des Auftretens von Tumoren) bei den mit CMT-3 (40 mg/kg) behandelten Gruppen auf. Eine Behandlung mit Doxycyclin führte jedoch zu keiner Tumorremission. Außer-

dem wurde eine Abnahme der Anzahl von Lungenmetastasen von $58 \pm 8\%$ bei der mit CMT-3 behandelten Gruppe beobachtet, verglichen mit einer Abnahme von $33 \pm 1,0\%$ bei der Doxycyclin-Gruppe. Bei keinem der hier beschriebenen Experimente wurde eine signifikante, durch Arzneistoffe herbeigeführte Morbidität festgestellt. Diese Ergebnisse belegen zusätzlich die Eignung von CMT-3 für eine chemotherapeutische Behandlung zur Bekämpfung der Tumoraggression und der Verhinderung der Metastasierung.

[0086] Bei weiteren, nachstehend beschriebenen Experimenten prüften wir die Einflüsse von Doxycyclin und CMTs auf extrazelluläre Konzentrationen der Gelatinase A- und B-Aktivität aus einer hochgradig invasiven und metastatischen humanen Melanom-Zelllinie C8161, und korrelierten diese Beobachtungen mit Veränderungen des biologischen Verhaltens der Zellen in einem in vitro-Invasionstest und in einem in vivo-SCID-Mäusemodell. Die Ergebnisse zeigen, dass – übereinstimmend mit der Fähigkeit dieser Verbindungen zur differentiellen Unterdrückung extrazellulärer Konzentrationen der Gelatinase-Aktivität – C8161-Zellen, die mit Doxycyclin und CMT-1, CMT-3 und CMT-6 behandelt wurden, in vitro weniger invasiv waren und zwar in dosisabhängiger Weise ($3\text{--}50\text{ }\mu\text{g/ml}$). Ferner zeigen vom in vivo-Modell abgeleitete Daten, dass SCID-Mäuse, die oral CMT-1 und CMT-3 erhielten, eine verringerte Anzahl an Lungenmetastasen im Anschluss an eine intravenöse Injektion von C8161-Zellen über eine Schwanzvenen-Inokulation aufwiesen.

[0087] Die nachstehenden Beispiele dienen dem weiteren Verständnis der Erfindung. Die speziellen Materialien und Bedingungen, die eingesetzt wurden, dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung und stellen keine Beschränkung eines vernünftigen Schutzzumfangs der Erfindung dar.

Beispiel 1A

Hemmung der Enzymexpression in Krebszellen

[0088] Zwei humane, von Krebszellen abgeleitete Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, bezogen. Die Zelllinien umfassten COLO 205, eine humane, von Kolonkrebs abgeleitete Zelllinie, die MMP-2 oder Gelatinase A exprimiert und E-10, eine humane, von Brustkrebs abgeleitete Zelllinie, die MMP-9 oder Gelatinase B exprimiert.

[0089] Zellen der einzelnen Zelllinien wurden in 75 cm^2 -T-Kolben in RPMI-1640 (Gibco), das 10% hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FBS) mit einem Gehalt an 100 Einheiten/ml Penicillin und $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Streptomycin enthielt, gezüchtet. Die Zellen wurden alle 2 Tage mit Nährstoffen versorgt und alle 2 Wochen einer Passage unterzogen. Die Zellen wurden bis zu 80–90% Konfluenz gezüchtet und anschließend wurde das FBS enthaltende Medium durch ein serumfreies Medium (SFM) ersetzt. CMT-3 (CollaGenex Pharmaceuticals, Inc., Newtown, PA) wurde den Zellen in SFM in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Konditioniertes Medium wurde nach 24 Stunden gewonnen, zur Entfernung von Zellbruchstücken zentrifugiert und sodann einem Test auf die Expression von MMP-Protein durch Western-Blot unter Anwendung einer herkömmlichen Technik und unter Abtasten der Blots mit einem Laser-Densitometer unterzogen. Die erhaltenen Daten sind in der nachstehenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Prozentuale Hemmung der MMP-Protein-Expression in Krebszelllinien durch CMT-3

Krebszelllinie	CMT-3-Konzentration		
	0 μM	10 μM	20 μM
COLO 205 (exprimiert MMP-2)	–	13,3 %	66,9 %
E-10 (exprimiert MMP-9)	–	45,3 %	60,8 %

[0090] Diese Daten zeigen klar die dosisabhängige Aktivität von CMT-3 bei der Hemmung der Expression von zwei verschiedenen MMPs in zwei verschiedenen Typen von Krebszellen. Es wird angenommen, dass die Hemmung der MMP-Expression die Fähigkeit dieser Krebszellen zum Abbau der extrazellulären Matrix von gesunden Geweben hemmt, wodurch die Fähigkeit des Krebses zur Invasion in derartige gesunde Gewebe eingeschränkt wird. Die Hemmung der in vitro-Krebszellproliferation und der in vivo-Krebsmetastasierung wird in mehreren folgenden Beispielen belegt.

Hemmung der Aktivität von Matrix-Metalloproteinase in Krebszellen

[0091] Die Wirkungen von CMT-3 und Doxycyclin auf die Gelatinase-Aktivität oder Expression durch Prostata-Krebszellen wurde getestet. Zunächst testeten wir die Fähigkeit von CMT-3 und Doxycyclin zur Hemmung der MMP-Sekretion in das Kulturmedium. Die Gelatinase-Aktivität wurde unter Anwendung eines adaptierten Verfahrens auf der Grundlage des Verfahrens von Dean und Woessner (1985) gemessen. Konditioniertes Kulturmedium wurde von MAT-LyLu- und TSU-PR1-Zellen, die zwei Tage mit CMT-3 oder Doxycyclin behandelt worden waren, gewonnen. Das serumfreie Kulturmedium umfasste RPMI 1640-Grundmedium mit einem Gehalt an Insulin (5 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml), seleniger Säure (5 ng/ml) und Gentamycin (2 µg/ml). Anfängliche Tests dieser konditionierten Medien ergaben die Anwesenheit von TIMPs, die den MMP-Test störten. Daher wurden die konditionierten Medien chemisch reduziert (1 mM Dithiothreitol) und alkyliert (1 mM Iodacetamid), jeweils 30 Min. bei 37°C, und sodann zur Zerstörung von endogenen TIMPs dialysiert (Dean et al., 1987; Woessner, 1991). Das dialysierte Medium wurde im Anschluss an die Aktivierung von latenten MMPs mit 1 mM p-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) für 30 min bei 37°C auf Gelatinase-Aktivität getestet. Das Testgemisch bestand aus 25 µg ³H-Gelatine (hergestellt aus hitzedenaturiertem ³H-acetyliertem, säurelöslichem Collagen), 0,1 ml bearbeitetem, konditioniertem Kulturmedium, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml eines Testpuffers (20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 30 mM NaCl, 0,005% Brij35, 10 mM CaCl₂, 2 µM ZnSO₄ und 0,02% NaN₃). In einigen Fällen wurde 1 mM CaCl₂ (anstelle von 10 mM) verwendet. Leerwerte wurden durch Zugabe von 1 mM 1,10-Phenanthrolin erhalten. Doxycyclin oder CMT-3 wurden dem Testgemisch im Anschluss an eine Aktivierung der latenten MMPs und unmittelbar vor Zugabe des Substrats ³H-Gelatine zugesetzt.

[0092] Ferner wurde die Fähigkeit von Doxycyclin oder CMT-3 zur Hemmung der APMA-Aktivierung von MMPs getestet. Bearbeitetes, konditioniertes Kulturmedium wurde 1 Stunde mit den Arzneistoffen inkubiert, wonach 1 mM APMA zugegeben wurde. Die Inkubation wurde anschließend 2 Stunden fortgesetzt. Sodann wurde ³H-Gelatine zugegeben und der Test wurde 4 Stunden fortgesetzt. Sämtliche Tests wurden im Doppelversuch in Röhrchen angesetzt und mindestens zweimal wiederholt.

[0093] Die MMP-Aktivität in den Kulturmedien wurde bei 1 mM und 10 mM CaCl₂ geprüft, wobei keine Veränderung in Bezug auf [Zn²⁺] im Testpuffer vorgenommen wurde. Wir verwendeten 1 mM CaCl₂, da diese Konzentration näher an der physiologischen Konzentration liegt, und 10 mM CaCl₂, die bei in vitro-Tests als optimale Konzentration bezeichnet wird (Woessner, 1991). Wie in Tabelle 2 dargelegt, hemmten sowohl CMT-3 als auch Doxycyclin in vitro aktivierte Gelatinasen. Bei 1 mM CaCl₂ betrug die 50%-Hemmung (IC₅₀) von CMT-3 0,5 µM, während bei 10 mM CaCl₂ der IC₅₀-Wert für CMT-3 ~1,5 µM betrug. Im Gegensatz dazu betrug bei 10 mM CaCl₂ der IC₅₀-Wert für Doxycyclin 5,0 µM. Ferner hemmten beide Arzneistoffe in starkem Maße die Aktivierung von MMPs durch p-Aminophenylquecksilberacetat; der IC₅₀-Wert für CMT-3 betrug 1,0 µg/ml (2,2 µM) und für Doxycyclin 2,5 µg/ml (5 µM) bei 10 mM CaCl₂.

Tabelle 2

Enzymhemmung durch CMT-3 und Doxycyclin in Prostata-Krebszellen

Arzneistoff- konzentration	Prozentuale Hemmung			
	CMT-3		Doxycyclin	
(μ M)	1 mM CaCl_2	10 mM CaCl_2	1 mM CaCl_2	10 mM CaCl_2
0,25	ND	31,5 \pm 1,2	ND	ND
0,50	84,8 \pm 10,1	37,8 \pm 7,5 ^b	54,8 \pm 0,6 ^a	ND
1,0	96,7 \pm 4,6 ^a	45,1 \pm 2,9	77,4	0,0
2,0	ND	51,2 \pm 2,6	ND	ND
5,0	97,2 \pm 2,9	52,4 \pm 3,5	ND	64,3 \pm 19,5
10	100	69,9 \pm 10,5	91,2 \pm 3,3	75,5 \pm 3,3
20	ND	78,9 \pm 11,4	ND	85,1 \pm 3,5
50	ND	94,2 \pm 3,3	100	93,2 \pm 2,7
100	ND	ND	ND	91,2 \pm 2,6

^a Die gesamte Gelatinase-Aktivität in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 ohne Inhibitoren (Kontrolle) betrug 18,95 \pm 3,18 ng verdaute [^3H]-Gelatine/min/ml des dialysierten Mediums.

^b Die gesamte Gelatinase-Aktivität in Gegenwart von 10 mM CaCl_2 ohne Inhibitoren (Kontrolle) betrug 48,92 \pm 2,7 ng/min/ml.

[0094] Anschließend prüften wir, ob CMT-3 und Doxycyclin in unterschiedlicher Weise die Erzeugung der beiden Hauptklassen von Gelatinasen, nämlich Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9), beeinflussen. Konfluente Kulturen von TSU-PR1- und MAT-LyLu-Zellen wurden 48 Stunden in serumfreiem Medium in verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin und CMT-3 inkubiert. Die konditionierten Medien wurden sodann gemäß den nachstehenden Angaben durch Zymographie auf MMPs analysiert.

[0095] Konditionierte Medien wurden aus den Kulturen, die zwei Tage mit Doxycyclin oder CMT-3 behandelt worden waren, gewonnen. Anschließend wurden die Medien mit SDS-Gelelektrophorese-Probenpuffer 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und sodann durch Gelelektrophorese an SDS-Polyacrylamidgel (8%) mit einem Gehalt an Gelatine (1 mg/ml) analysiert.

[0096] Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele zweimal mit 0,25% TRITON^R X100 jeweils 30 Min. gewaschen und 18 Stunden bei 37°C in einem MMP-Verdaupuffer mit einem Gehalt an 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, enthaltend 30 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM CaCl_2 , 2 μ M ZnSO_4 , 0,005% Brij35 und 0,02 NaN_3 (Lokeshwar, 1993a) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gele kurz in destilliertem Wasser gespült und mit 0,25% Coomassie-Brilliantblau R250, das in einer 40%-igen Isopropanollösung zubereitet worden war, 1 Stunde gefärbt. Sodann wurden die Gele mit 7% Essigsäure entfärbt. Die MMPs-Positionen in den Gelen waren auf einem blauen Hintergrund als klare Bereiche, ein Anzeichen für verdaute Gelatine, zu sehen.

[0097] Die Ergebnisse sind in den [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1D](#) dargestellt. Die konditionierten Medien, die von beiden Zelllinien abgeleitet waren, enthielten vorwiegend MMP-2 und MMP-9. Das TSU-PR1-Medium enthielt vorwiegend die latenten Formen dieser beiden Enzyme ([Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#)), während das MAT-LyLu-Medium aktivierte MMP-2, aber wenig MMP-9 enthielt ([Fig. 1C](#) und [Fig. 1D](#)).

[0098] Beide Arzneistoffe führten zu einer dosisabhängigen Abnahme der MMP-2-Konzentrationen. CMT-3 verminderte jedoch die MMP-2- und MMP-9-Spiegel in einer geringeren Konzentration als dies bei Doxycyclin der Fall war. Außerdem fielen die MMP-9-Spiegel bei einer Zunahme der Doxycyclin-Konzentration nicht signifikant. Die Abnahme der MMP-Spiegel bei steigender Konzentration der beiden Tetracyclinverbindungen war für MMPs spezifisch, da sämtliche Bahnen mit der gleichen Proteinmenge beladen worden waren.

Beispiele 2–6

[0099] In den Beispielen 2–6 wurden die folgenden Materialien und Methoden eingesetzt:

Reagenzien: Chemisch modifizierte Tetracycline wurden gemäß bekannten Verfahren hergestellt. Die Synthese verschiedener CMTs ist ausführlich dokumentiert; vergl. z. B. Mitscher (1978). Die folgenden CMTs wurden untersucht: 4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1), Tetracyclinonitril (CMT-2), 6-De-methyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3), 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4), 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6), 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7), 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8). Hochgradig gereinigtes CMT-3 (93–98%), das für Tierstudien verwendet wurde, wurde von der Firma CollaGenex, Inc., Newtown, PA, geliefert. Doxycyclin wurde von der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, bezogen. Matrigel, ein solubilisiertes Präparat einer Tumor-Grundmembran, wurde von der Firma Collaborative Research, Bedford, MA, erhalten. Boyden Chemotaxis-Testkammern (Transwells) wurden von der Firma Costar/Corning Corp., Boston, MA, erhalten. Sämtliche anderen Reagenzien stammten von der Firma Sigma Chemical Co.

Zellen und Tumorzelllinien: Humane Prostata-Krebszelllinien: PC-3, DU-145 und LNCaP wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, erhalten. TSU-PR1 und ALVA-101, humane, metastatische Prostata-Krebszelllinien und BPH-1, eine nicht-tumorigene Prostata-Zelllinie wurden ebenfalls verwendet (Lokeshwar, 1995b, 1996; Haywart, 1995). Die Kulturen wurden in Kompletmedium, das aus RPMI-1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 10 μ g/ml Gentamycin zusammengesetzt war, gehalten. Die Dunning-MAT-Ly-Lu-Ratten-Tumorzelllinie ist ein Androgen-unempfindliches Prostata-Tumormodell, das bei Copenhagen-Ratten in Lymphknoten und Lungen metastasiert. MAT-LyLu-Zellen wurden unter Zugabe von 250 nM Dexamethason im Kompletmedium gehalten.

Tumor-Erzeugung und -Behandlung: Dunning-MAT-LyLu-Zellen wurden aus Kulturkolben geerntet und eine 0,5 ml-Suspension mit einem Gehalt an 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml wurde in die dorsale Flanke von erwachsenen Copenhagen-Ratten (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) inokuliert. Die Ratten hatten ein Gewicht von 250–300 g und waren 90–100 Tage alt. Tumoren wurden durch Palpieren der Haut um die Injektionsstelle 3 Tage nach der Implantation der Tumorzellen festgestellt (Lokeshwar et al., 1995a).

In vivo-Arzneistoffbehandlung: Doxycyclin und CMT-3 wurden in einer 2%-igen wässrigen Lösung einer löslichen Form von Carboxymethylcellulose (Sigma, Katalog Nr. C-5678) gelöst und eine frische Lösung wurde täglich hergestellt. Die Ratten erhielten täglich über eine Sonde 1 ml der Arzneistofflösung (die Konzentrationen sind nachstehend angegeben) oder den Träger (2% Carboxymethylcellulose). Das Tumorstadium wurde dreimal pro Woche aufgezeichnet. Die Ratten wurden wöchentlich gewogen. Der Einfluss verschiedener Behandlungen auf das Tumorstadium wurde im zeitlichen Verlauf unter Verwendung eines Zirkels festgestellt. Das Volumen kam der Form eines Ellipsoids nahe (d. h. Volumen = Länge \times Breite \times Höhe \times 0,5236) (Lokeshwar et al., 1993b). Die Tumor-Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch Regressionsanalyse des Tumorstadiums gegen die Zeit für jede Ratte mit einem Tumor bestimmt. Die durchschnittliche Tumorstadiumsgeschwindigkeit (Zeitspanne bis zum Erreichen eines feststehenden Volumens) für jede Behandlungsgruppe wurde sodann zur Bewertung der statistischen Signifikanz des Behandlungswirkungsgrads unter Verwendung des statistischen INSTAT-Programms herangezogen (Ravitz Software, San Diego, CA). Die Ratten wurden getötet, nachdem das Tumorstadium einen Wert von $\geq 10 \text{ cm}^3$ erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere einer Nekropsie unterzogen. Tumoren und Lungen wurden entfernt und in Bouin's-Fixative fixiert. Makroskopische Tumorstadien an den Lungen wurden unter Verwendung eines Schneidemikroskops ausgezählt.

Beispiel 2

In vitro-Einfluss von CMTs auf die Prostata-Krebszellenproliferation

[0100] Zur Feststellung der Zytotoxizität der CMTs auf Prostata-Tumorzelllinien wurden TSU-PR1-Zellen (und Zellen von anderen Tumorzelllinien) verschiedenen CMTs oder Doxycyclin 24 Stunden oder 48 Stunden in einem Kompletmedium ausgesetzt. Die Zelllebensfähigkeit (prozentualer Anteil der lebenden Zellen) wurde durch Auszählen der Zellen im Anschluss an eine Färbung mit Trypanblau bestimmt. Die zelluläre Lebensfähigkeit wurde ferner durch den Reduktionstest mit Tetrazolium-Farbstoff (MTT-Test) bestimmt (Lokeshwar et al., 1995b). Aufgrund des aggressiven Proliferationsvermögens von Krebszellen wird angenommen, dass lebensfähige Zellen sich aktiv vermehren. Daher wurde die Messung der Lebensfähigkeit als ein Maß für die Proliferation herangezogen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei getrennten Experimenten angegeben.

[0101] Es wurde festgestellt, dass Doxycyclin und mehrere CMTs in vitro die zelluläre Lebensfähigkeit verringerten und daher die Zellproliferation hemmten. Die Hemmung der Zellproliferation war proportional zur Konzentration der Arzneistoffe und zur Dauer der Belastung, variierte aber in erheblichem Maße von Verbindung

zu Verbindung. Insbesondere waren CMT-2 und CMT-3 signifikant stärker zytotoxisch als Doxycyclin. Für die beiden humanen Prostata-Krebszelllinien DU-145 und TSU-PR1 lag die 50%-Hemmdosis (IC_{50}) für verschiedene CMTs im Bereich von 2,7 $\mu\text{g/ml}$ (CMT-3, 48 Stunden Belastung) bis 120 $\mu\text{g/ml}$ (CMT-6). Der IC_{50} -Wert für CMT-2 betrug 5,7 $\mu\text{g/ml}$. CMT-5 bewirkte keine Hemmung. Repräsentative Ergebnisse sind für die Zelllinien LNCaP, TSU-PR1 und MAT-LyLu angegeben, bei denen eine Reihe von CMTs zusammen mit Doxycyclin ([Fig. 2A–Fig. 2C](#)) getestet wurden; sowie für die Zelllinien DU-145, PC-3, BPH-1 und FHS733 (eine normale, humane Fibroblasten-Zelllinie) ([Fig. 3A–Fig. 3D](#)).

Beispiel 3A

Zytotoxischer in vitro-Einfluss von CMTs auf MAT-LyLu-Zellen

[0102] Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn Doxycyclin und verschiedene CMTs (CMT-2, CMT-3 und CMT-6) in vitro an den Dunning-MAT-LyLu-Zellen getestet wurden. Die Dunning-MAT-LyLu-Zellen wurden 24 oder 48 Stunden den Arzneistoffen ausgesetzt, bevor die zelluläre Lebensfähigkeit bestimmt wurde. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde im Anschluss an die Belastung mit den Arzneistoffen durch Färbung mit Trypanblau bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studien sind in [Fig. 4A](#) (24 Stunden) und [Fig. 4B](#) (48 Stunden) zusammengestellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 getrennten Experimenten angegeben. CMT-3 und CMT-2 stellten bei diesem Test die wirksamsten Inhibitoren der Zellproliferation dar.

Beispiel 3B

In vitro-Einfluss von CMT-3 auf die Proliferation von Prostata-Krebszellen

[0103] Aufgrund der vorstehend angegebenen Daten hat es den Anschein, dass CMT-3 von allen getesteten CMTs in vitro die stärkste Wirkung besitzt (am stärksten zytotoxisch wirkt). Um diese Beobachtung zu bestätigen, werden die Zytotoxizitäten von CMT-3 und Doxycyclin für eine Reihe von üblichen humanen Prostata-Krebszelllinien verglichen. Die Zytotoxizität wurde unter Anwendung des MTT-Tests (vergleiche oben) und eines zellulären Thymidin-Einbautests gemäß den Angaben von Lokeshwar et al. (1995a) gemessen. Die bei Anwendung beider Tests erhaltenen Werte für eine 50%-ige Hemmung des Wachstums (GI_{50}) waren identisch. Wie aus den in der nachstehenden Tabelle 3 zusammengestellten Daten hervorgeht, war CMT-3 zwei- bis achtfach stärker zytotoxisch als Doxycyclin.

Tabelle 3

Zytotoxizität von CMT-3 und Doxycyclin gegen Prostata-Krebszelllinien

Krebszelllinie (Anzahl an Wiederholungsversuchen)	Zytotoxizität GI_{50} (μM)	
	Doxycyclin	CMT-3
ALVA 101 (4)	36,6 \pm 2,42	6,82 \pm 0,75
BPH-1 (3)	21,3 \pm 5,4	10,53 \pm 3,7
DU-145 (8)	43,6 \pm 9,36	5,06 \pm 1,18
LNCaP (5)	13,86 \pm 2,97	5,0 \pm 2,1
MAT-LyLu (7)	20,0 \pm 6,4	5,2 \pm 1,9
PC-3 (5)	36,4 \pm 2,5	10,56 \pm 2,1
TSU-PR-1 (5)	41,0 \pm 11	14,74 \pm 2,64

[0104] Die Wachstumshemmung wurde aus der linearen Regression von Dosis-Reaktions-Kurven, die für jedes Experiment unter Verwendung von log (Dosis) gegen Zellproliferation (% der Kontrolle) aufgestellt wurden, berechnet. Der Korrelationskoeffizient (r) betrug $\geq 0,95$ (negativ). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 3 GI_{50} -Werten, die für jedes Experiment berechnet wurden, angegeben.

Beispiel 4

Einfluss von CMTs auf das invasive/metastatische Potential von Prostata-Krebszellen

[0105] Eine Behandlung von Prostata-Krebszellen mit bestimmten CMTs hemmte in signifikantem Maße die Fähigkeit der Zellen zur Invasion eines künstlichen Konstrukts einer Tumor-Grundmembran (Lokeshwar et al., 1996). Bei diesem Verfahren wurden 4×10^5 Tumorzellen auf der oberen Kammer der Boyden-Chemotaxis-Testkammern (Costar Transwell-Platten) ausgestrichen. Bei der Unterseite der Kammer handelte es sich um einen 12 µm-Poren-Polycarbonat-Filter, der mit einer 0,5 mm dicken Matrigel-Schicht beschichtet war. Die Bodenvertiefung enthielt ein Chemoattraktionsmittel, ein serumfreies, konditioniertes Kulturmedium von FHS-733-Zellen, eine Linie von humanen fötalen Lungenfibroblasten (ATCC Nr. HTB-157). Krebszellen (4×10^5) wurden in den oberen Vertiefungen der Platten ausgestrichen. Doxycyclin oder CMTs wurden in einem serumfreien Medium auf 5 µg/ml verdünnt und sowohl zu den oberen als auch zu den unteren Kammern gegeben. Die Kontrollvertiefungen enthielten nur 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO, ein Verdünnungsmittel). Nach 48-stündiger Inkubation wurde MTT sowohl zu den oberen als auch zu den unteren Vertiefungen (0,5 mg/ml) gegeben und die Inkubation wurde 4 Stunden fortgesetzt. Sodann wurden die Vertiefungen entleert und die Zellen von den Unterseiten des Filters wurden mit denen in den unteren Vertiefungen mit einer Filterspitze vereinigt. Das reduzierte MTT (Formazan) von den oberen und unteren Vertiefungen wurde über Nacht mit DMSO in Lösung gebracht. Die Absorption (O.D.) bei 515 nm wurde gemessen. Das Verhältnis des O.D.-Werts von den oberen Vertiefungen zu dem Gesamtwert (d. h. O.D.-Wert der oberen und unteren Vertiefungen) wurde als invasives Potential herangezogen. Dieses Verfahren war den bei früheren Berichten (Albini et al., 1987) verwendeten Verfahren, bei denen die Zellen an den Unterseiten der Filter aus verschiedenen, willkürlich ausgewählten optischen Feldern gezählt wurden, durchweg überlegen. Das MTT-Testverfahren normiert ferner die zufällige Hemmung aufgrund der zytotoxischen Wirkungen der untersuchten Mittel. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind angegeben.

[0106] Der Einfluss von CMT-3 und anderer Tetracyclinverbindungen auf das invasive Potential von TSU-PR1- und die Dunning-MAT-LyLu-Zellen wurde unter Anwendung des Matrigel-Tests bewertet. Wie in [Fig. 5A](#) dargestellt, variierte die Fähigkeit dieser Verbindungen zur Hemmung der invasiven Aktivität signifikant. CMT-3 stellte den stärksten Inhibitor des invasiven metastatischen Potentials von TSU-PR1-Zellen dar und CMT-7 den schwächsten Inhibitor. Die CMTs waren überraschend wirksam im Vergleich zu einem üblichen Tetracyclin, nämlich Doxycyclin, das nur eine mäßige Hemmung ($8 \pm 1,8\%$) der Matrigel-Invasion von TSU-PR1-Zellen bewirkte. Insbesondere variierte die 50% Hemmdosis (IC_{50}), die für verschiedene CMTs berechnet wurde, von $1,7 \pm 0,31$ µg/ml für CMT-3 bis > 100 µg/ml für CMT-7. Doxycyclin bewirkte keine signifikante Hemmung in TSU-PR1-Zellen ($IC_{50} = 27 \pm 4,3$ µg/ml). Die IC_{50} -Werte für CMT-3 und Doxycyclin in bezug auf drei andere invasive humane Prostata-Krebszelllinien (DU-145, PC-3 und ALVA-101) lagen in den gleichen Konzentrationsbereichen wie für TSU-PR1 (Daten nicht aufgeführt).

[0107] In den Dunning-Zellen hemmten sowohl CMT-2 als auch CMT-3 gleichermaßen die Matrigel-Invasion; vergl. [Fig. 5B](#). Außerdem hemmte Doxycyclin in signifikanter Weise ($68 \pm 4,2\%$) das invasive/metastatische Potential der Dunning MAT-LyLu-Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Die ständige Anwesenheit der Arzneistoffe war erforderlich, um eine signifikante Hemmung des invasiven Potentials zu erreichen. Eine 48-stündige Vorbehandlung mit CMT-3 unter anschließender Beseitigung der Arzneistoffe in der Invaskammer hatte nur einen mäßigen Einfluss auf das invasive Potential.

[0108] Der 48-stündige Invasionstest ergab die folgenden Invasionsindices in den Kontrollvertiefungen (0,1% DMSO): $22 \pm 8,3$ für TSU-PR1-Zellen und $17 \pm 4,2\%$ für MAT-LyLu-Zellen.

Beispiel 5

Einfluss von CMT-3 auf das MAT-LyLu-Tumorstadium und die Lungenmetastasierung

[0109] CMT-3 und Doxycyclin wurden in vivo auf ihre Antitumoraktivität getestet. Bei dieser Versuchsreihe wurde mit einer täglichen Verabreichung der Arzneistoffe an dem gleichen Tag begonnen, an dem den Testtieren die Tumorzellen implantiert wurden. Das Tumorstadium wurde durch eine subkutane Injektion von 1×10^6 Tumorzellen eingeleitet.

[0110] Am sechsten Tag waren die Tumoren bei mehr als 50% der mit der Injektion versehenen Tiere palpierbar ($\geq 0,1$ cm³) und nach 12 Tagen bei 100% der Tiere. Die Tumoren nahmen rasch an Volumen zu und erreichten 15 Tage nach der Implantation > 10 cm³. Die Tumorstadiumsgeschwindigkeit, bestimmt aus der

Zeitspanne bis zum Erreichen eines Volumens von 3 cm^3 variierte zwischen den mit Doxycyclin oder CMT-3 in Konzentrationen von 20 mg/kg oder 40 mg/kg behandelten und den Ratten, die nur den Träger erhielten (2%-ige Lösung von Carboxymethylcellulose) nicht signifikant. Die Regressionsanalyse der Tumorumfänge ergab keinen signifikanten Unterschied im primären Tumorwachstum zwischen der Kontrollgruppe und den mit Doxycyclin und mit CMT-3 behandelten Gruppen. Speziell betrug die Zeitspanne zwischen der Injektion der Zellen bis zu einem Tumorwachstum von 3 cm^3 $13,57 \pm 2,12$ Tage bei der Kontrollgruppe und $14,0 \pm 1,9$ Tage bei der mit CMT-3 behandelten Gruppe. Sämtliche Tumoren aus der Kontrollgruppe sowie aus der mit Arzneistoff behandelten Gruppe entwickelten beim Erreichen eines Tumorwachstums von 10 cm^3 oder mehr hochgradig nekrotische Zentren.

[0111] Metastatische Tumorherde (MTF) waren in mit Bouin's-Fixativ fixierten Lungen sichtbar. Der Großteil der MTF wies bei sämtlichen Behandlungsgruppen einen Durchmesser von weniger als 1 mm auf. [Fig. 6](#) zeigt die Anzahl der metastatischen Herde in den Lungen (Mittelwerte \pm Standardfehler). Wie in [Fig. 6](#) erläutert, ergab die Kontrollgruppe einen Wert von $59,5 \pm 13,9$ MTF/Ratte (Mittelwerte \pm Standardabweichung) und von nur $39,7 \pm 17,2$ oder $43,6 \pm 18,8$ MTF/Ratte bei der mit der niedrigen Dosis (20 mg/kg) bzw. mit der hohen Dosis (40 mg/kg) Doxycyclin behandelten Gruppe. Die Gruppe mit hoher CMT-3-Dosis (10 mg/Ratte, d. h. 40 mg/kg) zeigte die signifikanteste Verringerung der MTF, nämlich $28,9 \pm 15,4$ MTF/Ratte, was eine 51%-ige Verringerung an MTF, bezogen auf die Kontrollgruppe, bedeutet ($p < 0,01$, Tukey-Kramer-Mehrfachvergleichstest). Eine histologische Untersuchung der Lungenschnitte ergab keine offensichtlichen Unterschiede in den Tumorherden unter den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Beispiel 6

Einfluss einer Vorbehandlung auf das Tumorwachstum und die Metastasierung

[0112] In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir, ob eine vorherige Dosierung von Wirtstieren mit den Arzneistoffen das Tumorwachstum und die Metastasierung beeinflusste. Eine tägliche Verabreichung von Kontrollen oder Arzneistoffen (Doxycyclin oder CMT-3; 40 mg/kg) setzte 7 Tage vor den Injektionen der MAT-LyLu-Tumorzellen (2×10^5 Zellen/Tier) ein und wurde insgesamt 21 Tage fortgesetzt.

[0113] Bei diesem Ablauf stellten wir eine Abnahme der Tumorfrequenz und der Tumorentwicklungsfähigkeit fest. Die Tumorentwicklungsfähigkeiten wurden aus einer dreiwöchigen Messung des Tumorumfanges bei linearer Regressionsanalyse der logarithmisch umgewandelten Volumenmessungen berechnet (Dudak et al., 1996). Die durch dieses Verfahren bestimmten Tumorentwicklungsfähigkeiten wurden sodann mit dem Tukey-Kramer-Mehrfachvergleichstest getestet und erwiesen sich als signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe.

[0114] Wie in [Fig. 7A](#) gezeigt, betrug bei drei unabhängigen Experimenten die Tumorfrequenz $> 90\%$ bei den mit der Kontrolle und mit Doxycyclin behandelten Gruppen. Überraschenderweise variierte jedoch die Tumorfrequenz bei den mit CMT-3 behandelten Ratten von 28% (2/7) bis 85% (6/7) in vier getrennten Experimenten. Somit war die Tumorfrequenz signifikant niedriger (um $55\% \pm 18$) als bei den mit der Kontrolle oder mit Doxycyclin behandelten Gruppen. Die Ratten ohne Auftreten von primären Tumoren blieben sechs Monate lang tumorfrei, wonach sie getötet wurden. Es wurden keine histologisch identifizierbaren Tumorherde beobachtet, und zwar weder an der Injektionsstelle noch in der Lunge. Ferner verringerte ein Präparat von CMT-3 von größerer Reinheit die Tumorfrequenz auf 43% (Daten nicht aufgeführt). Somit ergaben nur CMT-3 und nicht das handelsübliche Tetracyclin, nämlich Doxycyclin, eine signifikante Hemmung des Auftretens von primären Tumoren.

[0115] Ferner war unter den Ratten in der mit CMT-3 behandelten Gruppe, die messbare Tumoren entwickelten ($\leq 50\%$), die Tumorentwicklungsfähigkeit (Zeitspanne bis zum Erreichen eines Tumorumfanges von 3 cm^3) signifikant langsamer ($20,2 \pm 3,5$ Tage) als entweder bei der Kontrollgruppe ($15,9 \pm 2,0$) oder bei der mit Doxycyclin behandelten Gruppe ($16,7 \pm 1,9$ Tage). Es ist zu betonen, dass die Tumorentwicklungsfähigkeit aus der Untergruppe von Tieren berechnet wurde, bei denen die Tumoren messbar waren. Somit war die Gesamtwirkung von CMT-3 auf das Tumorwachstum größer, als man diesen Daten entnehmen kann.

[0116] Besonders überrascht war die Anmelderin von der offensichtlichen Remission von palpierbaren Tumoren (d. h. Tumoresorption; Verringerung der Tumorgroße), die in zwei getrennten Experimenten bei mit CMT-3 (30%) oder Doxycyclin (20%) behandelten Ratten auftrat. Bei diesen Tieren waren die Tumoren 8 bis 10 Tage nach der Injektion an der primären Stelle palpierbar, zeigten aber keine Volumenzunahme und verschwanden 4 bis 7 Tage später. Diese Ratten ohne Auftreten von Primärtumoren blieben 8 Monate lang tumorfrei und ge-

sund, wonach sie getötet wurden.

[0117] CMT-3 hemmte ferner die Tumormetastasierung durch Vordosierung der Tiere mit CMT-3; vergl. [Fig. 7B](#). Dieser Einfluss war vergleichbar mit dem ohne Vordosierung. Die MTF bei den behandelten Tieren betrug $46,3 \pm 6,7$ bei der mit CMT-3 behandelten Gruppe gegenüber $74,2 \pm 6,4$ bei den Kontrollen, was eine Abnahme von 37,5% bedeutet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung für sämtliche Tiere, bei denen die Tumoren bis zu einer Größe von $\geq 10 \text{ cm}^3$ gewachsen waren, angegeben. Bei den den tumorfreien Tieren entnommenen Lungen waren zwei von histologisch erkennbarer Metastasierung.

[0118] Eine der typischen nachteiligen Wirkungen einer herkömmlichen chemotherapeutischen Arzneistoffbehandlung, wie Reizbarkeit, Überempfindlichkeit gegen Licht, Haarverlust oder Diarrhö, wurde in Verbindung mit der vorstehend beschriebenen Tetracyclin-Behandlung festgestellt. Als grobes Maß für Schädigungen an normalem Gewebe, die in plausibler Weise durch Doxycyclin oder CMT-3 hervorgerufen wurden, wurden die Tiere vor, während und nach der Behandlung gewogen und sämtliche Veränderungen wurden untersucht. Bei allen Experimenten ergab sich bei keinem der Tiere ein signifikanter Gewichtsverlust, vielmehr ergab sich am Versuchsende (6-monatige Beobachtungsperiode nach der Behandlung) bei 3% (Kontrollgruppe) bis 12% (mit CMT-3 behandelte Gruppe) eine Körpergewichtszunahme. Somit weist das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber herkömmlichen Antikrebstherapien erhebliche Vorteile insofern auf, als eine geringere und vorzugsweise praktisch gar keine Toxizität gegenüber normalem Gewebe bei krebshemmenden Tetracyclindosierungen erkennbar ist.

Beispiele 7–10

[0119] In den nachstehenden Beispielen 7–10 wurden die folgenden Materialien und Methoden angewandt: Züchtung und Aufrechterhalten von Zellen: C8161-Zellen, eine humane Melanomzelllinie, wurde in gemäß Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY), das mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FBS; GIBCO) und 0,1% Gentamycinsulfat ergänzt war, gehalten. Diese Zellen wurden routinemäßig unter Anwendung des raschen Nachweissystems GenProbe (Fisher Scientific; Chicago, IL) auf eine Mycoplasma-Kontamination abgesucht.

Chemisch modifizierte Tetracycline: Frische Vorratslösungen der chemisch modifizierten Tetracyclinverbindungen (2 mg/ml) wurden für jedes Experiment durch Hydratisierung in 2% Dimethylsulfoxid (DMSO)/Wasser, pH-Wert 10, anschließende Einstellung des pH-Werts unter Verwendung von 1,0 M HCl auf 7,4, hergestellt.

Beispiel 7

Einfluss von chemisch modifizierten Tetracyclinen auf die Zellproliferation

[0120] Einhunderttausend (1×10^5) C8161-Zellen wurden pro Vertiefung in jede von drei Platten mit je 24 Vertiefungen in Gegenwart von entweder DMSO (0,05%; Sigma Chem. Co.; Kontrolle) oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin oder der anderen CMTs (drei Vertiefungen auf jeder Platte pro Verbindung) überimpft. Die Zellen der ersten Platte wurden 24 Stunden mit 2 mM EDTA in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, minus zweiwertige Kationen), von der zweiten Platte nach 48 Stunden und von der dritten Platte nach 72 Stunden geerntet. Die Verdopplungszeit der C8161-Zellen in Gegenwart der einzelnen Verbindungen wurde sodann bestimmt und mit dem Wert der mit DMSO behandelten Zellen (Kontrolle) verglichen.

[0121] Der Einfluss von CMTs auf die Proliferation von C8161-Zellen an Kunststoff ist in der nachstehenden Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4

Einfluss von Tetracyclinverbindungen auf die C8161-Zellproliferation

Verbindung	Verdopplung
DMSO	22 Std.
CMT-1	24 Std.
CMT-3	28 Std.
CMT-4	22 Std.
CMT-6	24 Std.
CMT-7	24 Std.
CMT-8	26 Std.
Doxycyclin	22 Std.

[0122] Wie dargelegt, beeinflussten CMT-4 und Doxycyclin nicht die Verdopplungszeit von C8161-Zellen an Kunststoff; CMT-1, CMT-6 und CMT-7 erhöhten geringfügig die Verdopplungszeit der Zellen (etwa 9%) und CMT-8 und CMT-3 erhöhten die Verdopplungszeit um 18% bzw. 27%.

Beispiel 8

Gelatine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Zymographie)

[0123] 600 000 (6×10^5) C8161-Zellen wurden pro Vertiefung auf eine mit einer Laminin/Collagen IV/Gelatine-Matrix beschichtete Platte mit 12 Vertiefungen im DMEM plus Mito⁺ und 0,1% Gentamycinsulfat überimpft. Nach etwa 1-stündiger Inkubation, um den Zellen ein Anhaften zu ermöglichen, wurden 50 µg/ml Doxycyclin oder eines der üblichen CMTs pro Vertiefung zugegeben und die Platte wurde sodann in einen auf 37°C gehaltenen, befeuchteten 5% CO₂-Inkubator gebracht. 24 Stunden später wurden die Überstände entfernt und zur Beseitigung etwaiger Zellen oder Bruchstücke zentrifugiert. Ein Volumenteil Laemmli-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel wurde zu zwei Volumenteilen Medium gegeben. Diese Probe wurde ohne vorherige Erwärmung oder Siedebehandlung an 10% SDS-PAGE mit einem Gehalt an 0,1% Gelatine der Elektrophorese unterzogen (die Proben wurden auf die gleiche Zellzahl pro Volumen Medium pro Inkubationszeit normiert). Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter mäßigem Schütteln bei Raumtemperatur 30 Minuten in 50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,5) plus 2,5% TRITON^R X100 plus 50 µg/ml des entsprechenden CMT, das bei der ursprünglichen Behandlung verwendet worden war, gewaschen. Das Gel wurde sodann in einen Inkubationspuffer (50 mM Tris-Cl/10 mM CaCl₂/150 mM NaCl/0,05% NaN₃), der ferner 50 µg/ml des entsprechenden CMT enthielt, gebracht und 20 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Gele wurden mit Coomassie BBR-250 gefärbt, sodann mit 10% Methanol/10% Essigsäure in Wasser entfärbt, bis die Waschflüssigkeit klar blieb. Ein photographisches Negativ des Gels wurde unter Verwendung einer Videokamera und eines Snappy Video-Schnappschusssystems (Play Inc., Rancho Cordova, CA) digitalisiert. Die integrierte Dichte wurde für jede der klaren Proteolysezonen unter Verwendung der Software ImagePC8α (von den National Institutes of Health frei erhältlich) bestimmt. Die entsprechenden Veränderungen der gelatinolytischen Aktivitäten im Vergleich zu den Kontrollproben wurden auf einen Wert von 1,0 normiert.

[0124] Der relative Betrag der gelatinolytischen Enzymaktivität im konditionierten Medium aus C8161-Zellen, die mit diesen Verbindungen behandelt worden waren, wurde durch Zymographie gemessen (Daten nicht aufgeführt) und quantitativ gegen den Aktivitätsbetrag in den Kontrollproben durch densitometrische Analyse bestimmt, wie in der nachstehenden Tabelle 5 gezeigt ist.

Tabelle 5

Densitometrische Analyse von Zymogrammen

Verbindung	Gelatinase A	Gelatinase B
Kontrolle	1,00*	1,00*
Doxycyclin	0,26	0,40
CMT-1	0,24	0,22
CMT-2	0,89	1,51
CMT-3	0,22	0,03
CMT-4	0,75	0,12
CMT-6	0,07	0,51
CMT-7	0,17	1,22
CMT-8	0,70	1,05

* Integrierte Dichte von digitalisierten photographischen Negativen, normiert auf einen Wert von 1,00 für die Kontrollproben, unter Verwendung der Bildanalyse-Software ImagePCα (NIH).

[0125] Eine Behandlung von C8161-Zellen mit jeder dieser Verbindungen führte zu einer Abnahme der extrazellulären Niveaus der Gelatinase A-Aktivität (Tabelle 5), wobei die Werte im Bereich von 11% bis 93% lagen (CMT-2<CMT-4<CMT-8<Doxycyclin<CMT-1<CMT-3<CMT-7<CMT-6). Bei mit fünf der Verbindungen behandelten Zellen ergab sich auch eine Abnahme der extrazellulären Niveaus von Gelatinase B, von 49% bis 97% (CMT-6<Doxycyclin<CMT-1<CMT-4<CMT-3). Eine Behandlung mit drei der CMTs führte zu einer Zunahme der extrazellulären Niveaus von Gelatinase B (5 bis 51%; CMT-8<CMT-7<CMT-2).

Beispiel 9

In vitro-Invasionstest

[0126] Die invasiven in vitro-Potentiale der mit der Kontrolle (nur DMSO) und dem chemisch modifizierten Tetracyclin behandelten Zellen wurden unter Verwendung einer modifizierten Boyden-Kammer gemäß den vorstehenden Angaben gemessen (Membrane Invasion Culture System, MICS). Eine dazwischenliegende Barriere, die aus einem Polycarbonat-Filter mit 10 µm-Poren (Osmonics, Livermore, CA), der mit einer definierten Matrix aus humanem Laminin/Collagen IV/Gelatine (Sigma, St. Louis, MO) beschichtet war, bestand, wurde für diese Untersuchungen verwendet. Humane C8161-Melanomzellen wurden in die oberen Vertiefungen der Kammer in DMEM mit einem Gehalt an Mito⁺ (Collaborative Biomedical, Bedford, MA; d. h. serumfreies Medium) überimpft und in einem befeuchteten 5% CO₂-Inkubator bei 37°C einem Anheftvorgang überlassen. Doxycyclin oder einzelne CMTs wurden in die verschiedenen Vertiefungen der Kammer in Mengen von 3, 20 oder 50 µg/ml 2 Stunden nach der Überimpfung und täglich während des Tests zugesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen aus den unteren Vertiefungen entfernt und die Anzahl von invasiven Zellen wurde bestimmt und mit der ursprünglichen Anzahl an Zellen, die in die oberen Vertiefungen überimpft worden waren, verglichen. Gegebenenfalls wurden die Daten auf die Proliferation während der Dauer des in vitro-Tests korrigiert.

[0127] Die Einflüsse von Doxycyclin und CMTs in drei verschiedenen Konzentrationen (Bereich: 3 µg/ml; 20 µg/ml, 50 µg/ml) auf das invasive in vitro-Potential von C8161-Zellen ist in [Fig. 8](#) angegeben. Die Daten sind in der nachstehenden Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Hemmung des invasiven Potentials von C8161-Zellen durch einen mit einer Laminin/Collagen IV/Gelatine-Matrix beschichteten Filter

Verbindung	prozentuale Hemmung	Hemmtyp
Doxycyclin	12-79 %	dosisabhängig
CMT-1	26-58 %	dosisabhängig
CMT-2	~10 %	nicht dosisabhängig
CMT-3	35-74 %	dosisabhängig
CMT-4	~20 %	nicht dosisabhängig
CMT-6	8-50 %	dosisabhängig
CMT-7	15-55 %	nicht dosisabhängig
CMT-8	~12 %	nicht dosisabhängig

Beispiel 10

In vivo-Metastasierungstest

[0128] Einer Immunsuppression unterzogene Mäuse (athymische Nacktmäuse/weibliche SCID-Nacktmäuse der Firma Harlan Sprague Dawley) wurden in autoklavisierten Käfigen mit Mikroisolator-Oberteilen gehalten. Sämtliche Manipulationen an den Tieren wurden in einem Abzug mit laminarer Strömung durchgeführt, wobei vorher der Abzug, die Handschuhe und die Käfige mit ABQ-Sterilisationsmittel abgewischt wurden. Die Mäuse wurden mit sterilem Pico Lab Chow (Purina) und autoklavisiertem St. Louis-Leitungswasser versorgt. Täglich wurden den Mäusen Doxycyclin oder die CMTs intragastrisch in sterilem Wasser mit einem Gehalt an 2% Carboxymethylcellulose über sterile Einweg-Tierfütterungsnadeln (Poper & Sons Katalog-Nr. 9921; 20 g × 1,5") sieben Tage in der Woche zwischen 7.00 und 8.00 Uhr morgens verabreicht. Die Verbindungen und die Kontrolle (steriles Wasser plus 2% Carboxymethylcellulose) wurden bei -80°C aufbewahrt und in Aluminium eingewickelt, um tägliche lichtinduzierte Veränderungen zu vermeiden. Unmittelbar vor der Verwendung wurde der Tagesbedarf aufgetaut.

[0129] Vier Verbindungen wurden bezüglich ihrer Einflüsse auf das metastatische Potential von C8161-Zellen, die intravenös über die Schwanzvene injiziert wurden, getestet: CMT-1, CMT-3 und CMT-7 in Mengen von 40 bis 100 mg/kg, CMT-8 in einer Menge von 40 mg/kg, jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentration der Verbindungen in den verwendeten Fläschchen zur Erzielung der 100 mg/kg-Dosen betrug das 2,5-fache der 40 mg/kg-Dosen, so dass in beiden Fällen in etwa das gleiche Volumen verwendet wurde, nämlich etwa 0,5 ml/Tier. Die Experimente begannen am Tag -4 mit 9 Tieren pro Gruppe. Am Tag 0 wurden 2×10^5 C8161-Zellen in kalter ausgewogener Hank-Salzlösung (HBSS) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Das Experiment wurde weitere 24 Tage fortgeführt, wonach die Tiere getötet wurden. Ihre Lungen wurden entnommen und in einer Lösung gemäß Bouin/Formaldehyd (5 Teile:1 Teil) fixiert. Die Tumoren wurden auf der gesamten Oberfläche der Lunge quantitativ bestimmt, indem die Lunge gedreht wurde und die Tumoren an jedem Lappen unter Verwendung eines Vergrößerungsglases mit dem Faktor 6 gezählt wurden. Eine statistische Analyse wurde unter Verwendung des Statistikpakets der Microsoft Excel-Spreadsheet-Software durchgeführt.

[0130] Die Einflüsse von CMT-1, CMT-3, CMT-7 und CMT-8 in zwei verschiedenen Konzentrationen auf das metastatische Potential von C8161-Zellen in SCID-Mäusen sind in der nachstehenden Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Einfluss von CMTs auf das metastatische Potential von C8161-Zellen in SCID-Mäusen

Verbindung	Dosierung	Anzahl der Lungenmetastasen/Maus*	Bereich	Anzahl der Mäuse (n)	p-Wert†
Kontrolle	0,5ml Träger‡	231±49	120 bis >250	7	
CMT-1	40 mg/kg	129±102	3 bis >250	9	0,023
	100 mg/kg	240±28	165 bis >250	5	0,647
CMT-3	40 mg/kg	111±105	4 bis >250	9	0,033
	100 mg/kg	176±82	9 bis >250	5	0,141
CMT-7	40 mg/kg	136±107	63 bis >250	6	0,169
	100 mg/kg	166±101	11 bis >250	5	0,157
CMT-8	40 mg/kg	186±60	124 bis >250	7	0,184
	100 mg/kg	vergl. die Anmerkung			

* Mittelwert ± Standardfehler

† $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle als signifikanter Unterschied angesehen

‡ steriles Wasser mit einem Gehalt an 2% Carboxymethylcellulose

Anmerkung: Diese Gruppe von Mäusen war die erste, einer Sondenbehandlung unterzogenen Gruppe. Aufgrund von technischen Schwierigkeiten überlebte sie nicht.

[0131] Eine orale Sondenbehandlung der Tiere mit CMT-1 oder CMT-3 verringerte signifikant die Anzahl an Lungenmetastasen in der SCID-Mäusepopulation bei täglicher Verabreichung von 40 mg/kg ($< 0,05$), verringerte jedoch nicht in signifikantem Umfang die Anzahl an Lungenmetastasen bei der Dosierung von 100 mg/kg. Die Verbindungen CMT-7 und CMT-8 verringerten nicht in signifikantem Umfang die Anzahl der Lungenmetastasen bei beiden Dosierungen ($p > 0,05$).

Beispiel 11

Unterschiedliche Zytotoxizität von Tetracyclinverbindungen gegenüber Krebszellen

[0132] Verschiedene Krebszelllinien und normale Zellen wurden in vitro untersucht, um festzustellen, ob Tetracyclinverbindungen zytotoxische Wirkungen (Zellabtötung) hervorrufen. Ein herkömmlicher Test zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von gezüchteten Zellen, der auf der Redoxaktivität in den Zellen beruht, wurde herangezogen (Page et al., 1993). Der Test bedient sich des Redoxfarbstoffes Alamar Blue, bei dem es sich um einen fluorogenen Indikatorfarbstoff handelt, der nur dann zu einem fluoreszierenden roten Produkt umgewandelt wird, wenn die Zellen Elektronentransportaktivitäten ausüben, was ein weitgehend anerkanntes Kriterium für die Lebensfähigkeit darstellt.

[0133] Gezüchtete Zellen aus drei Prostata-Tumorzelllinien, nämlich LNCAP, DU-145 und PC-3, sowie normale Prostata-Stromazellen, die von einem normalen Mann im Alter von 37 Jahren durch Biopsie erhalten wurden, wurden bis zur Konfluenz in Mikroplatten mit Mehrfachvertiefungen gezüchtet, um Unterschiede in der proliferativen Aktivität unter den Zelltypen zum Zeitpunkt der Einwirkung der Testverbindung auf ein Minimum zu beschränken. CMT-3 wurde in die Vertiefungen in Konzentrationen von 10 μM und 20 μM gegeben (auch 50 μM im Fall von DU-145). Zu Versuchsbeginn und erneut an den Tagen 1, 2 und 3 wurden ausgewählte Vertiefungen 3 Stunden mit dem Indikatorfarbstoff inkubiert. Die Fluoreszenz wurde an einem Cytofluor 2300-Fluoreszenz-Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 9A–Fig. 9D](#) zusammengestellt.

[0134] Normale Prostata-Stromazellen zeigten praktisch keine Veränderung der Fluoreszenz innerhalb der dreitägigen Dauer, und zwar unabhängig von der CMT-3-Dosis ([Fig. 9A](#)). Eine geringfügige Zunahme am Tag 1 in den Stromazellen, die nicht mit CMT-3 behandelt wurden, unterstützte unsere Absicht, die Herbeiführung von Komplikationen durch ausgeprägte Unterschiede in der proliferativen Aktivität unter den verschiedenen untersuchten Zellen zu vermeiden. LNCAP-Zellen zeigten sogar unter diesen Bedingungen einer begrenzten proliferativen Aktivität eine hervorragende Empfindlichkeit gegenüber CMT-3: Die Zytotoxizität ist innerhalb von 24 Stunden bei 20 μM vollständig und zu diesem Zeitpunkt bei 10 μM CMT-3 nahezu vollständig ([Fig. 9B](#)). PC-3-Tumorzellen waren gegenüber CMT-3 etwas weniger empfindlich, was zu einer Zytotoxizität von etwa 25% nach 24 Stunden, von 50% nach 48 Stunden und von 75% nach 72 Stunden führte ([Fig. 9C](#)). DU-145-Tu-

morzellen sind weniger empfindlich, wobei eine gewisse Zytotoxizität bei 20 µM nach 72 Stunden auftritt ([Fig. 9D](#)). DU-145-Zellen zeigen eine signifikante Zytotoxizität bei 50 µM, die sich allmählich im Verlauf der 72-stündigen Testperiode entwickelt. Normale Zellen, die mit 50 µM CMT-3 behandelt werden, zeigen keine vergleichbare Zytotoxizität (Daten nicht aufgeführt).

[0135] Es ist darauf hinzuweisen, dass ausgeprägte Unterschiede in der zellulären Morphologie zwischen normalen Stromazellen und den Tumorzellen nach Einwirkung von CMT-3 festgestellt wurden: In den normalen Stromazellen waren keine signifikanten Veränderungen sichtbar, während bei sämtlichen Tumorzelltypen eine zunehmende Bildung von Vakuolen festgestellt wurde.

Beispiel 12

Zytotoxizität von Tetracyclinverbindungen gegen Krebszellen

[0136] Eine Gruppe von chemisch modifizierten Tetracyclinverbindungen und Doxycyclin wurde auf ihre Zytotoxizität gegen zwei Karzinome getestet: COLO 205 (eine von humanem Kolonkarzinom abgeleitete Zelllinie) und der E-10-Klon von MDA-MB-231 (eine von humanem Brustkarzinom abgeleitete Zelllinie). Die Zytotoxizität wurde unter Anwendung eines herkömmlichen Tests auf Lebensfähigkeit mit einem Tetrazoliumsalz (MTS) gemessen. Die Zellen wurden in Medium mit einem Gehalt an den CMTs in Konzentrationen von 5 µM bis 100 µM 2 Tage gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen mehrere Stunden mit dem MTS inkubiert, wonach das überstehende Medium zur Bestimmung von Formazan, das nur von lebenden Zellen erzeugt wird, entnommen wurde. Die Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen 8A und 8B aufgeführt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Zytotoxizität angegeben, wobei es sich einfach um die prozentuale Abnahme der gemessenen Formazan-Konzentration in der entnommenen Probe des Mediums handelt. Zwei verschiedene Chargen von CMT-3 mit der Bezeichnung "A" und "B" wurden getestet.

Tabelle 8A

Zytotoxische in vitro-Wirkung von CMTs auf COLO 205-Zellen

Verbindung	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	100 µM
CMT-1	0	4	32,5	63,8	82,8
CMT-2	2,7	4,5	0	7	16,3
CMT-3	17	28,8	52	79	85,6
CMT-3	25,9	38,9	37	86,7	86,7
CMT-4	1,8	6,8	25,3	73,3	81,9
CMT-5	0	0	0	0	0
CMT-6	1,7	0	0	0	22,2
CMT-7	0	0	0	0	29,4
CMT-8	0	20,5	35,5	44,4	50
Doxycyclin	0	0	45,7	58,8	66,5

Tabelle 8B

Zytotoxische in vitro-Wirkung von CMTs auf E-10-Zellen

Verbindung	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	100 µM
CMT-1	7, 6	0	0	2, 2	7, 6
CMT-2	1, 5	3, 8	0, 8	0	2, 3
CMT-3	0	0	4, 15	3	13, 9
CMT-3	0	1, 8	8, 5	17, 7	47
CMT-4	9	16, 7	0, 8	0	0
CMT-5	0	0	0	0	0
CMT-6	0	6	3	7, 6	16, 7
CMT-7	0	0	0	0	8, 3
CMT-8	0	0	0	0	0
Doxycyclin	0	0	4, 5	24, 2	29, 5

[0137] Die vorstehenden Daten zeigen, dass CMT-3 von den getesteten Verbindungen am wirksamsten war, wobei CMT-1, CMT-4 und CMT-8 ebenfalls eine signifikante Zytotoxizität aufweisen. Doxycyclin zeigte ebenfalls eine gewisse Zytotoxizität.

Beispiel 13

Zytotoxizität von Tetracyclinverbindungen gegenüber Krebszellen

[0138] Eine Untersuchung der Zytotoxizität von chemisch modifizierten Tetracyclinverbindungen gegenüber Krebszellen wurde durchgeführt, um die Beteiligung eines programmierten Zelltods (Apoptose) festzustellen (vergl. Duke et al., 1986). MAT-LyLu-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von CMT-3 und Doxycyclin inkubiert. Die konditionierten Medien wurden auf lösliche Nucleosomen, die sich aus internucleosomalen DNA-Strangbrüchen ergeben, getestet, wobei die ELISA-Plus-Testpackung zum Nachweis von Zelltod der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Katalog-Nr. 1774425) unter Berücksichtigung der Anweisung des Herstellers verwendet wurde. Bei Untersuchungen der Dosisabhängigkeit wurden die Zellen mit der Tetracyclinverbindung 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Medien gewonnen. Bei den Zeituntersuchungen wurden die Zellen für bestimmte Zeiträume 0 bis 48 Stunden mit den Tetracyclinverbindungen behandelt. Gegebenenfalls wurden sie in frischem Medium bis zu 48 Stunden nach Versuchsbeginn gehalten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium gewonnen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt. Repräsentative Daten sind in den [Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#) dargestellt.

[0139] Wie aus [Fig. 10A](#) ersichtlich ist, wurde eine dosisabhängige Zunahme an löslichen Nucleosomen in den mit CMT-3 behandelten MAT-LyLu-Zellen beobachtet, jedoch nicht in den mit Doxycyclin behandelten Zellen. Tatsächlich war die Induktion des programmierten Zelltods auch bei einer Doxycyclin-Konzentration, die die 50%-Wachstumshemmdosis (GI_{50}), die bei den vorstehend beschriebenen Proliferationstests bestimmt worden war, überstieg, insignifikant. Die Menge an löslichen Nucleosomen, die in das Medium freigesetzt worden waren, war direkt proportional zu den Fraktionen an apoptotischen Zellen gemäß mikroskopischer Bestimmung in ausgewählten Fällen. Ferner war, wie in [Fig. 10B](#) gezeigt, eine kurze Einwirkungsdauer von CMT-3 (4 Stunden bei 5 µg/ml oder 10 µg/ml) ausreichend, um eine mutmaßliche, programmierte Zelltodreaktion in den MAT-LyLu-Zellen hervorzurufen, wobei aber keine derartige Reaktion bei den mit Doxycyclin behandelten Zellen festgestellt wurde (Daten nicht aufgeführt).

Literatur

[0140] The following publications, having been mentioned in the foregoing specification, are incorporated herein by reference for all that they disclose:

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, and McEwan RM, "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells," Cancer Res 47: 3239–3245 (1987).

- Dean DD and Woessner JF Jr, "A sensitive, specific assay for tissue collagenases using telopeptide-free ^3H -acetylated collagen," *Anal Biochem* 148: 174–118 (1985).
- Dean DD, Curry TE, LeMaire WJ, and Woessner JF Jr, "Determination of metalloproteinase activity after selective destruction of tissue inhibitor of metalloproteinases," *Trans 33rd Mtg Orthopedic Res Soc*, 12: 248 (1987).
- DeClerck YA, Shimada H, Taylor SM, and Langley KE, "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression," *Annals NY Acad Sci* 732: 222–232 (1994).
- Dudak SD, Lopez A, Block NL, and Lokeshwar BL, "Enhancement of radiation response of prostatic carcinoma by Isonidamide," *Anticancer Res* 16: 3665–3672 (1996).
- Duke RC and Cohen JJ, "IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells," *Lymphokine Res* 5: 289–299 (1986).
- Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA, and Stetler-Stevenson W, "Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples," *Am J Pathol* 145(6): 1285–1290 (1994).
- Golub LM, Ramamurthy NS, and McNamara TF, *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 297–322 (1991).
- Golub LM, Sorsa T, and Suomalainen K, *Curr Opin Dent* 2: 80–90 (1992).
- Greenwald RA, Moak SA, Ramamurthy NS, and Golub LM, "Tetracyclines suppress matrix metalloproteinase activity in adjuvant arthritis and in combination with flurbiprofen, ameliorate bone damage," *J Rheumatol* 19: 927–938 (1992).
- Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, and Narayan P, "Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1," *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(1): 14–24 (1995).
- Kroon AM, Dontje BHJ, Holtrop M, and van den Bogert C, "The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics," *Cancer Letts* 25(1): 33–40 (1984).
- Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, and Gunja-Smith Z, "Secretion of matrix metalloproteinases and the inhibitors (TIMPs) by human prostate in explant cultures: Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues," *Cancer Res* 53: 4493–4498 (1993a).
- Lokeshwar BL, Hurkadi KS, Sheth AR, and Block NL, "Human prostatic inhibin suppresses tumor growth and inhibits clonogenic cell survival of a model prostatic adenocarcinoma, the Dunning R3327G rat tumor," *Cancer Res* 53: 4855–4859 (1993b).
- Lokeshwar BL, Ferrell SM, and Block NL, "Radiation sensitization of prostatic adenocarcinoma by taxol: Potential for therapeutic application in advanced malignancy," *Anticancer Res* 15: 93–98 (1995a).
- Lokeshwar BL, Lokeshwar VB, and Block NL, "Expression of CD44 in prostate cancer cells: Association with cell proliferation and invasive potential," *Anticancer Res* 15: 1191–1198 (1995b).
- Lokeshwar B, Dudak S, Selzer M, Block N, and Golub L, "Novel therapies for metastatic prostate cancer: Chemically modified tetracycline," in *Therapeutic Strategies in Molecular Medicine*, Miami Biotechnology Short Report, Vol. 7: Advances in Gene Technology, Oxford University Press, London (1996).
- Maragoudakis ME, Peristeris P, Missirlis E, Aletras A, Andriopoulou P, and Haralabopoulos G, *Annals NY Acad Sci* 732: 280–293 (1994).
- Mitscher LA, *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Ch. 6, Marcel Dekker, New York (1978).
- Nip LH, Uitto V-J, and Golub LM, "Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines," *J Periodontol Res* 28: 379–385 (1993).
- Pagé B, Pagé M, and Noël C, "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro," *International J Oncol* 3: 473–476 (1993).
- Rifkin BR, Vernillo AT, and Golub LM, "Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs," *Amer Acad Periodontol* 64: 819–827 (1993).
- Seftor REB, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, and Hendrix MJC, "Role of the $\alpha_v\beta_3$ integrin in human melanoma cell invasion," *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1557–1561 (1992).
- Seftor REB, Seftor EA, Stetler-Stevenson WG, and Hendrix MJC, "The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins during human melanoma cell invasion," *Cancer Res* 53: 3411–3415 (1993).
- Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O, Suomalainen K, Ingman T, Saari H, Halinen S, Lee H-M, Golub LM, Hall J, and Simon S, "Doxycycline protects serum alpha-1-antitrypsin from human neutrophil collagenase," *Agents Actions Suppl* 39: 225–229 (1993).
- Uitto VJ, Firth JD, Nip L, and Golub LM, "Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes," *Annals NY Acad Sci* 32: 140–151 (1994).
- van den Bogert C, Dontje BHJ, Holtrop M, Melis TE, Romijn JC, van Dongen JW, and Kroon AM, "Arrest of the proliferation of renal and prostate carcinomas of human origin by inhibition of mitochondrial protein synthesis," *Cancer Res* 46(7): 3283–3289 (1986).

Woessner JF Jr., "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling," FASEB J 5: 2145–2154 (1991).

Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, and Rao JS, "Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro," Cancer Res 56(2): 384–392 (1996).

Yu Z, Leung MK, Ramamurthy NS, McNamara TF, and Golub LM, "HPLC determination of a chemically modified nonantimicrobial tetracycline: Biological implications," Biochem Medicine Metab Biol 47: 10–20 (1992).

Zucker S, Lysick RM, Ramamurthy NS, Golub LM, Wieman JM, and Wilkie DP, "Diversity of plasma membrane proteinases in mouse melanoma cells: Inhibition of collagenolytic activity and cytolytic activity by minocycline," J Natl Cancer Inst 75: 517–525 (1985).

Patentansprüche

1. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),

Tetracyclinonitril (CMT-2),

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),

4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),

4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),

4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und

6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);

zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung des Wachstums von Krebs bei einem Säuger, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Krebs um ein Karzinom handelt.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei es sich bei dem Krebs um ein Adenokarzinom handelt.

4. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der zellulären Proliferation des Krebses.

5. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der Invasivität des Krebses.

6. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der Metastasierung des Krebses.

7. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verabreichung der Tetracyclinverbindung in einer ausreichenden Menge, um spezifisch die Expression einer Matrix-Metalloproteinase durch Krebszellen zu hemmen.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei es sich bei der Matrix-Metalloproteinase um eine Gelatinase handelt.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei es sich bei der Matrix-Metalloproteinase um Gelatinase A oder Gelatinase B handelt.

10. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verabreichung an einen Säuger zusammen mit einer begleitenden antineoplastischen Anwendung.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die begleitende antineoplastische Anwendung eine Chemotherapie, einen chirurgischen Eingriff oder eine Radiotherapie umfasst.

12. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),

Tetracyclinonitril (CMT-2),

6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),

4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),

4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),

4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der Proliferation von Krebszellen,
wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden-
und Lymph-Krebsarten besteht.

13. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung des invasiven Potentials von
Krebszellen, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Me-
lanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

14. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung des metastatischen Potentials von
Krebszellen, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Me-
lanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

15. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Krebszustands, der durch
eine übermäßige gelatinolytische Aktivität gekennzeichnet ist, bei einem Säuger, wobei der Krebs aus der
Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten
besteht.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die übermäßige gelatinolytische Aktivität durch eine übermäßi-
ge Aktivität von Gelatinase A gekennzeichnet ist und es sich bei der Tetracyclinverbindung um
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6) oder
4-De-(dimethylamino)-12- α -desoxytetracyclin (CMT-7)
handelt.

17. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der Krebszustand durch eine übermäßige Aktivität von Gelati-
nase B gekennzeichnet ist und die Tetracyclinverbindung aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus
4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1) und
4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6)
besteht.

18. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
Tetracyclinonitril (CMT-2),
6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),

4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);
 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung des Auftretens eines Tumors bei einem Säuger, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

19. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
 Tetracyclinonitril (CMT-2),
 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8);
 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der gelatinolytischen Aktivität, die mit einem krebsartigen Tumor verbunden ist, bei einem Säuger, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei sich die gelatinolytische Aktivität vom krebsartigen Tumor ableitet.

21. Verwendung nach Anspruch 19, wobei sich die gelatinolytische Aktivität von normalem Gewebe ableitet.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich beim normalen Gewebe um epitheliales Gewebe handelt.

23. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich beim normalen Gewebe um stromales Gewebe handelt.

24. Verwendung von

Tetracyclinonitril (CMT-2) oder
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6)
 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur topischen Verabreichung an einen Säuger zur Hemmung des Krebswachstums bei diesem Säuger, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

25. Verwendung einer Tetracyclinverbindung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1),
 Tetracyclinonitril (CMT-2),
 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3),
 4-De-(dimethylamino)-7-chlortetracyclin (CMT-4),
 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6),
 4-De-(dimethylamino)-12 α -desoxytetracyclin (CMT-7) und
 6- α -Desoxy-5-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8),
 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum differenziellen Abtöten von Krebszellen, wobei der Krebs aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Prostata-, Brust-, Kolon-, Lungen-, Melanom-, Hoden- und Lymph-Krebsarten besteht.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei es sich bei den Krebszellen um Zellen eines Sarkoms, eines Karzinoms oder eines Adenokarzinoms handelt.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei es sich bei den Krebszellen um Zellen eines Karzinoms von Prostata, Hoden, Lunge, Kolon oder Brust handelt.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

FIG-1A

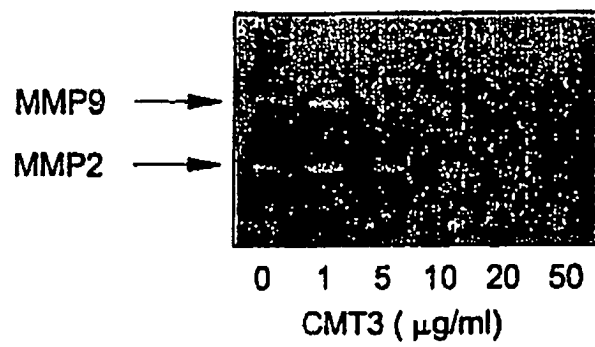


FIG-1B

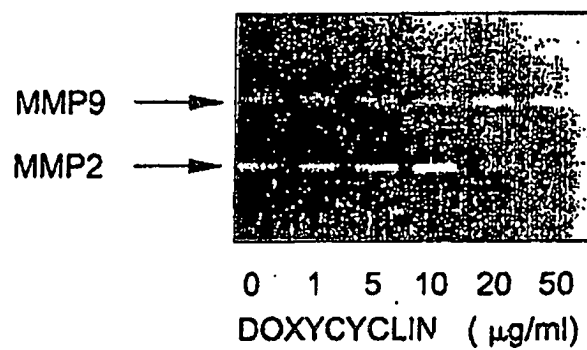


FIG-1C

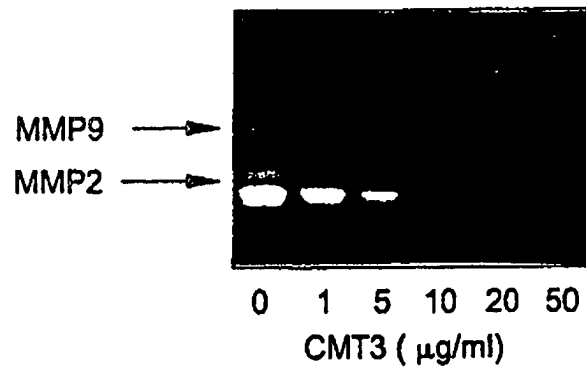


FIG-1D

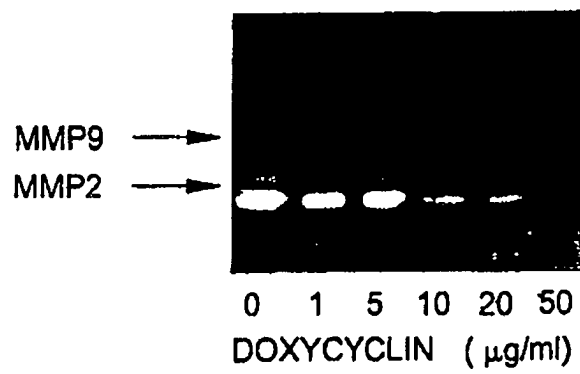


FIG-2A LNCaP

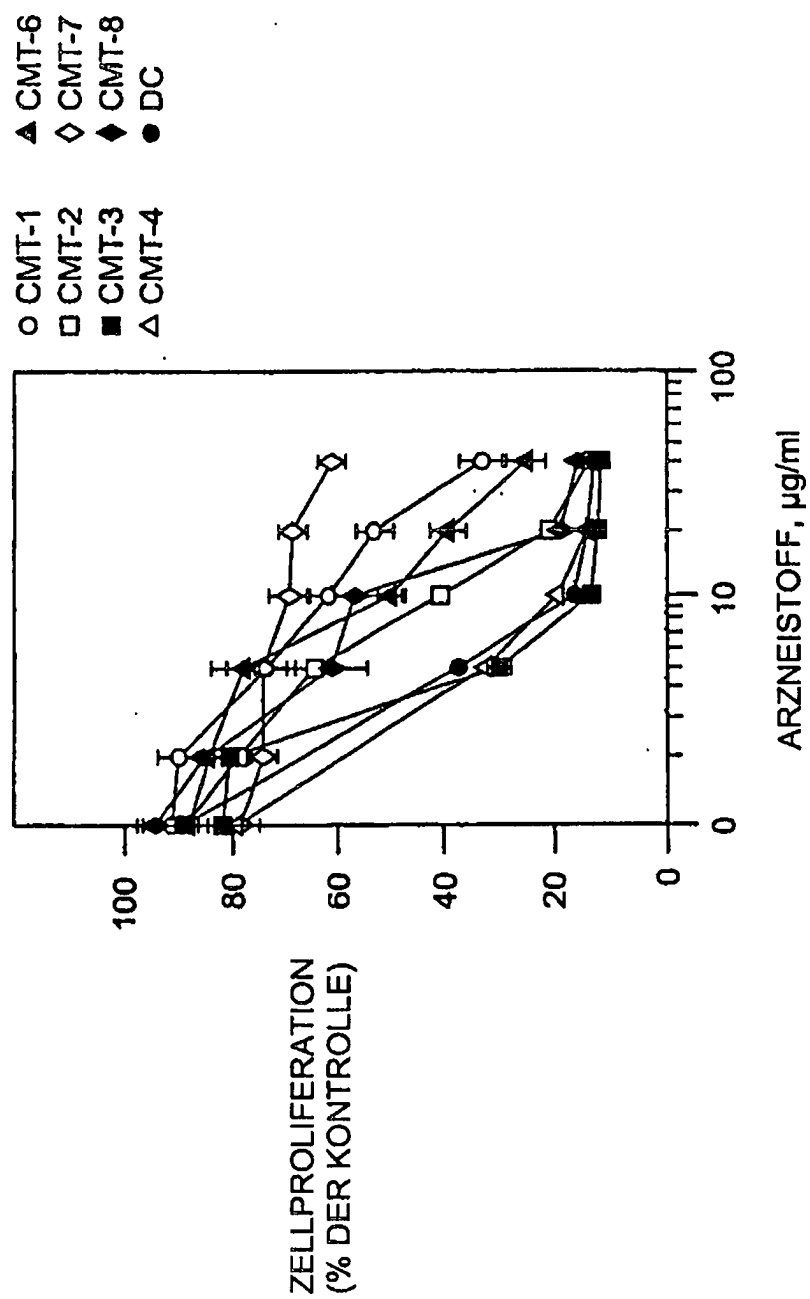


FIG-2B TSU PR1

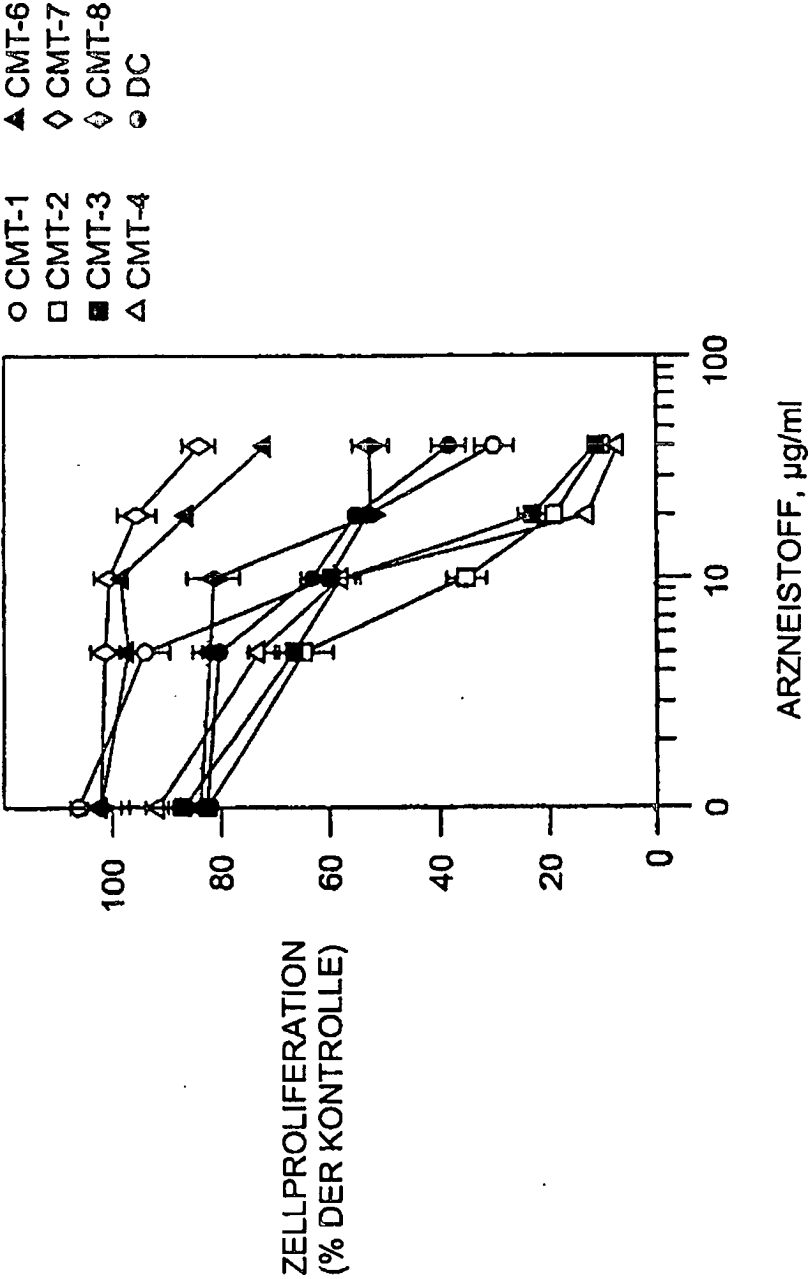


FIG-2C

MAT LyLu

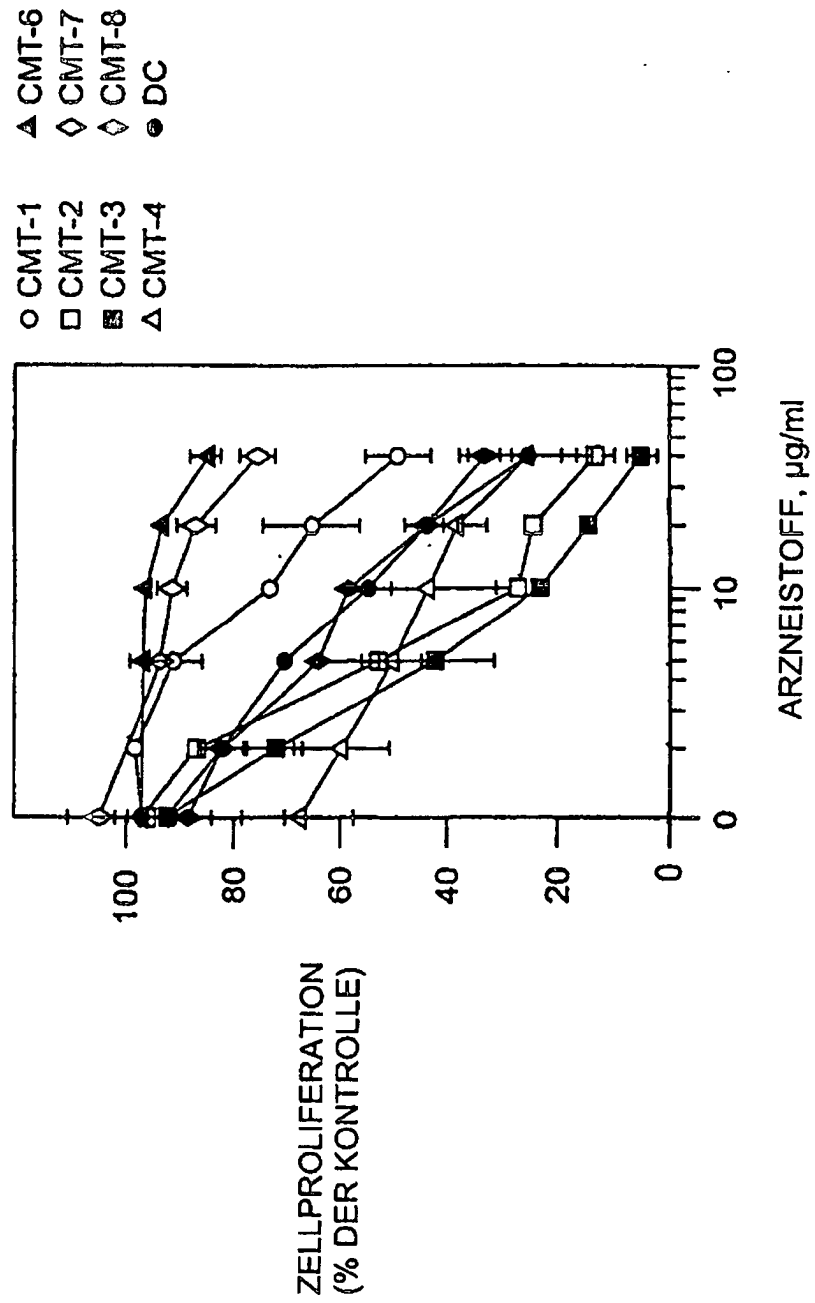


FIG-3A DU145

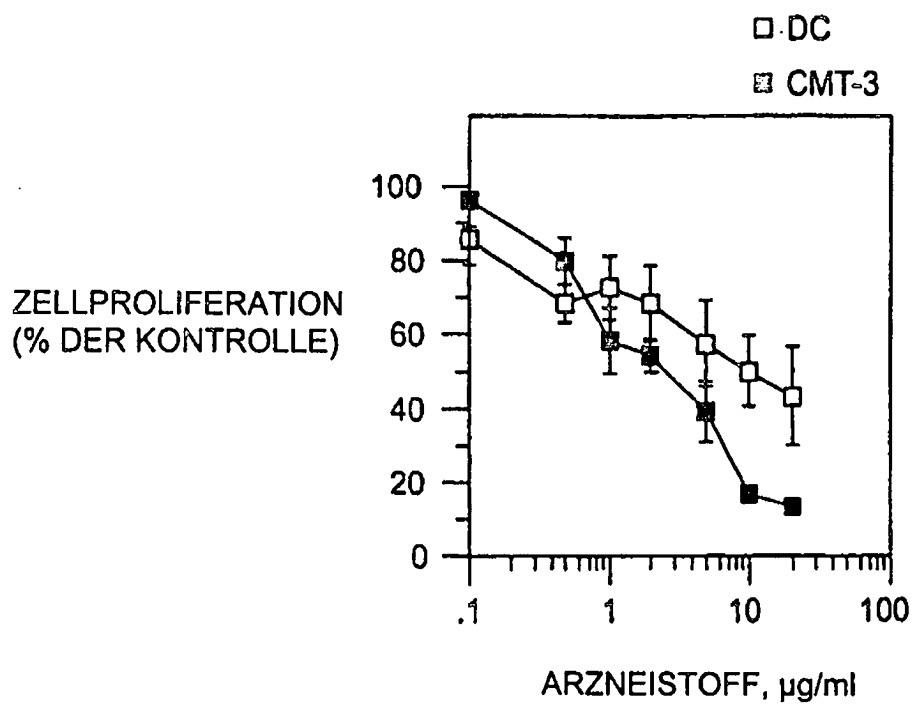


FIG-3B PC-3

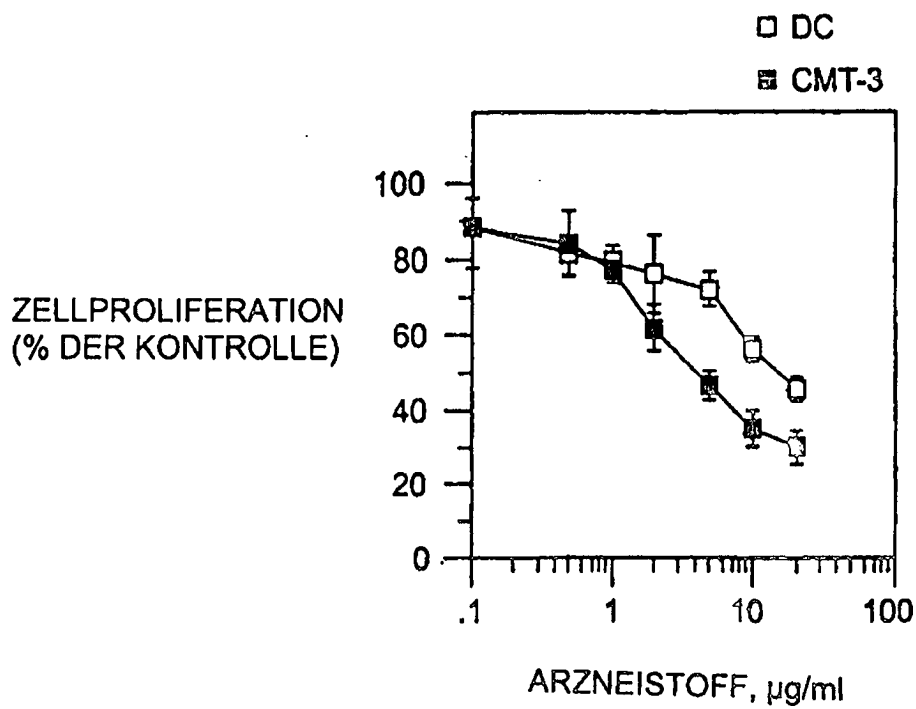


FIG-3C BPH-1

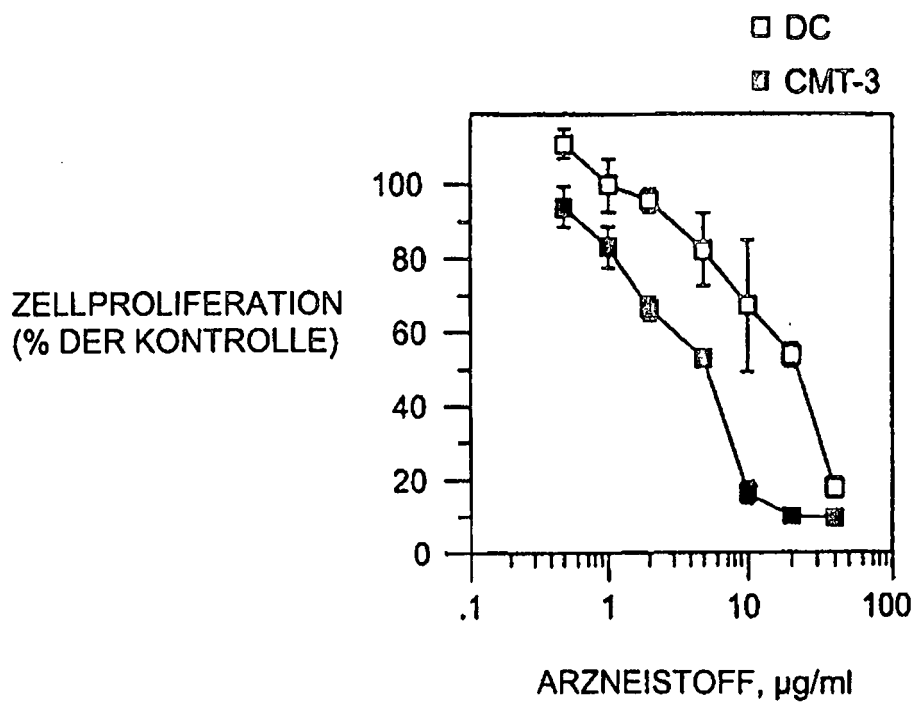


FIG-3D FHS733

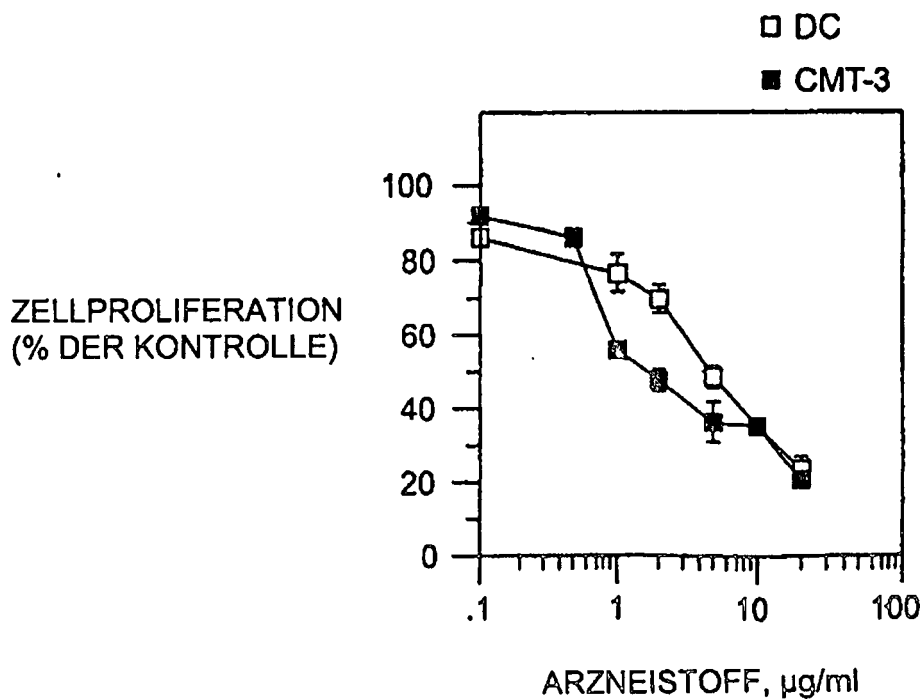
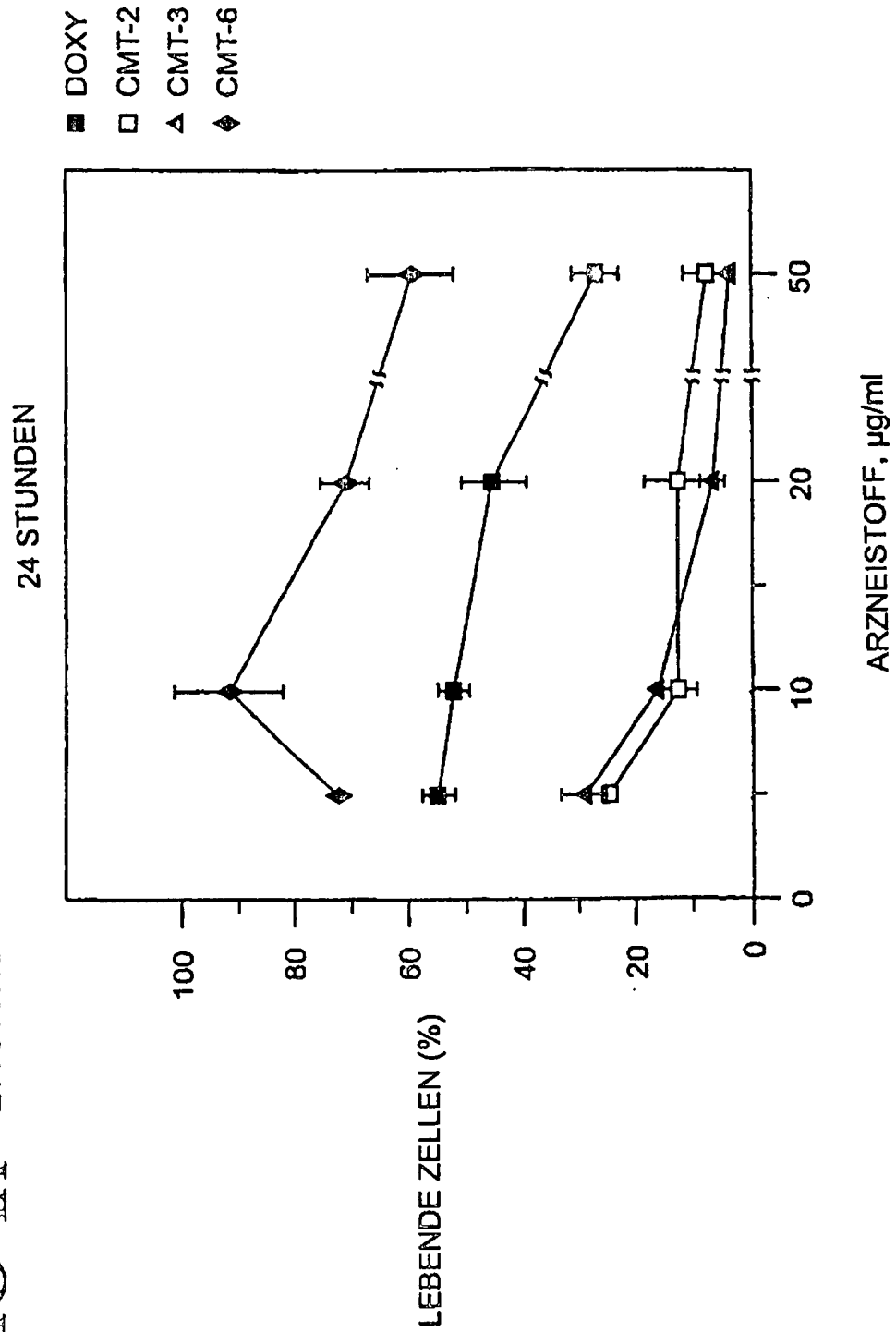


FIG-4A ZYTOTOXIZITÄT VON CMTS



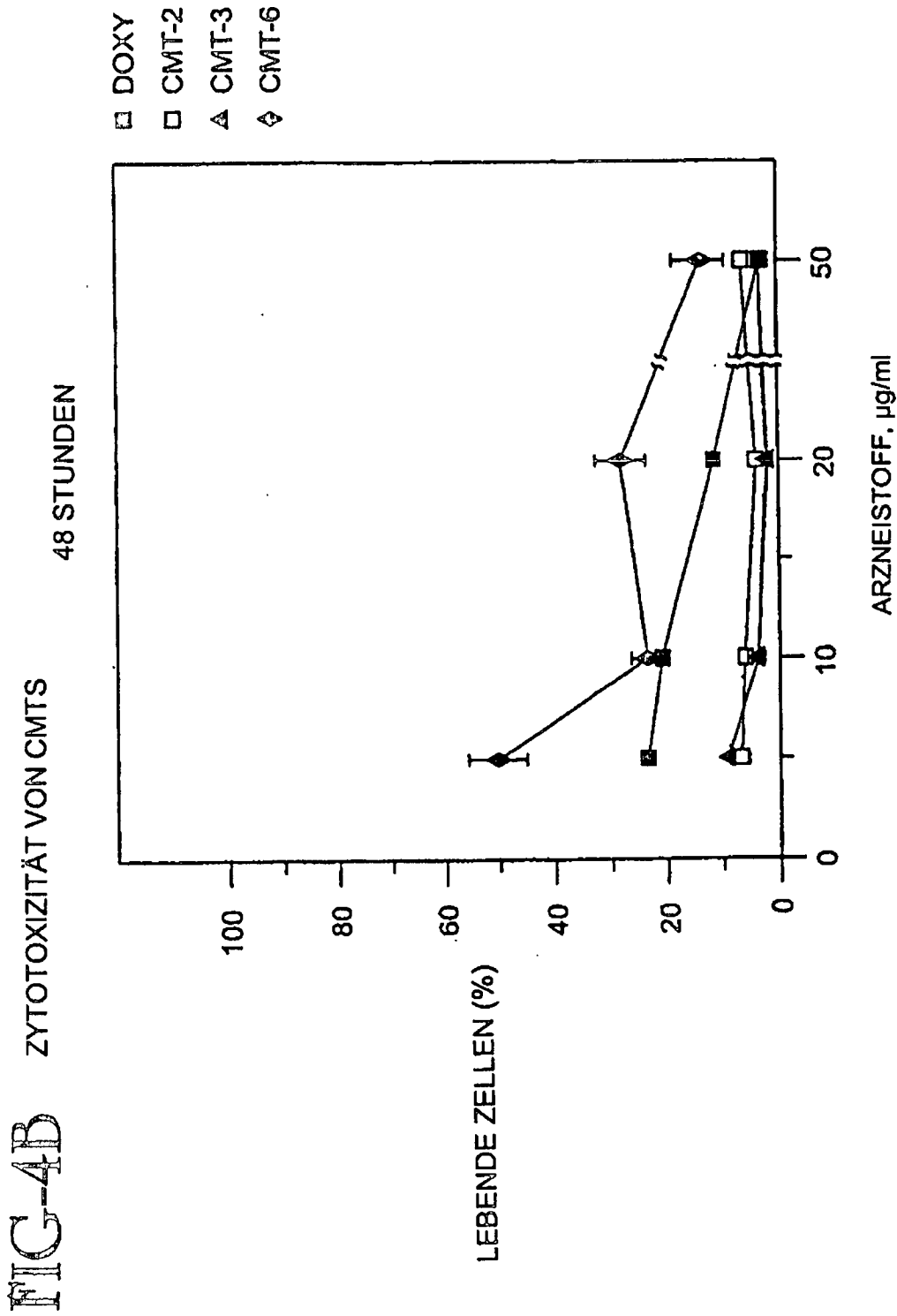


FIG-5A TSU-PR1

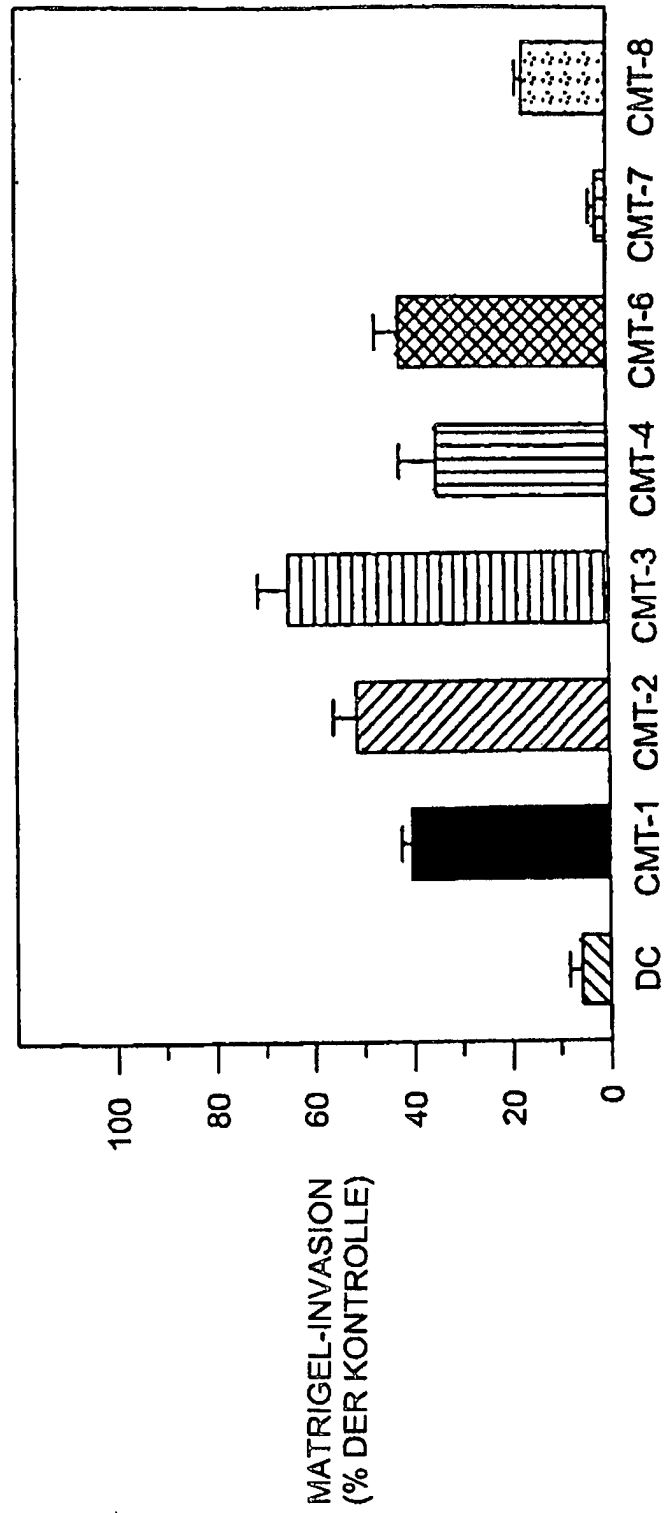


FIG-5B MAT LyLu

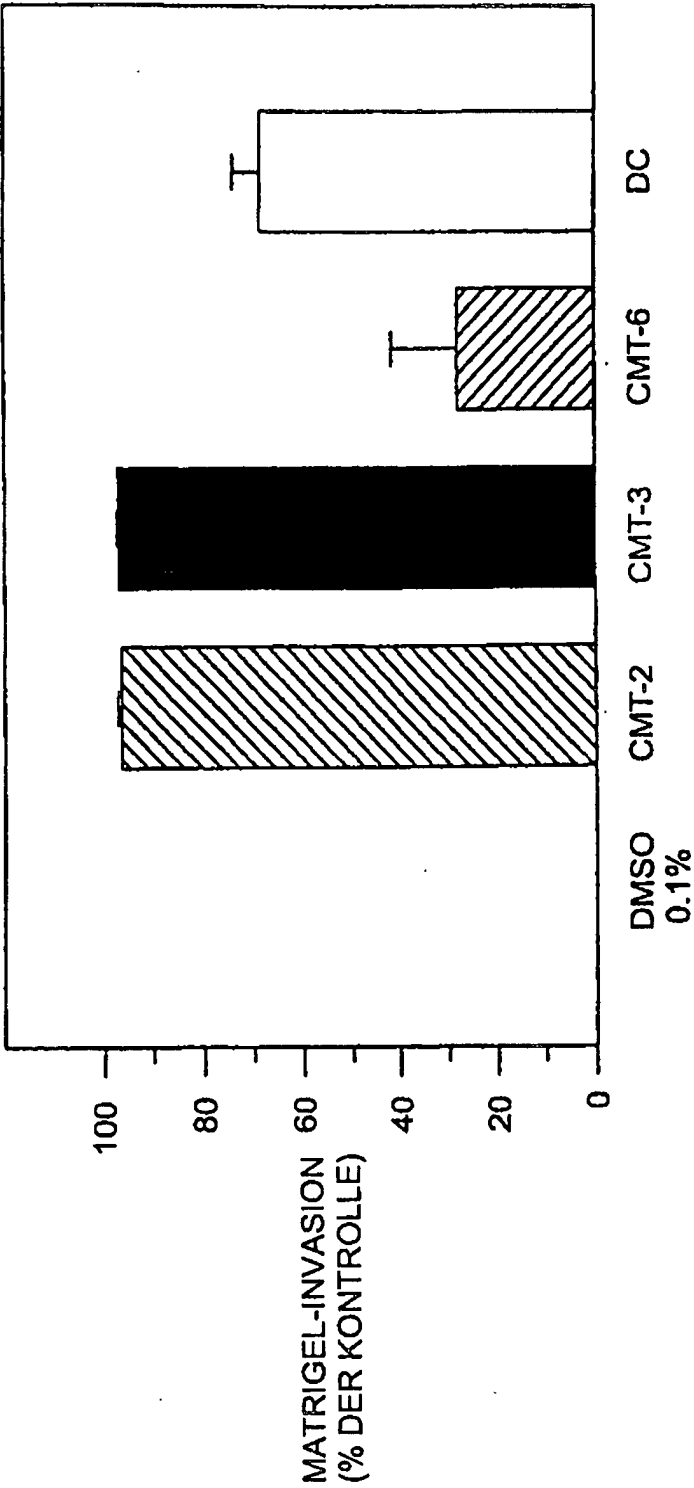


FIG-6

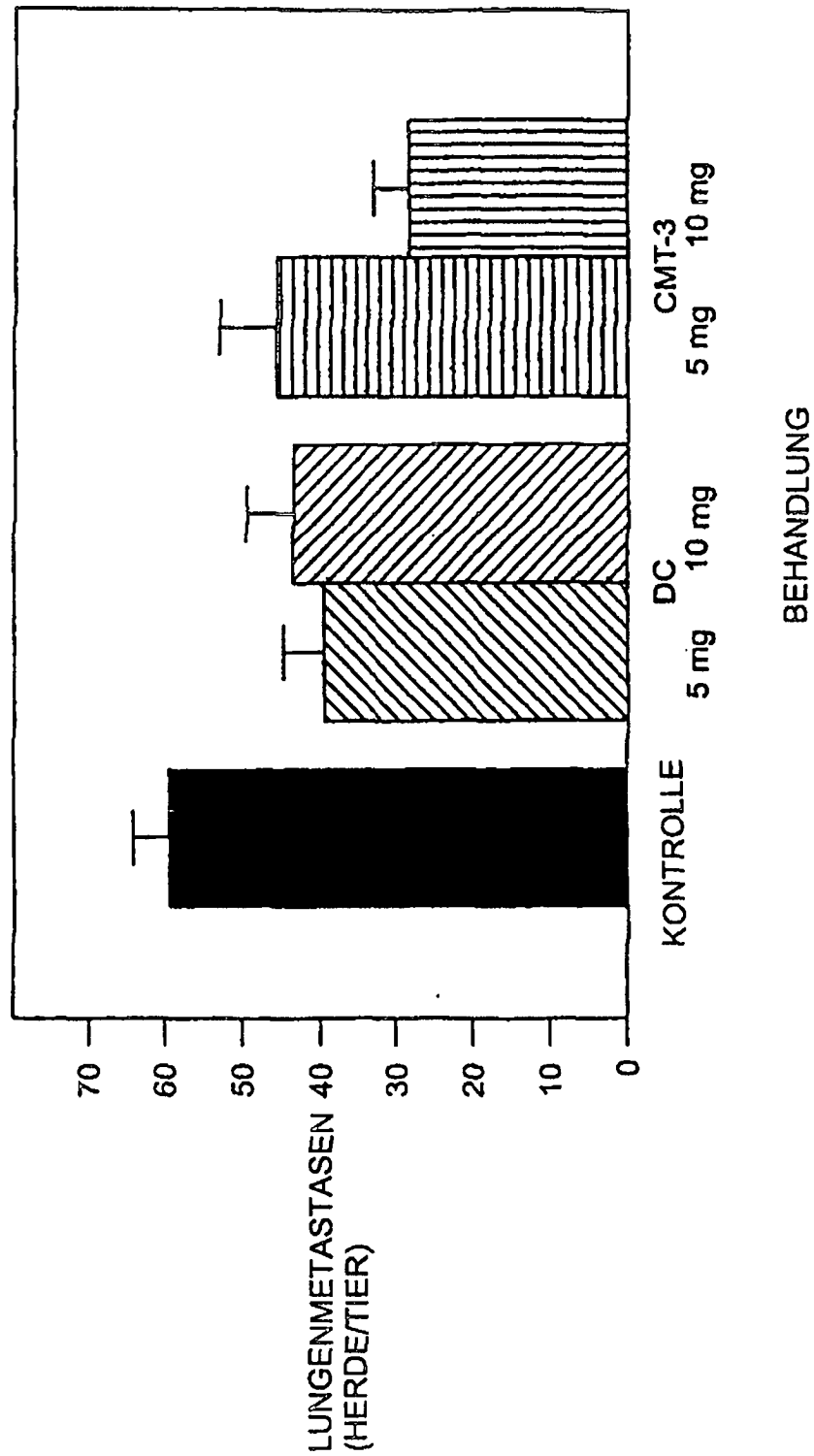


FIG-7A TUMORHÄUFIGKEIT

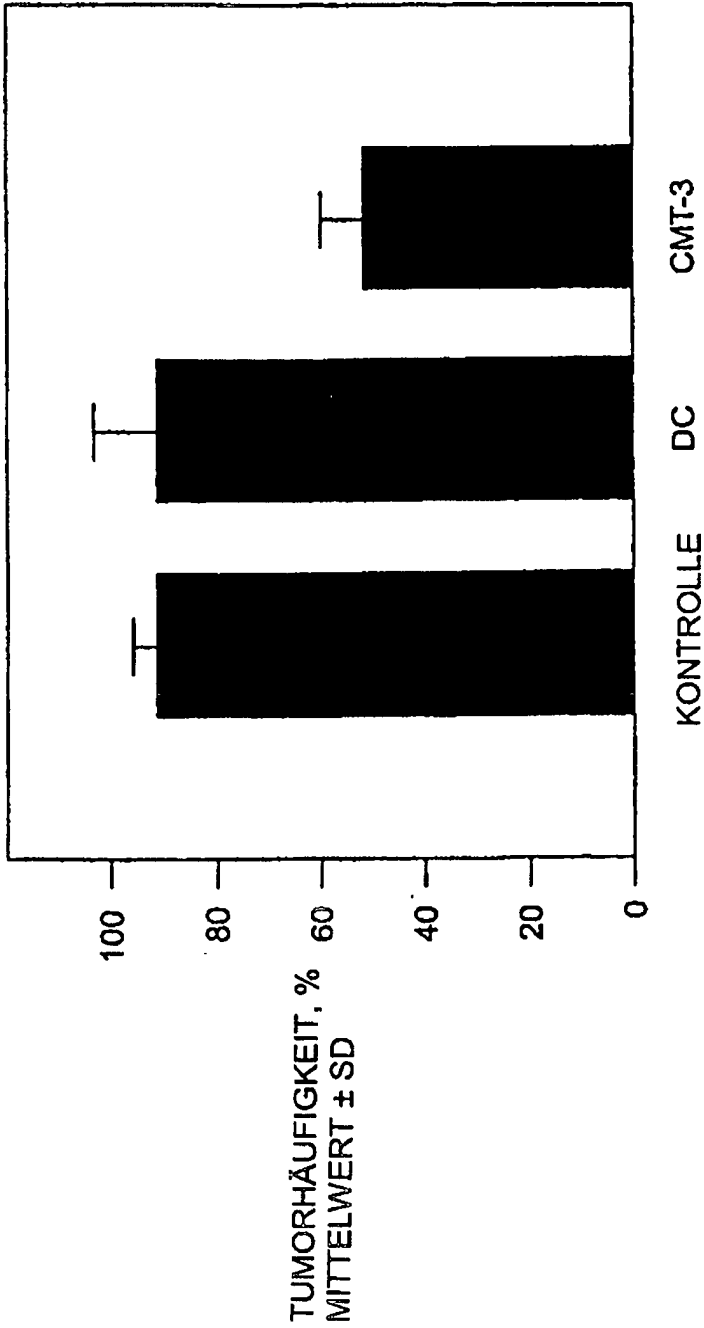


FIG-7B METASTASIERUNG

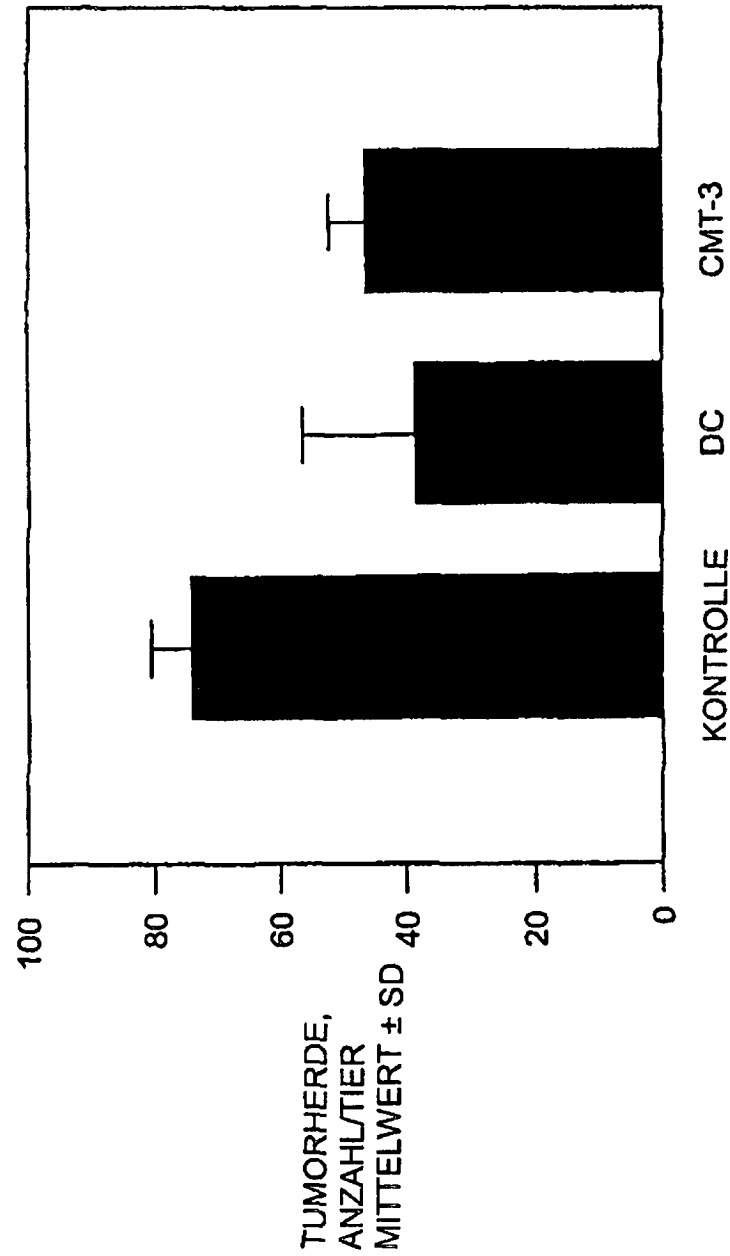


FIG-8

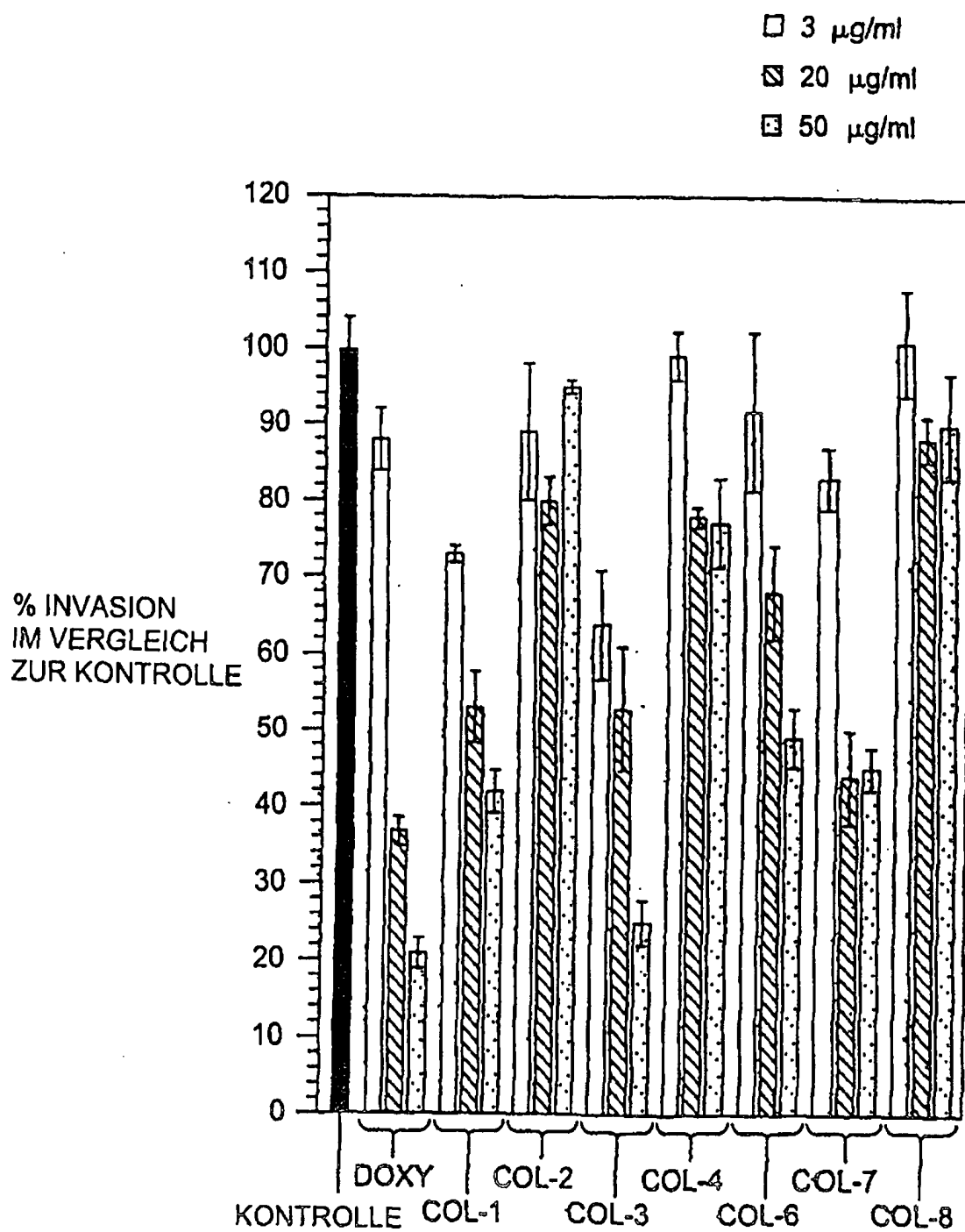


FIG-9A

EINFLÜSSE VON CMT-3 IM VERLAUF VON 3 TAGEN
PROSTATA-STROMAZELLEN: ALTER 37 JAHRE, CMT-3: 0, 10 und 20 μM

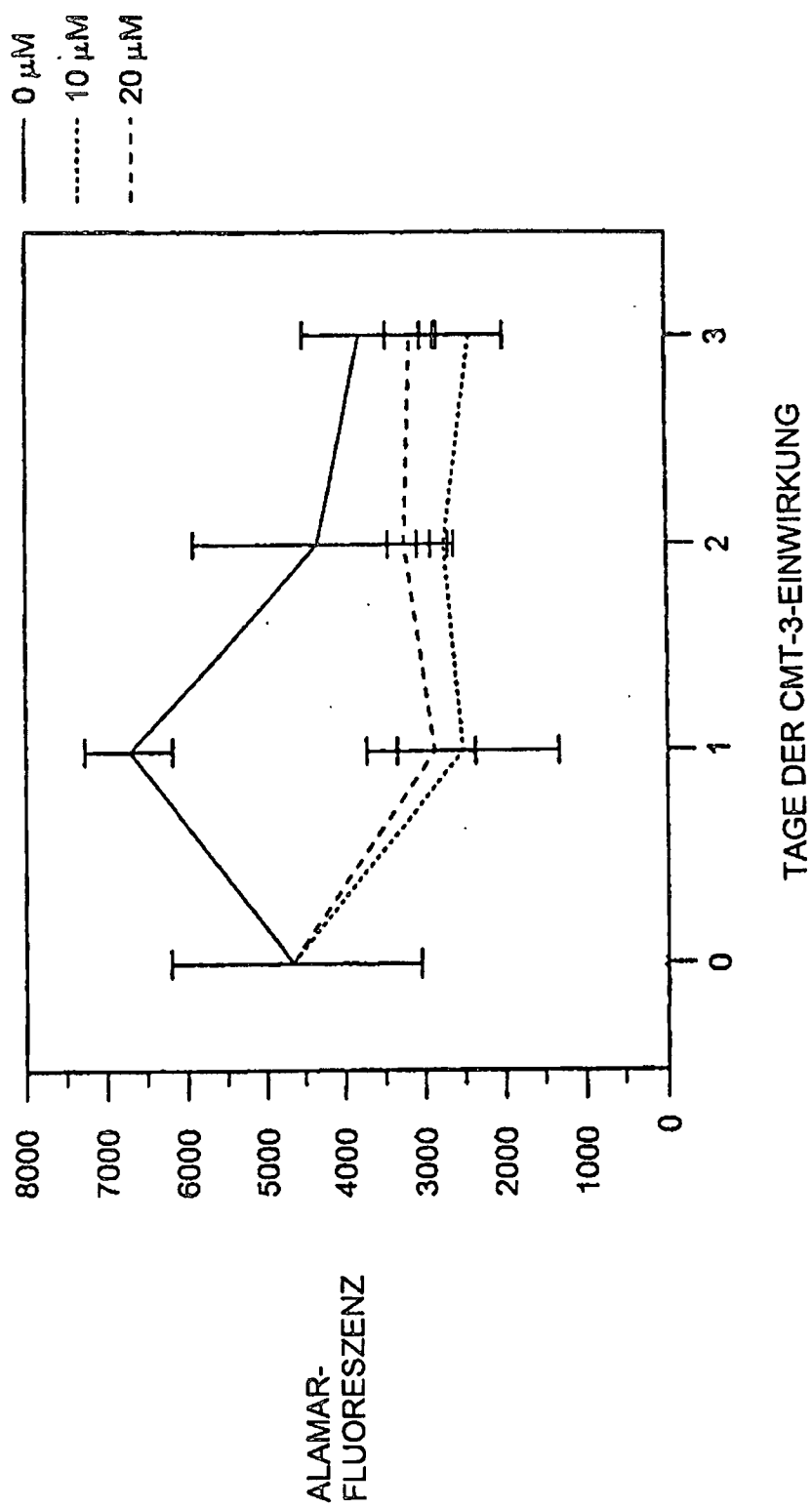


FIG-9B

EINFLÜSSE VON CMT-3 IM VERLAUF VON 3 TAGEN
PROSTATA-TUMOR: LnCap, CMT-3: 0, 10 und 20 μM

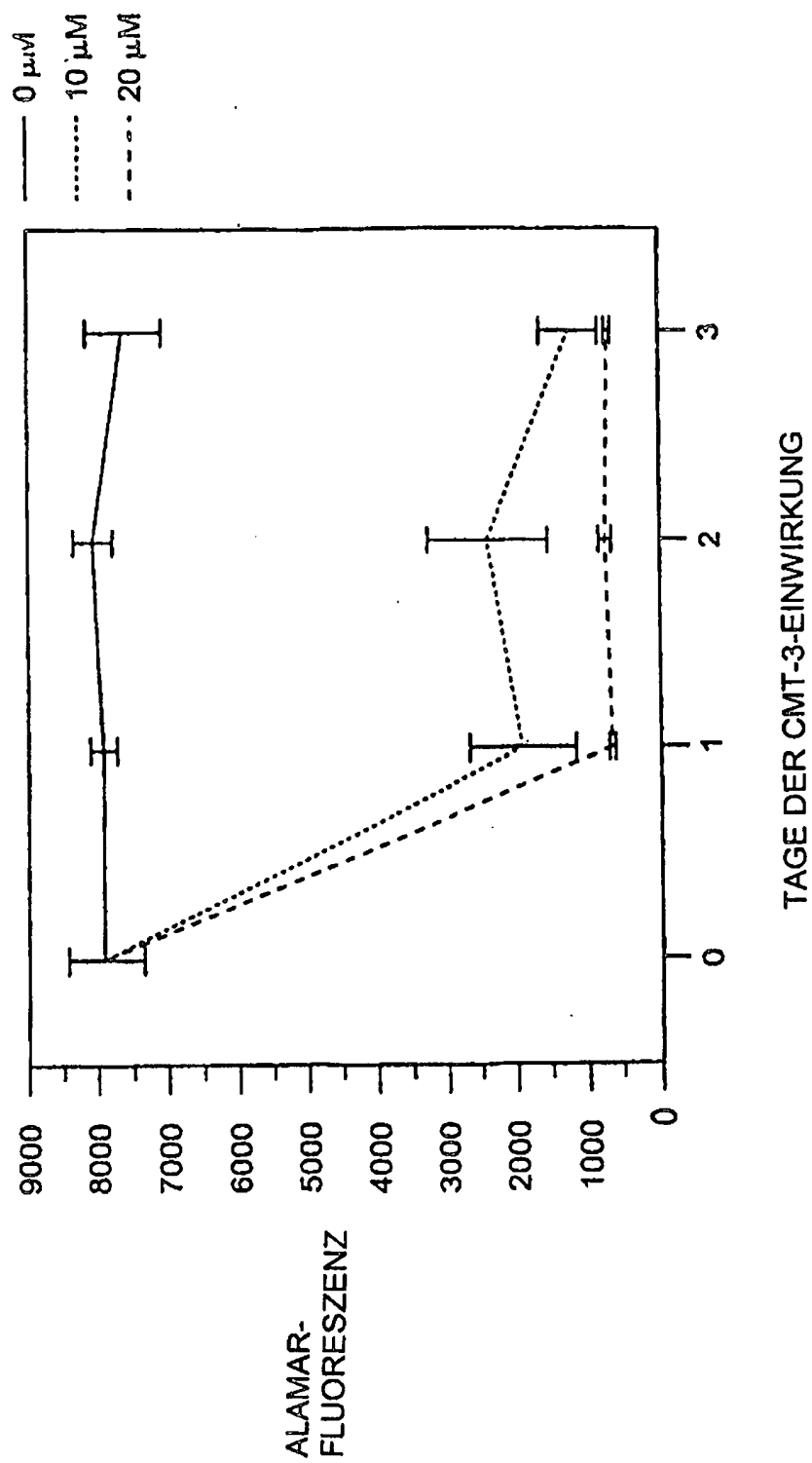


FIG-9C
EINFLÜSSE VON CMT-3 IM VERLAUF VON 3 TAGEN
PROSTATA-TUMOR: PC-3, CMT-3: 0, 10 und 20 µM

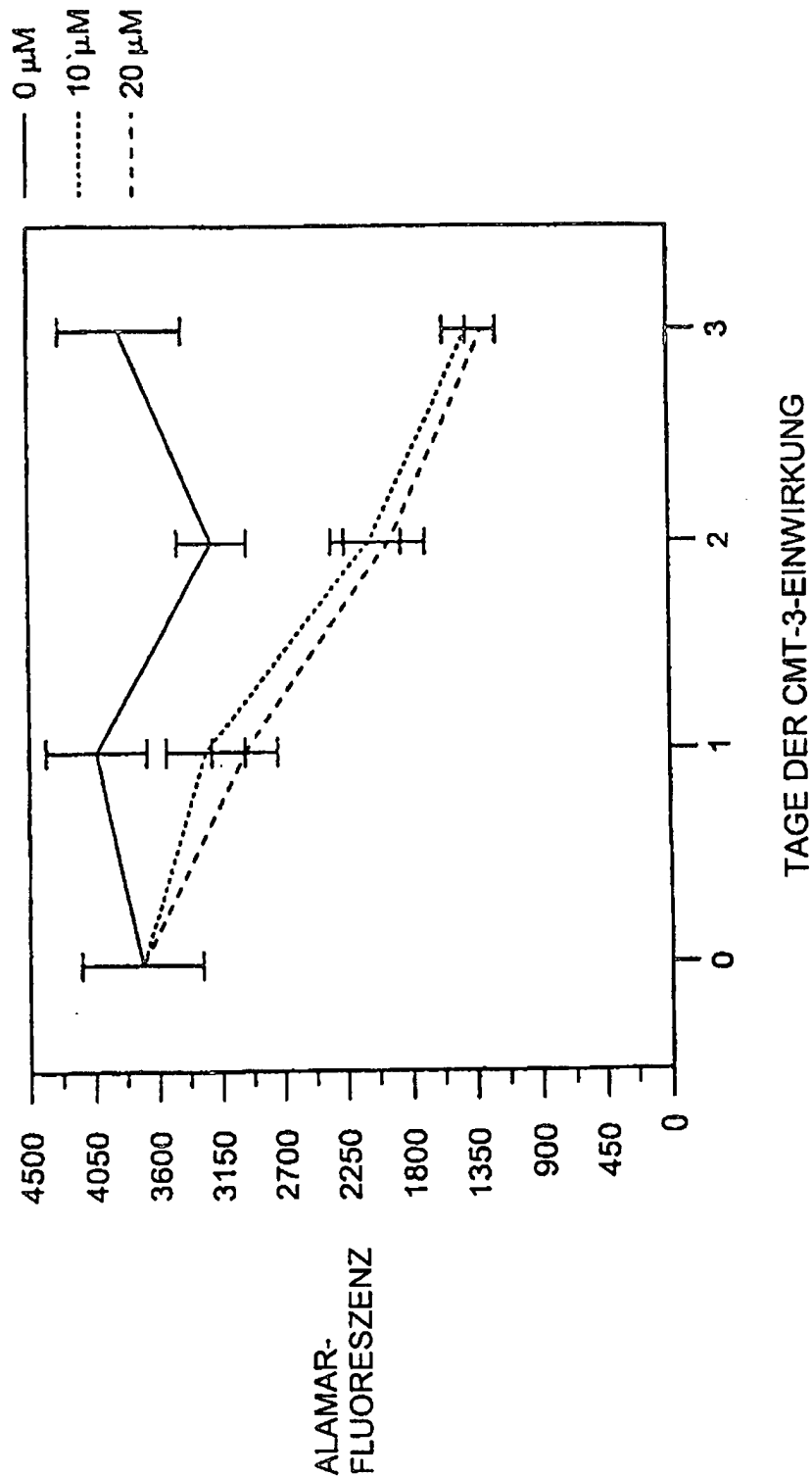


FIG-9D

EINFLÜSSE VON CMT-3 IM VERLAUF VON 3 TAGEN
PROSTATA-TUMOR: DU-145, CMT-3: 0, 10, 20 und 50 μM

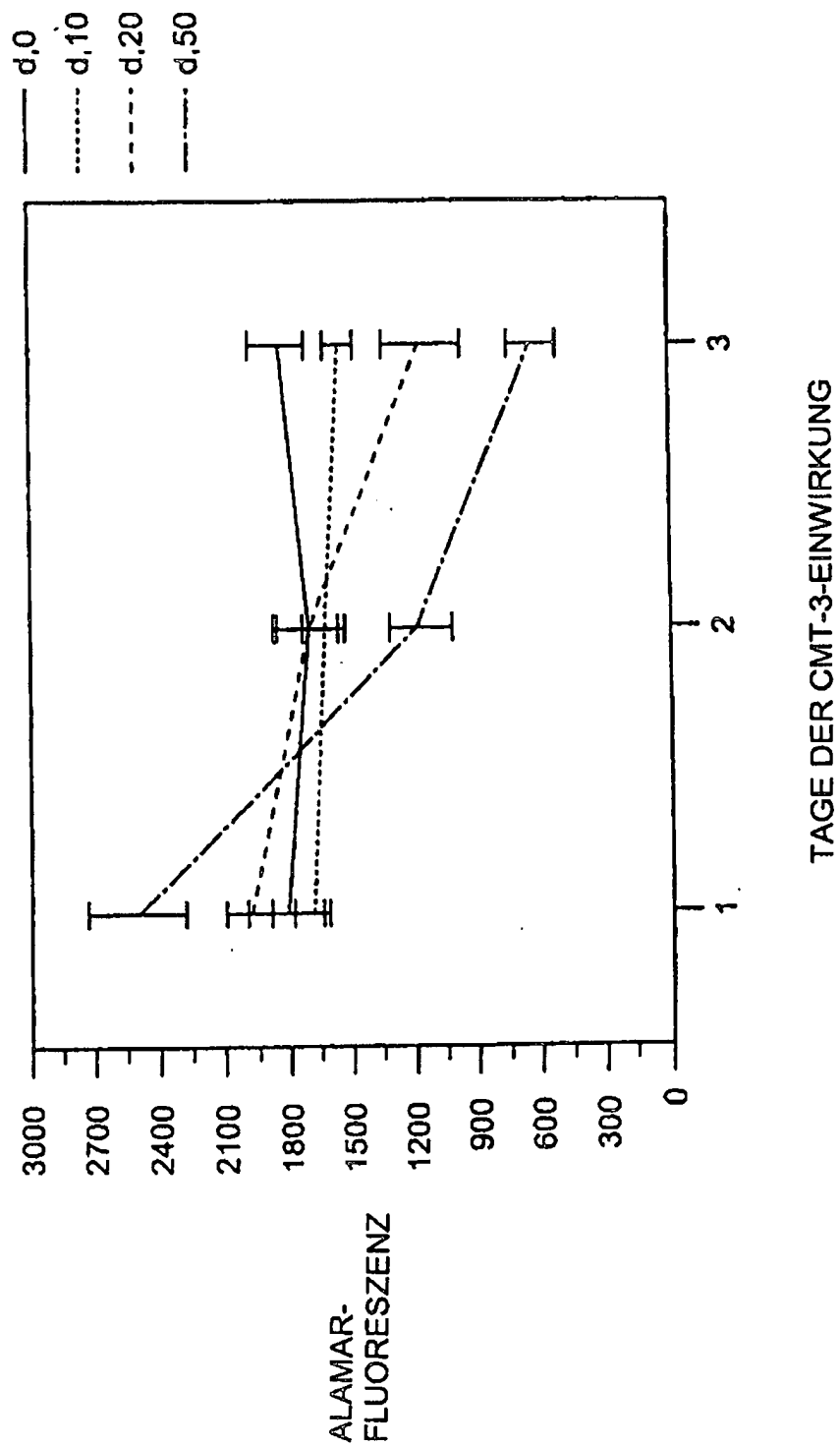


FIG-10A

CMT-3-INDUZIERTE APTOPOSE

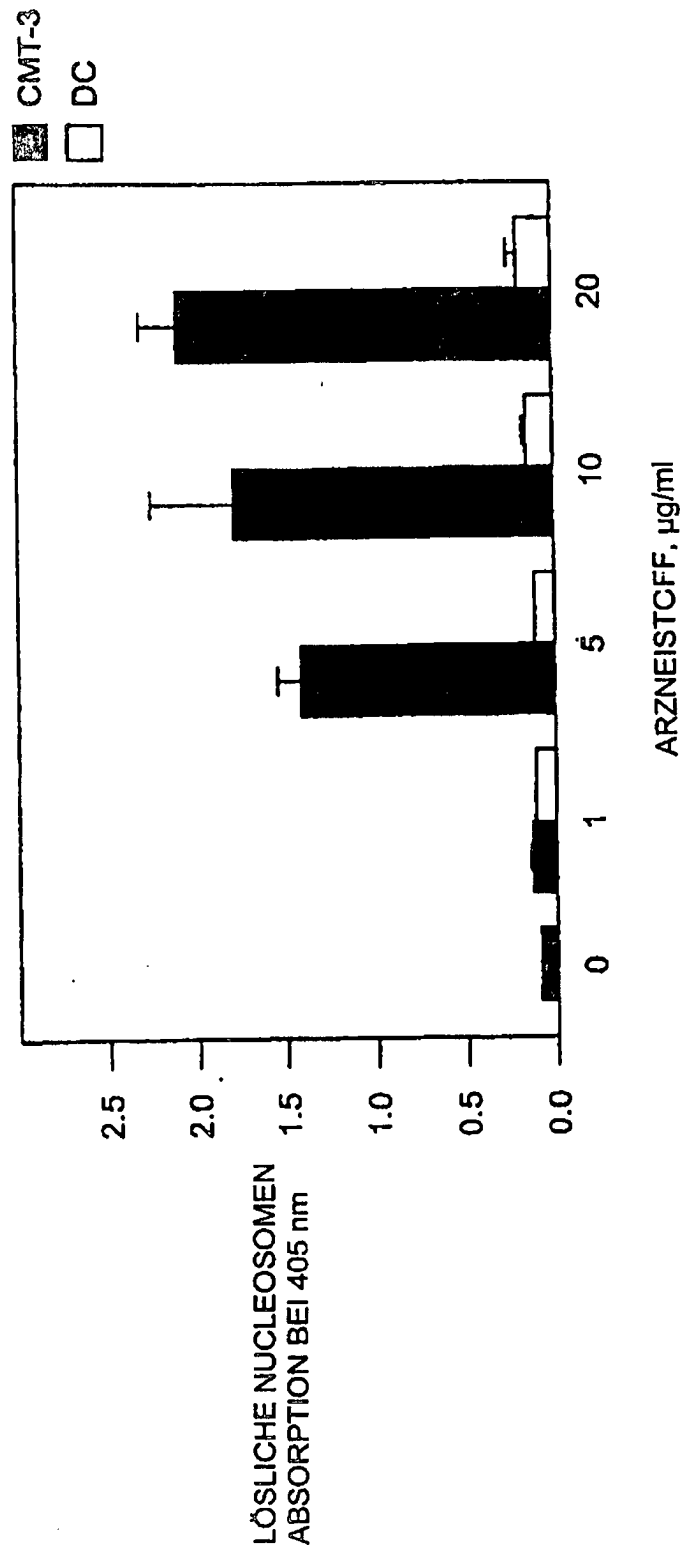


FIG-10B

CMT-3-INDUZIERTE APOPTOSE

