



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 414 B**

(12)

## PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 9008/94  
HU94/00049  
(22) Anmeldetag: 08.11.1994  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.04.2001  
(45) Ausgabetag: 26.11.2001

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61K 31/185**  
A61K 31/375, 31/70, 31/19, 31/525,  
31/4415, A61P 35/00

(30) Priorität:  
09.11.1993 HU 9303171 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:  
EP 0178602A2 EP 0347714A2 EP 0567433A1  
EP 0100022A1 EP 0220537A1 DE 2021969A  
WO 86/02555A2 GB 931921A FR 2201879  
FR 2244468A1 CH 642541A5

(73) Patentinhaber:  
IMMUNAL KFT.  
H-1055 BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:  
KULCSAR GYULA  
PECS (HU).

(54) PHARMAZEUTISCHE KOMPOSITIONEN ZUM VORBEUGEN UND HEILEN VON  
KREBSERKRANKUNGEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Komposition zur Herstellung eines Medikaments zum Vorbeugen und Heilen von Krebserkrankungen, welche Komposition von den im Kreislauf vorkommenden Verbindungen wenigstens drei enthält: wenigstens eine Aminosäure, wenigstens ein Vitamin und wenigstens eine von den folgenden Verbindungen: Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintri-phosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze der aufgeführten Stoffe.

Die Kompositionen können ohne toxische Effekte zum Vorbeugen gegen Krebserkrankungen, zur Verhinderung der Tumorbildung bei AIDS und Transplantationen, zur Hemmung der Metastasenbildung und zur direkten, adjuvanten oder kombinierten Behandlung und Heilung von Krebserkrankungen verwendet werden.

**AT 408 414 B**

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Komposition zur Herstellung eines Medikaments zum Vorbeugen und Heilen von Krebserkrankungen.

In der Krebstherapie sind die gegenwärtig am häufigsten angewendeten Behandlungen die chirurgische Behandlung, die Strahlen- und die Chemotherapie [*The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, Inc., New York, 1202-1263 (1990); *Harrison's Principles of Internal Medicine 12th ed., International Edition*, McGraw-Hill, Inc., New York, Vol. 2, 1587-1599 (1991); *Scientific American Medicine*, Scientific American, Inc. New York, Vol. 2, 12(V), 1-14 (1984)]. In der Strahlentherapie wird neben den verbreitet eingesetzten ionisierenden Bestrahlungen in speziellen Fällen, zum Beispiel bei Hautkrebs, die Phototherapie beziehungsweise in Kombination mit der Strahlen- und Chemotherapie die lokale Hyperthermie eingesetzt. Zu den Requisiten der Chemotherapie gehören, nach Wirkung, Ursprung oder Struktur geordnet, die Alkylierungsmittel, pflanzlichen Alkaloide, Antibiotika, Antimetaboliten und sonstige Mittel (zum Beispiel Asparaginase) ebenso wie die ebenfalls häufig angewendeten unterschiedlichen Hormone. In der Chemotherapie angewendete neuere Strategien sind: die kombinierte Chemotherapie; die über lange Zeit in kleinen Dosen fortgesetzte Verabreichung der chemotherapeutischen Mittel als intravenöse oder arterielle Infusion, um die Toxizität zu verringern; die Chemotherapie mit großen Dosen zur Bekämpfung der Arzneimittelresistenz; das Gleiche in Kombination mit autologer Knochenmarktransplantation; Kombination der chemotherapeutischen Arzneimittel mit die biologische Antwort verändernden Stoffen; verstärkte Anwendung der Adjuvant- und Neoadjuvant-Chemotherapie. Von den die biologische Antwort verändernden Stoffen werden am häufigsten die Interferone, die Tumornekrosefaktor, die Lymphokine, zum Beispiel Interleukin 2, und die monoklonalen Antikörper eingesetzt. Zu den in der Behandlung von Geschwulstkrankheiten bisher noch keine nachgewiesenen Erfolge aufweisenden, jedoch auch gegenwärtig angewendeten Methoden gehören die Diätmethoden, wenig erforschte Serumpräparate und die Simonton-Methode, die mit psychogenen Effekten arbeitet.

Die charakteristischsten Nachteile der gegenwärtig angewendeten Methoden sind die Toxizität, die beträchtlichen schädlichen Nebenwirkungen, die geringe Tumorspezifität, die Ausbildung von Resistenz und das begrenzte Wirkungsspektrum. Die meisten der in der Krebstherapie angewendeten cytotoxischen Arzneimittel machen keinen Unterschied zwischen neoplastischen Zellen und normalen proliferierenden Zellen. Deshalb müssen, um eine irreversible Schädigung dieser Zellen (z. B. Knochenmark, Darm) zu vermeiden, die Arzneimittel in Dosen eingesetzt werden, die zur Vernichtung sämtlicher neoplastischer Zellen nicht ausreichen [*Pharmac. Ther.*, 49, 43-54 (1991)]. Die Strahlentherapie kann akute und chronische Strahlenschäden verursachen, außerdem ist sie bei hypoxischen Zellen und bei manchen Tumortypen ohnehin nicht wirksam. Auch die chemotherapeutischen Mittel haben zahlreiche Nebenwirkungen. Sie können das Zentralnervensystem, die Blutbildungsorgane, die Magen- und Darmschleimhaut und alle vermehrungsfähigen Zellen schädigen. Darüberhinaus können sie Leber-, Nieren-, Lungen- und Herzmuskelschäden verursachen. Alle Cytostatika verschlechtern die Immunreaktivität des Organismus [*Proc. Roy. Soc. Med.*, 63 1063-1066 (1970)]. Viele von ihnen haben teratogene oder karzinogene Wirkungen, sie können Unfruchtbarkeit verursachen und die Häufigkeit der Bildung von Metastasen vergrößern. 60-70 % der Geschwülste können chemotherapeutisch von vornherein nur schwer oder überhaupt nicht beeinflußt werden, oder während der Behandlung bildet sich eine erworbene Resistenz oder Kreuzresistenz heraus.

Die Verfahren, die mit die biologische Antwort verändernden Substanzen arbeiten und die eigenen Mechanismen des Organismus ausnutzen, sind mit ähnlichen Nachteilen behaftet; sie sind nur bei einigen Tumortypen wirksam, zum anderen haben sie ebenfalls toxische Nebenwirkungen [*Harrison's Principles of Internal Medicine 12th ed., International Edition*, McGraw-Hill, Inc., New York, Vol. 2, 1587-1599 (1991)]. Auch die Interferone haben zahlreiche und schwere Nebenwirkungen, unter anderem sind sie zum Beispiel cardiotoxisch [*Chest*, 99, 557-561 (1991)]. Auch die monoklonalen Antikörper haben die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllt [*Eur. J. Cancer*, 27, 936-939 (1991)]. Obwohl seit 1980 mehr als 400 registrierte klinische Versuche auf dem Gebiet der Immuntherapie stattgefunden haben, ist keine einzige erfolgreiche immuntherapeutische Behandlungsmethode bekannt geworden [*J. R. Soc. Med.* 84, 321 (1991)].

Die unter der Nr. WO 86/025555 publizierte internationale Patentanmeldung betrifft ein Arzneimittel zur Behandlung von Krebserkrankungen, das aus Aminosäurelösungen besteht. Das

Mittel enthält L-Cystein, L-Methionin, L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Valin, L-Leucin, L-Threonin, L-Apfelsäure und Ascorbinsäure. Durch die Verwendung von Apfelsäure und Ascorbinsäure als Aktivatoren werden die Aminosäuren in saurer Form stabilisiert. Dadurch wird der pH-Wert des Blutes in den sauren Bereich, unter 6,8 verschoben. Die Publikation enthält keine Daten über eine Hemmung oder Rückentwicklung des Tumors.

In der publizierten japanischen Patentanmeldung Nr. 62-135 421 ist eine gegen Krebs wirkende Transfusionslösung beschrieben, die außer Isoleucin alle Aminosäuren, ferner auch Vitamine enthält. Die mögliche, aber nicht bewiesene Wirkung, eine Inhibition der Metastasen, mag auf die Restriktion einer Aminosäure, nämlich Isoleucin, zurückzuführen sein.

Ziel der Erfindung ist es, aus natürlichen Stoffen pharmazeutische Kompositionen herzustellen, die die Nachteile der bekannten tumortherapeutischen Kompositionen und Verfahren: die Toxizität, die geringe Spezifität und das schmale Wirkungsspektrum, nicht aufweisen.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß in den unterschiedlichen Organen ein passives Schutzsystem gegen Tumorzellen (im folgenden: PADS = Passive Antitumor Defence System) existiert, das fähig ist, die entstehenden und die bereits vorhandenen Tumorzellen zu vernichten. Die das System PADS aufbauenden, im Kreislauf vorkommenden endogenen und exogenen Verbindungen sind folgende: Aminosäuren, Vitamine, Nucleinbasen, Kohlehydrate und Zellstoffwechselprodukte. Es wurde erkannt, daß bei der gleichzeitigen Anwendung von wenigstens drei der aufgeführten Substanzen - die Bestandteile des Kreislaufsystems sind und deshalb zu jeder Zelle und in jede Zelle gelangen können - diese ihre Wirkung gegenseitig synergistisch verstärken und dadurch im Stande sind, die Tumorzellen zu vernichten.

Die Erfindung beruht weiterhin auf der Erkenntnis, daß im Verhalten der normalen und der Tumorzellen gegenüber den PADS-Substanzen wegen des Synergismus ein signifikanter Unterschied eintritt, wodurch die beiden Zellarten unterscheidbar werden. Während das klassische Immunsystem die Tumorzellen auf Grund ihrer äußeren Abweichung von normalen Zellen erkennt und selektiv vernichtet, ist der neuentdeckte passive Schutzmechanismus dazu auf Grund der inneren Unterschiede in der Lage.

Die Erfindung beruht ferner auf der Erkenntnis, daß eine Erhöhung der Konzentration der genannten Stoffe im Kreislauf, die Schaffung eines Überangebotes dieser Stoffe, in den Tumorzellen selektiv einen fatalen metabolischen Streß auslöst, der die Zellen zerstört.

Schließlich beruht die Erfindung auf der Erkenntnis, daß abhängig von der Dosis und der Applikationsart in den unterschiedlichen Krebszellen eine präventive oder eine Antitumorwirkung erzielt werden kann. Für die unterschiedlichen Tumortypen, die sich von den normalen Zellen nicht in dem gleichen Maße unterscheiden, kann unter Verwendung des Synergismus als Kriterium die quantitative und qualitative Zusammensetzung der wirksamsten Mischung durch einige Vorversuche bestimmt werden.

Gegenstand der Erfindung ist demnach die Verwendung einer Komposition zur Herstellung eines Medikaments zum Vorbeugen und Heilen von Krebserkrankungen, welche Komposition von den im Kreislauf vorkommenden Verbindungen wenigstens drei enthält: wenigstens eine Aminosäure, wenigstens ein Vitamin und wenigstens eine von den folgenden Verbindungen: Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze der aufgeführten Stoffe.

Die Komposition kann daneben die für Arzneimittel üblichen Trägerstoffe, Verdünnungsmittel und sonstige Hilfsstoffe enthalten.

Die erfindungsgemäß verwendete Komposition enthält als Aminosäure L-Methionin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Histidin, N-Benzoylglycin und/oder deren Salze, als Vitamin d-Biotin, Pyridoxin, Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat, L-Ascorbinsäure, Liponsäure, Orotsäure und/oder deren physiologisch verträgliche Salze.

Eine bevorzugte Ausführung der erfindungsgemäß verwendeten Komposition enthält L-Tryptophan, L-Ascorbinsäure und wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, D-Desoxy-D-ribose, D-Glucosamin und/oder deren physiologisch verträgliche Salze.

Eine andere bevorzugte Ausführung der erfindungsgemäß verwendeten Komposition enthält L-Arginin, Riboflavin-5'-phosphat und wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe D-Mannose, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträgliche Salze.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß verwendeten Komposition

enthält in einer Menge von 0,002-70 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe L-Methionin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Histidin, N-Benzoylglycin und/oder deren Salze als Aminosäure, in einer Menge von 0,0004-80 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe d-Biotin, Pyridoxin, Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat, L-Ascorbinsäure, Liponsäure, Orotsäure und/oder deren Salze als Vitamin und in einer Menge von 0,003-80 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträglichen Salze.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß verwendeten Komposition enthält 0,9-25 Masse% L-Methionin, 0,8-19 Masse% L-Tryptophan, 1,1-48 Masse% L-Arginin, 9-46 Masse% d-Biotin, 1,2-16 Masse% Pyridoxin, 0,03-42 Masse% Riboflavin-5-phosphat, 0,05-18 Masse% D-Glucosamin, 0,5-60 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, sowie 0,6-40 Masse% D-Mannose und/oder die physiologisch verträglichen Salze dieser Verbindungen.

Eine sehr wirksame erfindungsgemäß verwendete Komposition enthält 0,005-34 Masse% L-Methionin, 0,002-25 Masse% L-Tryptophan, 0,02-23 Masse% L-Tyrosin, 0,04-30 Masse% L-Phenylalanin, 0,04-50 Masse% L-Arginin, 0,03-34 Masse% L-Histidin, 0,05-22 Masse% N-Benzoylglycin, 0,01-60 Masse% d-Biotin, 0,01-20 Masse% Pyridoxin, 0,0004-45 Masse% Riboflavin, 0,0005-45 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,003-70 Masse% L-Ascorbinsäure, 0,004-15 Masse% Liponsäure, 0,01-17 Masse% Orotsäure, 0,001-10 Masse% Adenin, 0,01-63 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,08-42 Masse% D-Mannose, 0,05-20 Masse% D-Glucosamin, 0,02-60 Masse% Oxalessigsäure sowie 0,001-10 Masse% Adenosintriphosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze dieser Verbindungen.

Zur Herstellung der erfindungsgemäß verwendeten Komposition werden die aktiven Komponenten, und zwar wenigstens eine Aminosäure, wenigstens ein Vitamin und wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und deren physiologisch verträgliche Salze zu einer Komposition vermischt. Der Komposition können auch die in der Pharmazie üblichen Trägerstoffe, Verdünnungsmittel und/oder sonstige Zusatzstoffe in der zur Ergänzung auf 100 % erforderlichen Menge zugemischt werden.

Zur Herstellung einer bevorzugt verwendeten Komposition werden L-Tryptophan, L-Ascorbinsäure sowie wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Glucosamin und/oder deren physiologisch verträglichen Salze miteinander vermischt. Zur Herstellung einer anderen bevorzugt verwendeten Komposition werden L-Arginin, Riboflavin-5'-phosphat sowie wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe D-Mannose, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträglichen Salze miteinander vermischt.

Zur Herstellung einer anderen bevorzugt verwendeten Komposition werden L-Arginin, Riboflavin-5'-phosphat sowie wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe D-Mannose, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträglichen Salze miteinander vermischt.

Zur Herstellung einer bevorzugt verwendeten Komposition werden 0,002-70 Masse% Verbindung(en) aus der Gruppe L-Methionin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Histidin, N-Benzoylglycin und/oder deren Salze als Aminosäure, 0,0004-80 Masse% Verbindung(en) aus der Gruppe d-Biotin, Pyridoxin, Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat, L-Ascorbinsäure, Liponsäure, Orotsäure und/oder deren Salze als Vitamin und 0,003-80 Masse% Verbindung(en) aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträglichen Salze miteinander vermischt in eine pharmazeutische Komposition übergeführt.

Zur Herstellung einer weiteren bevorzugt verwendeten Komposition werden 0,9-25 Masse% L-Methionin, 0,8-19 Masse% L-Tryptophan, 1,1-48 Masse% L-Arginin, 9-46 Masse% d-Biotin, 1,2-16 Masse% Pyridoxin, 0,03-42 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,05-18 Masse% D-Glucosamin, 0,5-60 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, sowie 0,6-40 Masse% D-Mannose und/oder die physiologisch verträglichen Salze dieser Verbindungen miteinander vermischt in eine pharmazeutische Komposition übergeführt.

Zur Herstellung einer besonders bevorzugt verwendeten Komposition werden 0,005-34 Masse% L-Methionin, 0,002-25 Masse% L-Tryptophan, 0,02-23 Masse% L-Tyrosin, 0,04-30 Masse% L-Phenylalanin, 0,04-50 Masse% L-Arginin, 0,03-34 Masse% L-Histidin, 0,05-22 Masse% N-Benzoylglycin, 0,01-60 Masse% d-Biotin, 0,01-20 Masse% Pyridoxin, 0,0004-45 Masse% Ribo-

flavin, 0,0005-45 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,003-70 Masse% L-Ascorbinsäure, 0,004-15 Masse% Liponsäure, 0,01-17 Masse% Orotsäure, 0,001-10 Masse% Adenin, 0,01-63 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,08-42 Masse% D-Mannose, 0,05-20 Masse% D-Glucosamin, 0,02-60 Masse% Oxalessigsäure sowie 0,001-10 Masse% Adenosintriphosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze dieser Verbindungen miteinander vermischt.

Für die therapeutische Anwendung wird die erfindungsgemäß verwendete Komposition zweckmäßig zu pharmazeutischen Präparaten formuliert. Zu diesem Zweck wird die Komposition mit den in der Arzneimittelherstellung allgemein verwendeten nicht-toxischen, inerten, festen oder flüssigen, enteral oder parenteral applizierbaren Träger-, Verdünnungs- und/oder sonstigen Hilfsstoffen vermischt und zu den üblichen Arzneimittelpräparaten formuliert. Den Anforderungen entsprechende Träger-, Verdünnungs- beziehungsweise Bindemittel sind zum Beispiel Wasser, Gelatine, Lactose, Saccharose, Stärke, Pektin, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Talkum, unterschiedliche pflanzliche Öle, ferner Glycole, zum Beispiel Propylenglycol oder Polyethylenglycol. Von den pharmazeutischen Hilfs- und Zusatzstoffen sollen die Konservierungsmittel, zum Beispiel Methyl-(4-hydroxy-benzoat), die unterschiedlichen natürlichen und synthetischen Emulgier-, Dispergier- und Netzmittel, Farbstoffe, Aromastoffe, Puffer, Sprengmittel, Lösungsvermittler und Wirkungsverstärker genannt sein.

Die unter Verwendung der genannten Zusatzstoffe hergestellten üblichen Präparate können oral applizierbare Arzneimittel, wie Tabletten, Kapseln, Pulver, Dragees, Pillen oder Granulate beziehungsweise flüssige Arzneimittelformen, wie Sirup, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, ferner rektale Mittel, zum Beispiel Suppositorien - sowie parenterale Präparate, zum Beispiel Injektions- und Infusionslösungen sein.

Die vorteilhafte tägliche Dosis der erfindungsgemäß verwendeten Kompositionen hängt von zahlreichen Faktoren ab, zum Beispiel von der Art der zu behandelnden Krankheit, dem Zustand des Patienten und auch von der Art der Behandlung: Erwachsene erhalten zweckmäßig täglich 30-3000 mg/kg Körpergewicht. Dementsprechend ist es vorteilhaft, täglich 1-4mal Tabletten, Kapseln oder Dragees mit einem Gehalt an der aktiven Komposition von 0,2-3 g oder 0,5-3 Liter einer Infusionslösung von 10-200 g/l Konzentration der aktiven Komposition zu verabreichen.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Tabellen, Zeichnungen und Ausführungsbeispielen näher erläutert, wobei die Beispiele 13, 50, 80, 113 und 115 bis 119 Ausführungsformen der erfindungsgemäß verwendeten Komposition betreffen. Die restlichen Beispiele dienen als Vergleichsbeispiele. Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammen aus der "American Type Culture Collection" (Rockville, MD, USA).

**Tabelle 1** zeigt die tumorzellentötende Wirkung der vier und fünf Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 1-20 und das synergistische Zusammenwirken der Komponenten an Myelomzellen Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581).

**Tabelle 2** zeigt, ebenfalls an Sp2/0-Ag14-Zellen an Hand der Beispiele 21-37, wie die Wirkung einer Komposition aus 5 Wirkstoffen durch weitere Wirkstoffe erhöht wird.

**Fig. 1** zeigt die Wirkung der fünf Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 1-20 und die synergistische Wechselwirkung zwischen den Bestandteilen.

**Fig. 2** stellt die Wirkung der fünf Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 102-106 und die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 in vitro gegen Mausmyelomzellen Sp2/0-Ag14 bezogen auf ein entsprechendes Kontrollgemisch dar.

**Fig. 3** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Komposition gemäß Beispiel 107 gegen Mausmyelomzellen Sp2/0-Ag14 als Funktion der Zeit und verglichen mit der entsprechenden Kontrolle sowie mit unbehandelten Zellen.

**Fig. 4** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 gegen die menschlichen Erythroleukämiezellen K-562 (ATCC CCL 243) in vitro, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle.

**Fig. 5** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 gegen die menschlichen Gebärmutterhalskrebszellen HeLa (epitheloides Carcinom, Cervix) (ATCC CCL 2) in vitro, verglichen mit entsprechendem Kontrollgemischen.

**Fig. 6** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 gegen die menschlichen Kehlkopfkrebszellen HEp-2 (epidermoides Carcinom, Larynx)

(ATCC CCL 23) in vitro, verglichen mit entsprechenden Kontrollgemischen.

**Fig. 7** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 gegen normale Verozellen (Nierenzellen der grünen afrikanischen Meerkatze) (ATCC CCL 81) in vitro, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle.

**Fig. 8** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Komposition gemäß Beispiel 112 gegen den aus i.p. in Mäuse BALB/c geimpften Mausmyelomzellen Sp2/0-Ag14 gewachsenen Tumor in vivo.

**Fig. 9** zeigt die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Komposition gemäß Beispiel 112 gegen den aus s. c. in Mäuse BALB/c (nu/nu) geimpften menschlichen Gebärmutterkrebszellen HeLa unter der Haut gewachsenen soliden Tumor in vivo.

Für die Experimente wurden folgende Medien verwendet: im Falle der Zellen Sp2/0-Ag14 und K-562 Medium RPMI 1640 (Sigma Chemie GmbH, D-8024 Deisenhofen, BRD, Produktnr.: R 6504), im Falle der Zellen Hep-2, HeLa und Vero Medium MEM (Sigma Chemie GmbH, Produktnr.: M 4655).

#### **Beispiele 1-37**

In ein Rührgefäß werden die in den Tabellen 1 und 2 angegebenen Wirkstoffe in den ebenfalls angegebenen Mengen eingewogen. Dann wird das Pulvergemisch mit der zum Neutralisieren der Stoffe sauren Charakters erforderlichen, ebenfalls in den Tabellen 1 und 2 angegebenen Menge an Natriumhydrogencarbonat versetzt. Danach wird unter ständigem Rühren das entsprechende Medium zugesetzt, bis Masse der Komposition 100 % ausmacht. Die Wirkung der auf diese Weise hergestellten Lösungen ist aus den Tabellen 1 und 2 sowie aus Fig. 1 ersichtlich.

#### **Beispiele 38-67**

Man arbeitet auf die für die Beispiele 1-37 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß zum Neutralisieren der Stoffe sauren Charakters nicht Natriumhydrogencarbonat, sondern die entsprechende Menge Kaliumhydrogencarbonat verwendet wird. Die Wirkung der auf diese Weise erhaltenen Lösungen unterscheidet sich in keinem einzigen Fall signifikant von den in den Tabellen 1 und 2 beziehungsweise in Fig. 1 angegebenen Ergebnissen.

#### **Beispiele 68-97**

Man arbeitet auf die für die Beispiele 1-37 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß zum Neutralisieren der Stoffe sauren Charakters nicht Natriumhydrogencarbonat, sondern die entsprechende Menge Calciumcarbonat verwendet wird. Die Wirkung der auf diese Weise erhaltenen Lösungen unterscheidet sich in keinem einzigen Fall signifikant von den in den Tabellen 1 und 2 beziehungsweise in Fig. 1 angegebenen Ergebnissen.

#### **Beispiele 98-101**

Man arbeitet gemäß den Beispielen 23, 24, 27 bzw. 28, verwendet jedoch statt des in Beispiel 23 eingesetzten L-Arginins 0,053 Masse% L-Arginin-hydrochlorid, statt des in Beispiel 24 eingesetzten L-Histidins 0,052 Masse% L-Histidin-hydrochlorid, statt des in Beispiel 27 eingesetzten L-Methionins 0,009 Masse% L-Methionin-hydrochlorid und statt des in Beispiel 28 eingesetzten L-Tyrosins 0,025 Masse% L-Tyrosin-hydrochlorid sowie dementsprechend in jedem Beispiel 0,054 Masse% Natriumhydrogencarbonat. Die Wirkung der auf diese Weise erhaltenen Lösungen unterscheidet sich in keinem einzigen Fall signifikant von den für die Beispiele 23, 24, 27 und 28 in der Tabelle 2 angegebenen Ergebnissen.

#### **Beispiel 102**

In ein Rührgefäß werden 0,01 Masse% L-Tryptophan, 0,034 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,003 Masse% Adenin, 0,065 Masse% Apfelsäure, 0,007 Masse% L-Ascorbinsäure und 0,091 Masse% Natriumhydrogencarbonat eingewogen. Danach wird unter ständigem Rühren das entsprechende Medium zugesetzt, bis die Komposition 100 Masse% ausmacht. Diese Komposition ist in der die Wirkung darstellenden Fig. 2 als 100%-Komposition bezeichnet.

#### **Beispiel 103**

Man arbeitet auf die im Beispiel 102 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 80 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in der die Wirkung darstellenden Fig. 2 als 80%-Komposition bezeichnet.

#### **Beispiel 104**

Man arbeitet auf die im Beispiel 102 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man von

jeder der Komponenten nur 60 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in der die Wirkung darstellenden Fig. 2 als 60%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 105**

5 Man arbeitet auf die im Beispiel 102 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 40 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in der die Wirkung darstellenden Fig. 2 als 40%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 106**

10 Man arbeitet auf die im Beispiel 102 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 20 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in der die Wirkung darstellenden Fig. 2 als 20%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 107**

15 In ein Rührgefäß werden 0,011 Masse% L-Methionin, 0,01 Masse% L-Tryptophan, 0,036 Masse% L-Tyrosin, 0,041 Masse% L-Phenylalanin, 0,044 Masse% L-Arginin, 0,039 Masse% L-Histidin, 0,089 Masse% N-Benzoylglycin, 0,007 Masse% L-Ascorbinsäure, 0,012 Masse% d-Biotin, 0,010 Masse% Pyridoxin, 0,0004 Masse% Riboflavin, 0,0006 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,0006 Masse% Liponsäure, 0,017 Masse% Orotsäure, 0,003 Masse% Adenin, 0,034 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,090 Masse% D-Mannose, 0,053 Masse% D-Glucosamin, 0,065 Masse% Apfelsäure, 0,40 Masse% Oxalessigsäure, 0,0015 Masse% Adenosintriphosphat und 0,087 Masse% Natriumhydrogencarbonat eingewogen. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in den die Wirkung darstellenden Fig. 2, 3, 4, 5, 6 und 7 als 100%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 108**

25 Man arbeitet auf die in Beispiel 107 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 80 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in den die Wirkung darstellenden Fig. 2, 3, 4, 5, 6 und 7 als 80%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 109**

30 Man arbeitet auf die in Beispiel 107 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 60 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in den die Wirkung darstellenden Fig. 2, 3, 4, 5, 6 und 7 als 60%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 110**

35 Man arbeitet auf die in Beispiel 107 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 40 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in den die Wirkung darstellenden Fig. 2, 3, 4, 5, 6 und 7 als 40%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 111**

40 Man arbeitet auf die in Beispiel 107 angegebene Weise mit dem Unterschied, daß man von jeder der Komponenten nur 20 % der angegebenen Menge einwiegt. Dann wird mit dem entsprechenden Medium auf 100 Masse% aufgefüllt. Diese Komposition ist in den die Wirkung darstellenden Fig. 2, 3, 4, 5, 6 und 7 als 20%-Komposition bezeichnet.

**Beispiel 112**

45 In ein Rührgefäß werden 1,47 Masse% L-Methionin, 1,01 Masse% L-Tryptophan, 0,036 Masse% L-Tyrosin, 1,63 Masse% L-Phenylalanin, 1,71 Masse% L-Arginin, 1,53 Masse% L-Histidin, 0,18 Masse% N-Benzoylglycin, 1,94 Masse% L-Ascorbinsäure, 1,21 Masse% d-Biotin, 2,02 Masse% Pyridoxin, 0,038 Masse% Riboflavin, 0,05 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,02 Masse% Liponsäure, 0,09 Masse% Orotsäure, 0,068 Masse% Adenin, 1,32 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 1,8 Masse% D-Mannose, 1,1 Masse% D-Glucosamin, 1,32 Masse% Apfelsäure, 0,040 Masse% Oxalessigsäure, 0,11 Masse% Adenosintriphosphat, 1,34 Masse% Natriumhydrogencarbonat und 0,04 Masse% Kaliumhydrogencarbonat eingewogen. Dann werden unter ständigem Rühren 83,168 Masse% eines Puffers zugesetzt, der 0,02 Masse%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,3 Masse%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  enthält. Die Wirkung der auf diese Weise hergestellten und zur Behandlung von Tieren verwen-

deten Lösungen ist aus den Fig. 8 und 9 ersichtlich.

**Beispiel 113**

In einen Rührer werden 20 Masse% L-Tryptophan, 62 Masse% L-Ascorbinsäure und 18 Masse% D-Glucosamin eingewogen. Die gut vermischte Pulverkomposition wird unmittelbar für präventive Versuche verwendet.

**Beispiel 114**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 32 Masse% L-Arginin, 28 Masse% Riboflavin-5'-phosphat und 40 Masse% Apfelsäure verwendet.

**Beispiel 115**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 23 Masse% L-Tryptophan, 0,2 Masse% Pyridoxin, 17,8 Masse% N-Benzoylglycin und 59 Masse% Oxalessigsäure verwendet.

**Beispiel 116**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 19 Masse% L-Tyrosin, 61 Masse% L-ascorbinsäure, 0,2 Masse% Adenin und 19,8 Masse% L-Histidin verwendet.

**Beispiel 117**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 31 Masse% L-Methionin, 53 Masse% d-Biotin, 0,2 Masse% Adenin und 15,8 Masse% Orotsäure verwendet.

**Beispiel 118**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 27 Masse% L-Phenylalanin, 33 Masse% Riboflavin, 0,2 Masse% Adenosintriphosphat und 39,8 Masse% D-Mannose verwendet.

**Beispiel 119**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 32 Masse% L-Histidin, 9 Masse% Liponsäure und 59 Masse% 2-Desoxy-D-ribose verwendet.

**Beispiel 120**

Man arbeitet auf die im Beispiel 113 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man 12 Masse% L-Arginin, 11 Masse% Pyridoxin und 77 Masse% Apfelsäure verwendet.

**Beispiel 121**

In ein Rührgefäß werden 10 Masse% L-Methionin, 3 Masse% L-Tryptophan, 0,2 Masse% L-Tyrosin, 10,9 Masse% L-Phenylalanin, 22,7 Masse% L-Arginin, 10 Masse% L-Histidin, 1,1 Masse% N-Benzoylglycin, 11,9 Masse% L-Ascorbinsäure, 0,1 Masse% d-Biotin, 0,2 Masse% Pyridoxin, 0,05 Masse% Riboflavin, 0,35 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,1 Masse% Liponsäure, 0,6 Masse% Orotsäure, 0,3 Masse% Adenin, 0,9 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 11,5 Masse% D-Mannose, 7 Masse% D-Glucosamin, 8 Masse% Apfelsäure, 0,4 Masse% Oxalessigsäure und 0,7 Masse% Adenosintriphosphat eingewogen. Die gut vermischte Pulverkomposition wird unmittelbar für präventive Versuche verwendet.

Die abtötende Wirkung der gemäß den Beispielen 1-37 hergestellten Kompositionen auf Tumorzellen sowie die synergistische Wechselwirkung der Wirkstoffe (verglichen mit den Einzelwirkungen der einzelnen Wirkstoffe) wurde an Mausmyelomzellen Sp2/0-Ag14 untersucht.

Im Zuge der Experimente wurden in der Fachliteratur akzeptierte, neueste Methoden angewendet. Im Fall der Zelllinien Sp2/0-Ag14 und K562 wurden die logarithmisch wachsenden Zellen aus dem Medium isoliert und auf einer 96-Loch-Platte erneut suspendiert, wobei in jedes Loch 250 µl des die zu untersuchende Substanz in der angegebenen Menge enthaltenden entsprechenden Mediums gelangte und die Endkonzentration im Fall der Zellen Sp2/0-Ag14  $4 \times 10^4$ , im Fall der Zellen K562  $2 \times 10^4$  betrug. Die HeLa-, HEp-2- und Vero-Zellen wurden mit 0,2 %iger Trypsinlösung aus den einen zu 75 % zusammenhängenden Zellrasen aufweisenden Zuchtgefäßen geerntet und in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml in dem entsprechenden Medium erneut suspendiert. Je 100 µm der Suspension wurden in die Löcher der 96-Loch-Platte gegeben, und die Platten wurden 24 Stunden lang inkubiert. Dann wurde das Nährmedium weggegossen und durch 250 µl frisches Nährmedium, das die untersuchten Verbindungen in der angegebenen Konzentration enthielt, ersetzt. Alle Zellen wurden für 48 Stunden der Vermehrung überlassen. Zur Bestimmung der überlebenden Zellen wurden die Zellen Sp2/0-Ag14 und K562 unter dem Mikroskop mittels der

Trypanblau-Ausschlußmethode ausgezählt. Die überlebenden HeLa-, HEp-2- und Vero-Zellen wurden durch Messung ihrer endogenen Alkaliphosphatase-Aktivität erfaßt. Die Ergebnisse wurden mit der t-Probe nach Student ausgewertet. Die in den Tabellen auf den Durchschnittswert folgenden Zahlen beziehungsweise in den Figuren die Zeichen bedeuten die Standardabweichung des Mittelwertes.

5

**Tabelle 1: Wirkung der erfindungsgemäßen Kompositionen und ihrer Bestandteile auf Sp/20-Ag14-Zellen**

B E I S P I E L	K O N T R O L L E	GEHALT AN KOMPONENTEN IN MASSE%						WIRKUNG	
		L-TRYP- TOPHAN	2-DEOXY- RIBOSE	ADE- NIN	APFEL- SÄURE	ASCOR- BIN- SÄURE	Na- BICAR- BONAT	ANZAHL DER ZEL- LEN ( $\times 10^4$ )	IN % DER UN- BEHAN- DELTEN ZELLEN
1		-	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	15.9 $\pm$ 1.2	26.9 $\pm$ 2.0
20	1	-	-	-	-	-	-	59.1 $\pm$ 3.2	100.0
	2	0.002	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	10.7 $\pm$ 2.9	18.1 $\pm$ 4.8
	2	0.002	-	-	-	-	-	61.7 $\pm$ 3.0	104.4 $\pm$ 5.0
	3	0.006	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	6.0 $\pm$ 1.4	10.1 $\pm$ 2.4
	3	0.006	-	-	-	-	-	62.6 $\pm$ 2.0	106.0 $\pm$ 3.4
25	4	0.010	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	4.5 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6
	4	0.010	-	-	-	-	-	63.0 $\pm$ 3.4	106.6 $\pm$ 5.8
	5	0.010	-	0.003	0.065	0.007	0.091	14.8 $\pm$ 0.4	25.1 $\pm$ 0.7
	5	-	-	-	-	-	-	59.1 $\pm$ 3.2	100.0
	6	0.010	0.013	0.003	0.065	0.007	0.091	12.2 $\pm$ 0.3	20.6 $\pm$ 0.6
30	6	-	0.013	-	-	-	-	59.3 $\pm$ 2.3	100.4 $\pm$ 4.1
	7	0.010	0.025	0.003	0.065	0.007	0.091	8.7 $\pm$ 0.8	14.8 $\pm$ 1.3
	7	-	0.025	-	-	-	-	59.8 $\pm$ 1.2	101.1 $\pm$ 2.2
	8	0.010	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	4.5 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6
35	8	-	0.034	-	-	-	-	59.0 $\pm$ 3.2	99.9 $\pm$ 5.9
	9	0.010	0.034	-	0.065	0.007	0.091	12.6 $\pm$ 1.3	21.4 $\pm$ 2.3
	9	-	-	-	-	-	-	59.1 $\pm$ 3.2	100.0
	10	0.010	0.034	0.001	0.065	0.007	0.091	10.1 $\pm$ 1.8	17.1 $\pm$ 3.2
	10	-	-	0.001	-	-	-	60.5 $\pm$ 1.4	102.4 $\pm$ 2.5
40	11	0.010	0.034	0.002	0.065	0.007	0.091	7.9 $\pm$ 1.7	13.4 $\pm$ 2.9
	11	-	-	0.002	-	-	-	58.2 $\pm$ 1.8	98.5 $\pm$ 3.2
	12	0.010	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	4.5 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6
	12	-	-	0.003	-	-	-	58.6 $\pm$ 1.5	99.1 $\pm$ 2.8
45	13	0.010	0.034	0.003	-	0.007	0.007	16.6 $\pm$ 1.2	28.1 $\pm$ 2.1
	13	-	-	-	-	-	-	59.1 $\pm$ 3.2	100.0
	14	0.010	0.034	0.003	0.013	0.007	0.024	13.1 $\pm$ 2.2	22.2 $\pm$ 4.0
	14	-	-	-	0.013	-	-	58.7 $\pm$ 2.1	99.3 $\pm$ 3.7
	15	0.010	0.034	0.003	0.039	0.007	0.057	9.9 $\pm$ 1.1	16.7 $\pm$ 2.0
50	15	-	-	-	0.039	-	-	60.4 $\pm$ 1.7	102.2 $\pm$ 3.0
	16	0.010	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	4.5 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6
	16	-	-	-	0.065	-	-	58.8 $\pm$ 2.5	99.5 $\pm$ 4.5
	17	0.010	0.034	0.003	0.065	-	0.084	13.2 $\pm$ 0.8	22.3 $\pm$ 1.3
55	17	-	-	-	-	-	-	59.1 $\pm$ 3.2	100.0

B E I S P I E L	K O N T R O L L E	GEHALT AN KOMPONENTEN IN MASSE%						WIRKUNG	
		L-TRYP- TOPHAN	2-DEOXY- RIBOSE	ADE- NIN	APFEL- SÄURE	ASCOR- BIN- SÄURE	Na- BICAR- BONAT	ANZAHL DER ZEL- LEN  (x 10 <sup>4</sup> )	IN % DER UN- BEHAN- DELTEN ZELLEN
18		0.010	0.034	0.003	0.065	0.003	0.087	11.9 ± 2.1	20.2 ± 3.7
	18	-	-	-	-	0.003	-	58.2 ± 1.4	98.5 ± 2.5
19		0.010	0.034	0.003	0.065	0.005	0.089	6.8 ± 2.0	11.6 ± 3.5
	19	-	-	-	-	0.005	-	56.7 ± 2.1	96.0 ± 3.7
20		0.010	0.034	0.003	0.065	0.007	0.091	4.5 ± 0.3	7.7 ± 0.6
	20	-	-	-	-	0.007	-	56.3 ± 2.6	95.2 ± 4.8

Die erste Spalte der **Tabelle 1** enthält die Nummer des Beispiels, die zweite die Anzahl der Kontrollversuche. In den folgenden sechs Spalten sind die im Zuge der Versuche eingesetzten Mengen der einzelnen Komponenten in Masse% angegeben. Die Kontrollgemische enthielten dieselbe Menge an chemisch ähnlichen, aber pharmakologisch unwirksamen Substanzen (als Aminosäure 0,026 Masse% L-Serin, 0,033 Masse% L-Asparaginsäure, 0,029 L-Valin, 0,018 Masse% L-Alanin, 0,006 Masse% Glycin, 0,059 Masse% Trimethylglycin und 0,006 Masse% L-Prolin; als Vitamin 0,017 Masse% Thiaminhydrochlorid, 0,006 Masse% Niacin, 0,019 Masse% Folsäure-Na, 0,001 Masse% D-Pantothensäure-semicalciumsalz; 0,012 Masse% Uracil und 0,0008 Masse% Octanonsäure; ferner 0,003 Masse% Hypoxanthin, 0,038 Masse% D(-)Ribose, 0,090 Masse% Glucose, 0,055 Masse% N-Acetylglucosamin, 0,081 Masse% Succinsäure-dinatriumsalz, 0,080 Masse% Fumarsäure-dinatriumsalz und 0,0015 Masse% Guanosintriphosphat-trinatriumsalz). Die beiden letzten Spalten der Tabelle zeigen einmal die Wirkung der in den Beispielen angegebenen, vier beziehungsweise fünf Wirkstoffe enthaltenden Präparate, zum anderen die Wirkung der einzelnen Komponenten für sich allein (Kontrolle), wobei als Wirkung die Zellenanzahl nach 48 Stunden Inkubation bzw. die Zellenanzahl in Prozent der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 100 %) angegeben ist. Für L-Tryptophan zeigen zum Beispiel die Kontrollversuche 2, 3 und 4, welche Wirkung L-Tryptophan allein in einer Konzentration von 0,002, 0,006 beziehungsweise 0,01 Masse% auf die Anzahl der Zellen hat, während die Beispiele 2, 3 und 4 zeigen, welche Wirkung die gleichen Mengen L-Tryptophan im Verein mit den anderen, in den Beispielen mengenmäßig angegebenen Wirkstoffen ausübt.

Aus den Daten der letzten beiden Spalten der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die einzeln angewendeten Substanzen auf die Tumorzellen keine abtötende Wirkung ausüben, daß L-Tryptophan in den jeweiligen Konzentrationen die Vermehrung der Zellen sogar noch in geringem Maße fördert. Aus den Daten der gleichen Spalten ist auch ersichtlich, daß jede der Substanzen in steigender Menge die Wirkung der aus den übrigen vier Komponenten bestehenden Mischung in steigendem Maße synergistisch verstärkt. Zum Beispiel wurde durch 0,01 Masse% L-Tryptophan die 73,1 %ige Wirkung der übrigen vier Wirkstoffe auf 92,3 % erhöht. Die gleiche Menge (0,01 Masse%) L-Tryptophan für sich allein, ohne die übrigen Komponenten, verursacht sogar eine geringe Erhöhung der Zellvermehrung. Das weist eindeutig auf eine synergistische Wirkung hin.

Der Unterschied in der Wirkung der vier aktive Komponenten enthaltenden Kompositionen (Beispiele 1, 5, 9, 13 und 17) und der die fünfte aktive Komponente in den hier angewendeten höchsten Mengen (zum Beispiel 0,01 Masse% L-Tryptophan) enthaltenden Kompositionen (Beispiele 4, 8, 12, 16 und 20) ist in jedem Fall signifikant (p < 0,01), d.h. alle der Substanzen verstärken den Effekt der übrigen vier in signifikanter Weise.

Die synergistische Wirkung der fünf Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 1-20 ist in **Fig. 1** dargestellt, wobei sich im Abschnitt „Apfelsäure“ die äußerste linke Säule mit 0,000% Apfelsäure auf eine erfindungsgemäß verwendete Komposition bezieht. Die restlichen Säulen betreffen Vergleichsbeispiele. Die Ordinate zeigt die Menge der Sp2/0-Ag-14-

Zellen in Prozent der Menge der unbehandelten Zellen (die als 100 % betrachtet wird), die Abszisse zeigt in der Graphik 1 die Menge von L-Tryptophan, in Graphik 2 die von Desoxy-D-ribose, in Graphik 3 die von Adenin, in Graphik 4 die von Apfelsäure und in Graphik 5 die von L-Ascorbinsäure jeweils in Masse%. Die weißen Säulen zeigen die Anzahl der Zellen (in Prozent der unbehandelten Kontrolle), wenn für 48 Stunden nur mit dem jeweiligen Wirkstoff allein inkubiert wurde. Die schwarzen Säulen zeigen die Menge der Zellen, wenn die Verbindung zusammen mit den übrigen vier Wirkstoffen verwendet wurde. Die bei Steigerung der Menge der einzelnen Substanzen eintretenden Änderungen in der Größe der schwarzen und weißen Säulen (bei L-Tryptophan sogar in umgekehrter Richtung) sind ein anschaulicher Beweis für die synergistische Wirkung, und die schwarzen Säulen demonstrieren die starke tumorzellentötende Wirkung der Kompositionen.

In der **Tabelle 2** ist auf Grund der Beispiele 21-37 gezeigt, wie die Wirkung der fünf Komponenten enthaltenden Kompositionen gegen Zellen Sp2/0-Ag14 durch Zugabe weiterer Wirkstoffe erhöht wird. In der Tabelle 2 sind die in Masse% angegebenen Mengen der einzelnen Substanzen mit 1000 multipliziert, d.h. die Werte sind alle als um den Faktor  $10^{-3}$  kleiner zu verstehen, zum Beispiel bedeutet in Beispiel 21 die für L-Tryptophan angegebene Zahl 6:  $6 \cdot 10^{-3}$ , d.h. 0,006 Masse%. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bereits angegeben.

Ähnlich wie in Tabelle 1 ist auch hier aus den letzten beiden Spalten (als Zellenanzahl oder in Prozent) ersichtlich, daß keine der Verbindungen, für sich allein angewendet, eine zellenabtötende Wirkung hat, sondern im Gegenteil, einige von ihnen, wie L-Phenylalanin (Kontrolle 22), L-Arginin (Kontrolle 23), L-Histidin (Kontrolle 24) und Riboflavin (Kontrolle 29), im Vergleich zur Anzahl der unbehandelten Zellen (Kontrolle 21) zu einem schwachen Anstieg der Zellenzahl führen. Aus den Daten ist aber ferner auch ersichtlich, daß diese Stoffe, in den gleichen Mengen eingesetzt, die Wirkung der Komposition gemäß Beispiel 21 in synergistischer Weise erhöhen. Ohne wirkungspotenzierende Substanzen ist die Wirkung der fünf Wirkstoffe enthaltenden Komposition gemäß Beispiel 21 in jedem Falle signifikant schwächer als zusammen mit diesen Substanzen.

**Tabelle 2: Wirkung der erfindungsgemässen Kompositionen und ihrer Bestandteile auf Sp2/0-Ag14-Zellen**

B E I S P I E L	K O N T R O L L E	MENGE DER KOMPONENTEN IN MASSE% ( $\times 10^{-3}$ )														WIRKUNG			
		L- T R Y P T O P H A N	2- D E S O X Y- D- R I B O S E	A D D E N I N	A P F E L S Ä U R E	L- Ä S C O R B I N S Ä U R E	Na- B I C A R B O N A T	L- P H E N Y L A L A N I N	L- A R G I N I N	L- H I S T I D I N	B I O T I N	P Y R I D O X I N	L- M E T H I O N I N	L- T R O S I N	R I B O F L A V I N	R O T S Ä U R E	A N Z A H L D E R Z E L L E  ( $\times 10^4$ )	I N % D E R U N B E H A N D E L T E N Z E L L E N	
21		6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49.8 ± 0.4	67.0 0.6
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74.3 ± 3.9	100.0
22		6	20	2	39	4	54	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.4 ± 1.4	40.9 1.9
	22	-	-	-	-	-	-	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81.3 ± 3.0	109.4 4.0



Tabelle 2 (Fortsetzung): Wirkung der erfindungsgemäßen Kompositionen und ihrer Bestandteile auf Sp2/0-Ag14-Zellen

BEISPIELE	KONTROLLE	MENGE DER KOMPONENTEN IN MASSE% (x10 <sup>-3</sup> )												WIRKUNG		
		L-TRYPTOPHAN	2-DEOXYRIBOSE	ADENIN	ADENOSIN	L-ASCORBINSÄURE	NaBICARBONAT	ATP NaSALZ	D-MANNOSE	D-GLUCOSAMIN	N-BEZOYLGLYCIN	RIBOFL. 5'-PHOSPHAT	LIPONSÄURE	OROTIDSÄURE	ANZAHL DER ZELLEN (x 10 <sup>4</sup> )	IN % DER UNBEHANDELTEN ZELLEN
21	21	6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	-	-	-	49.8 ± 0.4	67.6 0.6
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74.3 ± 3.9	100.0
31	31	6	20	2	39	4	54	1.5	-	-	-	-	-	-	27.5 ± 0.5	55.3 1.1
		-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	71.0 ± 1.1	95.6 1.5
32	32	6	20	2	39	4	33	-	90	-	-	-	-	-	24.5 ± 0.9	49.2 1.2
		-	-	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-	-	73.1 ± 1.1	98.4 1.5
33	33	6	20	2	39	4	33	-	-	53	-	-	-	-	20.1 ± 0.8	40.3 1.1
		-	-	-	-	-	-	-	-	53	-	-	-	-	71.7 ± 1.3	96.5 1.8
34	34	6	20	2	39	4	54	-	-	-	89	-	-	-	24.0 ± 0.6	48.2 0.8
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	89	-	-	-	74.2 ± 1.6	99.8 2.1
35	35	6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	0.6	-	-	16.3 ± 0.5	32.7 0.7
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	73.5 ± 1.3	98.9 1.8
36	36	6	20	2	39	4	52	-	-	-	-	-	0.6	-	23.8 ± 1.0	47.8 1.3
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	73.1 ± 1.6	98.4 2.1
37	37	6	20	2	39	4	54	-	-	-	-	-	-	17	26.4 ± 0.6	53.1 0.8
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	70.0 ± 1.3	94.2 1.7

Verglichen wurde ferner die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 mit der der fünf Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 102-106. Um die Vergleichbarkeit mit den vorherigen Ergebnissen zu erleichtern, wurden auch diese Versuche mit Zellen Sp2/0-Ag14 durchgeführt und die gleichen Versuchsbedingungen eingehalten. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben, während die Abszisse den prozentualen Gehalt an Komposition (und damit an den einzelnen Wirkstoffen) angibt, wobei als Bezugsgrundlage von 100 % die fünf Wirkstoffe enthaltende Komposition gemäß Beispiel 102 dient. Das bedeutet, daß die Komposition gemäß Beispiel 103 jede der Komponenten des Beispiels 102 in nur 80 % der dort angegebenen Menge enthält. Im Fall der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen ist die Bezugsgrundlage (100 %) die Komposition gemäß Beispiel 107.

Um auszuschließen, daß es sich bei den gemessenen Wirkungen um einen osmotischen Effekt oder um ein unspezifisches Überangebot an Nährstoffen, eventuell um eine Aminosäure-

"Imbalance" handelt, wurden auch Kontrollgemische bereit. Diese Gemische enthalten Stoffe, von denen sich in Vorversuchen herausstellte, daß sie keinen Anteil an dem passiven Schutzsystem (PADS) haben. Diese Substanzen wurden in den in Tabelle 1 angegebenen Mengen verwendet. Die Ergebnisse, die mit den Kompositionen gemäß den Beispielen 102-106 und 107-111 beziehungsweise mit den Kontrollgemischen erreicht wurden, sind in Fig. 2 dargestellt, in der die Kurve mit leeren Kreisen die Änderung der Zellenanzahl nach 48 Stunden Inkubation für das Kontrollgemisch zeigt, während die Kurve mit ausgefüllten Kreisen sich auf die 5 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 102-106 und die Kurve mit den Dreiecken sich auf die 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 bezieht. In den in Fig. 2 dargestellten Versuchen wurden die einzelnen Komponenten der 100 %-Kompositionen gemäß den Beispielen 102 und 107 in Mengen eingesetzt, die an sich die Zellenanzahl nicht wesentlich beeinflussen (wie das auch aus den vorangegangenen, in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Ergebnissen ersichtlich war). Aus der Fig. 2 ist ersichtlich, daß die Komponenten, wenn sie zusammen angewendet werden, eine signifikante tumorzellentötende Wirkung haben. Diese Tatsache beweist erneut das synergistische Zusammenwirken der aktiven Substanzen. Aus Fig. 2 kann weiterhin entnommen werden, daß die Kontrollgemische keinen nennenswerten Einfluß auf die Zellenanzahl haben. Auf Grund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß die gemessene Wirkung auf osmotische Effekte, unspezifisches Nährstoffüberangebot oder Aminosäure-"Imbalance" zurückzuführen ist.

Um festzustellen, ob an der Wirkung der Kompositionen etwa auch Gegenionen einen Anteil haben, wurden statt der Natriumionen in den Beispielen 38-67  $K^+$ - und in den Beispielen 68-97  $Ca^{++}$ -Ionen verwendet. In der Wirkung der unterschiedliche Gegenionen enthaltenden Kompositionen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, die Ergebnisse waren fast völlig identisch.

Die Wirkung der 100%-Komposition gemäß Beispiel 107 auf Sp2/0-Ag14-Zellen wurde als Funktion der Zeit untersucht und mit der einer 100%-Kontrollmischung sowie den unbehandelten Zellen verglichen. Die Untersuchungsbedingungen waren die gleichen wie in den vorhergehenden Versuchen, ausgenommen, daß die Zellen nicht nur nach Ablauf von 48 Stunden, sondern auch nach 6, 12, 24 und 36 Stunden gezählt wurden. Das Ergebnis dieser kinetischen Messungen ist in Fig. 3 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Zellen/ml, auf der Abszisse die Zeit in Stunden aufgetragen. Die Kurve mit leeren Kreisen zeigt die Änderung der Zellenanzahl als Funktion der Zeit für die unbehandelte Kontrolle, die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen zeigt das gleiche für die Kontrollmischung, und schließlich zeigt die Kurve mit Dreiecken die Änderung der Zellenanzahl als Funktion der Zeit für die erfindungsgemäße Komposition gemäß Beispiel 107. Aus Fig. 3 ist ersichtlich, daß - während die Kontrollmischung keine nennenswerte Wirkung auf die Anzahl der Zellen hat, denn die Anzahl der Zellen steigt exponentiell mit der Zeit, und der Verlauf der Kurve ist ähnlich wie der der das Wachstum der unbehandelten Zellen zeigenden Kurve - die erfindungsgemäße Komposition für die Tumorzellen cytotoxisch ist, ihre Zahl nimmt mit der Zeit ab. Das heißt, die erfindungsgemäßen Kompositionen hemmen nicht die Vermehrung der Zellen, sondern sind cytotoxisch. In der 21 Wirkstoffe enthaltenden erfindungsgemäßen Komposition waren die einzelnen Komponenten in einer Menge anwesend, die im Falle einzelner Anwendung keine wesentliche Wirkung auf die Zellenzahl ausübt. (Dies ist natürlich noch mehr zutreffend für die 80 %igen, 60 %-igen usw. Komposition, in denen 20 %, 40 % usw. weniger Wirkstoff vorhanden ist.) Da in allen *in vitro* Versuchen die gleichen Kompositionen verwendet wurden, beweisen alle Ergebnisse das synergistische Zusammenwirken der Komponenten.

Diese Ergebnisse beweisen, daß die Ursache der Wirkung in einem synergistischen Zusammenwirken der auf Grund der erfindungsgemäßen Erkenntnisse ausgewählten Substanzen zu suchen ist. Die Ergebnisse beweisen weiterhin, daß diese Erkenntnisse richtig sind. So wie die unterschiedlichen Krebszellen in verschiedenen Einzelheiten von den normalen Zellen abweichen, unterscheiden sich auch die wirksamsten erfindungsgemäßen Antitumorkompositionen voneinander. Das bedeutet, daß unter Verwendung des synergistischen Zellabtötungseffektes als Kriterium die geeignetste Komposition für den jeweiligen Tumortyp gefunden werden kann. Zum Vorbeugen oder zur Behandlung eines Tumors, dessen Typ nicht bestimmt werden kann, oder falls nicht genügend Zeit zur Verfügung steht, ist es zweckmäßig, die 21 aktive Substanzen enthaltende Komposition anzuwenden. Mit den nächsten Versuchen sollte festgestellt werden, wie allgemein die

Wirkung und wie groß die Effizienz dieser Kompositionen ist.

Die Wirkung der 21 aktive Substanzen enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 auf Humanerythroleukämiezellen K-562 wurde untersucht und mit der Wirkung der bereits erwähnten Kontrollmischung verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 veranschaulicht. Ähnlich wie in Fig. 2 ist auch hier auf der Ordinate die Anzahl der Zellen in Prozent der Anzahl der unbehandelten Zellen angegeben, während die Abszisse (wie auch in Fig. 2) den prozentualen Gehalt an Komposition (und damit an den einzelnen Wirkstoffen) angibt. Die Kurve mit den leeren Kreisen zeigt die Wirkung der Kontrollmischung, die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Komposition. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Kompositionen auch im Fall der Zellen K-562 eine bedeutende tumorzellenabtötende Wirkung aufweisen.

Dann wurde die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 gegen die Zelllinien HeLa (menschliche Gebärmutterhalskrebszellen) und HEp-2 (menschliche Kehlkopfkrebszellen) untersucht und mit der Wirkung der Kontrollmischung verglichen. Dieser Versuch war erforderlich, um festzustellen, ob die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche verallgemeinerbar und unabhängig von eventuell störenden Wirkungen des verwendeten Mediums, der Suspensionstechnik, der Auszählung oder der Nachweismethode sind. Das Überleben der HeLa-, HEp-2- und Vero-Zellen wurde durch Messung der Aktivität des Enzyms endogene alkalische Phosphatase bestimmt. Kurz nach der Inkubation wurden die nicht haftenden (wahrscheinlich verletzten) Zellen durch Waschen entfernt. Dann wurden in jedes Loch 150 µg Substrat für alkalische Phosphatase (4-Nitrophenylphosphat, Sigma tablets No. 111-112), gelöst in 150 µl frisch bereitetem 10 %igem Diethanolaminpuffer (pH 9,8) gegeben. Dann wurden die Platten bei 30 °C so lange inkubiert, bis die Extinktion der unbehandelten Kontrolle einen Wert von etwa 1 erreichte. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 50 µl 3M NaOH abgebrochen. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem Dynatech ELISA reader gemessen. Von den Meßwerten wurden die Blindwerte abgezogen. In Fig. 5 sind die erhaltenen Ergebnisse für HeLa-Zellen, in Fig. 6 für HEp-2-Zellen dargestellt. In beiden Abbildungen ist ähnlich wie in den Fig. 2 und 4 auf der Ordinate die Anzahl der Zellen in Prozent der Zellenanzahl der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Anzahl der Zellen wurde durch die Messung der Extinktion ermittelt. Die Abszisse gibt den prozentualen Gehalt an Komposition (und damit an den einzelnen Wirkstoffen) an. Sowohl in Fig. 5 wie auch in Fig. 6 zeigt die Kurve mit den leeren Kreisen die Wirkung der Vergleichsmischung, die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111. Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß die Kompositionen gegen beide Zelllinien wirksam sind. Besonders wertvoll ist das bei Hep-2 erzielte Ergebnis, denn diese Zelllinie gilt als den Umgebungseinwirkungen widerstehende "hard cell line" [*American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 5th ed., 15-16 (1985)*].

In Einklang mit den theoretischen Grundlagen der Erfindung wirken die Kompositionen demnach selektiv auf die Krebszellen. Um diese Feststellung weiter zu erhärten, wurde die Wirkung der erfindungsgemäßen, 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111 auch auf normale Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze untersucht. Die Ergebnisse sind in der Fig. 7 dargestellt. Auf der Ordinate ist die ebenfalls durch Extinktionsmessung bestimmte Anzahl der Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben, während die Abszisse den prozentualen Gehalt an Komposition (und damit an den einzelnen Wirkstoffen) angibt. Die Kurve mit den leeren Kreisen zeigt die Wirkung der Vergleichsmischung, die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen die Wirkung der 21 Wirkstoffe enthaltenden Kompositionen gemäß den Beispielen 107-111. Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß die Kompositionen auf die normale Vero-Zelllinie keine cytotoxische Wirkung haben, denn die Wirkung der 100 %igen Komposition gemäß Beispiel 107 auf die Proliferation, über die Zeit aufgetragen, würde der in Fig. 3 dargestellten Wirkung der Kontrollmischung entsprechen. Vero ist eine schnell wachsende Zelllinie [*American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 5th ed., pp 45-46 (1985)*], und der Versuch zeigt, daß die erfindungsgemäßen Kompositionen im Gegensatz zu den Cytostatika nicht für alle schnell proliferierenden Zellen toxisch sind, sondern selektiv nur die Krebszellen beeinflussen. Auf Grund dieser Ergebnisse können die erfindungsgemäßen Kompositionen als nicht cytotoxische, antineoplastische Mittel eingestuft werden.

Zur Prüfung der Wirkung der erfindungsgemäßen Kompositionen in vivo wurden Tierversuche

vorgenommen. Bei diesen Versuchen wurden immer die in der Fachliteratur anerkannten Methoden und Bedingungen angewendet. Zu den Versuchen wurden Sp2/0-Ag14-Zellen verwendet. Als Versuchstiere kamen weibliche, 5-6 Wochen alte BALB/c-Mäuse, eingeteilt in zwei Gruppen zu je 10 Tieren, zur Anwendung. Den Tieren wurde i.p.  $5 \cdot 10^4$  Sp2/0-Ag14-Zellen enthaltendes inkomplettes RPMI-1640-Medium in einer Menge von 200  $\mu$ l injiziert. Der Tag der Impfung wurde als der Tag Null des Experimentes betrachtet. Die zu dem Versuch erforderliche Zellanzahl wurde mit einer Tumorgenitätsuntersuchung festgelegt. Die Behandlung der Tiere wurde 24 Stunden nach Einbringen der Zellen begonnen (das ist der erste Tag des Versuches) und 10 Tage lang fortgesetzt. Die Kontrollgruppe erhielt zu jeder Behandlung 200  $\mu$ l PBS (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung), während die Versuchsgruppe mit dem gleichen Volumen der 21 Wirkstoffe enthaltenden Komposition gemäß Beispiel 112 behandelt wird.

Die wirksamste Weise der Behandlung wäre es, den Blutspiegel der Moleküle der Komposition dauernd auf einem konstanten angehobenen Niveau zu halten. Dazu wäre eine Infusion erforderlich. Wegen der technischen Schwierigkeiten wurde eine annähernd kontinuierliche Verabreichungsform gewählt, indem die Tiere sechsmal täglich behandelt wurden. Die Ergebnisse des Versuches sind in Fig. 8 dargestellt. Auf der Abszisse ist die Anzahl der Tage ab Beginn des Versuches, auf der Ordinate die Überlebensrate in Prozent angegeben. Da 10 Mäuse 100 % bedeuten, steht 80 % für 8 Mäuse, usw. Das weiße Säulendiagramm zeigt die Überlebensrate der behandelten Tiere, das schwarze die der unbehandelten Kontrolle. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß am 16. Tag keine der unbehandelten Mäuse mehr überlebte, während alle behandelten Mäuse noch am Leben waren. Die letzte der behandelten Mäuse starb erst am 25. Tag. Es ist ersichtlich, daß durch die Behandlung eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer erzielt wurde. Die mittlere Überlebensdauer der behandelten Gruppe betrug 21 Tage, die der Kontrollgruppe 14 Tage. Der sich aus den mittleren Überlebensdauern errechnende T/C-Wert beträgt 150 % und liegt damit wesentlich über den in der Fachliteratur als Kriterium der Wirksamkeit geforderten 125 %. Auf Grund dieses Wertes kann die erfindungsgemäße Komposition als hochwirksames Antitumormittel für die betreffende Zelllinie bezeichnet werden.

Um sicherzustellen, daß es sich bei dem wahrgenommenen Anstieg der Überlebensdauer tatsächlich um eine toxische Wirkung der Komposition gemäß Beispiel 112 auf die Tumorzellen handelt und nicht um eine starke Roborationswirkung, wurde das folgende Experiment durchgeführt. In der oben beschriebenen Weise wurden je 10 Mäuse behandelt. Nach zehntägiger Behandlung wurden sowohl bei der Kontrolle wie auch bei den behandelten Tieren die Zellen aus der Bauchhöhle entfernt und ihre Zahl bestimmt. Die Differenz zwischen den durchschnittlichen Zellenanzahlen für beide Gruppen ( $5,55 \times 10^5$  beziehungsweise  $5,95 \times 10^7$ ) ist signifikant ( $p < 0,001$ ) und beweist die in vivo Wirkung der erfindungsgemäßen Kompositionen.

Zum weiteren Beweis der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Kompositionen und um ausschließen zu können, daß es sich bei den beschriebenen Ergebnissen nur um eine lokale Wirkung handelt (die in der Bauchhöhle befindliche Zellen wurden i. p. behandelt), wurde ein Versuch mit kongenital immunschwachen, sog. nackten Mäusen (ohne Thymus) vorgenommen. Die Mäuse wurden mit einem festen menschlichen Tumor beimpft. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen und 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c (nu/nu) Mäuse verwendet, und die Zellen wurden in einer Menge von  $5 \times 10^6$  s.c. in den linken Schenkel der Mäuse injiziert. Die Behandlung mit der Komposition gemäß Beispiel 112 wurde begonnen, als der Tumor durchschnittlich eine Größe von  $50 \text{ mm}^3$  erreicht hatte. Der Zeitplan, die Dauer der Behandlung und die verwendeten Lösungen (Beispiel 112) waren die gleichen wie in dem zuvor beschriebenen pharmakologischen Experiment. Die Maße der Tumore (L = Länge, W = Breite und H = Höhe) wurden zweimal wöchentlich mit einer digitalen Schublehre (Mitutoyo, Inc., Tokyo, Japan) festgestellt. Berechnet wurden das Tumorumfang nach der Gleichung  $LWH/2$  und das relative Tumorumfang  $V_t/V_0$  [Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 21, 1253-1260 (1988)], worin  $V_t$  das aktuelle Tumorumfang und  $V_0$  das Tumorumfang zu Beginn der Behandlung ist. Die Ergebnisse sind in der Fig. 9 zusammengestellt. Auf der Ordinate ist der Durchschnitt der für die einzelnen Tiere erhaltenen  $V_t/V_0$ -Werte, auf der Abszisse die Zeit aufgetragen, d.h. es kann abgelesen werden, das Wievielfache der Größe des Ausgangstumors der Tumor an dem jeweiligen Tag erreicht hat. Die mit leeren Kreisen gekennzeichnete Kurve zeigt das relative Tumorumfangwachstum für die unbehandelte Kontrolle, die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen für die behandelten Tiere. Aus der Abbildung ist gut ersichtlich, daß die Behandlung

das Wachstum des Tumors stark verlangsamte. Während bei den Kontrollmäusen das durchschnittliche relative Tumolvolumen zum Beispiel nach 16,5 Tagen das Neunfache des Anfangswertes erreichte, war für das gleiche Wachstum bei den behandelten Mäusen eine Zeit von 33 Tagen erforderlich. Wird aus dem Durchschnitt der für die behandelten und unbehandelten Tiere erhaltenen  $V_t/V_0$ -Werte der Quotient gebildet und mit 100 multipliziert, so erhält man T/C-% Werte. Die T/C-Prozentwerte waren bei allen beschriebenen Versuchen kleiner als 42 %; dieser Wert wird als Kriterium der Wirksamkeit akzeptiert [*Europ. J. Cancer*, 17, 129-142 (1981)]. Der Versuch zeigt erneut, daß die erfindungsgemäße Komposition eine starke Antitumorwirkung hat. Die beschriebenen Ergebnisse sind besonders vielversprechend, wenn man berücksichtigt, daß die Versuche durchaus nicht mit optimalsten Behandlungsmethoden beziehungsweise der maximal tolerierbaren Dosis vorgenommen wurden und daß in Krankenhäusern die Behandlung viel wirksamer vorgenommen werden kann (über längere Zeit, kontinuierliche Wirkung zum Beispiel durch Infusion).

Da die während einer Behandlung eintretende Änderung des Körpergewichtes ein brauchbarer und allgemein angewendeter Index für die Beurteilung der Toxizität einer Behandlung ist, wurde in dem oben geschilderten Experiment auch das Gewicht der Tiere gemessen. Gemäß der Literatur ist ein Mittel toxisch, wenn es eine Verminderung des Körpergewichtes um 10-15 % verursacht [*J. Cancer. Clin. Oncol.*, 21, 1253-1260 (1988)]. In dem beschriebenen Versuch war die durchschnittliche Änderung des Körpergewichtes  $-5,9 \pm 4,1\%$  in der Kontrollgruppe und  $-6,6 \pm 3,9$  in der behandelten Gruppe. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist nicht signifikant. Das bedeutet, daß die Komposition keine toxischen Nebenwirkungen hat.

Um zu prüfen, ob die erfindungsgemäßen Kompositionen zum Vorbeugen gegen Krebserkrankungen geeignet sind, wurden pro Komposition je zwei Gruppen Mäuse (10 Tiere pro Gruppe) wie folgt behandelt: das Futter der zu behandelnden Tiere wurde im Verhältnis 1:1 mit den Kompositionen gemäß den Beispielen 113-121 vermischt und stand ad libitum zur Verfügung. Fünf Tage nach Beginn der Behandlung wurden alle Tiere mit  $1 \times 10^4$  Sp2/0-Ag14-Zellen i. p. inokuliert. Die Behandlung wurde 100 Tage lang fortgesetzt. Die mit dem 1:1-Gemisch aus Futter und den Kompositionen gemäß den Beispielen 113-121 und die mit normalem Futter gefütterten Tiere zeigten kein Tumorstadium i. p., als sie am 100. Tag getötet wurden. Die Überlebensdauer der unbehandelten Kontrolle betrug in den einzelnen Gruppen 21-26 Tage.

Abhängend von Dosis und Behandlungsart bestehen für die erfindungsgemäßen Kompositionen die folgenden Hauptanwendungsmöglichkeiten: Vorbeugung, Hemmung von Tumorstadium bei AIDS und nach Transplantationen, Verhinderung der Bildung von Metastasen, Adjuvantbehandlung beziehungsweise direkte Therapie von krebserkrankten Patienten.

Die Hauptvorteile der erfindungsgemäßen Kompositionen sind folgende:

a) In entsprechenden Dosen können die Kompositionen zum Vorbeugen gegen Krebserkrankungen, zur Verhinderung des Entstehens von Tumoren bei AIDS und nach Transplantationen, zur Verhinderung der Bildung von Metastasen und für die direkte, adjuvante oder kombinierte Behandlung und Heilung von Krebserkrankungen verwendet werden.

b) Sie sind nicht toxisch. Die Toxizitätsuntersuchungen auf der Basis von Körpergewichtsmessungen haben ergeben, daß die Kombinationen nicht toxisch sind. Nach Literaturdaten ist die Toxizität der Komponenten gering, und sie nimmt noch weiter ab, wenn die Komponenten zusammen angewendet werden. Außerdem werden diese Substanzen von Primaten besser toleriert als von den kleinen Versuchstieren, die zum Bestimmen der Toxizitätswerte verwendet wurden. Auf Grund dessen kann gesagt werden, daß die Kompositionen nicht toxisch sind.

c) Sie haben entweder überhaupt keine oder vernachlässigbar geringe Nebenwirkungen. Betreffend die Nebenwirkungen hat sich schon viel Beobachtungsmaterial angesammelt, denn fast alle der Komponenten der Komposition sind (mit Ausnahme der Desoxyribose) in unterschiedlichen Therapien (nur die Ascorbinsäure auch in der Krebstherapie) oder als Lebensmittelzusatz bereits zum Einsatz gekommen. Auf Grund der im Zuge dieser Anwendungen gesammelten Erfahrung ist vollkommen gesichert, daß die Komponenten in den zur Anwendung kommenden Dosen keine Nebenwirkungen aufweisen.

d) Die Kompositionen sind selektiv. Die Selektivität ist durch die vorgenommenen Experimente bewiesen, wobei gezeigt werden konnte, daß die Kompositionen toxisch für unterschiedliche Krebszellen, für die normalen Vero-Zellen, für die Versuchstiere und damit auch für deren normale Zellen nicht toxisch sind. Die Selektivität wird noch dadurch erhöht, daß die Anzahl der normalen

Zellen viel größer ist als die der Krebszellen und außerdem in den Tumorzellen die Bestandteile der Komposition angehäuft werden, während in normalen Zellen die Aufnahme reguliert ist.

e) Die Kompositionen können verbreitet angewendet werden, ihre Wirkung ist umfassend. Die Wirkung wurde für ein Myelom der Maus (Sp2/0-Ag14), für menschliche Erythroleukämie (K-562), ein menschliches Epitheloidkarzinom (HeLa) und einem menschlichen Kehlkopfkrebs (HEp-2) nachgewiesen. Diese Krebsarten umfassen ein breites Spektrum, es sind Tumore von Menschen und Tumore von Tieren darunter, unter den Tumoren menschlichen Ursprungs sind sogar Leukämie und zwei völlig verschiedene feste Tumore zu finden. Die für diese sehr unterschiedlichen Zelllinien erhaltenen Ergebnisse belegen die breite Anwendbarkeit und umfassende Wirkung der Kompositionen.

f) Die Kompositionen sind leicht herstellbar, die einzelnen Komponenten haben eine geringe Molmasse und sind leicht beschaffbar. Auch die Herstellung der Kompositionen ist einfach.

g) Die Kompositionen sind wasserlöslich, daher ist ihre Dosierung einfach.

### PATENTANSPRÜCHE:

1. Verwendung einer Komposition zur Herstellung eines Medikaments zum Vorbeugen und Heilen von Krebserkrankungen, welche Komposition von den im Kreislauf vorkommenden Verbindungen wenigstens drei enthält: wenigstens eine Aminosäure, wenigstens ein Vitamin und wenigstens eine von den folgenden Verbindungen: Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze der aufgeführten Stoffe.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition neben den Wirkstoffen die in der Arzneimittelherstellung üblichen Trägerstoffe, Verdünnungsmittel und sonstigen Hilfsstoffe enthält.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition als Aminosäure L-Methionin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Histidin, N-Benzoylglycin und/oder deren Salze enthält.
4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition als Vitamin d-Biotin, Pyridoxin, Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat, L-Ascorbinsäure, Liponsäure, Orotsäure und/oder deren Salze enthält.
5. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition L-Tryptophan, L-Ascorbinsäure und wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Glucosamin und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthält.
6. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition L-Arginin, Riboflavin-5'-phosphat und wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe D-Mannose, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthält.
7. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition in einer Menge von 0,002-70 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe L-Methionin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Histidin, N-Benzoylglycin und/oder deren Salze als Aminosäure, in einer Menge von 0,0004-80 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe d-Biotin, Pyridoxin, Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat, L-Ascorbinsäure, Liponsäure, Orotsäure und/oder deren Salze als Vitamin und in einer Menge von 0,003-80 Masse% wenigstens eine Verbindung aus der Gruppe Adenin, 2-Desoxy-D-ribose, D-Mannose, D-Glucosamin, Oxalessigsäure, Adenosintriphosphat und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthält.
8. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition 0,9-25 % Masse% L-Methionin, 0,8-19 Masse% L-Tryptophan, 1,1-48 Masse% L-Arginin, 0,9-46 Masse% d-Biotin, 1,2-16 Masse% Pyridoxin, 0,03-42 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,05-18 Masse% D-Glucosamin, 0,5-60 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,6-40 Masse% D-Mannose und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthält.
9. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komposition 0,005-34 % Masse% L-Methionin, 0,002-25 Masse% L-Tryptophan, 0,02-23 Masse% L-Tyrosin, 0,04-30 Masse% L-Phenylalanin, 0,04-50 Masse% L-Arginin, 0,03-34 Masse% L-Histidin,

**AT 408 414 B**

0,05-22 Masse% N-Benzoylglycin, 0,01-60 Masse% d-Biotin, 0,01-20 Masse% Pyridoxin, 0,0004-45 Masse% Riboflavin, 0,0005-45 Masse% Riboflavin-5'-phosphat, 0,003-70 Masse% L-Ascorbinsäure, 0,004-15 Masse% Liponsäure, 0,01-17 Masse% Orotsäure, 0,001-10 Masse% Adenin, 0,01-63 Masse% 2-Desoxy-D-ribose, 0,08-42 Masse% D-Mannose, 0,05-20 Masse% D-Glucosamin, 0,02-60 Masse% Oxalessigsäure, 0,001-10 Masse% Adenosintriphosphat und/oder die physiologisch verträglichen Salze dieser Verbindungen enthält.

5

10

**HIEZU 5 BLATT ZEICHNUNGEN**

15

20

25

30

35

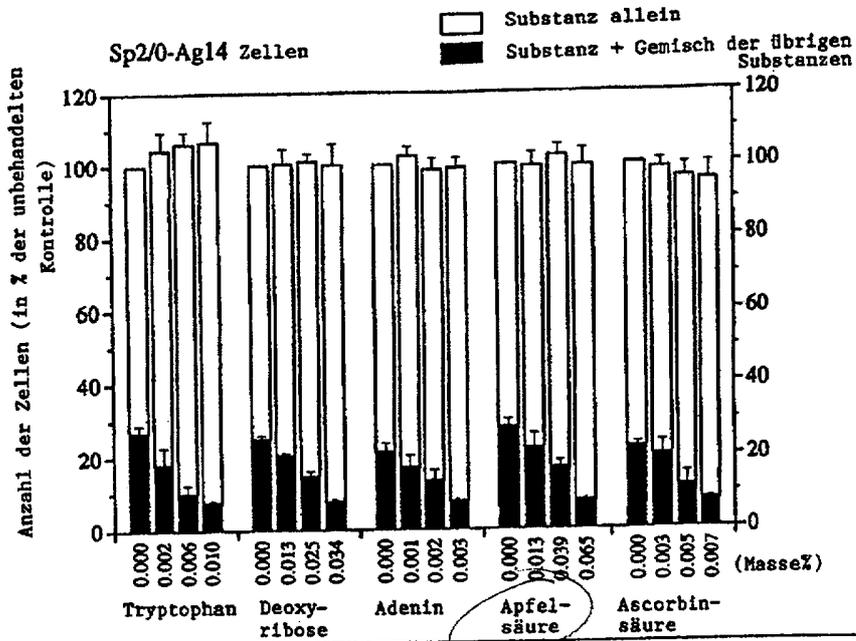
40

45

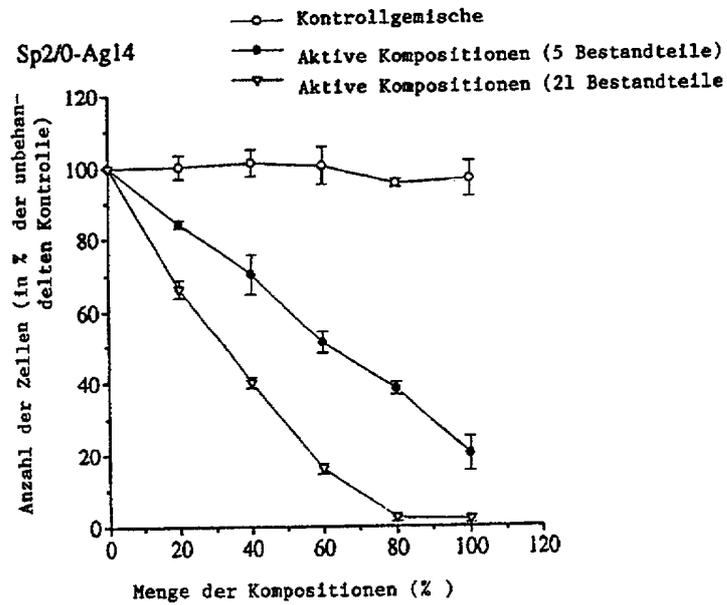
50

55

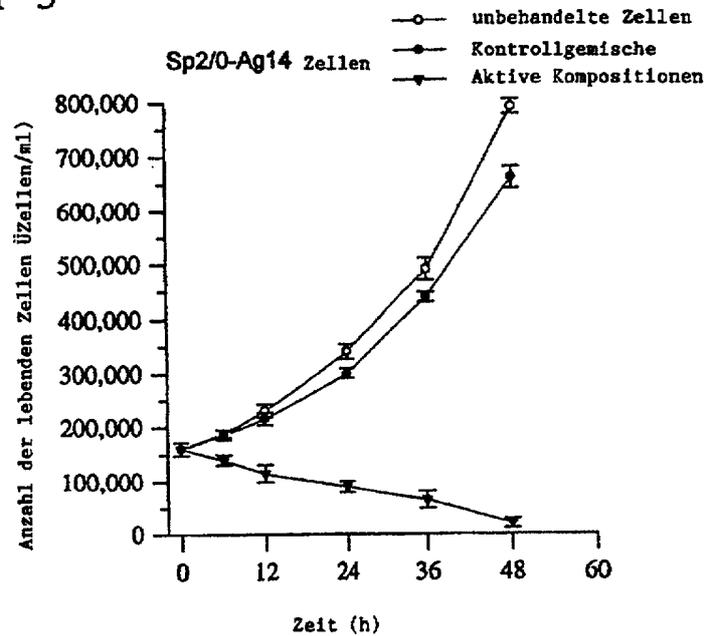
Figur 1



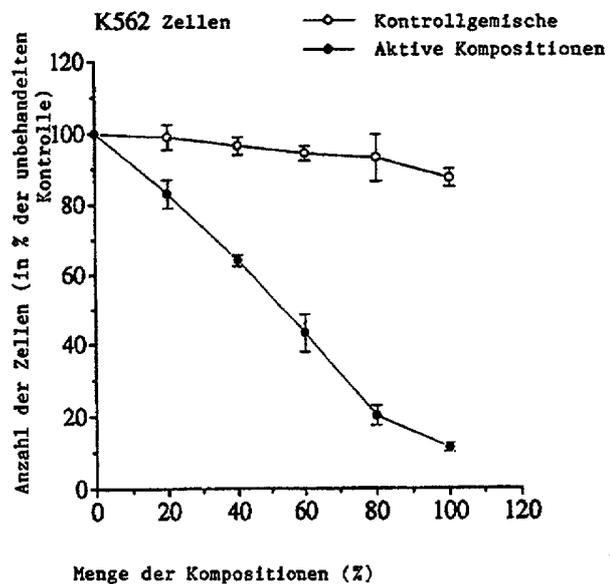
Figur 2



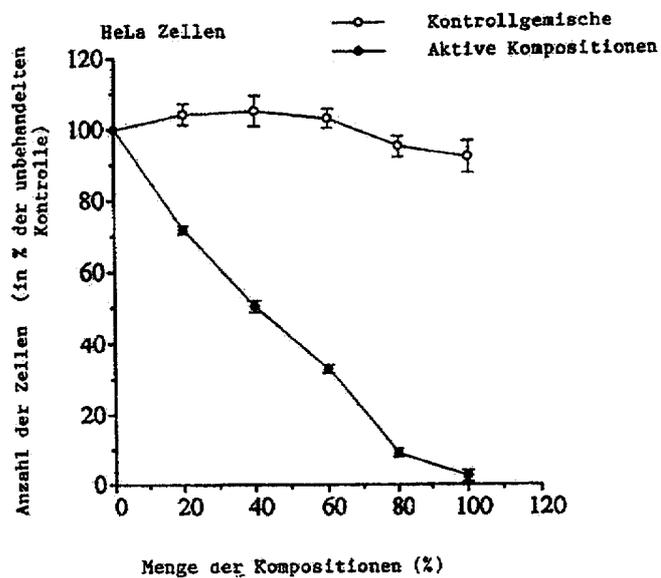
Figur 3



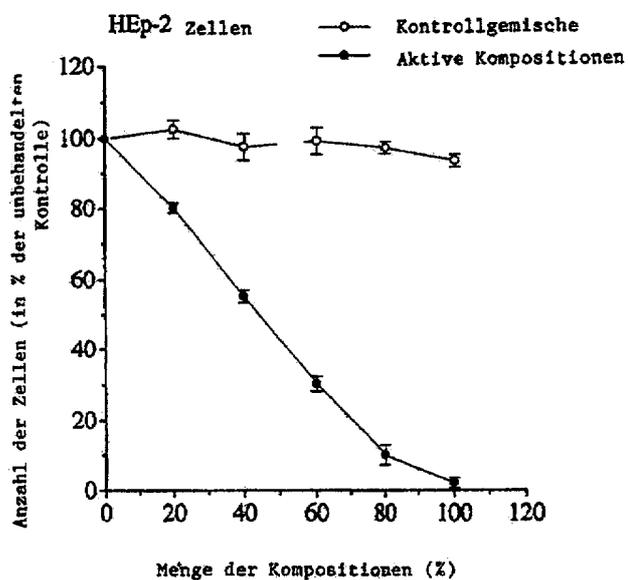
Figur 4



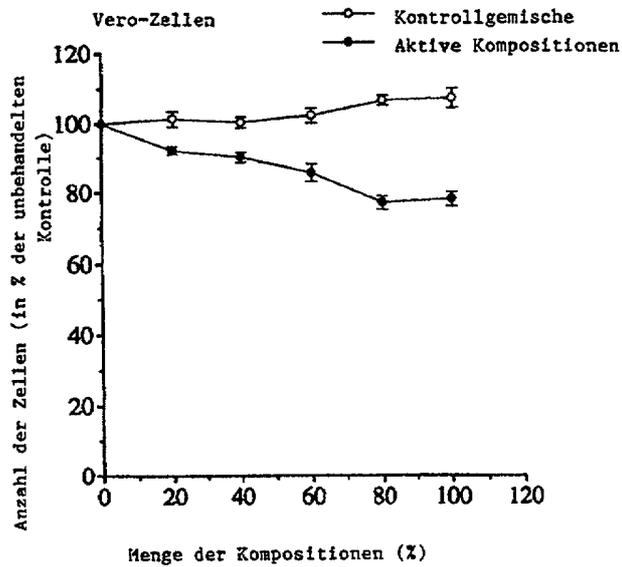
Figur 5



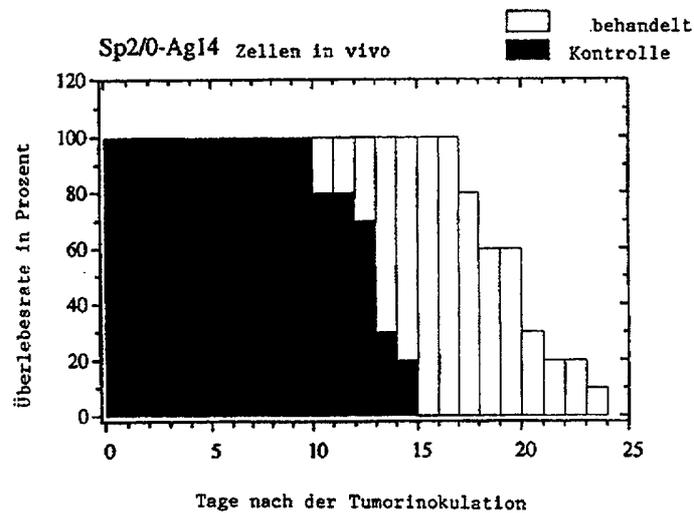
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

