



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 26 847 T3** 2010.05.12

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 975 340 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 26 847.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/06322**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 914 366.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/043618**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **08.10.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **28.10.2009**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.05.2010**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/335** (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

829685 **31.03.1997** **US**

829991 **31.03.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Boston Scientific Ltd., St. Michael, Barbados, BB

(74) Vertreter:

Fish & Richardson P.C., 80807 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**KUNZ, L., Lawrence, Redmond, US; KLEIN, A.,
Richard, Edmonds, US; RENO, M., John, Brier, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON CYTOSKELETTINHIBITOREN ZUR VORBEUGUNG DER RESTENOSE**

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**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) wird bei vielen Patienten mit koronarer Arterienkrankung als die wichtigste Behandlungsmethode weithin angewendet. PTCA kann die Herzmuskelschämie bei Patienten mit koronarer Arterienkrankung durch Verminderung des Lumenverschlusses abbauen und den koronaren Blutdurchfluss verbessern. Die Verwendung dieser chirurgischen Prozedur hat mit 39.000 Prozeduren, die im Jahr 1983 durchgeführt wurden, mit nahezu 150.000 Prozeduren im Jahr 1987, mit 200.000 im Jahr 1988, mit 250.000 im Jahr 1989 und mit über 500.000 geschätzten PTCA's für das Jahr 1994 schnell zugenommen (Popma et al., Amer. J. Med., 88: 16N–24N (1990); Fanelli et al., Amer. Heart Jour., 119: 357–368 (1990); Johnson et al., Circulation, 78: (Suppl. II): II–82 (1988)). Die auf die PTCA-Prozedur folgende Stenose bleibt bei 25% bis 35% der Patienten, die innerhalb von ein bis drei Monaten eine Restenose entwickeln, ein signifikantes Problem. Restenose resultiert in einer signifikanten Krankheitsziffer und Sterberate und macht häufig weitere Eingriffe wie beispielsweise eine Wiederholung der Angioplastie oder einen chirurgisch durchgeführten koronaren Bypass notwendig. Von 1993 an hat sich kein chirurgischer Eingriff oder eine nach-chirurgische Behandlung als wirksam in der Vermeidung von Restenose erwiesen.

[0002] Die Prozesse, die für eine Stenose nach einer PTCA verantwortlich sind, werden nicht völlig verstanden, können aber aus einem komplexen Zwischenspiel zwischen unterschiedlichen biologischen Wirkstoffen und Wegen resultieren. In histologischen Schnitten betrachtet, können Restenose-Läsionen ein übermäßiges Wachstum der Zellen der glatten Muskulatur in den intimalen Schichten der Blutgefäße aufweisen (Johnson et al., Circulation, 78 (Suppl II): II–82 (1988)). Einige mögliche Mechanismen für die Zellproliferation der glatten Muskulatur nach einer PTCA wurden bereits vorgeschlagen (Popma et al., Amer. J. Med., 88 16N–24N (1990); Fanelli et al., Amer. Heart Jour., 119: 357–368 (1990); Liu et al., Circulation, 79: 1374–1387 (1989); Clowes et al., Circ. Res., 56: 139–145 (1985)).

[0003] Verbindungen, von denen berichtet wurde, dass sie die in vitro-Proliferation der glatten Muskulatur unterdrücken (Liu et al., Circulation, 79: 1374–1387 (1989); Goldman et al., Atherosclerosis, 65: 215–225 (1987); Wolinsky et al., JACC, 15 (2): 475–481 (1990)), können unerwünschte pharmakologische Nebenwirkungen hervorrufen, wenn sie in vivo angewendet werden. Heparin ist ein Beispiel einer solchen Verbindung, die, wie berichtet wurde, die Zellproliferation der glatten Muskulatur in vitro inhibiert, aber, wenn sie in vivo angewendet wird, den potenziell nachteiligen Nebeneffekt der Inhibierung der Koagulation hat. Heparinpeptide, die eine reduzierte Aktivität bezüglich der Anti-Koagulation aufweisen, haben die unerwünschte pharmakologische Eigenschaft, eine kurze pharmakologische Halbwertszeit zu besitzen. Es sind Versuche unternommen worden, solche Probleme durch Verwendung eines doppelten Ballon-Katheters zu lösen, beispielsweise für die örtliche Zuführung des therapeutischen Wirkstoffes an den Ort der Angioplastie (z. B. Nabel et al., Science, 244: 1342–1344 (1989); U.S. Patent Nr. 4,824,436) sowie durch Verwendung bioabbaubarer Materialien, die mit einem Arzneimittel imprägniert sind, um die Probleme der kurzen Halbwertszeit zu kompensieren (z. B. Middlebrook et al., Biochem. Pharm., 38: (18) 3101–3110 (1989); U.S. Patent Nr. 4,929,602).

[0004] Wenigstens fünf Gesichtspunkte scheinen auf den ersten Blick die Verwendung von inhibierend wirkenden Arzneimitteln zur Verhinderung der Stenose, die aus einem übermäßigen Wachstum der Zellen der glatten Muskulatur resultiert, auszuschließen. Erstens können inhibierend wirkende Wirkstoffe eine systemische Toxizität aufweisen, was zu einem nicht akzeptablen Risiko für den Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung führt. Zweitens können inhibierend wirkende Wirkstoffe störend in die vaskuläre Wundheilung eingreifen, die auf eine Operation folgt, und können daher entweder den Heilungsprozess verschieben oder die Struktur oder die Elastizität der frisch verheilten Gefäßwandungen schwächen. Drittens können inhibierend wirkende Wirkstoffe, welche die Zellen der glatten Muskulatur abtöten, das umgebende Endothelium und/oder andere mediale Zellen der glatten Muskulatur zerstören. Tote und absterbende Zellen setzen auch mitogen wirkende Wirkstoffe frei, die zusätzlich die Zellproliferation der glatten Muskulatur anregen und eine Stenose verschlimmern können. Viertens kann die Zufuhr therapeutisch wirksamer Mengen eines inhibierend wirkenden Wirkstoffes unter einigen Gesichtspunkten problematisch sein. Nämlich a) es kann die Zufuhr einer großen Zahl von Molekülen in die interzellulären Räume zwischen den Zellen der glatten Muskulatur nötig sein, beispielsweise um günstige Bedingungen zu erzeugen, die es einer therapeutisch wirksamen Dosierung von Molekülen erlauben, die Zellmembran zu durchqueren, b) es kann schwierig sein, das Einbringen eines inhibierend wirkenden Arzneimittels in den geeigneten intrazellulären Abschnitt zu kontrollieren, beispielsweise dort wo er seine Wirkung ausüben soll, und c) kann es schwierig sein, die Assoziation des inhibierend wirkenden Arzneimittels mit seinem intrazellulären Ziel, beispielsweise einem Ribosom, unter Minimierung der interzellulären Umverteilung des Arzneimittels, beispielsweise an Nachbarzellen, zu optimieren. Fünftens sollte, da die

Zellproliferation der glatten Muskulatur über einige Wochen stattfindet, es auch a priori so sein, dass die inhibierend wirkenden Arzneimittel gleichfalls über einige Wochen verabreicht werden sollten, möglicherweise kontinuierlich, um eine günstige Wirkung zu erzeugen.

[0005] Aus dem Vorhergehenden wird offensichtlich, dass viele Probleme übrig bleiben, die bei der Verwendung von inhibierend wirkenden Arzneimitteln zu lösen sind, um die Zellproliferation der glatten Muskulatur wirkungsvoll behandeln zu können.

[0006] Deshalb besteht ein Bedarf nach einer Methode, mit der Stenose als Folge der Proliferation der vaskulären Zellen der glatten Muskulatur als Folge einer traumatischen Verletzung der Gefäße, wie sie während der vaskulären Operation eintritt, zu inhibieren oder zu reduzieren. Es besteht auch ein Bedarf danach, Verbindungen den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zuzuführen, die inhibierend wirkende Effekte über ausgedehnte Zeitspannen ausüben.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung sieht eine Vorrichtung gemäß den Patentansprüchen vor. In der Ausübung der vorliegenden Erfindung beinhalten bevorzugte Cytoskelettinhibitoren beispielsweise Taxol und Analoge oder Derivate davon, wie beispielsweise Taxotere oder ein Cytochalasin, wie beispielsweise Cytochalasin B, Cytochalasin C, Cytochalasin D oder Analoge oder Derivate davon. Die Verabreichung eines solchen Cytoskelettinhibitors wirkt so, dass das Blutgefäß biologisch mit einem Stent versehen, die vaskuläre Umgestaltung des Blutgefäßes inhibiert oder reduziert, die Zellproliferation der vaskulären glatten Muskulatur inhibiert oder reduziert werden, oder eine beliebige Kombination davon. Die Verabreichung der Cytoskelettinhibitoren wird vorzugsweise während der Prozedur durchgeführt, die das Blutgefäß traumatisiert, beispielsweise während der Angioplastie oder während einer anderen vaskulären chirurgischen Prozedur. Die Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammenstellungen und Dosierungsformen zur Verfügung, die Cytoskelettinhibitoren zur Anwendung im vorliegenden Verfahren beinhalten, genauso wie Kits, die diese enthalten.

[0008] Deshalb können Arzneimittel, pharmazeutische Zusammenstellungen und Dosierungsformen, wie sie hierin beschrieben sind, als ein biologischer Stent für ein traumatisiertes Säugerblutgefäß verwendet werden. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „biologischer Stent“ die Fixierung des vaskulären Lumens in einem erweiterten Zustand nahe seines maximalen systolischen Durchmessers. Das Verfahren der Behandlung eines Blutgefäßes mit einem biologischen Stent umfasst die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Cytoskelettinhibitors in das Blutgefäß. Vorzugsweise wird der Cytoskelettinhibitor in einem pharmazeutisch akzeptablen flüssigen Träger dispergiert, beispielsweise ungefähr 0.1 bis ungefähr 10 µg Cytochalasin B pro ml Vehikel, und wird vorzugsweise örtlich über einen Katheter verabreicht. Vorzugsweise dringt ein Teil der verabreichten Menge wenigstens in ungefähr sechs bis neun Zellschichten der inneren Tunica des Blutgefäßes ein und wirkt auf diese Art und Weise im Blutgefäß als biologischer Stent. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung enthalten ein Cytochalasin oder ein Analoges davon, das in einem pharmazeutisch akzeptablen flüssigen Träger in einer Menge von ungefähr 0,001 bis ungefähr 25 µg/ml des wässrigen Vehikels dispergiert ist.

[0009] Bevorzugte Bedingungen für die Verabreichung mittels eines Katheters beinhalten die Anwendung eines Katheters, um ungefähr 4 bis ungefähr 25 ml einer Zusammenstellung zuzuführen, die den Cytoskelettinhibitor umfasst, der in einem pharmazeutisch akzeptablen flüssigen Vehikel dispergiert oder gelöst ist. Der Cytoskelettinhibitor wird bei einem Anlagedruck von ungefähr 3 bis ungefähr 8 atm zugeführt, mehr bevorzugt von ungefähr 4 bis ungefähr 5 atm, während ungefähr 0,5 bis ungefähr 5 Minuten, mehr bevorzugt während etwa 0,7 bis ungefähr 3 Minuten. Bevorzugte hydrostatische Kopfdrucke für die Verabreichung mit einem Katheter beinhalten ungefähr 0,3 bis ungefähr 1,0 atm, mehr bevorzugt ungefähr 0,5 bis ungefähr 0,75 atm. Die Menge an Cytoskelettinhibitor wird so gesteuert, dass es den vaskulären Zellen der glatten Muskulatur möglich ist, weiterhin Protein zu synthetisieren, das erforderlich ist, um ein kleineres Zelltrauma zu reparieren und die interstitielle Matrix zu sekretieren, wobei die Fixierung des vaskulären Lumens in einem gedehnten Zustand nahe seines maximalen systolischen Durchmessers ermöglicht wird, d. h. um ein Blutgefäß mit einem biologischen Stent zu versehen. Vorzugsweise wird der Cytoskelettinhibitor direkt oder im Wesentlichen direkt in den traumatisierten Bereich des Gewebes der vaskulären glatten Muskulatur verabreicht.

[0010] Die Medikamente, pharmazeutische Zusammenstellungen und Dosierungsformen können dazu verwendet werden, das vaskuläre Umformen eines traumatisierten Säugerblutgefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren, indem man eine wirksame Menge des Cytoskelettinhibitors in das traumatisierte Blutgefäß verabreicht.

[0011] Wie hierin weiter unten beschrieben wird, zeigte eine Studie bezüglich des Dosisansprechverhaltens, dass Cytochalasin B einen zweifach logarithmischen therapeutischen Index (TI) hatte. Ein großer therapeutischer Index erlaubt die Diffusion der therapeutischen Mengen des Wirkstoffes aus dem Zuführungssystem, beispielsweise einer implantierbaren Vorrichtung, ohne Toxizität bezüglich der Zellen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der Auslassöffnung des Systems befinden. Darüber hinaus konnte nur eine geringe oder keine Toxizität in Zellen beobachtet werden, die sich in Nachbarschaft des Zuführungssystems befinden, sogar bei maximaler Konzentration des Cytochalasin B in einem flüssigen Vehikel. Es wurde auch gefunden, dass Cytochalasin B und Taxol sowohl die intimale Proliferation in Blutgefäßen inhibieren, die einem in Folge einer Prozedur auftretenden vaskulären Trauma unterworfen wurden. Diese Inhibierung resultiert in einer schnelleren und vollständigeren Endothelisierung der Blutgefäßwand, die auf das Trauma folgt.

[0012] Insbesondere können die Arzneimittel, Zusammenstellungen und Dosierungsformen dazu verwendet werden, die Abnahme im Blutgefäßlumenvolumen zu reduzieren oder zu inhibieren, die als Folge einer durch eine Prozedur bewirkten Traumatisierung im Säugerblutgefäß auftritt. Bei solchen Methoden wird eine wirksame Menge des Cytoskeletthinhibitors dem Blutgefäß eines Säugetieres verabreicht, wobei der Cytoskeletthinhibitor im Wesentlichen in reiner im Wesentlichen kristalliner Form vorliegt, und wobei die Kristalle eine Größe besitzen, die in einer anhaltenden Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors resultiert. Vorzugsweise besitzen die Kristalle eine Größe von ungefähr 0,1 Mikron bis ungefähr 10 mm, vorzugsweise ungefähr 1 Mikron bis ungefähr 25 Mikron. Methoden zur Bestimmung der Größe der Kristalle, die für eine anhaltende Freisetzung verwendet werden, sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt. Vorzugsweise wird der Cytoskeletthinhibitor in situ mittels einer implantierbaren Vorrichtung verabreicht, wobei der Cytoskeletthinhibitor freisetzbar eingebettet ist in, oder beschichtet ist auf, oder eingebettet ist in und beschichtet ist auf, der implantierbaren Vorrichtung. Vorzugsweise ist der kristalline Cytoskeletthinhibitor freisetzbar eingebettet in oder dispergiert in einer adventiziellen Umhüllung, beispielsweise einer Silikonmembran. Beispielsweise umfasst eine bevorzugte therapeutische implantierbare Vorrichtung der Erfindung ungefähr 5 bis ungefähr 70, vorzugsweise ungefähr 7 bis ungefähr 50, und mehr bevorzugt ungefähr 10 bis ungefähr 30 Gewichtsprozent an Cytochalasin, beispielsweise Cytochalasin B oder ein Analoges davon, pro Gewichtsprozent der adventiziellen Umhüllung. Eine weitere bevorzugte therapeutische implantierbare Vorrichtung der Erfindung umfasst ungefähr 1 bis ungefähr 70, vorzugsweise ungefähr 2 bis ungefähr 50 und noch mehr bevorzugt ungefähr 3 bis ungefähr 10 Gewichtsprozent an Taxol oder ein Analoges davon pro Gewichtsprozent der adventiziellen Umhüllung. Alternativ dazu umfasst eine bevorzugte therapeutische implantierbare Vorrichtung der Erfindung ungefähr 30 bis ungefähr 70, vorzugsweise ungefähr 30 bis ungefähr 60 und noch mehr bevorzugt ungefähr 30 bis ungefähr 50 Gewichtsprozent an Taxol oder einem Analogen davon pro Gewichtsprozent der adventiziellen Umhüllung. Alternativ dazu kann der kristalline Cytoskeletthinhibitor in einem Vehikel suspendiert werden, welches eine Lösung ergibt, die die Kristalle umfasst, d. h. dass dies eine gesättigte Lösung ist.

[0013] Deshalb ist nach einem ersten Gesichtspunkt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Dosierungsform vorgesehen, die einen Cytoskeletthinhibitor umfasst, wobei der Cytoskeletthinhibitor im Wesentlichen in kristalliner Form vorliegt und wobei die Kristalle eine Größe besitzen, die in einer anhaltenden Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors resultiert, für die Herstellung eines Arzneimittels, um die Abnahme der Gefäßlumenfläche eines durch eine Prozedur traumatisierten Säugerblutgefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren, wobei besagte Dosierungsform dem Säugerblutgefäß verabreicht wird.

[0014] Nach einem zweiten Aspekt ist die Verwendung einer Dosierungsform vorgesehen, die ein Cytochalasin oder ein Analoges davon in einer festen Form in einer nicht-flüssigen Matrix für die Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung oder Reduzierung der Abnahme der Gefäßlumenfläche eines Säugerblutgefäßes umfasst, wobei besagte Dosierungsform dem Säugerblutgefäß verabreicht wird, wobei die nicht-flüssige Matrix ein Gel, eine Paste oder eine Membran ist.

[0015] Die Kristalle können dem Blutgefäß als eine Emulsion oder als eine Mikroemulsion verabreicht werden. Die Menge des Cytoskeletthinhibitors ist wirksam, um die Abnahme der Gefäßlumenfläche des Säugerblutgefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren. Vorzugsweise liegt die Emulsion oder die Mikroemulsion in einer Dosierungsform vor, die die anhaltende Freisetzung ermöglicht. Vorzugsweise besitzen die Teilchen der Mikroemulsion einen Durchmesser von ungefähr 5 nm bis 1.000 nm und mehr bevorzugt von ungefähr 30 nm bis ungefähr 300 nm.

[0016] Die Kristalle können Mikropartikel oder Nanopartikel umfassen, die den Cytoskeletthinhibitor umfassen, beispielsweise Cytochalasin, Taxol oder Analoge davon. Die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung wird durch eine implantierbare Vorrichtung verabreicht, die kein Katheter ist, und die vorzugsweise kein Katheter ist mit dem eine blutfreie Angioplastie durchgeführt werden kann. Die Menge, welche verabreicht wird, ist

wirksam, um die Abnahme der Gefäßlumenfläche eines Säugerblutgefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren. Die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung umfasst vorzugsweise Mikropartikel mit einem Durchmesser von 4 bis ungefähr 50 Mikron. Die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung kann auch vorzugsweise ungefähr 2 bis ungefähr 50, und mehr bevorzugt mehr als 3 und weniger als 10 Mikron im Durchmesser umfassen. Für Nanopartikel beinhalten bevorzugte Größen ungefähr 10 bis ungefähr 5.000, mehr bevorzugt ungefähr 20 bis ungefähr 500 und noch mehr bevorzugt ungefähr 50 bis ungefähr 200 nm.

[0017] Deshalb stellt die Erfindung ein Medikament für die Verabreichung in ein Säugerblutgefäß zur Verfügung, das durch eine Prozedur traumatisiert wurde, das eine im Wesentlichen reine im Wesentlichen feste Form eines Cytochalasins oder eines Analogen davon enthält, und wirksam ist, die Abnahme der Gefäßlumenfläche des Säugerblutgefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren. Bevorzugte feste Formen beinhalten, ohne aber darauf beschränkt zu sein, Mikropartikel oder Nanopartikel, die das Cytochalasin oder das Analoge davon umfassen, Kristalle oder Mikrokristalle des Cytochalasins oder Analoge davon, Mikropartikel oder Nanopartikel, die Kristalle oder Mikrokristalle des Cytochalasins oder von Analogen davon umfassen, oder ein Gel oder eine Paste, die das Cytochalasin oder ein Analoges davon umfassen.

[0018] Es wird gleichfalls ein Kit zur Verfügung gestellt, das separat abgepackt, wenigstens eine implantierbare Vorrichtung umfasst, die für die in situ-Zuführung angepasst ist, vorzugsweise für die örtliche Zuführung wenigstens eines Cytoskeletthinhibitors an einen Ort im Lumen des traumatisierten Säugerblutgefäßes, und wenigstens eine Einheitsdosierungsform des Cytoskeletthinhibitors wie vorstehend beschrieben, die der Zuführung mittels besagter Vorrichtung angepasst ist. Die Zuführung der Einheitsdosierungsform zum traumatisierten Gefäß mittels der Vorrichtung ist wirksam als biologischer Stent, ist wirksam bezüglich der Inhibierung oder Reduzierung der vaskulären Umformung des Gefäßes, der Inhibierung oder Reduzierung der Zellproliferation der vaskulären glatten Muskulatur, oder einer beliebigen Kombination davon.

[0019] Die Einheitsdosierungsform kann den kristallinen Cytoskeletthinhibitor in einer Emulsion oder in einer Mikroemulsion umfassen, die wenigstens einen Cytoskeletthinhibitor umfasst. Die Zuführung der Einheitsdosierungsform über die Vorrichtung zum traumatisierten Säugergefäß wirkt so, dass die Abnahme im Gefäßlumendurchmesser im Gefäß inhibiert oder zu reduziert wird.

[0020] Die Einheitsdosierungsform kann alternativ den kristallinen Cytoskeletthinhibitor in Mikropartikeln oder Nanopartikeln umfassen, beispielsweise Taxol oder ein Analoges davon. Vorzugsweise umfasst das Kit auch eine zweite Einheitsdosierungsform, die ein pharmazeutisch akzeptables flüssiges Trägervehikel zum Dispergieren besagter Mikropartikel oder besagter Nanopartikel vor der Zuführung umfasst. Die Zuführung der dispergierten Mikropartikel oder Nanopartikel zum traumatisierten Säugergefäß bewirkt, dass die Abnahme des Gefäßlumendurchmessers im Gefäß inhibiert oder reduziert wird.

[0021] Eine weitere Ausführungsform ist eine pharmazeutische Zusammenstellung, die geeignet ist, mittels einer implantierbaren Vorrichtung verabreicht zu werden. Die Zusammenstellung umfasst eine Menge eines Cytochalasins oder eines Analogen davon (vorzugsweise im Wesentlichen in reiner Form) in fester Form, vorzugsweise kristallin, die so wirkt, dass die Stenose oder Restenose eines Säugergefäßes, das durch eine chirurgische Prozedur traumatisiert wurde, inhibiert oder reduziert wird; und eine pharmazeutisch akzeptable nicht-flüssige Freisetzungsmatrix für besagtes Cytochalasin oder einem Analogen davon, wobei die nicht-flüssige Freisetzungsmatrix ein Gel, eine Paste oder eine Membran ist, beispielsweise eine Silikonmembran, und die Vorrichtung ein Shunt oder eine adventizielle Umhüllung ist.

[0022] Es ist auch eine pharmazeutische Zusammenstellung vorgesehen, die eine Menge eines im Wesentlichen reinen festen Cytochalasins oder eines Analogen davon umfasst, die so effektiv ist, dass Stenose oder Restenose eines Säugergefäßes, das durch eine chirurgische Prozedur traumatisiert wurde, inhibiert oder zu reduziert werden, wobei besagtes Cytochalasin oder das Analoge davon in kristalliner Form vorliegt.

[0023] Das kristalline Cytochalasin in besagter Zusammenstellung kann eine Emulsion oder eine Mikroemulsion sein.

[0024] Die Erfindung stellt auch therapeutische Vorrichtungen zur Verfügung. Eine Ausführungsform der Erfindung umfasst einen therapeutischen Shunt, der eine Menge eines Cytoskeletthinhibitors in fester Form umfasst, die wirksam ist, Stenose zu inhibieren oder Restenose zu reduzieren, die auf die Anbringung des therapeutischen Shunts erfolgt. Zusammenstellungen oder Arzneimittel der Erfindung können unter Verwendung eines therapeutischen künstlichen Transplantats verabreicht werden. Eine weitere Ausführung der Erfindung umfasst eine therapeutische adventizielle Umhüllung, die eine Menge eines Cytoskeletthinhibitors in fester

Form umfasst, die wirksam ist, Stenose zu inhibieren oder Restenose zu reduzieren, die auf die Anbringung der Umhüllung folgt.

[0025] Auch wird durch die Erfindung eine therapeutische Vorrichtung zur Verfügung gestellt, umfassend einen Stent, der mit einem künstlichen Transplantat beschichtet ist, worin das künstliche Transplantat 5 bis 70 Gewichtsprozent eines Cytoskelettinhibitors in fester Form umfasst.

[0026] Die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Vorrichtungen, die oben beschrieben sind, können dazu verwendet werden, die Abnahme des Durchmessers des Gefäßlumens zu inhibieren. Der Cytoskelettinhibitor wird vorzugsweise über eine implantierbare Vorrichtung verabreicht, wobei die implantierbare Vorrichtung kein Katheter ist, der ein erstes und ein zweites dehnbares Bauteil besitzt, d. h. Ballons, die auf den gegenüberliegenden Seiten der Gefäßfläche, die behandelt werden soll, angeordnet sind, um den Teil des Gefäßes, der behandelt werden soll, vor der Verabreichung des Cytoskelettinhibitors zu isolieren. Vorzugsweise wird der isolierte Anteil des Gefäßes nicht gewaschen, um Blut zu vor der Verabreichung des Cytoskelettinhibitors entfernen („blutfreie Angioplastie“). „Isoliert“ wie oben verwendet bedeutet nicht, dass ein Verschlusskontakt der tatsächlichen Behandlungsfläche durch den Ballon des Katheters vorliegt, der bevorzugt in der Ausübung der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird. Darüber hinaus kann die blutfreie Angioplastie, beispielsweise wie sie beschrieben ist in Slepian, U.S. Patent 5,328,471, d. h. in welcher die Gegend, die behandelt werden soll, gewaschen wird, Traumata oder ein weiteres Trauma dem Gefäß zuführen, wobei das Potential für Komplikationen erhöht werden kann, und wobei diese blutfreie Angioplastie nicht notwendig ist, um einen günstigen Effekt zu erreichen.

[0027] Wie oben erwähnt, Vorrichtungen der Erfindung, die eine Dosierungsform eines Cytochalasins oder eines Analogen davon in einem nicht-flüssigen Vehikel oder einer Matrix enthalten, wirksam die Abnahme in der Gefäßlumenfläche eines Säugerblutgefäßes, wenn sie dem Gefäß verabreicht werden. Die Dosierungsform ist eine im Wesentlichen feste Dosierungsform. Das nicht-flüssige Vehikel oder die Matrix, welche das Cytochalsin oder das Analoge davon umfasst, ist ein Gel, eine Paste oder eine Membran, beinhaltet aber keine Mikropartikel, Nanopartikel und Ähnliches.

[0028] Wie oben erwähnt, ist ein Kit vorgesehen, umfassend, vorzugsweise getrennt abgepackt, eine implantierbare Vorrichtung, die der Zuführung wenigstens eines Cytoskelettinhibitors an eine Stelle im Lumen eines traumatisierten Säugergefäßes angepasst ist, und eine Einheitsdosierungsform, die wenigstens einen Cytoskelettinhibitor umfasst, wobei die Verabreichung wenigstens eines Teiles der Einheitsdosierungsform wirksam ist, die Abnahme im Gefäßlumendurchmesser des Gefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren. Die Vorrichtung ist kein Katheter, der ein erstes und ein zweites dehnbares Bauteil besitzt, die auf gegenüberliegenden Seiten der Gegend, die behandelt werden soll, angeordnet sind, so dass der Anteil des Gefäßes, der vor der Verabreichung behandelt werden soll, isoliert wird, oder wobei der isolierte Anteil des Gefäßes nicht gewaschen wird, um Blut vor der Verabreichung zu entfernen.

[0029] Wie hierin bezeichnet, kann die Einheitsdosierungsform eine Phiole umfassen, die ungefähr 10 bis ungefähr 30 ml von ungefähr 0,001 µg bis ungefähr 25 µg eines Cytoskelettinhibitors pro Milliliter des flüssigen Vehikels umfasst, vorzugsweise ein Cytochalsin, wobei die Einheitsdosierungsform so angepasst ist, dass sie über eine implantierbare Vorrichtung zugeführt werden kann, und wobei die Phiole für die Verwendung zur Behandlung oder Inhibierung der Stenose oder Restenose markiert ist. Vorzugsweise umfasst die Einheitsdosierungsform eine Phiole, die ungefähr 10 bis ungefähr 30 ml von ungefähr 0,01 µg bis ungefähr 10 µg des Cytochalasin B pro ml des flüssigen Vehikels umfasst. Deshalb kann das vorliegende Volumen in einer Phiole größer sein als oder ungefähr genauso groß sein wie das Volumen, das in der implantierbaren Vorrichtung vorliegt. Desgleichen kann das Volumen, das in der implantierbaren Vorrichtung vorliegt, größer sein als oder ungefähr genauso groß sein wie das Volumen, welches verabreicht wird. In ähnlicher Weise kann das Volumen, das verabreicht wird, größer sein als oder kann ungefähr so groß sein wie das Volumen, das eine günstige Wirkung besitzt.

[0030] Die Einheitsdosierungsform kann eine Phiole umfassen, die eine cytostatische Menge eines Cytoskelettinhibitors in einem pharmazeutisch akzeptablen flüssigen Vehikel umfasst. Vorzugsweise umfasst der Cytoskelettinhibitor ein Cytochalsin, Taxol oder ein Analoges davon.

[0031] Besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0032] [Fig. 1A](#) ist eine Mikraufnahme von vaskulären Zellen der glatten Muskulatur eines 24 Jahre alten männlichen Patienten.

[0033] [Fig. 1B](#) ist eine Mikraufnahme von vaskulären Zellen der glatten Muskulatur in einer Arterie eines 24 Jahre alten männlichen Patienten mit einem bindenden Protein der vaskulären glatten Muskulatur, das an die Zelloberfläche und -membran gebunden ist. Der Patient erhielt das bindende Protein der vaskulären glatten Muskulatur 4 Tage bevor das Arterien Gewebe für die Histologie präpariert wurde.

[0034] [Fig. 2](#) zeigt ein erstes Schema für die chemische Verknüpfung eines therapeutischen Wirkstoffes an ein bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur.

[0035] [Fig. 3](#) zeigt ein zweites Schema für das chemische Verknüpfen eines therapeutischen Wirkstoffes an ein bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur.

[0036] [Fig. 4A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, die die rasche in vitro-Bindung des bindenden Proteins der vaskulären glatten Muskulatur an Marker-positive Testzellen zeigen.

[0037] [Fig. 4B](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, die die rasche in vitro-Bindung des bindenden Proteins der vaskulären glatten Muskulatur an vaskuläre Zellen der glatten Muskulatur zeigen.

[0038] [Fig. 5A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, die die unerwünschte Cytotoxizität von sogar niedrigen Mengen eines therapeutischen Konjugats (beispielsweise RA-NR-AN-01) zeigen, und den freien RA-therapeutischen Wirkstoff, wenn Zellen der vaskulären glatten Muskulatur 24 Stunden lang in vitro behandelt wurden.

[0039] [Fig. 5B](#) zeigt graphisch experimentelle Daten, die die Wirkungen des RA-NR-AN-01-therapeutischen Konjugats auf die Metabolitaktivität von Marker-positiven und Marker-negativen Zellen zeigen. Die Daten zeigen unerwünschte, nicht-typische Cytotoxizität der Konjugate für all diese Zellen in einer 24-stündigen in vitro-Behandlung. Die Unspezifität resultiert aus der extrazellulären Hydrolyse des verknüpfenden Liganden, der die getesteten Zellen dem freien Arzneimittel aussetzt.

[0040] [Fig. 6A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, die die unerwünschte nicht-spezifische Cytotoxizität eines PE-NR-AN-01-therapeutischen Konjugats für Marker-positive und Marker-negative Testzellen nach 24-stündiger in vitro-Behandlung, obwohl der 24-stündigen Behandlung sogar eine Erholungsperiode über Nacht vor der Testung der Metabolitaktivität folgte.

[0041] [Fig. 6B](#) zeigt experimentelle Daten, die die nicht-spezifische Cytotoxizität des freien PS-therapeutischen Wirkstoffes auf Marker-positive und -negative Testzellen nach 24-stündiger in vitro-Behandlung zeigen.

[0042] [Fig. 7A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, welche zeigen, dass eine kurze 5-minütige „getaktete“ Behandlung, d. h. anstatt von 24 Stunden, gefolgt von der Exposition bezüglich $[3H]$ -Leucin, mit freiem RA-therapeutischen Wirkstoff, wobei dieser nicht-spezifisch cytotoxisch ist, d. h. zur Kontrolle von Marker-negativen HT29-Zellen, jedoch ist im Gegensatz dazu das RA-NR-AN-01-therapeutische Konjugat in dieser „getakteten“ Behandlung nicht cytotoxisch.

[0043] [Fig. 7B](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, welche zeigen, dass der freie RA-therapeutische Wirkstoff nicht spezifisch cytotoxisch bezüglich der Marker-negativen Kontroll-HT29-Zellen ist, sogar in einer fünf-minütigen „getakteten“ Behandlung, die einer 24-stündigen Erholungsperiode vor der $[3H]$ -Leucinexposition folgt, aber im Gegensatz dazu das RA-NR-AN-01-therapeutische Konjugat nicht cytotoxisch für Zellen ist.

[0044] [Fig. 7C](#) zeigt grafisch Ergebnisse von Experimenten, welche zeigen, dass die „getaktete“ in vitro-Behandlung von Zellen mit dem RA-NR-AN-01-therapeutischen Konjugat die zelluläre Aktivität in Marker-positiven A375-Zellen inhibiert, wie es durch Proteinsynthese gemessen wurde.

[0045] [Fig. 7D](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, welche zeigen, dass die „getaktete“ in vitro-Behandlung von Zellen mit dem RA-NR-AN-01-therapeutischen Konjugat keine lang anhaltenden Inhibitoreffekte auf die zelluläre Aktivität in Marker-positiven Zellen ausübte, da die Proteinsynthese in A375-Zellen nicht inhibiert wurde, wenn den Zellen eine Erholungsperiode über Nacht vor dem in vitro-Test erlaubt wurde.

[0046] [Fig. 8A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, welche zeigen, dass, da eine „getaktete“ in vitro-Behandlung von Zellen mit freiem RA-Wirkstoff nicht spezifisch cytotoxisch war, das RA-NR-AN-01-therapeutische Konjugat keine lang anhaltenden Inhibitoreffekte auf die zelluläre Aktivität in Zellen der vaskulären glatten Muskulatur ausübte, wie es durch Metabolitaktivität in BO54-Zellen bewiesen wurde, denen eine 48-stündige Erholungsperiode vor dem Test erlaubt wurde.

[0047] [Fig. 8B](#) zeigt grafisch experimentelle Daten ähnlich jenen, die oben in [Fig. 8A](#) dargestellt sind, aber unter Verwendung eines zweiten Marker-positiven Zelltyps, nämlich A375, wobei die Daten zeigen, dass eine „getaktete“ Behandlung mit dem RA-NR-AN-Q1-therapeutischen Konjugat keine lang anhaltenden Inhibitoreffekte auf die zelluläre Aktivität ausübt, wie es durch Metabolitaktivität in A375-Zellen gemessen wurde, denen eine 48-stündige Erholungsperiode vor dem Test erlaubt wurde.

[0048] [Fig. 8C](#) zeigt grafisch Ergebnisse ähnlich jenen, die oben in [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) dargestellt sind, jedoch unter Verwendung eines Marker-negativen Kontrollzelltyps, nämlich HT29. Die Ergebnisse zeigen, dass die „getaktete“ Behandlung mit dem RA-NR-AN-01-therapeutischen Konjugat keine lang anhaltenden Inhibitoreffekte auf die zelluläre Aktivität von Marker-negativen Kontrollzellen ausübte, so wie es durch Metabolitaktivität in HT29-Zellen gemessen wurde, denen eine 48-stündige Erholungsperiode vor dem Test erlaubt wurde.

[0049] [Fig. 9A](#) zeigt in einem Tiermodell in einem histologischen Schnitt einer unbehandelten Arterie Stenose als Folge der Zellproliferation der glatten Muskulatur fünf Wochen nach der Angioplastie.

[0050] [Fig. 9B](#) zeigt in einem Tiermodell die Inhibierung der Stenose in einem histologischen Schnitt einer Arterie, die mit einem therapeutischen Konjugat fünf Wochen nach der Angioplastie behandelt wurde.

[0051] [Fig. 10A](#) zeigt grafisch experimentelle Daten unter Vergleich der Proteinsynthese und der Fähigkeit von Suramin, DNA-Synthese bezüglich der vaskulären Zellen der glatten Muskulatur zu inhibieren.

[0052] [Fig. 10B](#) zeigt grafisch experimentelle Daten unter Vergleich der Proteinsynthese und der Fähigkeit von Staurosporin, DNA-Synthese zu inhibieren, bezüglich der vaskulären Zellen der glatten Muskulatur.

[0053] [Fig. 10C](#) zeigt grafisch experimentelle Daten, durch Vergleich der Proteinsynthese und der Fähigkeit von Nitroglyzerin, DNA-Synthese bezüglich der vaskulären Zellen der glatten Muskulatur zu inhibieren.

[0054] [Fig. 10D](#) zeigt grafisch experimentelle Daten unter Vergleich der Proteinsynthese und der Fähigkeit von Cytochalasin B, DNA-Synthese bezüglich der vaskulären Zellen der glatten Muskulatur zu inhibieren.

[0055] [Fig. 11](#) zeigt einen tangentialen Schnitt parallel zu der inneren Oberfläche einer Zelle der glatten Muskulatur in einer Vergrößerung von 62.500, der durch zahlreiche endocytische Vesikel charakterisiert, von denen einige mit Antikörper-beschichtete Goldkugeln enthalten, indem sie durch die Zelle in vitro internalisiert werden.

[0056] [Fig. 12](#) zeigt eine Zelle der glatten Muskulatur in einer Vergrößerung von 62.500, die durch eine merkliche Akkumulation von Goldkugeln in Lyosomen charakterisiert sind nach 24 Stunden, die der in vitro-Exposition der Zellen bezüglich der Kugeln folgt.

[0057] [Fig. 13](#) zeigt eine Zelle der glatten Muskulatur in einer 62.500-fachen Vergrößerung, die durch eine Akkumulation von Goldkugeln in Lyosomen in vivo gekennzeichnet ist.

[0058] [Fig. 14](#) zeigt eine Studie der in-vivo-Dosierungsantwort auf Effekte von Cytochalasin B auf die luminale Fläche der Arterien von Oberschenkeln von Schweinen

[0059] [Fig. 15](#) ist eine grafische Darstellung, die die Inhibierung der Zellproliferation der glatten Muskulatur in traumatisierten Gefäßen mit der Zeit zeigt, in der Cytochalasin B (CB) oder Taxol (TAX) in Silikonumhüllungen (SW) verabreicht wird.

[0060] [Fig. 16](#) ist eine grafische Darstellung, die die Inhibierung der Zellproliferation der glatten Muskulatur in traumatisierten Gefäßen in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, unter Zusatz von 10 oder 30 Gewichtsprozent/Gewichtsprozent CB in SW oder 5 Gewichtsprozent/Gewichtsprozent TAX in SW.

[0061] [Fig. 17](#) ist eine grafische Darstellung, die die Inhibierung der Zellproliferation der glatten Muskulatur in

traumatisierten Gefäßen in Abhängigkeit von der Zeit durch CB oder TAX in Silikon, CB in einem Kollagengel, das durch ein Rinderollagennetz (CG-CN) gehalten wurde, oder CB in einem Plurongel, das durch ein Rinderkollagennetz (PGCW) gehalten wurde.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Definitionen

[0062] Der Begriff „therapeutisches Konjugat“ bedeutet eine vaskuläre glatte Muskulatur oder ein bindendes Protein einer interstitiellen Matrix, das an einen Cytoskelettinhibitor gekoppelt ist (beispielsweise gegebenenfalls durch eine verknüpfende Einheit). Therapeutische Konjugate, wie sie gemäß der Erfindung verwendet werden und wie sie hierin beschrieben sind, werden erhalten durch Verknüpfung eines bindenden Proteins einer vaskulären glatten Muskulatur an einen Cytoskelettinhibitor. Im therapeutischen Konjugat hat das bindende Protein der vaskulären glatten Muskulatur die Funktion, das therapeutischen Konjugats zu den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur oder Pericyten zu steuern, und der Cytoskelettinhibitor hat die Funktion der Inhibition der zellulären Aktivität oder der Proliferation der Zelle der glatten Muskulatur oder der Pericyten.

[0063] Der Begriff „therapeutischer Wirkstoff oder Agenz“, wie hierin verwendet, bedeutet einen Cytoskelettinhibitor.

[0064] Die Begriffe „Target“ und „Marker“ werden gegeneinander austauschbar verwendet und beschreiben die vorliegenden Konjugate mit der Bedeutung eines Moleküls, das in einer spezifischen Art und Weise durch die Matrix oder durch das bindende Protein der vaskulären glatten Muskulatur erkannt wird, beispielsweise ein Antigen, ein Polypeptidantigen oder ein Kohlenhydrat der Zelloberfläche (beispielsweise ein Glycolipid, Glycoprotein oder ein Proteoglycan), welches auf der Oberfläche der Zellmembranen einer Zelle der glatten Muskulatur oder einer Matrixstruktur exprimiert ist.

[0065] Der Begriff „Epitop“ wird verwendet, um auf einen typischen Bindungsort innerhalb des „Target“-Moleküls Bezug zu nehmen, das durch die Matrix oder das bindende Protein der glatten Muskulatur gebunden wird, beispielsweise eine Sequenz von drei oder mehr Aminosäuren oder Zuckern.

[0066] Der Begriff „verknüpft“ wird unter der Bedeutung verwendet, dass eine kovalente oder nicht-kovalente chemische Verknüpfung (d. h. ein hydrophobe Verknüpfung wie durch van der Waals-Kräfte oder Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen) der Matrix oder des bindenden Proteins der vaskulären glatten Muskulatur mit dem therapeutischen Agenz vorliegt, einschließlich durch Chelierung. Vorzugsweise werden die bindenden Proteine mit den Cytoskelettinhibitoren durch kovalente Bindung verknüpft.

[0067] Der Begriff „Linker“ bedeutet eine Einheit, die die Matrix oder das bindende Protein der glatten Muskulatur an einen Cytoskelettinhibitor verknüpft, beispielsweise abgeleitet von einem organischen chemischen Agenz, das zur Verknüpfung geeignet ist.

[0068] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „im Wesentlichen“ rein, dass wenigstens ungefähr 90%, vorzugsweise wenigstens ungefähr 98% und mehr bevorzugt wenigstens ungefähr 99% frei von Verunreinigungen sind, wenn Untersuchungen nach konventionellen Methoden durchgeführt werden, wie sie im Stand der Technik verwendet werden.

[0069] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „im Wesentlichen“ fest oder kristallin, dass wenigstens ungefähr 90%, vorzugsweise wenigstens ungefähr 98% und noch mehr bevorzugt wenigstens ungefähr 99% frei von nicht-festen oder nichtkristallinen Formen oder Phasen sind, wenn Untersuchungen nach konventionellen Methoden durchgeführt werden, wie sie im Stand der Technik verwendet werden.

[0070] Der Begriff „Migration“ der Zellen der glatten Muskulatur bedeutet eine Bewegung dieser Zellen in vivo von den medialen Schichten eines Gefäßes zu den intimalen Schichten, die gleichfalls in vitro durch Folgen der Bewegung einer Zelle von einem Ort zu einem anderen studiert werden kann (beispielsweise unter Verwendung von Zeitrafferaufnahmen oder durch Verwendung eines Videorekorders und manuelles Auszählen der Migration der Zellen der glatten Muskulatur aus einer definierten Fläche in die Gewebekultur in Abhängigkeit von der Zeit).

[0071] Der Begriff „Proliferation“ bedeutet eine Zunahme in der Zellanzahl, d. h. durch Mitose der Zellen. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Zellen der glatten Muskulatur“ nicht auf neoplastische Zellen der vas-

kulären glatten Muskulatur, d. h. auf Krebszellen.

[0072] Der Begriff „implantierbare Vorrichtung“ bedeutet ein beliebiges Material, das in der Lage ist, einen Cytoskeletthinhibitor zurückzuhalten und freizusetzen, so dass er in situ in einer kontrollierten Art und Weise einem Säugergefäß zugeführt wird. Eine implantierbare Vorrichtung beinhaltet Vorrichtungen, die im Lumen des Gefäßes angeordnet sind, beispielsweise einem Dauerkatheter oder Stent, oder auf der Außenseite des Gefäßes, beispielsweise eine adventizielle Umhüllung, ein Sieb oder eine Abdeckung, oder welche ein Teil des Gefäßes selbst werden, beispielsweise um einen Teil eines erkrankten oder traumatisierten Gefäßes auszutauschen, beispielsweise ein synthetisches Transplantat. Die implantierbare Vorrichtung kann den Cytoskeletthinhibitor in einer Form umfassen, die freisetzbar eingebettet ist in und/oder als Schicht auf der Vorrichtung aufgetragen ist. Der Cytoskeletthinhibitor kann gleichfalls freisetzbar eingebettet sein in und/oder als Schicht auf einer pharmazeutisch akzeptablen Trägermatrix aufgetragen sein, die zur Freisetzung geeignet ist, und welche angewendet werden und/oder eingebettet sein kann in der Vorrichtung, oder die direkt dem Gefäß verabreicht werden kann. Beispielsweise enthält eine Matrix, die in bestimmten Ausführungen der Erfindung verwendet wird, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Mikropartikel, Nanopartikel, ein Gel, eine Paste oder eine durchlässige Membran. Eine implantierbare Vorrichtung kann für eine begrenzte Zeitdauer implantiert werden, beispielsweise als Katheter oder als Infusionsnadel zur Zuführung eines Cytoskeletthinhibitors, oder für eine verlängerte Zeitdauer, beispielsweise als Stent oder als Transplantat. Gefäße, in welche die implantierbare Vorrichtung der Erfindung eingeführt werden kann, beinhalten, ohne jedoch darauf begrenzt zu sein, koronare Blutgefäße, Gefäße des Oberschenkels, Gefäße der Halsschlagader und periphere Gefäße.

[0073] Der Begriff „krankhaft oder pathologisch oder ungeeignet“ bezüglich einer Aktivität oder Proliferation bedeutet Trennung, Wachstum oder Migration von Zellen, jedoch nicht von Krebszellen, was schneller oder in einem signifikant größeren Ausmaß eintritt als es typischerweise in einer normal funktionierenden Zelle des gleichen Typs eintritt oder in Läsionen, die in gesundem Gewebe nicht auftreten.

[0074] Der Begriff „exprimiert“ bedeutet mRNA-Transkription und -Translation mit einer resultierenden Synthese, Glycosylierung und/oder Sekretion eines Polypeptids durch eine Zelle, beispielsweise von CSPG, welches durch eine Zelle der vaskulären glatten Muskulatur oder durch einen Pericyten hergestellt wurde.

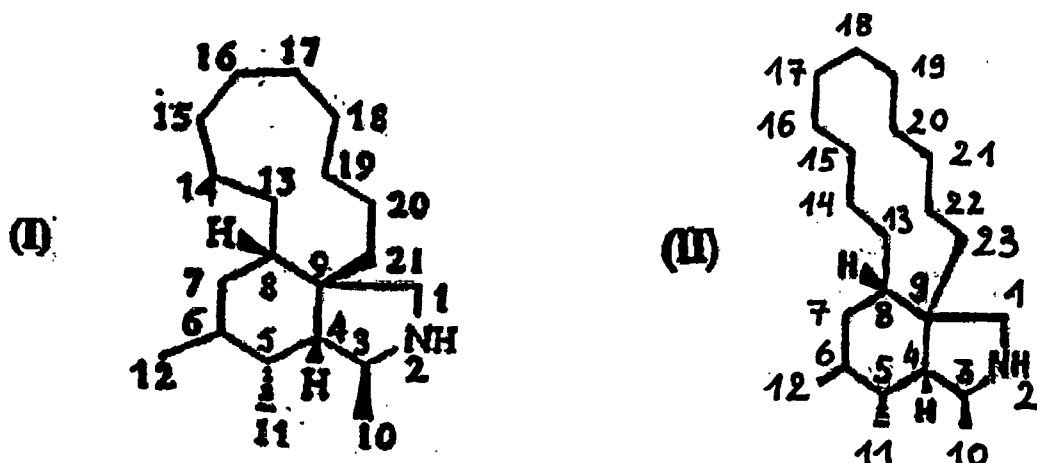
[0075] Der Begriff „vaskuläres Umformen“ bedeutet eine Abnahme oder Verminderung im Volumen des Gefäßlumens, des Durchmessers oder der Fläche, welche nicht das Ergebnis einer neointimalen Verdickung oder Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur ist, und welche im Allgemeinen nach einem durch eine Prozedur verursachten vaskulären Trauma eintritt. Deshalb wird eine Reduzierung der Fläche („Konstriktion“), welche durch die innere elastische Lamina oder Membran (IEL) umschrieben wird, ohne Bildung signifikanter neointimaler Verdickung, als „vaskuläres Umformen“ bezeichnet (vgl. Isner, Circ., 89, 2937 (1994)). Die luminale Querschnittsfläche eines Gefäßes kann durch direktes Planimetrieren gemessen werden, beispielsweise durch intravaskulären Ultraschall (IVUS) oder bei der Nekropsie. Wie hierin verwendet, beinhaltet der Begriff „vaskuläres Umformen“ nicht die kompensatorische Vergrößerung eines Gefäßes, welche die neointimale Proliferation begleitet, so dass der intimalen Zunahme begegnet werden kann. Diese kompensatorische Vergrößerung wurde auch als „positives“ vaskuläres Umformen bezeichnet.

[0076] Der Begriff „anhaltende Freisetzung“ bedeutet eine Dosierungsform, die so ausgebildet ist, dass sie den Cytoskeletthinhibitor daraus während einer Periode von ungefähr 0,0005 bis ungefähr 180, vorzugsweise von ungefähr 1–3 bis ungefähr 150, und noch mehr bevorzugt von ungefähr 30 bis ungefähr 120 Tagen freisetzt. Die Freisetzung über eine längere Zeitdauer wird gleichfalls als „anhaltende Freisetzung“ im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezeichnet. Darüber hinaus wird in Erwägung gezogen, dass die Methoden, wie sie hierin beschrieben sind, mit einer örtlichen oder einer systemisch verabreichten Dosierungsform mit anhaltender Freisetzung ausgeführt werden können.

[0077] Der Begriff „Dosierungsform“ beinhaltet eine Formulierung, welche einen freien (nicht mit einem Ziel oder mit einem bindenden Partner verknüpften) Cytoskeletthinhibitor genauso wie eine Formulierung mit anhaltender Freisetzung, die einen Cytoskeletthinhibitor umfasst, beinhaltet. Beispielsweise können Formulierungen der anhaltenden Freisetzung Mikropartikel oder Nanopartikel, Mikroemulsionen, bioabbaubare oder nicht-bioabbaubare Polymermaterialien enthalten, oder beliebige Kombinationen davon, umfassend einen Cytoskeletthinhibitor, der darin dispergiert ist, genauso wie kristalline Formen des Cytoskeletthinhibitors wie vorstehend beschrieben. Eine Dosierungsform, die zielgerichtet oder mit einem bindenden Partner verknüpft ist, beinhaltet eine therapeutische Formulierung mit anhaltender Freisetzung, welche Mikropartikel oder Nanopartikel, Mikroemulsionen und/oder bioabbaubare oder nicht-bioabbaubare Polymermaterialien umfasst. Die Dosierungsform mit anhaltender Freisetzung ist an ein oder mehrere bindende Proteine oder Peptide gebunden, um einen

Cytoskelettinhibitor, der darin dispergiert ist, einer Population von Zielzellen zuzuführen, die sich an das bindende Protein oder Peptid bindet.

[0078] Der Begriff „Cytochalasin“ beinhaltet einen Pilzmetabolit, der einen Inhibitoreffekt auf den zellulären Zielmetabolismus ausübt, beinhaltend die Verhütung der Kontraktion oder Migration der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur. Vorzugsweise inhibieren Cytochalasine die Polymerisation von monomerem Actin (G-Actin) zu polymeren Formen (F-Actin), wodurch die Zellfunktionen inhibiert werden, welche cytoplasmische Mikrofäden benötigen. Cytochalasine leiten sich typischerweise vom Phenylalanin ab (Cytochalasine), Tryptophan (Chaetoglobosine) oder Leucin (Aspochalasine), wobei jeweils an der Position C-3 einer substituierten Perhydroisoindol-Einheit eine Benzyl-Gruppe oder eine Methyl- oder Isobutyl-indol-3-yl-Gruppe resultiert (Formel I oder II).



[0079] Die Perhydroisoindol-Einheit enthält wiederum am Atom Nr. 11, 13 oder 14 carbozyklische oder Sauerstoff enthaltende Ringe, die an die Positionen C-8 und C-9 geknüpft sind. Alle natürlich vorkommenden Cytochalasine enthalten an C-5 eine Methyl-Gruppe; eine Methyl- oder Methylen-Gruppe an C-12; und eine Methyl-Gruppe an C-14 oder C-16. Beispielhafte Cytochalasine beinhalten Cytochalasin A, Cytochalasin B, Cytochalasin C, Cytochalasin D, Cytochalasin E, Cytochalasin F, Cytochalasin G, Cytochalasin H, Cytochalasin J, Cytochalasin K, Cytochalasin L, Cytochalasin M, Cytochalasin N, Cytochalasin O, Cytochalasin P, Cytochalasin Q, Cytochalasin R, Cytochalasin S, Chaetoglobosin A, Chaetoglobosin B, Chaetoglobosin C, Chaetoglobosin D, Chaetoglobosin E, Chaetoglobosin F, Chaetoglobosin G, Chaetoglobosin J, Chaetoglobosin K, Deoxaphomin, Proxiphomin, Protophomin, Zygosporin D, Zygosporin E, Zygosporin F, Zygosporin G, Aspochalasin B, Aspochalasin C, Aspochalasin D und ähnliches, genauso wie funktionelle Äquivalente und Derivate davon. Bestimmte Cytochalasinderivate werden in den japanischen Patenten Nr. 72 01,925; 72 14,219; 72 08,533; 72 23,394; 72 01,924 und 72 04,164 aufgeführt. Cytochalasin B, welches in dieser Beschreibung verwendet wird, ist ein typisches Cytochalasin.

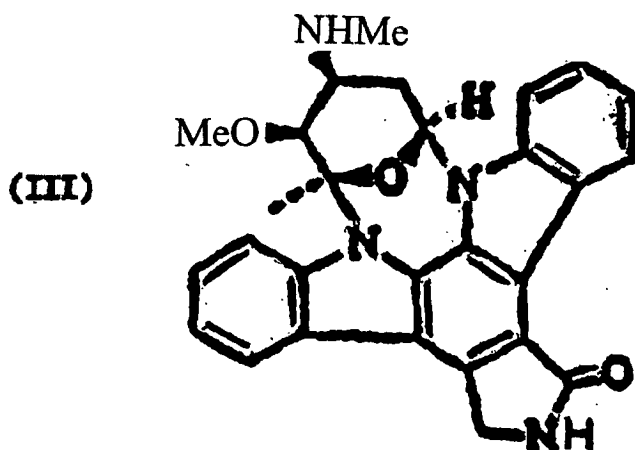
[0080] Wie hierin beschrieben, beinhaltet der Begriff „Taxol“ sowohl Taxol wie funktionelle Analoga, Äquivalente oder Derivate davon. Beispielsweise beinhalten Derivate und Analoga des Taxols, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Taxoter, Baccatin, 10-Deacetyltaxol, 7-Xylosyl-10-deacetyltaxol, Cephalomannin, 10-Deacetyl-7-epitaxol, 7-Epitaxol, 10-Deacetyl-baccatin III, 10-Deacetylcephalomannin und Analoge oder Derivate davon, wie sie offenbart wurden von Kingston et al. (New Trends in Nat. Prod. Chem., 26, 219 (1986)), Bringli et al., (WO 93/17121), Golik et al. (EPA 639577), Kelly et al. (WO 95/20582) und Cassady and Dourous (Hrsg., in: Anticancer Agents Based on Natural Product Models, Academic Press, NY (1980)). Methoden zur Herstellung von Taxol und zahlreicher Analoga und Derivate davon sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt.

[0081] Der Begriff „makrozyklisches Trichothecen“ soll eine beliebige Gruppe eines makrozyklischen Mykotoxins mit einer Struktur eines Sesquiterpens bedeuten, welches durch eine Pilzart erzeugt wird, und welches durch die grundlegende Struktur des 12,13-Epoxytrichothecen-9 charakterisiert ist, beispielsweise Verrucarine und Roridine, die die Produkte des Sekundärmetabolismus in den Erdpilzen *Myrothecium verrucaria* und *Myrothecium roridium* sind.

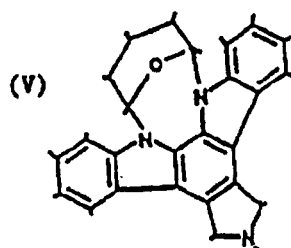
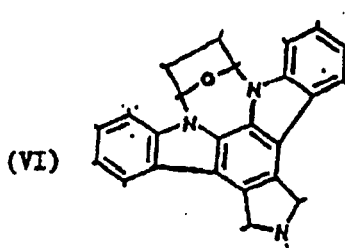
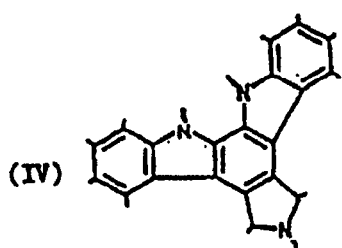
[0082] Es gibt zwei breite Klassen von Trichothecenen: Jene, welche nur eine zentrale Struktur eines Sesquiterpens besitzen und jene, die zusätzlich einen makrozyklischen Ring besitzen (jeweils einfache und makrozyklische Trichothecene). Die einfachen Trichothecene können in drei Gruppen unterteilt werden (d. h. Gruppe A, B und C), wie in den US-Patenten 4,744,981 und 4,906,452 offenbart (durch Referenz mit einbezogen). Re-

präsentative Beispiele der einfachen Trichothecene der Gruppe A beinhalten: Scirpen, Roridin C, Dihydrotrichothecen, Scirpen-4,8-diol, Verrucarol, Scirpentriol, T-2-Tetraol, Pentahydroxyscirpen, 4-Deacetylneosolaniol, Trichodermin, Deacetylcalonectrin, Calonectrin, Diacetylverrucarol, 4-Monoacetoxyscirpenol, 4,15-Diacetoxyscirpenol, 7-Hydroxydiacetoxyscirpenol, 8-Hydroxydiacetoxyscirpenol (Neosolaniol), 7,8-Dihydroxydiacetoxyscirpenol, 7-Hydroxy-8-acetyldiacetoxyscirpenol, 8-Acetylneosolaniol, NT-1, NT-2, HT-2, T-2 und Acetyl-T-2-toxin. Repräsentative Beispiele der einfachen Trichothecene aus Gruppe B beinhalten: Trichothecolon, Trichothecin, Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 5-Acetyldeoxynivalenol, 3,15-Diacetyldioxynivalenol, Nivanenol, 4-Acetylnivanenol (Fusarenon-X), 4,15-Diacetylnivanenol, 4,7,15-Triacetylnivanenol und Tetraacetylnivanol. Repräsentative Beispiele der einfachen Trichothecene aus Gruppe C beinhalten: Crotocon und Crotoxin. Representative makrozyklische Trichothecene beinhalten: Verrucaridin A, Verrucaridin B, Verrucaridin J (Satratoxin C), Roridin A, Roridin D, Roridin E (Satratoxin D), Roridin H, Satratoxin F, Satratoxin G, Satratoxin H, Vertisporin, Mytoxin A, Mytoxin C, Mytoxin B, Myrotoxin A, Myrotoxin B, Myrotoxin C, Myrotoxin D, Roritoxin A, Roritoxin B und Roritoxin D. Zusätzlich liegt die allgemeine Sesquiterpen-Ringstruktur des „Trichothecens“ in Verbindungen vor, die als „Baccharine“ bezeichnet und aus der höheren Pflanze *Baccharis megapotamica* isoliert werden, und diese werden in der Literatur beispielsweise von Jarvis et al. (Chemistry of Alleopathy, ACS Symposium Series No. 268: Hrsg. A. C. Thompson, 1984, Seiten 149–159) und Jarvis & Mazzola (Acc. Chem. Res., 15: 338–395, 1982) offenbart. Trichothecene werden gleichfalls durch Erdpilze der Klasse Fungi imperfecti erzeugt (Bamburg, J. R. Proc. Molec. Subcell. Biol., 8: 41–110, 1983)).

[0083] Der Begriff „Staurosporin“ beinhaltet Staurosporin, ein Proteinkinase-C-Inhibitor der folgenden Formel (III),



ebenso wie Diindoloalkaloide, die eine der folgenden allgemeinen Strukturen besitzen:



[0084] Noch typischer beinhaltet der Begriff „Staurosporin“ K-252 (vgl. zum Beispiel die japanische Patentanmeldung Nr. 62,164,626), BMY 41950 (US-Patent Nr. 5,015,578), UCN-01 (US-Patent 4,935,415), TAN-999 (japanische Patentanmeldung No. 01,149,791), TAN-1030A (japanische Patentanmeldung Nr. 01,246,288), RK-286C (japanische Patentanmeldung Nr. 02,258,724) und funktionelle Äquivalente und Derivate davon. De-

ivate von Staurosporin beinhalten jene, wie sie in der japanischen Patentanmeldungen Nr. 03,72,485; 01,143,877; 02,09,819 und 03,220,194 sowie in den internationalen PCT-Anmeldungen WO 89/07105 und WO 91/09034 und den Europäischen Patentanmeldungen EP 410 389 und EP 296 110 diskutiert werden. Derivate des K-252, einem natürlichen Produkt, sind bekannt (vgl. beispielsweise die Japanischen Patentanmeldungen Nr. 63,295,988; 62,240,689; 61,268,687; 62,155,284; 62,155,285; 62,120,288 und 63,295,589 sowie die internationalen PCT-Anmeldungen WO 88/07045 und die Europäische Patentanmeldung EP 323 171.

[0085] Wie hierin bezeichnet, beinhalten die Zellen der glatten Muskulatur und Perizyten jene Zellen, die sich von den medialen Schichten der Gefäße und der adventiziellen Gefäße ableiten, die sich an den intimalen hyperplastischen vaskulären Stellen vermehren, die auf eine Verletzung folgt, wie sie beispielsweise während einer PCTA verursacht wird. Eigenschaften der Zellen der glatten Muskulatur beinhalten eine histologische Morphologie (unter Prüfung durch Lichtmikroskopie) mit einer spindelförmigen Gestalt mit einem länglichen Zellkern, der zentral in der Zelle lokalisiert ist, mit vorliegenden Zellkernen und Myofibrillen im Sarkoplasma. Bei Prüfung unter dem Elektronenmikroskop haben Zellen der glatten Muskulatur lange schlanke Mitochondrien im juxtanuklearen Sarkoplasma, einige wenige tubulare Elemente eines granularen endoplasmischen Retikulums und zahlreiche Cluster freier Ribosome. Ein kleiner Golgy-Komplex kann auch in der Nähe eines der Pole des Zellkerns lokalisiert sein. Der Hauptanteil des Sarkoplasmas wird durch dünne, parallele Myofasern besetzt, die zum größten Teil entlang der langen Achse der Muskelzelle ausgerichtet sein können. Diese Aktin enthaltenden Myofibrillen können in Bündeln angeordnet sein, die mit Mitochondrien durchsetzt sind. Verstreut über die kontraktile Substanz der Zelle können sich auch ovale dichte Flächen befinden, mit ähnlichen dichten Flächen, die intervallmäßig entlang der inneren Anordnungen der Plasmalemma verteilt sind.

[0086] Die Eigenschaften der Perizyten beinhalten eine histologische Morphologie (bei Prüfung durch Lichtmikroskopie), die durch eine unregelmäßige Zellform charakterisiert ist. Perizyten werden in der Basismembran gefunden, die die vaskulären Endothelzellen umgibt, und ihre Identität kann durch positives Immuno-Anfärben mit Antikörpern bestätigt werden, die typisch sind für das Alpha-Aktin der glatten Muskulatur sind (beispielsweise Anti-alpha-smi, Biomakor, Rehovot, Israel), HMW-MAA und Antigene der Perizytinganglioside, vgl. MAb 3G5 (Schlingemann et al., Am. J. Pathol., 136: 1393–1405 (1990)); und durch negatives Immuno-Anfärben mit Antikörpern, die typisch sind für Cytokeratine (d. h. epithelische und fibroplastische Marker) und für den von Willdebrand-Faktor (d. h. ein endothelischer Marker). Beide Zellen der vaskulären glatten Muskulatur und Perizyten sind positiv beim Immuno-Anfärben mit dem NR-AN-01 monoklonalen Antikörper.

[0087] Wie hierin verwendet, beinhaltet der Begriff „durch eine Prozedur verursachtes vaskuläres Trauma“ die Wirkungen von chirurgischen/mechanischen Eingriffen in die Säugervaskulatur, beinhaltet aber kein vaskuläres Trauma als Folge organischer vaskulärer Pathologien, d. h. Erkrankungen und Infektionen.

[0088] Deshalb beinhalten die durch eine Prozedur verursachten vaskulären Traumata innerhalb des Rahmens der Behandlungen, für welche Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Vorrichtungen gemäß der Erfindung angewendet werden können, (1) Organtransplantation, beispielsweise Herz-, Nieren-, Leber-Transplantation und Ähnliches, beispielsweise beinhaltend Gefäßanastomie; (2) vaskuläre Chirurgie, beispielsweise koronare Bypass-Chirurgie, Biopsie, Herzklappenersatz, Atheroektomie, Thrombektomie und Ähnliches; (3) vaskuläre Therapien mittels eines Transkatheters (TVT) beinhaltend Angioplastie, beispielsweise Laserangioplastie und PTCA-Prozeduren unter Verwendung von Ballon-Kathetern und Dauerkathetern; (4) vaskuläre Transplantation unter Verwendung natürlicher oder synthetischer Materialien, beispielsweise koronare Bypass-Transplantate der Vena saphena, Arterien- und Venentransplantate, die für die Rekonstruktion der peripheren Arterien verwendet werden etc.; (5) Anbringung eines mechanischen Shunts, beispielsweise ein PTFE-Shunt für die Hämodialyse, wie sie für die Kommunikation zwischen Arterien und Venen verwendet werden; und (6) Einsatz eines intravaskulären Stents, der aus Metall, Kunststoff oder aus einem bioabbaubaren Polymer hergestellt sein kann (vgl. US-Patentanmeldung Serien-Nr. 08/389,712, eingereicht am 15. Februar 1995). Für eine allgemeine Diskussion implantierbarer Vorrichtungen und Biomaterialien, aus denen diese gebildet sein können, vgl. H. Kambic et al., „Biomaterials in Artificial Organs“, Chem. Eng. Neves, 30 (14. April 1986).

Cytoskeletthinhibitoren zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung

[0089] Cytoskeletthinhibitoren, die in den Dosierungsformen, den Medikamenten, den Kits und den pharmazeutischen Zusammenstellungen der Erfindung verwendbar sind, beinhalten Cytoskeletthinhibitoren, die als biologischer Stent in einem Gefäß wirken und/oder das vaskuläre Umformen reduzieren oder inhibieren und/oder die Proliferation der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur inhibieren oder reduzieren, die auf die Prozedur eines vaskulären Traumas folgt. Die Cytoskeletthinhibitoren, die in den Dosierungsformen, den Medi-

kamenten, dem Kit und den pharmazeutischen Zusammenstellungen der Erfindung verwendet werden, werden ausgewählt, um eine Zellaktivität einer Zelle der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren, beispielsweise eine Proliferation, Migration, Zunahme im Zellvolumen, Zunahme in der Synthese der extrazellulären Matrix (beispielsweise des Kollagens, Proteoglykans und Ähnlichem) oder die Sekretion der Materialien der extrazellulären Matrix durch die Zelle.

[0090] Das therapeutische Agens ist ein Cytoskeletthinhibitor und ist vorzugsweise: a) ein „cytostatisches Agens“, welches wirkt, um die Zellteilung in sich vermehrenden Zellen durch Inhibierung der Replikation von DNA oder durch Inhibierung der Bildung der spindelförmigen Fasern und Ähnlichem zu verhüten oder aufzuschieben; b) ein Inhibitor, der die Migration der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur aus den medialen Zellwänden in die intimalen Zellwände inhibiert, beispielsweise ein „Anti-Migrations-Agens“, beispielsweise ein Cytochalasin; c) als ein Inhibitor der intrazellulären Zunahme im Zellvolumen (d. h. im Gewebenvolumen, das durch eine Zelle besetzt ist; ein „Cytoskeletthinhibitor“); d) ein Inhibitor, der die zelluläre Proteinsynthese blockiert und/oder die Sekretion oder Organisation der extrazellulären Matrix (d. h. ein „Anti-Matrix-Agens“); oder eine beliebige Kombination davon.

[0091] Repräsentative Beispiele von „cytostatischen Agentien“ beinhalten beispielsweise modifizierte Toxine, Methotrexate, Adriamycin, Radionuklide (beispielsweise vgl. Fritzberg et al., US-Patent 4,897,255), Inhibitoren der Proteinkinase (beispielsweise Staurosporin), Taxol oder Analoge davon (beispielsweise Taxoter), Inhibitoren spezifischer Enzyme (beispielsweise wie das im Kern enthaltene Enzym DNA-Topoisomerase II und DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Adenyl-Guanyl-Cyklase), Superoxid-Dismutase-Inhibitoren, endständige Deoxynukleotidyl-Transferase, umgekehrte Transkriptase, Antisense-Oligonukleotide, die die Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur unterdrücken, und Ähnliches, die, wenn sie in einer entsprechenden Dosierung einem zellulären Raum zugeführt werden, so wirken, dass sie die Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur oder der Perizyten beeinträchtigen ohne die Zelle abzutöten.

[0092] Repräsentative Beispiele von „Anti-Migrations-Agentien“ beinhalten Inhibitoren (d. h. Agonisten und Antagonisten, und kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren) der chemotaktischen Faktoren und ihrer Rezeptoren (beispielsweise komplementäre Chemotaxine wie beispielsweise C5a, C5a-Desarg oder C4a; extrazelluläre Matrixfaktoren, beispielsweise Fragmente aus dem Kollagenabbau), oder der intrazellulären Cytoskelettproteine, die in der Fortbewegungsfähigkeit involviert sind (beispielsweise Aktin, Cytoskelettelemente und Phosphatasen und Kinasen, die in der Fortbewegungsfähigkeit involviert sind). Repräsentative Beispiele beinhalten Derivate der Kaffeesäure und Nifedipin (ein Calciumantagonist) und Steroidhormone. Bevorzugte therapeutische Anti-Migrations-Agentien sind die Cytochalasine.

[0093] Repräsentative Beispiele der „Cytoskeletthinhibitoren“ einer Untermenge der cytostatischen Agentien beinhalten Colchizin, Vinblastin, Cytochalasin, Taxol oder Analoge oder Derivate davon, die auf Mikrotubuli und Netzwerke der Mikrofilamente innerhalb einer Zelle wirken. Bevorzugte Cytoskeletthinhibitoren beinhalten Cytochalasin B und Taxol.

[0094] Repräsentative Beispiele der „Anti-Matrix-Agentien“ beinhalten Inhibitoren (d. h. Agonisten und Antagonisten und kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren) der Matrix-Synthese, der Sekretion und des Matrix-Zusammenbaus, organisatorische Vernetzung (beispielsweise durch Transglutaminase erzeugte Vernetzung von Kollagen), und Matrix-Umformen (beispielsweise auf eine Wundheilung folgend). Ein repräsentatives Beispiel in dieser Kategorie von Anti-Matrix-Agentien ist Colchizin, ein Sekretionsinhibitor der extrazellulären Matrix. Ein weiteres Beispiel ist Tamoxifen, für welches Beweise bezüglich seiner Fähigkeit vorliegen, die Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur zu organisieren und/oder zu stabilisieren sowie zu verringern, die einer Angioplastie folgt. Die Organisation oder Stabilisation kann aus der Blockade des Reifeprozesses der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in eine pathologische Proliferationsform hinein stammen.

Identifizierung der Cytoskeletthinhibitoren, die in der Anwendung der Erfindung verwendbar sind

[0095] Die Identifizierung der Cytoskeletthinhibitoren, die in der Anwendung der Erfindung verwendbar sind, kann durch Methoden bestimmt werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Beispielsweise zeigt ein Cytoskeletthinhibitor, der in den Rahmen der Erfindung fällt, wie sie hierin beschrieben ist, eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften. Der Cytoskeletthinhibitor

(i) resultiert aus der Retention einer expandierten luminalen Querschnittsfläche, des Durchmessers oder des Volumens eines Gefäßes, die auf eine Angioplastie folgt (beispielsweise PTCA, perkutane transluminale Angioplastie (PTA) oder Ähnliches) oder andere Traumata einschließlich Atheroektomie (beispielsweise durch Rotoblater, Laser und Ähnliches), koronare Arterien-Bypass-Prozeduren und Ähnliches;

- (ii) ermöglicht eine anfängliche Zunahme in der luminalen Querschnittsfläche, dem Durchmesser oder Volumen, die nicht in einer chronischen Stenose des Lumens resultiert oder diese hervorhebt;
- (iii) inhibiert die Konzentration der Zielzellen oder deren Migration; und
- (iv) ist cytostatisch.

[0096] Methoden zur Bestimmung der luminalen Querschnittsfläche, des Volumens oder des Durchmessers beinhalten ohne aber darauf begrenzt zu sein, Angiografie, Ultraschalluntersuchung, fluoroskopische Bildgebung, endoskopische Prüfung über optische Fasern oder Biopsie und Histologie.

[0097] Vorzugsweise besitzt ein Cytoskelettinhibitor, der hierin verwendet wird, alle vier Eigenschaften; jedoch sind in der Ausübung der vorliegenden Erfindung mit den Methoden, wie sie vorstehend beschrieben sind, die erste und die dritte im Allgemeinen wichtiger als die zweite und vierte. Es wurde gefunden, dass die Verabreichung von Cytochalasin B die Wirkung eines biologischen Stents besitzt. Die Wirkung des biologischen Stents kann durch Verwendung einer einzigen Infusion des therapeutischen Wirkstoffes in die traumatisierte Gegend der Gefäßwand bei einer Konzentration der Dosis im Bereich von ungefähr 0,1 µg/ml bis ungefähr 10,0 µg/ml (Beispiel 16) erreicht werden.

[0098] Im Falle der Cytoskelettinhibitoren, welche Anti-Migrations- oder Anti-Matrix-Eigenschaften aufweisen, können die Zellmigration und die Zellanhaftung in in vitro-Assays jeweils zur Bestimmung der Konzentration verwendet werden, bei welcher eine therapeutisch effektive Dosiermenge im flüssigen Raum in der Gefäßwand erreicht wird, die durch einen Infusions Katheter erzeugt wird.

[0099] Ein Cytoskelettinhibitor, der in den Ausführungsformen der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Verbindung verwendbar ist, zeigt eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften. Der Cytoskelettinhibitor

- (i) verursacht die Retention eines ausgedehnten luminalen Durchmessers oder der Querschnittsfläche, die auf eine Angioplastie folgt (beispielsweise PTCA, perkutane transluminale Angioplastie (PTA) oder Ähnliches) oder anderer Traumata einschließlich Atheroektomie (beispielsweise Rotoblater, Laser und Ähnliches), koronare Arterien-Bypass-Prozeduren oder Ähnliches;
- (ii) inhibiert die Proliferation der Zielzellen (beispielsweise nach einer 5-minütigen und 24-stündigen Exposition eines Wirkstoffes, in vitro-Gewebekulturen der vaskulären glatten Muskulatur zeigen einen Inhibitionsgrad der ³H-Thymidinaufnahme und zeigen vorzugsweise eine relativ geringe Inhibierung der ³H-Leucin-Aufnahme);
- (iii) erzeugt bei einer Dosis, die ausreicht, die DNA-Synthese zu inhibieren, nur in einem schwachen bis mäßigen Umfang morphologische cytotoxische Effekte (beispielsweise in den Assays, wie sie unten beschrieben sind, im zweiten oder dritten Grad);
- (iv) inhibiert die Konzentration der Zielzellen und
- (v) ist cytostatisch.

[0100] Nach Identifikation eines verwendbaren Cytoskelettinhibitors, der eine oder mehrere der vorausgehenden Eigenschaften zeigt, wird der Cytoskelettinhibitor einem zweiten Testprotokoll unterworfen, das eine längere Exposition der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (VSMC) durch den Cytoskelettinhibitor beinhaltet. Beispielsweise zeigt ein Inhibitor, der für die Ausführungsformen der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Verbindung verwendbar ist auch die folgenden Eigenschaften:

- (i) nach langfristiger (beispielsweise fünftägiger) Exposition erzeugt der Inhibitor den gleichen oder ähnlichen in vitro-Effekt auf die DNA-Synthese und Proteinsynthese der Gewebekultur der glatten Muskulatur, wie er oben für die 5-minütige und 24-stündige Exposition beschrieben ist;
- (ii) bei einer wirksamen Dosis im Langzeit-in vitro-Assay für die Inhibierung der DNA-Synthese, zeigt der Inhibitor über einen längeren Zeitabschnitt (beispielsweise 10 Tage) schwache bis mäßige morphologische cytotoxische Effekte.

[0101] Die weitere Bewertung von potenziell nützlichen Wirkstoffen, die die Proliferation unterbinden, wird in einem in vivo-Modell einer Arterie aus einem Oberschenkel eines Schweines durchgeführt, die durch einen Ballon traumatisiert wurde. Vorzugsweise weisen diese Wirkstoffe eine 50%ige oder größere Inhibierung der Zellproliferation in der Tunica media der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur auf, wie es durch ein einstündiges „BRDU-Flash-Labeling“ angezeigt wird, das vor der Abnahme des Gewebes und der histologischen Auswertung durchgeführt wird (Beispiel 13). Falls ein Inhibitor in diesem Assay wirksam ist, um die Proliferation der intimalen glatten Muskulatur mit einem Faktor von 50% oder mehr in einer einzigen Exposition zu inhibieren, erfordert dies keine Verabreichung in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung.

[0102] Inhibitoren für die anhaltende Freisetzung werden dann ausgewertet, wenn die systemische Toxizität

und der potenzielle therapeutische Index eine intravenöse Verabreichung zu erlauben scheinen, um den Grenzwert der 50%igen Inhibierung zu erreichen, oder, wenn der Inhibitor der örtlichen Zuführung zu den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur durch anhaltende Freisetzung bei einer wirksamen Dosis, die die Proliferation verhindert, zugänglich ist. Inhibitoren werden in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung zur Dosisoptimierung und für Wirksamkeitsstudien ausgewertet. Vorzugsweise verringern Inhibitoren, die die Proliferation unterbinden und die in der Ausübung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, die vaskuläre Stenose durch einen Faktor von 50% in Oberschenkelarterien von Schweinen, die durch einen Ballon traumatisiert wurden, und, was mehr bevorzugt ist, sie verringern die vaskuläre Stenose in koronaren Schweinearterien in einem ähnlichen Ausmaß.

[0103] Die Inhibierung der zellulären Proliferation (d. h. die DNA-Synthese) ist die Haupteigenschaft von Inhibitoren, die für die Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung nützlich sind. Beispielsweise zeigt ein bevorzugter Cytoskeletthinhibitor eine Differenzierung zwischen der ^3H -Leucin- und ^3H -Thymidin-Aufnahme, so dass er bei cytostatischen Dosiermengen verabreicht werden kann. Darüber hinaus sollten Cytotoxizitätsstudien anzeigen, dass die verlängerte Exposition bezüglich des Cytoskeletthinhibitors sich nicht nachteilig auf die Zielzellen auswirkt. Zusätzlich sollte die BRDU-Taktung anzeigen, dass der Cytoskeletthinhibitor wirksam die Proliferation der Zielzellen unterbindet. Eine beliebige konventionelle Methode zur Abschätzung der Eignung eines Cytoskeletthinhibitors zur Inhibierung der Proliferation der Zellen kann jedoch alternativ dazu angewendet werden.

Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung

[0104] Ausführungsformen der Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung der Erfindung können Mikropartikel, Nanopartikel oder Mikroemulsion umfassen, die einen Cytoskeletthinhibitor aufweisen, der darin dispergiert ist, oder können den Cytoskeletthinhibitor in reiner, vorzugsweise in kristalliner, fester Form umfassen. Für den Verabreichungszweck der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung, umfassen die Mikropartikel-Dosierungsformen reine, vorzugsweise kristalline, Cytoskeletthinhibitoren, die bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben. Die therapeutischen Dosierungsformen können in beliebiger geeigneter Konfiguration für die anhaltende Freisetzung vorliegen. Bevorzugte therapeutische Dosierungsformen für die anhaltende Freisetzung zeigen eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften:

- Mikropartikel (beispielsweise von ungefähr 0,01 Mikrometer bis ungefähr 200 Mikrometer im Durchmesser, vorzugsweise von ungefähr 0,5 bis ungefähr 50 Mikrometer und noch mehr bevorzugt, von ungefähr 2 bis ungefähr 15 Mikrometer) oder Nanopartikel (beispielsweise von ungefähr 0,01 Nanometer bis ungefähr 1000 Nanometer im Durchmesser, vorzugsweise von ungefähr 50 bis ungefähr 200 Nanometer), Pulver mit frei fließender Struktur, welche Kristalle oder Mikrokristalle umfassen;
- Bioabbaubare Strukturen, die so geformt sind, dass sie den Bioabbau über eine Zeitspanne von vorzugsweise ungefähr 0,5 bis ungefähr 180 Tagen gestatten, vorzugsweise von ungefähr 1–3 bis ungefähr 150 Tagen, oder nicht-bioabbaubare Strukturen, die es erlauben, dass die Diffusion des therapeutischen Wirkstoffes über eine Zellspanne von ungefähr 0,5 bis ungefähr 180 Tagen eintritt, mehr bevorzugt von ungefähr 30 bis ungefähr 120 Tagen;
- Biokompatibilität mit dem Zielgewebe und der örtlichen physiologischen Umgebung, in welche die Dosierungsform verabreicht werden soll, einschließlich des Liefers von biokompatiblen bioabbaubaren Produkten;
- die Ermöglichung einer stabilen und reproduzierbaren Dispersion des Cytoskeletthinhibitors darin, vorzugsweise unter Bildung einer polymeren Matrix des Cytoskeletthinhibitors, mit einer wirksamen Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors, die auf eine oder beide der folgenden Wege eintritt: (1) Diffusion des Cytoskeletthinhibitors durch die Dosierungsform (falls der Cytoskeletthinhibitor in der geformten Polymermischung löslich ist, die die Maße der Dosierungsform definiert); oder (2) Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors in dem Maße, wie die Dosierungsform biologisch abgebaut wird; und/oder
- für gezielte Dosierungsformen, die vorzugsweise ungefähr 1 bis ungefähr 10.000 bindende Proteine/Peptide bezogen auf die Bindungen der Dosierungsformen und noch mehr bevorzugt ein Maximum von ungefähr einem bindenden Peptid pro Bindung der Dosierungsform pro 150 Quadratängström der Partikeloberfläche aufweisen. Die gesamte Anzahl der bindenden Proteine/Peptide an Bindungen der Dosierungsformen hängt von der Partikelgröße ab, die eingesetzt wird. Die bindenden Proteine oder Peptide sind in der Lage, an die Partikel der therapeutischen Dosierungsform durch ein kovalentes Liganden-Sandwich oder durch nicht-kovalente Modalitäten zu koppeln, wie hierin ausgeführt.

[0105] Die nanopartikulären therapeutischen Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung sind vorzugsweise bioabbaubar und binden gegebenenfalls an die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur und dringen in diese Zellen ein, hauptsächlich durch Endocytose. Der Bioabbau der Nanopartikel tritt mit der Zeit ein (bei-

spielsweise 30 bis 120 Tage) in prälysosomischen Vesikeln und Lysosomen. Bevorzugte Ausführungen der therapeutischen Dosierungsformen in Form größerer Mikropartikel der vorliegenden Erfindung setzen die Cytoskeletthinhibitoren für eine nachfolgende Aufnahme durch eine Zielzelle mit nur einigen wenigen der kleineren Mikropartikel frei, die in die Zelle durch Phagocytose eindringen. Jemand, der diese Methode ausübt, wird zu würdigen wissen, dass der genaue Mechanismus, durch welchen eine Zielzelle eine Dosierungsform der vorliegenden Erfindung assimiliert und metabolisiert, von der Morphologie, der Physiologie und metabolischen Prozessen jener Zellen abhängig ist. Die Größe der Partikel der therapeutischen Dosierungsformen für die anhaltende Freisetzung ist gleichfalls bezüglich der Art der Zellassimilation wichtig. Beispielsweise können die kleineren Nanopartikel mit der interstiziellen Flüssigkeit zwischen Zellen fließen und in das erfüllte Gewebe hineindringen. Die größeren Mikropartikel tendieren dazu, leichter interstiziell vom erfüllten Primärgewebe eingefangen zu werden, und sind deshalb nützlich, Cytoskeletthinhibitoren zu liefern, die die Proliferation unterbinden.

[0106] Alternativ dazu können die Ausführungsformen der Dosierungsform für die anhaltende Freisetzung eine Emulsion oder eine Mikroemulsion umfassen, die einen darin dispergierten Cytoskeletthinhibitor besitzen. Mikroemulsionen werden im Allgemeinen als thermodynamisch stabile, isotropische klare Dispersionen von zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten definiert, die durch Filme der oberflächenaktive Moleküle, die eine Schnittstelle besitzen, stabilisiert werden. Mikroemulsionen können spontan gebildet werden. Die Bildung von Mikroemulsionen beinhaltet gewöhnlich eine Kombination von drei bis fünf Komponenten, nämlich eine Öl-, eine Wasser-, eine Oberflächen-, eine Co-Oberflächen- und eine Elektrolytkomponente. Im Allgemeinen sind alle pharmazeutischen Emulsionen, die für die parenterale Verabreichung gebildet werden, vom Öl-in-Wasser-Typ(o/w-Typ). Ein Arzneimittel für die parenterale Verabreichung in Form einer Mikroemulsion kann für die Zuführung von Arzneimitteln nützlich sein, die nur gering in Wasser löslich sind, für die Stabilisierung Hydrolyse-empfindlicher Verbindungen, zur Reduzierung der Reizung durch oder der Toxizität von intravenös verabreichten Arzneimitteln, der Herstellung der Dosierungsformen für die anhaltende Freisetzung, und kann auf die Zuführung von Arzneimitteln zu verschiedenen Organen gerichtet sein.

[0107] Die Tendenz, entweder eine Wasser-in-Öl(w/o)- oder eine Öl-in-Wasser(o/w)-Mikroemulsion zu bilden, wird durch die Eigenschaften des Öles und der oberflächenaktiven Stoffe beeinflusst. Oberflächenaktive Stoffe werden gewöhnlich durch eine empirische Skala klassifiziert, die von 1 bis 20 reicht, und die als das Hydrophilie-Lipophilie-Gleichgewicht (HLB) bekannt ist. Das Konzept des HLB-Wertes von oberflächenaktiven Stoffen und deren Bestimmung ist von Milton J. Rosen in „Surfactants & Interfacial Phenomena“, J. Wiley & Sons, New York, NY, 1978, Seiten 242–245, oder von Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3. Auflage, Bd. 8, 1979, Seiten 910–915, offenbart.

[0108] Im Allgemeinen werden (w/o)-Mikroemulsionen durch Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen (oder Emulgatoren) gebildet, die einen HLB-Wert im Bereich von ungefähr 3 bis 6 besitzen, während (o/w)-Mikroemulsionen durch Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen gebildet werden, die einen HLB-Wert im Bereich von ungefähr 8 bis 18 besitzen. Es ist schon lange erkannt worden, dass eine niedrige Grenzflächen-spannung zur thermodynamischen Stabilität von Mikroemulsionen beiträgt. Um dies zu erreichen, zeigen die oberflächenaktiven Stoffe vorzugsweise eine niedrige Löslichkeit sowohl in den Öl- wie auch in den Wasserphasen, und sie werden vornehmlich an der Wasser-Öl-Schnittstelle absorbiert, mit einer einhergehenden Erniedrigung der Grenzflächen-spannung. Wenn die Grenzflächen-spannung niedriger ist als 2×10^{-2} dyn/cm kann eine stabile Mikroemulsion gebildet werden. Allgemeine Überblicke über Mikroemulsionen werden von Bhargava et al., Pharm. Tech., 46–53, März 1987, und Kahlweit, Science, 240, 617–621, 1988, zur Verfügung gestellt.

[0109] Mikroemulsionen sind typischerweise im Wesentlichen nicht-opak, d. h. dass sie transparent oder opaleszent sind, wenn sie durch Mittel der optischen Mikroskopie betrachtet werden. Im unberührten Zustand sind sie optisch isotrop (nicht-brechend), wenn sie unter polarisiertem Licht geprüft werden. Die dispergierte Phase umfasst typischerweise Partikel oder Tröpfchen, die normalerweise in der Größe zwischen 5 und 200 nm liegen, und dies ist die Ursache für ihre optische Transparenz. Diese Partikel können kugelförmig sein, obwohl andere Strukturen durchaus möglich sind.

[0110] Die Rolle des Co-Tensids, gewöhnlich ein kurzkettiger Alkohol, ist es, die Grenzflächen-Instabilität dadurch zu erhöhen, dass es in den Film des oberflächenaktiven Stoffes eindringt, und folglich infolge des Hohlraumes zwischen den Molekülen des oberflächenaktiven Stoffes einen ungeordneten Film erzeugt. Die Verwendung eines Co-Tensids in Mikroemulsionen ist jedoch optional, und alkoholfreie, selbstemulgierende Emulsionen und Mikroemulsionen sind bereits beschrieben worden (vgl. zum Beispiel Pouton et al, Int. Journal of Pharmaceutics, 27, 335–348, 1985 und Osborne et al., J. Disp. Sci. Tech., 9, 415–423, 1988).

[0111] Es bestehen viele Vorteile durch die Verwendung einer Mikroemulsion bezüglich einer konventionellen Emulsion (oder Makroemulsion) für den Transport des Arzneimittels (Zuführung). Mikroemulsionen können spontan ohne die Notwendigkeit einer hohen Zufuhr von Energie gebildet werden, und sind deshalb leicht herzustellen und für kommerzielle Anwendungen zu vergrößern; sie haben eine thermodynamische Stabilität als Folge ihrer kleinen Partikelgröße und haben daher eine lange Haltbarkeit. Sie haben eine isotropisch klare Erscheinung, so dass sie durch spektroskopische Mittel überwacht werden können. Sie haben eine relativ niedrige Viskosität und sind deshalb leicht zu transportieren und zu mischen. Sie haben auch eine große interfaciale Fläche, welche die Oberflächenreaktionen beschleunigt. Sie haben eine niedrige interfaciale Spannung, welche eine flexible und starke Eindringkraft erlaubt. Sie bieten auch die Möglichkeit einer verbesserten Löslichkeit des Arzneimittels und eines verbesserten Schutzes gegen enzymatische Hydrolyse. Zusätzlich können Mikroemulsionen Phaseninversion durch Zusatz eines Überschusses der dispergierten Phase oder als Antwort auf eine Temperaturänderung eingehen, und dies ist eine Eigenschaft dieser Systeme, die die Arzneimittelfreisetzung aus Mikroemulsionen sowohl in vitro als auch in vivo beeinflussen kann.

[0112] Der Begriff „Öl“ wird hierin in einer allgemeinen Bedeutung verwendet, um eine große Klasse von Substanzen zu identifizieren, sei es mineralischen, vegetabilischen, tierischen, ätherischen, synthetischen oder essbaren Ursprungs, sofern jene Substanzen pharmazeutisch verträglich sind. Beispielsweise sind Ester des Glycerins mit drei Fettsäuren, die 9–83, mehr bevorzugt ungefähr 21–60 und noch mehr bevorzugt ungefähr 21–45 Kohlenstoffatome besitzen, verwendbare Öle, um Mikroemulsionen herzustellen. Bevorzugte Triglyceride sind kurzkettige (9–15 Kohlenstoffatome) und mittelkettige (21–45 Kohlenstoffatome), Triglyceride. Daher beinhalten Triester des Glycerins natürliche, essbare Öle beispielsweise wie Canola-, Mais-, Oliven-, Sonnenblumen- und Kokosnussöl, die Ester der Decansäure, und chemisch hergestellte Öle, beispielsweise Triacetin, 1-Olel-2,3-diacetylgerin und Ähnliches.

[0113] Die Alkohole, die in Mikroemulsionen verwendet werden können, beinhalten, ohne jedoch darauf begrenzt zu sein, Ethanol, Propylenglykol (als $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ und/oder $\text{CH}_3\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$), Glycerin, $\text{C}_5\text{-C}_{12}$ -Mono- und Disaccharide, beispielsweise Dextrose, Rohrzucker, Fruchtzucker, in reiner Form oder in anderen Formen, beispielsweise als Melasse, brauner Zucker, Invertzucker, Raffinationssirup, Maissirup; und Zuckeralkohole, wie beispielsweise Sorbit, Xylit und Mannit. Die Alkohole können einzeln oder in Mischungen von zwei oder mehr davon verwendet werden. Darüber hinaus sind diese Alkohole vorzugsweise in Wasser besser löslich als in den Ölen, mit denen sie verwendet werden.

[0114] Die oberflächenaktiven Stoffe, die zur Herstellung der Mikroemulsionen verwendet werden können, beinhalten all jene ionischen und nichtionischen oberflächenaktiven Stoffe, die für oral einzunehmende Produkte verwendbar sind, die auf die Anwendung auf Säugetiere abgezielt sind, beispielsweise Nahrung, Getränke, Konfekt, Pharmazeutika und Mittel der Zahnbehandlung. Die Auswahl der oberflächenaktiven Stoffe zur Verwendung mit einem bestimmten Öl hängt vom HLB-Wert (Hydrophilie-Lipophilie-Gleichgewicht) der oberflächeaktiven Stoffe ab.

[0115] Verschiedene ionische (anionische) oberflächenaktive Stoffe beinhalten Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Monoglycerinester der Diacetylweinsäure, Diglyceridester der Diacetylweinsäure, Monoglyceridester der Zitronensäure und Salze davon, Diglyceridester der Zitronensäure, Monoglyceridester der Milchsäure, Diglyceridester der Milchsäure, das Natriumsalz der Monoglyceridester der Dioctylsulfobernsteinsäure der Phosphorsäure, Diglyceridester der Phosphorsäure, Lecithin, hydroxyliertes Lecithin. Verschiedene nichtionische oberflächenaktive Stoffe beinhalten Polysorbate, Sorbitester der Myristinsäure, Sorbitester der Palmitinsäure, Sorbitester der Stearinsäure, Sorbitester der Ölsäure, Polyglycerinester der Myristinsäure, Polyglycerinester der Palmitinsäure, Polyglycerinester der Stearinsäure, Polyglycerinester der Ölsäure, Monoglycerinester der Myristinsäure, Monoglycerinester der Palmitinsäure, Monoglycerinester der Stearinsäure, Monoglycerinester der Ölsäure, Diglycerinester der Myristinsäure, Diglycerinester der Palmitinsäure, Diglycerinester der Stearinsäure, Diglycerinester der Ölsäure, (Ethoxy)_n-Monoglyceride der Myristinsäure, (Ethoxy)_n-Monoglyceride der Palmitinsäure, (Ethoxy)_n-Monoglyceride der Stearinsäure, (Ethoxy)_n-Monoglyceride der Ölsäure, wobei n eine ganze Zahl von 10 bis 30 ist, (Ethoxy)_n-Diglyceride der Myristinsäure, (Ethoxy)_n-Diglyceride der Palmitinsäure, (Ethoxy)_n-Diglyceride der Stearinsäure, (Ethoxy)_n-Diglyceride der Ölsäure, wobei n eine ganze Zahl von 10 bis 30 ist, einen Rohrzuckerester der Myristinsäure, Ester der Palmitinsäure, Ester der Stearinsäure, Ester der Ölsäure, Propylenglykolester der Myristinsäure, Ester der Palmitinsäure, Ester der Stearinsäure und Ester der Ölsäure.

[0116] Darüber hinaus können beliebige konventionelle Salze oder oberflächenaktive Derivate verwendet werden, vorausgesetzt natürlich, dass sie pharmazeutisch verträglich sind. Der Fachmann kann ein bestimmtes Salz oder Derivat durch Durchführung von Routineversuchen auswählen, falls notwendig. Insbesondere

sind Alkalimetallsalze und die Taurocholat-Derivate typische solcher Verbindungen.

[0117] Ein nichtionisches oberflächenaktives Mittel beinhaltet vorzugsweise ein alkalisches oxidisches Kondensat einer organischen Verbindung, welches eine oder mehrere Hydroxylgruppen enthält. Beispielsweise sind ethoxylierte und/oder propoxylierte Alkohole oder Ester oder Mischungen davon allgemein verfügbar und dem Fachmann wohl bekannt. Geeignete oberflächenaktive Stoffe beinhalten, ohne jedoch darauf begrenzt zu sein, TYLOXAPOL, POLOXAMER 4070, POLOXAMER 188, POLYOXYL-40-Stearat, POLYSORBAT 80 und POLYSORBAT 20, ebenso wie verschiedene Verbindungen, die unter dem Handelsnamen TWEEN (ICI America, Inc., Wilmington, Del., USA), und PLURONIC F-68 (Handelsname der BASF, Ludwigshafen, Deutschland, für ein Copolymer des Polyoxiethylens und Polyoxipropylens).

[0118] Einige typische Beispiele von oberflächenaktiven Stoffen, die für die Erfindung verwendbar sind, können beinhalten: Salze der Gallensäure, Natriumcholat, eine Mischung von 80 Gewichtsprozent Ethylenglykol 1000-Monocethylether und 20 Gewichtsprozent Ethylenglykol 400, und Polyoxiethylenether. Die Menge des oberflächenaktiven Stoffes in der Erfindung beträgt 5–10 Gewichtsprozent der totalen Menge der Sache und des Kapselmaterials. Falls die Menge der oberflächenaktiven Stoffe weniger als 0,5 Gewichtsprozent beträgt, kann die Emulsion nicht gebildet werden.

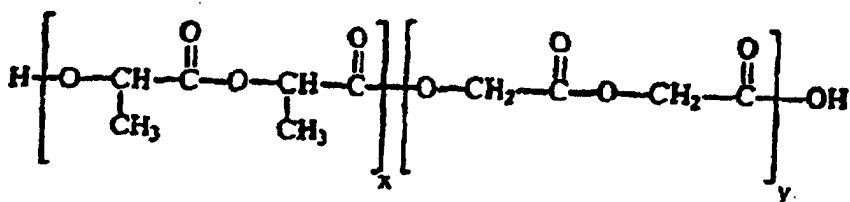
[0119] Pharmazeutische Zusammenstellungen, die eine Mikroemulsion umfassen, umfassen auch vorzugsweise ein Konservierungsmittel, beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylparaben, die medizinisch für die parenterale Verabreichung verträglich sind. Jedoch sind Konservierungsstoffe nicht erforderlich, falls die Zusammenstellungen im Autoklaven sterilisiert werden ohne im Wesentlichen ihre Stabilität zu reduzieren. Falls gewünscht, können die pharmazeutischen Zusammenstellungen oder Arzneimittel der vorliegenden Erfindung auch einen Regulator für den osmotischen Druck umfassen, beispielsweise Mannit oder Glycerin, wobei Glycerin für die parenterale Verabreichung bevorzugt und Mannit für die orale Verabreichung ist. Die Zusammenstellungen der vorliegenden Erfindung können gleichfalls ein Antioxidans umfassen, beispielsweise α -Tocopherol.

[0120] Die Herstellung der Mikroemulsionen ist aus dem Stand der Technik wohl bekannt (vgl. beispielsweise Wolf et al. (US-Patent 4,835,002); Lee et al. (US-Patent 5,362,424); Benita et al. (US-Patent 5,364,632); Owen et al. (WO 94/08604); Constantinides (WO 94/08605); Constantinides et al. (WO 94/19000); Constantinides et al. (WO 94/19001); und Constantinides et al. (WO 94/19003).

[0121] Bevorzugte Mikroemulsionen für die Verwendung in der Erfindung werden in den US-Patenten 5,478,860, US-Patent 4,389,330 und US-Patent 5,407,609 offenbart.

[0122] Bevorzugte Ausführungsformen für Dosierungsformen für die anhaltende Freisetzung der vorliegenden Erfindung umfassen bioabbaubare Mikropartikel oder Nanopartikel. Mehr bevorzugt werden bioabbaubare Mikropartikel oder Nanopartikel einer Matrix gebildet, welche ein Polymer enthält, welches den Bioabbau durch zufällige, nicht-enzymatische, hydrolytische Spaltung unter Freisetzung des Cytoskelettinhibitors hervorruft, wobei Poren innerhalb der bestimmten Struktur gebildet werden.

[0123] Polymere, welche aus der Kondensation von Alpha-Hydroxycarbonsäuren und verwandten Laktonen abgeleitet werden, sind bevorzugt. Eine besonders bevorzugte Einheit ist aus einer Mischung eines thermoplastischen Polyesters (beispielsweise Polylaktid oder Polyglykolid) oder eines Copolymers eines Laktids und der Glykolid-Komponenten gebildet, beispielsweise wie Poly(Laktid-co-Glykolid). Eine beispielhafte Struktur eines willkürlichen Poly(DL-Laktid-co-Glykolids) ist unten gezeigt, wobei die Werte von x und y durch denjenigen, der die Versuche ausübt, manipuliert werden können, um wünschenswerte Eigenschaften der Mikropartikel oder Nanopartikel erreichen zu können.



[0124] Andere Agenzien, die geeignet sind, um besondere Dosierungsformen zu bilden, beinhalten Polyorthoester und Polyacetale (Polymer Letters, 18: 293 (1980)) und Polyorthocarbonate (US-Patent 4,093,709) und Ähnliches.

[0125] Bevorzugte Partikel, die eine Matrix aus Milchsäure-/Glykolsäure-Polymeren enthalten, werden durch Emulsions-basierende Prozesse hergestellt, welche modifizierte Lösemittel-Extraktions-Verfahren darstellen, vgl. beispielsweise Verfahren, wie sie von Cowsar et al., „Poly(Lactid-Co-Glykolide)Microcapsules for Controlled Release of Steroids,” *Methods Enzymology*, 112: 101–116, 1985 (Steroidischer Einschluss in Mikropartikel) beschrieben werden; Eldridge et al., „Biodegradable and Biocompatible Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcal Enterotoxin B Toxinoid Which Enhances the Level of Toxin Neutralizing Antibodies,” *Infection and Immunity*, 59: 2978–2986, 1991 (Toxoidischer Einschluss); Cohen et al., „Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid)Microspheres,” *Pharmaceutical Research*, 8 (6): 713–720, 1991 (Einschluss von Enzymen); und Sanders et al. „Controlled Release of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)Microspheres,” *J. Pharmaceutical Science*, 73 (2) 1294–1297, 1984 (Einschluss von Peptiden).

[0126] Im Allgemeinen beinhaltet das Verfahren zur Herstellung der Partikel der Dosierungsformen das Auflösen der Polymere in einem halogenierten Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel, das Dispergieren einer Lösung des Cytoskeletthinhibitors (vorzugsweise wässrig) darin, und den Zusatz eines zusätzlichen Agens, das als Lösungsmittel für das Lösungsmittel des halogenierten Kohlenwasserstoffes wirkt, aber nicht für das Polymer. Das Polymer fällt aus der Lösung des polymer-halogenierten Kohlenwasserstoffes auf die Tröpfchen der Lösung aus, die den Cytoskeletthinhibitor enthält, und fängt den Cytoskeletthinhibitor ein. Vorzugsweise ist der Cytoskeletthinhibitor im Wesentlichen gleichmäßig innerhalb der Ausführung der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Verbindung dispergiert. Nach der Partikelbildung werden sie gewaschen und mit einem organischen Lösungsmittel verfestigt. Es folgen Schritte des Waschens mit Wasser und mit wässrigen nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen, bevor das Trocknen bei Raumtemperatur unter Vakuum erfolgt.

[0127] Für die Zwecke der Biokompatibilität werden bestimmte Dosierungsformen, die durch einen Cytoskeletthinhibitor, der in der Matrix der Partikel dispergiert ist, vor dem Verpacken, der Lagerung oder der Verabreichung sterilisiert. Die Sterilisation kann in einer beliebigen konventionellen Art und Weise durchgeführt werden. Beispielsweise können die Partikel durch Gamma-Strahlung bestrahlt werden, vorausgesetzt dass die Exposition einer solchen Strahlung die Struktur oder Funktion des Cytoskeletthinhibitors, der in der Cytoskeletthinhibitor-Polymer-Matrix oder dem bindenden Protein/Peptid, das daran befestigt ist, nicht nachteilig beeinflusst. Falls der Cytoskeletthinhibitor oder das bindende Protein/Peptid so nachteilig beeinflusst werden, können die Dosierungsformen der Partikel unter sterilen Bedingungen hergestellt werden.

[0128] Die Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors aus den Ausführungsformen der Partikel der Dosierungsformen der vorliegenden Erfindung kann sowohl als ein Ergebnis der Diffusion wie auch der Auflösung der Partikelmatrix eintreten. Die Geschwindigkeit des Bioabbaus beeinflusst direkt die Kinetik der Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors. Die Geschwindigkeit des Bioabbaus ist durch Änderung der Zusammenstellung oder der Struktur der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung regulierbar. Beispielsweise kann die Änderung des Laktid/Glykolid-Verhältnisses so durchgeführt werden, wie es beschrieben ist von Tice et al., „Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems,” *Pharmaceutical Technology*, Seiten 26–35, 1984; durch Einschluss von Agenzien, die die Geschwindigkeit der Polymerhydrolyse ändern, beispielsweise wie Zitronensäure und Natriumkarbonat, wie es von Kent et al., „Microencapsulation of Water Soluble Active Polypeptides,” US-Patent 4,675,189 beschrieben ist; durch Änderung der Beladung des Cytoskeletthinhibitors im Laktid/Glykolid-Polymer, wobei die Geschwindigkeit des Abbaus umgekehrt proportional zur Menge des darin enthaltenen Cytoskeletthinhibitors ist, durch wohl überlegte Auswahl eines geeigneten Analogons einer allgemeinen Familie von Cytoskeletthinhibitoren, die unterschiedliche Wirksamkeiten zur Schau stellen, um so die besagten Beladungen des Kernes zu verändern; und durch Variation der Partikelgröße, so wie es von Beck et al., „Poly(DL-Lactid-Co-Glycolide)/Norethisterone Microcapsules: An Injectable Biodegradable Contraceptive,” *Biol. Reprod.*, 28: 186–195, 1983, beschrieben ist oder Ähnliches. Alle vorstehend erwähnten Methoden der Regulierung der Geschwindigkeit des Bioabbaus beeinflussen die intrinsische Viskosität der Matrix, die das Polymer enthält, wobei deren Hydrationsgeschwindigkeit verändert wird.

[0129] Die bevorzugte Laktid/Glykolid-Struktur ist mit der physiologischen Umgebung des Säugers biokompatibel. Ebenso haben bevorzugte Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung den Vorteil, dass deren Bioabbau Milchsäure und Glykolsäure bildet, wobei beide normale metabolische Produkte von Säugern sind.

[0130] Funktionelle Gruppen, die für die Bindung des Proteins/Peptids an die Partikel der Dosierungsform erforderlich sind, sind gegebenenfalls in oder auf der Matrix des Partikels beinhaltet, und werden an die nicht-abbaubaren oder durch Bioabbau abbaubaren Polymereinheiten angeheftet. Funktionelle Gruppen, die für diesen Zweck verwendbar sind, beinhalten all jene, die mit Peptiden reaktiv sind, beispielsweise Carboxyl-, Amin-, Sulfhydryl-Gruppen und ähnliche Gruppen. Bevorzugte Einheiten für die Verstärkung der Bindung beinhalten

die endständigen Carboxyl-Gruppen der bevorzugten (Laktid-Glykolid)-Polymer-enthaltenden Matrix oder Ähnliches.

[0131] Cytoskeletthinhibitoren, die in den Ausführungsformen der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, sind vorzugsweise jene, die die Aktivität der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur inhibieren ohne jedoch die Zellen abzutöten (d. h. cytostatische Cytoskeletthinhibitoren). Ein cytostatischer Cytoskeletthinhibitor kann auch als eine Einheit definiert werden, die in der Lage ist, eine oder mehrere pathologische Aktivitäten der Zielzellen für eine Zeitdauer zu inhibieren, die ausreichend ist, einen therapeutischen Vorteil zu erzielen. Bevorzugte Cytoskeletthinhibitoren zeigen deshalb eine oder mehrere der folgenden Eignungen: Inhibierung der DNA-Synthese vor der Inhibierung der Proteinsynthese, oder Inhibierung der Migration der Zellen der glatten Muskulatur in die inneren Zellwände. Diese Cytoskeletthinhibitoren inhibieren nicht in signifikanter Weise die Proteinsynthese (d. h. sie töten die Zielzellen nicht ab) und ermöglichen daher die zelluläre Reparatur und die Matrixproduktion, die ihrerseits dazu dienen, die Läsion der vaskulären Wandung, die durch Angioplastie verursacht wurde, unter Reduzierung der Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur zu stabilisieren.

[0132] Bevorzugte Cytoskeletthinhibitoren sind die Cytochalasine, beispielsweise Cytochalasin B (Sigma Chemical Co.) und Taxol, oder analoge oder funktionelle Äquivalente davon. Diese Verbindungen sind cytostatisch und es ist gezeigt worden, dass sie eine geringe Inhibierung der Proteinsynthese und eine Cytotoxizität bei Konzentrationen bewirken, bei welchen eine signifikante Inhibierung der DNA-Synthese eintritt (vgl. Beispiel 8 und [Fig. 10A–Fig. 10D](#)). Ein verwendbares Protokoll für die Identifizierung der Cytoskeletthinhibitoren, die in den Ausführungsformen der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, wird beispielsweise im Beispiel 8 ausgeführt.

[0133] Zur Illustration wird ein Cytoskeletthinhibitor, beispielsweise Cytochalasin B, in Mikropartikel oder Nanopartikel des bioabbaubaren Poly(DL-Laktid-Co-Glykolids) inkorporiert. Die Mikropartikel betragen ungefähr 1 bis ungefähr 50 µm, vorzugsweise 4 µm bis ungefähr 15 µm und noch mehr bevorzugt ungefähr 2 bis ungefähr 15 µm im Durchmesser. Die Nanopartikel sind ungefähr 5 bis ungefähr 500 Nanometer, vorzugsweise ungefähr 10 bis ungefähr 250 Nanometer, und noch mehr bevorzugt ungefähr 50 bis ungefähr 200 Nanometer im Durchmesser. Die Mikropartikel oder Nanopartikel, die den Cytoskeletthinhibitor umfassen, können weiter in oder auf einer implantierbaren Vorrichtung eingerichtet sein, beispielsweise in einer Stent-Beschichtung, oder können in einem geeigneten flüssigen Vehikel durch eine implantierbare Vorrichtung zugeführt werden, beispielsweise durch einen Infusionskatheter. Vorzugsweise ist die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung bioabbaubar, und der Bioabbau tritt vorzugsweise über eine Zeitspanne von ungefähr 30 bis 120 Tagen ein. Die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung wird vorzugsweise während der Prozedur des vaskulären Traumas verabreicht.

[0134] Eine bevorzugte Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der Erfindung umfasst bioabbaubare Mikropartikel, vorzugsweise ungefähr 2 bis ungefähr 15 µm im Durchmesser, die Gewebe-verträglich und physisch verträglich mit einer implantierbaren Vorrichtung sind, beispielsweise einem nadelförmigen Infusionskatheter oder einem Mikroinfusionskatheter. Eine weitere bevorzugte Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der Erfindung umfasst bioabbaubare Nanopartikel, vorzugsweise ungefähr 50 bis 200 Nanometer im Durchmesser, die Gewebe-verträglich und physisch verträglich mit einer implantierbaren Vorrichtung sind, beispielsweise einem nadelförmigen Infusionskatheter oder einem Mikroinfusionskatheter. Um die Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung durch einen Katheter zuzuführen, sind die Katheterporen oder die Porengrößen vorzugsweise ungefähr 0,1 bis ungefähr 8 Mikron und mehr bevorzugt ungefähr 0,2 bis ungefähr 0,8 Mikron im Durchmesser.

[0135] Die zelluläre Konzentration des Cytoskeletthinhibitors, die in der Tunica media und/oder Intima des behandelten Gefäßes erreicht wird, und die wirksam ist, um die Proliferation und Migration der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren, ist beispielsweise eine zelluläre Konzentration von wenigstens ungefähr 0,1 µg/ml Cytochalasin B. Die Inhibierung der Zellen der glatten Muskulatur resultiert in einer schnelleren und vollständigeren Re-Endothelisierung nach einem durch eine Prozedur verursachten vaskulären Trauma, beispielsweise durch die durch einen Eingriff erfolgte Einführung des Stents. Die erhöhte Geschwindigkeit der Re-Endothelisierung reduziert den Verlust der luminalen Querschnittsfläche oder des Durchmessers und reduziert Abnahmen im Blutfluss.

[0136] Eine bevorzugte Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der Erfindung umfasst eine reine, feste kristalline Form eines Cytoskeletthinhibitors. Diese Ausführungsform der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Erfindung umfasst vorzugsweise weiter einen Gewebe-verträglichen und pharma-

zeitisch akzeptablen Matrixträger, der eine unterstützende Struktur für die Kristalle zur Verfügung stellt, beispielsweise einen geformten Körper aus Silikon, Kollagengel, das in einem Kollagennetz gespeichert ist, pluronisches Gel, das in einem Kollagennetz gespeichert ist, oder Mannit, das in einem geformten Körper des Silikons gespeichert ist. Deshalb umfassen beispielsweise Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung, die Cytochalasin B und einen pharmazeutischen Matrixträger umfassen, vorzugsweise ungefähr 5 bis ungefähr 70%, mehr bevorzugt ungefähr 7 bis ungefähr 40% und sogar noch mehr bevorzugt ungefähr 5 bis ungefähr 30 Gewichtsprozent von Cytochalasin B/Gewichtsprozent der gesamten Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung des therapeutischen Wirkstoffes des Matrixträgers. Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung, welche Taxol und einen pharmazeutischen Matrixträger umfassen, umfassen vorzugsweise ungefähr 1 bis ungefähr 70%, mehr bevorzugt ungefähr 2 bis ungefähr 50% und sogar noch mehr bevorzugt ungefähr 3 bis ungefähr 8 Gewichtsprozent des Taxols/Gewichtsprozent der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung des therapeutischen Wirkstoffes des Matrixträgers. Im Allgemeinen umfassen Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung, die einen Cytoskelettinhibitor in im Wesentlichen kristalliner Form umfassen, 3 bis 50 und, noch mehr bevorzugt, 5 bis 40 Gewichtsprozent der Dosierungsform.

Identifizierung und Herstellung der Ziel-Dosierungsformen, die verwendet werden können, um Arzneimittel der Erfindung etc. herzustellen

[0137] Zell-bindende Proteine der vaskulären glatten Muskulatur, die in der Erfindung verwendet werden können, binden sich an Ziele auf der Oberfläche der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur. Ein verwendbares bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur ist ein Polypeptid, eine peptidische oder mimetische Verbindung (wie unten beschrieben), die in der Lage ist, sich an ein Target oder einen Marker auf einer Oberflächenkomponente einer intakten oder gespaltenen Zelle der vaskulären glatten Muskulatur zu binden. Solch eine Bindung erlaubt entweder die extrazelluläre Freisetzung der Cytoskelettinhibitoren in der unmittelbaren interstitziellen Matrix mit nachfolgender Diffusion des Cytoskelettinhibitors in die verbleibenden intakten Zellen der glatten Muskulatur und/oder Internalisierung durch die Zelle in einen intrazellulären Raum der gesamten bioabbaubaren Einheit des Targets, wobei die diesbezügliche Zuführung des Cytoskelettinhibitors ermöglicht wird. Es soll beachtet werden, dass spezifische Targets, beispielsweise Polypeptide oder Carbohydrate, Proteoglykane und Ähnliches, die mit den Zellmembranen der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur verknüpft sind, für die Auswahl (beispielsweise durch Klonen) oder für den Aufbau (beispielsweise durch Gentechnik oder chemische Synthese) geeigneter spezifischer bindender Proteine der vaskulären glatten Muskulatur verwendbar sind. Insbesondere verwendbare „Targets“ werden durch die Zellen der glatten Muskulatur internalisiert, beispielsweise, wenn die Umkehr der Antigen-Bestandteile einer Membran in Erneuerungsprozessen eintritt. Internalisierung durch Zeilen kann gleichfalls durch Mechanismen eintreten, welche Phagolysosome, Clathrin-beschichtete Kerne, Rezeptor-vermittelnde Neuverteilung oder Endocytose und Ähnliches beinhalten.

[0138] Repräsentative Beispiele verwendbarer bindender Proteine der vaskulären glatten Muskulatur beinhalten Antikörper (beispielsweise monoklonale und polyklonale Antikörper), F(ab')₂Fab'-, Fab- und Fv-Fragmente und/oder die Komplementarität bestimmende Bereiche (complementarity determining regions, CDR) je-ner Antikörper oder funktioneller Äquivalente davon (beispielsweise bindende Peptide und Ähnliches); Wachstumsfaktoren, Cytokine und Polypeptidhormone und Ähnliches; und Rezeptoren der extrazellulären Matrix, welche Makromoleküle erkennen (beispielsweise Integrin- und Fibronektin-Rezeptoren und Ähnliches).

[0139] In einer bevorzugten Ausführungsform wird beispielsweise ein „Target“ durch Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) beispielhaft dargestellt, welches durch die Zellen und Perizyten der vaskulären glatten Muskulatur hergestellt wird, und ein diskreter Anteil (hierin als Epitop bezeichnet) des CSPG-Moleküls, das ein scheinbares Molekulargewicht von ungefähr 250 kD besitzt, wird als „Target“ besonders bevorzugt. Das 250 kD-Target ist ein N-verknüpftes Glykoprotein, welches eine Komponente eines größeren 400 kD-Proteoglykan-Komplexes ist (Bumol et al., PNAS USA, 79: 1245–1249 (1982)). In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur durch den NR-AN-01-monoklonalen Antikörper zur Verfügung gestellt (eine Unterkultur von NR-ML-05), das an ein Epitop eines CSPG-Zielmoleküls in einer vaskulären glatten Muskulatur bindet. Der monoklonale Antikörper, der als NR-ML-05 bezeichnet wurde, bindet, wie berichtet, ein 250 kD-CSPG, das durch melanome Zellen hergestellt wurde (Morgan et al., US-Patent 4,897,225).

[0140] Zellen und Perizyten der glatten Muskulatur synthetisieren gleichfalls, wie berichtet, sowohl ein 250 kD-CSPG wie auch andere CSPGs (Schlingemann et al., siehe oben). NR-ML-05-Bindung an Zellen der glatten Muskulatur wurden offenbart (Fritzberg et al., US-Patent 4,879,225). Das Hybridom NR-ML-05, welches einen monoklonalen Antikörper absondert, der sich an das 400-kD-CSPG bindet, wurde bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD hinterlegt, und darauf die Zugangsnummer 9350 erteilt. NR-ML-05 ist der

Stamm und das strukturelle und funktionelle Äquivalent des Subklons NR-AN-01, das hierin offenbart ist.

[0141] Es soll beachtet werden, dass NR-AN-01 nur ein Beispiel eines bindenden Proteins der vaskulären glatten Muskulatur ist, das sich in spezifischer Weise mit dem 400 kD-CSPG-Target verknüpft, und dass andere bindende Proteine, die sich mit diesem Target und anderen Epitopen auf diesem Target verknüpfen (Bumol et al., PNAS USA, 79: 1245–1249 (1982)) ebenfalls in den Arzneimitteln, Zusammenstellungen, Vorrichtungen oder Kits der Erfindung verwendet werden können, wenn die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Vorrichtungen oder Kits zur Behandlung der Stenose verwendet werden, die auf vaskuläre chirurgische Prozeduren folgt, beispielsweise PTCA; bevorzugte bindende Proteine, beispielsweise Antikörper oder Fragmente, zur Verwendung in der Ausübung der Erfindung, besitzen eine Bindungsaffinität von $> 10^4$ Liter/Mol für die 250 kD-CSPG der vaskulären glatten Muskulatur und gleichfalls die Fähigkeit, an Zellen oder Perizyten der glatten Muskulatur gebunden oder durch Zellen oder Perizyten der glatten Muskulatur internalisiert zu werden.

[0142] Weiterhin soll beachtet werden, dass die Reste der Aminosäuren, die in die kinetische Mehrpunkt-Verknüpfung des NR-AN-01-monoklonalen Antikörpers mit einem Antigen-Epitop eines CSPG-Markers involviert sind (beispielsweise die Aminosäuren, welche die Komplementarität bestimmenden Bereiche ausmachen) durch ein Computer-gestütztes molekulares Modelling und durch die Verwendung von Mutanten bestimmt werden können, die eine veränderte Bindungsaffinität zum Antikörper besitzen. Die bindenden Aminosäuren und dreidimensionale Modelle des Bindungsortes des NR-AN-01-Antigens kann als ein molekulares Modell zur Konstruktion funktioneller Äquivalente dienen, beispielsweise kurze Polypeptide („minimale Polypeptide“), welche eine Bindungsaffinität für ein CSPG besitzen, das durch Zellen und Perizyten der vaskulären glatten Muskulatur hergestellt wurde.

[0143] Dreidimensionales Modelling ist gleichfalls verwendbar, um andere funktionelle Äquivalente zu konstruieren, um die Bindung des NR-AN-01 an sein Antigen-Epitop nachzuahmen, beispielsweise chemische Nachahmer“-Verbindungen, welche die dreidimensionalen Aspekte der NR-AN-01-Bindung an sein Epitop in einem CSPG-Target-Antigen nachahmen. Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „minimales Polypeptid“ auf eine Aminosäuresequenz von wenigstens sechs Aminosäuren in der Länge. Wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff „mimetisch“ auf ein organisches chemisches Oligomer oder Polymer, das so ausgebildet ist, dass es die richtige räumliche Anordnung für die Bindung an die Aminosäuren erlangt, beispielsweise des NR-AN-01-CSPG-Targets, das durch Zellen oder Perizyten der vaskulären glatten Muskulatur hergestellt wurde.

[0144] Man kann sich auch vorstellen, dass menschliche monoklonale Antikörper oder „vermenschlichte“ mausartige Antikörper, die sich an ein bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur binden, in den therapeutischen Konjugaten verwendbar sind. Beispielsweise kann der mausartige monoklonale Antikörper in „chimärer Form“ durch genetische Rekombination der Nukleotidsequenz, die einen mausartigen Fv-Bereich (d. h. der die Bindungsplätze des Antigens enthält) kodiert, mit der Nukleotidsequenz, die einen menschlichen festen Domänenbereich und einen Fc-Bereich kodiert, hergestellt werden, beispielsweise in einer Art und Weise, wie sie in der europäischen Patentanmeldung 411,893 offenbart ist. Einige mausartige Reste können auch innerhalb der Gerüstdomänen des menschlichen variablen Bereichsrahmens behalten werden, um einwandfreie Eigenschaften des Ziel-Bindungsplatzes zu gewährleisten. Es soll beachtet werden, dass vermenschlichte Bindungspartner der vaskulären glatten Muskulatur den Vorteil aufweisen, dass sie die Immunoreaktivität des Antikörpers oder Polypeptids im Gastrezipienten vermindern, und dass dies verwendbar sein könnte, um die Zunahme der in vivo-Halbwertszeit zu erhöhen und die Wahrscheinlichkeit nachteiliger Immunreaktionen bezüglich des Konjugates zu erniedrigen.

[0145] Als verwendbare bindende Peptide für Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung, die für die Behandlung der Restenose abgestimmt sind, sind jene gleichfalls mit einbezogen, die sich dort befinden, die sich an das intrazelluläre Stroms und an die Matrix lokalisieren, die sich zwischen und unter den Zellen der glatten Muskulatur befindet. Solche bindenden Peptide können den Cytoskeletthinhibitor dem interstiziellen Raum zwischen den Zielzellen zuführen. Der Cytoskeletthinhibitor wird für die anschließende Aufnahme durch die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in den interstiziellen Räumen freigesetzt. Bevorzugte bindende Peptide dieses Typs sind mit den Epitopen auf Kollagen, extrazellulären Glykoproteinen, beispielsweise Tenascin, Reticulum und elastischen Fasern, Cytokeratin und anderen interzellulären Matrixkomponenten verknüpft. Minimale Peptide, mimetische organische chemische Verbindungen, menschliche oder vermenschlichte monoklonale Antikörper und Ähnliches, die das intrazelluläre Stroms und die Matrix definieren, sind gleichfalls als bindende Peptide in dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verwendbar. Diese bindenden Peptide können in Übereinstimmung mit bekannten Techniken identifiziert und gebildet oder isoliert werden. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung bindet sich das bindende Protein der interstiziellen Matrix an

ein Ziel-Epitop mit einer Bindungskonstante von wenigstens ungefähr 10^{-4} M.

[0146] Repräsentative „Koppelungs“-Methoden für die Verknüpfung des Cytoskeletthinhibitors durch kovalente oder nicht-kovalente Bindungen an das bindende Protein der vaskulären glatten Muskulatur beinhalten chemische Vernetzer und heterobifunktionelle vernetzende Verbindungen (d. h. „Linker“), welche so reagieren, dass eine Bindung zwischen reaktiven Gruppen (beispielsweise Hydroxyl-, Amino-, Amido- oder Sulfhydryl-Gruppen) in einem Cytoskeletthinhibitor und anderen reaktiven Gruppen (mit einer ähnlichen Natur) im bindenden Protein der vaskulären glatten Muskulatur gebildet wird. Diese Bindung kann beispielsweise eine Peptidbindung, eine Disulfidbindung, eine Thioesterbindung, eine Amidbindung, eine Thioätherbindung und Ähnliches sein.

[0147] In einem illustrativen Beispiel sind Konjugate monoklonaler Antikörper mit Arzneimitteln durch Morgan und Foon (Monoclonal Antibody Therapy to Cancer: Preclinical Models and Investigations, Basic and Clinical Tumor Immunology, Band 2, Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA) und durch Uhr (J. of Immunol. 12: i–vii, 1984) zusammengestellt worden. Ein weiteres illustratives Beispiel, in welchem das Konjugat ein cytostatisches Radionuklid-Agenz enthält, US-Patent 4,897,255, Fritzberg et al., instruiert über Koppelungsmethoden, die dazu verwendet werden können, die vorliegenden Konjugate herzustellen.

[0148] Die Auswahl der Kopplungsmethode wird durch die Wahl des bindenden Proteins oder Peptids der vaskulären glatten Muskulatur beeinflusst, des bindenden Protein oder Peptids der interstiziellen Matrix und des Cytoskeletthinhibitors, und gleichfalls durch solche physikalischen Eigenschaften wie z. B. die Stabilität der Haltbarkeit und/oder durch biologische Eigenschaften, beispielsweise Halbwertszeit in Zellen und Blut, oder durch die Route der intrazellulären Räumlichkeitsausbildung und durch Ähnliches.

[0149] Der physikalische und chemische Charakter der Ausführungsformen der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Erfindung gestattet einige alternative Arten der Anheftung der Dosierungsformen an bindende Proteine oder Peptide. Dosierungsformen (vom Typ der anhaltenden Freisetzung) wie hierin beschrieben, sind zur Bindung an bindende Proteine/Peptide fähig durch beispielsweise kovalente Verknüpfung mittels Liganden-Sandwich-Verknüpfung oder nicht-kovalente Adsorption oder partielles Einfangen. Wenn die bevorzugten Poly-Milch-/Glykolsäure-Partikel mit dem darin dispergierten Cytoskeletthinhibitor gebildet werden, wird der ungeladene Polymer-Backbone sowohl nach innen (mit dem quasi-lipophilen therapeutischen Wirkstoff, der darin enthalten ist), wie auch nach außen entlang einer Mehrzahl der endständigen Carboxylgruppen ausgerichtet. Diese Carboxylgruppen auf der Oberfläche können als kovalente Plätze der Anheftung für nukleophile Gruppen des bindenden Proteins/Peptids dienen wenn sie aktiviert werden, beispielsweise durch ein Carbodiimid. Solche nukleophilen Gruppen beinhalten Lysin-Epsilon-Aminogruppen (Amid-Verknüpfung), Serin-Hydroxylgruppen (Ester-Verknüpfung) oder Cystein-Mercaptangruppen (Thioester-Verknüpfung). Reaktionen mit bestimmten Gruppen hängen vom pH-Wert und dem Reduktionszustand der Reaktionsbedingungen ab.

[0150] Beispielsweise können Poly-Milchsäure-/Glykolsäure-Partikel, welche endständige Carboxylsäuregruppen besitzen, mit N-Hydroxybenztriazol in Gegenwart eines wasserlöslichen Carbodiimids der Formel $R-N=C=N-R'$ (wobei R eine 3-Dimethylaminopropyl-Gruppe oder Ähnliches und R' eine Ethyl-Gruppe oder Ähnliches ist) umgesetzt werden. Die Benztriazol-derivatisierten Partikel (d. h. die aktivierten Imidat-tragenden Einheiten) werden dann mit einer nukleophilen Einheit eines Proteins/Peptids umgesetzt, beispielsweise einer verfügbaren Epsilon-Amino-Einheit. Alternativ dazu sind para-Nitrophenol, Tetrafluorphenol, N-Hydroxysuccinimid oder ähnliche Moleküle verwendbar, um einen aktiven Ester mit den endständigen Carboxyl-Gruppen der Poly-Milchsäure-/Glykolsäure-Partikel in der Gegenwart des Carbodiimids zu bilden. Andere nukleophile Einheiten des bindenden Proteins/Peptids beinhalten Hydroxyl-Gruppen des Serins, endogene freie Thiole des Cysteins, Thiolgruppen, die aus der Reduktion von Disulfidbrücken des bindenden Proteins/Peptids resultieren, unter Verwendung von reduzierenden Agenzien, die gewöhnlich für diesen Zweck verwendet werden (beispielsweise Cystein, Dithiotreitol, Mercaptoethanol und ähnliche Verbindungen) und Ähnliches. Zusätzlich sind endständige Carboxylgruppen der Poly-Milchsäure-/Glykolsäure-Partikel durch Thionylchlorid aktivierbar, wobei eine derivatisierte Einheit eines Säurechlorids gebildet wird. Die derivatisierten Partikel werden dann mit den nukleophilen Gruppen des bindenden Peptids/Proteins reagiert, wobei die gezielten Dosierungsformen gebildet werden.

[0151] Direkte Konjugation der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung an ein bindendes Protein oder Peptid kann die Erkennung der Zielzelle des bindenden Proteins/Peptids stören. Techniken über Liganden-Sandwich-Anheftung sind verwendbare Alternativen, um die Anheftung der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung an das bindende Protein/Peptid zu erreichen. Diese Techniken beinhalten die Bildung einer

primären Peptid- oder Proteinschale unter Verwendung eines Proteins, das sich nicht an die Population der Zielzellen bindet. Das bindende Protein/Peptid wird dann an die Schale des primären Peptids oder Proteins gebunden, um das resultierende Partikel mit einem funktionellen bindenden Protein/Peptid auszurüsten. Ein beispielhafter Liganden-Sandwich-Ansatz beinhaltet die kovalente Anheftung von Avidin oder Streptavidin an Partikel über funktionelle Gruppen, wie oben bezüglich des „direkten“ Bindungsansatzes beschrieben. Das bindende Protein oder Peptid wird derivatisiert, vorzugsweise nur gering, durch funktionalisiertes Biotin (beispielsweise durch aktive Ester, Hydrazide, Iodacetal, Maleinimidyl oder durch ähnliche funktionelle Gruppen). Die Liganden-Anheftung (beispielsweise bindendes Peptid oder Protein/funktionalisiertes Biotin) an die verfügbaren Bindungsplätze des Biotins der primären Proteinschale des Avidins/Streptavidins geschieht durch die Verwendung einer sättigenden Menge eines mit Biotin reaktierten Proteins/Peptids.

[0152] Beispielsweise werden Poly-Milchsäure-/Glykolsäure-Partikel, welche endständige Carboxylsäuregruppen tragen, mit Carbodiimid aktiviert und anschließend mit Avidin oder Streptavidin umgesetzt. Das bindende Protein oder Peptid wird mit Biotinamidocaproat-N-Hydroxysuccinimid-Ester in einer Menge von 1–3 Mol an Verbindung, welche das Biotin enthält, das mit dem bindenden Protein/Peptid reagieren soll, umgesetzt, wobei ein bindendes Protein/Peptid, das mit Biotin umgesetzt ist, resultiert. Ein molarer Überschuss des mit Biotin umgesetzten bindenden Proteins/Peptids wird mit den Avidin-derivatisierten Partikeln inkubiert, wobei eine gezielte Dosierungsform gebildet wird.

[0153] Alternativ dazu werden die Partikel, die die Carboxylgruppen tragen, mit Biotin umgesetzt (beispielsweise durch Aktivierung mit Carbodiimid der Carboxylgruppe und nachfolgende Reaktion mit Aminoalkylbiotinamid). Die mit Biotin umgesetzten Partikel werden dann mit einer gesättigten Konzentration (beispielsweise ein molarer Überschuss) von Avidin oder Streptavidin inkubiert, wobei mit Protein beschichtete Partikel gebildet werden, die freie Biotin-Bindungsplätze besitzen. Diese beschichteten Partikel sind dann in der Lage, mit einem molaren Überschuss eines mit Biotin umgesetzten bindenden Proteins wie oben beschrieben zu reagieren. Eine weitere Option beinhaltet Avidin- oder Streptavidin-gebundenes bindendes Peptid oder Protein-Anheftung an Partikel, die mit Biotin umgesetzt sind.

[0154] Zusätzlich kann die Anheftung des bindenden Protein-/Peptid-Partikels durch Adsorption des bindenden Peptids an das Partikel erreicht werden, was aus dem nichtionischen Charakter des teilweise exponierten Polymer-Backbones des Partikels resultiert. Unter Bedingungen einer hohen Ionenstärke (beispielsweise 1,0 molare NaCl) wird die Wasserstoff- und hydrophobe Partikel-bindende Protein-/Peptid-Bindung bevorzugt.

[0155] Darüber hinaus kann das bindende Protein/Peptid teilweise in die Polymermatrix des Partikels während dessen Bildung eingeschlossen werden. Unter diesen Umständen ermöglichen solche einschließende bindende Proteine/Peptide eine selektive Bindung des Restes an das Partikel. Milde Bedingungen der Partikelbildung, beispielsweise wie jene, die durch Cohen et al., *Pharmaceutical Research*, 8: 713–720 (1991) angewandt wurden, werden bevorzugt, um das Protein oder Peptid in die Matrix einzuschließen. Eingeschlossene bindende Proteine sind gleichfalls in der Wiederanknüpfung an eine Zielzelle eines partiell abgebauten Partikels verwendbar, das eine Exocytose erlitten hat. Bindende Proteine oder Peptide können an andere Dosierungsformen der Polymerpartikel gebunden werden (beispielsweise Dosierungsformen, die nicht biologisch abbaubar sind), die unterschiedlich exponierte funktionelle Gruppen in Übereinstimmung mit den oben diskutierten Prinzipien aufweisen.

[0156] Beispielhafte Polymere, die nicht biologisch abbaubar sind, und die in der Anwendung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind Polystyrole, Polypropylene, Styrol-Acrylsäure und Acrylat-Co-polymere und Ähnliches. Solche Polymere, die nicht biologisch abbaubar sind, beinhalten oder können derivatisiert werden, um funktionelle Gruppen für die Befestigung des bindenden Proteins/Peptids zu beinhalten, und schließen carboxylische Säuregruppen, aliphatische primäre Aminogruppen, aromatische Aminogruppen und Hydroxylgruppen ein.

[0157] Carboxylische funktionelle Säuregruppen werden an das bindende Protein oder Peptid geknüpft, unter Verwendung von beispielsweise der Reaktionsmechanismen, die oben für bioabbaubare polymere Partikel-Dosierungsformen auf Basis von Poly-Milch-/Glykolsäure ausgeführt wurden. Funktionelle primäre Aminogruppen werden beispielsweise durch Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid unter Bildung einer Einheit mit einer endständigen Carboxylgruppe geknüpft, die an das bindende Peptid/Protein wie oben beschrieben gebunden werden kann. Zusätzlich können primäre Aminogruppen mit Cyanbromid aktiviert werden und bilden mit den primären Aminogruppen des bindenden Proteins/Peptids Guanidin-Bindungen. Aromatische funktionelle Aminogruppen werden beispielsweise mit salpetriger Säure diazotiert, um Einheiten mit Diazonium-Gruppen zu bilden, die mit den Tyrosinen der bindenden Proteine/Peptide reagieren, wobei eine Diazo-Bindung zwi-

schen dem nicht-biologisch-abbaubaren Partikel und dem bindenden Protein/Peptid gebildet wird. Funktionelle Hydroxylgruppen werden an die primären Aminogruppen des bindenden Proteins/Peptids gekoppelt durch beispielsweise Konvertierung der Hydroxyl-Einheit in eine Einheit, die eine endständige funktionelle carboxylische Säuregruppe besitzt. Diese Konversion kann durch Reaktion mit Chloressigsäure durchgeführt werden, gefolgt von einer Reaktion mit Carbodiimid. Sandwich-, Adsorptions- und Einschlusstechniken, wie sie oben bezüglich der bioabbaubaren Partikel diskutiert wurden, sind analog zur nicht-biologisch-abbaubaren Partikel-bindenden Protein-/Peptid-Befestigung anwendbar.

Dosierungen, Formulierung und Wege der Verabreichung der Cytoskelett-Inhibitoren

[0158] Die Menge des verabreichten Cytoskelettinhibitors wird so angepasst, dass vaskuläre Traumata verschiedener Schwere behandelt werden können. Beispielsweise sind kleinere Dosierungen ausreichend, um geringere vaskuläre Traumata zu behandeln, beispielsweise, um eine vaskuläre Abstoßung zu vermeiden, die einem Transplantat oder einer Transplantation folgt, wohingegen größere Dosierungen ausreichend sind, um ausgeprägtere vaskuläre Traumata zu behandeln, beispielsweise um eine Restenose zu behandeln, die einer Angioplastie folgt. Deshalb wird um ein traumatisiertes Gefäß mit einem biologischen Stent zu behandeln ein Cytoskelettinhibitor, wie beispielsweise Cytochalasin B, in einer systemischen Gesamtdosis von ungefähr 1 bis ungefähr 24 ml, vorzugsweise ungefähr 1 bis ungefähr 4 ml, bei ungefähr 0,01 bis ungefähr 10 µg Cytochalasin B/ml des Vehikels verabreicht, vorzugsweise ungefähr 0,1 bis ungefähr 10 µg Cytochalasin B/ml des Vehikels, und noch mehr bevorzugt, ungefähr 0,1 bis ungefähr 8,0 µg Cytochalasin B/ml des Vehikels, obwohl sich andere Dosierungen als günstig erweisen können. Insbesondere können niedrigere Konzentrationen eines Cytochalasins einen therapeutischen Effekt ausüben, wenn ein nicht-wässriges Lösungsmittel als das Vehikel verwendet wird. Die Verabreichung einer systemischen Dosis des Cytochalasin B resultiert in ungefähr 5 bis ungefähr 40, vorzugsweise ungefähr 8 bis ungefähr 30 Lambda der Cytochalasin B-enthaltenden Lösung, die in den interstiziellen Raum eintritt, der die Zellen der Tunica media umgibt, und ungefähr 0,01 bis ungefähr 4, vorzugsweise ungefähr 0,05 bis ungefähr 3 ml der Lösung, die der Gefäßwand durch den Transport der Lösung zu der Adventitia ausgesetzt wird. Darüber hinaus können diese Dosierungen auch Anti-Proliferations-Effekte aufweisen.

[0159] Die Verabreichung von Arzneimitteln, Zusammenstellungen oder Dosierungsformen der vorliegenden Erfindung kann kontinuierlich oder intermittierend erfolgen, abhängig beispielsweise vom physiologischen Befinden des Empfängers, davon, ob der Zweck der Verabreichung ein therapeutischer oder prophylaktischer ist und anderen Faktoren, die dem erfahrenen Arzt bekannt sind. Die Verabreichung der Arzneimittel, Zusammenstellungen oder Dosierungsformen der Erfindung kann im Wesentlichen kontinuierlich über eine vorgewählte Zeitdauer erfolgen oder in einer Serie von regelmäßigen Dosierungen, beispielsweise vor, während oder nach dem durch eine Prozedur verursachten vaskulären Trauma, vor und während, vor und danach, während und danach, oder bevor, während und nach dem durch eine Prozedur verursachten vaskulären Trauma. Darüber hinaus wird die Verabreichung der Medikamente, Zusammenstellungen oder Dosierungsformen so ausgewählt, dass das traumatisierte Gefäß nicht weiter beschädigt wird.

[0160] Eine oder mehrere geeignete Einheiten der Dosierungsform, die den Cytoskelettinhibitor umfassen, der für die anhaltende Freisetzung formuliert werden kann, kann auf verschiedenen Wegen verabreicht werden, beinhaltend den oralen oder parenteralen Weg, einschließlich rektale, transdermale, subkutane, intravenöse, intramuskuläre, intrapulmonale und intranasale Wege. Wenn die Arzneimittel, Zusammenstellungen oder Dosierungsformen der Erfindung für die orale Verabreichung hergestellt werden, werden sie vorzugsweise mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder einem Verdünnungsmittel oder einem Bindemittel kombiniert, um eine pharmazeutische Formulierung zu bilden, vorzugsweise in der Einheitsdosisform. Die gesamten wirksamen Bestandteile in diesen Formulierungen können 0,1 bis 99 Gewichtsprozent der Formulierung umfassen. Unter dem Begriff „pharmazeutisch verträglich“ wird verstanden, dass der Träger, das Verdünnungsmittel, das Bindemittel und/oder das Salz mit den anderen Bestandteilen verträglich sein müssen, und für den Empfänger nicht schädlich sein dürfen.

[0161] Pharmazeutische Formulierungen, die den Cytoskelettinhibitor enthalten, können durch Verfahren, wie sie im Stand der Technik wohl bekannt sind und aus leicht erhältlichen erhältlichen Bestandteilen hergestellt werden. Beispielsweise kann ein Cytochalasin mit den gewöhnlichen Bindemitteln, Verdünnungsmitteln oder Trägern formuliert und in Tabletten, Kapseln, Suspensionen, Pulver und Ähnlichem formuliert werden. Beispiele von Bindemitteln, Verdünnungsmitteln und Trägern, die für solche Formulierungen geeignet sind, beinhalten die folgenden Füllstoffe und Verschnittmittel, beispielsweise Stärke, Zucker, Mannit und Kieselsäurederivate; Bindemittel, beispielsweise Carboxymethylzellulose, HPMC und andere Zellosederivate, Alginate, Gelatine und Polyvinylpyrrolidon, Befeuchtungsmittel, beispielsweise Glycerin, auflösend wirkende Mittel, bei-

spielsweise Kalziumkarbonat und Natriumbikarbonat, Mittel, die die Auflösung hemmen, beispielsweise Paraffin, Beschleuniger für die Resorption, beispielsweise quaternäre Ammoniumverbindungen, oberflächenaktive Stoffe, beispielsweise Cetylalkohol, Glycerinmonostearat, Adsorptionsträger, beispielsweise Kaolin und Bentonit, und Gleitmittel, beispielsweise Talg, Kalzium- und Magnesiumstearat, und feste Polyethylglykole (vgl. Fondy et al., WO 88/10259).

[0162] Beispielsweise können Tabletten oder Kapletten, die einen Cytoskelettinhibitor beinhalten, Puffer-Agenzien beinhalten, beispielsweise Kalziumkarbonat, Magnesiumoxid und Magnesiumkarbonat. Kapletten und Tabletten können gleichfalls inaktive Bestandteile enthalten, beispielsweise Zellulose, vorgelatinisierte Stärke, Siliziumdioxid, Hydroxypropylmethylzellulose, Magnesiumstearat, mikrokristalline Zellulose, Stärke, Talg, Titandioxid, Benzoesäure, Zitronensäure, Maisstärke, Mineralöl, Polypropylenglykol, Natriumphosphat und Zinkstearat und ähnliche Substanzen. Harte oder weiche Gelatine kapseln, die einen Cytoskelettinhibitor beinhalten, können inaktive Bestandteile beinhalten, beispielsweise Gelatine, mikrokristalline Zellulose, Natriumlaurylsulfat, Stärke, Talg und Titandioxid und ähnliche Substanzen, genauso wie flüssige Vehikel, wie Polyethylenglykole (PEGs) und vegetabile Öle.

[0163] Cytoskelettinhibitoren können auch als Elixiere oder Lösungen für die gewöhnliche orale Verabreichung formuliert werden oder als Lösungen, die für die parenterale Verabreichung geeignet sind, beispielsweise auf dem intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Weg. In der Ausübung bestimmter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist der Cytoskelettinhibitor in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger dispergiert, der eine flüssige Phase ist, und wird über eine implantierbare Vorrichtung zugeführt, beispielsweise durch einen Katheter. Verwendbare pharmazeutisch akzeptable Träger für diese Zwecke beinhalten die im Allgemeinen verwendeten Träger, beispielsweise mit Phosphat gepufferte Salzlösung, Wasser, Emulsionen (beispielsweise Öl/Wasser- und Wasser/Öl-Emulsionen) und befeuchtend wirkende Substanzen verschiedener Typen.

[0164] Die pharmazeutischen Formulierungen der Cytoskelettinhibitoren können die Form einer wässrigen oder nicht-wässrigen Lösung oder Dispersion annehmen, oder alternativ dazu die Form einer Emulsion oder Suspension (vgl. Fondy et al., WO 90/13293).

[0165] Diese Formulierungen können pharmazeutisch verträgliche Vehikel und Hilfsstoffe enthalten, die aus dem Stand der Technik wohl bekannt sind. Beispielsweise ist es möglich Lösungen durch Verwendung eines oder mehrerer organischer Lösungsmittel herzustellen, welche vom physiologischen Gesichtspunkt her akzeptabel sind, zusätzlich zu Wasser ausgewählt aus Lösungsmitteln, beispielsweise Aceton, Ethanol, Isopropylalkohol, Glykoläther, beispielsweise wie die Produkte, die unter der Bezeichnung „Dowanol“ verkauft werden, Polyglykole und Polyethylenglykole, C₁-C₄-Alkylester von kurzkettigen Säuren, vorzugsweise Ethyl- oder Isopropyllaktat, Fettsäuretriglyceride, beispielsweise Produkte, die unter der Bezeichnung „Miglyol“ vermarktet werden, Isopropylmyristat, tierische, mineralische und pflanzliche Öle und Polysiloxane.

[0166] Die erfindungsgemäßen Zusammenstellungen und Arzneimittel können auch Verdicker enthalten wie beispielsweise Zellulose und/oder Zellulosederivate. Sie können gleichfalls Gummi enthalten wie beispielsweise Xanthan-, Guar- oder Carbogummi oder Gummi arabicum, oder alternativ dazu Polyethylenglykole, Bentonite, und Montmorillonite und ähnliche Substanzen.

[0167] Falls notwendig ist es möglich, ein Hilfsmittel ausgewählt aus Antioxidanzien, oberflächenaktiven Mitteln oder Konservierungsmitteln, Film-bildenden, keratolytisch oder komdolytisch wirkenden Stoffen, Duftstoffen und färbenden Mitteln hinzuzufügen. Es können auch gleichfalls weitere aktive Bestandteile zugeführt werden, sei es für die beschriebenen Bedingungen oder für andere.

[0168] Beispielsweise können unter Antioxidanzien t-Butylhydroquinon, butyliertes Hydroxyanisol, butyliertes Hydroxytoluol und α-Tocopherol und seine Derivate erwähnt werden. Die galenische Form, die auf die topische Anwendung zugeschnitten ist, besitzt die Form von Cremes, Milch, Gelen, Dispersionen oder Mikroemulsionen, Lotionen, die zu einem größeren oder geringeren Maß verdickt sind, imprägnierte Druckpolster, Salben oder Sticks oder alternativ dazu die Form von Aerosolformulierungen in der Form eines Sprays oder Schaums oder alternativ dazu in der Form eines Seifenstücks.

[0169] Zusätzlich sind Cytoskelettinhibitoren für eine Formulierung als Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung und Ähnlichem gut geeignet. Die Formulierungen können so ausgebildet sein, dass sie den wirksamen Bestandteil nur oder vorzugsweise in einem bestimmten Teil des intestinalen Traktes freisetzen, beispielsweise über eine bestimmte Zeitdauer. Die Beschichtungen, Umhüllungen und schützenden Matrices kön-

nen beispielsweise aus polymeren Substanzen oder Wachsen hergestellt sein.

[0170] Die lokale Zuführung der Cytoskelettinhibitoren kann durch eine Vielzahl von Techniken erfolgen, die den Wirkstoff an oder nahe dem traumatisierten vaskulären Ort verabreichen. Beispiele von ortsspezifischen oder Zuführung an gezielte örtliche Techniken sind nicht so gewollt, dass sie limitierend sind, sondern sollen nur die verfügbaren Techniken illustrieren. Beispiele beinhalten die Verwendung lokaler Zuführungskatheter, beispielsweise einen Infusionskatheter, einen Dauerkatheter oder einen Nadelkatheter, Stents, synthetische Transplantate, adventizielle Umhüllungen, Shunts und Stents oder andere implantierbare Vorrichtungen, orts-spezifische Träger, direkte Injektion oder direkte Verabreichungen.

[0171] Die örtliche Zuführung durch ein Implantat beschreibt die chirurgische Einbringung einer Matrix, die den Cytoskelettinhibitor enthält, in die Läsion oder die traumatisierte Fläche. Die implantierte Matrix setzt den Cytoskelettinhibitor durch Diffusion, chemische Reaktion oder Lösemittelaktivatoren frei (vgl. beispielsweise Lange, Science, 249, 1527 (1990)).

[0172] Ein Beispiel einer gezielten lokalen Zuführung durch ein Implantat ist die Verwendung eines Stents. Stents sind so ausgebildet, dass sie mechanisch den Kollaps und die Reokklusion der koronaren Arterien oder anderer Gefäße verhüten. Die Einbringung eines Cytoskelettinhibitors in den Stent kann den Cytoskelettinhibitor direkt der Läsion zuführen. Die örtliche Zuführung von Wirkstoffen durch diese Technik wird beschrieben in Koh, Pharmaceutical Technology (Oktober, 1990).

[0173] Beispielsweise wird ein intravaskulärer Stent aus Metall, Kunststoff oder bioabbaubarem Material verwendet, der den Cytoskelettinhibitor umfasst. Der Stent umfasst vorzugsweise eine bioabbaubare Beschichtung, eine poröse oder permeable nicht-bioabbaubare Beschichtung oder eine bioabbaubare oder nicht-bioabbaubare Membran oder ein synthetisches Transplantat, das aus einer hüllen-ähnlichen Beschichtung besteht, beispielsweise aus PTFE, welches den Cytoskelettinhibitor umfasst. Eine bevorzugtere Ausführungsform der Erfindung ist ein beschichteter Stent, worin die Beschichtung eine Dosierungsform für die anhaltende Freisetzung des Cytoskelettinhibitors umfasst. In einer alternativen Ausführungsform kann ein bioabbaubarer Stent auch das therapeutisch wirkende Agens in einer darauf imprägnierten Form besitzen, d. h. in der Stentmatrix.

[0174] Ein bioabbaubarer Stent, der den Cytoskelettinhibitor in imprägnierter Form darin enthält, kann weiter mit einer bioabbaubaren Schicht oder mit einer porösen nicht-bioabbaubaren Schicht beschichtet sein, die die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung des Cytoskelettinhibitors in darin dispergierter Form enthält. Dieser Stent kann eine differenzierte Freisetzungsrates des Cytoskelettinhibitors ermöglichen, d. h. es kann eine anfänglich schnellere Freisetzungsgeschwindigkeit des Cytoskelettinhibitors aus der Beschichtung heraus erfolgen, gefolgt von einer verzögerten Freisetzung des Cytoskelettinhibitors, der in der Stentmatrix imprägniert ist, nach Abbau der Stentmatrix. Der intravaskuläre Stent ermöglicht auch mechanische Mittel des zur Verfügungstellens einer Zunahme in der luminalen Fläche eines Gefäßes. Weiterhin kann die Einbringung des intravaskulären Stents, der einen Cytoskelettinhibitor umfasst, der ein Inhibitor der Zellproliferation der glatten Muskulatur ist, gleichfalls die intimale Proliferation reduzieren oder verhüten. Diese Inhibierung der intimalen Zellen der glatten Muskulatur und des Stroms, welche durch die Perizyten und durch die glatte Muskulatur erzeugt werden, kann zu einer schnelleren und vollständigeren Re-Endothelisierung führen, die auf die intravenöse Einführung des vaskulären Stents folgt. Die Zunahme der Geschwindigkeit der Re-Endothelisierung und Stabilisierung der Gefäßwand, die auf die Einbringung des Stents folgt, kann den Verlust der luminalen Fläche und des verminderten Blutflusses als Folge der vaskulären Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur reduzieren, welche eine der Hauptursachen der Fehlschläge mit vaskulären Stents darstellt.

[0175] Ein weiteres Beispiel der gezielten lokalen Zuführung durch ein Implantat ist die Verwendung einer adventiziellen Umhüllung. Die Umhüllung umfasst eine pharmazeutisch akzeptable Trägermatrix, beispielsweise ein Gel vom Pluron-Typ, welches frei oder in einem Kollagennetz enthalten ist, wobei dieses Gel einen darin dispergierten Cytoskelettinhibitor enthält. Eine Ausführungsform der Erfindung ist ein Gel vom Pluron-Typ (F-127, BASF), das bei 4°C löslich ist, aber bei 37°C fest wird, beispielsweise im Menschen bei Kontakt mit einem Fluid oder einem Gewebe. Um ein Gel vom Pluron-Typ herzustellen, das eine Umhüllung beinhaltet, wurden 4 ml Phosphat-Puffer vom pH 7,0 (CircRes, Band 76, April 1995) zu 1 g des Gels vom Pluron-Typ F-127 hinzugefügt, wobei die Mischung über Nacht bei 4°C gemischt wurde. Der Cytoskelettinhibitor wurde der Mischung vor der lokalen Verabreichung hinzugefügt. Die Mischung kann direkt einer chirurgisch exponierten Arterienwand zugeführt oder auf die Oberfläche einer Rinderkollagenunterlage appliziert werden (BioCore, Inc., Topeka, KS), die dann um die Arterie gehüllt wird, wobei dann die Kanten vernäht werden.

[0176] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Einbringung des Cytoskelettinhibitors in die aus-

gedehnten Knotenräume einer vaskulären Transplantat-ähnlichen Membran aus PTFE (Impra, Inc., Tempe, AZ), die einen interluminalen vaskulären Stent umgeben oder die auf die innere oder auf die äußere Oberfläche besagten Stents angebracht werden kann, der ein Metall oder ein bioabbaubares oder nicht-bioabbaubares Polymer umfasst. Der Cytoskeletthinhibitor oder die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung des Cytoskeletthinhibitors erfüllen die Knotenräume der PTFE-Membranwand und/oder beschichten die inneren und/oder äußeren Oberflächen der Membran.

[0177] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Mischung einer kristallinen Form eines Cytoskeletthinhibitors in einem Rinderkollagengel (BioCore, Inc., Topeka, KS) mit Kristallen, die in der Größe von ungefähr 0,1 Mikron bis ungefähr 1 mm variieren. Im Allgemeinen werden die Kristalle pulverisiert um kleinere Kristalle zu erzeugen. Die Mischung wird dann direkt auf die Oberfläche der Arterien appliziert, das umgebende subkutane Gewebe um das Gefäß herum festgenäht und die Haut geschlossen. Rinderkollagen (BioCore, Inc., Topeka, KS) wird in steriler Salzlösung aufgelöst (1:1) und der kristalline Cytoskeletthinhibitor zugefügt. Alternativ dazu wird das Kollagengel auf ein Rinderkollagennetz appliziert, welches dann um das Gefäß herumgewickelt wird, und die Kanten werden vernäht, um das Sieb am Platz zu halten. Das Rinderkollagennetz (BioCore, Inc.) wird zurechtgeschnitten, beispielsweise auf 1 cm × 1 cm, und die Mischung des Cytoskeletthinhibitors mit dem Kollagengel wird auf die Oberfläche des Netzes aufgebracht.

[0178] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfasst das Einschließen des kristallinen Cytoskeletthinhibitors in einer ungefähr 0,1 bis ungefähr 3, vorzugsweise ungefähr 0,5 bis ungefähr 0,7 mm dicken Silikonmembran, beispielsweise aus Silikonpolymer Q-7 4840 (Dow Corning, Midland, MI). Das Polymer (Teil A und B, 1:1) wird mit einem Spatel gemischt. Ein inerter Füllstoff, beispielsweise Mannit, wird pulverisiert und in Fraktionen einer Siebgröße 53–75 gesiebt. Mannit und Cytoskeletthinhibitor werden in vorbestimmten Anteilen gemischt und dann mit dem Polymer verrieben, wobei ein Gemisch gebildet wird. Das Gemisch wird dann in eine Gußform gefüllt und bei einem Druck von 5000 psi komprimiert. Die Mischung wird dann bei 80°C zwei Stunden lang gehärtet. Die Verbundmembran wird dann auf eine Größe von beispielsweise 1 cm × 1 cm zurechtgeschnitten, um die Arterie gewickelt und dadurch am Ort gehalten, dass man die Membrankanten zusammennäht.

[0179] Ein Cytoskeletthinhibitor kann auch auf das Äußere der Umhüllung beschichtet werden. Die Umhüllung und/oder die Beschichtung ist vorzugsweise bioabbaubar. Es ist bevorzugt, dass der Cytoskeletthinhibitor in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung vorliegt.

[0180] Ein weiteres Beispiel ist ein Zuführungssystem, in welchem ein Polymer, das den Cytoskeletthinhibitor enthält, in den Bereich der Läsion in einer flüssigen Form injiziert wird. Das Polymer verfestigt sich dann oder härtet aus, wobei das Implantat gebildet wird, das in situ erhalten wird. Diese Technik wird in PCT WO 90/03768 (Donn, 19. April 1990) beschrieben.

[0181] Ein weiteres Beispiel ist die Zuführung eines Cytoskeletthinhibitors durch polymeres endoluminales Versiegeln. Diese Technik verwendet einen Katheter, um ein Implantat aus einem Polymer auf die innere Oberfläche des Lumens zu applizieren. Der Cytoskeletthinhibitor ist im bioabbaubares polymeren Implantat eingebracht und wird dadurch am Ort des chirurgischen Eingriffs freigesetzt. Die Technik wird in PCT WO 90/01969 (Schindler, 23. August 1989) beschrieben.

[0182] Ein weiteres Beispiel für die lokale Zuführung ist das durch direkte Injektion von Vesikeln oder Mikropartikeln in die Läsion oder die Arterienwand, die der Läsion benachbart ist. Diese Mikropartikel können aus Substanzen wie Proteinen, Lipiden, Carbohydraten oder synthetischen Polymeren zusammengesetzt sein. Diese Mikropartikel tragen den Cytoskeletthinhibitor, der durch die Mikropartikel inkorporiert ist oder sich auf den Mikropartikeln als eine Beschichtung befindet. Zuführungssysteme, welche Mikropartikel enthalten, werden in Lange, Science, 249, 1527 (1990) und Mathiowitz et al., J. App. Poly. Sci., 26, 809 (1981) beschrieben.

[0183] Für die topische Verabreichung können die therapeutischen Wirkstoffe so formuliert werden, wie es vom Stand der Technik für die direkte Applizierung in ein Zielgebiet bekannt ist. Konventionelle Formen für diesen Zweck beinhalten Wundverbände, beschichtete Bandagen oder andere Beschichtungen mit Polymeren, Salben, Lotionen, Pasten, Gelees, Sprays und Aerosolen. Der prozentuale Gewichtsanteil eines Cytoskeletthinhibitors, der in einer topischen Formulierung vorhanden ist, hängt von verschiedenen Faktoren ab, beträgt aber im Allgemeinen 0,005 bis 95% des Gesamtgewichts der Formulierung, und liegt typischerweise zwischen 1–25 Gewichtsprozent.

Zugangsbedingungen für die Behandlung durch das Arzneimittel, die Zusammenstellungen, das Kit oder die Dosierungsformen der Erfindung

[0184] Die Arzneimittel, Kits, Zusammenstellungen und Dosierungsformen, wie sie vorstehend hierin beschrieben werden, sind verwendbar, um die Verminderung des Gefäßlumenvolumens, der Fläche und/oder des Durchmessers, die mit einem vaskulären Trauma, das durch eine Prozedur verursacht wurde, verbunden ist, zu behandeln oder zu inhibieren. Wie hierin verwendet, beinhaltet der Begriff „Gefäße“ Säuiergefäße, beispielsweise koronare Gefäße, wie auch periphere Gefäße, Gefäße des Oberschenkels und der Halsschlagadern. Es soll anerkannt werden, dass die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Dosierungsformen (sowohl freie wie auch anhaltende Freisetzung) der Erfindung nicht auf eine Therapie beschränkt sind, die der Angioplastie folgt; auch wird die Verwendbarkeit der Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Dosierungsformen nicht durch ihre Fähigkeit verboten, zelluläre Aktivitäten der Zellen und Perizyten der glatten Muskulatur in der vaskulären Gefäßwand zu inhibieren. Daher beinhaltet ein vaskuläres Trauma Traumata, die durch die Prozedur eines Eingriffs entstehen, beispielsweise durch Angioplastie, Einbringung eines Stents, Shunts, eines synthetischen oder natürlichen Transplantats, einer adventiziellen Umhüllung, eines Dauerkatheters oder anderer implantierbarer Vorrichtungen, ist jedoch nicht darauf begrenzt. Transplantate beinhalten Transplantate, die mit einem synthetischen therapeutischen Wirkstoff behandelt wurden, beispielsweise imprägnierte oder beschichtete Transplantate.

[0185] Die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Dosierungsformen der Erfindung sind gleichfalls in therapeutischen Modalitäten zur Verstärkung des Wiederwachstums endothelialer Zellen in verletzten vaskulären Geweben und in anderen Wundstellen einschließlich epithelialer Wunden verwendbar. Bei diesen therapeutischen Modalitäten finden die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Dosierungsformen der Erfindung und der Konjugate, wie hierin beschrieben, Verwendung zur Inhibierung der Migration und/oder Proliferation von Zellen oder Perizyten der glatten Muskulatur. Perizyten und Zellen der glatten Muskulatur wurden zur Herstellung von in vitro-Faktoren mit einbezogen, welche die Proliferation der endothelialen Zellen inhibieren, und ihre Proliferation kann gleichfalls in einer physikalischen Barriere resultieren, um ein kontinuierliches Endothelium hervorzurufen. Daher finden die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Dosierungsformen der Erfindung und Konjugate, wie sie hierin beschrieben sind, Anwendung in der Verstärkung der Neoangiogenese und der verstärkten Re-Endothelisierung, beispielsweise während der Wundheilung, bei Gefäßtransplantaten und als Folgebehandlung eines vaskulären chirurgischen Eingriffs. Die Dosierungsformen können gleichfalls therapeutische Modalitäten freisetzen, die die Re-Endothelisierung der beschädigten Gefäßwand stimulieren oder beschleunigen.

[0186] In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann ein Cytoskeletthinhibitor verwendet werden, der in der Lage ist, die Fähigkeit der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zur Kontraktion zu inhibieren, beispielsweise ein Cytochalasin. Beispielhafte Cytoskeletthinhibitoren, die für die Durchführung dieses Aspektes der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind jene, die in der Lage sind, zu verursachen, dass eine traumatisierte Arterie den vaskulären Zustand verliert, so dass der normale vaskuläre hydrostatische Druck (der Blutdruck) das schlaffe Gefäß bis oder bis nahe seines maximalen physiologischen Durchmessers expandiert. Der Verlust des vaskulären Zustands kann verursacht werden durch Cytoskeletthinhibitoren, die mit der Bildung oder Funktion kontraktile Proteine störend überlagern (beispielsweise Actin, Myosin, Tropomyosin, Caldesmon, Calponin oder ähnliche Substanzen). Diese störende Überlagerung kann direkt oder indirekt eintreten, beispielsweise durch Inhibierung der Kalziummodulation, Phosphorylierung oder durch andere metabolische Wege, die in Verbindung mit der Kontraktion der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur auftreten.

[0187] Die Inhibierung der zellulären Kontraktion (d. h. des Verlustes des vaskulären Zustands) kann über zwei Mechanismen wirken, um das Ausmaß der vaskulären Stenose zu reduzieren. Erstens begrenzt die Inhibierung der zellulären Kontraktion über eine ausgedehnte Zeitperiode die Zahl der Zellen der glatten Muskulatur, die von der Tunica media in die Tunica intima wandern, deren Verdickung in einer vaskulären luminalen Stenose resultiert. Zweitens verursacht die Inhibierung der zellulären Kontraktion unter dem normalen vaskulären hydrostatischen Druck (d. h. durch den Blutdruck) die Entspannung und Erweiterung der glatten Muskelgefäßwand.

[0188] Die Cytochalasine inhibieren die Kontraktion der Zellen der glatten Muskulatur ohne die Proteinsynthese aufzugeben, die notwendig ist, dass sich traumatisierte, durch Angioplastie oder andere chirurgische Eingriffe oder durch Krankheiten beschädigte Zellen der glatten Muskulatur selbst reparieren. Die Proteinsynthese ist gleichfalls für die Zellen der glatten Muskulatur notwendig, damit sie eine Matrix ausscheiden, die das Lumen in einem Zustand nahe seines maximalen systolischen Durchmessers fixiert oder erhält, in dem Maß, wie sich die vaskuläre Läsion stabilisiert (d. h. ein biologisch induzierter Effekt eines Stents).

[0189] Dieser biologische Effekt eines Stents resultiert nicht nur in einer erweiterten Querschnittsfläche des Gefäßes oder eines erweiterten Durchmessers und einer verstärkten Geschwindigkeit des Blutflusses durch das Gefäß, sondern reduziert auch in signifikanter Weise den elastischen Rückstoß, der auf eine Angioplastie folgt. Der elastische Rückstoß ist ein akuter Verschluss des Gefäßes, der mit einem Vasospasmus oder einer frühen Relaxation der Muskulaturwand verknüpft ist, in Folge eines traumatischen Schocks, der aus der Überdehnung des Gefäßes durch einen Ballonkatheter während der Angioplastie resultiert. Dieser Spasmus der Tunica media, der zu der Abnahme der luminalen Querschnittsfläche führt, kann innerhalb Stunden, Tagen oder Wochen nach der Erweiterung mit dem Ballon in dem Maß eintreten, in dem die Wiederherstellung der Art der Muskelwand eintritt.

[0190] Kürzliche Beobachtung während der mikroskopischen Überprüfung atheroektomischer Proben lassen vermuten, dass der elastische Rückstoß in bis zu 25% der angioplastischen Prozeduren eintritt, die als erfolgreich eingestuft wurden, wobei diese auf dem ursprünglichen Angiogramm basieren, das nach der Prozedur aufgenommen wurde. Da das Verfahren mit dem biologischen Stent, das auf eine Ballonangioplastie folgt, die Arterienwand entspannt, kann der Klinikarzt die Über-Aufblähung und den daraus resultierenden traumatischen Schock als ein Mittel ausschließen, um den Gefäßspasmus oder den elastischen Rückstoß zu verkleinern oder aufzuschieben. Die Reduzierung oder Eliminierung der Über-Aufblähung vermindert das Trauma der Muskelwand des Gefäßes, wodurch die Bestimmungsgrößen der Zellproliferation der glatten Muskulatur in der Intima reduziert werden, und wodurch das Auftreten oder die Schwere der Restenose reduziert wird.

[0191] Das Verfahren des biologischen Stents erniedrigt gleichfalls das Auftreten der Thrombusbildung. In Oberschenkelarterien von Schweinen, die mit Cytochalasin B behandelt wurden, wurde beispielsweise das Auftreten muraler Mikrothrombi erniedrigt im Vergleich zu Arterien, die mit einem Ballon traumatisiert und die nicht mit dem Cytoskelettinhibitor behandelt wurden. Dieses Phänomen scheint ein zweiter Vorteil zu sein, der aus dem erhöhten Blutdurchfluss durch das traumatisierte Gefäß resultiert, wobei besagter Nutzen durch die Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits, Dosierungsformen und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung erreicht wird. In Arterien, die mit Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung des Cytochalasin B behandelt wurden, kann Cytochalasin B gleichfalls die Kontraktion und Organisation von Blutplättchen, die für die Thrombusbildung benötigt werden, verhüten.

[0192] Cytochalasine können die Wirkung eines biologischen Stents auf die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur erzeugen. Von Cytochalasinen wird angenommen, dass sie sowohl die Migration und Kontraktion von Zellen der vaskulären glatten Muskulatur durch Wechselwirkung mit Actin inhibieren können. Die Cytochalasine Wechselwirken mit den Enden der faserartigen Abläufe, um die Dehnung der Actinfasern zu inhibieren. Niedrige Dosierungen an Cytochalasinen (beispielsweise Cytochalasin B) spalten auch die Netzwerke aus Mikrofaser des Actins. In-vitro-Daten zeigen an, dass, nachdem Zellen der vaskulären glatten Muskulatur mit dem Cytochalasin B aufräumen, die Zellen genügend polymerisiertes Actin regenerieren, so dass die Migration innerhalb von ungefähr 24 Stunden wieder aufgenommen wird. In vitro-Untersuchungen zeigen an, dass die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur den vaskulären Zustand innerhalb von 2 bis vier Tagen wieder erlangen. Während dieser stärkenden Zeitdauer tritt die Fixierung des Lumendurchmessers und die Wirkung des biologischen Stents ein.

[0193] Der Cytoskelettinhibitor kann auf das traumatisierte Gefäß abgezielt sein, wird jedoch vorzugsweise direkt in das traumatisierte Gefäß verabreicht, vor, während oder in Folge der Angioplastie oder anderer traumatischer Ereignisse. Die Wirkung des biologischen Stents des Cytochalasin B ist beispielsweise dadurch erreichbar, dass man eine einzige Infusion von ungefähr 1 bis ungefähr 24 ml, vorzugsweise ungefähr 5 bis ungefähr 15 ml eines Vehikels plus des Cytoskelettininhibitors in der traumatisierten Gegend der Gefäßwand bei einer Dosiskonzentration im Bereich von ungefähr 0,1 Mikrogramm des therapeutischen Agens/ml des Vehikels bis ungefähr 10,0 Mikrogramm des Cytoskelettininhibitors/ml des Vehikels anwendet.

[0194] Die Inhibierung der Migration der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (aus der Tunica media zu der Tunica intima) wurde im gleichen Dosierungsbereich gezeigt (Beispiel 11), wobei jedoch eine anhaltende Exposition des Gefäßes bezüglich des Cytoskelettininhibitors bevorzugt ist, um diese Anti-Migrationseffekte zu maximieren. Falls die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur nicht in die Intima wandern können, können sie sich auch dort nicht vermehren. Sollen Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zur Intima wandern, kann eine nachfolgend verabreichte Dosierungsform mit einer anti-proliferativ wirkenden anhaltenden Freisetzung die intimale Proliferation inhibieren. Als Ergebnis kann die Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung der gegenwärtigen Erfindung, die ein Cytochalasin oder andere anti-proliferative wirkende Cytoskelettininhibitoren beinhaltet, in Kombination mit einem freien Cytoskelettinhibitor verabreicht werden. In dieser Weise können ein Effekt eines biologischen Stents wie auch ein Effekt erreicht werden, die die Proliferation oder die Migration mit einem

einzigem Dosisprotokoll inhibieren.

Verfahren unter Verwendung der Produkte der Erfindung

[0195] Die Erfindung stellt Arzneimittel, Zusammenstellungen, Kits und Vorrichtungen zur Verfügung. Diese Produkte können zur Behandlung eines Säugers, der eine Verkleinerung des Volumens des Gefäßlumens oder das Risiko einer solchen Verkleinerung hat, einer Lumenfläche oder des Durchmessers, beispielsweise bei Stenose oder Restenose eines Blutgefäßes, verwendet werden. Die Methode umfasst die Verabreichung wenigstens eines Cytoskelettinhibitors in einer Menge, die ausreicht, in einem Gefäß die Wirkung eines biologischen Stents hervorzurufen, das vaskuläre Remodelling eines Gefäßes zu inhibieren oder zu reduzieren, die Zellproliferation der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren oder zu reduzieren oder einer beliebigen Kombination davon.

[0196] Für die Verhütung der Verringerung des Gefäßlumens, die mit vaskulären Traumata verknüpft sind, die einer Prozedur folgen, kann der Cytoskelettinhibitor vor, während und/oder nach der Prozedur verabreicht werden oder in einer beliebigen Kombination davon. Beispielsweise wird für die Verhütung der Restenose eine Serie getrennter Dosen des Cytoskelettinhibitors, gegebenenfalls in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung, vorzugsweise vor, während und/oder nach der Prozedur, die das Trauma auslöst (beispielsweise Angioplastie), verabreicht. Die Dosis kann auch lokal über eine implantierbare Vorrichtung zugeführt werden, beispielsweise über einen Katheter, der in das betroffene Gefäß während der Prozedur eingeführt wird. Vorzugsweise wird eine Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung über die implantierbare Vorrichtung während der Prozedur verabreicht, die das Trauma hervorruft. Nachdem die Prozedur, die das Trauma hervorruft, durchgeführt wurde, kann eine Serie von Nachfolgedosen mit der Zeit verabreicht werden, vorzugsweise in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung während einer Zeit, die ausreicht, im Wesentlichen das Risiko der Restenose zu reduzieren oder zu verhüten. Eine bevorzugte therapeutische Dauer des Protokolls für diesen Zweck beinhaltet die Verabreichung ungefähr 3 bis ungefähr 26 Wochen nach der Angioplastie.

[0197] Es wird vom Fachmann beachtet werden, dass therapeutisch/prophylaktisch wirksame Dosierungen der Cytoskelettinhibitoren und Dosierungsformen von einigen Faktoren abhängen, beinhaltend beispielsweise: a) Die Bindungsaktivität des bindenden Proteins der vaskulären glatten Muskulatur, sofern vorhanden, in der Dosierungsform; b) den Atmosphärendruck und die Druckdauer, die während der Infusion angewendet werden; c) die Zeitdauer, über die der Cytoskelettinhibitor oder die Dosierungsform, die verabreicht werden, am vaskulären Ort bleibt; d) die Art des verwendeten Cytoskelettinhibitors; e) die Art des vaskulären Traumas und der erwünschten Therapie; f) für Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung die Freisetzungsgeschwindigkeit des Cytoskelettinhibitors aus der Dosierungsform, und/oder g) für Dosierungsformen mit anhaltender Freisetzung die interzelluläre und/oder intrazelluläre Lokalisierung der Dosierungsform. Der erfahrene Anwender, der darauf trainiert ist, Arzneimittel in therapeutisch wirksamen Dosierungen zuzuführen (beispielsweise durch Überprüfung der Arzneimittelpegel und durch Beobachtung klinischer Auswirkungen in Patienten) wird die optimale Dosierung für einen individuellen Patienten auf Grund seiner Erfahrung und der professionellen Beurteilung bestimmen. Diese Fachleute werden erkennen, dass das Eindringen des Cytoskelettinhibitors in die intimalen Schichten der Gefäßwand eines traumatisierten Gefäßes in einer freien Dosierungsform oder in einer Dosierungsform mit anhaltender Freisetzung der Schwankung unterworfen ist, und es notwendig ist, diese auf einer individuellen Basis zu bestimmen.

[0198] Eine therapeutisch wirksame Dosierung des Cytoskelettinhibitors wird typischerweise dann erreicht, wenn die Konzentration des Cytoskelettinhibitors im Fluidraum zwischen den Ballons des Katheters im Bereich von ungefähr 10^{-3} bis 10^{-12} M ist. Es soll aus den Beispielen, die hiermit zur Verfügung gestellt werden, erkannt werden, dass Cytoskelettinhibitoren und Dosierungsformen nur in einer therapeutischen Dosis für die Anti-Proliferation zugeführt werden brauchen, die ausreicht, dem Cytoskelettinhibitor 10%, vorzugsweise 20% und noch mehr bevorzugt 99% der inneren Zellen der Tunica media, die das Lumen auskleiden, auszusetzen. Diese Dosierung kann empirisch bestimmt werden, beispielsweise durch a) Infusion der Gefäße aus einem geeigneten Tiermodell und Verwendung von Methoden der Immunohisto-Chemie, der Fluoreszenz oder Elektronenmikroskopie, um den Wirkstoff und seine Effekte zu detektieren (beispielsweise jene, wie sie weiter unten in den Beispielen beispielhaft beschrieben sind); und b) Durchführung geeigneter in vitro-Studien (vgl. z. B. unten Beispiele 3, 4 und 5).

[0199] Beispielsweise soll bezüglich der Zuführung mit einem Katheter der Fachmann beachten, dass therapeutisch/prophylaktisch wirksame Dosierungen der Cytoskelettinhibitoren und Dosierungsformen von Faktoren abhängen, die a) den atmosphärischen Druck, der während der Infusion angewendet wird; b) die Zeitdauer über die der verabreichte Wirkstoff am vaskulären Ort bleibt; c) die Form des verwendeten Cytoskelettinhibi-

tors; und/oder d) die Natur des vaskulären Traumas und der erwünschten Therapie beinhalten. Katheter, die in der Ausübung der Erfindung verwendbar sind, beinhalten Katheter, wie jene, die offenbart werden in Just et al. (US-Patent 5,232,44), Abusio et al. (US-Patent 5,213,576), Shapland et al. (US-Patent 5,282,785), Racchini et al. (US-Patent 5,458,568), Wolinsky (US-Patent 4,824,436), Spears (US-Patent 4,512,762) and Shaffer et al. (US-Patent 5,049,132).

[0200] Eine therapeutisch wirksame Dosierung ist im Allgemeinen die Dosierung des perizellulären Wirkstoffes in der Zellgewebekultur der glatten Muskulatur, d. h. eine Dosierung, bei welcher eine kontinuierliche Exposition in einem therapeutischen Effekt zwischen der toxischen und der minimalen wirksamen Dosierung resultiert. Dieses therapeutische Niveau wird in vivo durch Bestimmung der Größe, der Zahl und der Konzentration des Cytoskelettinhibitors und der Freisetzungsgeschwindigkeit erhalten, die für die Partikel erforderlich sind, die durch Infusion zwischen die Zellen der glatten Muskulatur der Arterienwand eingebracht werden, um diese perizelluläre therapeutische Dosierung aufrechtzuerhalten. Die Dosierungsform sollte den Cytoskelettinhibitor mit einer Geschwindigkeit freisetzen, die ungefähr gleich der perizellulären Dosierung der folgenden beispielhaften therapeutischen Wirkstoffe ist: Ungefähr 0,01 bis ungefähr 100 Mikrogramm/ml Nitroglycerin, ungefähr 1,0 bis ungefähr 1000 Mikrogramm/ml Suramin, ungefähr 0,001 bis ungefähr 100 Mikrogramm/ml Cytochalasin und ungefähr 0,01 bis ungefähr 105 Nanogramm/ml Staurosporin, sowohl ungefähr 0,001 bis ungefähr 100 Mikrogramm/ml Taxol. Deshalb resultiert für Cytochalasin B die systemische Dosis in ungefähr 5 bis ungefähr 40, vorzugsweise ungefähr 8 bis ungefähr 30 Lambda der Lösung, die in den interstiziellen Raum eintritt, der die Zellen der Tunica media umgibt, und ungefähr 0,001 bis ungefähr 4, vorzugsweise ungefähr 0,05 bis ungefähr 3 ml der Lösung, die der Gefäßwand über die Adventitia zugeführt wird.

[0201] Die Verabreichung einer zellulären therapeutischen Dosis von beispielsweise Cytochalasin B in die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur nach einem Trauma, das durch Erweiterung mit einem Ballon verursacht wurde, kann durch Ersatz des gesamten Volumens der Tunica media mit dem Cytoskelettinhibitor erfolgen, so dass die Wirkung eines Biostents erreicht wird, d. h. alle Zellen werden einer Konzentration des Cytoskelettinhibitors ausgesetzt, die wirksam ist, dass das Gefäß einem biologischen Stent ausgesetzt ist. Beispielsweise zeigte eine Studie bezüglich des Dosisansprecherverhaltens, welche Schweinearterien aus Oberschenkeln verwendete, dass die gesamte Tunica media durch Verwendung eines Infusionskatheters mit Cytochalasin B in einem Bereich von ungefähr 0,1 µg/ml an Vehikel bis 10,0 µg/ml an Vehikel infundiert war, wobei der Effekt eines Biostents resultierte. Das bedeutet, dass eine intensivere Retention der Größe des Arterienlumens (Durchmesser oder Querschnittsfläche) relativ zur Größe des Arterienlumens beobachtet wurde, welche durch Erweiterung mit einem Ballon resultierte. Der therapeutische Effekt hatte ein Grenzwertniveau von 0,1 µg/ml Cytochalasin B mit keiner Wirkung unterhalb dieser Dosis und keiner Zunahme in der therapeutischen Wirksamkeit bis zu 10 µg/ml Cytochalasin B. Deshalb weist Cytochalasin B einen breiten therapeutischen Index auf, der von ungefähr 0,1 bis ungefähr 10 µg/ml reicht, mit keinem Anzeichen von Toxizität bei 10 µg/ml. Zehn µg/ml ist die maximale Sättigungskonzentration des Cytochalasin B in Salzlösung. Die therapeutische Wirksamkeit, die durch Verabreichung von Cytochalasin B hervorgerufen wird, wurde über eine Zeitdauer von 3 bis 8 Wochen offensichtlicher, die dem durch den Ballon verursachten Trauma folgte.

[0202] Um eine zelluläre therapeutische Dosis zu erreichen, die den Effekt eines Biostents erzeugt, d. h. bei welcher jede Zelle der Tunica media dem Bereich der therapeutischen Konzentration ausgesetzt ist, beispielsweise ungefähr 0,1 µg/ml bis ungefähr 8,0 µg/ml des Cytochalasin B, wird ein Katheter, beispielsweise ein MIC2- oder MIC3-Katheter mit einem Volumen des gelösten Cytoskelettinhibitors gefüllt und bei einem Hubdruck zugeführt, der das Gefäß nicht beschädigt. Beispielsweise werden 9 bis 24 ml (MIC2) oder 5 bis 10 ml (MIC3) einer Lösung von 8,0 µg/ml Cytochalasin B bei einem Hubdruck von 4 bis 5 Atmosphären während einer gesamten Infusionszeit von 90 Sekunden zugeführt. Die Zuführung des NR-ML-05-monoklonalen Antikörpers zur Tunica media wurde unter diesen Bedingungen sowohl in Modellen an Oberschenkeln des Schweines und koronaren Modellen erreicht. Mit konstant gehaltenem Hubdruck und Expositionsdauer kann die Menge der infundierten Lösung variieren, da die Flussgeschwindigkeit durch die Dichtigkeit des Sitzes bestimmt wird. Falls die Flussgeschwindigkeit unterhalb des empfohlenen Bereich ist, ist der Sitz zu fest um eine gleichmäßige hydrostatische Fallhöhe zu erreichen, und deshalb existiert dann keine gleichmäßige Dosierung um die Gefäßwand herum. Falls die Flussgeschwindigkeit über dem empfohlenen Bereich ist, dann ist der Sitz zu lose, um die hydrostatische Fallhöhe zu ermöglichen, die erforderlich ist, um die Lösung in den interstiziellen Bereich der Tunica media zu zwingen, und die Dosis ist für die individuellen Zellen unterhalb des erforderlichen therapeutischen Niveaus.

[0203] Es ist gleichfalls bevorzugt, dass die Verabreichung des Cytoskelettinhibitors mit einem Katheter zur Tunica media und Adventitia nur eine minimale oder keine Beschädigung der Gefäßwand durch das Ausströmen oder das Zerlegen betont, welche durch die Prozedur der PTCA hervorgerufen wird. Darüber hinaus ist

es bevorzugt, dass der hydrostatische Druck der Fallhöhe an der Schnittstelle der Infusion mit dem Ballon und der Gefäßwand ungefähr zwischen 0,3 bis ungefähr 1,5, vorzugsweise ungefähr zwischen 0,4 bis ungefähr 0,8 und noch mehr bevorzugt ungefähr zwischen 0,5 bis ungefähr 0,75 Atmosphären beträgt, so dass die Lösung, die den Cytoskeletthinhibitor enthält, schnell in den interstiziellen Raum der Tunica media gezwungen wird, ohne die kleinen Gefäße in der Adventitia zu beschädigen, wobei deren Ausgangspunkt der hydrostatischen Fallhöhe ausgesetzt ist.

[0204] Vorzugsweise resultiert die Verabreichung des Cytoskeletthinhibitors in einer gleichförmigen Zuführung des Cytoskeletthinhibitors in die Tunica media. Darüber hinaus resultiert die Verabreichung des Cytoskeletthinhibitors über den Katheter in der Zuführung einer wirksamen Menge des Wirkstoffes in die Adventitia über die Vasa vasorum sowie über die Tunica media. Vorzugsweise wird der Cytoskeletthinhibitor gleichmäßig in der Adventitia verteilt. Die Verabreichung eines Cytoskeletthinhibitors mittels eines Katheters, beispielsweise ungefähr 4 bis ungefähr 24 ml des Cytochalasin B bei ungefähr 8,0 µg/ml, resultiert vorzugsweise in einem gleichförmigen Muster der Zuführung des Cytoskeletthinhibitors bei einer Eindringtiefe von wenigstens ungefähr 10%, mehr bevorzugt wenigstens ungefähr 20%, sogar noch mehr bevorzugt 100% des Inneren der Tunica media. Es wurde an Hand einer Koronarstudie an Schweinen gefunden, dass bis zu dem Zeitpunkt an dem ein Cytoskeletthinhibitor aus den inneren 10% der Tunica media zum äußeren Bereich diffundiert, die Zellen in den äußeren Bereichen der therapeutischen Dosis ausgesetzt waren.

[0205] Eine bevorzugte Form des Cytoskeletthinhibitors beinhaltet Cytochalasin B in steriler Salzlösung in einer Konzentration von ungefähr 8,0 µg/ml in 30 ml-Fläschchen, welche die bevorzugte zelluläre therapeutische Dosis, wie sie hierin beschrieben wurde, zur Behandlung einer einzigen Läsion zuzuführen. Vorzugsweise wird die Menge gleichförmig über die inneren 20% der Tunica media und gleichförmig über die Adventitia verteilt.

[0206] Bei einer weiteren therapeutischen Methode wird eine Lösung eines Cytoskeletthinhibitors in vivo oder ex vivo in die Wandungen isolierter Gefäße (Arterien oder Venen) infundiert, die für vaskuläre Transplantate verwendet werden sollen. In diesem Beispiel wird das Gefäß, das als das Transplantat dienen soll, operativ entfernt oder isoliert und anschließend durch eine Infusion einer Lösung eines Cytoskeletthinhibitors ausgedehnt. Vorzugsweise wird die Infusion durch einen Hubdruck von ungefähr 4 bis ungefähr 5 Atmosphären über eine Zeitdauer von ungefähr 1 bis ungefähr 4 Minuten durchgeführt, vorzugsweise ungefähr 1 bis ungefähr 2 Minuten. Diese Infusionsform resultiert in der Penetration einer wirkungsvollen Dosis des Cytoskeletthinhibitors zu den Zellen der glatten Muskulatur der Gefäßwand. Vorzugsweise wird der Cytoskeletthinhibitor bei einer Konzentration von ungefähr 0,1 µg/ml bis ungefähr 8,0 µg/ml der Infusionslösung vorliegen. Vorzugsweise ist der Cytoskeletthinhibitor ein Cytochalasin und am bevorzugtesten ist der verwendete Cytoskeletthinhibitor Cytochalasin B oder ein funktionelles äquivalentes Analoges davon.

[0207] Es ist dem Durchschnittsfachmann bekannt, dass periphere Gefäße, die für vaskuläre Transplantate an anderen Orten oder in koronaren Arterien-Bypass-Transplantaten verwendet werden, häufig nach einer chirurgischen Stenose nicht geeignet sind. Da eine Infusion mit Cytochalasin B die vaskuläre luminal Fläche in Gefäßen, die durch einen chirurgischen Eingriff traumatisiert wurden, auf Grund der Aktivität des biologischen Stents aufrechterhält, kann die Verabreichung in diesem Prozess die Fähigkeit des Gefäßes zur Kontraktion erhalten, was in einem größeren luminalen Durchmesser oder einer größeren luminalen Querschnittsfläche resultiert. Weiterhin ist es ein Vorteil dieser Ausführungsform, dass die Verabreichung des Cytochalasin B in dieser Art und Weise die Abschnürung oder Krämpfe verhindert, die häufig eintreten, nachdem vaskulären Transplantate sowohl ihre proximalen wie auch distalen Örtlichkeiten anastomosieren, die zur beeinträchtigten Funktion führen können, wenn nicht sogar zum totalen Fehlschlag der vaskulären Transplantate. Deshalb sollte die Gefäßbehandlung mit einem Cytochalasin-Stent das Auftreten von Krämpfen, die zwischen wenigen Tagen bis einigen Monaten nach der Transplantat-Prozedur auftreten können, vermindern.

[0208] In einer anderen Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte können diese in Situationen verwendet werden, in denen Angioplastie nicht ausreichend ist, um eine blockierte Arterie zu öffnen, beispielsweise wie in jenen Situationen, die die Einführung eines intravaskulären Stents oder Shunts oder anderer implantierbarer Vorrichtungen erfordern. Deshalb stellt die Erfindung auch Stents, adventizielle Umhüllungen, synthetische Transplantate oder Shunts zur Verfügung, die den Cytoskeletthinhibitor in fester Form umfassen. Ein bevorzugter Cytoskeletthinhibitor ist ein Cytochalasin, beispielsweise Cytochalasin B oder ein Analoges davon, welches ein funktionelles Äquivalent des Cytochalasin B ist. Ein weiterer bevorzugter Cytoskeletthinhibitor der Erfindung ist Taxol oder ein Analoges des Taxols, welches ein funktionelles Äquivalent des Taxols ist. Vorzugsweise liegt der Cytoskeletthinhibitor in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung vor.

[0209] Deshalb stellt eine implantierbare Vorrichtung wie beispielsweise ein intravaskulärer Stent oder Shunt

ein mechanisches Mittel zur Ermöglichung der Zunahme im luminalen Durchmesser eines Gefäßes dar, zusätzlich zu dem, das durch die Wirkung des biologischen Stents und/oder der anti-proliferativen Wirkung des Cytoskeletthinhibitors ermöglicht wird, beispielsweise durch Cytochalasin B oder Taxol, die darin freisetzbar eingebettet sind oder in Lösung oder Suspension während der Eingriffsprozedur verabreicht werden. Weiterhin ermöglicht die Einbringung einer implantierbaren Vorrichtung, die einen Cytoskeletthinhibitor umfasst, der ein Inhibitor der Zellproliferation der glatten Muskulatur ist, eine gesteigerte Wirksamkeit durch Reduktion oder Verhütung der intimalen Proliferation. Diese Inhibierung der Zellen der intimalen glatten Muskulatur und des Stroms, welches durch die glatte Muskulatur erzeugt wird, erlaubt eine schnellere und vollständigere Re-Endothelisierung, die dem Einsetzen der Vorrichtung durch den Eingriff folgt.

Kits, welche eine implantierbare Zuführvorrichtung und wenigstens einen erfindungsgemäßen Cytoskeletthinhibitor umfassen

[0210] Die Erfindung stellt ein Kit zur Verfügung, welches ein Verpackungsmaterial umfasst, dem, separat abgepackt, wenigstens eine implantierbare Vorrichtung beiliegt, die für die Zuführung eines Cytoskeletthinhibitors angepasst ist, beispielsweise ein Katheter, eine adventizielle Umhüllung, ein Ventil, ein Stent, ein Shunt oder ein synthetisches Transplantat, und wenigstens eine Einheitsdosisform, die einen Cytoskeletthinhibitor umfasst, wie auch Instruktionsmittel in Übereinstimmung mit den vorliegenden Verfahren zu dessen Anwendung. Die Einheitsdosisform kann eine Menge wenigstens eines der vorliegenden Cytoskeletthinhibitoren umfassen, welche wirksam ist, um die therapeutischen Ergebnisse bei lokaler und/oder systemischer Zuführung, wie sie hierin beschrieben sind, zu erreichen. Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Kit, das einen Katheter umfasst, der für die lokale Zuführung wenigstens eines Cytoskeletthinhibitors an einen Ort im Lumen eines Säugergefäßes ausgerichtet ist, zusammen mit Instruktionsmitteln, die seine Verwendung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung anweisen. In einem bevorzugten Aspekt kann der Infusionskatheter konventionell ein Doppelballon- oder Vierfachballon-Katheter mit einer durchlässigen Membran sein.

[0211] Es ist gleichfalls vorgesehen, dass das erfindungsgemäße Kit eine Zuführungsvorrichtung für die systemische oder lokale Zuführung umfasst, die kein Katheter ist, beispielsweise eine adventizielle Umhüllung, ein Ventil, ein Stent oder ein Shunt. Ein Ventil, Stent, Umhüllung oder Shunt, die für die Verfahren der Erfindung verwendbar sind, können eine bioabbaubare Beschichtung oder eine poröse nicht-bioabbaubare Beschichtung umfassen, beispielsweise eine PTFE-Membran, die darin dispergiert einen oder mehrere Cytoskeletthinhibitoren besitzt, wie sie hierin beschrieben sind, vorzugsweise eine Dosierungsform des Cytoskeletthinhibitors für die anhaltende Freisetzung.

[0212] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Kit, das eine Vorrichtung umfasst, die für die lokale Zuführung von wenigstens zwei Cytoskeletthinhibitoren eingerichtet ist, eine Einheitsdosis eines ersten Cytoskeletthinhibitors und eine Einheitsdosis eines zweiten Cytoskeletthinhibitors, zusammen mit Instruktionsmitteln, die ihre Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung anweisen. Die Einheitsdosisformen der ersten und zweiten Cytoskeletthinhibitoren können mittels diskreter Lumina eines Katheters eingeführt oder vor der Einführung in ein einziges Lumen eines Katheters zusammengemischt werden. Falls die Einheitsdosisformen in die diskreten Lumina eines Katheters eingeführt werden, kann die Zufuhr der Cytoskeletthinhibitoren zum Gefäß gleichzeitig oder aufeinander folgend eintreten. Darüber hinaus kann ein einziges Katheterlumen verwendet werden, um die Einheitsdosisformen eines Cytoskeletthinhibitors zuzuführen, worauf das Wiederbeladen des Lumens mit einem weiteren Cytoskeletthinhibitor und die Zufuhr des weiteren Cytoskeletthinhibitors zum Lumen des Gefäßes folgen. Sowohl eine oder beide Einheitsdosen können am Zielort die Verringerung des Durchmessers im Gefäßlumen bewirken.

[0213] Alternativ dazu kann eine Einheitsdosis eines der Cytoskeletthinhibitoren lokal verabreicht werden, beispielsweise durch Katheter, während eine Einheitsdosis eines weiteren Cytoskeletthinhibitors systemisch verabreicht wird, beispielsweise durch orale Verabreichung.

[0214] Die Erfindung wird an Hand der folgenden typischen Beispiele besser verstanden.

BEISPIEL 1

In vivo-Bindung an Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in der Blutgefäßwandung

[0215] [Fig. 1B](#) zeigt die Bindung von NR-AN-01 (ein mausartiges IgG2b MAb) an die Zellen der glatten Muskulatur in der vaskulären Wand einer Arterie eines 24-jährigen männlichen Patienten, vier Tage nach der intravenösen (i. v.) Verabreichung von NR-AN-01. [Fig. 1B](#) ist eine Mikraufnahme eines histologischen Schnitts,

der durch die mediale Region einer Arterienwand des Patienten nach der NR-AN-01-Verabreichung durchgeführt wurde, wobei der Schnitt ex vivo mit HRP-konjugierter Ziegen-anti-Maus-IgG reagiert wurde. Die Reaktion des HRP-Konjugats mit NR-AN-01 MAb wurde durch Zusatz von 4-Chlor-1-naphthol oder 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid als Peroxidasesubstrat (Chromogen) sichtbar gemacht. Das Reaktionsprodukt des Substrats bildet am Reaktionsort einen unlöslichen purpurnen oder dunkelbraunen Niederschlag (gezeigt bei Nr. 2, [Fig. 1B](#)). Ein Gegenfärbemittel wurde verwendet, um das kollagene extrazelluläre Matrixmaterial sichtbar zu machen (gezeigt in Nr. 2, [Fig. 1B](#)). Zellen der glatten Muskulatur wurden durch Untersuchung unter dem Mikroskop als Purpur angefärbte Zellen sichtbar gemacht ([Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#)). Diese Mikroaufnahme ([Fig. 1B](#)) zeigt die Fähigkeit der MAb, sich spezifisch an menschliche vaskuläre glatte Muskulatur in vivo zu binden, durch die Zellen internalisiert zu werden und über längere Zeit in den Zellen zu bleiben.

BEISPIEL 2

Therapeutische Konjugate enthaltend Trichothecen

[0216] Konjugate von NR-AN-01 und Roridin A wurden durch chemisches Koppeln eines Derivates der Hemibernsteinsäure des Trichothecen-Cytotoxins (wie unten beschrieben) an einen monoklonalen Antikörper, der als NR-AN-01 gekennzeichnet war, hergestellt. Zwei Konjugate wurden hergestellt, wobei eines an das Roridin in A2'-Position und eines an die 13'-Position gekoppelt wurde. Zwei Schemata wurden für diese Synthese verwendet, wie in den [Fig. 2](#) und 3 gezeigt. Das Konjugat wurde dann von nicht-reagiertem Roridin A durch Säulenchromatografie an PD-10 Sepharose® gereinigt (Pharmacia; Piscataway, NJ), durch Ausschluss-Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie analysiert, und die Säulenfraktionen durch SDS-PAGE und isoelektrisches Fokussieren (IEF) charakterisiert, wie unten beschrieben.

[0217] [Fig. 2](#) zeigt diagrammartig das erste Reaktionsschema für die Synthese von Roridin A-Hemibernsteinsäure-Bernsteinsäureimidat (RA-HS-NHS) durch einen Zweistufenprozess mit den Reagenzien: Bernsteinsäureanhydrid, Triethylamin (NEt_3) und Dimethylaminopyridin (DMAP), welche in Dichlormethan (CH_2Cl_2) bei Raumtemperatur (RT) vorlagen, und N-Hydroxybernsteinsäureimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid-Reagenzien (DCC), welche ebenfalls in CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur vorlagen.

[0218] [Fig. 3](#) zeigt diagrammartig das zweite Reaktionsschema für die Synthese von Roridin A-Hemibernsteinsäure-Bernsteinsäureimidat (RA-HS-NHS) durch einen Fünfstufenprozess mit den Reagenzien: t-Butyl-dimethyl-silylchlorid (TBMS-Cl) und Imidazol in Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur (RT), Essigsäureanhydrid, Triethylamin (TEA) und Diethylaminopyridin in Dichlormethan (CH_2Cl_2) bei Raumtemperatur, Bernsteinsäureanhydrid, Triethylamin (TEA) und Dimethylaminopyridin (DMAP) in Methylenchlorid (CH_2Cl_2) bei Raumtemperatur, und N-Hydroxybernsteinsäureimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid-Reagenzien (DCC).

Synthese von 2'-Roridin A-Hemibernsteinsäure (2):

[0219] Zu 0,5 g (0,94 mmol) Roridin A wurden 15 ml Dichlormethan hinzugegeben. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren 0,104 g (1,04 mmol) Bernsteinsäureanhydrid zugefügt. Zu dieser Reaktionsmischung wurden 0,2 ml Triethylamin in 5 ml Dichlormethan zugefügt. Zu der homogenen Reaktionsmischung wurde eine katalytische Menge von Dimethylaminopyridin zugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur 15 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatografie verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9,7:0,3$ mit einigen Tropfen Essigsäure). Am Ende der Reaktion wurden 0,3 ml Eisessig hinzugegeben und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der getrocknete rohe Rückstand wurde zwischen Wasser und Methylenchlorid verteilt. Die vereinigten Methylenchlorid-Extrakte (3×50 ml) wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet, wobei 0,575 g (96%) einer rohen Mischung von drei Verbindungen erhalten wurde. Die präparative C18-HPLC-Trennung der rohen Mischung in 50% Acetonitril-Wasser mit 2% Essigsäure ergab 0,36 g (60%) der Verbindung 2 als einen weißen Feststoff.

Synthese von Bernsteinsäureimidyl-2'-Roridin A-Hemibernsteinsäure (3):

[0220] Zu 0,3 g (0,476 mmol) von 2'-Roridin A-Hemibernsteinsäure in 30 ml Dichlormethan wurden 0,055 g (0,478 mmol) N-Hydroxybernsteinsäure zugefügt. Zu dieser klaren Reaktionsmischung wurden 0,108 g (0,524 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 6 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9,7:0,3$ mit einigen Tropfen Essigsäure) als entwickelndem Lösungsmittel verfolgt. Einige Tropfen Eisessig wurden der Reaktionsmi-

schung zugegeben und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Zum getrockneten Rückstand wurde Dichlormethan zugegeben und das ausgefallene DCU abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde aus dem Filtrat unter reduziertem Druck entfernt, wobei ein weißer Feststoff erhalten wurde. Aus dem Rohprodukt wurden 0,208 g (60%) der Verbindung 3 durch präparative HPLC in 50% Acetonitril mit 2% Essigsäure als der mobilen Phase gereinigt.

Synthese von 13'-t-Butyldimethylsilyl-Roridin A (4):

[0221] Zu 72,3 mg (0,136 mmol) Roridin A in 0,5 ml Dimethylformamid wurden 0,055 g (0,367 mmol) t-Butyldimethylsilylchlorid und 0,025 g (0,368 mmol) Imidazol dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 15 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch Dünnschicht-Chromatografie an Kieselgel unter Verwendung von 1% MeOH-CHCl₃ als der mobilen Phase verfolgt. Das Lösungsmittel wurde aus der Reaktionsmischung im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Rohprodukt wurde zwischen Wasser und Methylenchlorid verteilt. Das Lösungsmittel aus den vereinigten Methylenchloridextrakten wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Rohprodukt wurde durch Flash-Chromatografie unter Verwendung von EtOAc:Hexan (1:3) als eluierendem Lösungsmittel gereinigt. Das Lösungsmittel aus den Eluaten wurde unter reduziertem Druck entfernt, wobei 0,66 g (75%) der Verbindung 4 als Feststoff erhalten wurden.

Synthese von 13'-t-Butyldimethylsilyl-2'-Acetyl-Roridin A (5):

[0222] Zu 0,1 g (0,155 mmol) von 13'-t-Butyldimethylsilyl-Roridin A in 10 ml Dichlormethan wurden 0,3 ml Essigsäureanhydrid, 0,2 ml Triethylamin und einige Kristalle von Dimethylaminopyridin zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur 2 Stunden lang aufbewahrt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch TLC in 1% Methanol-Methylenchlorid als Laufmittel verfolgt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand an einer Kieselgelsäule unter Verwendung von 1% Methanol-Chloroform als Elutionsmittel gereinigt. Das Lösungsmittel wurde aus den Eluaten unter Vakuum entfernt, wobei 0,085 g (80%) der Verbindung 5 als ein weißer Feststoff erhalten wurden.

Synthese von 2'-Acetyl-Roridin A (6):

[0223] Zu 0,05 g (0,073 mmol) 2'-Acetyl-13'-t-Butyldimethylsilyl-Roridin A in 5 ml Tetrahydrofuran wurden 0,3 ml einer einmolaren Lösung von t-Butylammoniumfluorid in THF zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 2 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatografie an Kieselgel unter Verwendung von 1% MeOH-CHCl₃ als Laufmittel verfolgt. Das Lösungsmittel wurde aus der Reaktionsmischung unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Rohprodukt wurde an einer Kieselgelsäule unter Verwendung von 1% CH₃OH-CHCl₃ als eluierendem Solvens gereinigt. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Eluaten im Vakuum entfernt, wobei 0,020 g (48%) der Verbindung 6 als ein Feststoff erhalten wurden.

Synthese von 2'-Acetyl-13'-Hemisuccinyl-Roridin A (7):

[0224] Zu 0,05 g (0,087 mmol) von 2'-Acetyl-Roridin A in 1 ml Dichlormethan wurden 0,025 g (0,25 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 35 ml Triethylamin zugegeben. Einige Kristalle Dimethylaminopyridin wurden als Katalysator hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 24 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatografie unter Verwendung von 5% Me-OH-CH₂Cl₂ als Laufmittel verfolgt. Gegen Ende der Reaktion wurden 30 ml Eisessig hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde aus der Reaktionsmischung unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Rohprodukt wurde zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt. Das Lösungsmittel aus den vereinigten Ethylacetatfraktionen wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Verwendung einer Kieselgelsäule gereinigt, wobei 0,039 g (66%) der Verbindung 7 als ein weißer Feststoff erhalten wurden.

Synthese von Bernsteinsäureimidyl-2'-Acetyl-13'-Roridin A-Hemisuccinat (8):

[0225] Zu 0,036 g (0,0050 mmol) 2'-Acetyl-13'-Roridin A-Hemibernsteinsäure in 2 ml Dichlormethan wurden 0,009 g (0,09 mmol) N-Hydroxysuccinimid hinzugegeben. Zu der gerührten Lösung wurden 0,012 g (0,059 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 8 Stunden lang gerührt. Die Vervollständigung der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatografie an Kieselgel unter Verwendung von 5% MeOH-CH₂Cl₂ als Laufmittel verfolgt. Dann wurden einige Tropfen Eisessig der Reaktionsmischung zugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck aus der Reaktionsmischung entfernt

und getrocknet. Das Rohprodukt wurde auf einer Kieselgelsäule unter Verwendung von 5% MeOH-CH₂Cl₂ als eluierendem Lösungsmittel gereinigt. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Eluaten entfernt, wobei 0,025 g (61%) der Verbindung 8 als ein weißer Feststoff erhalten wurden.

Konjugation von Succinimidyl-2'-Roridin A-Hemisuccinat (3) und Succinimidyl-2'-Acetyl-13'-Roridin A-Hemisuccinat (8) an NR-AN-01-Vollantikörper (MAb):

[0226] Konjugationsreaktionen wurden bei einem pH-Wert von 8,0 in Boratpuffer in Gegenwart von 25% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter leichtem Mischen während einer Zeitdauer von 45 Minuten vor der Reinigung durch Gelpermeationschromatografie durchgeführt. Die molare Konzentration der Trichothecen-Arzneimittelvorstufe bezüglich des Angebots an Antikörpern betrug jeweils 25:1 und 40:1 für die 2'- und 13'-Roridin A-Analoga (Verbindungen 3 und 8). Die Antikörperkonzentration betrug 0,9 bis 1,0 mg/ml während der Konjugationsreaktion.

[0227] Eine typische Reaktion des 2'-Analogen (3) mit 25 mg des Antikörpers war folgende: Zu 4,7 ml von 5,3 mg Ab/ml in Phosphat-gepufferter Salzlösung (d. h. PBS; 150 mM NaCl, 6,7 mM Phosphat, pH 7,3) wurden 10 ml PBS und 5 ml des Boratpuffers (0,5 M, pH 8,0) zugefügt. Unter leichtem Rühren wurden 6,3 ml DMSO, das 1,37 mg Succinimidyl-2'-Roridin A-Hemisuccinat (3) enthielt, während einer Zeit von 15 Sekunden tropfenweise zugegeben.

Reinigung:

[0228] Zur Reinigung wurden 1 ml Reaktionsaliquote auf Pharmacia PD-10 Sepharose®-Säulen, die in PBS equilibriert worden waren, aufgebracht. Das eluierte Konjugat wurde in 2,4 bis 4,8 ml Fraktionen gesammelt. Die an den Säulen gereinigten Konjugataliquote wurden dann vereinigt und mittels eines Amicon PM-10 Diaflo®-Konzentrators auf 1,5 bis 2,0 mg des Ab/ml aufkonzentriert, durch eine 0,2 µm Gelman Acrodisc® steril gefiltert und in sterile Glasfläschchen in Volumina von 5 ml gefüllt.

[0229] Das 2'-Konjugat wurde schnell in flüssigen Stickstoff eingefroren und dann bei -70°C bis zur Anwendung gelagert. Das 13'-Roridin A-NR-AN-01-Konjugat wurde in gefrorenem oder gekühltem Zustand aufbewahrt (d. h. bei 5–10°C).

Charakterisierung der Konjugate:

[0230] Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay unter Verwendung der Kupfer-Reagenz-Methode (Pierce Chemical Corp.) bestimmt.

[0231] Die Bewertung des Derivatisierungsgrades des Antikörpers wurde dadurch durchgeführt, dass zuerst ein Aliquot des Konjugats in 0,2-molarer Carbonatlösung, pH 10,3, während einer Zeit von 4 Stunden hydrolysiert wurde (bei Raumtemperatur für das 2'-Konjugat oder bei 37°C für das 13'-Konjugat), gefolgt durch Filtration durch eine PM-30-Membran. Das Filtrat wurde dann auf Roridin A durch inverse HPLC auf einer C-18-Säule unter Verwendung einer mobilen Phase von CH₃CN:H₂O:HOAc jeweils im Verhältnis 50:48:2 geprüft. Ein Korrekturfaktor von 1,32 wurde wegen der parallel ablaufenden Zersetzung des makrozyklischen Ringes verwendet, welche polare Produkte während der Hydrolyse des 13'-Konjugats ergibt.

[0232] Ausschlusschromatografie auf einer DuPont Zorbax®-HPLC-Säule und isoelektrische Fokussierung unter Verwendung von Serva®-Gelplatten (pH 3 bis 10) wurde gleichfalls durchgeführt. Durch HPLC wurde kein Anzeichen einer Aggregation beobachtet.

[0233] Ein Immunoassay des Roridin A-Antikörper-Konjugats wurde entweder durch kompetitive ELISA unter Verwendung eines mit Biotin umgesetzten Ab mit Streptavidin/Peroxidase-Detektion durchgeführt oder durch ein kompetitives Zell-bindendes Assay unter Verwendung eines ¹²⁵I-markierten Antikörpers. Alternativ dazu wurde die Immunoreaktivität unter Bedingungen der Antigen-Sättigung in einem Zell-bindenden Assay gemessen, wobei der Antikörper zuerst mit I-125 mittels Chloramin T Methode markiert und anschließend mit 2'- und 13'-Roridin A-Vorläuferstufen derivatisiert wurde.

BEISPIEL 3

Kinetik der Bindung an Zellen der glatten Muskulatur

[0234] Zur in vivo-Verabreichung mittels eines Katheters ist es wünschenswert, dass die therapeutischen Konjugate in weniger als 3 bis 5 Minuten verabreicht werden, so dass sich der Blutfluss im Patienten wieder neu einstellen kann. Deshalb wurden Studien durchgeführt um die Bindungskinetik eines bindenden Proteins der glatten Muskulatur mit einem K_a -Wert von $> 10^9$ Liter/Mol zu bestimmen. Da menschliche Zellen der vasculären glatten Muskulatur langsam in Kultur wachsen und gefunden wurde, dass Pavianzellen der glatten Muskulatur den menschlichen CSPG-Zell-Oberflächen-Marker exprimieren, wurden BO54-Pavian-Arterienzellen der glatten Muskulatur und menschliche A375 M/M-Zellen (Melanom; ATCC #CRL1619), die den CSPG-Oberflächen-Marker tragen, in vielen der Studien verwendet, die in den unten angegebenen Beispielen beschrieben sind.

[0235] Für die kinetischen Bindungsstudien wurden A375 M/M- und BO54-Zellen in sterile Mikrotiterplatten mit 96 Aufzuchtstäpfen mit 2500 Zellen/Napf gesät. Die Platten wurden mit Aluminiumfolie umhüllt und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO₂/95% Luft inkubiert. Nach ungefähr 18 h wurden die inkubierten Platten entfernt und die Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd 5 Minuten lang fixiert, um den Membrandurchsatz zu verhüten. Nach der Fixierung wurden die Platten eingehend mit PBS gewaschen, das 0,5% Tween-20® enthielt. Serielle Zweifachverdünnungen eines NR-AN-01-therapeutischen Konjugats, das Roridin A enthielt, wurde bei Proteinkonzentrationen von 10 mg/ml bis 20 ng/ml hergestellt, und jede Verdünnung wurde aliquot in zwei Aufzuchtstäpfen eingebracht. Die Platten wurden bei 4°C mit dem NR-AN-01 während einer Zeitdauer von 5, 15, 30 und 60 Minuten inkubiert, nach welcher das nicht-gebundene Protein durch Aspiration entfernt wurde, und 100 µl des CS-Puffers wurde jedem Napf zugefügt (5% Hühnerserum/0,5% Tween-20® in PBS). Der CS-Puffer wurde entfernt und das therapeutische NR-AN-01-Konjugat, das an die Zellen gebunden war, wurde durch Addition von 100 µl eines HRP-konjugierten Ziegen-anti-Maus-IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) zu jedem Napf zugefügt, bei 4°C 1 h inkubiert, gewaschen mit PBS/0,05% Tween-20® um ungebundenes Ziegen-IgG zu entfernen, und 2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)(ABTS)-Chromogen-Substrat hinzugefügt (d. h. für das HRP). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Menge des NR-AN-01, das an die Zellen gebunden war, durch Messung der Absorption bei 415 nm und 490 nm unter Verwendung eines ELISA-Plattendetektors gemessen, der für die Datenerfassung mit einem Compaq-Computer ausgerüstete war.

[0236] [Fig. 4A](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, in welchen A375 m/m-Marker-positive Zellen bei 4°C gehalten wurden (d. h. um den Durchsatz durch die Membran zu verhüten) für 5 Minuten (leere Quadrate, [Fig. 4A](#)), für 15 Minuten (gefüllte Rauten, [Fig. 4A](#)), für 30 Minuten (gefüllte Quadrate, [Fig. 4A](#)) oder für 60 Minuten (leere Rauten, [Fig. 4A](#)) bei verschiedenen Konzentrationen an NR-AN-01 (NRAN01 µg/ml). Die Bindung des NR-AN-01-MAB an die A375-Zellen wurde unter Waschen quantifiziert, um den ungebundenen Antikörper zu entfernen, durch Zufügen von HRP-konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG unter Reaktion mit dem Zell-gebundenen MAB, Waschen, um ungebundenen sekundären Ziegen-Antikörper zu entfernen und Hinzufügen von 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-(ABTS)-Substrat als Peroxidase. Die Farbreaktion wurde nach 30 Minuten sowohl bei 415 nm wie auch 490 nm beobachtet (ABS415, 490).

[0237] [Fig. 4B](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die auf ähnliche Art und Weise wie die oben beschriebenen bezüglich der [Fig. 4A](#) durchgeführt wurden, wobei aber BO54-Marker-positive Zellen der glatten Muskulatur verwendet wurden, d. h. anstatt der A375 m/m-Zellen.

[0238] Die Ergebnisse, die in den [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) dargestellt sind zeigen eine signifikante Bindung des NR-AN-01 an die A375- und BO54-Zellen innerhalb von 5 Minuten bei 4°C, sogar bei der niedrigsten Dosis von 20 ng/ml.

BEISPIEL 4

Wirkungen von Roridin A und RA-NR-AN-01-Konjugaten

[0239] Die Wirkungen von Roridin A (RA) und RA-NR-AN-01-Konjugaten auf die zelluläre Proteinsynthese (d. h. durch ³H-Leucin-Inkorporation) und auf die Metabolitaktivität (d. h. durch mitochondriale MTT-Assay) wurden in den Experimenten durchgeführt, die unten im Detail in Beispiel 5 und Beispiel 6 beschrieben sind. Die Studien in Beispiel 4 beinhalten Experimente, um die Wirkungen der langfristigen Behandlung (d. h. über 24 Stunden) mit den Wirkstoffen zu bestimmen. Die Studien in Beispiel 5 beinhalten Experimente zur Bestimmung der

Wirkungen einer „getakteten“ Behandlung (d. h. während 5 Minuten) auf die Zellen. In beiden Studien wurden die zelluläre Spezifität der Wirkungen ausgewertet durch Einschluss von „Ziel“-Zellen (d. h. Zellen, die den CSPG-„Marker“ tragen) und Zellen, die keine Ziel-Zellen sind. Für Vergleichszwecke wurde auch freies RA (d. h. nicht verknüpftes RA) in die Studien aufgenommen. Die Wirkungen auf die zelluläre Proteinsynthese oder auf die Metabolitaktivität wurden entweder unmittelbar nach der Behandlung abgeschätzt oder nach einer „Erholungsperiode“ (d. h. unter Einschluss der Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C), um die langfristigen Wirkungen der Agenzien auf die Zellpopulationen zu bestimmen.

Metabolit-Effekte nach einer Exposition von 24 Stunden:

[0240] Während es bekannt ist, dass monoklonale Antikörper-Arzneimittel-Konjugate einen Spezifizierungsgrad für Zellen, die Marker-Antigene tragen, wenn sie in vivo angewendet werden, hat es sich in vielen Systemen als schwierig erwiesen, die in vitro-Spezifität der Wirkung zu zeigen, besonders mit Verbindungen, welche lipophil sind. Daher wurden die vorliegenden Experimente durchgeführt, in welchen die Inhibitoreffekte des NR-AN-01-Roridin A-Konjugats während einer Zeitdauer von 24 Stunden auf Zielzellen und auf Zellen, die keine Zielzellen sind, getestet wurden. Die Ergebnisse mit RA-NR-AN-01 wurden mit der Wirkung des freien Roridin A über die gleiche Zeitdauer von 24 Stunden verglichen. Ein modifiziertes Methyltetrazoliumblau(MTT)-Assay wurde mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (Sigma) verwendet, um die zelluläre Metabolitaktivität zu bestimmen. Dieses Assay ist dazu gedacht, die zelluläre mitochondriale Aktivität der Dehydrogenase zu messen. Für einige dieser Studien wurden M14(Melanom)- und B054(glatte Muskulatur)-Zelllinien als marker-positive Zielzellen und HT29-Zellen (Dickdarmkarzinom; ATCC Nr. HTB38) zur Kontrolle der Spezifität der Zellen, die keine Zielzellen darstellen, verwendet. In anderen Studien wurde A375 als eine marker-positive Zelle verwendet. Die HT29- und M14-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Näpfen bei einer Konzentration von $5,0 \times 10^3$ Zellen/Napf gesät, und die B054-Zellen wurden bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^3$ Zellen/Napf ausgesät. Serielle Zweifachverdünnungen des freien Roridin A und des 2'RA-HS-NR-AN-01 (d. h. Roridin A mittels eines Hemisuccinats(HS)-Kopplungsagenzes an der 2'-Position an das NR-AN-01 gekoppelt) wurden in DMEM über einen Bereich von Proteinkonzentrationen von 20 mg/ml bis 40 µg/ml hergestellt. Testagenzien (in Duplikat) wurden den Mikrotiter-Näpfen (100 µl/Napf) zugefügt, die Platten mit Aluminiumfolie umhüllt und bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre bestehend aus 5% CO₂/95% Luft 24 Stunden lang inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt (durch Aspiration), frisches DMEM hinzugegeben (100 µl/Napf) und die Zellen zurückgegeben, um während einer zusätzlichen Nacht (d. h. für 16–18 Stunden) inkubiert zu werden („Erholungsperiode“). Am Ende der Erholungsperiode wurde die zelluläre Metabolitaktivität durch Zugabe von 20 µl einer Lösung von 5 mg/ml MTT zu jedem Napf bestimmt. Die Platten wurden bedeckt und bei 37°C während einer Zeitdauer von 4 Stunden inkubiert und dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/Napf von 10% SDS/0.1 N HCl entwickelt. Das dunkelblaue lösliche Formazanreaktionsprodukt wurde bei Raumtemperatur nach 16–18 Stunden entwickelt und unter Verwendung eines ELISA-Mikrotiterplatten-Detektors bei einer Absorption von 570 nm quantifiziert.

[0241] [Fig. 5A](#) zeigt graphisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, in welchen B054-Marker-positive Zellen der glatten Muskulatur mit verschiedenen Konzentrationen von RA-NR-AN-01 (NRAN01-RA; leere Quadrate, [Fig. 5A](#)) oder freiem Roridin A (freies RA; gefüllte Rauten, [Fig. 5A](#)) während einer Zeitdauer von 24 Stunden inkubiert, dann gewaschen und dann der Kultur für eine zusätzliche 16–18stündige Erholungsperiode über Nacht (o/n) zurückgegeben wurden, um die Metabolitaktivität in einem MTT-Assay zu testen. Die Konzentrationen des freien RA und RA-NR-AN-01 werden als die berechnete Konzentration des Roridin A (in mg/ml auf einer logarithmischen Skala aufgetragen) im Assay (d. h. mehr als die gesamte Menge in mg/ml des NR-AN-01-Proteins im Assay) ausgedrückt, so dass direkte Vergleiche gemacht werden können. Die Metabolitaktivität der Zellen im MTT-Assay wird als der Prozentsatz der Metabolitaktivität, die in einer Kontrolle unbehandelter Zellkulturen gemessen wurde (d. h. Prozent-Kontrolle) dargestellt.

[0242] [Fig. 5B](#) zeigt graphisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die in einer ähnlichen Weise wie oben bezüglich der [Fig. 5A](#) durchgeführt wurden, aber unter Vergleich der Wirkungen von RA-NR-AN-01 (NRAN01-RA) auf drei verschiedene Zelltypen: nämlich B054-Marker-positive Zellen der glatten Muskulatur (B054-NRAN01-RA; leere Quadrate, [Fig. 5B](#)); HT29-marker-negative Kontrollzellen (HT29-NRAN01-RA; gefüllte Rauten, [Fig. 5B](#)); und M14-Marker-positive Zellen (M14-NRAN01-RA; gefüllte Quadrate, [Fig. 5B](#)). Wie oben bezüglich der [Fig. 5A](#) beschrieben, werden die Konzentrationen im vorliegenden Experiment in Einheiten von µg/ml des Roridin A ausgedrückt. Die Metabolitaktivität der Zellen ist in einer ähnlichen Weise zu der in [Fig. 5A](#), beschriebenen ausgedrückt, d. h. als der Prozentteil der Aktivität, die in unbehandelten Kontrollen von Zellkulturen gemessen wurde (Prozent-Kontrolle).

[0243] Die Ergebnisse, die in [Fig. 5A](#) und in [Fig. 5B](#) dargestellt sind zeigen, dass die Metabolitaktivität, die

im MTT-Assay gemessen wurde, signifikant in allen Populationen der Testzellen abnahm, sogar 16–18 Stunden nach einer 24-Stunden-Inkubation sowohl mit dem freien Roridin A oder in den 2'- oder 13'-RA-NR-AN-01-Konjugaten. Die Wirkungen der RA-NR-AN-01-Konjugate schienen nicht spezifisch hemmend für beide Zielzellen (BO54 und M14) und für die Zellen zu sein, die keine Zielzellen waren (HT29) ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Die Inhibitoreffekte wurden bei den Roridin-A-freien oder RA-Konjugaten bei einer Konzentration von > 10 ng/ml beobachtet.

[0244] Für Vergleichszwecke wurde eine zweite Studie durchgeführt, in welcher die Wirkungen von Pseudomonas-Exotoxin(PE)-Konjugaten auf Zellen in einem ähnlichen Protokoll bewertet wurde. Für diese Studien wurden Zielzellen und Zellen, die keine Zielzellen waren, mit PE oder PE-NR-AN-01 für eine Zeitdauer von 24 Stunden behandelt, und dann wurde ihnen eine Erholungsperiode (wie oben) erlaubt, bevor die Metabolitaktivität in einem MTT-Assay getestet wurde.

[0245] [Fig. 6A](#) zeigt graphisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die in ähnlicher Weise wie jene bezüglich der [Fig. 5A](#) durchgeführt wurden, die oben beschrieben sind, wurden aber so angelegt, dass die Metaboliteffekte des PE-NR-AN-01 (NRAN01-PE) auf Zellen studiert werden konnte, d. h. eher als RA-NR-AN-01. Es wurden drei verschiedene Zelltypen verwendet: nämlich BO54-Marker-positive Zellen der glatten Muskulatur (BO54; leere Quadrate, [Fig. 6A](#)); HT29-Marker-negative Kontrollzellen (HT29; gefüllte Rauten, [Fig. 6A](#)); und M14-Marker-positive Zellen (MT14; gefüllte Quadrate, [Fig. 6A](#)). In dieser Studie wird die Konzentration des Konjugats in µg/ml NR-AN-01-Protein (dargestellt auf einer logarithmischen Skala) ausgedrückt, und die Metabolitaktivität ist als der Prozentteil der MTT-Aktivität dargestellt, die in einer unbehandelten Kontrollkultur gemessen wurde (Prozent-Kontrolle).

[0246] [Fig. 6B](#) zeigt graphisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die in ähnlicher Art und Weise wie die oben diskutierten bezüglich der [Fig. 6A](#) durchgeführt wurden, wurden aber so angelegt, dass die Wirkungen, die mit freiem PE (PE) mit jenen, die oben erhalten wurden, verglichen werden konnten, d. h. in [Fig. 6A](#) mit PE-NR-AN-01. Die Zellen, Kulturbedingungen, Berechnungen und Darstellung der Ergebnisse sind dieselben wie oben in [Fig. 6A](#).

[0247] Die Ergebnisse, die in [Fig. 6A](#) und in [Fig. 6B](#) dargestellt sind, zeigen, dass eine 24stündige Exposition bezüglich PE-NR-AN-01 oder freiem PE nicht spezifisch inhibierend auf Zellen bei Konzentrationen von > 100 ng/ml war.

[0248] Während dieser Typ der nicht spezifischen Inhibierung so beurteilt wurde, dass er von potenziellem Wert für die biologische Atheroectomie sein kann, wurde er als nicht wünschenswert für die Behandlung der Restenose erachtet, die auf eine Angioplastie folgt, wo tote und sterbende Zellen Faktoren freisetzen können, welche die Proliferation der glatten Muskulatur stimulieren.

BEISPIEL 5

Wirkungen der getakteten Behandlung auf die zelluläre Aktivität

[0249] Zusätzliche Studien wurden durchgeführt, um die Effekte der kurzfristigen, d. h. 5-minütigen Exposition auf ein therapeutisches Roridin A-enthaltendes Konjugat auf Zellen abzuschätzen. In diesen Studien wurden sowohl die Metabolitaktivität (gemessen in MTT-Assays) und zelluläre Proteinsynthese (gemessen durch ³H-Leucin-Inkorporation) abgeschätzt.

Wirkungen nach einer 5-minütigen Exposition: Proteinsynthese

[0250] Die Wirkungen einer 5-minütigen Exposition auf das freie Roridin A (RA) oder eines therapeutischen Konjugats wurden bestimmt. Roridin A-NR-AN-01, das durch einen Hemisuccinyl-Rest (HS) entweder an der 2'-Position (2'RA-HS-NR-AN-01) oder der 13'-Position (13'RA-HS-NR-AN-01) wurden angewendet. (Im Falle der 13'RA-HS-NR-AN-01 war die 2'-Position des Roridin A gleichfalls acetyliert.) Das RA, die 2'- oder 13'RA-NR-AN-01-Konjugate wurden zweifach in sterilem DMEM über einen Konzentrationsbereich von 400 ng/ml bis 780 pg/ml Roridin A verdünnt. (Die Testproben wurden alle bezüglich des Roridin A normiert, so dass direkte Vergleiche der Wirkungen bei vergleichbaren Dosierungen gemacht werden konnten). Proben wurden in aliquoten Mengen (in Duplikat) in doppelte Mikrotiterplatten bei 100 µl/Napf verteilt und bei Raumtemperatur während einer Zeit von fünf Minuten inkubiert.

[0251] Sowohl langfristige wie auch kurzfristige Wirkungen der Testproben auf Marker-positive A375- und

Marker-negative HT29-Zellen wurden bestimmt. Zum Studium der kurzfristigen Effekte wurden 100 ml/Napf des [^3H]-Leucins (0,5 mCi/ml) unmittelbar nach der 5-minütigen Behandlung mit dem Konjugat (oder dem RA) hinzugefügt und die Proteinsynthese über eine fünfstündige Zeitdauer bestimmt. Zur Bestimmung der langfristigen Wirkungen wurden die Zellen während 5 Minuten behandelt, gewaschen und dann der Kultur für eine 24-stündige „Erholungsperiode“ im DMEM-Medium zurückgegeben, das entweder 5% NBS/5% Serum Plus® (d. h. für die A375- oder HT29-Zellen) oder 10% FBS (d. h. für die B054-Zellen) enthielt. Nach Beendigung der Erholungsperiode wurde das Inkubationsmedium entfernt (beispielsweise durch Aspiration) und ^3H -Leucin hinzugefügt (wie oben). In beiden Fällen (d. h. kurz- und langfristig) wurde die Proteinsynthese der Zellen durch Inkubation der Zellen mit dem ^3H -Leucin für eine Zeitdauer von 4 Stunden bei 37°C in einer befeuchteten Kammer bestimmt (wie oben) und alle Ergebnisse durch Vergleich mit nicht-behandelten Zellen (d. h. 100%-Kontrolle) berechnet. Nach 4 Stunden wurde das ^3H -Leucin entfernt, die Zellen aus dem Substrat durch Trypsin-Behandlung entfernt, aspiriert (Verwendung eines PHD™-Zellernters (Cambridge Technology, Inc., Cambridge, MA)) und durch Filtration über Glasfaserfilter filtriert. Die Glasfaserfilter wurden getrocknet und die Radioaktivität durch Flüssigkeits-Scintillations-Spektroskopie in einem Beckman-Flüssigkeits-Scintillations-Zähler bestimmt.

[0252] [Fig. 7A](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der durchgeführten in vitro-Studien, um die Wirkungen auf Kontroll-HT29-Marker-negative Zellen während einer 5-minütigen Exposition auf verschiedene Konzentrationen von Roridin A-(freies RA; leere Quadrate, [Fig. 7A](#)) oder 2'-RA-NR-AN-01-(2'-RA-NRAN01; gefüllte Quadrate, [Fig. 7A](#)) oder 13'-RA-NR-AN-01-(13'-RA-NRAN01; gefüllte Dreiecke, [Fig. 7A](#))-Konjugaten zu untersuchen. Die Konzentrationen des freien RA, des 2'-RA-NR-AN-01 oder 13'-NR-AN-01 werden als die berechnete Konzentration des Roridin A im Assay ausgedrückt (in µg/ml, dargestellt auf einer logarithmischen Skala), d. h. eher als die gesamte µg/ml des NR-AN-01-Proteins, so dass direkte Vergleiche der Ergebnisse durchgeführt werden können. Für diese Studien wurden die Zellen 5 Minuten lang behandelt, gewaschen und dann der Kultur für eine Zeitdauer von 4 Stunden zurückgegeben, wobei während dieser Zeit die zelluläre Proteinsynthese durch Zugabe von 0,5 mCi/ml des ^3H -Leucins zum Kulturmedium bestimmt wurde. Am Ende der 4-stündigen Periode wurden die zellulären Proteine isoliert und die Radioaktivität bestimmt. Die Resultate werden als Prozentsatz der gemessenen Radioaktivität in einer Kontroll(nicht behandelten)-HT29-Zellkultur bestimmt (d. h. %-Kontrolle).

[0253] [Fig. 7B](#) zeigt grafisch die Ergebnisse von in vitro-Studien, die die Wirkungen auf Kontroll-HT29-Marker-negative Zellen bezüglich einer 5-minütigen Exposition auf verschiedene Konzentrationen des freien RA (leere Quadrate, [Fig. 7B](#)), des 2'-RA-NRAN01 (gefüllte Quadrate, [Fig. 7B](#)) oder des 13'-RA-NRAN01 (gefüllte Dreiecke, [Fig. 7B](#)) untersuchen, wie oben bezüglich der [Fig. 7A](#) beschrieben; jedoch wurden in den vorliegenden Experimenten die Zellen für eine 16–18-stündige Erholungsperiode inkubiert (d. h. über Nacht; o/n) bevor der Test der Proteinsynthese in einem 4-stündigen ^3H -Leucin-Proteinsynthese-Assay durchgeführt wurde. Die Ergebnisse werden in einer ähnlichen Weise dargestellt, wie jene oben in [Fig. 7A](#).

[0254] Die Ergebnisse, die in den [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) dargestellt sind, zeigen jeweils von RA, 2'-RA-HS-NR-AN-01 und 13'-RA-HS-NR-AN-01 die kurzfristigen und langfristigen Wirkungen auf die Proteinsynthese durch die HT29-Kontrollzellen. Die Ergebnisse zeigen eine Inhibierung des Dosisansprechverhaltens der zellulären Proteinsynthese durch das freie Roridin A, aber nicht durch RA-NR-AN-01 in HT29-Zellen. Die Inhibierung, die durch RA während der 5-minütigen Inkubation ausgelöst wurde, äußerte sich noch nach der 16–18-stündigen Erholungsperiode ([Fig. 7B](#)). Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung von HT29-Zellen mit 2'-RA-HS-NR-AN-01 oder 13'-RA-HS-NR-AN-01, die keine Zielzellen waren, in keiner detektierbaren Inhibierung der Proteinsynthese. Daher scheinen diese Ergebnisse (im Gegensatz zu denen, die nach 24 Stunden erhalten wurden) einen überraschenden Spezifitätsgrad der in vitro-Wirkung der NR-AN-01-Konjugate nahezulegen, wenn die Behandlung mit einem 5-minütigen „Takt“ durchgeführt wurde. Es war jedoch auch möglich, dass das NR-AN-01-Konjugat inaktiv war, und deshalb wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um die Wirkung der Konjugate auf die Zielzellen zu bestimmen.

[0255] [Fig. 7C](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, welche die Effekte auf A375 m/m-Marker-positive Zellen der 5-minütigen Exposition auf zwei verschiedene Konzentrationen des freien RA untersuchen (leere Quadrate, [Fig. 7C](#)), des 2'-RA-NR-AN-01 (gefüllte Quadrate, [Fig. 7C](#)), oder des 13'-RA-NR-AN-01 (gefüllte Dreiecke, [Fig. 7C](#)) wie oben bezüglich der [Fig. 7A](#) beschrieben. In den vorliegenden Studien wurden die A375-Zellen für 5 Minuten im Testagenz inkubiert, gewaschen und für die Proteinsynthese über die nächsten 4 Stunden durch Zusatz von 0,5 mCi/ml ^3H -Leucin zum Kulturmedium getestet. Die Ergebnisse der Experimente werden in einer ähnlichen Weise wie die oben beschriebenen bezüglich der [Fig. 7A](#) dargestellt.

[0256] [Fig. 7D](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die die Wirkungen auf A375 m/ml-Mar-

ker-positive Zellen der 5-minütigen Exposition auch verschiedener Konzentrationen des freien RA untersuchen (leere Quadrate, [Fig. 7D](#)), des 2'-RA-NRAN01 (gefüllte Quadrate, [Fig. 7D](#)), des 13'-RA-NRAN01 (gefüllte Dreiecke, [Fig. 7D](#)) wie oben bezüglich der [Fig. 7B](#) beschrieben. In den vorliegenden Studien wurden die A375-Zellen für 5 Minuten im Testagenz inkubiert, gewaschen und dann der Kultur für eine 16–18-stündige Erholungsperiode zurückgegeben (d. h. über Nacht; o/n-Erholung), nach welcher Zeit die Proteinsynthese während eines 4-stündigen ^3H -Leucin-Proteinsynthese-Assays ausgewertet wurde. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in einer ähnlichen Weise beschrieben wie jene oben bezüglich der [Fig. 7A](#).

[0257] Die Ergebnisse, die in den [Fig. 7C](#) und [Fig. 7D](#) dargestellt sind, zeigen jeweils die kurzfristigen und langfristigen Wirkungen von RA, 2'-RA-HS-NR-AN-01 und 13'-RA-HS-NR-AN-01 auf die Proteinsynthese durch A375-Zielzellen. Die Behandlung der Zielzellen sowohl mit dem therapeutischen 2'- oder 13'-RA-NR-AN-01-Konjugat resultierte in einer kurzfristigen Inhibierung der Proteinsynthese, d. h. unmittelbar nach der 5-minütigen getakteten Behandlung beobachtet ([Fig. 7C](#)). Wird dieser Befund mit den Befunden in [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) kombiniert, kann vermutet werden, dass die RA-NR-AN-Konjugate aktiv und dass sie spezifische Inhibitoren für Zielzellen waren, aber nicht für die Zellen, die keine Zielzellen waren. Interessanterweise wurden keine langfristigen Inhibitoreffekte beobachtet, wenn die „Takt“-behandelten Zielzellen in die Kultur zurückgegeben wurden ([Fig. 7D](#)). Die Ergebnisse, die in den [Fig. 7C](#) und [Fig. 7D](#) dargestellt sind, zeigen wieder, dass Roridin A ein nichtspezifischer Inhibitor für Testzellen ist (d. h. in einer Art ähnlich zu [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#)) und dass seine Wirkung auf Zellen sich sogar noch nach einer 16–18-stündigen Erholungsperiode äußert. Deshalb scheinen diese spezifischen Wirkungen der RA-NR-AN-01-Konjugate auf Zielzellen während der „Takt“-Behandlung eine Eigenschaft des NR-AN-01-Bindungsproteins zu sein.

[0258] Die Ergebnisse, die mit arteriellen BO54-Zellen der glatten Muskulatur erhalten wurden, waren ähnlich zu jenen, die mit den A375-Zellen erhalten wurden, wie oben dargestellt, d. h. freies Roridin A zeigte im kurzfristigen Bereich eine Inhibierung des Dosisansprechverhaltens der Proteinsynthese, gleichgesetzt mit 60%, 66% und 90% der Kontrolle bei 200 ng/ml, 100 ng/ml und 50 ng/ml; und im langfristigen Bereich waren die Effekte auf die Proteinsynthese gleichgesetzt mit 27%, 46% und 98% der Kontrolle bei den gleichen Dosismengen. Im Gegensatz dazu zeigten 2'- oder 13'-RA-NR-AN-01 nur eine 10–20%ige Inhibierung für kurz- bzw. langfristige Wirkungen auf die Proteinsynthese (d. h. > 80% der Kontrolle).

[0259] Deshalb zeigen die Ergebnisse einen kurzfristigen spezifischen reversiblen Effekt der Roridin-A-konjugierten NR-AN-01 auf Zielzellen, wenn sie in einer „Takt“-Behandlung zugeführt werden. Jedoch war es möglich, da nur die Proteinsynthese in diesen Experimenten bewertet wurde, dass die zelluläre metabolische Aktivität in den Zellen als ein Ergebnis der „Takt“-Behandlung beeinträchtigt wurde. Daher wurden zusätzliche Studien durchgeführt, in denen die zelluläre Metabolitaktivität einer „Takt“-Behandlung folgend bewertet wurde.

Wirkungen nach 5-minütiger Exposition: Metabolit-Aktivität

[0260] MTT-Assays wurden nach 48 Stunden durchgeführt, wobei die Zielzellen und die Zellen, die keine Zielzellen waren, den RA- oder RA-NR-AN-01-Konjugaten 5 Minuten lang exponiert waren. Zielzellen in diesen Studien beinhalteten BO54- und A375-Zellen, und Zellen, die keine Zielzellen waren, beinhalteten HT29-Zellen. Sterile Mikrotiterplatten mit 96 Aufzuchtnäpfen wurden mit 2500 Zellen/Napf besät, in Aluminiumfolie gehüllt und in einer Feuchtigkeitskammer, die 5% CO_2 /95% Luft enthielt, 16–18 Stunden lang inkubiert. Aufeinanderfolgende zweifache Verdünnungen von Roridin A (RA), 2'-RA-HS-NR-AN-01 und 13'-RA-HS-NR-AN-01 wurden aus 400 ng/ml bis 780 pg/ml hergestellt und 100 ml Aliquote der Verdünnungen in doppelte Näpfe gegeben. Nach einer 5-minütigen Exposition zu den Testproben wurden die Zellen gewaschen, um die Testproben zu entfernen, und frisches Medium wurde zugefügt. Den Zellen wurde vordem Test eine 48-stündige Erholung erlaubt: D. h. die Platten wurden 48 Stunden lang inkubiert und dann die zelluläre Metabolit-Aktivität durch Zusatz von 20 ml/Napf einer Lösung von 5 mg/ml MTT bestimmt. Die Platten wurden bedeckt, bei 37°C 4 Stunden Tang inkubiert und dann die Reaktion entwickelt, wie oben beschrieben (vgl. BEISPIEL 4, oben). Das dunkelblaue gelöste Formazan-Reaktionsprodukt wurde bei Raumtemperatur nach einer Inkubationszeit von 16–18 Stunden entwickelt. Die Proben wurden unter Verwendung eines ELISA-Mikrotiterplatten-Detektors bei einer Absorption von 570 nm quantifiziert.

[0261] [Fig. 8A](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, welche die Wirkungen auf BO54-Marken-positive Zellen der glatten Muskulatur einer 5-minütigen Exposition der verschiedenen Konzentrationen des Roridin A (leere Quadrate, [Fig. 8A](#)), 2'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-2'RA; gefüllte Rauten, [Fig. 8A](#)) oder 13'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-13'RA; gefüllte Quadrate, [Fig. 8A](#)). Die Experimente wurden in einer ähnlichen Weise wie jene durchgeführt, die oben bezüglich der [Fig. 7A](#) beschrieben sind, aber die Metabolitaktivität wur-

de unter Verwendung eines MTT-Assay durchgeführt, d. h. eher als die Proteinsynthese wie in [Fig. 7B](#) und den Zellen wurde eine 48-stündige Erholungsperiode erlaubt (im Gegensatz zu den 24 Stunden wie in [Fig. 7B](#)). Die Ergebnisse der Experimente sind in einer ähnlichen Weise wie jene beschrieben bezüglich der [Fig. 7A](#) (oben).

[0262] [Fig. 8B](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die die Wirkungen auf A375 m/m-Marker-positive Zellen einer 5-minütigen Exposition auf verschiedene Konzentrationen des Roridin A untersuchen (leere Quadrate, [Fig. 8B](#)), des 2'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-2'RA; gefüllte Rauten, [Fig. 8B](#)), 13'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-13'RA; gefüllte Quadrate, [Fig. 8B](#)). Die Experimente wurden in einer ähnlichen Weise wie sie oben in Bezug auf [Fig. 8A](#) beschrieben ist durchgeführt (und die Ergebnisse auch so dargestellt).

[0263] [Fig. 8C](#) zeigt grafisch die Ergebnisse der in vitro-Studien, die die Wirkungen auf HT29-Marker-negative Zellen der 5-minütigen Exposition auf verschiedene Konzentrationen des Roridin A untersuchen (leere Quadrate, [Fig. 8C](#)), 2'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-2'RA; gefüllte Rauten, [Fig. 8C](#)), 13'-RA-NR-AN-01 (NRAN01-13'RA; gefüllte Quadrate, [Fig. 8C](#)). Die Experimente wurden in einer ähnlichen Weise wie sie oben bezüglich der [Fig. 8A](#) beschrieben ist durchgeführt (und die Ergebnisse auch so dargestellt).

[0264] Die Ergebnisse, die in den [Fig. 8A–Fig. 8C](#) dargestellt sind, zeigen leichte Unterschiede zwischen den verschiedenen RA-NR-AN-01-Konjugaten bei den höchsten Dosierungen, aber bei den niedrigeren Dosierungen inhibierten die zwei 2'- und 13'-RA-NR-AN-01-Konjugate die Metabolitaktivität der Zielzellen (d. h. BO54- und A375-Zellen) oder der Zellen, die keine Zielzellen waren (d. h. HT29-Zellen) über den langfristigen Bereich (d. h. 48 Stunden) nicht in signifikanter Weise. Deshalb lassen die Ergebnisse vermuten, dass die kurzfristige Inhibierung der Proteinsynthese der Zielzellen ([Fig. 7C–Fig. 7D](#), oben) nicht in einem langfristigen Metaboliteffekt auf die Zellen resultiert, wie in den MMT-Assays messbar. Dass diese Assays in der Lage waren, Metabolitänderungen zu detektieren, die aus der 5-minütigen Exposition resultierten, wird durch die Ergebnisse bewiesen, die mit freiem Roridin A erhalten wurden. In diesem Fall war das freie Roridin A ein nicht-spezifischer Inhibitor auf die Zielzellen und auf die Zellen, die keine Zielzellen waren, sogar wenn die Zellen dem Agens nur für 5 Minuten exponiert und dann in die Kultur für eine 48-stündige Erholungsperiode zurückgegeben wurden ([Fig. 8A–Fig. 8C](#)).

[0265] Deshalb lassen die Befunde mit freiem Roridin A vermuten, dass das MTT-Assay in der Lage war, Metabolitveränderungen zu detektieren, die während einer 5-minütigen Exposition induziert wurden. Wenn man diese Befunde zusammenfasst, lässt dies vermuten, dass RA-NR-AN-01-Konjugate spezifisch die Aktivität der Zielzellen inhibieren können (d. h. die Proteinsynthese), wenn sie in einer „Takt“-Behandlung verabreicht werden, und dass diese Wirkungen reversibel waren ohne signifikante langfristige Wirkungen weder auf die Proteinsynthese noch auf die zelluläre Metabolitaktivität (wie sie in einem MMT-Assay gemessen wurde). Diese in vitro-Eigenschaften der RA-NR-AN-01-Konjugate wurden als hochverwendbar für die Inhibierung der Zellaktivität der glatten Muskulatur in vivo bewertet. Deshalb wurden als Nächstes Studien an Tiermodellen durchgeführt, um die Wirkungen dieser therapeutischen Konjugate in vivo zu bewerten.

BEISPIEL 6

Bestimmung der Infusionsbedingungen in einem Tiermodell

[0266] Die therapeutischen Konjugate, wie sie hierin beschrieben werden, sind verwendbar zur Inhibierung der Stenose, die einem vaskulären Trauma oder einer Erkrankung folgt. In einem illustrativen Beispiel wird dieses vaskuläre Trauma, das während einer Angioplastie induziert wird, während der chirurgischen Prozedur durch Entfernung des Katheters, der verwendet wird, um die Angioplastie durchzuführen, behandelt, und ein Ballon-Infusionskatheter wird in das Gefäß eingeführt. Der Infusionskatheter wird zwischen der Einträufelungsöffnung (oder alternativ dazu ein durchlässiger Membranbereich) in der traumatisierten Fläche des Gefäßes angebracht, und dann wird Druck angewendet, um das therapeutische Konjugat einzuführen. Beispielsweise kann ein Infusionskatheter mit zwei Ballons verwendet werden, und wenn ein Ballon auf beiden Seiten des traumatisierten Ortes aufgebläht wird, wird ein fluider Raum erzeugt, der mit einer geeigneten Infusionsflüssigkeit gefüllt werden kann, die das therapeutische Konjugat enthält. Es ist kürzlich berichtet worden, dass die Infusion eines Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Marker-Enzyms bei einem Druck von 300 mm Hg für eine Zeitspanne von 45 Sekunden in koronaren Arterien von Hunden oder Menschen in einer Penetration des HRP in die Gefäßwand resultierte (Goldman et al., oben). Jedoch ist das HRP ein kleineres Molekül als NR-AN-01 und koronare Arterien von Menschen und Hunden sind auch beträchtlich kleiner als die Halsschlagadern oder die Oberschenkelarterien im vorliegenden Hausschwein-Modellsystem. Experimente wurden deshalb durchgeführt um in einem Hausschwein-Modellsystem die Infusionsbedingungen zu bestimmen, die für die Zuführung

eines therapeutischen Konjugats zu den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in Halsschlagadern oder Arterien in Oberschenkeln geeignet sind. Die Zuführungsbedingungen wurden durch Bestimmung der Penetration des therapeutischen Konjugats in die vaskuläre Wand und durch die spezifische Bindung des therapeutischen Konjugats an die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in der Gefäßwand überwacht.

[0267] Unter Verwendung eines Infusionskatheters wurden Herz- und Oberschenkelarterien von Hausschweinen oder nicht-menschlichen Primaten mit NR-AN-01 während einer Zeitspanne von 45 Sekunden bis 3 Minuten bei verschiedenen Drücken im Bereich von ungefähr 0,4 Atmosphären (300 mm Hg) bis 3 Atmosphären infundiert. Nach der Infusion wurden die Gefäße mit steriler Salzlösung gespült und für die Immunohistochemie unter Verwendung von HRP-konjugierter Ziegen-anti-Maus-IgG vorbereitet, um das NR-AN-01-Maus-IgG in der Gefäßwand zu detektieren. Es wurde festgestellt, dass die vollständige Penetration des NR-AN-01 in diese Gefäßwandungen bei einem Druck von 3 Atmosphären nach 3 Minuten erreicht wurde.

[0268] Die Immunohistologie wurde gleichfalls verwendet, um herauszufinden, welche Tiermodellsysteme das Zielantigen für NR-AN-01 exprimierten. Vaskuläre Gewebeabschnitte aus leicht verfügbaren experimentellen tierischen Spezies wurden der NR-AN-01 ausgesetzt, gewaschen und mit HRP-konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG reagiert. Es wurde gefunden, dass nur nicht-menschliche Primaten und Schweine das 250 kD-NR-AN-01-Zielantigen mit dem Menschen teilen.

[0269] Um zu bestimmen, ob das NR-AN-01 in einer spezifischen Art und Weise an sein Zielantigen in vivo gebunden werden kann, wurden die koronaren Arterien und Oberschenkelarterien von Hausschweinen mit therapeutischen Konjugaten unter Verwendung eines Infusionskatheters infundiert, die Infusionsorte wurden mit steriler Salzlösung gewaschen, die chirurgischen Orte dann verschlossen und die Tiere für zusätzliche 3–5 Tage am Leben gehalten. Am Ende dieser Zeit wurden die Bereiche der vaskulären Infusion herausgeschnitten und für die Immunohistologie präpariert, wobei noch einmal das Ziegen-anti-Maus-IgG verwendet wurde, um das NR-AN-01 zu identifizieren. NR-AN-01 wurde in der Gefäßwand der Herz- und Oberschenkelarterien des Schweines 3–5 Tage nach dem chirurgischen Eingriff identifiziert und es schien so, dass das NR-AN-01 nur mit den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur verknüpft war. Diese Befunde lassen vermuten, dass das NR-AN-01 dazu in der Lage ist, in vivo spezifisch an sein Zielantigen zu binden.

BEISPIEL 7

In vivo-Inhibierung der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur

[0270] Das Wachstum der intimalen glatten Muskulatur, die auf ein Trauma folgt, die durch die Behandlung mit einem Ballonkatheter verursacht wurde, stellt ein gutes Modell dar, die therapeutische Wirksamkeit der Konjugate zur Inhibierung der Zellaktivität der glatten Muskulatur in vivo als Ansprechverhalten auf ein vaskuläres Trauma zu untersuchen, einschließlich der Restenose, die auf eine Angioplastie folgt. Es wurden Hausschweine verwendet, um die Wirksamkeiten von NR-AN-01 zu studieren (d. h. dass ein bestimmtes bindendes Protein der vaskulären glatten Muskulatur oder einfach VSMBP in diesen Studien verwendet wurde; therapeutische Konjugate mit Roridin A werden als VSMBP-RA bezeichnet). Die Begebenheiten, die normalerweise einer Angioplastie mit einem Ballon in der Schweinearterie folgen, wurden kürzlich beschrieben (Steele et al., *Circ. Res.*, 57: 105–112 (1985)). In diesen Studien resultierte die Erweiterung der Halsschlagader unter Verwendung eines überdimensionierten Ballons (Ballon:Arterien-Verhältnis ungefähr 1,5:1) in einer kompletten endothelen Abtragung über ein Gebiet im Umfang von 1,5–2 cm. Obwohl dieser Umfang der traumatischen Verletzung in einem Versuch ausgewählt wurde, um die Thrombose zu minimieren, trat immer noch eine merkliche Ablagerung von Blutplättchen und eine Thrombusbildung ein. Die Prozedur resultierte gleichfalls in einer Zerlegung durch die internalen elastischen Lamina im arteriellen Medium und in Nekrose der medialen Zellen der glatten Muskulatur. Intimale Verdickung als Folge des Wachstums der glatten Muskulatur war 7 Tage nach der Verletzung offensichtlich und erreichte eine durchschnittliche maximale Dicke von 85 µm nach 14 Tagen. Das histologische Auftreten dieser Neointima ist der Proliferation des neointimalen Gewebes der Restenose sehr ähnlich (Schwartz et al., *Circ.*, 82: 2190–2200 (1990)).

[0271] Ein Testprotokoll mit einer Einzeldosis wurde bei Hausschweinen mit NR-AN-01-Roridin A-Konjugaten durchgeführt. Lokale Verabreichung der Testkonjugate, d. h. durch einen Katheter in das Gebiet des traumatisierten Gefäßes, begrenzt durch notdürftige Slip-Ligaturen, wurde ausgeführt, um die systemische Toxizität zu reduzieren, während gleichzeitig ein hohes Expositionslevel für die Zielzellen der glatten Muskulatur ermöglicht wurde. Dieser intra-arterielle Weg der Verabreichung in Tiermodellstudien simuliert den vermuteten Weg in menschlichen koronaren Arterien. Das Testprotokoll wurde als ein ursprüngliches in vivo-Screening der int-

ra-arteriellen, ortsspezifischen, mit einem Katheter verabreichten Konjugate des bindenden Proteins der vasculären glatten Muskulatur ausgeführt.

[0272] Die Toxizität des freien Arzneimittels wurde gleichfalls beurteilt, d. h. die patho-biologischen Wirkungen auf die arteriellen Zellen der glatten Muskulatur. Die therapeutisch wirksame Dosis des Roridin A-NR-AN-01-Konjugats wurde durch in vitro-Studien bestimmt, und der geeignete intra-arterielle Verabreichungsdruck durch Verabreichung der freien MAb's und MAb-Konjugate an Tieren bestimmt, wie oben in Beispiel 7 beschrieben.

[0273] Sechs durch Kreuzung erzeugte Hausschweine (Duroc X), die der Nahrung entwöhnt waren und ungefähr 30 Pfund Körpergewicht hatten, wurden in diesem Experiment verwendet. Die Tiere wurden willkürlich der folgenden Behandlung zugeordnet, wobei jedes Schwein vier verschiedene Behandlungen bekam, die zwischen der rechten und linken Halsschlagader und den Adern der Oberschenkel aufgeteilt waren, von denen eine eine PBS-Kontrolle war (Tabelle 1–3, unten).

Tabelle 1

GRUPPE NO.	BEHANDLUNGSGRUPPE	MATERIALBESCHREIBUNG
1	KONTROLLE, VSMBP	VSMBP, 200 µg/ml in PBS, pH 6,5
2	KONTROLLE, PBS	PBS, pH 6,5, in sterilisiertem Injektionswasser
3	KONTROLLE, ARZNEIMITTEL	Roridin A, 2,5 µg/ml in PBS, pH 6,5
4	TEST, KONJUGAT	VSMBP-RA2' (200 µg/ml VSMBP & 2,5 µg/ml RA)
5	TEST, KONJUGAT	VSMBP-RA13' (200 µg/ml VSMBP & 3,1 µg/ml RA)
6	TEST, KONJUGAT + RA	VSMBP-RA2' (200 µg/ml VSMBP & 2,5 µg/ml RA) PLUS freies Roridin A (2,5 µg/ml)
7	TEST, KONJUGAT + RA	VSMBP-RA13' (200 µg/ml VSMBP & 3,1 µg/ml RA) PLUS freies Roridin A (2,5 µg/ml)

Chirurgische Prozedur:

[0274] Testkonjugate und Kontrollverbindungen wurden als eine intra-arterielle Einzelinfusion am Orte des abgetragenen Endothels und des Traumas, das durch einen Ballonkatheter erzeugt worden war, verabreicht. Sowohl die Halsschlagadern als auch die Oberschenkelarterien wurden über 1 cm bis 2 cm des Endothels durch eine intraluminal Passage eines 23 cm-, Größe 3 (Oberschenkel) und Größe 4 (Halsschlagader) Uresil-Vascu-Flo®-Silikonokklusions-Ballonkatheters (Uresil Technology Center, Skokie, IL) abgetragen, wobei diese genügend mit Salzlösung gedehnt waren, um einen geringen Widerstand zu erzeugen. Diese Technik erzeugte eine leichte Dehnung der Arterie. Auf diese Behandlung folgend wurden proximale und distale Slip-Ligaturen, 3-0-Seide, nahe der Enden der abgetragenen Fläche plziert, und ein French-Infant-Feeding-Katheter, Größe 8, (Cutter-Resiflex, Berkeley, CA), das an eine Inflation Pro®(USCI, C. R. Bard, Inc., Billerica, MA)-Druckspritze befestigt war, wurde dazu verwendet, die Testkonjugate und Kontrollverbindungen direkt in das abgetragene Segment bei einem Druck von 3 Atmosphären 3 Minuten lang zu applizieren. Die Slip-Ligaturen wurden nach der 3-minütigen Expositionsdauer entfernt und der arterielle Blutfluss wieder hergestellt. In diesen Studien wurden Verästelungen der Oberschenkel- oder Halsarterien mit 00-Seidennaht vernäht, wie es erforderlich war, um die Druckinfusion in dem behandelten Gebiet zu erhalten. Die größte distale Verästelung der Oberschenkelarterie (die Saphenus-Arterie) wurde eingeschnitten und als Einführungsort für die Katheter verwendet, die dann durch die Hauptarterie des Oberschenkels geführt wurden. Dieser Prozedur der Applizierung des Katheters der Hauptarterie des Oberschenkels folgend, wurden die sekundären Verzweigungen abgebunden. In diesen Fällen wurde das Abbinden oder das Einschnneiden dazu verwendet, den Einlass der Katheter zu gewährleisten, und die Öffnung wurde dann mit 3 bis 4 Nähten eines 5-0-Monofilament-Polybutylen verschlossen (Novafil, D & G Monofil Inc., Monati, PR).

Folgeprozeduren:

[0275] Im Anschluss an den chirurgischen Eingriff wurden die Schweine während der Quarantäne und der chirurgischen Erholungsperioden in 3 × 5-Fuß-Innengehegen mit Zementböden gehalten. Sie wurden dann vor

dem Sammeln von Geweben für die Histologie für die Heilungsperiode fünf Wochen lang in Innen-/Außen-Pferchen gehalten.

[0276] Die Tiere erholten sich normalerweise vom chirurgischen Eingriff mit keinerlei Anzeichen der Hämorrhagie oder Entzündung an den Orten des chirurgischen Eingriffs. Alle sechs wurden 5 bis 6 Tage nach der Behandlung mit einem Doppler-Stethoskop untersucht und in jedem der Tiere waren alle Arterien offenliegend. Nach der Behandlung zeigten alle Tiere normalen Appetit, Aktivität und Gewichtszunahme.

Großpathologie und histologische Beurteilung:

[0277] Fünf Wochen nach der Traumatisierung und der Behandlung der Arterien wurden die Tiere mit 0,6 ml Telazol® (Tiletamin-Hydrochlorid; A. H. Robins Co., Richmond, VA) und 0,5 ml Xylazin (Lloyd Laborstories, Shenandoah, IA) pro 30 Pfund Körpergewicht durch intramuskuläre Injektion sediert, heparinisiert (i. v. 2 ml Natriumheparin, 1000 Einheiten/ml) und durch i. v. Pentobarbital euthanisiert. Sowohl die rechten und linken Halsschlagadern und Oberschenkelarterien wurden mit den normalen Blutgefäßen entfernt, die sowohl proximale wie auch distale Blutgefäße in der Nachbarschaft des behandelten Segments enthielten. Die Arterien wurden gemessen und der Ort der Ligaturen und grobe Abnormalitäten notiert. Die Arterien wurden in Abständen von 2 mm durchschnitten und in gekühlte Formen mit O. C. T. (optimale Schnitttemperatur, optimum cutting temperature)-Verbindung (Tissue Tek®, Miles Laborstories Inc., Elkhart, IN) eingeordnet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Blöcke wurden bei 5 Mikron seziiert und mit H & E, Massons Trichrome und Movats Pentachrome für morphologische Studien angefärbt. Die Schnitte wurden gleichfalls für das immunohistologische Anfärben der vaskulären glatten Muskulatur verwendet.

[0278] Die histologische Überprüfung der schrittweisen Sektionen der Arterien erbrachte eine bemerkenswerte Inhibierung der Proliferation der intimalen glatten Muskulatur in den traumatisierten Bereichen, die mit RA-NR-AN-01-Konjugaten (Tabelle 2) behandelt worden waren. Diese Inhibierung war sogar unter einer grob-förmigen Beurteilung der Gefäße offensichtlich. Die Inhibierung der Proliferation der Zellen der intimalen glatten Muskulatur wurde mit minimalem oder überhaupt keinem histologischen Anzeichen des Absterbens der Zellen der glatten Muskulatur in der Gewebewand erzeugt. Eine Querschnittssection einer solchen traumatisierten Arterie wird in den [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2

INTIMALE PROLIFERATION DER GLATTEN MUSKULATUR IN TRAUMATISIERTEN UND BEHANDELTEN SCHWEINEARTEN

BEHANDLUNG	NR. DER BEURTEILTEN ARTERIE	INTIMALE SMC-HYPERTROPHIE* Durchschnitt (Bandbreite)
Kontrolle, MAB	4	3,75(3–4)
Kontrolle, PBS	4	4(4)
Kontrolle, RA	2	4(4)
Test, 2'RA		
(Hoher Druck)	1	1(1)
(Niedriger Druck)	1	3(3)
Test, 13'RA		
(Hoher Druck)	1	1(1)
(Niedriger Druck)	1	1(1)

* Intimale SMC-Hypertrophie: Intimale Zellhypertrophie der glatten Muskulatur, die auf einer Skala von 1+ (minimal) bis 4+ (maximal) ausgewertet wurde.

[0279] Die Resultate, die in [Fig. 9A](#) präsentiert werden, zeigen (bei 160-facher Vergrößerung) einen Querschnitt einer unbehandelten Arterie 5 Wochen nach der Angioplastie. Vorherrschende histologische Merkmale der Arterie beinhalten das Ablösen des Endothels (vgl. No. 1 in [Fig. 9A](#)) weg von den internalen elastischen Lamina (vgl. No. 2, [Fig. 9A](#)), offensichtlich als Folge der Proliferation der intimalen glatten Muskulatur (vgl. No. 3, [Fig. 9A](#)).

[0280] Die Ergebnisse, die in [Fig. 9B](#) dargestellt sind, zeigen (bei 160-facher Vergrößerung) einen Querschnitt einer behandelten Arterie 5 Wochen nach der Angioplastie und der Infusion des theapeutischen RA-NR-AN-01-Konjugats. Das Gefäß in diesem Schnitt war größeren mechanischen Belastungen ausgesetzt

als das Gefäß, das in [Fig. 9A](#) gezeigt wird, mit zahlreichen Stellen, an denen die externe elastische Membran zerrissen war; es wurde eine damit verbundene Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur in den äußeren Schichten der Media beobachtet (d. h. vgl. No. 4 in [Fig. 9B](#)). Die Behandlung mit dem therapeutischen Konjugat inhibierte die intimale Hypertrophie, wie es durch das Fehlen der Ablösung des Endothels (vgl. No. 1, [Fig. 9B](#)) von den internalen elastischen Lamina (vgl. No. 2, [Fig. 9B](#)) bewiesen wurde. Überraschenderweise wurde dieser Inhibierungseffekt auf die Zellen der intimalen glatten Muskulatur ohne die Inhibierung der Hypertrophie der Zellen der medialen glatten Muskulatur in den Gebieten bewerkstelligt, in denen die externe elastische Membran zerrissen war (vgl. No. 4, [Fig. 9B](#)).

[0281] Dies ist ein äußerst günstiges Ergebnis, da die Wundheilung im behandelten Gefäß ohne die nachteiligen Konsequenzen der intimalen Hyperplasie und Stenose oder Nekrose der Zellen der glatten Muskulatur in der Media erfolgt.

[0282] In diesen histologischen Studien wurden gleichfalls Vergleiche bezüglich der Wirksamkeit sowohl der 2'- und der 13'-Roridin A-Konjugate gezogen mit dem Ergebnis, dass das 13'-Konjugat (d. h.

[0283] 13'-RA-HS-NR-AN-01) aktiver in der Inhibierung der intimalen Hyperplasie der Zellen der glatten Muskulatur zu sein schien als das 2'-Konjugat (d. h. 2'-RA-HS-NR-AN-01). In dieser Studie schien die Niederdruck-Infusion des 13'-Konjugats die Proliferation der glatten Muskulatur effektiver zu inhibieren als die Hochdruck-Infusion, und das 13'-Konjugat schien auch effektiver zu sein als das 2'-Konjugat.

[0284] In [Fig. 9B](#) resultierte das therapeutische Konjugat, das an der Stelle der Angioplastie verabreicht wurde, in einer ungefähr 95%igen Inhibierung der Hypertrophie der glatten Muskulatur, welche das Lumen des unbehandelten Gefäßes ([Fig. 9A](#)) begrenzte. Das therapeutische Konjugat zeigte in signifikanter Weise seine Wirkungen auf die Zellen der glatten Muskulatur durch Wanderung aus den medialen Schichten der glatten Muskulatur in die Intima, ohne weder das Endothelium zu beeinflussen noch irgendwelche Anzeichen von Nekrose (d. h. Abtötung von Zellen) in den Zellen der glatten Muskulatur in den medialen Schichten der Arterienwand zu erzeugen. Die Studien konnten auch keinerlei histologische Anzeichen einer mononuklearen Infiltration oder Fibrose zeigen, wie sie aus toxischen Effekten auf die Gefäßwand resultieren könnten. Es wurden auch sichtbare Anzeichen der Heilung in den intimalen Schichten der behandelten Gefäße zusammen mit dem Wiederwachstum des Endothels beobachtet, d. h. dass endothele Zellen über die dünne Schicht der Zellen der glatten Muskulatur in der Intima wuchsen, welche zwischen dem Endothel und den internalen elastischen Lamina liegt (d. h. No. 1 und No. 2, [Fig. 9B](#)). Diese kombinierten histologischen Beobachtungen lassen die hochwünschenswerten Merkmale der Wundheilung, des Wiederwachstums des Endotheliums und der verbesserten vaskulären Festigkeit vermuten, die auf eine Behandlung mit einem therapeutischen Konjugat folgen, welches die Hyperplasia der glatten Muskulatur in den intimalen Schichten des Gefäßes inhibiert.

BEISPIEL 8

In vitro-DNA-Inhibierung der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur und Proteinsynthese-Inhibierung

[0285] Es wurde die Fähigkeit verschiedener Agenzien getestet, die DNA-Synthese und Proteinsynthese in Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren. ³H-Leucin- und ³H-Thymidin-Aufnahme und Zytotoxizitäts-Assays wurden in Übereinstimmung mit den folgenden Protokollen durchgeführt.

[0286] ³H-Leucin-Wiederaufnahme einer 5-minütigen Exposition: Zellen der vaskulären glatten Muskulatur wurden mit einer Konzentration von 40.000 Zellen/ml in sterile Platten mit 24 Näpfen zu 1 ml/Napf gesät. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luft in einer feuchten Atmosphäre (gesättigt) inkubiert. Logarithmische Verdünnungen des interessierenden therapeutischen Wirkstoffes wurden mit den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur für 5 Minuten oder 24 Stunden lang inkubiert. Proben der therapeutischen Wirkstoffe wurden in DMEM:F-12-Medium (Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryville) mit 5% fötalem Rinderserum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) und 5% Serum Plus (JRH Biosciences, Lenexa, KS) verdünnt. Der Inkubation des therapeutischen Wirkstoffes folgend wurde die Lösung aspiriert und 1 ml/Napf des 0,5 Mikrocurie/ml ³H-Leucins in Leucin-freiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 5% Serum Plus® zugefügt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre re-inkubiert. Die Zellen wurden durch Verwendung eines umgekehrten Mikroskops unter Verwendung einer Riefenskala visuell eingeteilt um die Sichtbarkeit und die Zellanzahl zu bestimmen. Die Größenordnung 1 bis 3 basiert auf dem prozentualen Anteil der Zellsichtbarkeit und der Zellanzahl verglichen mit den Kontrollnäpfen mit 3 = 100%, 2 = 70%–100% und 1 = 0%–70%. Ein Protokoll dieser Auswertung unterstützte die Bestimmung des unmittelbaren zytotoxischen Effekts der therapeutischen Agenzien. Das Medium wurde dann aspiriert und die Zellen wurden

zweimal mit kalter 5%iger TCA gewaschen. 400 Mikroliter 0,2 molarer Natronlauge wurden dann pro Napf zugefügt und die Platten zwei Stunden lang bei Raumtemperatur auf einer rotierenden Plattform inkubiert. 200 Mikroliter pro Napf der Zelllösung wurden dann in Szintillationsfläschchen aus Kunststoff überführt (Bio-Rad Laborstories) und 4 Milliliter des flüssigen Bio-Safe® II-Szintillationsfluids (Research Products InterCorp., Mount Prospect, IL) vor der Verwirbelung zugefügt. Die Fläschchen wurden auf einem Beckman LS2800 Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, der mit einer Beckman „Data Capture“-Software für die Konversion in ein Lotus 1-2-3®-File verbunden war, und unter Verwendung von Lotus 1-2-3® analysiert.

[0287] 5-minütige Exposition; ³H-Thymidin-Aufnahme: Die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur wurden in einem fertigen Medium mit 5% FBS (Gibco) über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten Umgebung mit 5% CO₂ in sterilisierten Platten mit 24 Näpfen inkubiert. Das Medium wurde aus den Näpfen aspiriert und das Serum-freie Medium mit Wachstumsfaktoren (DMEM:F-12 basales Medium supplementiert mit einem Cocktail von Wachstumsfaktoren, Katalog Nummer I1884, welcher Insulin (5 Mikrogramm/ml), Transferrin (5 Mikrogramm/ml) und Natriumselenit (5 Nanogramm/ml) enthielt, erhältlich von Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, enthält) wurde zugefügt. Die Zellen wurden in diesem Medium 24 Stunden lang inkubiert. Für eine 5-minütige Exposition des therapeutischen Wirkstoffes wurden logarithmische Verdünnungen der therapeutischen Agenzien mit den Zellen im fertigen Medium inkubiert. Nach 5 Minuten und der Aspiration des Mediums wurden 1 ml/Napf des 1,0-Mikrocurie/ml-³H-Thymidins zugefügt, das im fertigen Medium dispergiert war. Die 24-stündige Exposition beinhaltete die Inkubation der Zellen mit 1 ml/Napf des 1,0-Mikrocurie/ml-³H-Thymidins, welches im fertigen Medium dispergiert war, und logarithmische Verdünnungen des therapeutischen Agens, das getestet wurde. In beiden Expositionsversuchen wurden die Zellen dann über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten Umgebung mit 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden visuell auf ihre Sichtbarkeit und Zellanzahl beurteilt. Die Zellen wurden gewaschen und für die Überführung in Szintillationsfläschchen aus Kunststoff vorbereitet, wie für das ³H-Leucin-Protokoll beschrieben. Die Fläschchen wurden auf dem Beckman LS2800-Flüssigkeits-Szintillationszähler gezählt, welcher mit der Beckman „Data Capture“-Software für die Konversion in ein Lotus 1-2-3®-File zusammengeschlossen war und für die Analyse unter Verwendung von Lotus 1-2-3®.

[0288] Diese Protokolle waren für die Verwendung mit anderen Populationen an Zielzellen zugänglich, besonders für einschichtige anhaftende Zelltypen.

[0289] Morphologische cytotoxische Evaluations-getaktete-Exposition: Zellen der vaskulären glatten Muskulatur wurden in einer Konzentration von $4,0 \times 10^4$ Zellen/ml Medium/Napf auf einem kommerziell vorbereiteten Objektträger mit 4 Näpfen gesät (Nunc, Inc., Naperville, Illinois). Es wurden genügend Objektträger besiedelt um zwei getaktete Expositionsdauern (5 Minuten und 24 Stunden) und vorgeschriebene Inkrement-Auswertungspunkte (24 Stunden bis 128 Stunden) zu ermöglichen. Alle Objektträger wurden in Duplikat untersucht um irgendwelche Assay-Anomalitäten aufzudecken. Der therapeutische Wirkstoff wurde dann im gleichen Medium verdünnt, das für die ³H-Leucin- und ³H-Thymidin-Assays verwendet wurde. Jeder Objektträger mit 4 Näpfen wurde dann bezüglich der minimalen wirksamen Konzentration (Napf „C“) mit einer logarithmisch größeren Konzentration (Napf „B“) und einer logarithmisch niedrigeren Konzentration (Napf „D“) versehen, wie sie durch die ³H-Leucin- und ³H-Thymidin-Assays, wie oben beschrieben, bestimmt worden waren. Als Kontrolle für die normale Morphologie wurde ein Napf (Napf „A“) unbehandelt gelassen (nur Medium). Die Inkubation fand bei 37°C in einem 5% CO₂ enthaltenden und befeuchteten Inkubator statt. Nach jedem der zwei Expositionspunkte (5 Minuten und 24 Stunden) wurde das Wirkstoffmedium aus jedem Napf einschließlich dem unbehandelten Napf aspiriert. Ein Milliliter frischen Mediums wurde dann zugefügt um das aspirierte Medium zu ersetzen. Es folgte Re-Inkubation bis jeder der inkrementierten Bewertungspunkte erreicht wurde. An diesen Punkten wurde das Medium aspiriert und nachfolgend mit 1 ml 10%igen neutral-gepufferten Formalins für eine Stunde ersetzt, um eine geeignete Fixierung zu ermöglichen. Die fixierten Objektträger wurden dann mit Hematoxylin (nuklear) und Eosin (zytoplasmisch) für die morphologische Bewertung und Einordnung angefärbt.

Ergebnisse:

[0290] Die Ergebnisse des 24-stündigen ³H-Leucin-Protein-Inhibierungs-Assays und des 24-stündigen ³H-Thymidin-DNA-Syntheseinhibierungs-Assays werden jeweils in den [Fig. 10A–Fig. 10D](#) für Suramin, Staurosporin, Nitroglycerin, und Cytochalasin B gezeigt. Alle diese getesteten Verbindungen zeigten einen verfügbaren therapeutischen Bereich (die Fläche unter der Kurve des ³H-Leucin-Assays ist größer als die, die aus dem ³H-Thymidin-Assay resultiert), was die Verwendbarkeit in der Ausübung der Ausführungsformen der Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung zeigt. Was noch typischer ist, so inhibierten die Verbindungen die Fähigkeit der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur, DNA-Synthese in Anwesenheit von 5% FBS in einem größeren Maß einzugehen, als sie die Proteinsynthese der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur hemmten. Die Inhibitoreffekte auf die Protein- und DNA-Synthese des Suramins, Staurosporins, Nitroglycerins und Cytochalasin B

während einer 5-minütigen und 24-stündigen getakteten Exposition werden jeweils in den [Fig. 10A–D](#) gezeigt.

BEISPIEL 9

Spezifische Bindung und Internalisierung von gezielten Partikeln durch die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur

[0291] Die Fähigkeit der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur, Partikel zu binden und zu internalisieren, die mit bindendem Protein oder Peptid beschichtet sind, wurde mit monoklonalem Antikörper(NR-AN-01)-beschichteten Goldkügelchen sowohl in vitro wie auch in vivo gezeigt.

[0292] Die Gewebekulturen der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (BO54), eine Antigen-positive Zelllinie zur Kontrolle (A375) und eine Antigen-negative Zelllinie zur Kontrolle (HT29) wurden mit 10 nm Goldkügelchen inkubiert, wobei eine Gruppe mit NR-AN-01 beschichtet war, und mit einer zweiten unbeschichteten Kontrollgruppe. Die Zellen wurden den Kügelchen als Monoschicht- und Zellsuspensions-Kulturen ausgesetzt und dann zu sechs Zeitpunkten (d. h. nach 1 Minute, 5 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 24 Stunden) zur Bindung und Internalisierung durch Elektronenmikroskopie überprüft.

[0293] Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Experiments, welches anzeigt, dass die Bindung an die Zelloberfläche spezifisch ist. Das relative Bewertungssystem, das durchgehend durch die Tabelle 3 verwendet wurde, stellt eine subjektive Bewertung der Bindung des Partikels dar, wobei 0 = keine, 1 = minimale, 2 = schwache, 3 = gemäßigte, und 4 = ausgeprägte Bindung bedeutet. Wenn die Aggregate der Partikel sich sowohl auf der Oberfläche der Monoschicht der Zellen der glatten Muskulatur und der Kontrollzellen ansiedelten wurden die Partikel nicht-spezifisch durch Makro- und Mikro-Phagocytose internalisiert. Wenn die Zellen in einer Zellsuspension gehalten wurden, war die nichtspezifische Internalisierung minimal oder fehlte. Die nicht-spezifische Anheftung der Goldkügelchen ohne NR-AN-01 an das Oberflächenmucin, welches durch HT29-Zellen hergestellt wurde, wurde beobachtet, wobei diese in einer gemäßigten nicht-spezifischen Internalisierung resultierte. Die Aufnahme der mit NR-AN-01 geladenen Goldkügelchen durch die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur war in den Zellsuspensionskulturen hoch spezifisch.

Tabelle 3

Zeit	Raster	Produkt	Zelllinie	Zelloberfläche	Primärvesikel Mikro-/Makro- Phagostase Pinocytose	Beschichte Vertiefung	Sekundär- vesikel	Lyosom	Golgi- apparat	Endoplas- misches Retikulum
Monoschicht der Zellen										
1 min	Aa	05(G)	A375	2	0	0	0	0	0	0
	Ba	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	C	05(G)	BO54	2	1	0	0	0	0	0
	Da	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Eb	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	F	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
5 min	Ac	05(G)	A375	4	1	0	0	0	0	0
	Bb	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Ca	05(G)	BO54	3	0	0	0	0	0	0
	Dc	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Ea	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Fa	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0

Zeit	Raster	Produkt	Zelllinie	Zellober- fläche	Primärvesikel Mikro-/Makro- Phagostase Pinocytose	Beschich- tete Ver- tiefung	Sekundär- vesikel	Lyosom	Golgi- apparat	Endoplas- misches Retikulum
15 min	Aa	05(G)	A375	3	1	0	0	0	0	0
	Bb	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Ca	05(G)	BO54	2	1	0	0	0	0	0
	Da	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Ea	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Fa	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
30 min	A	05(G)	A375	4	3	0	2	0	0	0
	B	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	C	05(G)	BO54	3	2	0	1	0	0	0
	D	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	E	(G)	HT29	0	1	0	0	0	0	0
	F	(G)	BO54	1	1	0	0	0	0	0
60 min	Aa	05(G)	A375	4	3	2	3	2	0	1
	Ba	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Cc	05(G)	BO54	3	2	0	2	0	0	1
	Da	(G)	A375	0	1	0	0	0	0	1

Zeit	Raster	Produkt	Zelllinie	Zellober- fläche	Primärvesikel Mikro-/Makro- Phagostase Pinocytose	Beschich- tete Vertie- fung	Sekundär- vesikel	Lyosom	Golgi- apparat	Endoplas- misches Retikulum
	Ec	(G)	HT29	1	1	0	1	0	0	0
	Fa	(G)	BO54	1	2	0	1	0	0	0
24 Std	Ab	05(G)	A375	2	1	1	2	4	0	2
	Ba	05(G)	HT29	0	1	1	2	3	0	0
	Cc	05(G)	BO54	3	3	1	3	4	1	1
	Da	(G)	A375	0	3	0	2	3	0	0
	Eb	(G)	HT29	0	3	0	3	1	0	0
	Fb	(G)	BO54	0	2	0	2	3	0	0
Zellniederschlag										
1 min	1A	05(G)	A375	2	0	0	0	0	0	0
	7A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	13A	05(G)	BO54	3	0	1	0	0	0	0
	1B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	7B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	13B	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0

Zeit	Raster	Produkt	Zelllinie	Zellober- fläche	Primärvesikel Mikro-/Makro- Phagocytose Pinocytose	Beschich- tete Vertie- fung	Sekundär- vesikel	Lyosom	Golgi- apparat	Endoplas- misches Retikulum
5 min	2A	05(G)	A375	3	1	0	0	0	0	0
	8A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	14A	05(G)	BO54	2	1	0	0	0	0	0
	2B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	8B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15B	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
15 min	3A	05(G)	A375	4	1	0	1	0	0	0
	9A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15A	05(G)	BO54	1	1	0	0	0	0	0
	3B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	9B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15B	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
30 min	4A	05(G)	A375	4	2	0	0	0	0	0
	10A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	16A	05(G)	BO54	2	1	0	0	0	0	0
	4B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0

Zeit	Raster	Produkt	Zelllinie	Zelloberfläche	Primärvesikel Mikro-/Makro- Phagostase Pinocytose	Beschich- tete Verfärbung	Sekundär- vesikel	Lyosome	Golgi- apparat	Endoplas- misches Retikulum
	10B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	16G	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
60 min	5A	05(G)	A375	3	3	0	2	1	0	0
	11A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	17A	05(G)	BO54	2	2	0	2	0	0	0
	5B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	11B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	17B	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0
24 Std	6A	05(G)	A375	3	1	0	3	3	0	0
	12A	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	18A	05(G)	BO54	2	1	0	1	3	0	0
	6B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	12B	(G)	HT29	1	2	0	2	2	0	0
	18B	(G)	BO54	0	0	0	0	0	0	0

[0294] [Fig. 11](#) zeigt einen tangentialen Schnitt parallel zu der inneren Oberfläche der Zellen einer glatten Muskulatur im Prozess der Internalisierung durch die Zelle, die durch zahlreiche endocytische Vesikel charakterisiert ist, wobei einige von diesen Goldkugeln enthalten, die mit Antikörper beschichtet sind. Diese endocytischen Vesikel mit Partikeln, die auf den Antigenen der Zelloberflächen anhaften, wurden angeregt, um mit Lysosomen bei einer höheren als der für die normale Rezyklisierung der Zelloberflächenmembran erwarteten Geschwindigkeit zu verschmelzen. Die resultierende markante Akkumulation von internalisierten Partikeln wurde beim die 24-stündigen Zeitpunkt beobachtet und ist in [Fig. 12](#) gezeigt.

[0295] Die gezielte Oberflächenbindung der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur der Goldkugeln, die Internalisierung und die Lysosom-Konzentration wurde ebenso in vivo beobachtet. Goldkugeln, die mit NR-AN-01 beschichtet waren, wurden mittels eines intravaskulären Katheders infundiert, mit einer behandel-

ten Fläche erweitert, die proximal und distal mit Slip-Ligaturen okkludiert war, bei 3 atm Druck, der für 3 Minuten auf die Wandung einer Oberschenkelarterie des Schweines ausgeübt wurde, unmittelbar folgend auf ein durch einen Ballon verursachtes Trauma. Die Internalisierungsgeschwindigkeit der Kügelchen variierte mit dem Grad der Zerstörung, die durch die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur während des durch den Ballon verursachten Traumas aufrecht erhalten wurde. Zellen mit minimaler Zerstörung oder keiner Zerstörung internalisierten schnell die Partikel durch Endocytose und Phagocytose, wobei die internalisierten Partikel in Lysosomen konzentriert wurden. Zellen, die durch das Trauma abgetötet wurden, wiesen eine Bindung der Kügelchenoberfläche auf. Zellen, die durch das Trauma zerstört worden waren, die aber überlebt hatten, wurden durch eine Bindung der Kügelchenoberfläche charakterisiert mit verzögerter Internalisierung und Lysosom-Konzentration. [Fig. 13](#) zeigt eine partikuläre Konzentration in den Lysosomen in vivo eine Woche nach der Verabreichung der Kügelchen.

BEISPIEL 10

In vitro-Inhibierung der DNA- und Protein-Synthese der vaskulären glatten Muskulatur durch Staurosporin und Cytochalasin

[0296] Es wurde die Fähigkeit von Staurosporin und Cytochalasin getestet, in vitro DNA und die Proteinsynthese in Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren. Die ^3H -Leucin- und ^3H -Thymidinaufnahme und Cytotoxizitäts-Assays wurden gemäß folgenden Protokollen durchgeführt:

Kultivierte Zellen:

[0297] BO54-Zellen (Zellen der glatten Muskulatur von Pavianen) wurden aus Explantaten von Aortenzellen der glatten Muskulatur von Pavianen abgeleitet. Die Zellen wurden in DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium):F-12-Medium (Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland) mit 5% fötalem Rinderserum (FBS, Gibco) und 5% Serum Plus® (JRH Biologicals) („vollständiges Medium“) expandiert, und eine Menge des Saatgutes der Zellen wurde in flüssigem Stickstoff gefroren für den zukünftigen Gebrauch in Passage Sieben.

5-minütige Exposition; Proteinsynthese-Assay:

[0298] Zellen der vaskulären glatten Muskulatur mit einer Konzentration von 40.000–50.000 Zellen/ml wurden gesät und weiterverarbeitet wie in Beispiel 8 beschrieben, „5-minütige Exposition; ^3H -Leucin-Aufnahme.“ Logarithmische Verdünnungen von Staurosporin (200 ng/ml, 20 ng/ml, 2 ng/ml, 0,2 ng/ml und 0,02 ng/ml) wurden im vollständigen Medium dispergiert. Für Cytochalasin B wurden die logarithmischen Verdünnungen bei 20 µg/ml, 2,0 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml und 0,002 µg/ml im vollständigen Medium dispergiert. Das vollständige Medium wurde dann den Kontrollnäpfen zugefügt. Ein ml/Napf einer jeden Verdünnung des therapeutischen Wirkstoffes wurde dann in Vierfachnäpfen zugefügt, und der Wirkstoff des Interesses wurde mit den Zellen der vaskulären glatten Muskulatur 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer sterilen ventilierten Abzugshaube inkubiert. Nach der Inkubation des therapeutischen Wirkstoffes wurden die Näpfe anschließend behandelt wie in Beispiel 8 beschrieben, „5-minütige Exposition; ^3H -Leucin-Aufnahme.“

5-minütige Exposition; DNA-Synthese-Assay:

[0299] Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (BO54) wurden gesät und weiter verarbeitet in Platten mit 24 Näpfen wie oben unter „5-minütige Exposition: Protein-Synthese-Assay“ beschrieben. Nach 5-minütiger Inkubation mit dem therapeutischen Testwirkstoff wurde das Medium aspiriert und 1 ml/Napf des 1,0 µCi/ml ^3H -Thymidins (anders als ^3H -Leucin), welches im vollständigen Medium dispergiert war, wurde zugefügt. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten, 5% CO₂ enthaltenden Umgebung inkubiert. Der toxische Effekt auf den therapeutischen Wirkstoff wurde dann bestimmt wie oben beim Protein-Synthese-Assay beschrieben.

24- und 120-stündige Exposition Protein-Synthese-Assay:

[0300] Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (BO54) wurden mit einer Konzentration von 20.000 Zellen/ml in sterile Platten mit 24 Näpfen gesät und im fertigen Medium (1 ml/Napf) über Nacht bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luft in einer befeuchteten Atmosphäre (gesättigt) inkubiert. Logarithmische Verdünnungen von Staurosporin (100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml) wurden nacheinander wie unten beschrieben in den zwei Medien dispergiert. Für Cytochalasin B wurden logarithmische Verdünnungen von 10 µg/ml, 1,0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml und 0,001 µg/ml nacheinander in den zwei Medien verteilt, wie unten beschrieben:

Medium (1) = fertiges Medium; und
 Medium (2) = DMEM (Leucin-frei) mit 0,5 µCi/ml-³H-Leucin.

[0301] Medium (2) wird für die finale 24-stündige Inkubationsperiode des Experiments verwendet. Noch spezieller wurde im 24-Stunden-Assay jeder Wirkstoff in Medium (2) verdünnt, wie oben vermerkt. Medium (1) wurde aus den Näpfen aspiriert und aliquote Teile der Verdünnungen des therapeutischen Wirkstoffs im Medium (2) wurden in vierfacher Ausführung den entsprechenden Näpfen zugeführt. Medium (2) wurde dann den Kontrollnäpfen zugegeben.

[0302] Beim 120-Stunden-Assay wurde jeder Wirkstoff in Medium (1) verdünnt, wie oben vermerkt. Medium (1) wurde aus den Näpfen aspiriert und aliquote Anteile der Verdünnungen des Wirkstoffs in Medium (1) in vierfacher Ausführung den entsprechenden Näpfen zugegeben. Medium (1) wurde dann den Kontrollnäpfen zugefügt. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt und frischer Wirkstoff den Testnäpfen zugegeben. Nach 96 Stunden (d. h. am 4. Tag) wurde jeder Wirkstoff in Medium (2) verdünnt, wie oben vermerkt. Medium (1) wurde aus den Näpfen aspiriert und aliquote Anteile der Verdünnungen des Wirkstoffes in Medium (2) in vierfacher Ausführung den entsprechenden Näpfen zugegeben. Medium (2) wurde dann den Kontrollnäpfen zugefügt.

[0303] Die Testwirkstoffe im ³H-Leucin (und in den Kontrollen) wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Die toxische Wirkung der Wirkstoffe wurde dann wie bei der 5-minütigen Exposition beschrieben bestimmt: Protein-Synthese-Assay wie oben beschrieben. Zusätzlich wurden die Veränderungen in den Zellen bei jeder Verdünnung unter Verwendung eines Zeiss-Mikroskops (Zeiss, Westdeutschland) bei 320-facher Vergrößerung fotografiert. Das Medium wurde dann aspiriert und die Zellen dann mit TCA weiterverarbeitet, wie oben beschrieben.

24- und 120-stündige Exposition; DNA-Synthese-Assay:

[0304] Dieser Assay wurde gemäß der Prozedur, wie sie für die „24- und 120-stündige Exposition; Protein-Synthese-Assay“ durchgeführt, mit der Ausnahme, dass Medium (2) in diesem 24- und 120-stündigen DNA-Synthese-Assay wie folgt beschaffen ist:
 Medium (2) = fertiges Medium mit 1,0 µCi/ml³H-Thymidin.

[0305] Medium (2) wird für die finale 24-stündige Inkubation des Experiments verwendet.

[0306] Diese Protein- und DNA-Synthese-Assays sind für die Verwendung mit anderen Populationen der Zielzellen zugänglich, besonders mit anheftenden Monoschicht-Zelltypen.

Ergebnisse:

[0307] Die minimale wirksame Dosis (MED) eines jeden Agenzes wurde als der Prozentteil der Kontrolle bestimmt, die nur mit Medium behandelt worden war; 50% der Kontrollwerte wurden als der Cytotoxizitäts-Bezugswert gewählt. Bei einer 5-minütigen Exposition wies Staurosporin eine MED von 100 ng/ml im Protein-Synthese-Assay und von 1 ng/ml im DNA-Assay auf. Der Wert für die 24-stündige MED für Staurosporin betrug 10 ng/ml im Protein-Synthese-Assay und 1 ng/ml im DNA-Synthese-Assay. Beide Assays gaben einen MED-Wert von 1 ng/ml für eine 120-stündige Exposition des Staurosporins.

[0308] Bei einer 5-minütigen Exposition wies Cytochalasin B einen MED-Wert von 10 µg/ml im Protein-Synthese-Assay auf wie auch im DNA-Assay. Der 24-Stunden-MED-Wert für Cytochalasin B betrug 1,0 µg/ml im Protein-Synthese-Assay und 0,1 µg/ml im DNA-Synthese-Assay. Beide Assays gaben einen MED-Wert von ungefähr 0,1 µg/ml für eine 120-stündige Exposition des Staurosporins.

[0309] Cytochalasin C und Cytochalasin D wurden bei 24- und 48-stündigen Expositionen unter Verwendung der gleichen Verdünnungen, wie oben für Cytochalasin B beschrieben, getestet. Nach 24 Stunden wies Cytochalasin C einen MED-Wert von 1,0 µg/ml im Protein-Synthese-Assay und einen MED-Wert von 0,01 µg/ml im DNA-Synthese-Assay auf. Nach 48 Stunden zeigte Cytochalasin C einen MED-Wert von 0,1 mg/ml im Protein-Synthese-Assay und 0,01 µg/ml im DNA-Synthese-Assay. Cytochalasin D wies einen MED-Wert von 1,0 µg/ml im 24-Stunden-Protein-Synthese-Assay und einen MED-Wert von 0,1 µg/ml im 24-Stunden-DNA-Synthese-Assay auf. Eine 48-stündige Exposition bezüglich Cytochalasin D ergab einen MED-Wert im Bereich zwischen 0,1 und 0,01 µg/ml sowohl im Protein-Synthese- als auch im DNA-Synthese-Assay.

Inhibierung der Migration der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur

[0310] Scratch-Assays zur Bestimmung des Ausmaßes der Inhibierung der Migration der Zellen der glatten Muskulatur durch Cytochalasin B wurden gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (BO54) wurden aus Explantaten von aortischer glatter Muskulatur von Pavianen hergeleitet, wie in Beispiel 10 beschrieben. Die Zellen ließ man auf flachen Böden wachsen, welche Gewebekulturplatten mit sechs Näpfen waren, die ungefähr 5 ml des Mediums enthielten. Die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur wurden in einer Konzentration von 200.000 Zellen/Napf eingebracht und bei 37°C in einer befeuchteten 5%igen Kohlendioxid-Atmosphäre 18 Stunden lang inkubiert. Die Näpfe wurden dann mit einem sterilen Teil einer einzigen Rasierklingenkante angeritzt, die durch Klammern oder durch eine Presszange gehalten wurde und dann aseptisch in einem Winkel von 90° in Kontakt mit dem Boden des Napfes gebracht. Die Zellen wurden aus einer kleinen Fläche entlang des Kratzers durch ein Auftragegerät entfernt, das mit steriler Baumwolle bestückt war, während die Klinge in Kontakt mit dem Boden des Napfes war. Nach der Inkubation ist die Anwesenheit von Zellen in der „angeritzten“ Gegend für die Zellmigration über die Linie des Kratzers hinweg indikativ. Eine Kontrollinkubation zeigte signifikante zelluläre Migration und dient als Standard, gegen den die Migration der Zellen, die dem therapeutischen Wirkstoff ausgesetzt sind, verglichen wird.

[0311] Kurz gefasst wurde eine Vorratslösung von Cytochalasin B (Sigma Chemical Co.) in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Testverdünnungen des Cytochalasin B oder des Kontrollmediums wurden zugesetzt. Jedes Experiment beinhaltete zwei Plattensätze:

A-Satz: Exposition des Testwirkstoffes für nur 1, 3, 6, 8 und 10 Tage; und

B-Satz: Exposition des Testwirkstoffes für 1, 3, 6, 8 und 10 Tage gefolgt von einer siebentägigen Erholungszeit mit dem Kontrollmedium.

[0312] Beide Plattensätze wurden am Ende der Expositionszeiten fixiert (10% Formalin in PBS) und angefärbt (0,02% Kristallviolett). Die Testkonzentrationen an Cytochalasin B waren 1, 0,1 und 0,01 µg/ml einschließlich einer negativen Mediumkontrolle. Frisches Medium und Arzneimittel wurden dreimal pro Woche zur Verfügung gestellt.

[0313] Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. In dieser Tabelle zeigt „M“ den Migrationsgrad an, wobei – = keine Migration, +1 = minimale Migration, +2 = schwache Migration, +3 = gemäßigte Migration und +4 = markante Migration (Maximaldichte, Grenze der Kontaktinhibierung der Zellen) der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur in die freigelegte Gegend benachbart zum Kratzer anzeigt. In dieser Tabelle bedeutet „T“ einen morphologischen Toxizitätsgrad, wobei – = keine Toxizität, +1 = minimale Toxizität, +2 = schwache Toxizität, +3 = gemäßigte Toxizität und +4 = markante Toxizität bedeutet. Die Migrationsresultate werden ausgedrückt als „Grad in der freigelegten Fläche des Napfes/Grad in einem ungestörten Bereich des Napfes“. Die Toxizitäts-Werte stellen einen Grad für alle Zellen in jedem Napf dar.

[0314] Die Daten zeigen an, dass Cytochalasin B die Migration der Zellen (+1 bis +2) der vaskulären glatten Muskulatur in den freigelegten Bereich benachbart zum Kratzer bei einer Dosis von 0,1 µg/ml mit einer nur minimalen (– bis +1) morphologischen Toxizität inhibiert. Die Daten zeigen gleichfalls, dass die behandelten Zellen (0,1 µg/ml) die Fähigkeit zur Migration (+3 bis +4) wiedererhalten, die einer Entfernung des therapeutischen Wirkstoffes folgt, sogar nach 10 Tagen der kontinuierlichen Exposition bezüglich des therapeutischen Wirkstoffes.

Tabelle 4

SCRATCH-MIGRATIONS-ASSAY: INHIBIERUNG DER MIGRATION

DER ZELLEN DER VASKULÄREN GLATTEN MUSKULATUR DURCH CYTOCHALASIN B

Tag	Kontinuierliche Exposition					7-tägige Erholungs-Folge-Exposition			
	Dosis µg/ml					Dosis µg/ml			
	Kontrolle 0,0	0,01	0,1	1,0		Kontrolle 0,0	0,01	0,1	1,0
1 M	+1/+3	+1/+3	+1/+3	-/+2		+3/+4	+3/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	-	+3		-	-	-	+2
3 M	+3/+4	+3/+4	+1/+4	-/+2		+3/+4	+3/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+3		-	-	-	+1
6 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2		+4/+4	+4/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4		-	-	-	+3
8 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2		+4/+4	+4/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4		-	-	-	+3
10 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2		+4/+4	+4/+4	+4/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4		-	-	-	+3

BEISPIEL 12

Cytotoxische Wirkungen des Wirkstoffes auf die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur – getaktete und kontinuierliche Exposition

[0315] Zellen der vaskulären glatten Muskulatur wurden einem Wirkstoff in einem oder zwei Expositionsausführungsformen ausgesetzt:

Getaktete Exposition:

[0316] Das Protokoll der getakteten Exposition ist in Beispiel 8 oben beschrieben (vgl. „Morphologische Auswertung der Cytotoxizität – getaktete Exposition“).

Kontinuierliche Exposition:

[0317] Die gleiche Methodik wird für die Bewertung der kontinuierlichen morphologischen Cytotoxizität wie

bei der getakteten Exposition verwendet, mit der Ausnahme, dass die Testnapfe kontinuierlich einem Wirkstoff in einem Medium während der Expositionsdauer ausgesetzt waren. Das Medium und der Wirkstoff wurden täglich aus jedem Napf einschließlich des unbehandelten Kontrollnapfes aspiriert und mit 1 ml des frischen Mediums und des Wirkstoffes ersetzt (bzw. Medium alleine für die Kontrollnapfe). Eine Reinkubation folgte bis jeder der inkrementellen Bewertungspunkte des langfristigen kontinuierlichen Expositionsprotokolls erreicht wurde. Diese inkrementellen Bewertungszeitpunkte lagen bei 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216 und 264 Stunden. Nach der festgelegten Zeitdauer wurden dann die geeigneten Zellen fixiert, angefärbt und genauso wie beim getakteten Expositionsprotokoll ausgewertet. Die Resultate eines kontinuierlichen Expositionsexperiments werden in Tabelle 5 für Suramin, Staurosporin und Cytochalasin B gezeigt. Die 5-Minuten- und 24-Stunden-Daten, die in Tabelle 5 dargestellt sind, stehen mit den Daten, die in den [Fig. 10A](#), [Fig. 10B](#) und [Fig. 10C](#) enthalten sind in Beziehung.

Tabelle 5
MORPHOLOGISCHER CYTOTOXIZITÄTS-ASSAY
Arzneimittel & Dosis

Expositionsprotokoll	Cytochalasin B				Suramin			Staurosporin				
	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	10 mg	1 mg	0,1 mg	0,01 mg	100 ng	10 ng	1 ng	0,1ng
5 min + 2 Stunden	0,5	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
5 min + 6 Stunden	4	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-
5 min + 24 Stunden	4	0,5	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-
5 min + 48 Stunden	4	1	0	-	2	0	0	-	2	1	0	-
5 min + 72 Stunden	4,5	1	0	-	3	1	0	-	3	1,5	0	-
5 min + 96 Stunden	5	1	0	-	3	1	0	-	3,5	1,5	0	-
5 min + 120 Stunden	5	1	0	-	3	1	0	-	4	1,5	0	-
6 Std. kontinuierlich	-	3	0	0	3	1	0	-	0	0	0	0
24 Std. kontinuierlich	-	3	1	0	3	2	0	-	-	0	0	0
24 Std. + 24 Std.	-	3	0,5	0	4	3	0	-	-	0,5	0	0
24 Std. + 48 Std.	-	4	1	0	4	3	0	-	-	2	0	0
24 Std. + 72 Std.	-	4	0,5	0	4	3	0,5	-	-	1	0	0
24 Std. + 96 Std.	-	4	0	0	4	3,5	1	-	-	1,5	0	0
24 Std. + 120 Std.	-	4	0	0	-	-	-	-	-	1,5	0	0
24 Std. kontinuierlich	-	3	0	0	-	1	1	0	-	3	1	0
48 Std. kontinuierlich	-	3	1	0	-	3	2	0	-	3	2	0
72 Std. kontinuierlich	-	3	1	0	-	4	3	0	-	3	2	0
96 Std. kontinuierlich	-	3	2	0	-	4	3	0	-	3	2	1
120 Std. kontinuierlich	-	3	1	0	-	5	4	0	-	3	2	1
168 Std. kontinuierlich	-	4	1	0	-	5	4	0	-	3	2	1
216 Std. kontinuierlich	-	4	1	0	-	5	4	0	-	3	2	1
264 Std. kontinuierlich	-	4	1	0	-	5	4	0	-	4	2	1

[0318] Bei einer wirksamen in vivo-Dosierung zeigen Cytochalasin B (1 µg/ml; eine anti-Migrations-/Kontraktions-wirksame Dosis) und Staurosporin (1 ng/ml; eine anti-proliferativ wirksame Dosis) jeweils einen Cytotoxizitätsgrad von 1 (minimal) und 2 (schwach). Unabhängige Studien haben angezeigt, dass ein Grad von 3 (gemäßigt) oder weniger für einen cytostatischen, gegen Proliferation wirksamen Wirkstoff der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist.

In vivo-BRDU-Assay: Inhibierung der Zellproliferation der vaskulären glatten Muskulatur

[0319] BRDU-Assay: Die in vivo-Proliferation der vaskulären glatten Muskulatur wurde durch Messung der Inkorporation des Basen-analogen 5-Brom-2'-deoxyuridin (BRDU, erhältlich von Sigma Chemical Co.) in die DNA während der zellulären DNA-Synthese und Proliferation quantifiziert. Die BRDU-Inkorporation wurde histochemisch dadurch gezeigt, dass kommerziell erhältliche anti-BRDU-monoklonale Antikörper verwendet wurden. Das Labeling im 1-Stunden-Takt erlaubt die Abschätzung der Zellzahl, die während der Taktperiode Zellteilung eingehen.

[0320] Das Protokoll des BRDU-Takt-Labeling, das oben beschrieben ist, wird als Standard-Bewertungstechnik mit in vivo-vaskulären Studien an Schweinen angewendet. Nach chirurgischen und Behandlungsprozeduren (beispielsweise wie in den Beispielen 7 und 11 diskutiert) und einer post-chirurgischen Erholungsperiode, wurden die Schweine sediert und im Takt mit BRDU 1 Stunde vor der Gewebeentnahme behandelt.

[0321] Kurz gesagt wurden die Schweine mit Tiletamin-Hydrochlorid und Xylazin (wie in Beispiel 7, „Grobpathologie und histologische Beurteilung“) durch intramuskuläre Injektion sediert. BRDU wurde dann intravenös durch die laterale Ohrvene verabreicht. Jedem der 30–40-pfündigen Schweine wurden zwei ml BRDU bei einer Konzentration von 50 mg/ml verabreicht. Eine Stunde später wurden die Schweine durch intravenös verabreichtes Pentobarbital geopfert. Testsegmente der Arterien wurden dann entfernt (ein Segment beinhaltete ein normales Gefäß, welches proximal und, wenn möglich, distal bezüglich des behandelten Arteriensegments angeordnet war). Die Arteriensegmente wurden dann in 2-mm-Abständen zerschnitten und der Reihe nach in gekühlten Formen mit einer O. C. T. (optimale Schnitttemperatur, optimum cutting temperature)-Verbindung (Tissue Tek®, Miles Laborstories, Inc., Elkhart, IN) und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Blöcke wurden in 5 Mikron-Schnitten abgeteilt und immunohistologisch angefärbt, um BRDU unter Verwendung der folgenden Prozedur zu detektieren.

[0322] BRDU-gekennzeichnete Zelldetektion: Nach dem Taktlabelling des BRDU (1 g BRDU verdünnt in 17 ml sterilem Wasser und 3 ml 1 N Natronlauge) und der Entfernung des Testarteriensegments und der Unterteilung (wie oben) stellt das immunohistochemische Anfärben mit anti-BRDU-monoklonalen Antikörpern ein visuelles Mittel dar, einen mitotischen Index über eine bestimmte Zeitperiode zu bestimmen. Das immunohistochemische Anfärbeverfahren wurde wie folgt durchgeführt:

- 1) 5 µm-Abschnitte der Testarterie wurden in kaltem Aceton 10 Minuten lang dehydratisiert (–20°C);
- 2) die Abschnitte wurden auf Mikroskop-Objektträgern aus Glas befestigt, und die Objektträger wurden dann bei 37°C 10 Minuten lang getrocknet;
- 3) die Objektträger wurden in PBS 10 Minuten lang rehydratisiert;
- 4) die Objektträger wurden der Feulgens-Säurehydrolyse unter Verwendung von 1 N HCl ausgesetzt, wobei zwei gleiche Anteile von 1 N HCl auf 37°C und 60°C vor dem weiteren Verfahren aufgeheizt wurden;
- 5) die Objektträger wurden mit 1 ml 1 N HCl bei 37°C 1 min lang gespült;
- 6) die Objektträger wurden dann für 15 min in 60°C heiße 1 N HCl transferiert;
- 7) die Objektträger wurden mit 1 ml 1 N HCl bei 37°C 1 min lang gespült;
- 8) die Objektträger wurden mit PBS gewaschen, das Raumtemperatur besaß, unter Verwendung eines dreimaligen Wechsels von PBS in 5-minütigen Intervallen;
- 9) endogene entgegengesetzt reaktive Bereiche auf den Abschnitten wurden mit normalen Ziegsenserum (1:25 in PBS) 20 min lang verstopft;
- 10) die Objektträger wurden mit PBS gewaschen wie in Schritt 8;
- 11) die Sektionen wurden mit Anti-BRDU-Antikörpern von Mäusen (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) bei 10 µg/ml 30 min lang inkubiert;
- 12) die Objektträger wurden wie in Schritt 8 mit PBS gewaschen;
- 13) die Sektionen wurden mit Meerrettichperoxidase-markierten (HRPO) Ziegen-anti-Maus-IgG, (Jackson ImmunoResearch Laborstories, Inc., West Grove, PA; 1:20 verdünnt in PBS) und 4% menschlichem AB-Serum 30 min lang inkubiert;
- 14) die Objektträger wurden wie in Schritt 8 mit PBS gewaschen;
- 15) die Abschnitte wurden mit Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Sigma) bei 5 mg/ml in 200 ml PBS und 200 µl 30%igem H₂O₂ 10 min lang inkubiert;
- 16) die Objektträger wurden wie in Schritt 8 mit PBS gewaschen;
- 17) die Proben wurden zur Kontrastfärbung mit Gill I Hematoxylin (Gill I Lerner Laborstories, Pittsburgh, PA; 30 Dips) angefärbt;
- 18) die Objektträger wurden mit PBS wie in Schritt 8 gewaschen, mit einer blau färbenden Lösung gespült

(1 mg Lithiumkarbonat in 500 ml dH₂O), mit deionisiertem Wasser gewaschen und 19) die Testproben wurden dann dehydratisiert, geklärt, und mit einem Glas bedeckt.

[0323] Zum Abschluss dieser Prozedur zeigt eine positive immunohistologische Anfärbung an den reaktiven Stellen eine braune Farbe.

[0324] Zellzerstörende Wirkstoffe inhibierten die BRDU-Aufnahme relativ zu einer PBS-Kontrolle; jedoch inhibierten Cytochalasin B und Staurosporin die BRDU-Aufnahme (d. h. die Zellproliferation) ohne die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur abzutöten. Der Zahl der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur, die mit BRDU gekennzeichnet waren, wurde bei 400-facher Vergrößerung ein Rang zugesprochen:

1 = ≤ 1 /Hochleistungsfeld (HPF);

2 = 2 bis 5/HPF

3 = > 5 bis ≤ 10 /HPF; und

4 = > 10 /HPF.

[0325] Sowohl Cytochalasin B als auch Staurosporin inhibierten die Proliferation nach einem durch einen Ballon verursachten Trauma 24 Stunden lang (Rang 1), wobei ein BRDU-Kennzeichnungsgrad erreicht wurde, der dem der Basislinie (Rang 1) der prä-traumatischen Basislinie äquivalent war. PBS- und monoklonale Antikörper-Kontrollen zeigten einen Rang von 2,5 bis 4 BRDU-Kennzeichnung während dergleichen Zeitperiode. Vier Tage nach einem Trauma zeigten die Arterien, die mit Cytochalasin B oder Staurosporin behandelt wurden, genauso wie PBS- und monoklonale Antikörper-Kontrollen, einen BRDU-Labeling-Rang von 4. Die anti-proliferativen, nicht-zellzerstörenden Eigenschaften von Cytochalasin B und Staurosporin lassen vermuten, dass diese Wirkstoffe der Formulierungen der anhaltenden Freisetzungsdosierung zugänglich sind, um die vaskuläre Stenose zu reduzieren.

BEISPIEL 14

Direkte Konjugation des NR-AN-01-Antikörpers an carboxylische funktionelle Gruppen eines Latexpartikels

[0326] Mit Antikörpern beschichtete Latexpartikel (ein Modell einer Antikörper-beschichteten Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung) kann durch die nachfolgend beschriebene aseptische Technik erhalten werden:

Konjugation:

[0327] Zu 4 ml 0,05 M Natriumborat-Lösung vom pH 8,5, welche 0,01% Tween-20® (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurat, Sigma) enthält, werden 0,5 ml PBS zugefügt, welches 5 mg monoklonalen NR-AN-01-Antikörper enthält. Zu dieser Lösung werden bei Raumtemperatur unter Verwirbeln 2,5 ml einer wässrigen Suspension zugefügt, die 50 mg carboxylierte Latexpartikel mit einem Durchmesser von 1 µm enthält. Unmittelbar danach werden 0,50 ml Wasser, welches 100 mg frisch gelöstes 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid enthält, unter Verwirbeln zugefügt. Die Lösung wird dann unter Schütteln 1–2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsmischung wird dann mit 50 ml eines 50 mM Phosphatpuffers vom pH 6,6, der 0,2% Gelatinestabilisator enthält (Phosphat/Gelatine-Puffer), verdünnt. Die Mischung wird dann 2 Stunden lang bei 40.000 × g bei 4–10°C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und der Niederschlag dann in 50 ml Phosphat/Gelatine-Puffer resuspendiert, wobei dies mit einer Ultraschallbehandlung mit niedrigem Niveau für eine Zeitdauer von 10 Sekunden erfolgt. Die Zentrifugation wird dann wiederholt und der Niederschlag zweimal resuspendiert, worauf die Resuspendierung im Phosphat/Gelatine-Puffer erfolgt. Die Konjugatpartikel werden dann unter Verwendung des Standardprotokolls und von Sorbit-Arzneiträger lyophilisiert.

Charakterisierung:

(a) Größe: Die Größe der Partikelhomogenität wurde durch Laseranisotropie beurteilt bzw. für Partikel, die größer als 1 µm waren, durch mikroskopische Überprüfung.

(b) Beurteilung der spezifischen Bindung: Die spezifische Bindung an Zellen der glatten Muskulatur wird durch histologische Überprüfung des Gewebes oder Mikrotomschnitte des Zellniederschlags nach der Inkubation der Protein-/Peptid-Konjugate mit konjugierten Partikeln überprüft, mit oder ohne Blocker-Protein-/Peptid, das in der Inkubationsmischung beinhaltet war. Bevorzugte Detektionstechniken beinhalten zweite Antikörper-Assays (d. h. Anti-Maus-Ig) oder Kompetitions-Assays (d. h. radiosintigrafische Detektion in Verbindung mit Radioisotop-markierten Protein-/Peptid-Konjugaten).

(c) Die Beurteilung des Ausmaßes der Protein-/Peptid-Derivatisierung: Diese Bestimmung wird durchge-

führt durch Beschichten der Latexpartikel mit radioisotopisch markiertem Antikörper, gefolgt durch Detektion der Radioaktivität, die mit den beschichteten Partikeln verbunden ist.

[0328] Die Charakterisierung der mit Antikörpern beschichteten Partikel ist in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6

Charakterisierung der mit NR-AN-01 beschichteten Latexpartikel

Partikel Durchmesser	Angebot an Ab/Partikel	µg Ab-gebundene/5 mg Latex	Ab-Moleküle pro Partikel
1,2 µm	40.000	42	3520
1,2 µm	84.000	66	5470
0,4 µm	32.000	99	3160
0,4 µm	64.000	140	4550
0,1 µm	932	140	65

[0329] Der Einfluss des pH-Wertes auf die Partikelaggregation während der Antikörper-Konjugation wird in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7

Einfluss des pH-Wertes während der Antikörper-Konjugation-Partikelaggregation

Partikeldurchmesser	pH*-Wert während der Konjugation	Partikelaggregation** +Tween 20®	-Tween 20®
1,2 µm	8,5	<5%	<2,5%
1,2 µm	7,0	≈20%	≈10%
1,2 µm	5,5	10%	100%
0,4 µm	8,5	<10%	<5%
0,4 µm	7,0	≈30%	≈20%
0,4 µm	5,5	100%	100%
0,1 µm	8,5	<20%	<10%
0,1 µm	7,0	≈50%	≈40%
0,1 µm	5,5	100%	100%

* Verwendung von 50 mM MES (pH 5,5); Phosphat-Puffer (pH 7,0) oder Borat-Puffer (pH 8,5), wie beschrieben.

** Wie durch mikroskopische Überprüfung auf einer Skala von 0–100% beurteilt.

[0330] Diese Daten lassen vermuten, dass Proteine oder Peptide direkt mit den Dosierungsformen der anhaltenden Freisetzung der vorliegenden Erfindung konjugiert werden können. Noch typischer werden Polymilch-säure-/Glykolsäure-Partikel, die endständige carboxylische Säuregruppen haben, gemäß der hierin beschriebenen Prozedur konjugiert oder gemäß der alternativen Prozeduren, wie sie in der Spezifikation hiervon beschrieben sind.

BEISPIEL 15

In vivo-Studien des Cytochalasin B

[0331] Bioverteilung von Cytochalasin B: Um die Bioverteilung von Cytochalasin B zu ermitteln, wurden Mäuse mit 50 mg/kg Cytochalasin B injiziert (i. p.). Kontrollmäuse wurden mit DMSO/Tween 20/Carboxymethylcellulose („Vehikel“) injiziert. Die Mäuse wurden nach 3, 12, 24 und 72 Stunden nach der Verabreichung des Cytochalasin B oder des Vehikels geopfert. Organe wurden entnommen, homogenisiert, extrahiert und die Menge des Cytochalasin B in Geweben durch HPLC quantifiziert. Ungefähr 75% des Cytochalasin B verblieben in der Bauchfellhöhle oder am Injektionsort. Von den getesteten Organen wurde die höchste Menge an Cytochalasin B in der Leber gefunden. Nachfolgende Analysen zeigten, dass die maximal tolerierte Dosis für Cytochalasin B 50 mg/kg betrug, und dass diese Dose jeden zweiten Tag verabreicht werden kann.

[0332] Cytochalasin B wurde auch Mäusen bei einer Konzentration von 3,5 mg/kg intravenös verabreicht (in Methanol oder Tween 20/Carboxymethylcellulose). Die Mäuse wurden in einem Abstand von 2, 15, 30 Minuten, 3 und 12 Stunden nach der Cytochalasin B-Verabreichung geopfert und Gewebeextrakte auf Cytochalasin

durch TLC analysiert. Die maximale Wiedergewinnung von Cytochalasin B aus Gewebeextrakten betrug 32%. Die Daten zeigten, dass sich Cytochalasin B in der Lunge und am Injektionsort befand und dass 3,5 mg/kg des Cytochalasin B keiner akute Toxizität hervorriefen. 12 Stunden nach der Verabreichung waren in den Geweben nur sehr niedrige Cytochalasin B Mengen.

[0333] ^3H -Cytochalasin B (2 μg ; 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) wurden in vivo in BALB/c-Mäuse injiziert, die Harnblasen hatten, die von außen zugebunden waren. Die Tiere wurden 15 Minuten, 30 Minuten, 2 Stunden oder 16 Stunden nach der Injektion geopfert. Die Organe wurden entfernt, abgeschmutzt, gewogen, an der Luft getrocknet und auf Radioaktivität überprüft. 50–73% der gesamten injizierten Dosis wurden in den Gewebeproben festgestellt (Blut, Herz, Gehirn, Muskulatur, Knochen, Lunge, Leber, Milz, Magen, Niere, Eingeweide und Harnblase). Die Beseitigung des ^3H -Cytochalasin B aus dem Blut erfolgte extrem schnell mit weniger als 1% der injizierten Dosis durch Zirkulation in 15 Minuten. Nur Leber, Skelettmuskulatur und Eingeweide zeigten eine signifikante Retention der ^3H -Aktivität. Alle Gewebe wiesen eine Beseitigung der ^3H -Aktivität bis herunter auf 1,5% der injizierten Dosis pro Gramm des Gewebes nach 16 Stunden auf.

Cytochalasin B-Metabolismus

[0334] ^3H -Cytochalasin B wurde mit einer Dosis von 1,5 oder 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit lebensfähigen oder nicht-lebensfähigen menschlichen Leberschnitten und Medium gemischt, und die Menge des ^3H -Cytochalasin B im Medium oder im Gewebe wurde durch HPLC beurteilt (Tabellen 8 und 9).

[0335] Die Cytotoxizität von ^3H -Cytochalasin B und seinen nachfolgenden Metaboliten wurde gleichfalls durch Beurteilung der Dosis-abhängigen Veränderungen in der mitochondrialen Funktion durch Überwachung der 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-aktivität, die einer 24-stündigen Exposition der menschlichen Leberschnitte bezüglich des Testagenzes folgte, bewertet (Tabelle 10).

TABELLE 8

VERTEILUNG VON ^3H -CYTOCHALASIN B IM MEDIUM UND IMMENSCHLICHENLEBERGEWEBE				
^3H -Cytochalasin B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inkubationssystem	Inkubationsperiode bei 37 °C (Stunden)	% Aktivität im Medium	% Aktivität im Gewebe
1,5	Medium/lebensfähiges Gewebe	1	84	16
1 5		4	84	16
1,5		24	91	9
8	Medium/lebensfähiges Gewebe	1	88	12
8		4	84	16
8		24	89	11
8	Medium/abgekochtes Gewebe	1	83	17
8		4	87	13
8		24	87	13

TABELLE 9

STUDIE DES METABOLISMUS MENSCHLICHERLEBERSCHNITTE ART DER TRITIUM-AKTIVITÄT AUSMASS DER METABOLIT-KONVERSION					
³ H-Cytochala- sin B (µg/ml)	Inkubations- system	Inkubations- dauer (Stun- den)	Nichtextra- hier-bare Akti- vität (%)	Extrahierbare Aktivität (%)	%-Satz der Me- tabolisierung der extrahier- baren Aktivität
8	Medium/le- bensfähiges Gewebe	1	0,5	99,5	24,2
8		4	1	99,0	59,4
8		24	1,3	98,7	98,0
1,5	Medium/le- bensfähiges Gewebe	1	0,5	99,5	43,0
1,5		4	0,6	99,4	77,0
1,5		24	0,4	99,6	98,7
8	Medium/abge- kochtes Gewe- be	1	0,5	99,5	5
8		4	1	99,0	5
8		24	1,3	98,7	5
8	reines Medium	1	nicht beurteilt	n. b.	5
8		4	nicht beurteilt	n. b.	4
8		24	nicht beurteilt	n. b.	5

TABELLE 10

MTT-Absorption in menschlichen Leberschnitten, die für eine Zeitdauer von 24 Stunden ³ H-Cytochala- sin B ausgesetzt waren	
Dosis (µg/ml)	MTT-Absorption
0(Kontrolle)	0,639 +/- 0,188
0,1	0,844 +/- 0,014
1,5	0,841 +/- 0,081
8,0	0,850 +/- 0,082

^aMTT-Absorptionswerte spiegeln die mitochondriale Lebensfähigkeit wider, wobei hohe Absorptionswerte lebensfähige Mitochondrien darstellen, während niedrige Absorptionswerte Mitochondrien ohne Gebrauchswert widerspiegeln. Jeder Wert stellt die +/- Standardabweichung der optischen Dichte von Dreifach-Leberproben dar.

[0336] Die Ergebnisse in den Tabellen 8–9 zeigten an, dass 98% des ³H-Cytochala-
sin B innerhalb 24 Stunden nach der Verabreichung mit mehr als 80% der gesamten Reaktivität, die im Medium anwesend war, metaboli-
sisiert wurden und weniger als 20% der Reaktivität, die im Gewebe vorhanden war. Die Ergebnisse in Tabelle
10 zeigten, dass ³H-Cytochala-
sin B oder seine nachfolgenden Metabolite nicht zytotoxisch waren.

[0337] Um den Metabolismus von ³H-Cytochala-
sin B in menschlichem Blut zu bestimmen, wurde ³H-Cytocha-
lasin B (8 µg/ml) in Salzlösung, in einer 1:1-Verdünnung von Salzlösung und menschlichem Plasma oder in
einer 1:1-Verdünnung von Salzlösung und menschlichem Vollblut aufgelöst. Die Mischungen wurden 20 Stun-
den lang bei 37°C inkubiert und dann mittels HPLC auf Stabilität und Metabolismus analysiert. ³H-Cytochala-
sin B wurde nicht metabolisiert, wenn es entweder mit Salzlösung oder Plasma gemischt wurde. Jedoch wurde
³H-Cytochala-
sin B durch menschliches Vollblut metabolisiert, wobei der Metabolit eine HPLC-Retentionszeit
und ein Profil aufwies, das mit dem übereinstimmte, das im menschlichen Leberschnitt-Assay gefunden wurde
(siehe oben).

Toxizitätsstudien

[0338] Um die Toxizität von Cytochala-
sin B zu bestimmen, wurden Ratten (4 männliche und 4 weibliche Rat-
ten) mit 10 µg/ml Cytochala-
sin B viermal am Tag während einer Zeitspanne von 7 Tagen injiziert (Tabelle 11).
Die Daten bezüglich der Änderungen des Körpergewichts, des Nahrungsverbrauchs, der Nahrungswirksam-

keit, der hämatologischen Parameter, der Koagulationsparameter, der Parameter der Serumchemie und der Befunde der Kadaverschau wurden zusammengestellt. Der einzige Parameter, welcher einen nachteiligen Effekt der Verabreichung von Cytochalasin B vermuten ließ, war eine Erhöhung des mittleren relativen Herzgewichts in den behandelten weiblichen Tieren. Es gab keine abartigen oder mikroskopischen Änderungen, welche im Herz detektiert werden konnten, die zu dieser Erhöhung beitrugen. Deshalb kann die tägliche Verabreichung von Cytochalasin B an Ratten mit einer Dosis von 800 µg/kg (für eine gesamte injizierte Dosis von 5600 µg/kg) einen Effekt auf das Herzgewicht der weiblichen (aber nicht der männlichen) Ratten haben. Jedoch wurde geronnenes Blut nicht routinemäßig aus den Herzlumina vor dem Abwiegen des Herzens entfernt.

TABELLE 11

Gruppennummer	Anzahl der Tiere		Behandlung	Dosis-Niveau (µg/ml)	Weg	Dosierungshäufigkeit	Dosierungsdauer
	männlich	weiblich					
1	4	4	Kontrolle durch den Biostent	0	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 2 Std)	7 Tage
2	4	4	Cytochalasin B	10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 2 Std)	7 Tage

[0339] Um die Toxizität der chronischen Verabreichung von Cytochalasin B zu bestimmen, wurde Cytochalasin B sieben Tage lang intravenös Sprague-Dawley-Ratten verabreicht (Tabelle 12). Daten bezüglich des Nahrungsverbrauches, des Körpergewichts, der hämatologischen Parameter, der Parameter der klinischen Chemie, der Koagulationsprofile, der Organgewichte, der klinischen Beobachtungen, der Befunde der Kadaverschau und Befunde der Histopathologie wurden zusammengestellt. Es wurde gefunden, dass die chronische intravenöse Verabreichung von Cytochalasin B bei Dosismengen bis zu 600 µg/kg/Tag weder in Anzeichen nachteiliger Effekte noch in einer Toxizität resultierten.

TABELLE 12

Gruppennummer	Anzahl der Tiere		Behandlung	Dosis-Niveau (µg/ml)	Weg	Dosishäufigkeit	Dosierungsdauer
	männlich	weiblich					
1*	15	15	Kontrolle	0	Intravenöse Injektion	4-mal/Tag (≈in Abständen von 2 Std)	7 Tage
2	10	10	Cytochalasin B	1,3			7 Tage
3	10	10		3,9			7 Tage
4*	15	15		7,5			7 Tage
5*	15	15		7,5			7 Tage

* Fünf Tiere/Geschlecht/Gruppe wurden für eine 14-tägige Nichtbehandlungs-Erholungsperiode verwendet und wurden dann am 22. Tag getötet

** Fünf Tiere/Geschlecht wurden nach 8, 15 und 22 Tagen getötet

[0340] Eine ähnliche Studie an Hunden (Tabelle 13) mit zusammengestellten Daten bezüglich des Futterverbrauchs, des Körpergewichts, der hämatologischen Parameter, der Parameter der klinischen Chemie, der Koagulationsprofile, der Organgewichte, der klinischen Beobachtungen, dem Abhören der Brusthöhle, der ophthalmischen Überprüfung, der Harnuntersuchung, der Befunde der Kadaverschau und der Histopathologie (Gruppe der hohen Dosierung) ergab, dass die intravenöse Verabreichung des Cytochalasin B während sieben aufeinanderfolgenden Tagen an Beagle-Hunde mit Dosierungen bis zu 648 µg/kg/Tag (eine kumulative Dosis von 4.536 µg/kg) weder in Anzeichen nachteiliger Effekte noch in einer Toxizität resultierten.

TABELLE 13

Gruppennummer	Anzahl der Tiere		Behandlung	Dosis-Niveau (µg/ml)	Dosisvolumen (ml/kg); Durchflussgeschwindigkeit (ml/min)	Weg	Dosierungshäufigkeit	Dosierungsdauer
	♂	♀						
1*	4	4	Kontrolle	0	20; 10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 6 Std)	7 Tage
2	4	4	Cytochalasin B	1,3	20; 10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 2 Std)	7 Tage
3	4	4	Cytochalasin B	4,4	20; 10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 6 Std)	7 Tage
4*	6	6	Cytochalasin B	8,1	20; 10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 6 Std)	7 Tage
5**	6	6	Cytochalasin B	8,1	20; 10	IV	4-mal/Tag (in Abständen von 6 Std)	7 Tage

♂ = männlich; ♀ = weiblich; IV = intravenöse Infusion

* Zwei Hunde/Geschlecht/Gruppe wurden während einer 14-tägigen Nichtbehandlungs-Erholungsperiode gehalten und dann am 23. Tag getötet

** Drei Hunde/Geschlecht wurden am 9. und 23. Tag getötet

BEISPIEL 16

Verwendung eines biologischen Stents in Schweinearterien, die durch einen Ballon traumatisiert wurden

[0341] Oberschenkelarterien von Schweinen wurden traumatisiert wie es in Beispiel 7 beschrieben wurde, und dann mit Cytochalasin B behandelt. Ungefähr 1,5 bis ungefähr 2 ml von Cytochalasin B wurden in einer Konzentration von 0,1 µg/ml in Teile der Arterie infundiert, die von anderen Teilen durch Ligaturen getrennt waren. Die Arterie wurde dann drei Minuten lang unter Druck gehalten und das Fluid aspiriert. Ungefähr 8 bis ungefähr 30 Lambda der Lösung wird im interstiziellen Raum festgehalten, der die Zellen in der Tunica Media umgibt. Zehn Oberschenkelarterien (zwei Arterien erhalten aus jedem der 5 Schweine, die gemäß dem Einzeldosis-Protokoll behandelt wurden, das in Beispiel 7 beschrieben wurde) wurden dann histologisch nach 4 Ta-

gen oder 3 Wochen nach der Verabreichung des Cytochalasin B untersucht. Die maximale luminale Fläche jeder Arterie wurde aus digitalisierten mikroskopischen Bildern durch ein mit einem Computer unterstütztes morphometrisches Analysesystem vom Typ BQ-System IV (R & M Biometrics, Inc., Nashville, TN) gemessen und berechnet. Dieses Experiment wurde dann mit 5 zusätzlichen Schweinen wiederholt (zwei Arterien pro Schwein; Cytochalasin B-Dosis = 0,1 µg/ml, angewendet während einer Zeitdauer von 3 Minuten bei einem Druck von 1 atm; gleiche Zeitpunkte). Die aus den zwei Experimenten erhaltenen Daten wurden kombiniert. Schweinearterien, die durch einen Ballon traumatisiert und welche mit Cytochalasin B behandelt worden waren, zeigten eine größere luminale Fläche nach den 4-Tage- und 3-Wochen-Zeitpunkten der Nachbehandlung im Vergleich zu Arterien, die mit anderen Testwirkstoffen oder Kontrollen behandelt worden waren.

[0342] Die luminale Fläche der traumatisierten und mit Cytochalasin B behandelten Segmente der Arterien wurden gleichfalls mit der luminalen Fläche des normalen unbehandelten Bereichs der Oberschenkelarterie verglichen, die der Testfläche naheliegt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Lumenfläche im Testbereich ungefähr zweimal so groß war wie die Fläche des normalen Kontrollsegments der gleichen Arterie. Die negativen Kontrollwirkstoffe, PBS und monoklonale NR-AN-01-Antikörper zeigten keine Zunahme oder eine leichte Abnahme in der Lumenfläche im Vergleich zum normalen Kontrollsegment der gleichen Arterie.

[0343] Eine Studie des Ansprechverhaltens auf Cytochalasin B-Dosierung wurde dann mit 10 Schweinen durchgeführt, wobei dem experimentellen Protokoll, das in Beispiel 7 beschrieben wurde, gefolgt wurde. Es wurden kurz gesagt sowohl Oberschenkelarterien von jedem der 2 Schweine mit einer der folgenden Dosierungen an Cytochalasin B behandelt: 0,0 µg/ml (d. h. PBS-negative Kontrolle), 0,01 µg/ml, 0,10 µg/ml, 1,0 µg/ml und 10,0 µg/ml, wie oben beschrieben. Der Wirkstoff wurde mittels eines intraluminalen Katheters bei einem Druck von 1 atm 3 Minuten lang zugeführt und die Arterien 3 Wochen später durch das morphometrische Analysesystem bewertet, das oben beschrieben wurde. Das Verhältnis von behandelter luminaler Arterienfläche, das der normalen luminalen Arterienfläche benachbart war, wurde als prozentuale Veränderung von behandeltem zu normaler Fläche oder der Größe des Arterienlumens (Durchmesser oder Querschnittsfläche) der behandelten Arterien relativ zu den traumatisierten aber unbehandelten Arterien beurteilt. Ein signifikanter Grenzwerteffect wurde bei Dosierungen von 0,1 µg/ml (ungefähr eine 140%ige Zunahme) bis 1,0 µg/ml beobachtet ([Fig. 14](#)). Die Grenzwertdosis (0,01 µg/ml) und die negative Kontrolle (PBS) zeigten ungefähr eine ±20%ige Veränderung in der luminalen Fläche.

[0344] Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass innerhalb einer Stunde des durch einen Ballon verursachten Traumas eine Depolymerisation der Myofasern in den traumatisierten Gefäßen eintrat, welche kontrahierende Organellen sind. Die Depolymerisation der Myofasern ist ein normales physiologisches Ansprechverhalten der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur auf Traumata, und ist der erste Schritt in ihrer Transformation einer kontrahierbaren Zelle zu einer Zelle mit Sekretion und Migration. Die Behandlung der traumatisierten Schweinearterien mit ungefähr 0,01 bis ungefähr 10,0 µg/ml an Cytochalasin B ergab keine gesteigerte Geschwindigkeit oder eine noch intensivere Depolymerisation der Myofibrillen. Jedoch zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass die Neubildung der Myofasern verzögert eintrat. Basierend auf der anhaltenden Zunahme im Gefäßdurchmesser kann die Rückkehr zur normalen vaskulären Kontrahierbarkeit weit stärker erniedrigt werden, als dies durch die verzögerte Rückkehr zur normalen Morphologie vermutet werden kann.

[0345] Die traumatisierten und behandelten Flächen der Arterie waren nicht der Beschränkung oder der chronischen geometrischen (vaskulären) Umgestaltung unterworfen, die normalerweise bei Scheinkontrollen im Schwein eintraten, und die für den Menschen einer PTCA folgend beschrieben wurden. Querschnitte der Arterie zeigten eine größere Querschnittsfläche des gesamten Gefäßes, die durch Messung des Verhältnisses der Gefäßfläche innerhalb der externalen elastischen Lamina (EEL) der behandelten Fläche zur mittleren gesamten Gefäßfläche der proximalen und distalen Bereiche der gleichen Arterie erhalten wurden, verglichen mit traumatisierten aber nicht mit Cytochalasin B behandelten Arterien. In Arterien, welche mit einem verdrillbaren Ballon traumatisiert wurden, der die Gefäßwand zerstört ohne die Tunica media zu zerreißen, trat eine gleichförmigere intimale Proliferation ein, und die größere Gefäßgröße (Fläche innerhalb der EEL) resultierte in einer größeren luminalen Querschnittsfläche und in einer signifikanten Abnahme der Restenose. Wenn die Gefäße extensiv zerstört und die Tunica media zerrissen wurde, trat eine extensive Proliferation und Umgestaltung des Thrombus ein, welche in einer hochvariablen intimalen Proliferation resultierte.

[0346] Deshalb resultierte die Verabreichung von Cytochalasin B an Zellen der glatten Muskulatur von Schweinen durch einen Infusionskatheter nach einem durch einen Ballon verursachten Dehnungstrauma in einer weit ausführlicheren Retention des Lumens der Arteriengröße (Durchmesser oder Querschnittsfläche), als sie durch den Dehneffekt mittels des Ballons verursacht wurde. Dieser Effekt wurde durch Ersatz des gesam-

ten interstitziellen Fluidvolumens zwischen den Zellen der Tunica media mit dem therapeutischen Wirkstoff erreicht.

[0347] Darüber hinaus hat Cytochalasin B einen breiten therapeutischen Index, der von ungefähr 0,1 bis 10 µg/ml reicht, mit keinem Hinweis auf Toxizität bei einer Konzentration von 10 µg/ml. Zehn µg/ml ist die maximale Sättigungskonzentration des Cytochalasin B in Salzlösung. Weiterhin wurde die Wirkung, die durch Verabreichung durch Cytochalasin B erreicht wurde, noch augenscheinlicher über eine Zeitdauer von 3 bis 8 Wochen nach einem durch einen Ballon verursachten Trauma. Diese Daten lassen vermuten, dass Cytochalasin B als ein „biologischer Stent“ wirkt, wenn es den traumatisierten Arterien zugeführt wird.

[0348] Mit einem Ballon traumatisierte Schweinearterien aus Oberschenkeln aus der Kontrolle und aus der Behandlung (0,1 µg/ml Cytochalasin B) wurden nach 1, 4, 7, 14 oder 21 Tagen nach dem Eingriff bewertet. Die morphometrischen Analysen an gefrorenen histologischen Schnitten der Arterie zeigten, dass Arterien, die mit Cytochalasin B behandelt worden waren, einen Zustand der anhaltenden Ausdehnung erreichten, welcher sich nur wenig zwischen den Tagen 7 und 21 änderte. Eine Zwei-Wege-Varianz-Analyse zeigte eine statistisch signifikante Differenz ($p < 0,05$) in den Arterien-Lumenflächen über eine Zeitdauer von drei Wochen zwischen der mit Cytochalasin B behandelten Gruppe und den Kontrollgruppen.

[0349] Eine Studie bezüglich des Dosis-Ansprechverhaltens von mit einem Ballon traumatisierten koronaren Arterien von Schweinen zeigte, dass die Behandlung mit Cytochalasin B bei einer Konzentration von 0,1, 1,5 oder 10,0 µg/ml (Tabelle 14, „Bio-Stent“) in einer anhaltenden arteriellen Ausdehnung der koronaren Luminalfläche drei Wochen nach dem Eingriff resultierte. Darüber hinaus resultierte die Verabreichung des Cytochalasin B nicht in myokardialen oder arteriellen Läsionen, die dem Cytochalasin B zugeordnet werden können, was durch Histologie ermittelt wurde. Es konnten keine statistisch und biologisch signifikanten Veränderungen in klinischen Chemieparametern, hämatologischen Parametern, Körpergewichten, Blutdruck oder Elektrokardiogrammen gesehen werden, die dem Cytochalasin B zugeordnet werden konnten.

TABELLE 14

DATEN DER KORONAREN MORPHOMETRIE VON SCHWEINEN				
Gruppe Dosierung (µg/ml)*	Tage nach dem chirurgischen Eingriff	mittlerer Prozentsatz der Lumenfläche	Standardabweichung	P-Wert Unpaariger T-Test
Salzlösung	4	96,5	15,2	-
0,1 µg/ml Biostent	4	97,0	17,1	0,48
1,5 µg/ml Biostent	4	101,7	6,8	0,28
10 µg/ml Biostent	4	103,9	14,1	0,25
Salzlösung	21	78,7	19,1	-
0,1 µg/ml Biostent	21	98,0	15,5	0,004
1,5 µg/ml Biostent	21	100,9	18,5	0,002
10 µg/ml Biostent	21	110,9	19,2	0,004

* Dosis basiert auf der Konzentration des Cytochalasin B (µg/ml) im Fluidvolumen (ungefähr 8 bis ungefähr 30 Lambda), das ungefähr 10 bis ungefähr 20% der Tunica media zugeführt wurde.

[0350] Koronare Arterien von Schweinen wurden gleichfalls durch Embolektomie oder übergroße PTCA-Balons traumatisiert und dann mit 8–16 ml des Cytochalasin B bei einer Konzentration von 8,0 µg/ml in die Arterienwand mit einem MIC-Katheter infundiert, um die therapeutische Dosis zu erreichen. Kontrollen beinhalteten eine Verdünnungskontrolle und eine unbehandelte traumatisierte Kontrolle; alle Tiere wurden 4 Wochen nach dem Eingriff geopfert und die koronaren Arterien durch Perfusion fixiert.

[0351] Eine Morphometrie wurde an ausgewählten Schnitten aus proximalen, behandelten und distalen Segmenten der Koronararterien durchgeführt (Tabelle 15).

TABELLE 15

STUDIE AN KORONARARTERIEN VON SCHWEINEN						
Gruppe	Neointimale Fläche		Luminale Fläche		Arterienfläche	
	Fläche	Standard	Fläche	Standard	Fläche	Standard
Unbehandelte Kontrolle	1,88	1,62	0,77	0,38	2,19	1,07
Behandelte Kontrolle in Salzlösung	1,39	1,13	0,73	0,37	1,88	0,96
8,0 µg/ml Cytochalasin B	1,56	1,24	0,58	0,30	1,80	0,70

[0352] Während die in Tabelle 15 gezeigten Daten im Widerspruch zu früheren Studien zeigten, dass die lokale Zuführung von Cytochalasin B in keiner statistisch signifikanten Zunahme der luminalen Fläche resultierte, zeigen die Daten, dass ein Trend in Richtung einer günstigen Arterienumgestaltung existierte, wie es durch die größere Arterienfläche angezeigt wurde, die durch die externalen elastischen Lamina in den mit Cytochalasin B behandelten Arterien gebunden wurde, wenn diese mit beiden Kontrollen verglichen wurden. Die Durchmesser der oder die Flächen in der EEL der Arterie können so mit den Kontrollen verglichen werden, dass sie als ein Indikator für den Grad der vaskulären Umgestaltung wirken. Das Fehlen einer statistisch signifikanten Zunahme in der luminalen Fläche kann eine Folge der erhöhten Probenvariabilität, der erhöhten neointimalen Bildung und/oder des erhöhten Traumagrades sein.

[0353] Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass die Verabreichung eines Cytoskelettinhibitors, beispielsweise Cytochalasin B, in einer Menge, die als biologischer Stent wirkt, auf ein traumatisiertes Gefäß auch wirksam sein kann, die Proliferation der Zellen der vaskulären glatten Muskulatur zu inhibieren oder zu reduzieren.

BEISPIEL 17

Formulierungen der anhaltende Freisetzung von Cytochalasin B und Taxol

[0354] Um die Wirksamkeit der Dosierungsformen der lokalen anhaltenden Freisetzung zur Inhibierung der Restenose von Cytochalasin B oder Taxol zu bestimmen, wurden Cytochalasin B oder Taxol in einer Trägerstruktur, beispielsweise einer „Umhüllung“, auf das adventizielle Gewebe angewendet, das die Halsschlagader eines Kaninchens, die durch einen Ballon traumatisiert (Gruppen 1–11) oder eine Oberschenkelarterie eines Schweines, die durch einen Ballon traumatisiert wurde (Gruppe 12) (Tabelle 16), umgibt.

[0355] Die Arterien in den Tieren der Gruppe 1a und 1b wurden mit 20 mg Cytochalasin B in 1 g eines Rinderkollagengels (BioCore, Inc., Topeka, KS) behandelt, welches in einer Netzhüllung aus Rinderkollagen (Skin Temp-Biosynthetic Skin Dressing, BioCore, Inc., Topeka, KS) getragen wurde oder eingeschlossen war. Eine Woche nach der Behandlung zeigte die mit Cytochalasin B behandelte Arterie im Tier 1223 keine intimale oder adventizielle Proliferation. Es trat ein markantes Zellsterben in der äußeren Zone der Tunica media mit Heterophilen ein, die die Tunica media infiltrierten. Die Heterophilen waren außerhalb der Umhüllung anwesend, jedoch inhibierte Cytochalasin B die Heterophilen und Makrophagen bezüglich der Infiltration der Umhüllung. Die Arterie des Kontrolltiers (1249) zeigte eine gemäßigte intimale Proliferation, und Heterophilen und Histozyten infiltrierten die Umhüllung. Der Zelltod innerhalb der Tunica media war minimal.

[0356] Zwei Wochen nach der Behandlung trat nur eine minimale intimale und adventizielle Proliferation in der Fläche der Arterie auf, die mit der Cytochalasin B Umhüllung behandelt war (Tier 1224). Die Intima war lose angeordnet und es trat nur eine minimale Infiltration durch Heterophilen ein. Es waren syncytische Riesenzellen aus Protoplasma anwesend. In der Arterie des Kontrolltieres mit Umhüllung (Tier 1222) trat eine gemäßigte intimale Proliferation mit Heterophilen und Makrophagen in der Umhüllungsfläche ein. Diese Zellen waren in der Tunica media sichtbar.

[0357] Drei Wochen nach der Behandlung konnte keine intimale Proliferation in der Fläche der Arterie beob-

achtet werden, die mit dem umhüllten Cytochalasin B behandelt worden war (1244). Heterophile und syncyti-sche Riesenzellen aus Protoplasma waren rund um die Umhüllung vorhanden. Es trat eine signifikante Nekrose der Zellen in der Tunica media mit infiltrierenden Heterophilen und Makrophagen ein. Es gab kein Endothelium. In der Kontrollarterie (Tier 1232) trat eine markante intimale Proliferation mit gut entwickeltem adventiziellen und perivaskulären Gewebe ein. Heterophile und Makrophagen infiltrierten die Umhüllung. Die Zellen in der Tunica media waren zugänglich, und es wurde ein mauerartiger Thrombus im Gefäßlumen ausgebildet. Deshalb wurde eine Inhibierung der intimalen Proliferation mit Cytochalasin B in den Arterien der behandelten Tiere der Gruppen 1a und 1b gesehen, jedoch trat eine signifikante Reaktion bezüglich des Umhüllungsmaterials ein.

[0358] Die Arterien in den Tieren in Gruppen 2a und 2b wurden mit Cytochalasin B (30% Gewicht/Gewicht; 300 mg Cytochalasin B/g Silikon) in einer Silikonumhüllung (Q-7 4840, Dow Corning, Midland, MI) behandelt. Eine Woche nach dem Trauma trat keine signifikante intimale oder adventizielle Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur (smooth muscle cells, SMCs) oder des mesenchymalen Gewebes (Tier 1229) ein. Es trat eine signifikante Nekrose der SMC-Zellen in der äußeren Zone der Tunica media ein. In Flächen, die anscheinend nur minimal durch den verdrillbaren Ballon traumatisiert worden waren, trat nur eine minimale bis keine zelluläre Nekrose ein. Dies zeigte an, dass traumatisierte Zellen leichter dazu neigten abzusterben, wenn sie dieser Dosis des Cytochalasin B ausgesetzt waren, aber dies zeigte auch an, dass diese Dose nicht zellzerstörend bezüglich der nur minimal traumatisierten oder normalen SMC-Zellen wirkte. Es trat eine minimale mononukleare und polymorphonukleare Zellinfiltration in die Tunica media ein. Es wurde gesehen, dass nur einige wenige Heterophile aus dem Gefäßlumen infiltrierten.

[0359] Im Kontrolltier (1228) trat eine geringere zelluläre Nekrose in der Tunica media ein, und die bestehende Nekrose war eher auf die innere als auf die äußere Zone der Gefäßwand lokalisiert. Deshalb scheint die Cytochalasin B-Inhibierung der Zellreparatur die Nekrose der Tunica media zu erhöhen. Der Kontrolle fehlte auch die Proliferation der Tunica media oder der Adventitia sowie die Organisation des perivaskulären Blutgerinnsels. Die zelluläre Infiltration in beliebige Flächen war minimal.

[0360] Zwei Wochen nach der Initiierung der Cytochalasin B-Behandlung traten eine vollständige Inhibierung der intimalen Proliferation und ein minimaler perivaskulärer Aufbau eines Blutgerinnsels ein, hauptsächlich in Folge der Fibrinausbildung und nicht als Folge der mesenchymalen Proliferation (Tier 1227). Es trat nur eine geringe Infiltration der polymorphonuklearen Zellen und eine minimale Infiltration der mononuklearen Zellen in die Tunica media und Adventitia ein. Es gab kein Endothelium in der Umhüllungsfläche mit der Ausnahme einiger weniger kleiner isolierter Fokusse. Die Kontrollarterie (Tier 1226) wies nur eine gemäßigte intimale und adventizielle Proliferation mit einem mesenchymalen Aufbau der perivaskulären Blutgerinnselfläche auf. Die Fokusse der endothelischen Proliferation waren im Kontrolltier größer und extensiver verglichen mit dem mit Cytochalasin B behandelten Gefäß.

[0361] Nach der dreiwöchigen Exposition (Tier 1212) bezüglich des Cytochalasin B in einer Silikonumhüllung, zeigte das Gefäß einen markanten Zellverlust in der Tunica media, der am heftigsten in der äußeren Zone war. Die zelluläre Infiltration in die Tunica media und Adventitia war minimal und die Endothelisierung trat nur in einigen wenigen focalen Gebieten auf. Es trat eine gemäßigte unregelmäßige intimale Proliferation ein, jedoch waren die intimalen Zellen und die wenigen endothelischen Zellen, die anwesend waren, nicht entwickelt und ohne Polarität. Die Inhibierung der Migration durch Cytochalasin B resultierte in diesem Verlust an Aufbau oder Polarität. Die intimale Proliferation im Kontrollgefäß war gleichfalls schwach (1230); jedoch war die Intima gut entwickelt und nahezu vollständig endothelisiert. Es gab nur einen minimalen Zellverlust aus der Tunica media. Deshalb wurde in den ersten zwei Wochen eine signifikante intimale Inhibierung in den behandelten Tieren der Gruppe 2 gesehen.

[0362] Die Gefäße der Tiere der Gruppe 3a und 3b wurden mit 8 mg Cytochalasin B in 100 mg eines Plurongels (F-127, BASF) behandelt, die von einer 1 cm × 1 cm-Rinderkollagenetz-Umhüllung getragen wurde. Eine Woche nach der Behandlung zeigte die mit Cytochalasin B behandelte Arterie des Tieres 1250 eine schwache intimale Proliferation, die bezüglich der Dicke unregelmäßig war. Es trat eine ungefähr 30%ige Re-Endothelisierung ein, und die Zellen der Tunica media waren lebensfähig mit dem signifikantesten Verlust (schwach) in der inneren Zone der Tunica media. Es trat eine markante pyogranulomatische Reaktion bezüglich des Plurongels im perivaskulären und adventiziellen Bereich ein. Die vollständige Thrombose der Kontrollarterie des Tieres 1261 verhinderte deren Auswertung.

[0363] Nach zwei Wochen stimulierte das Plurongel mit Cytochalasin B eine markante pyogranulomatische Reaktion im adventiziellen und perivaskulären Gewebe. Es trat eine schwache unregelmäßige intimale Proliferation ein.

feration und eine vollständige Endothelisierung ein. Die Zellen der Tunica media waren lebensfähig. Es schien ein schwacher Zellverlust aus der inneren Zone der Tunica media einzutreten. Die Arterie des Kontrolltieres (1247) zeigte eine schwache unregelmäßige intimale Proliferation, eine vollständige Endothelisierung mit prallen Endothelzellen und lebensfähigen Zellen in der Tunica media. Es trat eine markante pyogranulomatische Entzündungsreaktion als Folge der Überbleibsel des Plurongels ein.

[0364] Nach drei Wochen zeigten die Arterien der Tiere 1248 und 1246 Überreste der Kollagenumhüllung; jedoch war die Umhüllung im mit Cytochalasin B behandelten Tier (1248) weniger aufgelöst als in der Kontrolle (1246). Diese Verzögerung der Umhüllungsresorption kann aus der Inhibierung der Makrophagenmigration und Makrophagenfunktion resultieren. Sowohl die behandelte Arterie wie auch die Kontrollarterie zeigten nach drei Wochen eine gemäßigte Menge an intimaler Hyperplasia, so dass keine signifikante intimale Inhibierung durch Cytochalasin B eintrat, wenn dieses im Plurongel verabreicht wurde. Es wurden Fokusse dystrophischer Mineralisierung in der Arterie gesehen, die mit Cytochalasin B behandelt worden war. Deshalb konnte in diesen Tieren (Gruppe 3) nach 1, 2 oder 3 Wochen nach der Initiierung der Behandlung kein Inhibitionseffekt bezüglich der Intima beobachtet werden.

[0365] Die Arterien der Tiere der Gruppe 4a und b, welche mit 100 mg Cytochalasin B (10% Gewicht/Gewicht) in einer 1 g-Silikonumhüllung behandelt worden waren, zeigten zu allen Zeitpunkten eine signifikante Inhibierung der intimalen Proliferation. In der Arterie des Tieres 1259, die mit einer Cytochalasin B-Umhüllung behandelt worden war, trat nach einer Woche nach der Behandlung keine intimale Proliferation oder adventizielle Fibrose ein. Es gab ekstatische Gefäße in der Adventitia, und das perivaskuläre Blutgerinnsel war nicht entwickelt und bestand nur aus Fibrin. Es trat ein markanter Zellverlust aus der Tunica media insbesondere in der äußeren Zone ein. Es wurde gesehen, dass Heterophile die Tunica media infiltrierten. In der Kontrollarterie (1206) trat keine intimale Proliferation nach 1 Woche ein; jedoch trat ein früher Aufbau an Fibrin des perivaskulären Blutgerinnsels ein. Der Zellverlust aus der Tunica media war diffuser als in der Cytochalasin B-Umhüllung, der am heftigsten in der äußeren Zone war.

[0366] Die mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelte Arterie des Tieres 1253 zeigte nach zwei Wochen eine minimale intimale Proliferation, verglichen mit der mit der Umhüllung-behandelten Arterie der Kontrolle (1258), die eine maximale intimale Proliferation zeigte. Die intimale Proliferation in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie war unregelmäßig und schien das Ergebnis der Ausbildung mauerförmiger Thrombi zu sein, die die SMC infiltrierten. Es existierten nur lose dünne Schichten von Plättchen in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie, mit der marginalen Ausbildung von Heterophilen. Es trat keine Endothelisierung in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie und weniger als 20%-Endothelisierung in der Kontrollarterie ein. Das perivaskuläre Blutgerinnsel war nicht entwickelt und enthielt Fibrin in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie und war in der Kontrollarterie gut entwickelt. Die Kontrollarterie zeigte einen minimalen Zellverlust aus der Tunica media, während die mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelte Arterie einen markanten Zellverlust aufwies.

[0367] Nach drei Wochen zeigte die mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelte Arterie (1251) eine minimale bis keine intimale Proliferation. Die intimale Proliferation schien dort einzutreten, wo ein geringerer Zellverlust aus der Tunica media auftrat. Es trat eine frühe Re-Endothelisierung in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie ein, jedoch waren die Zellen oft abgerundet, lose angeheftet und nur wenige verstreute Fokusse anwesend (< 10%). Das perivaskuläre Blutgerinnsel in der mit der Cytochalasin B-Umhüllung behandelten Arterie war nicht entwickelt und bestand noch aus Fibrin, wohingegen die Kontrollarterie eine vollständige Thrombose und eine markante intimale Erzeugung in distalen Bereichen des Thrombus zeigte, welche weniger vollständig aufgebaut waren.

[0368] Die Arterien der Tiere in Gruppe 5a und b wurden mit 50 mg Taxol in 1 g einer Silikonumhüllung (5% Gewicht/Gewicht) behandelt. Diese Behandlung zeigte zu allen Zeitpunkten eine markante Inhibierung der intimalen Proliferation. Die mit der Taxol-Umhüllung behandelte Arterie (Tier 1278 nach 1 Woche) zeigte keine intimale oder adventizielle Proliferation und das perivaskuläre Blutgerinnsel bestand aus Fibrin und war nicht entwickelt. Es trat ein markanter Verlust an Zellen der Tunica media ein und es gab keinen endothelischen Belag. Die Kontrolle (1279) zeigte eine schwache intimale Proliferation mit einer sehr frühen Fibrose des Fibrin-haltigen perivaskulären Blutgerinnsels. Das Lumen war ungefähr zu 85% re-endothelisiert. Sowohl die behandelte wie auch die Kontrollarterie hatten eine schwache heterophile Infiltration in die Tunica media und Adventitia.

[0369] Die Arterie aus Tier 1281, das während einer Zeitdauer von zwei Wochen mit Taxol behandelt worden war, zeigte bei einer schwachen heterophilen Infiltration keine intimale Proliferation, kein minimale adventizielle

Fibrose und keine markante Zellnekrose in der Tunica media. Es gab fokale Bereiche der Nekrose und dystrophische Mineralisierung in der Adventitia und dem Gewebe des perivaskulären Blutgerinnsels. Die Arterie aus dem Kontrolltier (1280) zeigte eine gemäßigte intimale Proliferation mit einer markanten Organisation der Adventitia und des perivaskulären Blutgerinnsels. Das Lumen war zu 100% re-endothelisiert, und die SMC-Zellen der Tunica media waren in der Kontrollarterie lebensfähig.

[0370] Nach drei Wochen zeigte die mit der Taxol-Umhüllung behandelte Arterie (1242) keine intimale Proliferation und war zu 50% re-endothelisiert mit prallen Zellen, die endothelisch zu sein schienen. Es trat ein minimaler Aufbau des perivaskulären Blutgerinnsels und ein markanter Zellverlust aus der Tunica media ein. Es gab eine schwache Infiltration der Heterophilen in die Tunica media, und die Infiltration der luminalen Oberfläche des Gefäßes war marginal. Die Kontrollarterie (1234) zeigte eine markante intimale Proliferation und Fibrose der Adventitia und des perivaskulären Blutgerinnsels. Die Zellen in der Tunica waren lebensfähig.

[0371] In Gruppe 6a und 6b zeigten die Taxol-behandelten Arterien gleichfalls eine markante Inhibierung 2 Wochen nachdem die Umhüllung entfernt worden war. Das Tier 1276 hatte eine Taxol-Umhüllung für 2 Wochen, dann wurde die Umhüllung entfernt und das Tier 3 Wochen später geopfert. Nach einer 3-wöchigen Erholungsperiode nach der Entfernung der Taxol-Umhüllung (1276) trat nur eine minimale intimale Proliferation als Folge des SMC-Aufbaus mauerförmiger Thrombi in dieser Arterie mit der Ausnahme einiger weniger fokaler Bereiche ein, die verdickt zu sein schienen. Die Adventitia war gut entwickelt, und es gab einen signifikanten Zellverlust in der Tunica media, jedoch waren die anwesenden Zellen lebensfähig. Das Lumen war ungefähr zu 90% re-endothelisiert. Die Kontrollarterie (1277) zeigte eine markante intimale Proliferation, gut entwickeltes perivaskuläres und adventizielles Gewebe und war zu 100% re-endothelisiert.

[0372] Die Ergebnisse, die mit den Tieren aus Gruppe 7a beobachtet wurden, zeigten dass Arterien, die mit Cytochalasin B behandelt wurden (10% Gewicht/Gewicht) keine intimale Proliferation innerhalb von 2 Wochen aufwiesen. Die Abnahme in der Freisetzungsgeschwindigkeit des Cytochalasin B resultierte jedoch in einer schwachen intimalen Proliferation nach der dritten Woche nach der Anbringung der Umhüllung. Nach einer Woche (1257) wiesen die Arterien keine intimale Proliferation und eine markante Nekrose der SMCs der Tunica media mit einer gemäßigten Infiltration mit Heterophilen auf. Es bildete sich kein Endothel aus, und Heterophile und Makrophagen waren längs der Lumenoberfläche nur marginal anwesend. Darüber hinaus gab es keinen Hinweis auf Plättchenaggregate, die sich an die Gefäßwand anhefteten. Nach zwei Wochen (1265) waren die Arterien den Arterien morphologisch ähnlich, die nach einer Woche untersucht wurden. Nach drei Wochen (1266) zeigten die Arterien eine schwache unregelmäßige intimale Proliferation. Darüber hinaus waren die Heterophilen in der Tunica media selten, das Lumen war zu 70% re-endothelisiert und es trat eine frühe Fibrose in der Adventitia mit nichtentwickeltem perivaskulären Blutgerinnsel ein, das noch in den behandelten Arterien anwesend war. Dies zeigte an, dass nach 3 Wochen die Menge des therapeutischen Wirkstoffes unter das therapeutische Niveau innerhalb der Gefäßwand gefallen war; jedoch war immer noch genügend Arzneimittel vorhanden, um einen Inhibitoreffekt auf den Aufbau des Blutgerinnsels zu haben, das unmittelbar benachbart der Umhüllung anwesend war.

[0373] Bei den Arterien der Tiere der Gruppe 8, die mit 10% Cytochalasin B für 2 Wochen behandelt worden waren, wurde die Umhüllung entfernt und die Gefäße wurden 2 Wochen später beurteilt, und diese wiesen eine variable intimale Proliferation in und zwischen den Tieren auf. Die Arterie des Tieres 1254 zeigte eine variable intimale Proliferation, die von null bis schwach reichte, gut entwickelte adventizielle Fibrose, einen markanten Zellverlust in der Tunica media und fokale Bereiche der zellzerstörenden Mineralisierung in der äußeren Tunica media und Adventitia. Die Bereiche der schwachen intimalen Proliferation lagen an den Enden der Umhüllungsbereiche, was eine Infiltration aus den benachbarten unbehandelten Arterienbereichen vermuten ließ. Das Lumen war ungefähr zu 60% re-endothelisiert. Die Arterie des Tieres 1255 zeigte eine schwache bis gemäßigte intimale Proliferation, lebensfähige Zellen in der Tunica media und gut entwickeltes Gewebe in der Adventitia. Das Lumen war zu 100% re-endothelisiert. Die Arterie in Tier 1256 zeigte eine vollständige Thrombose. Benachbart zum chronischen Thrombus in der Fläche der Umhüllung trat ein akuter Thrombus auf und dort zeigte sich eine gemäßigte intimale Proliferation.

[0374] Während eine gemäßigte intimale Proliferation in den Arterien einiger Tiere auftrat, war die Proliferation in diesen Arterien immer noch geringer als in den Kontrollen in Gruppe 9b. Die Kontrollumhüllungen aus Mannit und Silikon befanden sich auf der Arterie zwei Wochen nach dem durch den Ballon verursachten Trauma und wurden dann entfernt, wobei das Tier dann getötet und die Arterie eine Woche nach der Entfernung der Umhüllung histologisch untersucht wurde. Zwei der Arterien (1267 und 1268) zeigten eine gemäßigte intimale Proliferation mit einer 100%igen Re-Endothelisierung und eines hatte eine maximale Proliferation. Das eine Tier mit der maximalen intimalen Proliferation zeigte einen akuten verstopfenden Thrombus.

[0375] Die Arterien in den Tieren der Gruppe 10 und 11 wurden mit 10 mg Cytochalasin B behandelt, das auf 1 g der Silikonumhüllung geladen war (1% Gewicht/Gewicht) und wurde der Arterie für 2 Wochen appliziert, chirurgisch entfernt und 2 oder 4 Wochen später jeweils histologisch bewertet. Es wurde kein signifikanter Unterschied durch qualitative Auswertung zwischen den Test- und Kontrolltieren gesehen. Die Tiere 1304 und 1305 hatten für 2 Wochen eine Cytochalasin B-Umhüllung (1%), welche dann entfernt wurde. Zwei Wochen nach der Entfernung wurde das Tier geopfert. Die Arterie aus Tier 1304 zeigte eine gemäßigte intimale Proliferation in den meisten Bereichen der Umhüllung, in den Bereichen der Zellen der Tunica media eine markante Nekrose, wobei die Proliferation eine schwache Wand-zerstörende Mineralisierung aufwies. Es trat eine 100%ige Re-Endothelisierung ein, und es waren keine Heterophile in der Intima oder der Tunica media anwesend. Die Adventitia und der Bereich des perivaskulären Blutgerinnsels waren gut ausgebildet. Die Arterie aus Tier 1305 war morphologisch ähnlich der Arterie aus Tier 1304. Die Arterie aus Tier 1306 zeigte eine markante intimale Proliferation, keine Infiltration durch Heterophile in der Intima oder Tunica media und war zu 100% re-endothelisiert.

[0376] Die Tiere 1307, 1308 und 1309 waren der Cytochalasin B(1%)-Umhüllung 2 Wochen lang ausgesetzt, welche dann entfernt wurde. Vier Wochen nach der Entfernung wurden die Tiere geopfert. Die Arterie aus Tier 1307 zeigte eine gemäßigte intimale Proliferation mit fokalen Bereichen der Verdickung in Folge eines mauerförmigen Aufbaus eines Thrombus durch SMCs. Es trat ein signifikanter Verlust an Zellen aus der Tunica media ein, und die elastischen Lumina schienen kollabiert zu sein. Einige wenige Heterophile waren in der Adventitia anwesend. Es gab Bereiche oder Abschnitte im Umhüllungsbereich mit minimaler intimaler Proliferation. Die Arterie aus Tier 1308 zeigte eine gemäßigte intimale Proliferation mit Bereichen eines markanten Zellverlustes in der Tunica media und einer zellzerstörenden Mineralisierung in der äußeren Zone der Tunica media. Das Gefäß war zu 100% re-endothelisiert. Die Arterie aus Tier 1309 wies eine markante intimale Proliferation mit einer gut ausgebildeten Adventitia und einem perivaskulären Bereich auf. Das Tier 1311 wurde in Folge der Thrombose nicht ausgewertet. Die Resultate der Arterie aus Tier 1312 waren ziemlich variabel, mit Abschnitten, die einen Bereich der intimalen Proliferation zeigten, der von schwach bis gemäßigt reichte. Die Endothelisierung schien in diesen Arterien vollständig zu sein.

[0377] Die Arterien der Tiere aus Gruppe 12 (Arterien von Oberschenkeln von Schweinen), welche mit Silikonumhüllungen behandelt worden waren, die mit 30% Gewicht/Gewicht Cytochalasin B beladen waren, zeigten während der ersten zwei Wochen eine signifikante Inhibierung der intimalen Proliferation. Während eine intimale Proliferation in den Arterien 3 Wochen später eintrat, war diese immer noch geringer, als die Proliferation, die in den Kontrollen beobachtet wurde.

TABELLE 16

TIER- NUMMER	GRUPPEN- NUMMER	BEHANDLUNG	DATUM DES CHIRURGISCHEN EINGRIFFS	DATUM DER NEKROPSIE	ZEIT NACH DER BEHANDLUNG	GRAD
1233	1a	Cytochalsin B+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	07.03.96	1 Woche	1
1249	1b	Kontrolle+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	07.03.96	1 Woche	3
1224	1a	Cytochalsin B+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	15.03.96	2 Wochen	2
1222	1b	Kontrolle+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	15.03.96	2 Wochen	3
1244	1a	Cytochalsin B+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	20.03.96	3 Wochen	1
1232	1b	Kontrolle+Rinderkollagenel+Kollagenmaterial	28.02.96	20.03.96	3 Wochen	3
1229	2a	Cytochalsin B 30 %+ Silikon	22.02.96	28.02.96	1 Woche	0
1228	2b	Kontrolle+ Silikon	22.02.96	28.02.96	1 Woche	2
1227	2a	Cytochalsin B 30 %+ Silikon	22.02.96	07.03.96	2 Wochen	0
1226	2b	Kontrolle+ Silikon	22.02.96	07.03.96	2 Wochen	3
1212	2a	Cytochalsin B 30 %+ Silikon	22.02.96	15.03.96	3 Wochen	2
1230	2b	Kontrolle+ Silikon	22.02.96	15.03.96	3 Wochen	2
1250	3a	Cytochalsin B+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	15.03.96	1 Woche	2

TIER- NUMMER	GRUPPEN- NUMMER	BEHANDLUNG	DATUM DES CHIRURGISCHEN EINGRIFFS	DATUM DER NEKROPSIE	ZEIT NACH DER BEHANDLUNG	GRAD
1261	3b	Kontrolle+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	15.03.96	1 Woche	k.B.
1245	3a	Cytochalasin B+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	20.03.96	2 Wochen	2
1247	3b	Kontrolle+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	20.03.96	2 Wochen	2
1248	3a	Cytochalasin B+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	28.03.96	3 Wochen	3
1246	3b	Kontrolle+Plurongel+Kollagenumhüllung	07.03.96	28.03.96	3 Wochen	3
1259	4a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	08.04.96	15.04.96	1 Woche	0
1260	4b	Kontrolle-Mannit+Silikon	08.04.96	15.04.96	1 Woche	0
1253	4a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	08.04.96	22.04.96	2 Wochen	1
1258	4b	Kontrolle-Mannit+Silikon	08.04.96	22.04.96	2 Wochen	4
1251	4a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	08.04.96	29.04.96	3 Wochen	0
1252	4b	Kontrolle-Mannit+Silikon	08.04.96	29.04.96	3 Wochen	4
1278	5a	Taxol+Silikon	20.03.96	02.03.96	1 Woche	0
1279	5b	Kontrolle-Silikon	20.03.96	28.03.96	1 Woche	2
1281	5a	Taxol+Silikon	20.03.96	04.04.96	2 Wochen	1
1280	5b	Kontrolle-Silikon	20.03.96	04.04.96	2 Wochen	3
1242	5a	Taxol+Silikon	07.03.96	28.03.96	3 Wochen	0
1243	5b	Kontrolle-Silikon	07.03.96	28.03.96	3 Wochen	4

TIER- NUMMER	GRUPPEN- NUMMER	BEHANDLUNG	DATUM DES CHIRURGISCHEN EINGRIFFS	DATUM DER NEKROPSIE	ZEIT NACH DER BEHANDLUNG	GRAD
1276	6a	Taxol+Silikon	20.03.96	23.04.96	2 Wchn - 3 Wchn	1
1277	6b	Kontrolle-Silikon	20.03.96	23.04.96	2 Wchn - 3 Wchn	4
1257	7a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	16.05.96	23.05.96	1 Woche	0
1265	7a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	16.05.96	23.05.96	2 Wochen	0
1266	7a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	16.05.96	06.05.96	3 Wochen	2
1254	8a	Achtung: Siehe Kontrollfälle Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	1260 = 1 Woche 16.05.96	1258 = 2 Wchn 11.06.96	1252 = 3 Wochen 2 Wchn - 2 Wchn	0-2
1255	8a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	16.05.96	11.06.96	2 Wchn - 2 Wchn	2-3
1256	8a	Cytochalasin B 10 %-Mannit+Silikon	16.05.96	11.06.96	2 Wchn - 2 Wchn	3
1267	9b	Kontrolle-Mannit+Silikon	23.05.96	14.06.96	2 Wchn - 1 Woche	3
1268	9b	Kontrolle-Mannit+Silikon	23.05.96	14.06.96	2 Wchn - 1 Woche	3
1269	9b	Kontrolle-Mannit+Silikon	23.05.96	14.06.96	2 Wchn - 1 Woche	4
1304	10a	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	09.07.96	2 Wchn - 2 Wchn	3
1305	10a	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	09.07.96	2 Wchn - 2 Wchn	3

TIER- NUMMER	GRUPPEN- NUMMER	BEHANDLUNG	DATUM DES CHIRURGISCHEN EINGRIFFS	DATUM DER NEKROPSIE	ZEIT NACH DER BEHANDLUNG	GRAD
1306	10b	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	09.07.96	2 Wchn - 2 Wchn	4
1307	11a	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	3
1308	11a	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	3
1309	11a	Cytochalasin B 1 %-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	kein. B.
1310	11b	Kontrolle-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	4
1311	11b	Kontrolle-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	kein. B.
1312	11b	Kontrolle-Mannit+Silikon	10.06.96	22.07.96	2 Wchn - 4 Wchn	3
1029LF	12e	Cytochalasin B 30 %-Silikonumhüllung	01.02.96	22.02.96	3 Wochen	2
1020RF	12f	Kontrolle-Silikonumhüllung	01.02.96	22.02.96	3 Wochen	3
1030LF	12e	Cytochalasin B 30 %-Silikonumhüllung	07.02.96	22.02.96	2 Wochen	1
1030RF	12d	Kontrolle-Silikonumhüllung	07.02.96	22.02.96	2 Wochen	4
1036LF	12a	Cytochalasin B 30 %-Silikonumhüllung	01.02.96	07.02.96	1 Wochen	1
1036RF	12b	Kontrolle-Silikonumhüllung	01.02.96	07.02.96	1 Wochen	1

[0378] Zusammenfassend wurde die intimale Proliferation traumatisierter Arterien von Schweinen signifikant sowohl durch Cytochalasin B als auch durch Taxol in einer Dosierungsform der anhaltenden Freisetzung inhibiert. Die am besten gesteuerte anhaltende Freisetzung des therapeutischen Wirkstoffes wurde ohne die Auslösung sekundärer Entzündungsreaktion durch ein adventizielles Umhüllungsmaterial erhalten, welches Silikon umfasste. Die Silikonumhüllungen inhibierten die intimale Proliferation mit einer 30%igen und 10%igen Beladung an Cytochalasin B; wenn jedoch das Niveau der Freisetzung zwischen 3 und 2 Wochen abfiel, trat eine Initiierung der intimalen Proliferation ein. Wenn die Umhüllungen 2 Wochen am Platze gelassen, dann chirurgisch entfernt und die Arterien 1 bis 4 Wochen später überprüft wurden, schien eine Erholung der intimalen

Proliferation einzutreten. Die Erholung trat dann ein, wenn die intimale Proliferation der Arterie, die mit dem therapeutischen Wirkstoff behandelt wurde, sich zwar der intimalen Proliferation in der Kontrollarterie annäherte, aber immer noch geringer als diese war. Das Tier, das mit Taxol behandelt worden war, schien für diese Arterien einen geringeren Erholungseffekt zu besitzen als für Arterien, die mit Cytochalasin B behandelt worden waren.

BEISPIEL 18

Zuführung von kristallinen Cytochalasin B oder von Taxol

[0379] Die in vivo-Gewebeverteilung von Cytochalasin B, das in kristalliner Form verabreicht wurde, wurde in Oberschenkelarterien von Schweinen, die durch einen Ballon traumatisiert worden waren, nach der lokalen Zufuhr bewertet. Eine Oberschenkelarterie eines gekreuzten Yorkshire-Schweines wurde mittels eines Ballons durch Überaufblähung und Drehung eines Vasculo-Flo™-Silikon-Embolektomie-Katheters traumatisiert. Dem durch den Ballon verursachten Trauma folgte drei Minuten lang unmittelbar eine intravaskuläre Zufuhr von 10 µg/ml ³H-Cytochalasin B-Kristallen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Salzlösung (gesättigt) unter einem Druck von 1 atm. Der Blutfluss wurde in der Arterie fünf Minuten lang vor der Tötung des Tieres fortgesetzt. Eine Analyse der Gewebeverteilung des ³H-Cytochalasin B zeigte, dass diese Methode für die Zufuhr von 31 µg des ³H-Cytochalasin B wirksam war, welches sich hauptsächlich an der Adventitia befand. ³H-Cytochalasin B wurde histologisch durch die Anwesenheit von Silberkörnern in einer autoradiografischen Emulsion sichtbar gemacht. Deshalb zeigten diese Ergebnisse, dass kristallines Cytochalasin B lokal einer Gefäßwand in vivo zugeführt werden kann.

[0380] Eine weitere Studie wurde an zwanzig männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Ratten durchliefen an ihrer linken Halsschlagader ein durch einen Ballon verursachtes Trauma, worauf eine interarterielle Infusion einer Lösung folgte, die 1 mg kristallines Cytochalasin B in 300 ml eines Vehikels (Hanks sterile Salzlösung mit 0,5% Cremophor) oder eine Verdünnungskontrolle (Salzlösung) enthielt. Die Tiere wurden unmittelbar nach der Infusion sowie 2, 4, 7 und 14 Tage nach dem Trauma und der Infusion getötet. Bei den später getöteten Tieren wurden die linken und die rechten (Kontrol-)Halsschlagadern entfernt. Proben der Arterien wurden für die Quantifizierung des ³H-Cytochalasin B durch Oxidation und Scintillationszählung, Histopathologie, Autoradiografie und vaskuläre Morphometrie entnommen. Die Histopathologie ergab in der Arterienwand der linken Halsschlagarterien ein gleichförmiges umfängliches Trauma, das durch den Ballon verursacht wurde.

[0381] Autoradiografisch waren Cytochalasin B-Kristalle am Tag 0 in den intraluminalen Fibringerinnseln anwesend, die der Intima anhafteten, die aber kaum in der Adventitia gegenwärtig waren. Am Tag 2 verringerte sich die Anzahl der Kristalle verglichen mit Tag 1, und am Tag 4 waren die Kristalle durch Autoradiografie nicht detektierbar. Die Ergebnisse der Autoradiografie korrelierten eng mit der quantitativen Auswertung des ³H-Cytochalasin B durch Oxidation und Scintillationszählung, in welcher ungefähr 8 µg des Cytochalasin B über die behandelte Länge der Arterie am Tag 0 und etwas weniger als 2 ng am Tag 2 anwesend waren. Jedoch hatte eines der zwei geopfert Tiere am Tag 4 immer noch Cytochalasin B-Mengen, die über dem Untergrundrauschen lagen. Die morphometrische Analyse der linken Halsschlagarterien von Ratten, die mit kristallinen Cytochalasin B behandelt wurden zeigten im Vergleich zu Ratten, die mit verdünntem Cytochalasin B behandelt wurden, keine statistisch signifikante Reduktion der Bildung der Neointima. Jedoch wiesen die fünf behandelten Ratten einen höheren mittleren luminalen Bereich und einen kleineren neointimalen Bereich auf als die mit dem verdünnten Mittel behandelte Kontrolle.

[0382] Cytochalasin B und Taxol wurden periadvenziell verabreicht. Drei Gruppen von sieben erwachsenen männlichen Ratten wurden dem durch einen Ballon verursachten Trauma der linken Halsschlagarterie unterzogen, worauf unmittelbar die periadvenzielle Einbringung entweder von Cytochalasin B-Kristallen (7,8–11,8 mg/Ratte), Taxol-Kristallen (3,4–6,5 mg/Ratte) oder keinem Arzneimittel (Kontrolle) erfolgte. Die Cytochalasin B- und Taxol-Kristalle wurden in einem gleichförmigen Muster aufgebracht, welche die chirurgisch exponierte Oberfläche der Halsschlagarterie bedeckte, worauf die Bedeckung der umgebenden subkutanen Haut und des Gewebes durch Nähte folgte. Vierzehn Tage später wurden die Ratten geopfert und ihre Halsarterien für histologische und morphometrische Analyse weiter verarbeitet.

[0383] Zwei Tiere, die mit Cytochalasin B behandelt worden waren, starben in Folge einer akuten Hämorrhagie am Orte des chirurgischen Eingriffs und in Folge eines hypovolämischen Schocks vordem 14 Tage-Opferungszeitpunkt. Zwei zusätzliche mit Cytochalasin B behandelte und ein mit Taxol behandeltes Tier wurden geopfert, wobei sich das subkutane Anschwellen und die Hämorrhagie am Orte des chirurgischen Eingriffs vor

dem 14-Tage-Opferungszeitpunkt schnell ausweiteten. Alle Tiere, die entweder mit Cytochalasin B- oder Taxol-Kristallen behandelt wurden, zeigten eine signifikante Toxizität am Orte des chirurgischen Eingriffs, welche durch variierende Grade der Hämorrhagie, der Nekrose der Gefäßwand, der Nekrose des benachbarten Skelettmuskels und durch Entzündung charakterisiert war. Zusätzlich zeigten sowohl die mit Taxol wie auch die mit Cytochalasin B behandelten Tiere eine Verzögerung in der Gewichtszunahme nach dem chirurgischen Eingriff.

[0384] Die drei mit Cytochalasin B behandelten, die 6 mit Taxol behandelten und die 7 Kontrolltiere, die bis zum 14-Tage-Opferungszeitpunkt überlebten, wurden morphometrisch ausgewertet. Die mit Taxol behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den mit dem Ballon traumatisierten unbehandelten Kontrolltieren in einem zweiseitigen T Test mit $p < 0,05$ statistisch signifikant größere luminale Flächen und keine neointimale Proliferation auf. Die mit Cytochalasin B behandelte Tiere zeigten keinen statistischen Unterschied zu den Kontrollen im luminalen Bereich, dem neointimalen Bereich, dem medialen Bereich, den Bereichen, die in die internalen und externalen elastischen Lamina eingebunden waren oder dem Verhältnis von intimalen zu medialen Bereichen.

[0385] Um weiter die Wirksamkeit des kristallinen Taxols bezüglich der Inhibierung der neointimalen Bildung in Ratten beurteilen zu können, wurden vier Gruppen von 5–6 erwachsenen männlichen Ratten einem durch einen Ballon verursachten Trauma der linken Halsschlagarterie unterworfen, wobei unmittelbar darauf eine periadvenzielle Zufuhr von 1, 0,1, 0,01 oder 0 mg von Taxol-Kristallen in 500 mg eines Pluronpolymers in einer Gelmatrix folgte. Vierzehn Tage später wurden die Ratten geopfert, das Serum wurde isoliert und ihre Halsschlagarterien wurden für die histologische und morphometrische Analyse weiterverarbeitet.

[0386] Fünf Tiere (3,1 mg und 2–0,01 mg) starben nach dem chirurgischen Eingriff in Folge technischer Schwierigkeiten. In grober Weise trat jeweils eine Myonekrose der benachbarten Skelettmuskulatur (fahlweiße Bereiche der Muskulatur) in 3/3, 1/5, 0/4 und 0/5 Tieren in den Gruppen mit 1 mg, 0,1 mg, 0,01 mg und den Kontrollgruppen auf. Histologisch wurde die Myonekrose in der benachbarten Skelettmuskulatur und in einigen Bereichen der Tunica media der linken Halsschlagader in der Gruppe mit der Behandlung mit 1 mg festgestellt, aber nicht in den anderen Gruppen.

[0387] Morphometrisch gab es keine statistische Signifikanz im luminalen Bereich, im neointimalen Bereich, in Bereichen, die durch die internalen elastischen Lamina begrenzt waren, im Bereich der Tunica media, in Bereichen, die durch das Verhältnis der externalen elastischen Lamina oder der neointimalen zu den medialen Bereichen begrenzt waren, wenn sie durch Varianzanalyse unter Verwendung der Datenanalyse der Excel-Software verglichen wurden.

[0388] Periadvenzielle Behandlung von Halsschlagarterien der Ratten mit 1 mg Taxol-Kristallen in 500 mg eines Pluron-Gels resultierte in einer häßlichen Myonekrose der benachbarten Muskulatur. Während die Anzahl der Tiere, die in dieser Gruppe überlebte, zu niedrig für eine statistisch signifikante Auswertung der Reduktion der neointimalen Bildung war, war der neointimale Bereich 38% niedriger als der der Kontrolltiere.

[0389] Bei Tieren, die mit 0,1 und 0,01 mg Taxol behandelt wurden, wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Erniedrigung des neointimalen Bereichs und des Verhältnisses des neointimalen zum medialen Bereich beobachtet, obwohl dies in Folge der kleinen Anzahl der Tiere pro Gruppe statistisch nicht signifikant war. Darüber hinaus zeigten Tiere in den Gruppen mit der niedrigeren Dosierung keine (0,01 mg) minimale (0,1 mg) oder eine begrenzte (1,0 mg) Toxizität, was anzeigte, dass geringere Dosen wirksam sein können und weniger nachteilige Nebenwirkungen hervorrufen als Dosen, die höher als 1,0 mg sind.

Patentansprüche

1. Therapeutischer Shunt, umfassend eine Menge eines Cytoskelettinhibitors in fester Form, welche die Stenose oder Restenose nach Einsetzen des therapeutischen Shunts wirksam inhibiert oder reduziert, wobei die feste Form kristallin ist.

2. Therapeutische Umhüllung der Adventitia, umfassend eine Menge eines Cytoskelettinhibitors in fester Form, welche die Stenose oder Restenose nach Einsetzen der therapeutischen Umhüllung wirksam inhibiert oder reduziert, wobei die feste Form kristallin ist.

3. Therapeutischer Shunt oder Umhüllung der Adventitia nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Cytoskelettinhibitor ein Cytochalasin oder ein Analogon davon oder Taxol oder ein Analogon davon umfasst.

4. Therapeutischer Shunt oder Umhüllung der Adventitia nach Anspruch 1 oder 2, umfassend etwa 5 bis 70 Gewichtsprozent eines Cytochalasins oder 30 bis 70 Gewichtsprozent Taxol.

5. Therapeutische Vorrichtung, umfassend einen mit einem künstlichen Transplantat belegten Stent, wobei das künstliche Transplantat eine Menge eines Cytoskelettinhibitors umfasst, welche die Stenose oder Restenose nach Einsetzen der therapeutischen Vorrichtung wirksam inhibiert oder reduziert, wobei der Cytoskelettinhibitor ein Cytochalasin, Taxol, oder ein Analogon davon umfasst und wobei das künstliche Transplantat etwa 5 bis 70 Gewichtsprozent eines Cytochalasins oder 30 bis 70 Gewichtsprozent Taxol in fester Form umfasst, wobei die feste Form kristallin ist.

6. Therapeutischer Shunt oder Umhüllung der Adventitia nach Anspruch 4, umfassend 10 bis 30 Gewichtsprozent eines Cytochalasins.

7. Therapeutischer Shunt oder Umhüllung der Adventitia nach Anspruch 4, umfassend 30 bis 50 Gewichtsprozent Taxol.

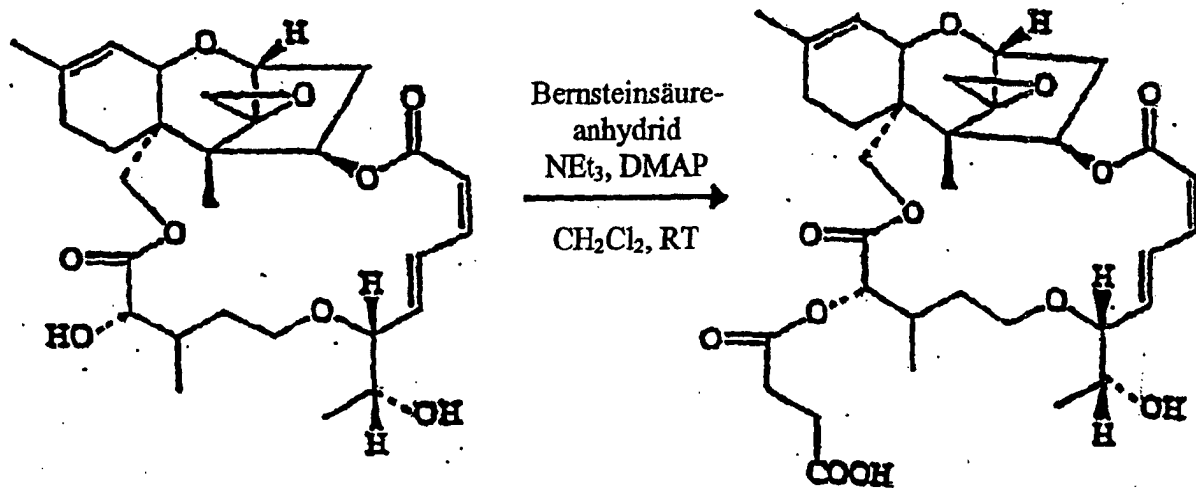
Es folgen 23 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1A



FIGUR 1B



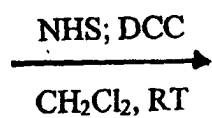


RORIDIN A

1

RORIDIN A-HEMISUCCINAT

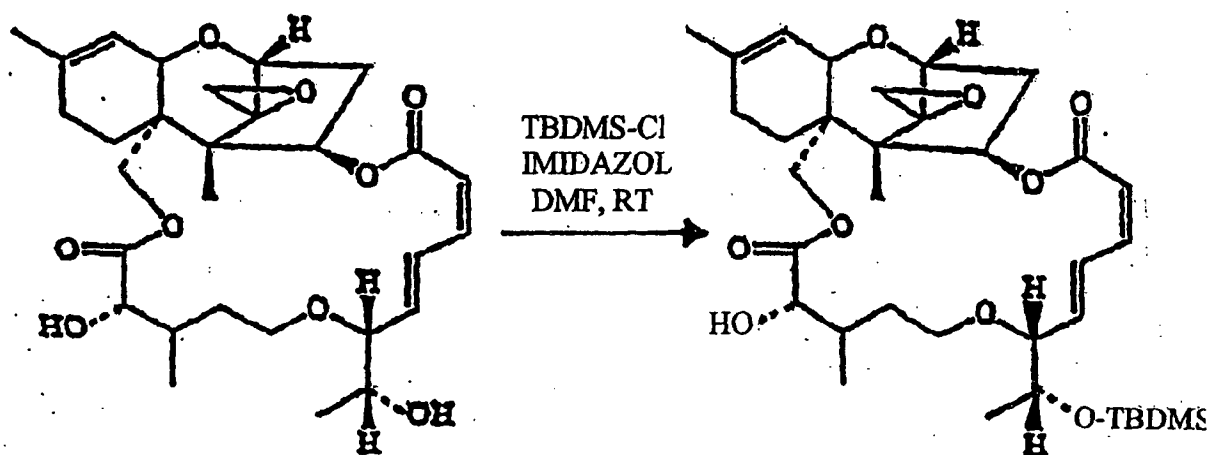
2



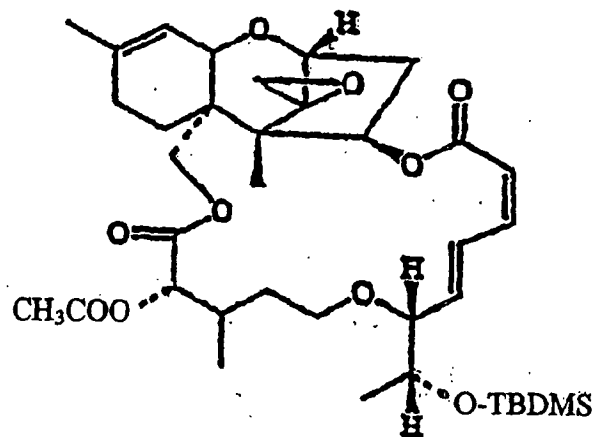
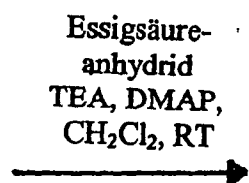
RORIDIN A-HEMISUCCINYL-SUCCINIMIDAT
(RA-HS-NHS)

3

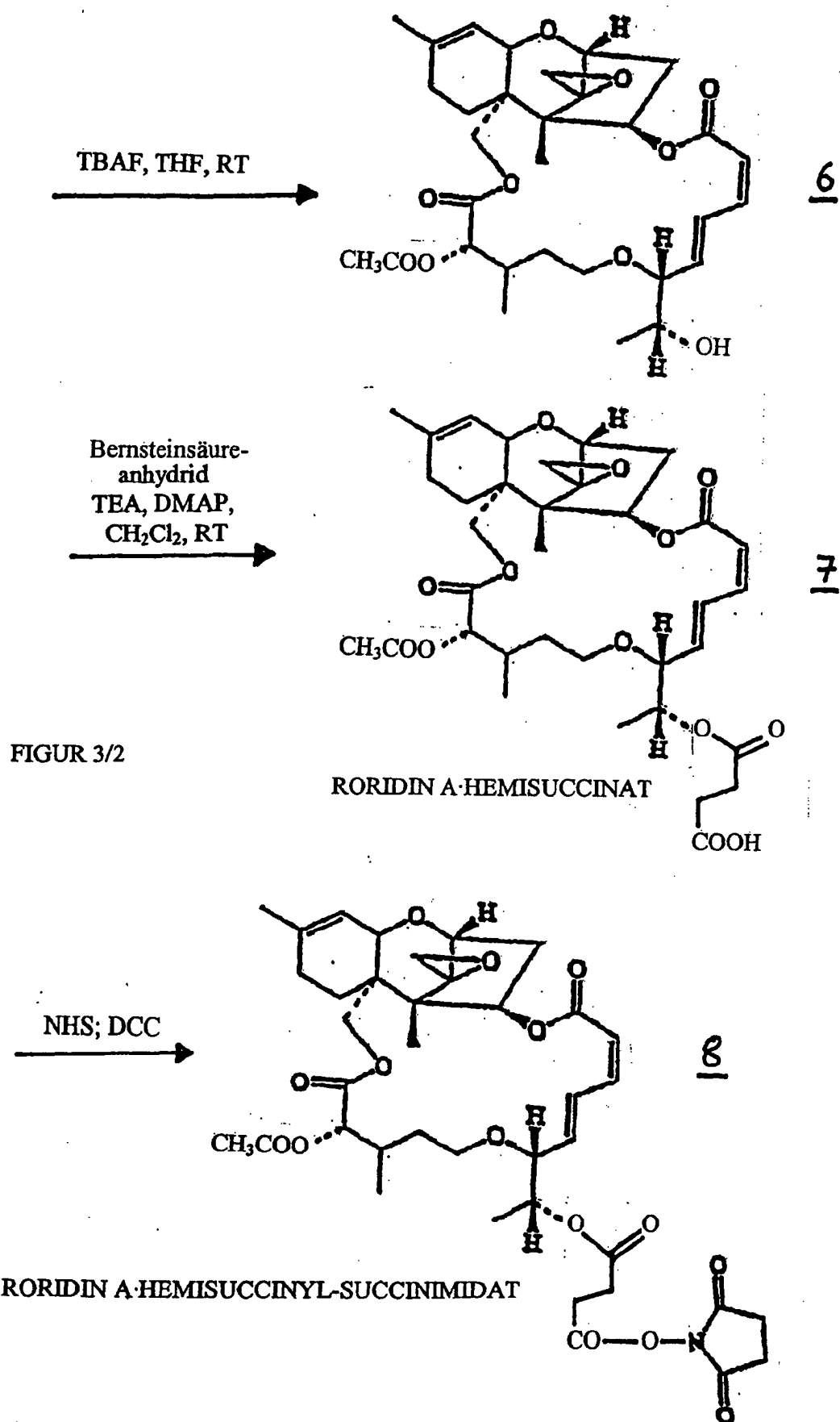
FIGUR 2



RORIDIN A

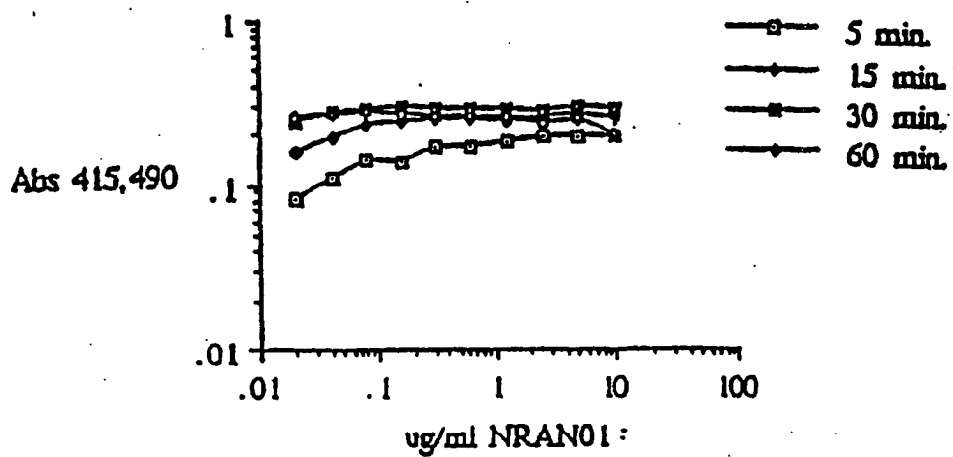
145

FIGUR 3/1



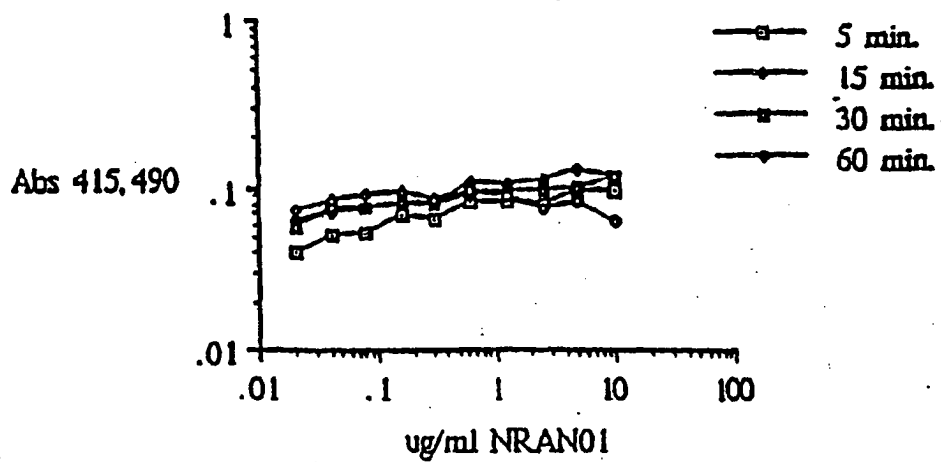
Figur 4A

Kinetik von NRAN01 bezüglich A375m/m



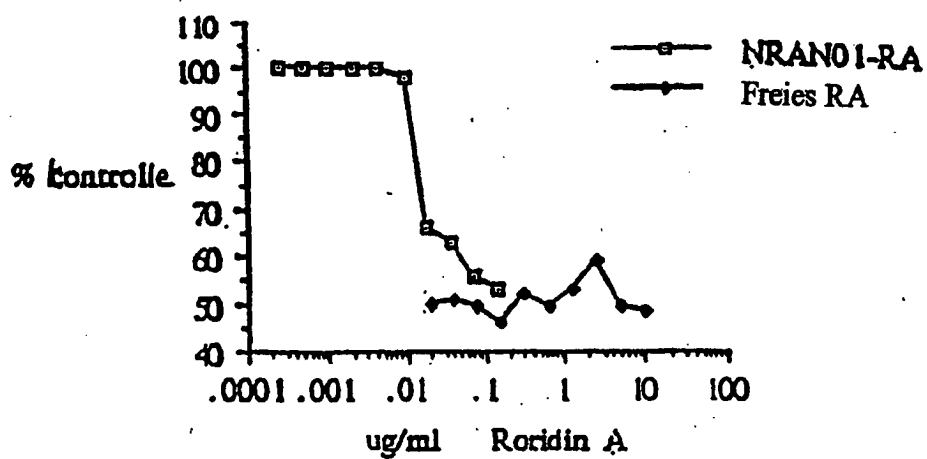
Figur 4B

Kinetik von NRAN01 bezüglich BO54



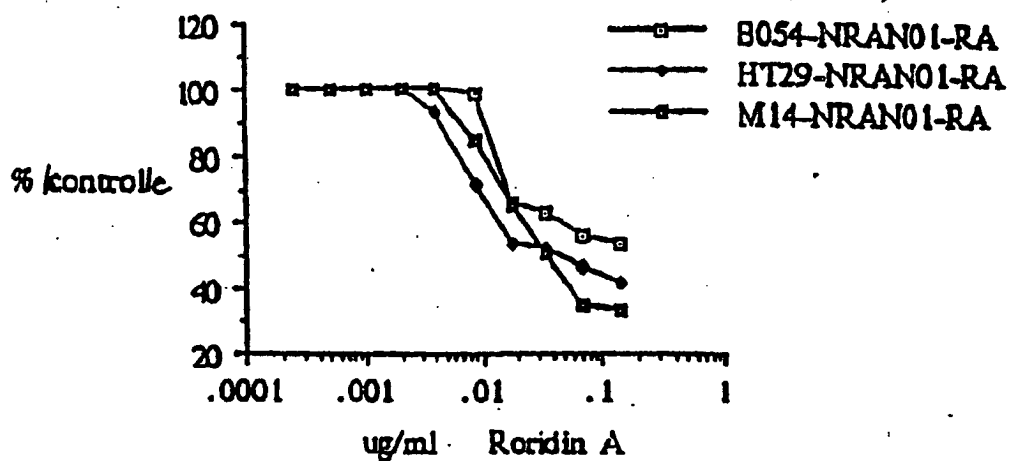
Figur 5A

24stündige Roridin A-o/n-Erholung bez. BO54



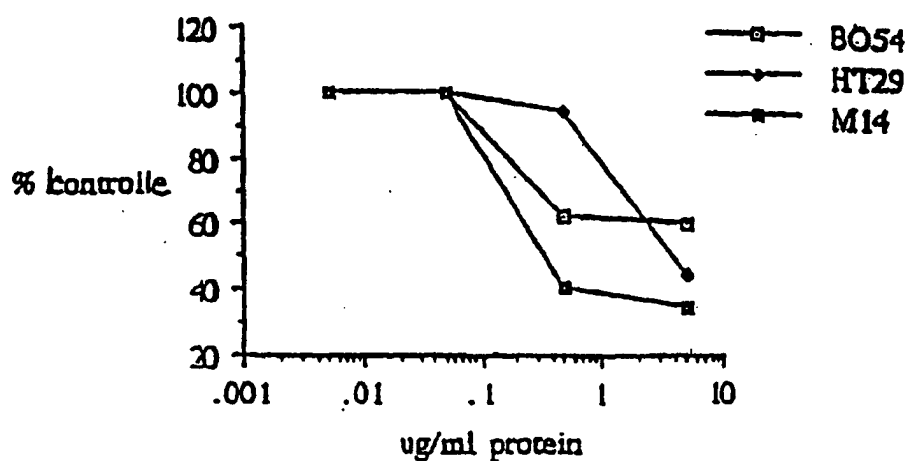
Figur 5B

24stündige Exposition von NRAN01-o/n-Erholung bez. BO54, HT29, M14



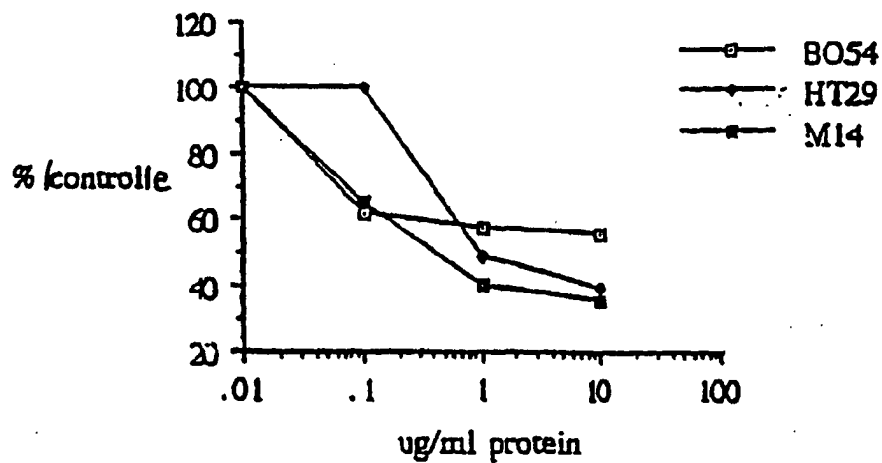
Figur 6A

24stündige Exposition von NRAN01-PE-o/n-Erholung bez. BO54, HT29, M14



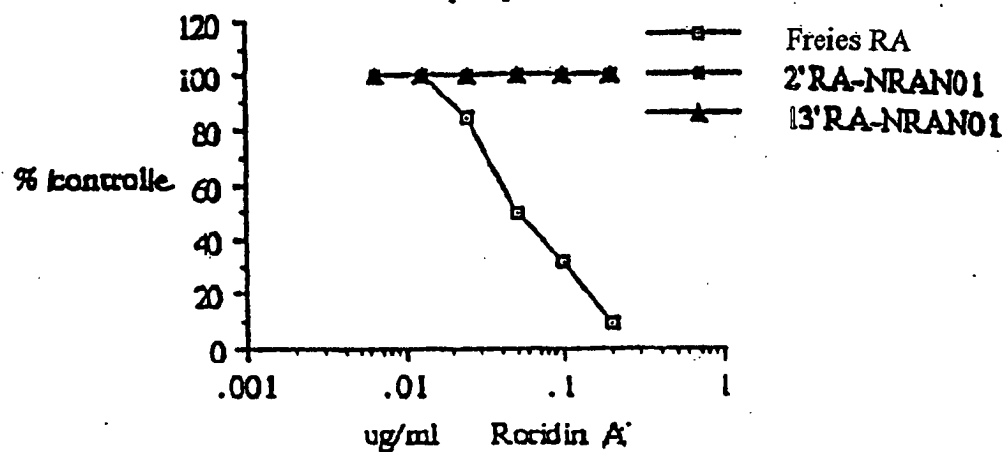
Figur 6B

24stündige Exposition von PE-o/n-Erholung bez. BO54, HT29, M14



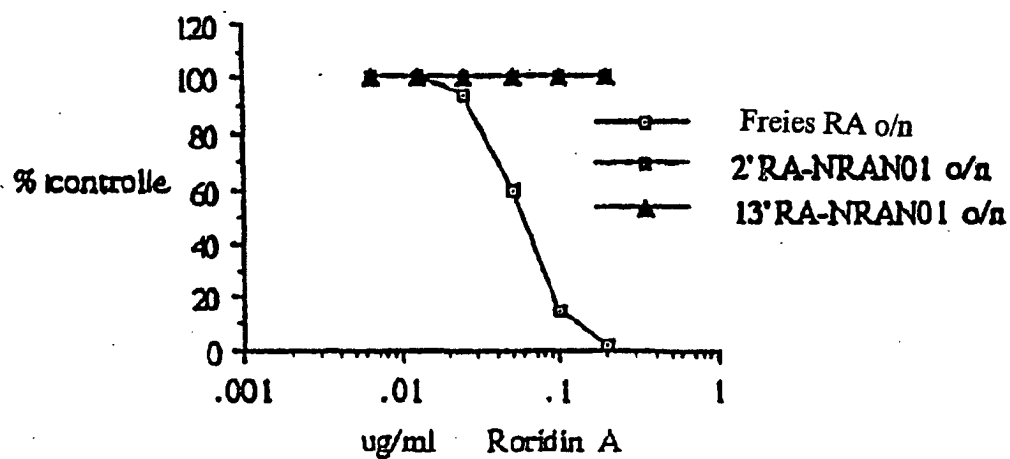
Figur 7A

5 min. Roridin A, direkt [3H]Leucin - 4 Std. bez. HT29



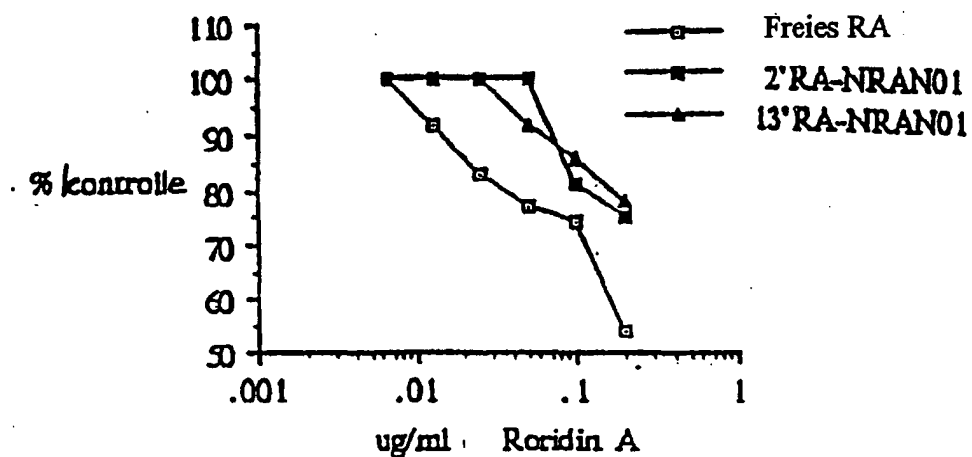
Figur 7B

5 min Roridin A, o/n-Erholung, [3H]Leucin - 4 Std. bez. HT29



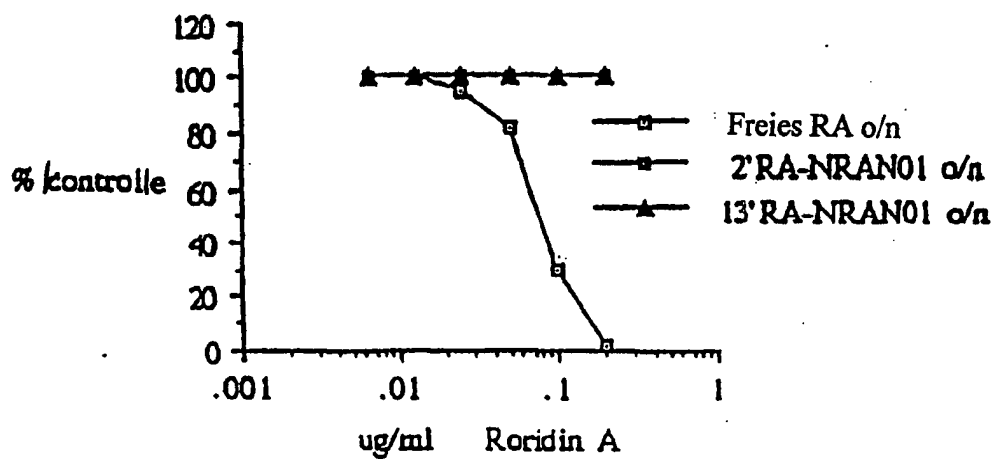
Figur 7C

5 min. Roridin A, direkt [3H]Leucin - 4 Std. bez. A375m/m

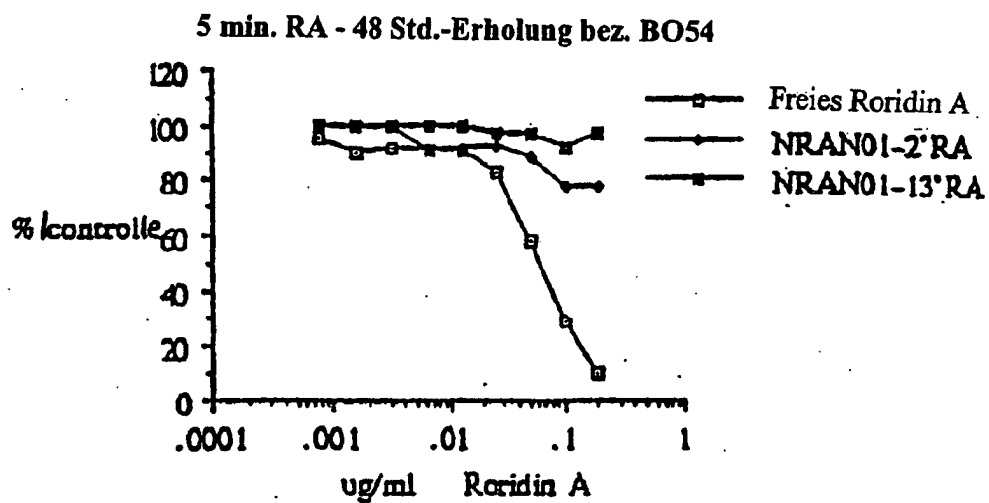


Figur 7D

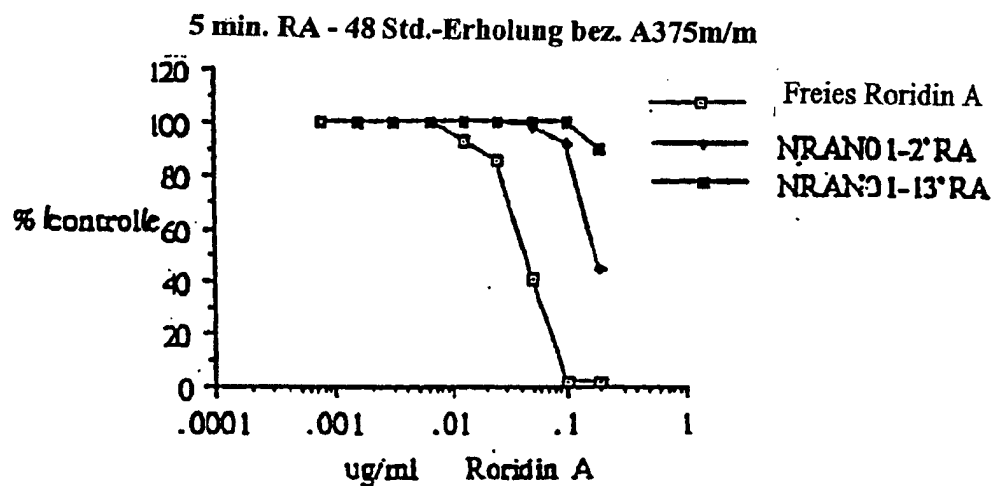
5 min Roridin A, o/n-Erholung, [3H]Leucin - 4 Std. bez. A375m/m



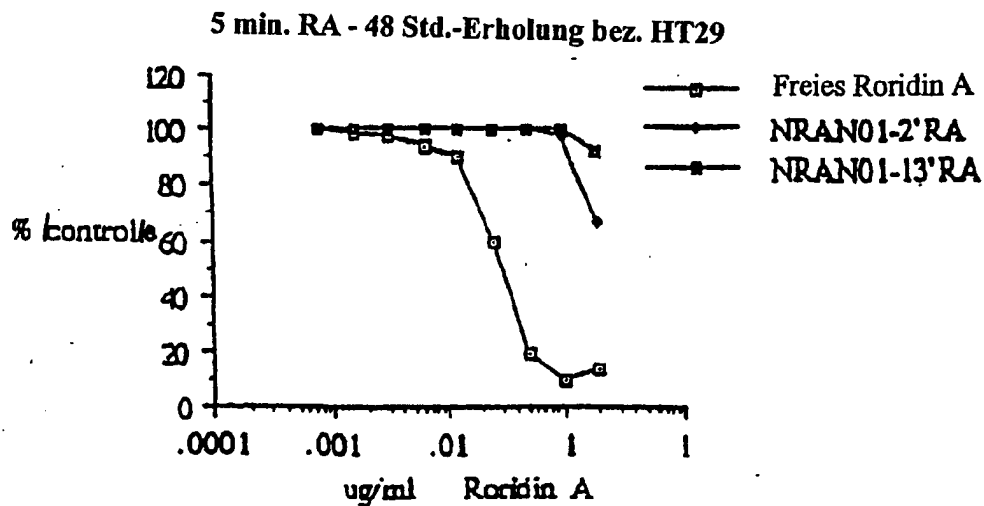
Figur 8A

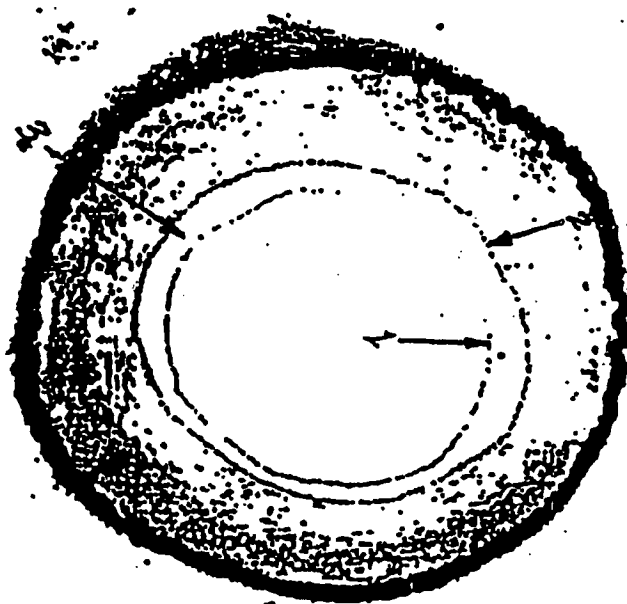


Figur 8B



Figur 8C



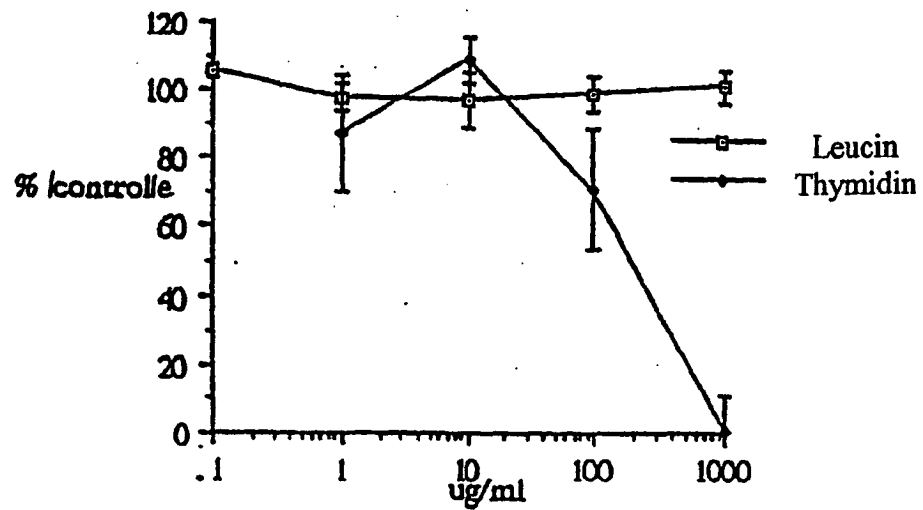


Figur 9A

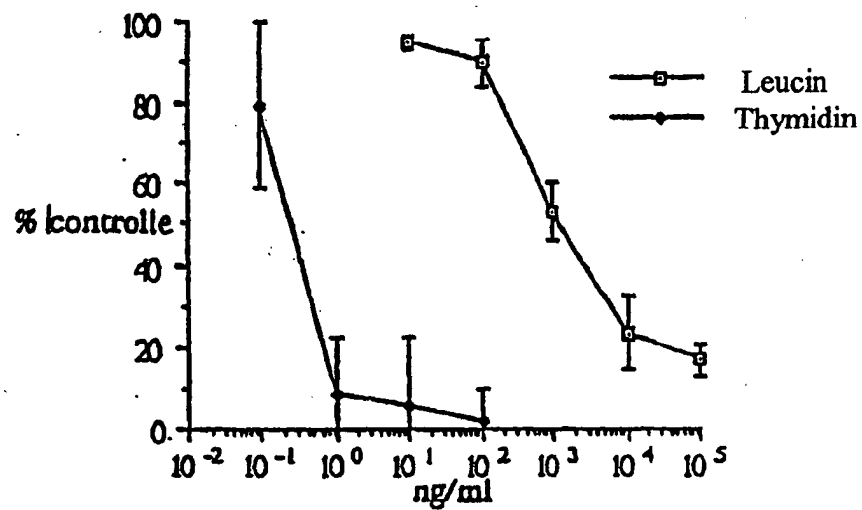


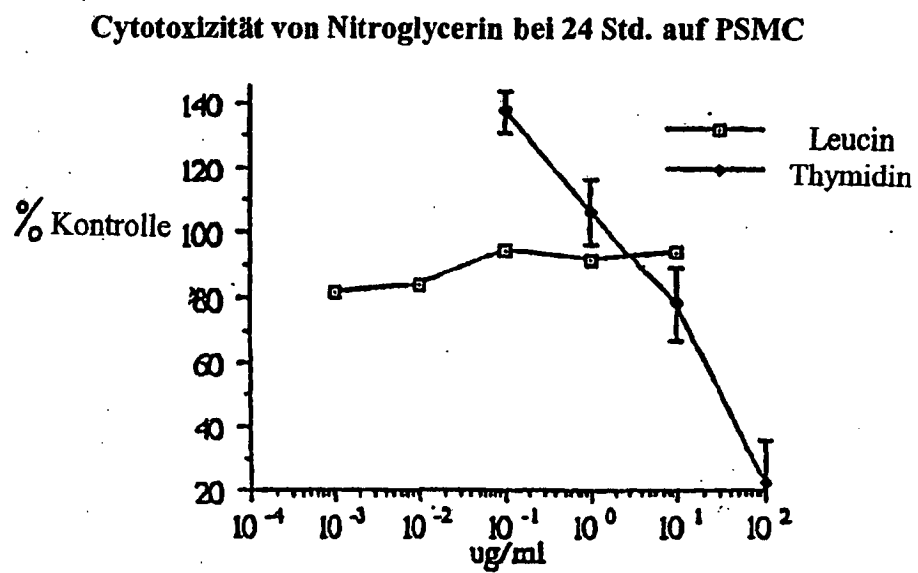
Figur 9B

Cytotoxizität von Suramin bei 24 Std. auf PSMC



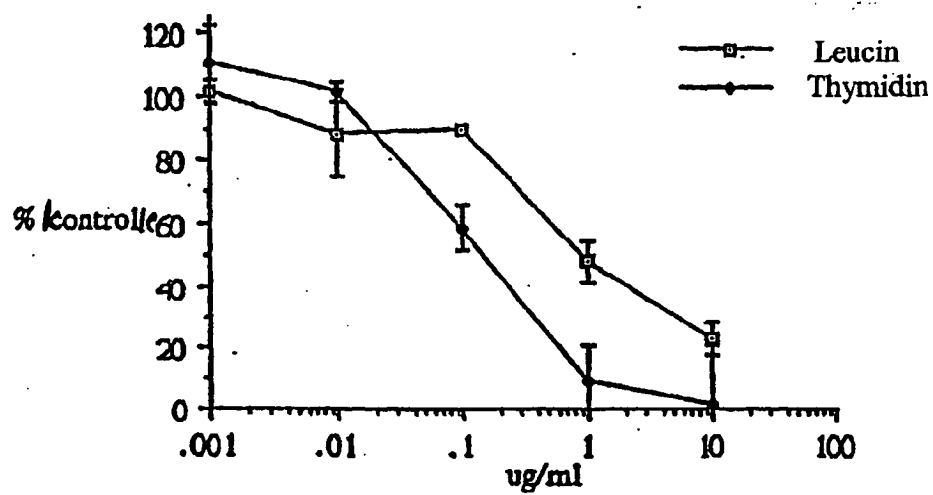
FIGUR 10A

Cytotoxizität von Staurosporin bei 24 Std. auf PSMC**FIGUR 10B**

**FIGUR 10C**

Figur 10D

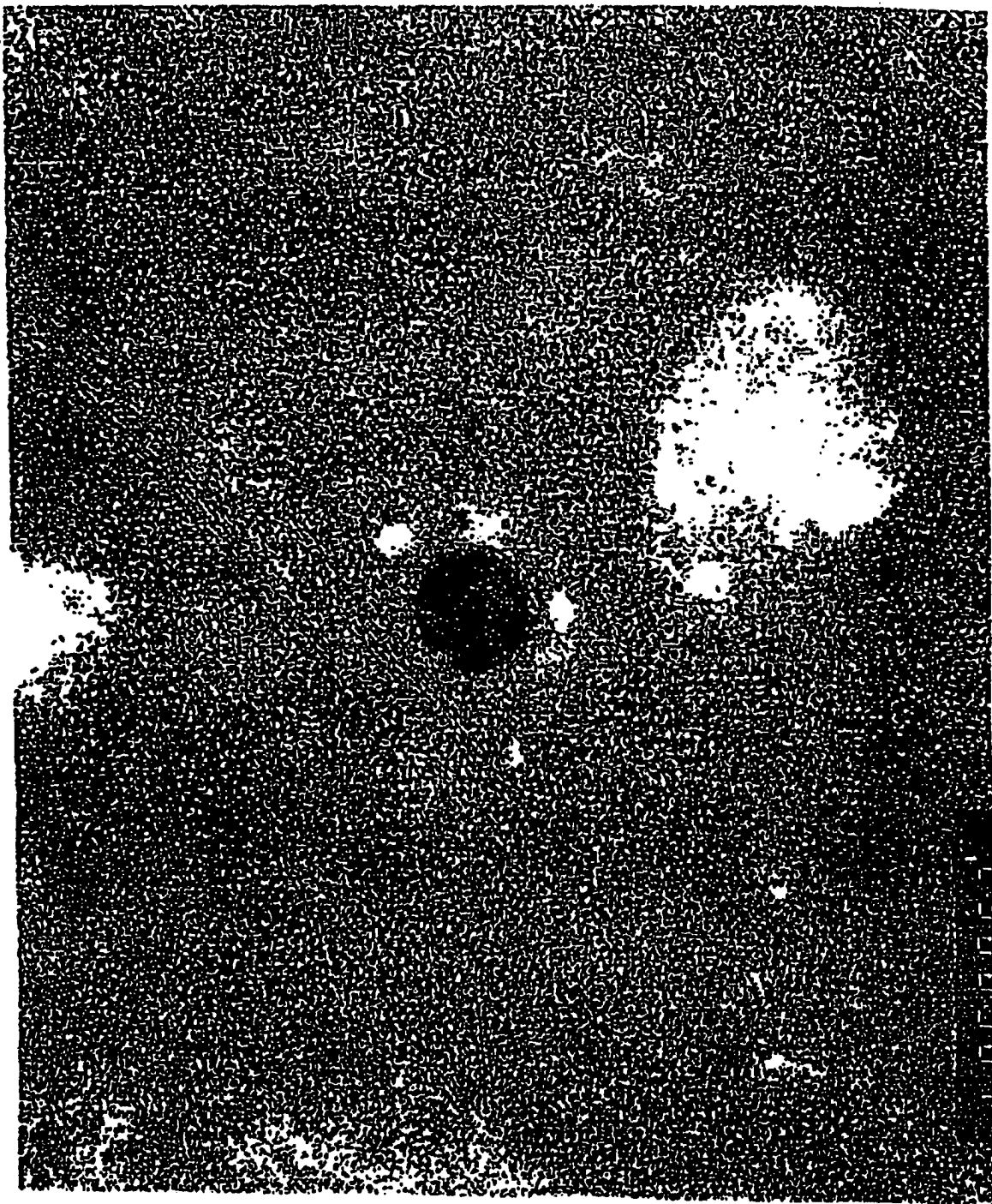
Cytotoxizität von Cytochalasin B bei 24 Std. auf PSMC



Figur 11



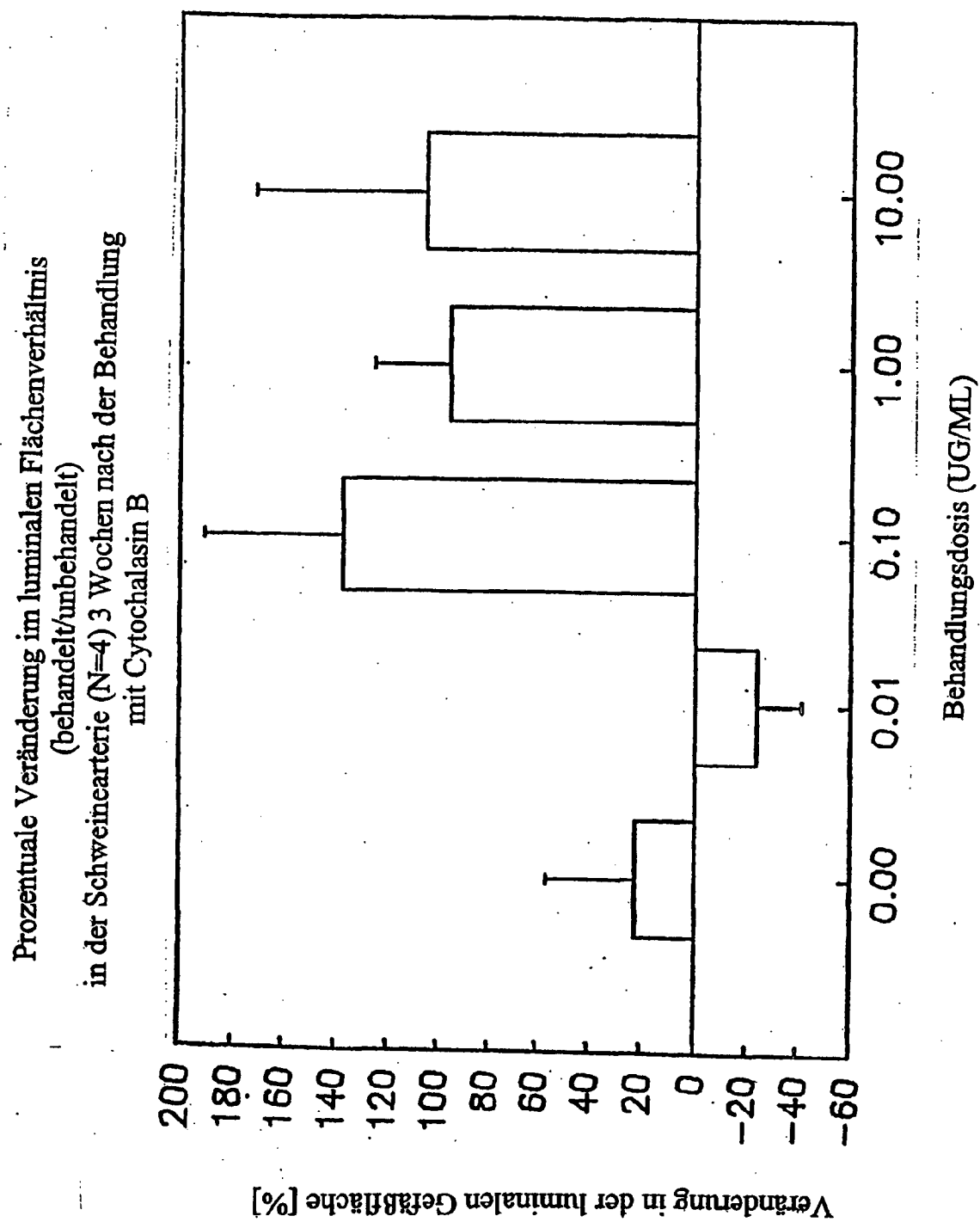
Figur 12

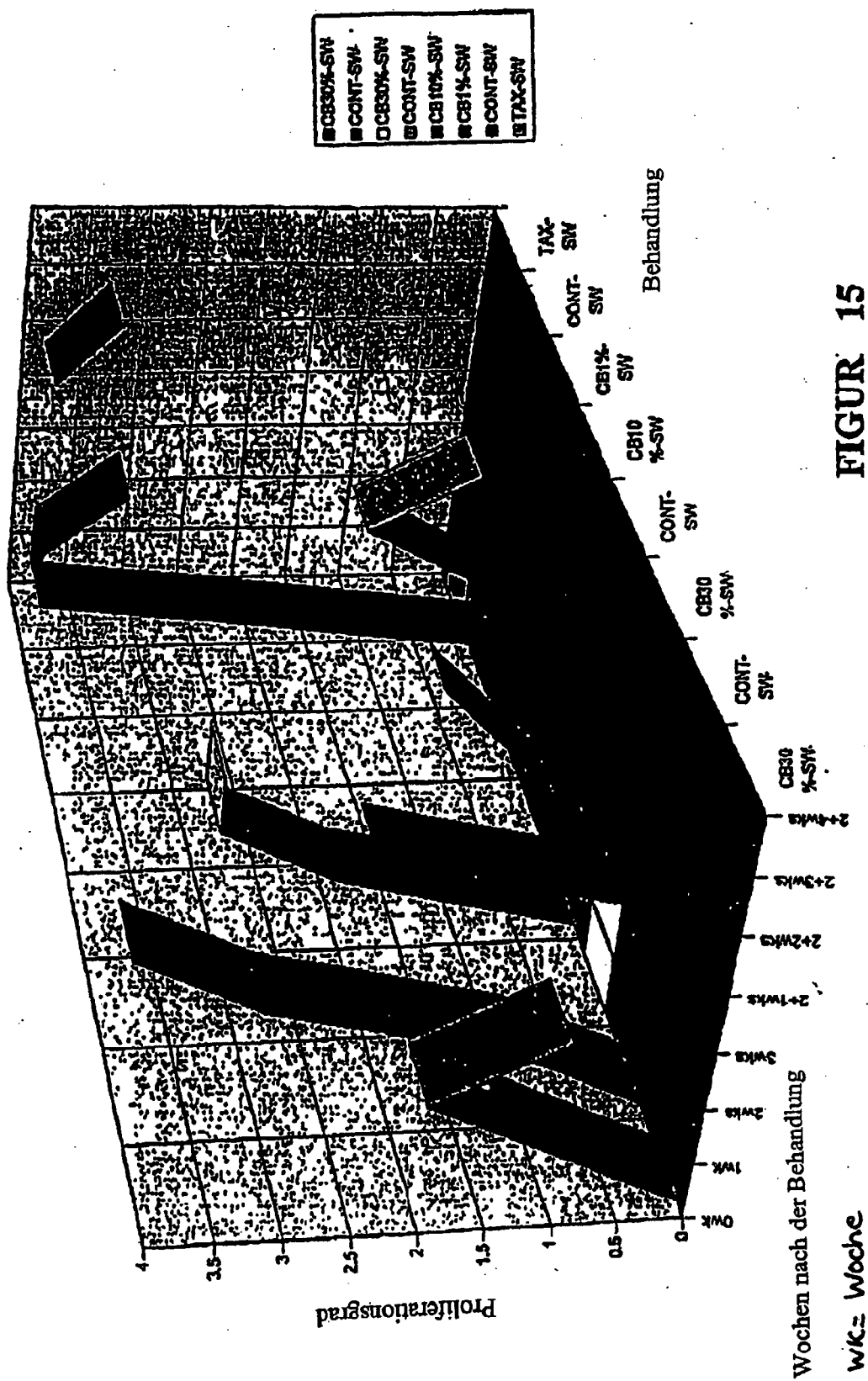


Figur 13

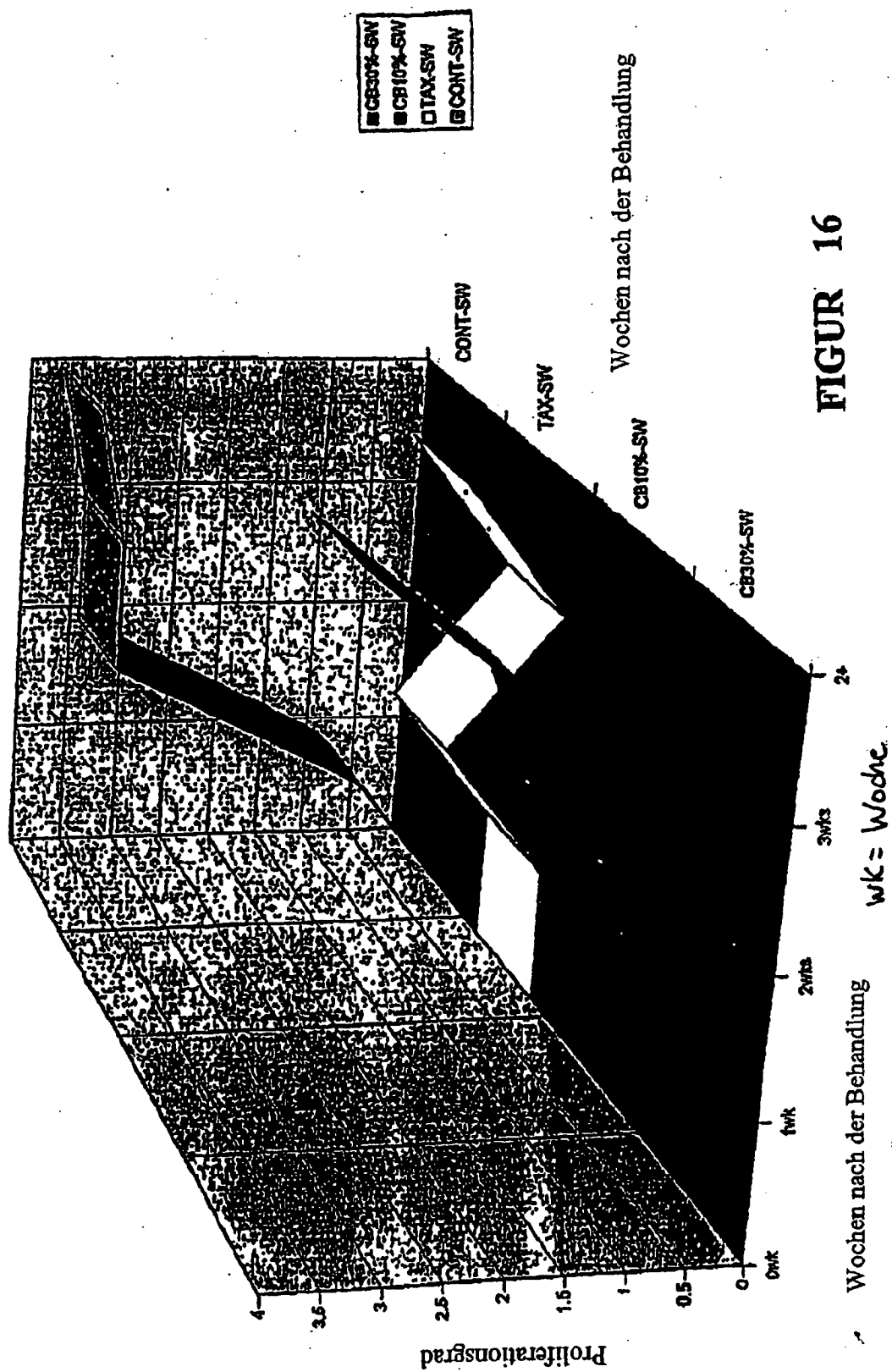


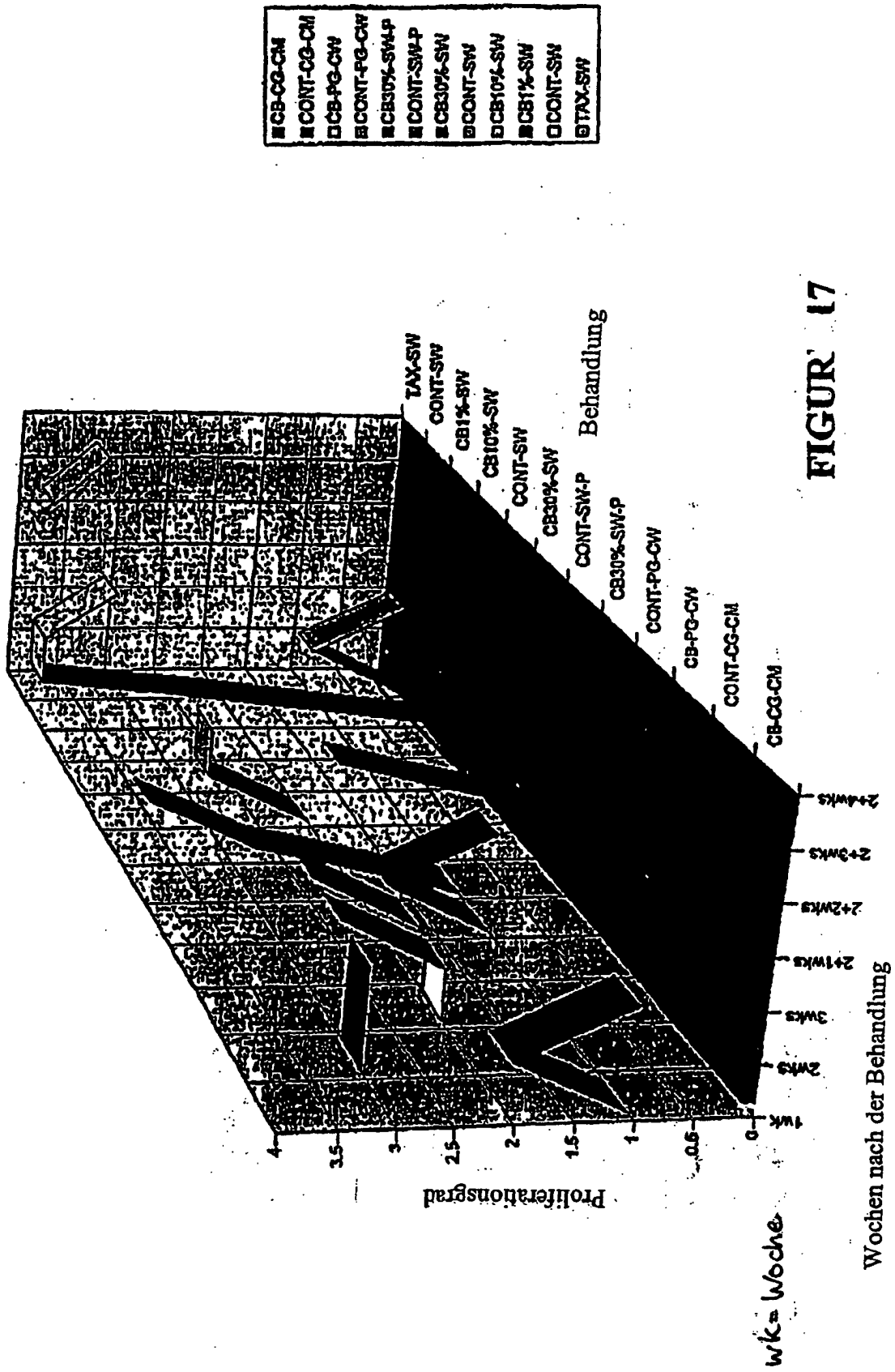
Figur 14





FIGUR 15





FIGUR 17