



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 13 666 T2** 2006.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 274 458 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 45/06** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 13 666.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/12169**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 926 985.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/078705**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.04.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **25.10.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **28.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(30) Unionspriorität:

**197103 P      12.04.2000      US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

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

(72) Erfinder:

**BROWN, M., Dennis, Menlo Park, US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN WELCHE EIN NAPHTHALMID UND EIN ANTIPROLIFERATIVES MITTEL  
ENTHALTEN**

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

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

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Das technische Gebiet der Erfindung ist die Verwendung von Naphthalimiden mit antiproliferativen Mitteln zur Behandlung eines Wirts mit einer Zellproliferationserkrankung.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** An der Anpassung der Wirksamkeit derzeit eingesetzter antiproliferativer Mittel, um das Ausmaß und die Dauer der Antitumorwirkungen herkömmlicher antineoplastischer Mittel zu erhöhen; besteht großes Interesse.

**[0003]** Herkömmliche antiproliferative Mittel, die bei der Behandlung von Krebs eingesetzt werden, werden ganz allgemein in (1) chemische Verbindungen, die sich durch Bindungen, Alkylierung, Auslösung von Strangbrüchen, Einschlebung zwischen Basenpaaren oder Beeinträchtigung von Enzymen, welche die Integrität und Funktion von DNA und RNA aufrechterhalten, auf die Integrität von Nucleinsäurepolymeren auswirken; und (2) chemische Stoffe, die an Proteine binden und so Enzymwirkung hemmen (z.B. Antimetabolite) oder die Funktion von Strukturproteinen, die für die Zellintegrität erforderlich sind, hemmen (z.B. Antitubulinstoffe) eingeteilt. Andere chemische Verbindungen, die sich bei der Behandlung einiger Krebsarten als nützlich herausgestellt haben, umfassen die Steroidhormonwirkung blockierenden Arzneimittel zur Behandlung von Brust- und Prostatakrebs, photochemisch aktivierte Mittel, Strahlensensibilisatoren und Protektoren.

**[0004]** Von besonderem Interesse für diese Erfindung sind Verbindungen, die sich direkt auf die Integrität der genetischen Struktur der Krebszellen auswirken. Nucleinsäurepolymere, wie z.B. DNA und RNA, sind die wichtigsten Ziele von Arzneimitteln gegen Krebs. Alkylierungsmittel, wie z.B. Stickstoff-Senfgase, Nitrosoharnstoffe, aziridinhaltige Verbindungen, greifen direkt DNA an. Koordinative Metallverbindungen, wie z.B. Cisplatin und Carboplatin, greifen auf ähnliche Weise direkt die Nucleinsäurestruktur an, was in Läsionen resultiert, die für die Zellen schwer zu reparieren sind, was wiederum zu Zelltod führen kann. Weitere sich auf die Nucleinsäure auswirkende Verbindungen umfassen Anthracyclinmoleküle, wie z.B. Doxorubicin, das sich zwischen die Nucleinsäure-Basenpaare von DNA-Polymeren einschlebt, Bleomycin, das zu Nucleinsäure-Strangbrüchen führt, "betrügerische" Nucleoside, wie z.B. Pyrimidin- und Purin-Nucleinsäureanaloge, die fälschlicherweise in Nucleinsäurepolymerstrukturen inkorporiert werden und schließlich zu frühzeitiger DNA-Kettentermination führen. Bestimmte Enzyme, die sich auf die Integrität und Funktionalität des Genoms auswirken, können ebenfalls durch spezifische chemische Wirkstoffe in Krebszellen gehemmt werden und zu Zelltod führen. Dazu gehören Enzyme, die sich auf die Ribonucleotidreductase (z.B. Hydroxyharnstoff, Gemcitabin), Topoisomerase I (z.B. Camptothecin) und Topoisomerase II (z.B. Etoposid) auswirken.

**[0005]** Eines der am meisten verwendeten, auf DNA ausgerichteten Arzneimittel gegen Krebs ist Cisplatin (cis-Diammindichlorplatin(II), CDDP). Diese Verbindung ist gegen mehrere menschliche Krebsarten wirksam, einschließlich Hodenkrebs, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Blasenkrebs, Zervikalkrebs und Tumoren im Kopf- und Halsbereich.

**[0006]** Obwohl die klinische Aktivität von derzeit genehmigten antiproliferativen Mitteln gegen viele Formen von Krebs nachgewiesen werden kann, wird noch immer nach Verbesserungen in Bezug auf Tumoransprechrate, Dauer der Reaktion und letztendlich Überlebensquote der Patienten gesucht. Die hierin beschriebene Erfindung zeigt eine neuartige Verwendung der Naphthalimide und von Analoga davon, einschließlich Amonafid, das die Antitumorwirkung der chemotherapeutischen Arzneimittel verstärken kann, insbesondere von Mitteln, die sich auf die Integrität von Nucleinsäurepolymeren, wie z.B. DNA, auswirken, auf.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0007]** Bereitgestellt werden, wie in den Ansprüchen dargelegt, Zusammensetzungen und ihre medizinische Verwendung bei der Behandlung von Zellproliferationserkrankungen, insbesondere Neoplasma.

**DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER FIGUREN**

**[0008]** [Fig. 1](#) zeigt die allgemeine Struktur eines Naphthalimidanalogs. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> stehen für Substitutionsgruppen. Dargestellt sind die Strukturen von R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> für das Naphthalimidanalogon Amonafid.

[0009] [Fig. 2](#) zeigt die Struktur des Naphthalimidanalogons Amonafid.

[0010] [Fig. 3](#) zeigt die Verzögerung des Tumorwachstums in Form des Tumolvolumens in Bezug auf die Tage nach der Behandlung mit dem Naphthalimidanalogon Amonafid gefolgt von CDDP oder CDDP alleine.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0011] Bereitgestellt werden Verfahren und Zusammensetzungen zur Behandlung eines Wirts mit einer Zellproliferationserkrankung, insbesondere einer Neoplasie. Bei den vorliegenden Verfahren wird ein pharmazeutisch annehmbares Naphthalimid verabreicht, vorzugsweise systemisch, und zwar zusammen mit einem antiproliferativen Mittel, um die Wirkung gegen Krebs zu verbessern. In einer bevorzugten Ausführungsform stellt das Naphthalimid eine Chemopotenziierungswirkung bereit.

[0012] Die Wirkstoffe werden in Mengen bereitgestellt, die ausreichen, um eine Zellproliferationserkrankung zu modulieren. In einer Ausführungsform umfasst die Modulation einer Zellproliferationserkrankung eine Verringerung des Tumorwachstums. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Modulation einer Erkrankung die Hemmung des Tumorwachstums. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Modulation einer Zellproliferationserkrankung eine Erhöhung der Tumorumfang-Vervielfachungszeit (siehe unten). In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Modulation einer Zellproliferationserkrankung eine Chemopotenziierungswirkung. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Modulation einer Erkrankung eine Chemosensibilisierungswirkung. In weiteren Ausführungsformen umfasst die Modulation einer Erkrankung Zytostase. In weiteren Ausführungsformen umfasst die Modulation einer Erkrankung eine zytotoxische Wirkung.

[0013] Ein chemischer Wirkstoff ist ein "Chemopotenziator", wenn er die Wirkung eines bekannten antiproliferativen Arzneimittels im Vergleich zur Aktivität des Chemopotenziators oder des antiproliferativen Mittels alleine mehr als nur auf additive Weise verstärkt. In manchen Fällen kann eine "Chemosensibilisierungswirkung" beobachtet werden. Diese ist als Wirkung der Verwendung eines Mittels definiert, das alleine keine signifikante Antitumorwirkung aufweisen würde, die Antitumorwirkung eines antiproliferativen Mittels im Vergleich zur Verwendung des antiproliferativen Mittels alleine aber mehr als auf nur additive Weise verstärken würde.

[0014] Der Begriff "Naphthalimid" umfasst hierin alle Mitglieder dieser chemischen Familie, einschließlich Benzisochinolinindion und Analoga davon. Die Naphthalimidfamilie ist durch die in [Fig. 1](#) abgebildete chemische Struktur definiert.

[0015] Ein Naphthalimidanalogon ist weiter durch Substituentenveränderungen in  $R_1$  und  $R_2$  ([Fig. 1](#)) definiert, nicht jedoch auf diese eingeschränkt. Beispiele für  $R_1$  und  $R_2$  umfassen jene, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. In einer bevorzugten Ausführungsform weist ein Naphthalimidanalogon die Struktur von Amonafid auf, die in [Fig. 2](#) zu sehen ist.

Tabelle 1

Gruppe	Substitution	Länge
$R_1$	Alkyl	$C_1 \rightarrow C_5$
	Amino	
	Nitro	
	Cyano	
	Alkoxy	$OC_1 \rightarrow OC_5$
	Wasserstoff	
$R_2$	Alkyl	$C_1 \rightarrow C_5$

[0016] Ein Naphthalimidanalogon stellt eine weitere chemische Verfeinerung dar. Ein spezifisches Beispiel für ein Naphthalimidanalogon ist Amonafid, das auch unter den folgenden chemischen Synonymen bekannt ist: Nafidamid; Benzisochinolinindion; 5-Amino-2-[(dimethylamin)ethyl]-1H-benz[de-]isochinolin-1,3-(2H)-dion ([Fig. 2](#)).

[0017] Antiproliferative Verbindungen sind hierin Verbindungen, die Zytostase oder Zytotoxizität auslösen.

"Zytostase" ist die Hemmung des Wachstums von Zellen, während "Zytotoxizität" als Tötung von Zellen definiert ist.

**[0018]** Spezifische Beispiele für antiproliferative Mittel umfassen: Antimetabolite, wie z.B. Methotrexat, 5-Fluoruracil, Gemcitabin, Cytarabin, Pentostatin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, L-Asparaginase, Hydroxyharnstoff, N-Phosphonoacetyl-L-asparat (PALA), Fludarabin, 2-Chlordesoxyadenosin und Floxuridin; Strukturproteinmittel, wie z.B. die Vincaalkaloide, einschließlich Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinorelbin, Paclitaxel und Colchizin; Mittel, die auf NF-κB wirken, wie z.B. Curcumin und Parthenolid; Mittel, die auf die Proteinsynthese wirken, wie z.B. Homoharringtonin; Antibiotika, wie z.B. Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Bleomycine, Plicamycin und Mitomycin; Hormonantagonisten, wie z.B. Tamoxifen und Analoga des Luteinisierenden Hormons (LNRH); Nucleinsäureschädigungsmittel, wie z.B. die Alkylierungsmittel Mechlorethamin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Chlorambucil, Dacarbazin, Methylnitrosourea, Semustin (Methyl-CCNU), Chlorzotocin, Busulfan, Procarbazine, Melphalan, Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) und Thiotepa, die interkalierenden Mittel Doxorubicin, Dactinomycin, Daunorubicin und Mitoxantron, die Topoisomeraseinhibitoren Etoposid, Camptothecin und Teniposid und die koordinativen Metallkomplexe Cisplatin und Carboplatin.

**[0019]** Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung.

#### Beispiel 1

##### Chemopotenzierung von Cisplatin durch Amonafid

**[0020]** Experimentelle transplantierbare Mäusefibrosarkome ( $2 \times 10^5$  RIF-1-Zellen) wurden intradermal in den Flanken von 3 Monate alten weiblichen C3H-Mäusen (Charles River, Holister, CA, USA) gezüchtet. Als die Tumoren ein Volumen von etwa  $100 \text{ mm}^3$  erreichten, wurden die Mäuse zufällig in Versuchsgruppen (4 Mäuse pro Gruppe) eingeteilt.

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

Tabelle 2

Wirkstoff	Dosis	Lösungsmittel	Lieferant
Amonafid	50 mg/kg	DMSO	NCI
Cisplatin	4 mg/kg	Wasser für Injektionszwecke	David Bull Labs

**[0022]** Der Chemopotenziator Amonafid wurde vom NCI bezogen und in DMSO zur geeigneten Konzentration verdünnt. Cisplatin (David Bull Laboratories – Mulgrave, Australien, Charge 5201844x) wurde mit Wasser für Injektionszwecke auf die geeignete Konzentration gebracht. Die Zusammensetzungen wurden systemisch (d.h. intraperitoneal, i.p.) injiziert, und zwar in einem Volumen von 100 Mikroliter. Für die Behandlung der Gruppe 3 wurde der Chemopotenziator Amonafid 30 Minuten vor der Injektion von Cisplatin injiziert. Nach der Behandlung wurde das Wachstum der Tumoren dreimal pro Woche durch Messung von drei senkrechten Durchmesser des Tumors mithilfe einer Schieblehre und Berechnung des Tumolvolumens durch die folgende Formel überwacht:

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

worin  $D_{1-3}$  in mm angegeben sind.

**[0023]** Die Tumoren wurden überwacht, bis sie eine Größe erreichten, die vier Mal ihrem Volumen am Tag Null der Behandlung (TWZ) entsprach, oder bis zu 30 Tagen nach der Behandlung, was zuerst eintrat. Die Daten sind als Mittelwert der "Tumolvolumen-Vervierfachsungszeit" (TWZ) und als "Verzögerung" angegeben. Die mittlere TWZ ist die durchschnittliche Anzahl an Tagen, die einzelne Tumoren brauchen, um das Vierfache des Tumolvolumens vom ersten Behandlungstag zu erreichen. Die "Verzögerung" ist die durchschnittliche Anzahl an Tagen, die ein Tumor braucht, um das Vierfache der mittleren Größe der Behandlungsgruppe zu erreichen, minus der durchschnittlichen Anzahl an Tagen, die erforderlich sind, um das Vierfache der mittleren Größe der Kontrollgruppe zu erreichen. Die Daten sind außerdem als Verhältnis zwischen der Tumolvolumen-Vervierfachsungszeit des behandelten Tumors und jener der unbehandelten Kontrollgruppe (TWZ:KTWZ) angegeben. Steigende Werte dieses Verhältnisses weisen auf erhöhte Antitumorantwort hin.

**[0024]** Die Daten sind in der nachstehenden Tabelle 3 und in [Fig. 2](#) dargelegt.

Tabelle 3

Gruppe	Behandlung	Dosis (mg/kg)	mittlere TVVZ $\pm \sigma$	TVVZ:KTVVZ	Mittel (TVVZ)	Verzögerung (Tage)
1	unbehandelte Kontrolle	-	6,3 $\pm$ 0,3	1,0	6	0,00
2	Amonafid	50	9,7 $\pm$ 0,6	1,5	9,0	2,94
3	Amonafid $\Rightarrow$ Cisplatin	50 $\Rightarrow$ 4	17,9	2,8	17,9	11,81
4	Cisplatin	4	8,4 $\pm$ 0,3	1,3	8,1	2,10

**[0025]** Der Pfeil ( $\Rightarrow$ ) in Gruppe 3 weist auf eine Verabreichung 30 Minuten nach der Verabreichung von Amonafid hin.

**[0026]** Die Ergebnisse aus Tabelle 3 zeigen, dass im Vergleich zur Verwendung von Cisplatin alleine (Gruppe 4) oder Amonafid alleine (Gruppe 2) die antiproliferative Aktivität von Cisplatin durch die Verwendung des Chemopotenziators Amonafid gefördert wird, und zwar stärker als nur auf additive Weise, wenn beide Verbindungen zur Behandlung der tumortragenden Mäuse (Gruppe 3) verwendet wurden.

## Beispiel 2

Wirkung von Amonafid alleine und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika auf das RIF-1-Tumorstwachstum in C3H-Mäusen

**[0027]** Das RIF-1-Mäusefibrosarkomtumormodell wurde verwendet, um die Antitumoraktivität von Amonafid alleine und in Kombination mit verschiedenen antiproliferativen Mitteln zu beurteilen. Die verwendeten antiproliferativen Mittel umfassen solche, die auf die Nucleinsäure-(z.B. DNA-)Integrität wirken (z.B. Cisplatin, Etoposid, 5-Fluoruracil), Mittel, welche die Struktur- oder Zytoplasmaproteine oder ihre Synthese beeinträchtigen (z.B. Homoharringtonin, Paclitaxel, Vinblastin, Colchizin, Curcumin oder Parthenolid).

**[0028]** Amonafid-NCI wurde vom NCI in Form eines Pulvers erhalten. Amonafid-Penta wurde von Penta Biotech (Union City, CA, USA), Charge Nr. 039-01, in Form eines Pulvers erhalten. Cisplatin für Injektionszwecke, USP, wurde von David Bull's Labs (Mulgrave, Australien), Charge Nr. 5201844x, in Form eines gefriergetrockneten Pulvers erhalten. Paclitaxel wurde von Bristol Myers Squibb Co. (Princeton, NJ, USA), Charge Nr. 9J16241, Ablauf Sep. 2001, vorverdünnt auf 6 mg/ml in Cremaphor/EL, erhalten. Vinblastin wurde von Bedford Labs (Bedford, OH, USA), Charge Nr. 112647, in Form eines gefriergetrockneten Pulvers erhalten. Etoposid wurde von Pharmacia (Kalamazoo, MI, USA), Charge Nr. ETA013, Ablauf 5/99, in Form einer auf 20 mg/ml vorverdünnten Flüssigkeit erhalten. 5-Fluoruracil wurde von Pharmacia (Kalamazoo, MI, USA), Charge Nr. FFA191, Ablauf 7/00, in Form einer auf 50 mg/ml vorverdünnten Flüssigkeit erhalten. Curcumin wurde von Sigma (St. Louis, MO, USA), Charge Nr. 69H3457, bezogen. Parthenolid wurde von Tocris (Ballwin, MO, USA), Charge Nr. 7/18089, bezogen. DMSO wurde von Sigma (St. Louis, MO, USA), Charge Nr. 80K3695, bezogen. 0,9% Natriumchlorid für Injektionszwecke, USP, (Kochsalzlösung) wurde von Abbott Laboratories (Charge Nr. 55-199-DK) hergestellt.

**[0029]** Steriles Wasser für Injektionszwecke, USP, (WFI) wurde von Lyphomed, Inc., (Charge Nr. 390849) hergestellt.

**[0030]** Formulierungen: Die Testpräparate (Behandlungsgruppen) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**[0031]** Zur Herstellung der Formulierung 1 und 2 wurde Amonafid in Phiolen gewogen und zu 12,5 mg/ml in DMSO gelöst.

**[0032]** Für Formulierung 3 wurde Amonafid in Phiolen gewogen und in einer Kochsalzlösung gelöst.

- [0033]** Für Formulierung 4 wurde der Inhalt einer 10-mg-Phiole von gefriergetrocknetem CDDP (Cisplatin für Injektionszwecke) mit 10 ml WFI resuspendiert, um eine 1-mg/ml-CDDP-Suspension herzustellen.
- [0034]** Für Formulierung 5 wurde Paclitaxel, das in Cremaphor/EL und wasserfreiem Alkohol auf 6 mg/ml vorverdünnt war, weiter mit WFI auf 3,3 mg/ml verdünnt.
- [0035]** Formulierung 6 wurde hergestellt, indem 0,9% Natriumchlorid für Injektionszwecke zu einer Phiole mit 10 mg gefriergetrocknetem Vinblastin-Pulver zugesetzt wurde.
- [0036]** Die Formulierungen 7–10 wurden hergestellt, indem die geeignete Menge der einzelnen Teststoffe in einer Kochsalzlösung verdünnt wurden (7–2,5 mg/ml Etoposid, 8–7,5 mg/ml 5-Fluoruracil, 9–3,75 mg/ml 5-Fluoruracil, 10–2,5 mg/ml Colchizin).
- [0037]** Formulierung 11 war unverdünntes HHT-Clin, das so wie es erhalten wurde verwendet wurde.
- [0038]** Die Formulierungen 12 und 13 wurden hergestellt, indem die geeignete Menge der einzelnen Teststoffe in DMSO verdünnt wurde (12–6,25 mg/ml Curcumin und 13–5 mg/ml Parthenolid).
- [0039]** Tiere: Etwa 3 Monate alte, weibliche C3H-Mäuse (Charles River Laboratories, Holister, CA, USA) wurden für die Studie verwendet. Ihr mittleres Körpergewicht betrug etwa 25 g. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Zyklus in Isolationskäfigen gehalten. Futter und Wasser standen frei zur Verfügung.
- [0040]** Tumoren: Die RIF-1-Mäusefibrosarkom-Zelllinie wurde bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> in einer In-vitro-Kultur gehalten (Waymouth-Medium, ergänzt mit 20% fötalem Rinderserum). RIF-1-Zellen der log-Phase wurden trypsinisiert und aus den Zellkulturkolben entnommen, um eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten, und jeder Maus dann intradermal in einem Volumen von 50 µl (entspricht  $2 \times 10^5$  Zellen pro Injektion) in beide Flanken injiziert. Neun Tage später, als die Tumoren eine Größe von etwa 100 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Tiere zufällig in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt.
- [0041]** Behandlungsgruppen: Die Behandlungsgruppen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Vier bis fünf Tiere wurden jeder Gruppe zugeordnet. Das intraperitoneale Injektionsvolumen betrug 100 µl. Das orale Verabreichungsvolumen betrug 100 µl. Kombinationsbehandlungen unter Verwendung von zwei Teststoffen wurden als zwei separate Injektionen verabreicht, wobei die zweite direkt nach der ersten oder 30 Minuten später verabreicht wurde.
- [0042]** Beurteilung der Verzögerung des Tumorwachstums: Die Tumoren wurden bis zu 22 Tage lang dreimal wöchentlich mit einer Vernier-Schieblehre gemessen. Das Tumolvolumen (Kubikmillimeter, mm<sup>3</sup>) wurde mithilfe der folgenden Formel berechnet:
- $$V = \pi/6 \times D_1 \times D_2 \times D_3,$$
- worin D<sub>1,3</sub> in Millimeter (mm) gemessene senkrechte Durchmesser sind.
- [0043]** Die Tumolvolumen-Vervierfachungszeit (TWZ), die als Zeit definiert ist, die ein Tumor braucht, um das Vierfache (4×) seines Anfangsvolumens (zu Beginn der Behandlung) zu erreichen, stellte den Studienendpunkt dar. Die TWZ wurde für jede Behandlungsgruppe bestimmt und wird in Tagen als Mittel ± Standardabweichung (σ) ausgedrückt.
- [0044]** Antitumoraktivität oder Modulation des Tumorwachstums (gemessen durch verzögertes Tumorwachstum, d.h. erhöhte TWZ-Werte) aufgrund von Amonafid, das als einziger Wirkstoff oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht wurde, sind in Tabelle 5 zusammengefasst.
- [0045]** Ergebnisse aus fünf unabhängigen Versuchen sind in diese Studie eingebunden. Unbehandelte Kontrolltiere wiesen eine Vervierfachung der Größe in durchschnittlich 7,0 Tagen auf. Die intraperitoneale Verabreichung von Amonafid-NCl, das in DMSO in einer Menge von 50 mg/kg formuliert war, wies eine TWZ von 9,7 Tagen auf. Eine weitere intraperitoneale Verabreichung von CDDP verlängerte die mittlere TWZ weiter auf 17,9 Tage. Die intraperitoneale Verabreichung von Amonafid-Penta, das in DMSO in einer Menge von 50 mg/kg formuliert war, wies eine TWZ von 9,3 Tagen auf. Während Paclitaxel (10 mg/kg) alleine eine TWZ von 7,9 Tagen aufwies, verlängerte der Zusatz von Amonafid (50 mg/kg) die TWZ auf 9,8 Tage.

**[0046]** Amonafid-Penta, das in einer Kochsalzlösung in einer Menge von 30 mg/kg formuliert war, wurde für den Rest der Kombinationsstudien verwendet.

**[0047]** Bei 30 mg/kg wies Amonafid eine mittlere TWZ von 7,3 Tagen auf. Die kombinierte Verabreichung von Cisplatin (4 mg/kg) und Amonafid (30 mg/kg) ergab eine TWZ von 11,0 Tagen, die somit länger war als die von Amonafid (TWZ = 7,3 Tage) oder Cisplatin (TWZ = 9,2 Tage) alleine.

**[0048]** Die Verabreichung von Amonafid (30 mg/kg) in Kombination mit 5-Fluoruracil (30 mg/kg) ergab eine TWZ von 20,2 Tagen, im Vergleich zu 13,6 Tagen für 5-Fluoruracil alleine. Bei einer Dosis von 15 mg/kg ergab 5-Fluoruracil eine TWZ von 6,7 Tagen, im Vergleich zu 7,7 Tagen, wenn es mit 30 mg/kg Amonafid kombiniert wurde. Die kombinierte Verabreichung von Amonafid (30 mg/kg) und Vinblastin (2 mg/kg) ergab eine TWZ von 9,5 Tagen, in Vergleich zu 8,6 Tagen bei Vinblastin alleine. Die kombinierte Verabreichung von Amonafid (30 mg/kg) und Homoharringtonin (4 mg/kg) ergab eine TWZ von 10,2 Tagen, im Vergleich zu 8,5 bei Homoharringtonin alleine. Amonafid in Kombination mit Etoposid (10 mg/kg) ergab eine TWZ von 8,5 Tagen, was der TWZ für Etoposid alleine entsprach. Kombinationen von Amonafid mit Curcumin oder Parthenolid ergaben TWZ von 8,2 Tagen bzw. 7,6 Tagen, was weniger war als bei Curcumin (TWZ = 9,7 Tage) oder Parthenolid (TWZ = 8,5 Tage) als einzige Wirkstoffe.

**[0049]** Die orale Verabreichung von Colchizin (10 mg/kg) ergab eine TWZ von 6,3 Tagen. Amonafid in Kombination mit Colchizin erhöhte die TWZ auf 7,1 Tage.

**[0050]** In einigen Gruppen starben Tiere: Zwei von vier Mäusen starben nach der Behandlung mit Amonafid-NCI, das in DMSO in einer Menge von 12,5 mg/ml formuliert war.

**[0051]** Zusammengefasst führte die intraperitoneale Verabreichung von Amonafid zu Antitumoraktivität im RIF-1-Mäusefibrosarkom-Tumormodell. Die intraperitoneale Verabreichung von Amonafid in Kombination mit Cisplatin, Paclitaxel, Vinblastin, 5-Fluoruracil und Homoharringtonin wies höhere Antitumoraktivitätswerte auf als die von Amonafid oder der Teststoffe alleine. Die besten kombinatorischen Aktivitäten traten bei Cisplatin, 5-Fluoruracil und Homoharringtonin auf. Amonafid in Kombination mit Colchizin ergab geringere Antitumoraktivität als Amonafid alleine. Amonafid in Kombination mit Etoposid, Curcumin oder Parthenolid war stärker als Amonafid alleine, aber schwächer als die Teststoffe alleine.

Tabelle 4

## Zusammenfassung der Behandlungsgruppen

Formulierung	Behandlung	Konzentration (mg/ml)	Verabreichungs- weg	Injektions- volumen (µl)
1	Amonafid-NCI in DMSO	12,5	IP	100
2	Amonafid-Penta in DMSO	12,5	IP	100
3	Amonafid-Penta in Kochsalzlösung	7,5	IP	100
4	CDDP in WFI	1	IP	100
5	Paclitaxel in WFI	2,5	IP	100
6	Vinblastin in Kochsalz- lösung	0,5	IP	100
7	Etoposid in Kochsalz- lösung	2,5	IP	100
8	5-Fluoruracil in Koch- salzlösung	3,75	IP	100
9	5-Fluoruracil in Koch- salzlösung	7,5	IP	100
10	Colchizin in Kochsalz- lösung	2,5	PO	100
11	HHT-Clin in WFI	1	IP	100
12	Curcumin in DMSO	6,25	IP	100
13	Parthenolid in DMSO	5	IP	100



Tabelle 5

Wirkung von Amonafid und Amonafid in Kombination mit anderen Chemotherapeutika auf das RIF-1-Tumorstadium in C3H-Mäusen

Gruppe	Behandlung	Arzneimitteldosis (mg/kg)	Verabreichungsweg	Anzahl an Tumoren	TVVZ
1	unbehandelte Kontrolle	-	-	40	7,0 ± 0,2
2	Amonafid-NCI/DMSO	50	IP	8	9,7 ± 0,6
3	Amonafid-Penta/DMSO	50	IP	8	9,3 ± 0,3
4	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung	30	IP	12	7,3 ± 0,2
5	Cisplatin/WFI	4	IP	16	9,2 ± 0,4
6	Paclitaxel/Cremaphor EL	10	IP	8	7,9 ± 0,3
7	Vinblastin/Kochsalzlösung	2	IP	8	8,6 ± 0,4
8	Etoposid/Kochsalzlösung	10	IP	8	8,5 ± 0,5
9	Fluoruracil/ Kochsalzlösung	15	IP	8	6,7 ± 0,4
10	Flururacil/Kochsalzlösung	30	IP	8	13,6 ± 1,9
11	Homoharringtonin/WFI	4	IP	8	8,5 ± 0,5
11	Colchizin/Kochsalzlösung	10	PO	8	6,3 ± 0,3
12	Curcumin/DMSO	25	IP	8	9,7 ± 1,1
13	Parthenolid/DMSO	20	IP	8	8,5 ± 0,8
14	Amonafid-NCI/DMSO-30- CDDP/WFI	50,4	IP, IP	4	17,9 ± 0,4
15	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung-10s- CDDP/WFI	30,4	IP, IP	8	11,0 ± 0,4
16	Amonafid-Penta/DMSO-10s- Paclitaxel/Cremaphor EL	30/10	IP, IP	8	9,8 ± 0,4
17	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung-10s- Vinblastin/Kochsalzlösung	30,2	IP, IP	8	9,5 ± 1,1

18	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung-10s- Etoposid/Kochsalzlösung	30,10	IP, IP	8	8,5 ± 0,9
19	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung-10s- 5-Fluoruracil/Kochsalzlösung	30,15	IP, IP	8	7,7 ± 0,8
20	Amonafid-Penta/ Kochsalzlösung-10s- 5-Fluoruracil/ Kochsalzlösung	30,30	IP, IP	8	20,2 ± 1,0
21	Amonafid/WFI-10s- HHT-Clin/WFI	30,4	IP, IP	8	10,2 ± 0,5
22	Amonafid-Penta/ Kochsalzlö- sung-10s-Colchizin/WFI	30,10	IP, PO	8	7,1 ± 0,3
23	Amonafid-Penta/ Kochsal- zlösung-10s-Curcumin	30/25	IP, IP	8	8,2 ± 0,2
24	Amonafid-Penta/ Kochsal- zlösung-10s-Parthenolid	30/20	IP, IP	8	7,6 ± 0,3

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Amonafids und eines antiproliferativen Mittels bei der Formulierung eines Medikaments zur Behandlung einer Zellproliferationserkrankung, worin das antiproliferative Mittel Cisplatin, Paclitaxel, Vinblastin oder 5-Fluoruracil umfasst und worin die Behandlung mit dem Amonafid und dem antiproliferativen Mittel bei der Behandlung der Zellproliferationserkrankung wirksamer ist als das Amonafid oder das antiproliferative Mittel alleine.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Formulierung ein Amonafid-Medikament und ein antiproliferatives Medikament umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Zellproliferationserkrankung ein solider Tumor ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Medikament das Tumorwachstum verringert.

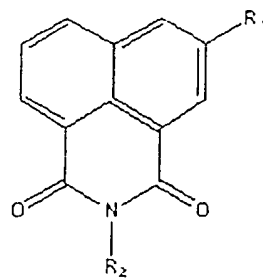
5. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Medikament das Tumorwachstum hemmt.

6. Verwendung nach Anspruch 3, worin das Medikament die Tumolvolumen-Vervierfachungszeit erhöht.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Amonafid und ein antiproliferatives Mittel, worin das antiproliferative Mittel Cisplatin, Paclitaxel, Vinblastin oder 5-Fluoruracil umfasst.

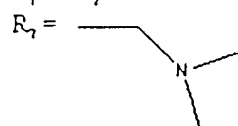
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

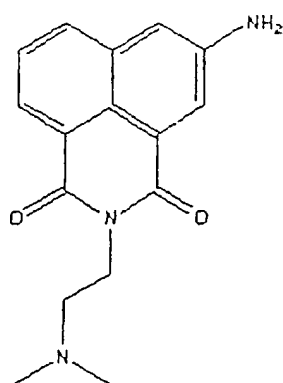


Amonafid:

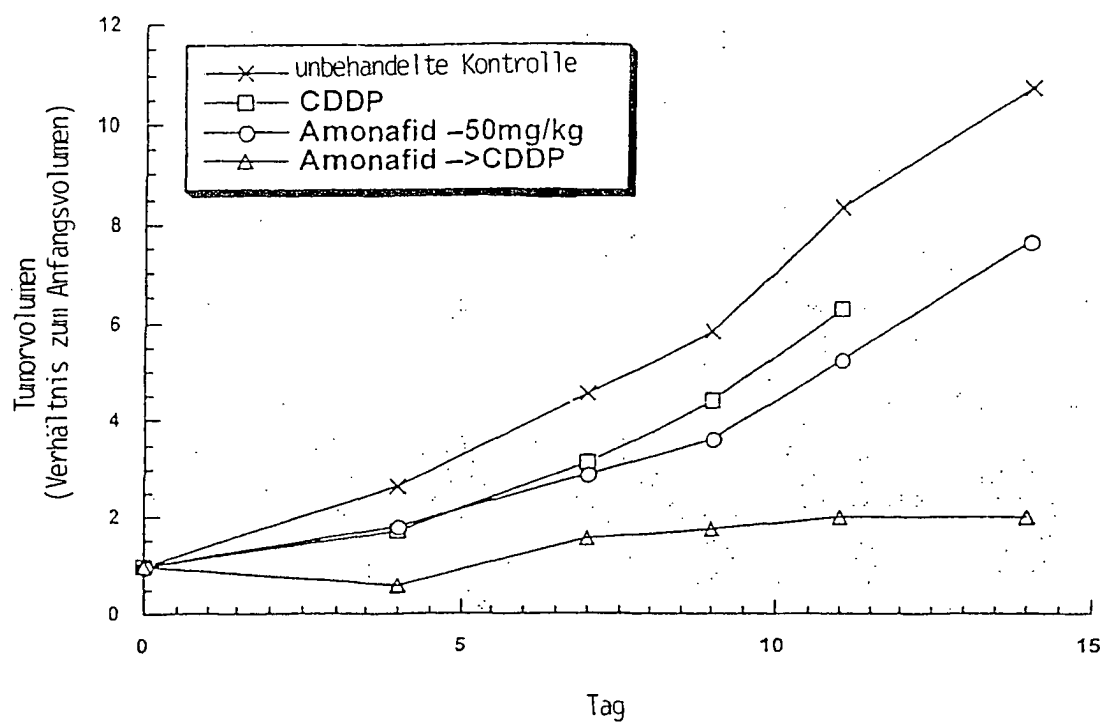
$R_1 = \text{NH}_2$



Figur 1



Figur 2



Figur 3