



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 27 021 T2** 2005.02.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 012 291 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 27 021.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/01638**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 904 730.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/032859**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **30.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **13.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.02.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/19**  
**A61K 48/00, A61K 38/19**

(30) Unionspriorität:

<b>36601 P</b>	<b>29.01.1997</b>	<b>US</b>
<b>801352</b>	<b>19.02.1997</b>	<b>US</b>
<b>71156 P</b>	<b>13.01.1998</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Cornell Research Foundation, Inc., Ithaca, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ROSENGART, K., Todd, Tenaflly, US; CRYSTAL, G.,  
Ronald, Potomac, US**

(54) Bezeichnung: **AN VERSCHIEDENEN ORTEN VERABREICHUNG VON ADENOVIREN-VEKTOR ZUR INDUZIERUNG VON ANGIOGENESE**

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

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

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

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments zur Steigerung des Grades der Blutperfusion in ein Zielgewebe hinein, auf die Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zielgewebes, das an einem ischämischen Schaden leidet oder dem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden und auf die Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Angiogenese in einem Zielgewebe.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Die Angiogenese, das Wachstum neuer Blutgefäße, ist ein komplexer Vorgang, der die Unterbrechung der vaskulären Basalmembranen, die Wanderung und Proliferation von Endothelzellen und nachfolgend die Bildung und Reifung von Blutgefäßen betrifft. Viele Vermittler sind bekannt, die angiogene Antworten auslösen, und die Verabreichung dieser Vermittler fördert die Revaskularisierung von ischämischen Geweben. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF-Protein) ist von den bekannten angiogenen Vermittler der mit der höchsten Spezifität, da seine Rezeptoren nahezu ausschließlich auf Endothelzellen vorkommen. VEGF-Rezeptoren werden unter ischämischen Bedingungen hochreguliert, und die Verabreichung von rekombinantem VEGF fördert die Entstehung von Kollateralgefäßen und verbessert die Funktion in peripheren und myokardialen ischämischen Geweben.

**[0003]** Die Verabreichung von VEGF-Protein stellt jedoch nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die Halbwertszeit des VEGF-Proteins ist kurz, die Verabreichung von hohen Dosen an VEGF-Protein ist mit niedrigem Blutdruck verbunden und die systemische Verabreichung von VEGF-Protein kann eine Induktion der Angiogenese in anderen Geweben, die nicht Zielgewebe sind, bewirken. Die in anderen Geweben induzierte Angiogenese kann zur Erblindung führen, die Aggressivität von Tumorzellen steigern und kann eine Vielzahl von anderen negativen Nebenwirkungen auslösen. Weiterhin ist die Menge an freigesetztem VEGF-Protein wichtig. Wenn zu wenig VEGF-Protein freigesetzt wird, wird die Angiogenese nicht induziert, und ein signifikanter therapeutischer Nutzen kann dann nicht erreicht werden. Wenn zuviel VEGF-Protein freigesetzt wird, kann die Bildung von unorganisierten Gefäßbetten, ein Verlust der Funktion in der betroffenen Geweben und eine Angiogenese in verschiedenen Geweben resultieren.

**[0004]** Weiterhin ist die Induktion der Angiogenese durch Verabreichung von Liposomen und/oder "nack-

ter" DNA, die DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, mit zahlreichen Nachteilen verbunden. Insbesondere sind sowohl liposomale als auch „nackte“ DNA-Formen weniger wirksam als Viren beim Transferieren von Genen in Zellen hinein, sind ineffizient, was die Integration der Gene in das Wirtsgenom hinein betrifft, und auch die zielgerichtete Freisetzung in bestimmte Gewebe ist schwierig.

**[0005]** Hinsichtlich des oben Gesagtem besteht ein Bedürfnis für ein wirksames Mittel, das die Angiogenese in einem Zielgewebe induziert. Die vorliegende Erfindung liefert ein solches Mittel. Diese und andere Vorteile der vorliegenden Erfindung, sowie zusätzliche erfinderische Eigenschaften, werden aus der hier vorliegenden Beschreibung der Erfindung deutlich werden.

**KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0006]** Die vorliegende Erfindung liefert die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Steigerung des Grades der Blutperfusion in ein Zielgewebe hinein, wobei das Medikament in einer geeigneten Form zur Verabreichung in multiplen Anwendungen vorliegt. Ferner wird die Verwendung eines adenoviralen Vektors bereitgestellt, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Gewebes, das an einem ischämischen Schaden leidet, oder einem Risiko unterliegt, so einen zu erleiden, wobei das Medikament in einer geeigneten Form zur Verabreichung in multiplen Anwendungen vorliegt. Ferner wird die Verwendung eines adenoviralen Vektors bereitgestellt, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Angiogenese in einem Zielgewebe, wobei das Medikament in einer geeigneten Form zur Verabreichung in multiplen Anwendungen vorliegt. Weiter wird die Verwendung eines adenoviralen Vektors bereitgestellt, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der kollateralen Blutgefäßbildung in einem Zielgewebe, das durch einen Gefäßverschluß betroffen ist oder einem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, wobei das Medikament in einer geeigneten Form zur Verabreichung in multiplen Anwendungen vorliegt, so dass der adenovirale Vektor mit einer Region in Kontakt steht, die die Quelle, das Ende und ein dazwischen liegendes Gebiet für die kollaterale Blutgefäßbildung einschließt und die kollaterale Blutgefäßbildung induziert.

**BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN**

**[0007]** Die Erfindung kann am besten im Zusammenhang mit der folgenden detaillierten Beschrei-

bung der bevorzugten Ausführungsformen verstanden werden. Die vorliegende Erfindung liefert die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Steigerung des Grades der Blutperfusion in ein Zielgewebe hinein, die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Gewebes, das an einem ischämischen Schaden leidet, oder einem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Angiogenese in einem Zielgewebe, und/oder die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der kollateralen Blutgefäßbildung in einem Zielgewebe, das durch einen Gefäßverschluss betroffen ist oder einem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden. Jedes dieser Medikamente kann mittels multipler Anwendungen dem Zielgewebe verabreicht werden, eine Dosis der pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend (a) einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und (b) einen adenoviralen Vektor, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, so dass der Grad der Blutperfusion in das Zielgewebe hinein gesteigert ist, die Dosis einen prophylaktischen oder therapeutischen Effekt auf das Zielgewebe hat, die Angiogenese in dem Zielgewebe induziert ist, und/oder der adenovirale Vektor mit einem Gebiet in Kontakt steht, das die Quelle, das Ende und ein Gebiet dazwischen für die kollaterale Blutgefäßbildung einschließt, und die kollaterale Blutgefäßbildung induziert wird.

#### Induktion der Angiogenese

**[0008]** Mit dem Ausdruck „Induktion der Angiogenese“ ist gemeint, dass die Angiogenese entweder ausgelöst oder gesteigert wird. Wenn im Zielgewebe z. B. noch nicht der Prozess der Angiogenese abläuft, liefert die vorliegende Verwendung ein Mittel zur Auslösung der Angiogenese in dem Zielgewebe. Wenn im Zielgewebe jedoch schon der Prozess der Angiogenese stattfindet, liefert die vorliegende Verwendung ein Mittel, mit dem der Grad der Angiogenese gesteigert oder erhöht wird.

#### Zielgewebe

**[0009]** Jedes geeignete Gewebe kann Gegenstand für eine Verabreichung im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sein. Vorzugsweise umfasst das Zielgewebe Rezeptoren, die fähig sind, angiogene Peptide, für die die DNA kodiert, zu binden; bevorzugter umfasst das Zielgewebe VEGF-Rezeptoren. Am meisten bevorzugt umfasst das Zielgewebe Endothelzellen. Im allgemeinen wird das Zielgewebe

Teil von einem einzelnen Organ sein oder dieses bilden, z. B. ein Muskel, wie das Herz.

**[0010]** Typischerweise wird das Zielgewebe an einem ischämischen Schaden leiden oder dem Risiko unterliegen, einen solchen zu erleiden, wobei der Schaden daraus resultiert, dass das Gewebe von einer adäquaten Zufuhr mit sauerstoffreichem Blut abgeschnitten ist. Die Unterbrechung der Zufuhr mit oxygeniertem Blut wird oft durch einen Gefäßverschluss verursacht. Solch ein Gefäßverschluss kann durch Arteriosklerose, Trauma, chirurgische Verfahren, Krankheit und/oder andere Indikationen verursacht sein. Es gibt viele Wege, um zu bestimmen, ob ein Gewebe dem Risiko unterliegt, an einem ischämischen Schaden wegen eines unerwünschten Gefäßverschlusses zu leiden. Solche Methoden sind den Ärzten gut bekannt, die solche Zustände behandeln. Bei der koronaren Herzkrankheit z. B. schließen diese Methoden eine Vielzahl von bildgebenden Verfahren ein (z. B. „Radiotracer“-Verfahren, wie „<sup>99m</sup>Tc-Scintiscanning“, Röntgenstrahlen und „MRI-scanning“) und physiologische Untersuchungen. Daher ist die Induktion der Angiogenese in einem Zielgewebe, das durch einen Gefäßverschluss betroffen ist oder einem Risiko unterliegt, von einem solchen betroffen zu sein, ein wirksames Mittel, die Ischämie in einem solchen Gewebe zu verhindern und/oder aufzuhalten. Daher stellt die Induktion der Angiogenese in einem Gewebe, das von einem ischämischen Schaden betroffen ist oder dem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, ein wirksames Mittel dar, die Ischämie zu verhindern oder abzuschwächen. Daraus folgt, dass das Zielgewebe bevorzugt ein Gewebe ist, das von einem Gefäßverschluss betroffen ist, bzw. einem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, obwohl jedes geeignete Gewebe zur Induktion der Angiogenese vorgesehen werden kann.

**[0011]** Die Blutzufuhr z. B. zu einzelnen Organen, wie Gehirn, Herz, Pankreas, die gesamten Extremitäten oder andere Gebiete des Körpers, wie Füße, kann durch eine Krankheit, Trauma, chirurgische Maßnahmen oder andere Vorfälle vermindert sein. Die Erhöhung einer auf diese Weise verminderten Blutzufuhr, unabhängig von ihrer Ursache, ist Ziel der vorliegenden Erfindung. Somit wird hier die Verhinderung oder Linderung eines Schadens, der aus Indikationen, wie myokardiale Ischämie und Herzinfarkt resultiert, in vollem Umfang offenbart. Ferner kann bei der Planung einer chirurgischen Operation vorhergesagt werden, wie die Unterbrechung der Blutzufuhr durch einen bestimmten Anteil der Gefäße bei einem Patienten sein wird. Eine Vorbehandlung nach dem vorliegenden Verfahren kann das gewünschte Ergebnis solcher Operationen wesentlich verbessern. In diesem Fall findet die Behandlung vorzugsweise ungefähr eine bis ungefähr sechs Wochen vor der Operation statt und bevorzugter ungefähr zwei bis ungefähr vierzehn Tage vor der Operation.

## Verabreichung eines angiogenen Vektors

**[0012]** Wie schon vorher ausgeführt, kann die Induktion der Angiogenese mittels systemischer Verabreichung von angiogenen Peptiden, wie VEGF-Protein, zu einer Induktion der Angiogenese in zahlreichen Geweben führen, was z. B. zur Erblindung und einer Zunahme der Aggressivität von Tumorzellen führen kann. Um solche negativen Wirkungen zu verhindern oder abzuschwächen, ist es daher wünschenswert, die Angiogenese nur in den Geweben zu induzieren, wo dies nötig ist (d. h. das Zielgewebe).

**[0013]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines adenoviralen Vektors, der DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments, das für eine lokale Verabreichung in das Zielgewebe geeignet ist. Während irgendein geeignetes Mittel zur Verabreichung des angiogenen Vektors in das Zielgewebe im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, wird eine lokale Verabreichung in das Zielgewebe vorzugsweise durch direktes Injizieren des angiogenen Vektors in das Zielgewebe oder durch topisches Anwenden des angiogenen Vektors auf das Zielgewebe erreicht. Mit dem Ausdruck "Injizieren" ist gemeint, dass der angiogene Vektor mit Kraftaufwand in das Zielgewebe gebracht wird. Jede geeignete Injektionsvorrichtung kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Injektionsvorrichtungen schließen in nicht beschränkender Weise solche ein, die in der U.S. Patentanmeldung Nr. 08/801,352 beschrieben sind, welche auf eine Vorrichtung zum Gentransfer gerichtet ist, die geeignet ist, simultan multiple Injektionen zu ermöglichen. Ein anderes Beispiel einer Injektionsvorrichtung, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, schließt minimal invasive Injektionsvorrichtungen ein. Solche Vorrichtungen sind geeignet, das Herz zu erreichen, z. B. durch kleine Einschnitte von weniger als 5 Zoll, und sind so gestaltet, dass Injektionen mittels eines einzigen Einstichs erfolgen können, im Gegensatz zur Vorrichtung für die multiplen Injektionen, die oben beschrieben ist. Für den Bedarf an multiplen Injektionen mit einer spezifischen Geometrie kann ein Markierungssystem verwendet werden, so dass die Orte der vorherigen Injektionen gut abgegrenzt werden können. Vorrichtungen für minimal invasive Injektionen können Injektionsspitzen umfassen, die flexibel und lenkbar sind, um einen Zugang über schmale Einschnitte des Herzens zu erlauben, z. B. in die kurvige äußere Oberfläche, die in verschiedenen Winkeln in Bezug auf die begrenzte Öffnung, die bei minimal invasiven Operationen erforderlich ist, vorliegt. Darüber hinaus kann der angiogene Vektor jeder geeigneten Oberfläche verabreicht werden, entweder innerhalb oder außerhalb eines Zielgewebes. In Hinblick auf die direkte Injektion des angiogenen Vektors, z. B. in das Herzgewebe hinein, wird hier offen-

bart, dass so eine Injektion von irgendeiner geeigneten Oberfläche des Herzens verabreicht werden kann (d. h. endokardial und/oder epikardial). Es ist jedoch wünschenswert, unabhängig davon welches Mittel zur Verabreichung des angiogenen Vektors ausgewählt wird, dass die Induktion der Angiogenese in einem Gewebe, das nicht Zielgewebe ist, minimiert wird.

**[0014]** Während eine Dosis des angiogenen Vektors durch eine einzelne Anwendung dem Zielgewebe verabreicht werden soll (z. B. eines einzelne Injektion oder eine topische Anwendung), wird die Dosis vorzugsweise mittels multipler Anwendungen des angiogenen Vektors verabreicht. Die multiplen Anwendungen können aus 2, 3, 4, 5 oder mehr Anwendungen bestehen, vorzugsweise 5 oder mehr Anwendungen, noch bevorzugter 8 oder mehr Anwendungen und am meisten bevorzugt mindestens 10 (z. B. 10, 15 oder 20) Anwendungen. Multiple Anwendungen stellen einen Vorteil gegenüber Einzelanwendungen dar, weil sie durch bestimmte Parameter beeinflusst werden können, wie z. B. durch eine besondere Geometrie, die durch die Lokalisation auf dem Zielgewebe definiert ist, wo jede Anwendung verabreicht wird. Die Verabreichung von einer Einzeldosis des angiogenen Vektors durch multiple Anwendungen kann besser kontrolliert werden, und die Wirksamkeit, mit der jede gegebene Dosis verabreicht wird, kann maximiert werden. Auf diese Weise können auch die unerwünschten Wirkungen, die mit der Verabreichung einer Anwendung auf eine einzelne Stelle verbunden sind, minimiert werden.

**[0015]** Die besondere Geometrie der multiplen Anwendungen wird durch die Lokalisation auf dem Zielgewebe bestimmt, entweder im zwei- oder dreidimensionalen Raum, wo jede Anwendung des angiogenen Vektors verabreicht wird. Die multiplen Anwendungen werden bevorzugt in einem solchen Abstand durchgeführt, dass die Orte der Anwendung bis zu ungefähr 4 cm (z. B. ungefähr 0,5–4 cm), bevorzugter bis zu ungefähr 3 cm (z. B. ungefähr 1–3 cm), und am meisten bevorzugt bis zu ungefähr 2 cm (z. B. ungefähr 1–2 cm) auseinander liegen. Was die besondere Geometrie multipler Anwendungen im zweidimensionalen Raum betrifft, wird die besondere Geometrie durch eine Ebene definiert (d. h. durch einen Querschnitt des Zielgewebes), in dem die multiplen Anwendungen stattfinden. Die Ebene, die durch die multiplen Anwendungen definiert ist, kann in einem konstanten Abstand zur Oberfläche (d. h. im wesentlichen parallel zu der Oberfläche des Zielgewebes) oder zur Tiefe des Zielgewebes liegen, oder, alternativ, kann die Ebene in einem Winkel zur Oberfläche des Zielgewebes liegen. Bevorzugt wird eine einzelne Anwendung ungefähr alle 0,5–15 cm<sup>2</sup> in der Ebene verabreicht, bevorzugter ungefähr alle 1–12 cm<sup>2</sup> in der Ebene und am meisten bevorzugt ungefähr alle 1,5–7 cm<sup>2</sup> in der Ebene. Die Ebene liegt bevorzugt

ungefähr 1–10 mm tief, bevorzugter ungefähr 2–7 mm und am meisten bevorzugt ungefähr 3–5 mm. Im dreidimensionalen Raum wird eine einzelne Anwendung bevorzugt in bis zu ungefähr 50 cm<sup>3</sup> (z. B. ungefähr 0,5–50 cm<sup>3</sup>) des Zielgewebes verabreicht, bevorzugter in bis zu ungefähr 35 cm<sup>3</sup> (z. B. 1–35 cm<sup>3</sup>) und am meisten bevorzugt in bis zu ungefähr 15 cm<sup>3</sup> (z. B. ungefähr 3–15 cm<sup>3</sup>) des Zielgewebes. Ferner können die multiplen Anwendungen irgendein geeignetes Muster oder besondere Geometrie definieren. Daher können die multiplen Anwendungen z. B. im zweidimensionalen Raum ein Quadrat definieren, wohingegen im dreidimensionalen Raum die multiplen Anwendungen einen Würfel definieren können.

**[0016]** Ein anderer Parameter der multiplen Anwendungen, der verändert werden kann, ist der zeitliche Abstand zwischen jeder Anwendung. Bevorzugt wird jede der multiplen Anwendungen im Abstand von ungefähr 10 Minuten (z. B. ungefähr 0,5–10 Minuten) verabreicht, bevorzugter im Abstand von ungefähr 8 Minuten (z. B. ungefähr 0,5–8 Minuten) und noch bevorzugter im Abstand von ungefähr 6 Minuten (z. B. ungefähr 1–6 Minuten). Am meisten bevorzugt werden alle der multiplen Anwendungen der Einzeldosis innerhalb der oben genannten Zeitfenster verabreicht. Im günstigsten Fall werden die multiplen Anwendungen mehr oder weniger simultan verabreicht.

**[0017]** Durch die Manipulation, sowohl von der besonderen Geometrie als auch des Zeitabstandes zwischen den einzelnen der multiplen Anwendungen, kann die Induktion der Angiogenese in Geweben, die nicht Zielgewebe sind, minimiert werden.

**[0018]** Bei der Verabreichung des angiogenen Vektors in ein Zielgewebe, das von einem Gefäßverschuß betroffen ist oder dem Risiko unterliegt, so einen zu erleiden, ist es wünschenswert, dass die Verabreichung so erfolgt, dass der angiogene Vektor mit der Region in Kontakt kommen kann, die in geeigneter Weise der Quelle und dem Terminus für die kollaterale Blutgefäßbildung benachbart ist, sowie dem Gebiet dazwischen, das als ein Bypass für den Gefäßverschuß wirken kann. Es wird nicht angenommen, dass es nötig ist, dass der angiogene Vektor tatsächlich mit den genauen Orten der Quelle und des Terminus der kollateralen Blutgefäßbildung in Kontakt steht. Es ist jedoch im Zusammenhang mit den multiplen Anwendungen wünschenswert, dass die spezifische Geometrie der multiplen Anwendungen so definiert wird, dass dem angiogenen Vektor erlaubt wird, eine Region zu erreichen oder zu kontaktieren, die die Quelle, den Terminus und das Gebiet dazwischen für die kollaterale Blutgefäßbildung einschließt.

**[0019]** Weiterhin kann die Verabreichung des angiogenen Vektors in das Zielgewebe entweder in vivo oder ex vivo erfolgen. Daher kann das Zielgewebe z.

B. von dem, nach dem vorliegenden Verfahren, behandelten Patienten entfernt werden, kann mit der angiogenen Substanz behandelt werden und dann in den Empfänger reimplantiert werden. Eine ex vivo-Verabreichung der angiogenen Substanz in das Zielgewebe hilft auch, die unerwünschte Induktion der Angiogenese in einem Gewebe, das nicht Zielgewebe ist, zu minimieren.

#### Angiogener Vektor

**[0020]** Wie vorher schon gesagt, stellt die Freisetzung von VEGF-Protein, als angiogene Substanz, in ein Gewebe hinein, eine signifikante Herausforderung dar, die zum Großteil auf seine sehr kleine Halbwertszeit zurückzuführen ist. Durch die Verwendung eines adenoviralen Vektors jedoch, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid als angiogenen Wirkstoff kodiert, ist es möglich, Wirtszellen zu infizieren und dadurch eine anhaltende, vorhersagbare und wirksame Produktion eines angiogenen Peptids für ungefähr eine Woche zu induzieren. Nach ungefähr einer Woche hört der angiogene Vektor auf, das angiogene Peptid zu produzieren und in dieser Hinsicht liefert die vorliegende Erfindung ein sich selbst beendendes Verfahren der Angiogenese-Induktion.

**[0021]** Adenovirale Vektoren sind bevorzugt, weil sie, unähnlich zu Plasmiden und anderen viralen Vektoren (z. B. Herpes simplex Virus), einen Gentransfer sowohl in teilenden als auch in nicht-teilenden Zellen ermöglichen, und hohe Spiegel der Proteinexpression in kardiovaskulär relevanten Orten, wie Myokard, vaskuläres Endothelium und Skelettmuskel, erreicht werden. Weiterhin ist das durch einen adenoviralen Vektor transferierte Gen in epichromosomaler Lokalisation wirksam, und somit besteht nur ein geringes Risiko, dass das transferierte Gen an eine kritische Stelle des Wirtgenoms eingefügt wird. Dem adenoviralen Vektor fehlt auch vorzugsweise mindestens eine Genfunktion, die zur viralen Replikation notwendig ist. Bevorzugt fehlt dem adenoviralen Vektor mindestens eine essentielle Genfunktion in der E1-Region des adenoviralen Genoms, insbesondere der E1a-Region, bevorzugter fehlt dem Vektor mindestens eine essentielle Genregion der E1-Region und ein Teil der E3-Region (z. B. eine XbaI-Deletion der E3-Region) oder, alternativ, fehlt dem Vektor mindestens eine essentielle Genfunktion der E1-Region und mindestens eine essentielle Genfunktion der E4-Region. Adenovirale Vektoren, die in mindestens einer essentiellen Genfunktion der E2a-Region, und adenovirale Vektoren, denen sämtliche Gene der E3-Region fehlen, sind hier auch mit berücksichtigt und sind im Stand der Technik gut bekannt. Adenovirale Vektoren, deren gesamte E4-Region entfernt wurde, bewirken eine geringere Immunantwort des Wirtes. Geeignete replikationsdefiziente angiogene Vektoren sind in den internationalen

PCT-Anmeldungen mit den Nummern WO 95/34671 und WO 97/21826 beschrieben. Geeignete replikationsdefiziente adenovirale Vektoren schließen z. B. solche mit einer partiellen Deletion der E1 a-Region, einer partiellen Deletion der E2a-Region und einer partiellen Deletion der E3-Region ein. Alternativ kann der replikationsdefiziente adenovirale Vektor eine Deletion in der E1-Region, eine partielle Deletion in der E3-Region und eine partielle Deletion in der E4-Region aufweisen.

**[0022]** Weiterhin kann das "Coat"-Protein des viralen Vektors so modifiziert sein, dass es eine spezifische, proteinbindende Sequenz enthält, wie in der internationalen PCT-Anmeldung Nr. WO 96/2628 beschrieben, oder das "Coat"-Protein des viralen Vektors kann so modifiziert sein, dass die Fähigkeit oder Unfähigkeit des viralen Vektors, von einem neutralisierenden Antikörper, der gegen das Wildtyp-"Coat"-Protein gerichtet ist, erkannt zu werden, gemindert wird, wie in der U.S. Patent-Anmeldung Nr. 08/816,346 beschrieben.

**[0023]** Irgendeine DNA, die für ein angiogenes Peptid kodiert und operativ an geeignete Expressionssignale verknüpft ist, kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Wohingegen die DNA operativ an irgendeinen geeigneten Satz an Expressionssignalen verknüpft sein kann, steht die Expression der DNA vorzugsweise unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) „immediate early promoters“.

**[0024]** Zusätzlich kann die DNA für irgendein geeignetes angiogenes Peptid kodieren. Vorzugsweise ist das angiogene Peptid ein VEGF-Protein und bevorzugter ist das angiogene Peptid VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> oder ein Säuger-Äquivalent, die verschiedentlich in den U.S. Patenten 5,332,671 (Ferrara et al.), 5,240,848 (Keck et al.) und 5,219,739 (Tischer et al.) beschrieben sind. Am meisten bevorzugt, wegen seiner höheren biologischen Aktivität, ist das angiogene Peptid VEGF<sub>121</sub> oder VEGF<sub>165</sub>, insbesondere VEGF<sub>121</sub>. Ein zu bemerkender Unterschied zwischen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> ist, dass VEGF<sub>121</sub>, im Gegensatz zu VEGF<sub>165</sub>, nicht mit einer hohen Affinität an Heparin bindet. Im allgemeinen sind die VEGF-Moleküle vorteilhaft gegenüber anderen angiogenen Peptiden, weil VEGF-Proteine nicht das Wachstum von Geweben induzieren, die nicht an der Bildung neuer Vaskulatur beteiligt sind. Andere angiogene Peptide schließen VEGF II, VEGF-C, FGF4, Angiogenin, Angiogenin-2 und P1GF ein, die verschiedentlich in den U.S. Patenten 5,338,840 (Bayne et al.) und 5,532,343 (Bayne et al.), in der internationalen Patentanmeldung WO 95/24473 (Hu et al.), in den Europäischen Patentdokumenten 476 983 (Bayne et al.), 506 477 (Bayne et al.) und 550 296 (Sudo et al.) und in den japanischen Patentdokumenten 1038100, 2117698, 2279698 und 3178996 beschrie-

ben sind.

**[0025]** Der adenovirale Vektor kann auch eine DNA einschließen, die für einen angiogenen Peptid-Rezeptor kodiert. Geeignete angiogene Peptid-Rezeptoren schließen z. B. FLT-1, FLK-1 und FLT-4 ein. Tatsächlich kann der adenovirale Vektor in bestimmten Ausführungsformen für eine DNA kodieren, die eher alleine für einen angiogenen Peptid-Rezeptor für ein angiogenes Peptid, als zusätzlich zu einem angiogenen Peptid, kodiert.

**[0026]** Die DNA, die operativ an Expressionssignale verknüpft ist und für das angiogene Peptid kodiert, kann in irgendeine geeignete Region des adenoviralen Vektors als eine Expressionskassette eingefügt sein. In dieser Hinsicht wird der Fachmann auf seinem Gebiet leicht wahrnehmen, dass es gewisse Vorteile mit sich bringt, einen adenoviralen Vektor zu verwenden, der in einigen wichtigen Regionen des adenoviralen Genoms Defekte aufweist, vor allem insofern, als solch ein Defekt in dem Vektor Platz für ein Transgen lässt und gleichzeitig den Virus an der Replikation hindert. Vorzugsweise wird das DNA-Segment in die E1-Region des adenoviralen Vektors integriert. Wenn auch das DNA-Segment in irgendeiner geeigneten Orientierung und in irgendeiner geeigneten Region des adenoviralen Vektors als eine Expressionskassette integriert werden kann, ist es bevorzugt, dass das DNA-Segment eine Orientierung von rechts nach links aufweist. Damit, dass die Expressionskassette eine Orientierung von rechts nach links aufweist, ist gemeint, dass die Richtung der Transkription der Expressionskassette entgegengesetzt zu der Region des adenoviralen Vektors ist, in der die Expressionskassette inseriert wurde.

**[0027]** Ein beispielhafter adenoviraler Vektor für den vorliegenden erfinderischen Vektor ist einer, dem die E1a-Region, Teile der E1B-Region und Teile der E3-Region des adenoviralen Genoms fehlen, und, der die DNA enthält, die für humanes VEGF<sub>121</sub> oder humanes VEGF<sub>165</sub> kodiert, wobei die DNA unter der Kontrolle des „CMV immediate early promoters“ in der E1-Region des adenoviralen Genoms steht. Solch ein Vektor unterstützt die in vivo Expression von VEGF, die einen Tag nach Verabreichung maximal ist und nur eine Woche nach Verabreichung nicht mehr oberhalb der Ausgangswerte nachzuweisen ist. Dieser Verlauf ist insofern ideal, als er ausreichend ist, ein wesentliches Wachstum der neuen Vaskulatur bewirken, während gleichzeitig die nachteilige Neovaskularisierung an entfernten Orten minimiert wird. So kann, wenn der Vektor lokal dem Zielgewebe verabreicht wird, mittels Standard-ELISA-Nachweistests keine VEGF-Expression im Blutserum nachgewiesen werden.

**[0028]** In vorteilhafter Weise führt die lokale Verabreichung des adenoviralen Vektors, der für humanes

VEGF<sub>121</sub> oder VEGF<sub>165</sub> in der E1-Region des adenoviralen Genoms kodiert, dazu, dass der Blutfluss mindestens 3-fach in den Extremitäten von Säugetieren mit Ligationen der Hüft- und Oberschenkel-Arterien gesteigert ist (z. B. im Hinterlauf von Sprague-Dawley Ratten).

#### Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0029]** Es ist wünschenswert, dass der angiogene Vektor dem Zielgewebe in einer pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht wird, die einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und den angiogenen Vektor enthält.

**[0030]** Irgendein geeigneter pharmazeutisch akzeptabler Träger kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, und solche Träger sind im Stand der Technik gut bekannt. Die Wahl des Trägers wird teilweise durch den besonderen Ort, dem die Zusammensetzung verabreicht werden soll, bestimmt sein, und von dem besonderen Verfahren, das verwendet wird, um die Zusammensetzung zu verabreichen. Formulierungen, die für die Injektion geeignet sind, schließen ein: wässrige und nicht-wässrige Lösungen, isotonische sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien enthalten können, Puffer, Bakterizide und Lösungen, die die Formulierung isotonisch zu dem Blut des vorgesehenen Empfängers machen, und wässrige bzw. nicht-wässrige sterile Suspensionen, die suspendierende Inhaltsstoffe einschließen können, Aufschließungsmittel, verdickende Inhaltsstoffe, Stabilisatoren und Konservierungsmittel. Die Formulierungen können in Einheits- oder Mehrfachdosen in verschlossenen Behältern, wie Ampullen oder Fläschchen vorliegen und können in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) Zustand aufbewahrt werden, was nur die Zufuhr von sterilem flüssigen Träger, z. B. von Wasser, unmittelbar vor Verwendung erforderlich macht. Improvisierte Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilem Pulver, Körnchen und Tabletten, so, wie oben beschrieben, hergestellt werden. Vorzugsweise ist der pharmazeutisch akzeptable Träger eine gepufferte Salzlösung.

**[0031]** Obwohl jedes geeignete Volumen an Träger im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, wird der angiogene Vektor vorzugsweise in kleinen Träger-Volumina verabreicht, so dass das Gewebe, das vaskularisieren soll (d. h. das Zielgewebe), mit dem angiogenen Vektor perfundiert wird, der angiogene Vektor aber nicht durch das Blut, Lymphdrainage oder physikalische Mechanismen (z. B. durch Gravitations- oder osmotische Strömung) zu Geweben, die nicht Zielgewebe sind, transportiert wird.

**[0032]** Bei den meisten Verabreichungen, insbesondere zu einzelnen Organen, wie z. B. bei humanen

Myokard-Injektionen, wird das verabreichte Volumen vorzugsweise geringer als 20 ml (z. B. ungefähr 0,1–20 ml) pro Verabreichung sein und bevorzugter weniger als ungefähr 2,5 ml (z. B. ungefähr 0,5–2,5 ml) pro Verabreichung sein.

#### Dosierung

**[0033]** Die Bestimmung der geeigneten Dosierung des angiogenen Vektors kann durch Fachleute auf ihrem Gebiet einfach ermittelt werden. Im allgemeinen werden jedoch bestimmte Faktoren die zu verabreichende Dosierung beeinflussen.

**[0034]** Obwohl die geeignete Dosierung derart ist, dass die Angiogenese im Zielgewebe induziert wird, ist die Dosierung vorzugsweise ausreichend, um eine therapeutische und/oder prophylaktische Wirkung auf das Zielgewebe zu erreichen, das von einem Gefäßverschluss betroffen ist, oder dem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, was zu einem ischämischen Schaden des Gewebes führen kann. Zusätzlich sollte die Dosierung derart sein, dass die Induktion der Angiogenese in einem Gewebe, das nicht Zielgewebe ist, minimiert ist.

**[0035]** Die Dosierung wird auch in Abhängigkeit von der zu verabreichenden angiogenen Substanz variieren. Insbesondere wird die Dosierung von dem verwendeten besonderen Vektor und der DNA, die die Expression des angiogenen Peptids in dem Vektor kodiert und kontrolliert, abhängen. Eine dem Zielgewebe typischerweise verabreichte Dosis wird mindestens ungefähr  $1 \times 10^6$  pfu (z. B.  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{13}$  pfu) sein, z. B. bei Verabreichung in ein einzelnes Organ, wie das menschliche Herz. Vorzugsweise beträgt die Dosis mindestens ungefähr  $1 \times 10^7$  pfu (z. B. ungefähr  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^{13}$  pfu), bevorzugter mindestens ungefähr  $1 \times 10^8$  pfu (z. B. ungefähr  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^{11}$  pfu) und am meisten bevorzugt mindestens ungefähr  $1 \times 10^9$  pfu (z. B. ungefähr  $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$  pfu). Diese Dosis ist typischerweise für ein Volumen des Zielgewebes von ungefähr 100 cm<sup>3</sup>, noch typischer für ein Volumen des Zielgewebes von ungefähr 150 cm<sup>3</sup>, vorgesehen. Die Dosis wird mittels multipler Anwendungen verabreicht und wird als solche auf die multiplen Anwendungen aufgeteilt. Das heißt, wenn die Dosis mit 10 Anwendungen verabreicht wird, beinhaltet jede Anwendung dabei ungefähr  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{12}$  pfu. Vorzugsweise beinhaltet jede Anwendung ungefähr  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{12}$  pfu, bevorzugter ungefähr  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^{10}$  pfu und am meisten bevorzugt ungefähr  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  pfu. Wird die Dosierung in Partikeleinheiten ausgedrückt (pu), auch als virale Partikel bezeichnet, kann davon ausgegangen werden, dass 100 Partikel/pfu vorliegen (z. B.  $1 \times 10^{12}$  pfu ist äquivalent zu  $1 \times 10^{14}$  pu). Bei einer einzelnen Runde der Vektorverabreichung, bei der z. B. ein adenoviraler Vektor, dem die E1a-Region, Teile der E1b-Region und Teile der E3-Region des adenoviralen Genoms

fehlen, und wobei der Vektor humanes VEGF<sub>121</sub> oder VEGF<sub>165</sub> unter der Kontrolle eines Standard-CMV "immediate early promoters" exprimiert, werden ungefähr  $10^7$ – $10^{13}$  pfu, vorzugsweise ungefähr  $10^9$ – $10^{11}$  pfu, dem Zielgewebe (z. B. einen einzelnen Organ, das das Zielgewebe enthält) in einem geschätzten Volumen von ungefähr 150 cm<sup>3</sup> verabreicht. Unter diesen Umständen wird eine substantielle VEGF-Produktion in dem Zielgewebe erreicht, ohne dass eine VEGF-Expression in entfernten Geweben nachweisbar ist. In Hinblick auf die multiplen Anwendungen des angiogenen Vektors kann weiterhin jede Anwendung derart sein, dass ein Dosierungsgradient über die Region, die durch die multiplen Anwendungen definiert ist, verabreicht wird. Alternativ kann jede der multiplen Anwendungen derart sein, dass eine im wesentlichen uniforme Dosis über die Region, die durch die multiplen Anwendungen definiert ist, verabreicht wird.

### BEISPIELE

**[0036]** Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung weiter, sollen aber keinesfalls so verstanden werden, dass dadurch der Bereich der Erfindung eingeschränkt wird.

#### Beispiel 1

**[0037]** Dieses Beispiel erläutert das Vermögen der vorliegenden Erfindung, die Angiogenese durch Verabreichung eines replikationsdefizienten rekombinanten Adenovirus (Ad-Vektor) in vivo zu induzieren.

**[0038]** Der replikationsdefiziente rekombinante Ad-Vektor, der die DNA für ein beispielhaftes angiogenes Peptid (insbesondere VEGF-Peptid) VEGF<sub>165</sub> enthält, wurde nach den Techniken, die in Gastroenterology, 106, 1638–1644 (1994) beschrieben wurden, konstruiert. Die DNA für VEGF<sub>165</sub>, einschließlich der Signalsequenz für die Sekretion, wurde in ein Expressionsplasmid inseriert und stand unter der Kontrolle des konstitutiven CMV "immediate-early promoter/enhancer". Das Expressionsplasmid enthielt auch die Ad5-Sequenz, die von Nukleotid 3384 bis Nukleotid 5778 reicht (9,24 bis 16,05 "map units"). Das die DNA für VEGF<sub>165</sub> tragende Plasmid wurde mit dem Plasmid pJM17 (von F. Graham, McMaster Universität, Hamilton, Ontario, Kanada) in 293-Zellen (American Type Culture Collection, CRL1573) co-transfiziert. Das Plasmid pJM17 enthält die gesamte Länge der Ad5-DNA (36 kb) und pBRX, eine 4,2-kb-Insert, das in die E1-Region eingebracht wurde, so dass die maximale Grenze, bis zu der DNA in das Ad-Kapsid verpackt werden kann, um ungefähr 2 kb überschritten wurde. Eine homologe Rekombination zwischen dem Expressionsplasmid und pJM17 in den 293-Zellen ersetzte die E1-Region und das pBRX-Insert mit der Expressionskassette von dem Expressionsplasmid. Das Wachstum des adenoviralen Vektors, dem

die E1-Region fehlte, ist auf komplementäre Zellen beschränkt und wurde in 293-Zellen vorgenommen, eine humane embryonische Nieren-Zelllinie, die durch Ad5 transformiert wurde und, die die E1-Region in trans exprimiert. Das Kulturmedium für die 293-Zellen war verbessertes "Minimal Essential Medium", dem 10% hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum, 2 mmol/l Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurde (alle von „Biofluids"). Nach der Co-Transfektion wurden einzelne virale Plaques isoliert und in 293-Zellen amplifiziert. Der Kontroll-Vektor, der die DNA für das E. coli lacZ-Gen trägt und für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, war AdCMV. $\beta$ gal. AdCMV.VEGF<sub>165</sub> und AdCMV. $\beta$ gal wurden in 293-Zellen vermehrt und mittels CsCl-Dichtegradienten gereinigt.

**[0039]** Nachfolgend wurden die Präparationen dialysiert und in Dialyse-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl und 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) bei –70°C mit 10% Glycerin aufbewahrt. Der Titer jeder viralen Stammlösung wurde mit dem Plaque-Test in 293-Zellen ermittelt und die Titer betrugen konsistent zwischen  $5 \times 10^9$  und  $2 \times 10^{11}$  pfu/ml.

**[0040]** Um die Wirkungen des Ad-vermittelten Gentransfers in vivo zu ermitteln, wurden entweder AdCMV.VEGF<sub>165</sub> oder AdCMV. $\beta$ gal ( $2 \times 10^{10}$  pfu) in 0,5 ml Matrigel resuspendiert. Anschließend wurden C57BL-Mäuse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) subkutan mit den gesamten 0,5 ml Matrigel, das entweder AdCMV.VEGF<sub>165</sub> oder AdCMV. $\beta$ gal enthielt, nahe der abdominalen Mittellinie injiziert. Zusätzlich wurden Tiere mit Vektor-freiem Matrigel injiziert. Die Mäuse wurden gemäß vier verschiedener Protokolle untersucht.

**[0041]** Protokoll 1: Um festzustellen, ob in Matrigel resuspendierte Ad-Vektoren das umliegende Gewebe infizieren, wurden die Mäuse entweder mit Matrigel, das AdCMV. $\beta$ gal (n = 5) enthielt, oder mit Matrigel alleine (n = 3) injiziert. Die Tiere wurden 6 Tage nach der Injektion getötet und das verfestigte Matrigel wurde entfernt und fixiert. Nachfolgend wurde das Matrigel zerschnitten, mit X-gal gefärbt und auf Blaufärbung hin untersucht.

**[0042]** Protokoll 2: Um die Dauer der Expression des Transgens in vivo zu ermitteln, wurden die Mäuse entweder mit Matrigel, das AdCMV.VEGF<sub>165</sub> enthielt (n = 9), oder mit Matrigel alleine (n = 9) injiziert. Die Tiere wurden getötet und das verfestigte Matrigel wurde 3, 7 und 21 Tage nach der Injektion entfernt. Die Gewebeblöcke wurden sofort in OTC (Miles, Inc.) getaucht und schnell in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Gewebeblöcke wurden bei –70°C für weniger als einen Monat aufbewahrt. Zur immunhistochemischen Analyse wurden 10 µm dicke gefrorene Schnitte (Microm-Kryotom) auf silanisierten Objektträgern eingebracht (Digene Diagnostics). Die Schnitte wurden für



15 min an der Luft getrocknet und entweder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für bis zu 48 Stunden aufbewahrt oder sofort in  $1 \times$  Histochoice (Amresco), das 0,1% Triton-X-100 (Sigma Chemical Co.) enthielt, für 12 Minuten fixiert. Nachdem Waschen mit PBS (pH 7.4), wurden die Objektträger in 0,5% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert, um endogene Peroxidase-Aktivität zu inhibieren. Primäre anti-VEGF-Antikörper aus Kaninchen wurden mit sekundärem biotinylierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege und dem Avidin-Biotin-Komplex nachgewiesen und mittels Diaminobenzidin sichtbar gemacht (alle Detektionsreagenzien wurden von „Vector Laboratories“ erhalten). Die Durchführung erfolgte gemäß der Packungsbeilagen, mit der Ausnahme, dass die Schnitte in der Blockierungslösung für mindestens 45 Minuten inkubiert wurden, bevor der primäre Antikörper zugesetzt wurde, und dass die Inkubationen mit anti-VEGF oder Kontrollserum (1 : 6000 Verdünnung) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  vorgenommen wurden. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt. Die anti-VEGF-Antikörper wurden in Kaninchen hergestellt, außer die Peptide wurden an ein Trägerprotein, KLH, durch 0,2% Glutaraldehyd konjugiert. Die Antikörper gegen KLH alleine wurden auch hergestellt und als Negativkontrolle verwendet. Die Antikörper-Spezifität wurde durch die Detektion von humanem VEGF auf Western Blots getestet und sowohl anti-KLH und Kontrollserum (vor Immunisierung) wurden als Negativkontrollen verwendet, um die Hintergrundfärbung zu bestimmen.

**[0043]** Protokoll 3: Die Anwesenheit von neu gebildeten Blutgefäßen wurde wie in Lab. Invest., 67, 519–528 (1992) beschrieben, an Mäusen untersucht, die 14 Tage nach der Injektion mit Matrigel getötet wurden ( $n = 8$  Mäuse für jeden Ad-Vektor; 4 Mäuse wurden in jedem von zwei separaten Experimenten verwendet). Die Gele wurden durch Herausschneiden wiedergewonnen und fixiert. Histologische Schnitte wurden mit "Masson's Trichome Stain" gefärbt und auf das Vorliegen von Neovaskularisierung untersucht. Die Dicke des Stromas, das das Matrigel umgab, wurde durch Messen des Abstandes zwischen der Oberfläche des Matrigels und dem Abdominalmuskel in zwei verschiedenen histologischen Schnitten für jedes verfestigte Matrigel ermittelt. Zehn Messwerte wurden in 50 bis 100  $\mu\text{m}$  Abständen aus jedem histologischem Schnitt gewonnen und die 20 Messwerte von den zwei Schnitten wurden gemittelt, um die Stromadicke für jedes einzelne verfestigte Matrigel anzugeben.

**[0044]** Protokoll 4: Die angiogene Antwort wurde über den Hämoglobingehalt in dem verfestigten Matrigel bestimmt ( $n = 10$  Mäuse für jeden Ad-Vektor; 3 oder 4 Mäuse wurden in jedem der drei separaten Experimente verwendet).

**[0045]** Bei Experimenten, die durchgeführt wurden,

um zu untersuchen, ob in Matrigel resuspendierte Ad-Vektoren aus dem Gel diffundieren und umgebenes Gewebe infizieren können, wurden die Mäuse 6 Tage nach der Injektion mit Matrigel alleine oder Matrigel, das AdCMV. $\beta\text{gal}$  enthielt, getötet und das verfestigte Matrigel wurde mit X-gal gefärbt. X-gal-positive Zellen wurden in dem das Matrigel umgebenden Stroma gefunden. Im Gegensatz dazu wurden keine blauen Zellen in dem Gewebe nachgewiesen, welches das uninfilzierte verfestigte Matrigel umgab. In anderen Experimenten wurde die Dauer der Ad-vermittelten VEGF<sub>165</sub>-Genexpression in vivo untersucht. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde festgestellt, dass in dem Gewebe, das das verfestigte Matrigel umgab, das 3 Tage nach der Co-Injektion von Matrigel und AdCMV.VEGF<sub>165</sub> wiedergewonnen wurde, VEGF-positive Zellen nachweisbar waren. Die Färbung war am Tag 7 am intensivsten und nur eine wenige Zellen waren 21 Tage nach der Injektion immunpositiv. Die Inkubationen in der Abwesenheit von dem primären Antikörper zeigten keine Immunfärbung. Die Inkubationen mit dem Antikörper gegen das Trägerprotein zeigten eine positive Reaktion in der abdominalen Muskelschicht, jedoch wurde keine positive Reaktion in dem Gewebe, das das verfestigte Matrigel umgab, gefunden. Das verfestigte Matrigel wurde 14 Tage nach der Injektion histologisch untersucht und die Angiogenese wurde als Reaktion auf AdCMV.VEGF<sub>165</sub> in den das Matrigel umgebenden Geweben untersucht. Diese Wirkung war mit einer gesteigerten Vaskularisierung und Dicke der Stromamatrix, die das Matrigel umgab, verbunden. Im Gegensatz dazu bewirkte AdCMV. $\beta\text{gal}$  eine geringe Verdickung der Stromamatrix um das Matrigel herum, ohne jedoch eine gesteigerte Vaskularisierung zu induzieren, und Matrigel alleine bewirkte keine Verdickung des Stromas oder Angiogenese. Weiterhin zeigte die quantitative Bestimmung der Angiogenese, dass der Hämoglobingehalt in dem verfestigten Matrigel mit AdCMV.VEGF<sub>165</sub> vierfach höher war, als im Fall der Gelexplantate mit AdCMV. $\beta\text{gal}$ . Eine signifikante Zunahme im Hämoglobingehalt wurde auch mit AdCMV. $\beta\text{gal}$  infizierten, im Vergleich zu uninfilziertem, verfestigtem Kontroll-Matrigel beobachtet. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ein adenoviraler Vektor, der DNA umfasst, die für ein angiogenes (insbesondere VEGF) Peptid kodiert, die Angiogenese in vivo induziert.

#### Beispiel 2

**[0046]** Dieses Beispiel erläutert das Vermögen der vorliegenden Erfindung, den in vivo Gentransfer in das Myokard unter Verwendung eines replikationsdefizienten adenoviralen Vektors zu steuern.

**[0047]** Ein replikationsdefizienter Vektor, AdCMV.VEGF, war ein E1a<sup>-</sup>, partieller E1b<sup>-</sup>, partieller E3<sup>-</sup>-adenoviraler Vektor, der eine Expressionskassette in der E1-Position enthielt, die den Cytomegalovi-

rus „immediate early promoter/enhancer“ (CMV) enthielt, der die DNA für humanes VEGF<sub>165</sub> antreibt. AdCMV.Null (ähnlich zu AdCMV.VEGF, aber ohne Gen in der Expressionskassette) wurde als ein Kontroll-Vektor in den in vitro Experimenten verwendet. AdCMV.CAT (ähnlich zu AdCMV.VEGF, aber für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase kodierend) wurde verwendet, um ein Markergen zu transferieren und zu exprimieren. Alle adenoviralen Vektoren wurden in 293-Zellen vermehrt, mittels CsCl-Dichtegradienten gereinigt, dialysiert und der Titer mit dem Plaque-Assay bestimmt. Die Vektoren wurden in 50 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

**[0048]** Männliche Mongrel-Hunde (25–30 kg) wurden für alle Untersuchungen verwendet. Die Betäubung wurde intravenös durch Methohexital induziert (Brevital; Eli Lilly, Indianapolis, Indiana; 10 mg/kg), und nach der Intubation wurde die Betäubung durch inhaliertes Isofluran aufrecht gehalten (1–2% in 2–3 l O<sub>2</sub>). Für direkte myokardiale Injektionen wurde eine links-laterale Thorakotomie unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Perikard wurde anterior bis zum Nervus phrenicus geteilt, und drei getrennte Nähte (5-0 Monofilament) wurden zur Markierung, in Abständen von 3,5 cm, entlang der freien Wand des linken Ventrikels platziert. Die adenoviralen Vektoren wurden an markierten Stellen in einem Volumen von 100 µl, mit Hilfe einer 0,5 ml Spritze und einer 30-gauge-Nadel, verabreicht. Die Nadelspitze wurde in 3–5 mm Tiefe von der epikardialen Oberfläche entfernt, positioniert, und eine ausreichende Freisetzung wurde visuell bestätigt. Das Perikard und der Brustkorb wurden mittels Standardtechniken wieder geschlossen, und den Tieren wurde es erlaubt, sich zu erholen.

**[0049]** Um festzustellen, ob anhaltende lokale Spiegel eines therapeutischen Proteins im Myokard zu erreichen sind, wurde AdCMV.VEGF (10<sup>9</sup> pfu) durch direkte myokardiale Injektion (zwei Injektionen pro Tier; 12 Tiere) verabreicht. Gewebeproben (1 cm<sup>3</sup>) wurden von dem Ort der Vektorverabreichung entnommen und sofort, bzw. 2, 5, 7, und 14 Tage nach Vektorverabreichung, auf eine VEGF-Expression untersucht. Die mit dem AdCMV.CAT-Vektor injizierten Gewebe wurden als Negativkontrolle verwendet.

**[0050]** Die Quantifizierung der VEGF-Expression im Myokard erfolgte mit dem „Quantikine Immunassay“ für humanes VEGF (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN). Gewebeproben (0,5 g), entnommen von den Orten der Vektorverabreichung, wurden mit Proteinlysis-Puffer homogenisiert (10 mmol/l Tris-HCl, pH = 8, 0,14 mol/l NaCl, 0,25% NaN<sub>3</sub>, 2% Triton X-100, und 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid; 2 ml/g Gewebe), Proteinbestimmungen wurden durchgeführt, Aliquots des Proteinlysats (100 µg) wurden in 3 Parallelen untersucht und die Absorption bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät ermittelt. Die

VEGF-Konzentration wurde auf mg Protein bezogen. Die räumliche Grenze der VEGF-Expression wurde durch Untersuchung von Gewebeproben aus Tieren, die am Tag 7 getötet wurden, bestimmt. Die Gewebe wurden in zentrale, periphere, epikardiale und endokardiale Anteile getrennt, und jedes Gewebe wurde separat auf VEGF-Expression untersucht.

**[0051]** Um zu bestimmen, ob eine lokale VEGF-Expression zu nachweisbaren Mengen an VEGF im Serum führt, wurden Blutproben von Tieren vor Vektorverabreichung bzw. am Tag der Tötung, 2, 5, 7 und 14 Tagen nach Vektorverabreichung, untersucht. Die Quantifizierung von VEGF wurde mit dem Enzymgekoppelten immunabsorbierenden Test mit 50 µl Serumprobe durchgeführt.

**[0052]** Um die systemische Wirkung der direkten Injektionen der adenoviralen Vektoren in das Myokard zu untersuchen, wurde die Serumbiochemie und die vollständigen Blutbild-Parameter über die Zeit verfolgt. Blutproben für die Ermittlung der Zahl weißer Blutzellen, des Hämatokrits, der Plättchenanzahl, der alkalischen Phosphatase, der Serum-Glutamin-Pyruvat-Transaminase, des Bilirubins und des Kreatins wurden von den Tieren vor der Vektorverabreichung bzw. 2, 7 und 14 Tage nach Vektorverabreichung untersucht. Die Werte für jeden Zeitpunkt wurden gemittelt. Die Bestimmungen der Serumbiochemie erfolgte mit dem „Du Pont Analyst Benchtop Chemistry System“ (Du Pont Co., Wilmington, DE), und die vollständige Bestimmung der Blutbild-Parameter wurde mit dem „System 900 Hematology Analyzer“ (Serono Diagnostics, Allentown, PA) durchgeführt.

**[0053]** Um die Wirkung von einem direkten myokardialen Gentransfer auf die Herzfunktion zu ermitteln, wurde eine transthorakale, zweidimensionale Dopplernalyse und Echokardiogramme mit einem „Hewlett Packard 2500 Echocardiograph“-Gerät (Hewlett-Packard Co., Andover, MA) und einem 3,5-MHz-Wandler durchgeführt. Die folgenden Bilder wurden vor der Operation und entweder 5–7 Tage oder 14 Tage postoperativ aufgenommen: Die parasternale Ansicht in der langen Achse, die parasternale Ansicht in der kurzen Achse an der Spitze der papillären Muskel und die apikale Fünf-Kammer Ansicht. Eine gepulste Doppler-Echokardiographie wurde auch vom apikalen 5-Kammer-Blick auf der Ebene des Aorta-Annulus durchgeführt.

**[0054]** Eine „off-line“ Analyse der lokalen Wanddickenzunahme wurde durch Nachfahren der endokardialen und epikardialen Oberflächen des linken Ventrikels sowohl in der Diastole als auch in der Systole ermittelt. Der Ventrikel wurde dazu in sechs gleiche radiale Segmente eingeteilt, das Segment 1 befand sich am unteren ventrikulären Septum und nachfolgende Segmente wurden fortlaufend im Uhrzeigersinn nummeriert, so dass Segment 6 an der unteren

Wand endete. Die Segmente 3 und 4 repräsentierten daher die anterolaterale freie Wand des linken Ventrikels. Die mittlere Wanddickenzunahme jedes Segments wurde ermittelt. Die systolische Wandverdickung in jedem Segment wurde als mittlere systolische Wanddickenzunahme minus der mittleren diastolischen Wanddickenzunahme definiert. Um die globale linksventrikuläre Funktion zu bestimmen, wurde das Herzminutenvolumen mittels einer Standard-Doppleranalyse des Herzschlagvolumens (Gebiet des Aorta-Annulus' multipliziert mit dem Geschwindigkeits/Zeit-Integral des Fließgeschwindigkeitsprofils über dem Aorta-Annulus) sowie die Herzschlagrate ermittelt.

**[0055]** Die Bestimmung der VEGF-Proteinexpression in vivo wurde nach der direkten myokardialen Verabreichung von AdCMV.VEGF mit dem Enzymgekoppelten immunabsorbierenden Test ermittelt. Die Quantifizierung der VEGF-Expression im Myokard über die Zeit ergab, dass der AdCMV.VEGF-Vektor, 2 Tage nach Vektorverabreichung, einen mehr als 18-fachen Anstieg gegenüber dem Ausgangswert der VEGF-Expression induzierte, und 7 Tage nach Vektorverabreichung war die Expression noch 15-fach erhöht. Im Gegensatz dazu bewirkte die Verabreichung des Kontrollvektors AdCMV.CAT zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Erhöhung des VEGF-Spiegels gegenüber dem Ausgangswert. Die VEGF-Spiegel am Tag 0, die sofort nach Vektorverabreichung erhalten wurden, waren ähnlich denen im unbehandelten Gewebe, was bestätigt, dass die virale Präparation nicht mit VEGF-Protein verunreinigt war. Darüber hinaus konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt VEGF-Mengen in dem Serum behandelter Tiere nachgewiesen werden, was die Annahme stützt, dass die Freisetzung von adenoviraler Vektoren eine geeignete Methode für den lokalen Gentransfers darstellt.

**[0056]** Die Verabreichung von AdCMV.VEGF war auch durch eine breite räumliche Begrenzung der Genexpression charakterisiert, was mit den Daten, die mit dem Marker-Gentransfer erhalten wurden, übereinstimmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die für AdCMV.CAT erhalten wurden, waren jedoch 7 Tage nach Verabreichung von AdCMV.VEGF, bis zu 15 mm von dem Ort der Vektorverabreichung entfernt, die Spiegel der VEGF-Expression in allen vier räumlichen Regionen, bis zu 15 mm vom Ort der Vektorverabreichung entfernt, gleichermaßen angestiegen (zentrales und peripheres Epikard und zentrales und peripheres Endokard), was eine gleichmäßige Verteilung des Proteins in allen Geweben nahe legt.

**[0057]** Alle Tiere, die adenovirale Vektoren erhielten, überlebten bis zu dem vorher bestimmten Zeitpunkt der Tötung. Keines der Tiere zeigte eine Störung in der Entwicklung oder Tachykardie oder war

fiebrig, und es entwickelten sich auch keine Wundinfektionen. Gegenüber den Kontrollen waren in den Tieren 2, 7 und 14 Tage nach Vektorverabreichung keine signifikanten Veränderungen in der Zahl weißer Blutkörperchen, im Hämatokrit, in der Plättchenzahl, der alkalischen Phosphatase, der Serum Glutamin-Pyruvat-Transaminase, des Bilirubins oder des Kreatins festzustellen.

**[0058]** Echokardiogramme, die vor Vektorverabreichung und 5–7 oder 14 Tage nach Vektorverabreichung erstellt wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen in der globalen oder lokalen ventrikulären Funktion. Bei der Ermittlung der regionalen Wandbewegung waren keine signifikanten Unterschiede in der systolischen Wanddickenzunahme von irgendeinem der sechs radialen Segmente zwischen den prä- und postoperativen Untersuchungen festzustellen. Auch das Herzminutenvolumen veränderte sich nicht signifikant zwischen den prä- und postoperativen Untersuchungen.

**[0059]** Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine breite räumliche Begrenzung der Genexpression nach direktem myokardialen Gentransfer mittels Adenovirus vorliegt, und es wurde gezeigt, dass das angewendete Verfahren zur Freisetzung sicher war und gut toleriert wurde. Weiterhin wurde mittels eines Modells am Großtier, das eine ähnliche Physiologie wie Menschen aufweist, gezeigt, dass eine in vivo Verabreichung eines adenoviralen Vektors, der für ein angiogenes Protein kodiert (insbesondere VEGF), in einer für mehrere Tage anhaltenden, lokalen Proteinexpression nach dem Gentransfer resultiert.

### Beispiel 3

**[0060]** Diese Beispiel erläutert das Vermögen der vorliegenden Erfindung, mittels adenoviralen Gentransfers eines angiogenen Peptids (insbesondere VEGF), vor einem drohenden Gefäßverschluss durch Induktion von Angiogenese zu schützen.

**[0061]** Ein Modell für einen akuten Gefäßverschluss, der eine schon vorher bestehende Ischämie überlagert, wurde mit Sprague Dawley-Ratten im Gewicht von 250 bis 300 g geschaffen. Die Tiere wurden intramuskulär mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (2 mg/kg) betäubt, eine Laparatomie wurde entlang der Mittellinie unter sterilen Bedingungen vorgenommen, und die linke gemeinsame Hüftarterie wurde abgebunden und geteilt. Die adenoviralen Vektoren wurden dann in das linke iliofemorale Fettgewebe verabreicht und der Muskel und das Abdomen wurden in zwei Schichten mit einer nicht-absorbierenden Naht geschlossen. AdVEGF (Gesamtdosis =  $4 \times 10^9$  pfu), der Kontrollvektor AdNull (Gesamtdosis =  $4 \times 10^9$  pfu) oder PBS (Gesamtdosis =  $4 \times 100 \mu\text{l}$ ) wurden zum Zeitpunkt der Hüftarterienligatur an vier Stellen

mit einem Volumen von 100 µl unter Verwendung einer 0,5 ml Spritze mit einer 30-gauge-Nadel injiziert. In den Gebieten, die für die kollaterale Gefäßbildung vorgesehen waren, wurden vier einzelne Vektorverabreichungen an bestimmten Stellen in die linke iliofemorale Region jedes Tiers vorgenommen, einschließlich des retroperitonealen und Leisten-Fettgewebes, des Lendenmuskels und des Quadrizeps-Muskels. Bei einer zusätzlichen Gruppe von Kontrolltieren wurde nur eine unilaterale Ligation der gemeinsamen Hüftarterie ohne Behandlung durchgeführt.

**[0062]** Drei Wochen nach der Ligation der linken gemeinsamen Hüftarterie und der Vektorverabreichung wurden die Tiere, wie oben beschrieben, betäubt, und die linke gemeinsame Femoral-Arterie wurde abgebunden und auf der Ebene des Leistenbands geteilt. Eine sofortige Analyse des relativen Hinterlauf-Blutflusses und der Gefäßausbildung wurde in der angegebenen Reihenfolge mit folgenden Techniken untersucht: (1)  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertes Sestamibi; (2) farbige Mikrokugeln; (3) Angiographie; und (4) histologische Quantifizierung der Blutgefäßzahl.

**[0063]** Der replikationsdefiziente Vektor AdVEGF war ein E1a<sup>-</sup>, partieller E1b<sup>-</sup>, partieller E3<sup>-</sup>-adenoviraler Vektor, der eine Expressionskassette in der E1-Position enthielt, die den Cytomegalovirus "immediate early promoter/enhancer" (CMV) enthielt, der die Expression für humanes VEGF<sub>165</sub> steuert. AdNull (ähnlich zu AdVEGF, aber ohne Gen in der Expressionskassette) wurde als Kontrollvektor verwendet. Alle adenoviralen Vektoren wurden in 293-Zellen vermehrt, mittels CsCl-Dichtegradienten gereinigt, dialysiert und bei -70°C aufbewahrt. Der Titer jeder Virus-Stammlösung wurde mit dem Plaque-Test in 293-Zellen ermittelt. Es wurde gezeigt, dass alle viralen Stammlösungen frei von replikationskompetentem Wildtyp-Adenovirus waren.

**[0064]** Zur Bestätigung, dass der AdVEGF-Vektor den Transfer und die Expression der VEGF-DNA an Fett- und Muskelgewebe vermitteln kann, wurde ein Enzym-gekoppelter Immunttest (ELISA) verwendet, um die VEGF-Spiegel in Geweben, die 0, 1, 3, 5 und 7 Tage nach der Ligation der gemeinsamen Hüftarterie und Vektorverabreichung gewonnen wurden, zu bestimmen ( $10^9$  pfu/Ort; n = 3 zu jedem Zeitpunkt). Retroperitoneales Fettgewebe und Quadrizeps-Muskel von Tieren, die mit den Vektoren behandelt worden waren, wurden entnommen, in Phosphat-gepufferter Salzlösung gespült, pH 7.4 (PBS) und mit Proteinlysis-Puffer homogenisiert [10 mM Tris-HCl pH = 8, 0,14 M NaCl, 0,025% NaN<sub>3</sub>, 2% Triton-X-100, und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (2 ml/g Gewebe)]. Um zu bestätigen, dass das synthetisierte VEGF lokal verbleibt, wurde von jedem Tier, zu den oben genannten Zeitpunkten Serum gewonnen. Proteinbestimmungen erfolgten mit der Bradford-Methode, und

ein ELISA für VEGF („Quantikine Immunassay“ für humanes VEGF, R & D Systems, Minneapolis, MN) wurde unter Verwendung von 50 µg Gewebe durchgeführt (jeder Test wurde für jedes Tier in zwei Parallelen durchgeführt). Die Absorption wurde bei 450 nm unter Verwendung eines Mikroplatten-Lesegerätes bestimmt und die VEGF-Konzentration wurde auf mg Protein bezogen.

**[0065]**  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertes "sestamibi scanning" wurde verwendet, um den Blutfluss zu dem Hinterlauf zu bestimmen. Dazu wurde die rechte Drosselvene durch einen begrenzten rechten Schnitt am Hals ermittelt, und 2–3 mCi des  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten Sestamibi (Cardiolite, Dupont Pharma, North Billerica, MD) wurde in einem Volumen von 0,5 ml PBS (0,9%) intravenös injiziert. Ungefähr 15 min nach der Injektion wurden die Tiere, auf dem Rücken liegend, auf den unteren Detektor eines „ADAC Vertex Zweikopf-Gamma-Kamerasystems“ (ADAC Laboratories, Milpitas, CA) positioniert, und ventral und dorsal wurden Ganzkörper-Gamma-Kamerabilder mittels eines Niedrigenergie-Hochauflösungs-Parallelloch-Kollimators und eines „Photopeak“-Energiefenster von 140 keV + 10% aufgenommen. Mindestens  $2 \times 10^5$  „counts“ wurden pro Tier simultan von den dorsalen (unterer Detektor) und ventralen (oberer Detektor) Bildern aufgenommen. Pegasys™ Computer und Bildverarbeitungssoftware (ADAC Laboratories) wurde verwendet, von einer Person im Blindmodus über das Zentrum der Waden des linken und rechten Hinterlaufs konsistente rechteckige „regions of interest“ (ROI) manuell zu markieren, und die mittlere Zahl an „counts/pixel“ wurde in diesen Gebieten bestimmt. Für das geometrische Mittel der ventralen und dorsalen Bilder wurde der relative Blutfluss als Verhältnis der mittleren „counts/pixel“ in der ROI des abgebundenen (linken) Hinterlaufs zu den mittleren „counts/pixel“ in der ROI des kontralateralen (rechten) Kontroll-Hinterlaufs angegeben.

**[0066]** Der Blutfluss zu dem ischämischen (linken) Hinterlauf relativ zum normalen (rechten) Hinterlauf wurde auch durch intra-arterielle Verabreichung von 15 µm-Farb-Mikrokugeln bestimmt, indem die Blutgefäße zum Hinterlauf auf ihre Funktion hin untersucht wurden. Die abdominale Aorta wurde durch eine Mittellinien-Laparatomie ermittelt und großzügig mit einer 4-0 Seidennaht eingekreist. Unmittelbar distal zur Naht wurde ein 24-gauge, 3,4-Zoll (1,9 cm) „Angio-cath“-Katheter (Becton Dickinson Vascular Access, Sandy, UT) in die infrarenale Aorta eingeführt, und 0,5 ml einer Nitroglycerin-Lösung [Abbott Laboratories, North Chicago, IL (500 µg/ml)] und  $2 \times 10^6$  15 µm-Farbmikrokugeln [E-Z Trac, Los Angeles, CA ( $2 \times 10^6$  Mikrokugeln in 200 µl)] wurden gevortext und durch den Katheter innerhalb von 20 Sekunden injiziert, um eine geeignete Vermischung der Mikrokugeln zu gewährleisten. Nach Tötung wurde die gesamte Hinterlauf-Wadenmuskulatur von Haut und

Knochen freigeschnitten, gewogen, mit Gewebeverdau-Reagenzien 1 und 2 (E-Z Trac), gemäß Herstellerangaben, verdaut und in 50 µl Mikrokugel-Zählreagenz (E-Z Trac) resuspendiert. Die Mikrokugeln wurden von einer Person im Blindmodus, unter Verwendung eines manuellen Hämozytometers, ausgezählt, mit einem Minimum von 400 gezählten Mikrokugeln pro Probe. Die Zahl der Mikrokugeln pro Gramm Gewebe wurde als Mikrokugeln/g (Feuchtgewicht) Gewebe in dem ligierten Hinterlauf im Vergleich zu den Mikrokugeln/g Feuchtgewicht in der kontralateralen Hinterlauf-Kontrolle angegeben.

**[0067]** Die Angiographie wurde verwendet, um makroskopisch die Gefäßausbildung zu untersuchen. Dafür wurden die Tiere, auf dem Rücken liegend, in einem Abstand von 20 cm von dem Kollimator eines „Mobile Surgical X-ray System BV25“ (Philips, Holland) positioniert. Unter Verwendung eines 24-gauge, 3/4-Zoll (1.9 cm) Angiokatheters (Becton Dickinson, Sandy, UT), der in die infrarenale Aorta eingeführt wurde, wurden 0.5 ml Nitroglycerin (500 µg/ml; Abbott Laboratories) innerhalb von 20 Sekunden injiziert. Sofort danach wurden 3 ml Renograffin-76 (Squibb Diagnostics, New Brunswick, NJ) durch den Katheter in die distale Aorta injiziert, und Leuchtschirm-Bilder wurden in Abständen von 2 Sekunden aufgenommen. Repräsentative Bilder, die die maximale arterielle Trübung zeigen, wurden entwickelt, und der Gefäßausbildung wurden durch drei Untersucher im Blindmodus Punktzahlen, „Scores“, zugeordnet. Ein Gefäß-Score wurde für jedes Tier so bestimmt, dass eine Linie senkrecht zu dem Mittelpunkt der Längsachse des Oberschenkels gezogen wurde, und die Zahl der Gefäße, die diese Linie kreuzten, wurde von jedem Beobachter bestimmt, gemittelt und als Gefäß-Score angegeben.

**[0068]** Eine histologische Untersuchung wurde verwendet, um die Gefäßausbildung auf der Ebene der kleinen Gefäße, an den Orten, denen die adenoviralen Vektoren verabreicht worden waren, zu quantifizieren. Für die behandelten Fettgewebe wurde 1 cm<sup>3</sup> Fettgewebe als Probe von den Orten der Vektorverabreichung entnommen, in PBS gewaschen und in 4% Formalin bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet, in einer zur Gewebeoberfläche parallelen Fläche wurden serielle 5 µm-Querschnitte in Abständen von 50 µm hergestellt, und eine immunhistochemische Färbung wurde für alpha-Actin, ein Endothelzell-spezifisches Antigen, durchgeführt. Die Paraffin-Schnitte wurden mit 1,5% Pferdeserum für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um eine unspezifische Bindung zu verhindern und mit dem primären Antikörper (monoklonaler anti-Mensch alpha-Actin; Sigma, St. Louis, MO) in einer Verdünnung von 1/500 für 60 Minuten inkubiert. Die Objektträger wurden dann nacheinander (jeweils 30 Minuten) in biotinyliertem anti-Maus IgG aus Pferd, ABC-Reagenzien (Vector Laboratories, Burlingame,

CA) und neues Fuchsin-Substrat für alkalische Phosphatase (Dako Corp., Carpinteria, CA) inkubiert und dann mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Schnitte wurden im Blindmodus von drei Beobachtern bei einer Vergrößerung von 100× untersucht. Fünf zufällige Gefäßfelder von weniger als 80 µm wurden pro Objektträger ausgezählt; 6 Objektträger wurden pro Probe untersucht. Die Zahlen wurden gemittelt und als Blutgefäßzahl pro mm<sup>2</sup> angegeben.

**[0069]** Um die Gefäßausbildung in den behandelten Regionen des Skelettmuskels zu untersuchen, wurden 1 cm<sup>3</sup> Proben des Quadrizeps-Muskels von den Orten der Vektorverabreichung entnommen, in PBS gewaschen und dann in ansteigenden Konzentrationen Saccharose-Phosphat-Lösung (25°C, 1 Stunde) fixiert. Die Skelettmuskelpuben wurden dann in einer 2 : 1 20% Saccharose/OCT-Mischung (Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) bei -70°C eingefroren. Die gefrorenen Schnitte wurden dann in 5 µm-Schnitte geschnitten und auf den Objektträgern bei -70°C eingefroren. Die gefrorenen Schnitte wurden auf Raumtemperatur erwärmt, für alkalische Phosphatase mit einem unlöslichen Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat und Nitroblautetrazolium (BCIP/NBT Tablette, Sigma, St. Louis, MO) für alkalische Phosphatasen gefärbt (25°C, 1 Stunde), und mit Eosin gegengefärbt. Die Schnitte wurden bei einer Vergrößerung von 400× durch drei Beobachter im Blindmodus untersucht. Die Kapillaren pro Muskelfaser wurden quantifiziert und als Anzahl Kapillaren pro Muskelfaser angegeben.

**[0070]** Ein erfolgreicher AdVEGF-vermittelter Gentransfer und Expression in Fettgewebe und Skelettmuskel wurde durch einen ELISA bestätigt. In keinem der Gewebe gab es eine nachweisbare VEGF-Expression am Tag 0 (Gewebe sofort nach der Vektorverabreichung entnommen), ähnlich zu unbehandeltem Fettgewebe und Skelettmuskel, was bestätigt, dass die Vektorpräparation nicht mit VEGF-Protein verunreinigt war. In beiden Geweben zeigte die Quantifizierung der VEGF-Expression, dass die Verabreichung von AdVEGF in einer VEGF-Expression resultiert, die 1 Tag nach Vektorverabreichung ihr Maximum erreichte und dann über mehrere Tage hinweg abnahm, bis der Ausgangswert 1 Woche nach Vektorverabreichung wieder erreicht war. Im Gegensatz dazu resultierte die Verabreichung des AdNull-Kontroll-Vektors in keinem der untersuchten Gewebe und zu keinem Untersuchungszeitpunkt in einer nachweisbaren VEGF-Expression. Es ist wichtig, festzuhalten, dass in Übereinstimmung mit dem Konzept, dass die adenovirale Vektorfreisetzung einen örtlich begrenzten Gentransfer und eine Methode zur Genexpression liefert, zu keinem Zeitpunkt in dem Serum von AdVEGF-behandelten Tieren nach der Vektorfreisetzung VEGF nachgewiesen werden konnte, und dass die Verabreichung von AdNull nicht in gesteigerten Serumspiegeln von VEGF im Vergleich zur

Kontrolle führte. Endogenes VEGF konnte im Serum oder in den Geweben nicht nachgewiesen werden, da der in den Experimenten eingesetzte ELISA nur humanes VEGF und nicht VEGF aus der Ratte detektieren kann.

**[0071]** <sup>99m</sup>Tc-markiertes „sestamibi imaging“ zeigte in den mit AdVEGF behandelten Tieren einen signifikant gesteigerten relativen Blutfluss zum ischämischen Hinterlauf. Die eingelesenen radioaktiven Bilder der AdNull-behandelten Kontrolltiere zeigten niedrige Radioaktivität in der Waden-Region des abgebundenen Hinterlaufs. Unbehandelte und PBS-behandelte Kontrolltiere zeigten ähnlich niedrige Radioaktivität in diesen Regionen wie die Ad-Null-Kontrollen. Obwohl sowohl die AdNull- als auch die PBS-Kontrollen niedrige Radioaktivitätsspiegel in der Waden-Region aufwiesen, waren die Werte der AdNull-Gruppe etwas höher als in der PBS-Gruppe.

**[0072]** Eine Analyse mit farbigen Mikrokugeln zeigte, dass der relative Blutfluss infolge der Femoral-Arterien-Ligation in den AdVEGF-behandelten Tieren fast dreimal höher als war, als der, der in irgendeinem der Kontrolltiere beobachtet worden war (AdNull-behandelt, PBS-behandelt oder unbehandelte Tiere). Der relative Blutfluss in unbehandelten und PBS-behandelten Kontrollen war ähnlich dem in AdNull-behandelten Tieren. Die Zunahme des relativen Blutflusses in den AdVEGF-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen, berechnet als das Verhältnis von Mikrokugeln/g Gewebe in dem ligierten Hinterlauf im Vergleich zu den Mikrokugeln/g Gewebe in dem kontralateralen Kontroll-Hinterlauf, beruhte auf einer Zunahme der Zahl der Mikrokugeln in dem ligierten Hinterlauf und nicht aus einer Abnahme der Zahl der Mikrokugeln in dem kontralateralen Kontroll-Hinterlauf. Um zu bestätigen, dass die farbigen Mikrokugeln während der Injektion genügend gut gemischt waren, wurde der relative Blutfluss zu jedem Hinterlauf in separaten Tiergruppen quantifiziert, ohne dass irgendeine Hüft- oder Oberschenkelarterien-Ligation (n = 6) vorgenommen wurde. Der relative Blutfluss (links gegenüber rechts) betrug in diesen Tieren 99% + 7%.

**[0073]** Die Angiographie zeigte eine signifikant stärkere Gefäßausbildung in dem ligierten Hinterlauf der AdVEGF-behandelten Tieren als in den Kontrollen, wobei die Kollateralen-Bildung teilweise das distale Gefäßsystem des Hinterlaufs wiederherstellte. Der angiographische Gefäß-Score in dem abgebundenen Hinterlauf der AdVEGF-behandelten Tiere war signifikant größer als der von unbehandelten, PBS-behandelten und AdNull-behandelten Kontrollen. Die Anzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralgefäße in den unbehandelten und PBS-behandelten Tieren war ähnlich, wie auch die Zahl der Gefäße in den PBS- und AdNull-behandelten Tieren. Die Zahl der Gefäße in den unbehandelten Kontrollen

war größer als die in der AdNull-Gruppe, aber beide waren kleiner als in der AdVEGF-Gruppe.

**[0074]** Die histologische Untersuchung der Gefäßausbildung im Fettgewebe und im Skelettmuskel stimmte mit den Beobachtungen des relativen Blutflusses und des angiographischen Nachweises einer gesteigerten Gefäßausbildung überein. Im Vergleich zu unbehandelten, PBS-behandelten und AdNull-behandelten Kontrollen wurde 21 Tage nach der Vektorverabreichung eine signifikant größere Zahl an kleinen Blutgefäßen in dem AdVEGF-injizierten Fettgewebe beobachtet. Eine quantitative Bestimmung der histologischen Proben AdVEGF-behandelter Fettgewebe zeigte eine Zunahme in der Zahl kleiner Gefäße um 52% + 6% im Vergleich zu unbehandelten, PBS-behandelten und AdNull-Kontrollen. In ähnlicher Weise zeigte eine histologische Untersuchung des AdVEGF-behandelten Quadrizeps-Skelettmuskels, 21 Tage nach Vektorverabreichung, eine signifikant größere Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser im Vergleich zu unbehandelten, PBS-behandelten oder AdNull-Kontrollen. Die quantitative Bestimmung des AdVEGF-behandelten Skelettmuskels zeigte eine signifikante Zunahme in der mittleren Kapillaren-Anzahl pro Muskelfaser im Vergleich zu unbehandelten, PBS-behandelten oder AdNull-Kontrollen.

**[0075]** Die Ergebnisse zeigen, dass der in vivo adenovirale vermittelte Transfer von humaner VEGF<sub>165</sub>-DNA zu Fett- und Skelettmuskelgeweben, die den Ort des Gefäßverschlusses umgeben bzw. sich distal dazu befinden, eine angiogene Antwort induziert, die geeignet ist, die Ischämie abzuschwächen, die durch den nachfolgenden akuten Gefäßverschuß verursacht wird. Weiterhin zeigen die Ergebnisse auch, dass angiogene Vermittler nicht nur verwendet werden können, um angiogene Antworten, die einem akuten ischämischen Ereignis folgen, zu induzieren, sondern, dass sie auch verwendet werden können, um ischämische Gewebe zu retten, die durch einen nachfolgenden akuten Gefäßverschuß bedroht sind. Der Nachweis eines gesteigerten Blutflusses zum Schutz ischämischer Gewebe, Wochen, nach dem das exprimierte angiogene Protein nicht länger nachweisbar war, zeigt, dass die Verabreichung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, ausreichend ist, eine physiologisch signifikante angiogene Antwort zu liefern.

#### Beispiel 4

**[0076]** Dieses Beispiel zeigt das Vermögen der vorliegenden Erfindung, die myokardiale Perfusion und die Funktion des ischämischen Herzens durch Adenovirus-vermittelten Gentransfer von einer DNA, die für ein angiogenes Peptid (insbesondere VEGF<sub>121</sub>) kodiert, zu verbessern.

**[0077]** Ein Modell für eine chronische myokardiale Ischämie wurde in Yorkshire-Schweinen etabliert, die 28–30 kg wogen. Die Tiere wurden intramuskulär mit Tiletamin, Zolazepam (Telazol, 3,3 mg/kg) und Xylazin (0,10 mg/kg) betäubt, dann intubiert, und die Betäubung wurde mit 0,5% bis 2,0% Isofluran aufrecht erhalten. Eine begrenzte linke Thorakotomie wurde unter sterilen Bedingungen durch den fünften interkostalen Raum durchgeführt, und ein kleiner Einschnitt wurde im Perikard vorgenommen. Ein Ameroid-Konstriktor mit 2,5 mm im Durchmesser (Research Instruments & MFG, Corvallis, Ore.) wurde so nahe wie möglich um die Circumflex-Koronararterie platziert. Eine 1%-ige Lidocain-Lösung wurde an dem Ort des Ameroid-Konstriktors topisch auf die Circumflex-Koronararterie aufgebracht, um einen Spasmus der Koronararterien zu verhindern. Das Perikard und der Brustkorb wurden dann geschlossen, und dem Tier wurde Gelegenheit gegeben, sich zu erholen.

**[0078]** Der replikationsdefiziente Vektor AdVEGF<sub>121</sub> ist ein E1a<sup>-</sup>, partieller E1b<sup>-</sup>, partieller E3<sup>-</sup>-adenoviraler Vektor, der eine Expressionskassette in der E1-Position (rechts nach links) enthält, die den Cytomegalovirus (CMV) „immediate early promoter/enhancer“, eine artifizielle „splice“ Sequenz, die humane VEGF<sub>121</sub>-DNA und das SV40-polyA/Stop-Signal enthält. AdNull (ähnlich zu AdVEGF<sub>121</sub>, aber ohne Gen in der Expressionskassette) wurde als ein Kontrollvektor verwendet. Alle adenoviralen Vektoren wurden in 293-Zellen vermehrt und titriert, mittels Cesiumchlorid-Dichtegradienten gereinigt, dialysiert und bei -70°C aufbewahrt. Es wurde gezeigt, dass die Virus-Stammlösungen frei von replikationskompetenten Wildtyp-Adenoviren waren. Die biologische Aktivität des transgenen VEGF<sub>121</sub>-Produkts wurde bestätigt, indem die Proliferation von humanen Nabelschnur-Endothelzellen durch Bestimmung von [<sup>3</sup>H]Thymin-Einbau wurde, und die transgene Expression in vivo durch einen Enzym-gekoppelten Immunabsorptionstest an myokardialen Biopsie-Proben, die von AdVEGF<sub>121</sub>-injizierten Orten, 3 Tage nach Vektorverabreichung, erhalten wurden, bestimmt wurde.

**[0079]** Drei Wochen nach Einsetzen des Ameroid-Konstriktors wurde die Thorakotomie wieder geöffnet und der therapeutische Vektor AdVEGF<sub>121</sub> oder der Kontroll-Vektor, AdNull, wurden mittels direkter myokardialer Injektion verabreicht. Jeder Vektor wurde an 10 Orten injiziert, jeder in 100 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7.4, in der Umgebung der Circumflex-Koronararterie (10<sup>8</sup> pfu/Injektion). Schrittmacher-Kabel wurden in das linke Herzohr platziert und subkutan für nachfolgende Untersuchung der regionalen myokardialen Perfusion während Belastung, durch Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) mittels <sup>99m</sup>Tc-markiertem Sestamibi, sowie für eine echokardiographische Untersuchung der lokalen Wanddickenzunahme, verlegt.

**[0080]** Die regionale myokardiale Perfusion wurde in Ruhe- und Belastungsphasen 3 Wochen und 7 Wochen nach Platzierung des Ameroid-Konstriktors mittels <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi SPECT untersucht. Während des schnellen atrialen pacings bei 200 Schlägen pro Minute bekamen die Tiere eine intravenöse Injektionen eines 5 mCi-Bolus von <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi und das pacing wurde für ungefähr 3 Minuten fortgeführt. Die Tiere wurden dann in geneigter Stellung in ein „ADAC Vertex dual detector gamma camera system“ (ADAC Laboratories, Milpitas, CA) platziert. Eine „nongated-SPECT“-Analyse wurde dann mit der „Step-and-Shoot“-Methode und einer 180°-Kreisbahn, die dem Körper umfuhr, aufgenommen. Den Tieren wurde erlaubt, die Basis-Herzschlagrate wieder zu erreichen und erhielten dann eine Injektion von einem 25 mCi-Bolus von <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi, bevor das Ruhe-SPECT in analoger Weise aufgenommen wurde.

**[0081]** Die Ruhe- und Belastungs-SPECT-Studien wurden im Blindmodus unter Verwendung eines integrierten ADAC Pegasys Computers ausgewertet. „Circumferential count profiles“ (Polardiagramme) wurden in Ruhe- und Belastungsphasen auf der mittelventrikulären Ebene erhoben, indem das mittelventrikuläre Bild in der kurzen Achse in 60 Kreissegmente unterteilt wurde, die ihr Zentrum in der Ventrikelhöhle hatten, durch die Bestimmung der „counts“ pro Segment, Normalisierung der „counts“ in jedem Segment auf das Segment mit der maximalen Zahl an „counts“ (zugeordnet wurde ein Referenzwert von 100) und Auftragen der normalisierten „counts“ pro Segment gegen die Winkelposition des Segments. Die Polardiagramme wurden in ASCII-Dateien für eine weitere Analyse mit dem Programm SIGMAP-LOT (Jandel Scientific, Corte Madera, CA) überführt.

**[0082]** Für jedes Tier wurde das Ausmaß der myokardialen Ischämie („Area“) aus der Differenz zwischen den Polardiagrammen, die aus den Ruhe- und Belastungsphasen erhalten wurden, bestimmt. Der maximale Grad der Ischämie („maximale Ischämie“) in der Umgebung der koronaren Circumflex-Koronararterie wurde dadurch bestimmt, dass der Punkt der größten Differenz zwischen Ruhe- und Belastungsdiagrammen ermittelt wurde, und die Differenz in den Diagrammen an diesem Punkt gemessen wurde. Die prozentuale Verbesserung der myokardialen Perfusion wurde für jedes Tier für diese beiden Parameter als („Parameter“ bei 3 Wochen – „Parameter“ bei 7 Wochen × 100)/(„Parameter“ bei 3 Wochen) berechnet.

**[0083]** Die lokale Myokardfunktion im Ausgangszustand wurde durch Echokardiographie, aufgenommen bei Ruhe und Belastung, zum Zeitpunkt der Vektorverabreichung ermittelt. Die Tiere wurden betäubt, in eine linkslaterale Dekubitus-Position gebracht, und zweidimensionale Standard- sowie „M-Modus-transt-

horakale" Bilder wurden mit einem HP2500 Echokardiographiegerät und einem a 3.0/3.5 MHz zwei Frequenzen-Transthorakal-Wandler (Hewlett-Packard, Andover, Mass.) aufgenommen. Aus dem rechten parasternalen Zugang wurden für 3 Minuten Bilder von der Mitte des Papillarmuskels im Ruhezustand aufgenommen. Die Tiere wurden dann schrittweise schnell atrial gepact, um eine Herzschlagrate von letztlich 200 Schlägen/min zu erreichen, dem Zeitpunkt, zu dem für weitere 3 Minuten Bilder aufgenommen wurden.

**[0084]** Die lokale Wanddickenzunahme wurde durch einen einzelnen erfahrenen Forscher im Blindmodus dadurch ermittelt, dass die endokardialen und epikardialen Oberflächen des linken Ventrikels in der Diastole und Systole, unter Verwendung eines „Digisonics CardioRevue System" (Digisonics Inc, Houston, Tex.) umfahren wurden. Die systolische Wanddickenzunahme in jedem der sechs gleichen 60°-Segmente wurde als mittlere systolische Wanddickenzunahme minus der mittleren diastolischen Wanddickenzunahme definiert. Die anteilige Wanddickenzunahme wurde als mittlere systolische Wanddickenzunahme, geteilt durch die mittlere diastolische Wanddickenzunahme, berechnet. Die ischämischen und nicht-ischämischen Gebiete wurden für jedes Tier bei 3 Wochen (Ausgangs-Ischämie) aus den Bildern, die mittels des schellen atrialen pacings erhalten wurden, als die zwei benachbarten Segmente mit der niedrigsten bzw. höchsten anteiligen Wanddickenzunahme bestimmt. Diese Werte passten in allen Fällen zur Umgebung der koronaren Circumflex-Koronararterie bzw. dem Septum. Die gleichen Gebiete wurden für jedes Tier auch bei 7 Wochen aus den schnellen atrialen pacing Bildern analysiert.

**[0085]** Zum Zeitpunkt, an dem die Tiere getötet werden sollten (4 Wochen nach der Vektorverabreichung), wurde der Herzschlag mit 40 mEq KCl stillgestellt und dann mittels Perfusion bei 100 mm Hg mit 1 l McDowell-Trump-Fixativ (4% Formaldehyd, 1% Glutaraldehyd, 1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und mit 0,3% NaOH auf pH = 7.2 eingestellt) fixiert. Eine ex vivo Koronarangiographie wurde von dem gleichen Beobachter der Angiographie im Blindmodus unter Verwendung eines „5F end-hole wedge balloon catheter" (Arrow Inc., Reading, Pa.), der in die linke Haupt-Koronararterie platziert wurde, durchgeführt. Mittels der Film-Fluoroskopie in der rechtsschrägen Standard-Projektion und kontinuierlicher Bildaufnahme wurden 5 ml Kontrastmedium (Hypaque-76, Nycomed Inc., New York, N. Y.) bei kontinuierlichem Fluss injiziert, bis die gesamte linke vordere absteigende Koronararterie und ihre Verzweigungen sich vollständig trübten. Die Kollateralgefäße von der linken vorderen absteigenden Koronararterie, die die Circumflex-Koronararterie oder den „obtuse marginal branch" der Circumflex-Arterie ersetzen, wurden durch drei Beobachter im Blindmodus, unter Verwen-

dung der „grading method" nach Rentrop et al., beschrieben im J. Am. Coll. Cardiol. 5, 587–592 (1985), wie folgt quantifiziert: 0 = kein Füllen der Kollateralgefäße; 1 = Füllen der Kollateralverzweigungen der Circumflex-Arterie oder des „obtuse marginal branch", ohne, dass das epikardiale Segment sichtbar war; 2 und 3 = teilweises oder vollständiges Füllen des epikardialen Segments der Circumflex-Arterie oder des „obtuse marginal branch" durch die kollateralen Gefäße.

**[0086]** Nach der Angiographie wurde der linke Ventrikel jedes Herzens in drei Ringe entlang der kurzen Achse geschnitten. Vierzig histologische 5 µm-Schnitte wurden von jedem Herzen, in gleichen Abständen um die basalen und mittelventrikulären Ringe, erhalten, in Paraffin überführt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Der histologische Nachweis für einen Infarkt oder eine Entzündung wurde in jedem Gewebeschnitt von einem Pathologen im Blindmodus auf einer Skala von 0 bis 4, wie folgt bestimmt: 0 = nichts; 1 = ein bis drei kleine betroffene Gebiete; 2 = weniger als 10% der Schnittoberfläche betroffen; 3 = mehr als 10% und bis zu 50% der Schnittoberfläche betroffen; und 4 = mehr als 50% der Schnittoberfläche betroffen.

**[0087]** Jedes der untersuchten 19 Tiere (AdVEGF<sub>121</sub>, n = 9; AdNull, n = 10) überlebte bis sieben Wochen nach der Platzierung des Ameroid-Konstriktors, ohne dass sich klinische Zeichen einer Toxizität zeigten. Bei 3 Wochen (d. h. vor der Therapie), zeigten vier der 19 Schweine (AdVEGF<sub>121</sub>, n = 2; AdNull, n = 2) Zeichen für einen Myokardinfarkt in der Circumflex-Umgebung, gezeigt durch (1) einen nachgewiesenen Defekt (kein Unterschied zwischen Ruhe und Belastung) in der Circumflex-Umgebung der <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi-SPECT-Bilder und (2) eine dünnere, akinetische posteriolaterale Region des linken Ventrikels in den Kurzachsen-Bildern, erhalten mittels Echokardiographie im Ruhezustand. In Übereinstimmung mit der <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi-SPECT und der Echokardiographie, die einen Myokardinfarkt 3 Wochen nach Platzierung des Ameroid-Konstriktors nahe legten, zeigte die grobe pathologische Beurteilung 4 Wochen später eine myokardiale Vernarbung und Abnahme von mindestens 25% der gesamten ventrikulären Masse. Alle vier Schweine in dieser Untergruppe zeigten auch histologisch einen ausgedehnten transmuralen Infarkt. Auf der Grundlage dieser Daten wurden diese vier Tiere von der weiteren Analyse ausgenommen. Somit schloss die Gruppe der Tiere, die für die Wirksamkeit der Therapie untersucht wurden, sieben AdVEGF<sub>121</sub>-behandelte Tiere und acht AdNull-(Kontroll)-Tiere ein.

**[0088]** Die in vivo Expression des AdVEGF<sub>121</sub>-Vektors wurde dadurch bestätigt, dass eine lokale myokardiale VEGF-Expression nach der Injektion von 10<sup>8</sup> pfu AdVEGF<sub>121</sub> (n = 3) in das Myokard gezeigt wurde.



Drei Tage nach der Vektorverabreichung betrug die Konzentration im Myokard  $0.75 \pm 0.25$  ng/mg Protein. "Circumferential count profiles" (Polardiagramme) der  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi-SPECT-Daten aus der mittellventrikulären Ebene wurden verwendet, um (1) das Ausmaß und den Grad der Ischämie ("area") und (2) die stärkste Ischämie ("Ischämie-Maximum") zu ermitteln. "Circumferential plots" der Ruhe-Bilder, die bei 3 Wochen erhoben wurden, zeigten minimale Durchblutungsdefekte im Vergleich zu Belastungs-(pacing)-Bildern, die eine verminderte Durchblutung in der posteriolateralen Region zeigten, Daten, die zu der verstopften Circumflex-Koronararterie passte. Das Gebiet der Ischämie und das Ischämiemaximum waren in charakteristischer Weise gegenüber den Ausgangswerten in AdNull-Tieren, die 4 Wochen nach Vektorverabreichung untersucht wurden, unverändert. Im Gegensatz dazu zeigten die AdVEGF<sub>121</sub>-Tiere 4 Wochen nach Vektorverabreichung eine Verbesserung der myokardialen Durchblutung, was durch eine Abnahme in der Größe des Ischämiegebiets und des ischämischen Maximums, verglichen mit den Ausgangswerten, belegt wurde. Dazu passende Veränderungen wurden in der apikalen, mittellventrikulären und Basisebene festgestellt.

**[0089]** Zum Zeitpunkt der Vektorverabreichung waren die ischämischen Gebiete in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren und in den AdNull-Kontrolltieren ähnlich. Im Gegensatz dazu war das Ischämiegebiet in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren bei 7 Wochen, verglichen mit den AdNull-Tieren, signifikant vermindert. Die "prozentuale Verbesserung" des Ischämiegebietes war 4 Wochen nach Vektorverabreichung in jedem Tier, verglichen mit den Ausgangswerten, ungefähr 2,4-mal höher in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren als in den AdNull-Tieren ( $75\% \pm 6\%$  versus  $32\% \pm 11\%$ ).

**[0090]** Das Ischämiemaximum in der Circumflex-Region war auch bei 3 Wochen in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren und in den AdNull-Kontrolltieren gleich. Im Gegensatz dazu war das Ischämiemaximum in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren, 4 Wochen nach Vektorverabreichung, signifikant geringer als in den AdNull-Kontrolltieren. In ähnlicher Weise war die "prozentuale Verbesserung" 2,5-mal höher in AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren als in den AdNull-Kontrolltieren ( $56\% \pm 8\%$  versus  $22\% \pm 6\%$ ).

**[0091]** Drei Wochen nach der Platzierung des Ameroid-Konstriktors war die Myokardfunktion in der ischämischen Circumflex-Region, verglichen mit der in dem nicht-ischämischen Septum, ähnlich in der AdVEGF<sub>121</sub>-Gruppe und den AdNull-Kontrollen, wie durch die Bestimmung der anteiligen Waddickenzunahme während des atrialen pacings ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu zeigten die AdVEGF<sub>121</sub>-behandelten Tieren eine signifikant stärkere Verbesserung in der anteiligen Waddickenzunahme während des atrialen pacings, im Vergleich zu AdNull-Kontrolltie-

ren. Auffallend war, dass die kontraktile Funktion in dem Circumflex-Segment der AdVEGF<sub>121</sub>-Gruppe fast die des septalen (Kontroll)-Segments erreichte, was durch eine Differenz von „Null“ zwischen der ischämischen und nicht-ischämischen Zone in dieser Untersuchung angezeigt wurde.

**[0092]** Eine ex vivo Angiographie, die 4 Wochen nach der Vektorverabreichung durchgeführt wurde, bestätigte den kompletten Verschluss der proximalen Circumflex-Koronararterie durch den Ameroid-Konstriktor in allen Tieren. AdNull-behandelte Tiere zeigten charakteristischerweise nur ein teilweises Füllen der „obtuse marginal“- und Circumflex-Koronararterien. Im Gegensatz dazu zeigten die AdVEGF<sub>121</sub>-behandelten Tiere typischerweise nahezu eine vollständige Wiederherstellung sowohl von der Durchblutung in der „obtuse marginal“- als auch in der Circumflex-Arterie.

**[0093]** Der Qualität der Kollateralen war für die „obtuse marginal“- und Circumflex-Koronararterien in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren signifikant größer als in den AdNull-Tieren. Schließlich war die Gesamtzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralgefäße, die die Circumflex- und „obtuse marginal“-Arterien füllten, in den AdVEGF<sub>121</sub>-Tieren signifikant höher als in den AdNull-Tieren.

**[0094]** Das Myokard war in 13 von den 15 Tieren in der Untersuchung für eine Bestimmung der Entzündung zugänglich (AdVEGF<sub>121</sub>, n = 5; AdNull, n = 8). Eine minimale Entzündung wurde in dem Myokard dieser Tiere 4 Wochen nach der Therapie festgestellt, gleichzeitig war kein Unterschied in dem Ausmaß der Entzündung zwischen den AdVEGF<sub>121</sub>- und AdNull-Gruppen festzustellen (Intensitäts-Score insgesamt:  $0.3 \pm 0.06$  versus  $0.4 \pm 0.08$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass der adenovirale vermittelte Transfer von DNA für humanes VEGF, insbesondere VEGF<sub>121</sub>, direkt in das Myokard eines Säugers mit einer verschlossenen Circumflex-Koronararterie, wie hier an Yorkshire-Schweinen gezeigt, zu einer signifikant und physiologisch relevanten Verbesserung in der lokalen Durchblutung des Myokards sowie der kontraktilen Funktion führt, wenn eine myokardiale Ischämie durch Belastung induziert war. Wichtig ist, dass diese Verbesserung mit einer gesteigerten myokardialen Kollateralen-Blutgefäßbildung einherging, die auf biologische Weise, wie ein Bypass, die experimentell induzierten, verschlossenen Koronararterien-Segmente ersetzte.

#### Beispiel 5

**[0095]** Dieses Beispiel erläutert das Vermögen der vorliegenden Erfindung, AdVEGF<sub>121,10</sub> in das Herzgewebe eines Menschen zu verabreichen.

**[0096]** Der replikationsdefiziente Vektor

AdVEGF<sub>121.10</sub> ist ein E1a<sup>-</sup>, partieller E1b<sup>-</sup>, E3<sup>-</sup>-adenoviraler Vektor, der eine Expressionskassette in der E1-Position enthält, die den Cytomegalus (CMV) "immediate early gene promoter/enhancer", eine künstliche "splice-site" und das SV40-PolyA/Stop-Signal enthält. Der AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektor wurde entsprechend zu den Verfahren hergestellt, die für die Konstruktion und Herstellung der Ad<sub>GV</sub>CFTR.10- und Ad<sub>GV</sub>CD.10 Vektoren für zwei humane klinische Versuchsreihen (d. h. "U.S. FDA Clinical Trials" BB-IND 5702 and BB-IND 6442) verwendet wurden. Nach der Herstellung des AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektors, wurde der Vektor gereinigt und bei -70°C in einer Kohlenhydrat-Salzlösung mit einem Titer zwischen  $2 \times 10^9$ – $2 \times 10^{10}$  pfu/ml (d. h.  $2 \times 10^{11}$ – $2 \times 10^{12}$  pu/ml unter der Annahme von 100 Partikeleinheiten/pfu) aufbewahrt.

**[0097]** Eine chirurgische Bypass-Operation am offenen Herzen wurde mit einem Standard-kardiopulmonalen Bypass durchgeführt, wobei die Verabreichung des AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektors nach Beendigung der Bypass-Operation erfolgte. Der adenovirale AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektor wurde während der Herzoperation bei geöffnetem Brustkorb direkt mittels Insulinspritze und einer 28-gauge Nadel in das Myokard injiziert. Zwei Patienten, die Kandidaten für eine Standard-Herz-Bypass-Operation waren und eine diffuse Krankheit hatten oder eine, die in mindestens einer anderen Koronararterien-Umgebung nicht durch einen Bypass zu operieren war, wurde der AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektor verabreicht. Für jeden der zwei Patienten wurde die Gesamtdosis ( $1 \times 10^7$  pfu,  $1 \times 10^9$  pu) des Vektors auf 10 Aliquots verteilt (100 µl/Aliquot), wobei jedes Aliquot in Abständen von 1,5–2,0 cm in einer Tiefe von weniger oder gleich 5 mm injiziert wurde.

**[0098]** Die zwei Patienten durften nach Mitternacht vor der Operation keine Nahrungsmittel und Flüssigkeiten zu sich nehmen. Ein Standardverfahren wurde von dem Herz-Anästhesisten angewendet, um jeden Patienten individuell und während der Operation vorzubereiten. Die Patienten wurden in den Operationsraum transportiert, in dem Standard-Monitore angeschlossen wurde (drei „lead-modified“ EKGs, Puls-Oximeter). Wenn nötig, wurde die Medikamente vorher verabreicht. Unter lokaler Betäubung wurde eine kreisförmiger arterieller Schlauch für eine kontinuierliche Überprüfung des Blutdrucks und zum Blutsammeln eingeführt. Die Betäubung wurde mit Midazolam, Fentanyl und/oder Thiopental sowie mit Isofluran durchgeführt. Zusätzlich Betäubung wurde u. a. mit Midazolam, Fentanyl und/oder Thiopental, sowie Isofluran vorgenommen. Die Muskelentspannung wurde durch Pancuronium erreicht. Succinylcholin wurde, wenn nötig, verabreicht, um die endotracheale Intubation zu erleichtern, in diesem Fall wurde ein zusätzlicher venöser Zugang eingeführt. Ein zentraler Schlauch (entweder in die innere Vena jugularis oder Vena subclavia) wurde eingeführt.

Durch den Zentralschlauch wurde ein pulmonaler Kathether eingefügt, um die Herzfunktion zu beobachten (zentraler venöser Druck, pulmonal-arterieller Druck, pulmonaler arterieller Verschluss-Druck sowie mittels Computer bestimmtes "thermodilution-calculated" Herzminutenvolumen). Eine durch den Ösophagus reichende Echokardiographie-Sonde wurde eingeführt, um die intrakardialen Strukturen zu identifizieren und die Klappen und ventrikulären Funktionen zu ermitteln. Ein Harnblasen-Kathether wurde platziert, um die Urinabgabe zu bestimmen. Die Betäubung wurde in Dosen verabreicht, die eine Extubation innerhalb von vier bis sechs Stunden nach Beendigung der Operation erlaubten. Die Brust des Patienten wurde dann mittels einer Betadin/Alkohol-Lösung und Standardtechniken abgetupft und sterilisiert. Eine kleine Hautbiopsie (ungefähr 0,6 mm im Radius, der gleiche wie bei einer Stanz-Biopsie aus der Haut) wurde an der Stelle des Einschnitts der Haut entnommen. Die Biopsie wurde verwendet, um autologe Fibroblasten zum Ermitteln zytotoxischer T-Lymphozyten, die gegen den adenoviralen Vektor gerichtet sind, wachsen zu lassen.

**[0099]** Eine mediane Sternotomie wurde durchgeführt, und die Vena saphena oder andere relevante Gefäße wurden entnommen. Auf die mediane Sternotomie folgend, wurden Schläuche in die Aorta und das rechte Atrium eingebracht, nachdem Heparin (3 mg/kg) verabreicht wurde. Die linke innere Brustarterie wurde identifiziert und von der Wand der Brust abgetrennt. Dem Patienten wurde dann mit Standardtechniken ein kardiopulmonaler Bypass gelegt. Der Kreislauf des kardiopulmonalen Bypass schloss einen „Cobe Excel membrane oxygenator“ (Cobe Laboratories Inc., Lakewood, Colorado) und entweder eine „Cobe roller pump“ oder eine „Biomedicus centrifugal pump“ (Biomedicus, Eden Prairie, MN) ein. Im Kreislauf rezirkulierten ungefähr 2200 ml einer kristalloiden Lösung (200 ml of 25% Albumin, 0.5 mg/kg Mannitol, 1800 ml Ringer's Lactat). Die Koronararterien, die mit dem Bypass umgangen werden sollen, wurden identifiziert und markiert. Nach dem kreuzweisen Festklammern der Aorta wurde periodisch anterograd und/oder retrograd kalte kardioplegische Lösung mit moderater systemischer Kühlung (28–32°C) perfundiert. Eine myokardiale Temperatursonde wurde platziert, um die myokardiale Temperatur während des kardioplegischen Stillstands zu verfolgen, und die systemische Temperatur wurde unter Verwendung einer Blasen-Temperatursonde verfolgt. Distale Anastomosen zu den Koronararterien wurden unter Verwendung der entgegengesetzt laufenden Vena saphena-Segmente mit 7-0 Prolen-Nähten hergestellt. Für die innere Brustarterie wurden in ähnlicher Weise Anastomosen zu der linken vorderen absteigenden Arterie geschaffen. Die Aortenklammer wurde entfernt, und der Patient wurde systemisch auf 36°C, unter Verwendung eines Wärmetauschers des kardiopulmonalen Bypass-Kreislaufs, erwärmt.

Nachdem die Erwärmung gestartet wurde, wurde eine Klammer zur teilweisen Abdichtung der Aorta an diese angebracht. Die Orte der proximalen Anastomosen der Vena saphena-Transplantate wurden auf der Aorta markiert und 4,8 mm große Scheiben aus der Wurzel der Aorta herausgeschnitten. Der proximale Anteil jedes Vena saphena-Transplantats wurde an die Aorta mit 6-0 Prolen-Nähten angebunden, so dass eine Anastomose entstand.

**[0100]** Nach Abschluss der proximalen Anastomosen wurden 10 Injektionen (100 µl/Injektion) des AdVEGF<sub>121.10</sub>-Vektors in das Gebiet einer verschlossenen Koronararterie, die für den Bypass nicht zugänglich war, verabreicht. Einem Patienten wurde der Vektor in die Umgebung der rechten Koronararterie verabreicht, und dem zweiten Patient wurde der Vektor in den linken Ventrikel injiziert. Die Patienten wurden dann vom kardiopulmonalen Bypass getrennt. Protamin wurde verabreicht, um die Heparin-induzierte Gerinnungshemmung wieder aufzuheben. Die Schläuche in der Aorta und im Atrium wurden entfernt, und alle Orte, in denen Kanülen bzw. Schläuche eingebracht worden waren, wurden vernäht. Vorübergehend wurden Kabel zum pacing platziert. Sechsenddreissig französische Thorakostomie-Röhrchen wurden in den linken Pleuraraum und Mittelfellraum eingebracht, um eine post-operative Drainage mittels Standard-Protokollen zu ermöglichen. Das Sternum wurde wieder zusammengebracht und mit einem #20-Draht verschlossen. Die Fascia wurde mit 0-Vicryl-Nähten in zwei Schichten geschlossen. Die Haut wurde mit Hautklammern verschlossen. Ein ähnlicher Verschluss wurde für die Beine, den Ort der Entnahme der Vena saphena, angewandt.

**[0101]** Alle der hier zitierten Referenzen, einschließlich der Patente, Patentanmeldungen und Publikationen, sind hierdurch in ihrer jeweiligen Gesamtheit durch die Referenzen mit eingeschlossen.

**[0102]** Während die Erfindung mit Betonung auf die bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, wird es für die Fachleute auf ihrem Gebiet offensichtlich sein, dass Variationen der bevorzugten Ausführungsformen verwendet werden können, und es ist beabsichtigt, dass die Erfindung in anderer Weise als hier beschrieben ausgeführt werden kann. Dementsprechend schließt diese Erfindung alle Modifikationen ein, die innerhalb des Geistes und des Bereichs der Erfindung umfasst sind, wie durch die folgenden Ansprüche beschrieben.

### Patentansprüche

1. Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Steigerung des Grades der Blutperfusion in ein Zielgewebe

hinein, wobei das Medikament in einer Form vorliegt, die für eine Verabreichung mittels multipler Anwendungen in ungefähr 0,5–15 cm<sup>3</sup> des Gewebes geeignet ist, oder mindestens 2 der multiplen Anwendungen sind innerhalb von 10 Minuten zu verabreichen.

2. Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zielgewebes, das von einem ischämischen Schaden betroffen ist oder einem Risiko unterliegt, einen solchen zu leiden, wobei das Medikament in einer Form vorliegt, die für eine Verabreichung mittels multipler Anwendungen in ungefähr 0,5–15 cm<sup>3</sup> des Gewebes geeignet ist, oder mindestens 2 der multiplen Anwendungen sind innerhalb von 10 Minuten zu verabreichen.

3. Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion von Angiogenese in einem Zielgewebe, wobei das Medikament in einer Form vorliegt, die für eine Verabreichung mittels multipler Anwendungen in ungefähr 0,5–15 cm<sup>3</sup> des Gewebes geeignet ist, oder mindestens 2 der multiplen Anwendungen sind innerhalb von 10 Minuten zu verabreichen.

4. Verwendung eines adenoviralen Vektors, der eine DNA umfasst, die für ein angiogenes Peptid kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Bildung von kollateralen Blutgefäßen in einem Zielgewebe, das von einem Gefäßverschluss betroffen ist oder dem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden, wobei das Medikament in einer Form vorliegt, die für eine Verabreichung mittels multipler Anwendungen in ungefähr 0,5–15 cm<sup>3</sup> des Gewebes geeignet ist, oder mindestens 2 der multiplen Anwendungen sind innerhalb von 10 Minuten zu verabreichen.

5. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–4, wobei die multiplen Anwendungen in ungefähr 0,5–15 cm<sup>3</sup> des Gewebes verabreicht werden sollen.

6. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–5, wobei die multiplen Anwendungen auf verschiedene Punkte des Zielgewebes zu verabreichen sind.

7. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–6, wobei mindestens 2 der multiplen Anwendungen innerhalb von ungefähr 10 Minuten zu verabreichen sind.

8. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–7, wobei die multiplen Anwendungen innerhalb von ungefähr 10 Minuten zu verabreichen sind.

9. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–8, wobei das Zielgewebe ein einzelnes Organ ist.

10. Die Verwendung von Anspruch 9, wobei das einzelne Organ das Herz ist.

11. Die Verwendung von Anspruch 10, wobei das Herz ein menschliches Herz ist.

12. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–11, wobei die multiplen Verabreichungen im wesentlichen simultan erfolgen.

13. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–12, wobei das angiogene Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> besteht.

14. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–13, wobei der Vektor in mindestens einer essentiellen Genfunktion der E1-Region des adenoviralen Genoms defekt ist.

15. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–14, wobei der Vektor in Teilen der E3-Region defekt ist.

16. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–15, wobei der Vektor mindestens eine partielle Deletion der E1a-Region, mindestens eine partielle Deletion der E1 b-Region und mindestens eine partielle Deletion der E3-Region aufweist.

17. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–16, wobei der Vektor in mindestens einer essentiellen Genfunktion der E4-Region des adenoviralen Genoms defekt ist.

18. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–17, wobei der Vektor mindestens eine partielle Deletion der E1-Region, mindestens eine partielle Deletion der E3-Region, und mindestens eine partielle Deletion der E4-Region aufweist.

19. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–18, wobei die DNA von rechts nach links in dem adenoviralen Genom des adenoviralen Vektors orientiert ist.

20. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 19, wobei die DNA in der E1-Region des adenoviralen Genoms positioniert ist.

21. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–20, wobei das Gewebe von einem Gefäßverschluß betroffen ist, oder dem Risiko unterliegt, einen solchen zu erleiden.

22. Die Verwendung von irgendeinem der An-

sprüche 1–21, wobei die Dosis ex vivo in dem Zielgewebe zu verabreichen ist.

23. Die Verwendung von irgendeinem der Ansprüche 1–21, wobei die Dosis in vivo in dem Zielgewebe zu verabreichen ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen