



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 987 T2** 2006.11.09

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 109 559 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 987.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL99/00440**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 936 952.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/009070**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.08.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **24.02.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.06.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.11.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/505** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

|                 |                   |           |
|-----------------|-------------------|-----------|
| <b>12579098</b> | <b>13.08.1998</b> | <b>IL</b> |
| <b>137145 P</b> | <b>01.06.1999</b> | <b>US</b> |

(73) Patentinhaber:

**Hadasit Medical Research Services & Development Co. Ltd., Jerusalem, IL; Agricultural Research Organization, Beit Dagan, IL**

(74) Vertreter:

**Becker, Kurig, Straus, 80336 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PINES, Mark, 76308 Rehovot, IL; VLODAVSKY, Israel, 90805 Mevaseret Zion, IL; NAGLER, Arnon, 74381 Jerusalem, IL; HAZUM, Eli, Rehovot 76308, IL**

(54) Bezeichnung: **HEMMUNG VON MIT GEWEBETRAUMA VERBUNDENEN PATHOGENEN PROZESSEN**

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

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

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Inhibierung von pathogenen Vorgängen, die mit einem Gewebetrauma zusammenhängen, durch Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie auf dem molekularen Niveau. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Zusammensetzungen, die ein Quinazolinonderivativ enthalten und die für eine derartige Regulierung nützlich sind, insbesondere das Quinazolinon Halofuginon und andere Moleküle, die Effekte durch die gleichen Mechanismen auf dem molekularen Niveau ausüben können.

**[0002]** Es wird insbesondere nun offenbart, dass diese Moleküle wirkungsvolle Inhibitoren der nuklearen Faktor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) Transkription sind, wodurch die Schadenskaskade pathogener Vorgänge, die durch ein Trauma bzw. Trauma initiiert werden, verhindert werden, ohne dass die gewöhnlichen Reparaturmechanismen untergraben werden.

### Hintergrund der Erfindung

**[0003]** Zersetzung und Remodellierung des ECM stellen wesentliche Vorgänge für eine gewöhnliche Wiederherstellung nach einem Gewebetrauma dar. Diese Vorgänge sind allerdings ebenso in eine Anzahl von verschiedenen pathologischen Vorgängen involviert, die die Bildung von Verwachsungen, hepatischer Fibrose und Zirrhose, sowie die Bildung von Keloiden, hypertropischen Narben und pulmonäre Fibrose beinhalten. Alle diese pathophysiologischen Vorgänge stellen abnormale Antworten bzw. Reaktionen auf ein Gewebetrauma dar. Jeder dieser Vorgänge stellt jedoch einen verschiedenen Typus einer verschiedenen Fibrose dar, die sehr unterschiedliche Typen von Geweben mit möglicherweise verschiedenen zugrunde liegenden Mechanismen einbezieht.

**[0004]** Die physiologische Antwort auf ein Gewebetrauma ist ein komplexer Vorgang, der viele Faktoren einschließlich Zellwanderung und Replikation, Erneuerung bzw. Umsatz von extrazellulären Matrix (ECM) Komponenten und Änderungen der zellulären Mikroumgebung beinhaltet. Eine derartige Antwort beinhaltet hauptsächlich die Wiederherstellung oder Ersetzung von beschädigten Geweben. Die präzise Beschaffenheit einer solchen Wiederherstellung oder Ersetzung hängt von den mit einbezogenen Geweben ab, obgleich alle derartigen Vorgänge gewisse zugrunde liegende Prinzipien einbeziehen. Die gewöhnliche und notwendige Wiederherstellung von irgendeinem Gewebe nach irgendeinem Trauma erfordert die Koordination einer umfangreichen Reihe von Faktoren durch regulierte Genexpression.

**[0005]** Die pathophysiologische Antwort auf das Gewebetrauma kann sich in diesen Geweben ebenso unterscheiden, sie resultieren allerdings häufig in einer Bildung von Verwachsungen oder anderen Typen von abnormen Geweben, die die Funktionalität des Ursprungsorgangewebes nicht duplizieren, so dass die Wiederherstellung eines Gewebetrauma nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung der Organkapazität und Funktion führt.

**[0006]** Ein Beispiel eines fibrotischen Vorgangs, der von pathophysiologischen Antworten auf ein Gewebetrauma herrührt, ist die Herzfibrose.

**[0007]** Die Herzfibrose weist eine Anzahl von Ursachen auf, die zu der Ablagerung von fibrotischem Gewebe führt. Da sich die Ablagerungen von derartigem fibrotischem Gewebe erhöht, nimmt die Möglichkeit des Herzens zu funktionieren ab, was zur Invalidität und eventuell dem Tod des Patienten führt. Die Bildung von fibrotischem Gewebe im Herzen wird durch die Ablagerung von ungewöhnlich großen Mengen von extrazellulären Matrixkomponenten gekennzeichnet, einschließlich Kollagen, ebenso wie andere Matrixproteine. Daher muss der Vorgang bzw. das Voranschreiten der Herzfibrose inhibiert werden, um einen Schaden des Herzgewebes und folglich der Möglichkeit des Herzens zu funktionieren zu verhindern.

**[0008]** Unglücklicherweise sind momentan verfügbare Behandlungen zur Inhibierung verschiedener abnormaler Antworten auf ein Gewebetrauma, wie die Bildung und das Wachstum von Keloiden und hypertropischen Narben, Herzfibrose und andere Arten von fibrotischen Erkrankungsvorgängen, nicht vollständig erfolgreich. Beispielsweise kann eine Operation zur Verringerung der Größe oder des Ausmaßes der Verletzung verwendet werden, während physikalischer Druck zur Verringerung der Größe und des Ausmaßes von Keloiden und hypertropischen Narben verwendet werden kann und ebenso um deren anfängliche Bildung zu verhindern (D.D. Datubo-Brown, Brit. J. Plas. Surg., Vol. 43 (1990) p. 70-77). Keine Behandlung kann allerdings die Verletzung von der Wiederkehr abhalten und eine Operation beinhaltet insbesondere ein Risiko einer erhöhten

Morbidität.

**[0009]** Andere Formen der Behandlung beinhalten die Gabe von Corticosteroiden. Beispielsweise scheint Triamcinolon die Größe von Keloiden und hypertropischen Narben durch Erhöhung der Rate an Kollagenzersetzung (Rockwell, W.B. et al., Plastic and Recon. Surg., Vol. 84 (1989) p. 827-35) zu verringern. Die Nebeneffekte von solchen Medikamentierungen sind allerdings potenziell gefährlich und nicht allgemein erfolgreich. Andere Behandlungen, wie beispielsweise Bestrahlung, zeigten ebenso eine verschiedene Effektivität und hängen mit anderen möglichen Nebeneffekten zusammen (Rockwell, W.B. et al., Plastic and Recon. Surg., Vol. 84 (1989) p. 827-35). Daher sind eindeutig verbesserte Behandlungen für diese Krankheiten, die mit pathophysiologischen fibrotischen Vorgängen zusammenhängen, erforderlich.

**[0010]** Wie vorstehend angemerkt spielen Kollagensynthese und Ablagerung eine wichtige Rolle bei der Bildung von Keloiden und hypertropischen Narben und bei der Bildung von Verwachsungen ebenso wie bei der Zellhyperproliferation, die mit Psoriasis zusammenhängt, und bei den vielen verschiedenen Formen von pathologischen Fibrosen, wie der Herzfibrose, pulmonären Fibrose und Leberfibrose. Die Synthese von Kollagen ist ebenso in eine Anzahl von anderen pathologischen Zuständen einbezogen, insbesondere in jene, die mit einer primären oder sekundären Fibrose zusammenhängen. Die wesentliche Rolle von Kollagen bei der Fibrose hat Versuche zur Entwicklung von Medikamenten angeregt, die die Anhäufung von Kollagen inhibieren (K.I. Kivirikko, Annals of Medicine, Vol. 25 (1993) p. 113-26).

**[0011]** Von der Ablagerung von ECM Bestandteilen, wie beispielsweise Kollagen, wird allerdings momentan angenommen ebenso bei der Wundheilung, ebenso wie für ein allgemeines Aufrechterhalten der Struktur der Gewebe, von Wichtigkeit zu sein. Der Stand der Technik lehrt in der Tat dass die Stärke der Wundheilung letztendlich von der Kollagenablagerung abhängt (Haukipuro, K., et al., Ann. Surg., Vol. 213 (1991) p. 75-80). Daher muss gemäß dem Stand der Technik eine Kollagenablagerung in einem ausreichendem Niveau vorhanden sein, um der Wundheilung Stärke und Unterstützung zu leisten, allerdings nicht zu einem derartig hohen Niveau, um die Bildung von Narben zu verursachen.

**[0012]** Gemäß dem Stand der Technik würde weiterhin von einem einfachen Beseitigen der Kollagensynthese erwartet werden, äußerst zerstörerische Nebeneffekte aufzuweisen. Unglücklicherweise wurden gewisse Medikamente, die eine Kollagensynthese aufheben, wie allgemeine Inhibitoren der Kollagenbildung, auf ihren Effekt auf kollagenabhängige Vorgänge wie beispielsweise Tumorwachstum untersucht und wurden gefunden, ein Tumorwachstum in Mäusen zu inhibieren, wobei sie sich allerdings als zu toxisch für eine sichere Verabreichung über einen langen Zeitraum erwiesen. Daher wurden momentan verfügbare Inhibitoren der Kollagensynthese und Ablagerung, die auf ihre Effekte auf fibrotische und/oder kollagenbezogene Zustände getestet wurden, als ungeeignet für die Behandlung von bösartigen Tumoren und anderen von Kollagen abhängigen oder zusammenhängenden Krankheitszuständen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebenen fibrotischen Erkrankungen, gefunden.

**[0013]** Viele andere verfügbare Inhibitoren der Kollagensynthese und Ablagerung, obgleich nicht auf ihre Effekte auf verschiedene fibrotische Vorgänge untersucht, sind im allgemeinen darüber hinaus unerwünscht, da sie eine Spezifität für den Kollagenmetabolismus-Weg ermangeln. Daher weisen viele derzeit verfügbare Medikamente schädliche Nebeneffekte auf.

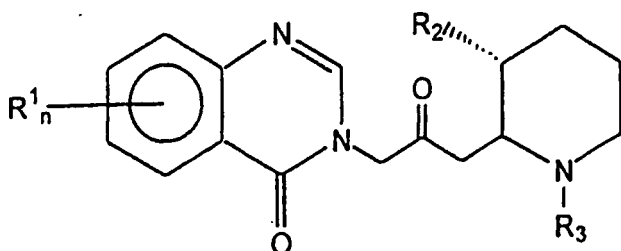
**[0014]** Beispielsweise wurden cytotoxische Medikamente in einem Versuch die Proliferation von Kollagen erzeugenden Fibroblasten zu verlangsamen verwendet (J.A. Casas et al., Ann. Rhem. Dis., Vol. 46 (1987) p. 763), wie beispielsweise Colchicin, das die Kollagensekretion in die extrazelluläre Matrix verlangsamt (D. Kershenovich, et. Al., N. Engl. J. Med., Vol. 318 (1988) p. 1709). Andere Medikamente wirken als Inhibitoren von Schlüsselenzymen des Kollagenmetabolismus (K. Karvonen et. al., J. Biol. Chem., Vol. 265 (1990) p. 8414; C.J. Cunliffe et al J. Med. Chem., Vol. 35 (1992) p. 2652). Allerdings wies keiner dieser Inhibitoren spezifische Effekte auf den Metabolismus und die Ablagerung von spezifischen Kollagentypen auf. Obgleich diese Medikamente mit der Biosynthese von anderen lebenswichtigen Kollagenmolekülen Wechselwirken können, wie beispielsweise Clq in dem klassischen komplementären Weg, Acetylcholinesterase des neuro-Muskulären Gelenkabschlusses (junction endplate), Conglutinin und pulmonäres Oberflächenprotein. Eine derartige Wechselwirkung und Mangel an Spezifität könnte mögliche schwerwiegende, gegenteilige Effekte aufweisen.

**[0015]** Andere Medikamente die eine Kollagensynthese inhibieren können, wie beispielsweise Nifedipin und Phenytoin, inhibieren die Synthese von anderen Proteinen ebenso, wodurch der Kollagen Biosyntheseweg nicht spezifisch blockiert wird (T. Salo et al., J. Oral. Pathol. Med., Vol 19 (1990) p. 404). Der Mangel an Spezifität verringert wiederum die klinische Verwendung bzw. Verwendbarkeit dieser Medikamente erheblich, da

die nicht-spezifische Inhibierung der Proteinsynthese zu gegenteiligen Nebeneffekten führen kann, falls das Medikament dem Patienten verabreicht wird.

**[0016]** In der Tat sind klinisch verfügbare, anti-fibrotische Medikamente, die die Kollagen vernetzenden Inhibitoren wie beispielsweise das vorstehend erörterte Beta-Aminopropionitril einschließen, ebenso nicht-spezifisch. Unglücklicherweise führt der Mangel an Spezifität dieser Kollagen vernetzenden Inhibitoren letztendlich zu schwerwiegenden Nebenwirkungen nach anhaltender Verwendung. Diese Nebeneffekte beinhalten das lathritische bzw. arthritische (lathritic) Syndrom, ebenso wie eine unterbrochene Elastogenese. Der letztere Nebeneffekt rührt von der Unterbrechung der Vernetzung von Elastin her, eines anderen fibrotischen Proteins des Bindegewebes. Darüber hinaus ist der Kollagen vernetzende inhibitorische Effekt dieser Medikamente sekundär, so dass Kollagen zuerst im Übermaß vor einer Zersetzung durch Kollagenase hergestellt werden muss. Daher wird ein typspezifischer Inhibitor der Kollagensynthese selbst eindeutig benötigt.

**[0017]** Ein derartiger typspezifischer Kollagensynthese Inhibitor wird in der US 5,449,678 für die Behandlung von gewissen fibrotischen Zuständen, wie beispielsweise des Scleroderma und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung bzw. Reaktion (Graft Versus Host Disease) offenbart. Beide diese Zustände hängen mit einer übermäßigen Kollagenablagerung zusammen, die mittels Halofuginon inhibiert werden kann. Dieser spezifische Inhibitor ist eine Zusammensetzung mit einer pharmazeutisch effektiven Menge einer pharmazeutisch wirksamen Verbindung einer Formel:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;

$R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy; und

$R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist. Von dieser Gruppe an Verbindungen wurde Halofuginon als insbesondere effektiv für eine derartige Behandlung gefunden.

**[0018]** Die PCT Patentanmeldung WO 96/06616 offenbart weiterhin, dass diese Verbindungen Restenose durch Verhindern bzw. Vorbeugen der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen wirksam behandeln können. Restenose ist durch eine glatte Muskelzellproliferation und eine extrazelluläre Matrix Anhäufung in dem Lumen von betroffenen Blutgefäßen als Reaktion auf eine vaskuläre Verletzung gekennzeichnet (Choi et al., Arch: Surg., Vol. 130 (1995) p. 257-61). Ein Kennzeichen einer derartigen glatten Muskelzellenproliferation ist eine phänotypische Änderung von dem gewöhnlichen kontraktile Phänotypen zu einem unechten. Von Typ I Kollagen wurde gezeigt eine derartige phänotypische Änderung zu unterstützen, die durch Halofuginon blockiert werden kann (Choi et al., Arch. Surg., Vol. 130 (1995) p. 257-61; PCT Patentanmeldung 96/06616). Daher kann Halofuginon eine derartige abnorme Redifferenzierung von glatten Muskelzellen nach einer vaskulären Verletzung mittels eines Blockierens der Synthese von Typ I Kollagen verhindern. Andere in vitro Studien zeigen, dass Halofuginon ebenso die Proliferation von 3T3 Fibroblastenzellen inhibieren kann (US Patent 5,449,678).

**[0019]** Der Vorgang der Restenose unterscheidet sich allerdings von der Herzfibrose. Weiterhin ist Herzgewebe allgemein von dem Gewebe von anderen Organen verschieden. Herzgewebe muss insbesondere die Fähigkeit als einzelner Muskel zu funktionieren beibehalten gemäß einer Welle bzw. Schwingung elektrischer Aktivität, um Blut effektiv zu pumpen. Daher muss das Herz ein hohes Niveau an Funktionalität im Gegensatz zu einem Organ wie beispielsweise der Leber aufrecht erhalten, das erheblich geschadet werden und dennoch das benötigte Niveau an Funktion bereitstellen kann, um den Körper zu unterstützen. Daher ist irgendeine Menge bzw. Umfang an Herzfibrose für die Funktion des Herzens schädlich, so dass Behandlungen die für andere Organe als geeignet erscheinen als nicht geeignet erwartet werden würden zur Behandlung und/oder Verhinderung von Herzfibrose geeignet zu sein.

**[0020]** Die in vitro Wirkung von Halofuginon sagt weiterhin nicht immer seine in vivo Effekte vor. Beispielswei-

se inhibiert Halofuginon die Synthese von Kollagen Typ I in Knochenchondrozyten in vitro, wie in US 5,449.678 gezeigt. Allerdings wurde von mit Halofuginon behandelten Hühnern nicht berichtet eine gesteigerte Rate von Knochenbrüchen aufzuweisen, was anzeigt, dass dieser Effekt in vivo nicht beobachtet wird. Daher kann das genaue Verhalten von Halofuginon in vivo nicht immer durch in vitro Studien vorhergesagt werden.

**[0021]** Die anfängliche Entdeckung der Befähigung von Halofuginon mehrere verschiedene Erkrankungszustände erfolgreich zu behandeln war in der Tat äußerst glücklich. Mittels Ausprobieren wurde von Halofuginon gezeigt für diese Krankheitszustände effektiv zu sein, da der genaue zugrunde liegende Mechanismus der Wirkung von Halofuginon nicht bekannt war. Ein derartiger Mangel an Wissen, verbunden mit der Unmöglichkeit das in vivo Verhalten von Halofuginon durch seine in vitro Effekte vollständig vorherzusagen, hat die Entwicklung von neuen Agenzien für diese pathophysiologischen Zustände begrenzt.

**[0022]** Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus der Wirkungen) von Halofuginon wird die Entwicklung von neuen und möglicherweise sogar effektiveren Behandlungen ermöglichen. Derartige Behandlungen könnten weiterhin gestaltet werden, um präzise die molekularen Ziele von Halofuginon und anderer Quinazolinonderivate genau aufzuzeigen, wodurch möglicherweise die unerwünschten Nebeneffekte der Behandlung verringert werden. Derartige Behandlungen könnten ebenso die gesamte extrazelluläre Matrixökonomie regulieren, und daher zu einer Verbesserung vieler verschiedener pathologischer Zustände führen, die mit Störungen dieser Ökonomie zusammenhängen.

**[0023]** Es besteht daher ein allgemein anerkannter, ungedeckter medizinischer Bedarf an spezifischen Effektoren, die die extrazelluläre Matrixökonomie regulieren können, deren Wirkungsmechanismus die gezielte Intervention auf dem Transkriptions- oder einem anderen molekularen Niveau beinhaltet, so dass der spezifische Effekt auf die pathologischen Antworten auf ein Gewebetrauma durch eine präzise Intervention an einem besonderen molekularen Ziel bestimmt wird, welches daher als ein Inhibitor von Tumorwachstum, Entwicklung und Metastase wirken könnte, welches insbesondere in vivo ohne im wesentlichen andere physiologische Vorgänge nachteilig zu beeinflussen effektiv ist und welches Angiogenese und die Ablagerung von Kollagen inhibieren könnte, welches selektiv Apoptose in Tumorzellen induzieren kann und welches in der Lage ist, eine Vielzahl von fibrotischen Krankheitsvorgängen zu inhibieren, einschließlich von Herzfibrose in einer spezifischen und zielgerichteten Art, so dass die Behandlung nicht zu unerwünschten Nebeneffekten führt.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0024]** Es wird jetzt offenbart, dass die Befähigung der Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung die pathogenen Gesichtspunkte von Gewebetrauma vorzubeugen, während gewöhnliche Gewebe Wiederherstellungsmechanismen erhalten werden, auf der Tatsache beruht, dass diese Moleküle die Schadenskaskade aufleben, die durch ein Gewebetrauma initiiert wird, während die eigentliche, gesunde extrazelluläre Matrixökonomie beibehalten wird.

**[0025]** Gemäß einer erfindungsgemäßen Ausführungsform wurde von Halofuginon gezeigt, für die Koordination oder Co-Regulierung von mehreren Genen effektiv zu sein von deren Aktivität es nicht bekannt ist co-reguliert zu sein. Eine derartige Co-Regulierung ist spezifisch, so dass gewisse Gene von denen bekannt ist mit den regulierten Genen in anderen Systemen verbunden zu sein, nicht durch Halofuginon co-reguliert sind. In der Tat zeigt eine derartige Co-Regulierung einen gemeinsamen zugrunde liegenden Mechanismus für all diese Effekte von Quinazolinonderivaten, wie beispielsweise Halofuginon, an.

**[0026]** Gemäß einer anderen Erfindungsgemäßen Ausführungsform, verursacht Halofuginon eine Palette von Effekten von denen es vorher nicht bekannt war zusammenzuhängen und die beinhalten:

- a) Abnahme der Expression von Kollagen Typ I, insbesondere durch Inhibierung bzw. Hemmung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens;
- b) Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  und Inhibierung der Transkription von NF- $\kappa$ B;
- c) Inhibieren der Kollagenase Typ IV Herstellung;
- d) Unterstützen bzw. Fördern der Aktivität von cKrox Transkriptionsfaktors;
- e) Abnahme der Expression des Kollagenchaperon Hitzeschock Proteins HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; und
- f) Mangel an Effekt auf die Expression von TGF $\beta$ .

**[0027]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird nun offenbart, dass der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus von Halofuginon und verwandten Quinolinonen bei der Inhibierung von pathogenen Reaktionen auf Gewebetrauma die Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie auf dem molekularen Niveau beinhaltet.

Eine derartige Regulierung beinhaltet mindestens die nachstehenden Faktoren: Inhibieren der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens, Inhibierung der Transkription von NF- $\kappa$ B und Inhibierung der Kollagenase Typ IV Herstellung. Ein anderer wichtiger Faktor bei der Effektivität der Regulierung durch Halofuginon ist die Unterstützung der Aktivität des cKrox Transkriptionsfaktors.

**[0028]** Von NF- $\kappa$ B wurde gezeigt im Mittelpunkt eines starken Interesses zu stehen, da es von ihm gezeigt wurde in Zellen durch eine Vielzahl von stimulierenden Faktoren aktiviert zu werden, die mit Stress oder Verletzung zusammenhängen. Von NF- $\kappa$ B wurde gezeigt durch eine große Anzahl von Faktoren induziert zu werden, beispielsweise IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (Mercurio and Manning; Curr. Op. In Cell Biol., 11 (1999) p. 226-32). Von vielen entzündlichen Faktoren wurde es ebenso gezeigt, NF- $\kappa$ B zu induzieren so dass von einer großen Vielzahl von Induktionsmechanismen angenommen wird sich diesem besonderen Ziel anzunähern. Daher kann der Effekt von Halofuginon auf die Inhibierung von NF- $\kappa$ B Expression mindestens eine Eigenschaft des Mechanismus zur Induktion des Effekts von Halofuginon auf die Inhibierung von fibrotischen Vorgängen bzw. Prozessen anzeigen, während die physiologisch gewöhnliche und gewünschte extrazelluläre Matrixökonomie reguliert und aufrechterhalten wird.

**[0029]** Der cKrox Transkriptionsfaktor für die Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens ist ein neuer Zinkfinger enthaltender Transkriptionsfaktor, der an die  $\alpha 1(I)$  und  $\alpha 2(I)$  Kollagen Genpromotoren bindet, und von dem gezeigt wurde, die Transkription des  $\alpha 1(I)$  Prokollagenpromoters zu hemmen (Widom R L; Culic I; Lee J Y; Korn J H; Gene; (1997 Oct. 1) 198:407-20.) Wie ausführlicher in den nachstehenden Beispielen beschrieben, wurde von Halofuginon wiederum gezeigt den Effekt von cKrox zu verstärken und daher die Inhibierung der Kollagensynthese zu verstärken.

**[0030]** Wie vorstehend beschrieben, können zusätzliche Faktoren bei der Möglichkeit bzw. Befähigung von Halofuginon die extrazelluläre Matrixökonomie zu regulieren eine Abnahme bei der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF  $\alpha$  beinhalten und eine Abnahme bei der Expression des Kollagenchaperons HSP47. Begleitend zu all diesen gegenwärtigen Effekten auf die extrazelluläre Matrixökonomie ist ein Mangel an irgendeinem Effekt auf die Expression von TGF $\beta$ . Daher ist die Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie durch Halofuginon eindeutig spezifisch für einen besonderen zugrunde liegenden Mechanismus, während eine gesunde extrazelluläre Matrixökonomie aufrechterhalten wird.

**[0031]** Einige dieser molekularen Ziele von Halofuginon und anderer Moleküle seiner Klasse, wie die Inhibierung der Tumormarker H19 Genexpression, ebenso wie die Gesamtregulierung von ECM (extrazelluläre Matrixökonomie) Ablagerung und Remodellierung, sind entweder wahrscheinlich sekundäre Ziele für den Wirkungsmechanismus von Halofuginon oder nur indirekt durch Halofuginon inhibiert. In der Tat können diese inhibierenden Effekte wiederum mit der Verstärkung des cKrox Transkriptionsfaktors zusammenhängen oder mit der Regulierung der anderen vorstehend beschriebenen Mechanismen.

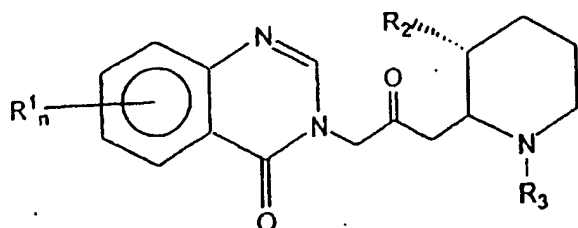
**[0032]** In jedem Fall hängen alle diese Mechanismen mit der Regulierung der "extrazellulären Matrixökonomie" zusammen. Regulierung ist nicht nur die Inhibierung von allen Vorgängen die mit dem extrazellulären Matrixökonomie Umsatz und der Kollagenablagerung zusammenhängen, da von Halofuginon bereits von den Erfinder gezeigt wurde eine übermäßige Kollagenablagerung zu inhibieren ohne mit Basalniveaus der für die Wundheilung notwendigen Kollagenexpressionen wechselzuwirken wie in der US 5,852,024 gezeigt wurde.

**[0033]** Der Ausdruck "extrazelluläre Matrixökonomie" ist beabsichtigt die Konstellation von Vorgängen anzuzeigen die mit der Synthese, Ablagerung und Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix und zusammenhängenden Gewebestrukturen zusammenhängt. Die eigentliche bzw. korrekte Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie führt zu der Inhibierung der pathologischen Antwort auf Gewebetrauma, so dass alle die möglichen Ziele für die Wirkung von Halofuginon und anderer Effektoren derartige pathologische Antworten im Wesentlichen ohne Inhibieren oder Ändern anderer erwünschter physiologischer Aktivität verhindern können.

**[0034]** Diese spezifischen Effekte von Halofuginon und anderer Verbindungen, durch die eine Regulierung der Extrazellulären Matrixökonomie erreicht werden kann, sind für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten nützlich, die mit einer ECM Ablagerung und anderen Gesichtspunkten der ECM Ökonomie zusammenhängen, wie nachstehend ausführlicher beschrieben. Beispielsweise und unerwarteterweise wurde gefunden, wie in den Beispielen nachstehend beschrieben, dass Halofuginon den pathophysiologischen Vorgang der Herzfibrose in vivo inhibieren kann.

**[0035]** Gemäß einer ersten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Herzfibrose bereitgestellt, umfassend den Schritt von Platzieren einer phar-

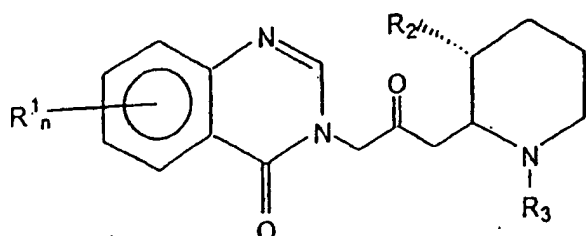
mazeutisch effektiven Menge einer Verbindung in einem pharmazeutischen verträglichen Träger bzw. Trägermittel, wobei die Verbindung ein Mitglied einer Gruppe mit einer Formel ist:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist. Pharmazeutisch verträgliche Salze sind ebenso umfasst.

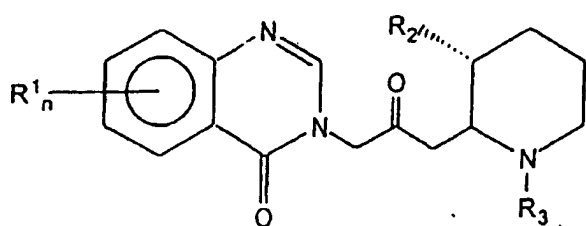
**[0036]** Eine andere erfindungsgemäße Ausführungsform besteht in der Verwendung einer Verbindung mit der Formel:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes einer derartigen Verbindung; für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Herzfibrose.

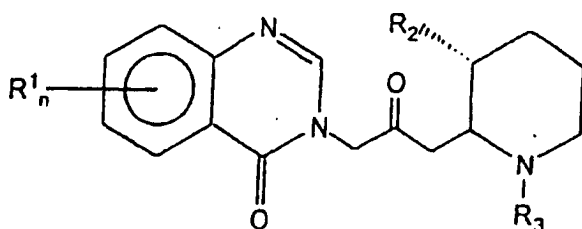
**[0037]** Gemäß einer dritten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung von Herzfibrose bereitgestellt, umfassend den Schritt von Platzieren einer pharmazeutisch effektiven Menge einer Verbindung in einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei die Verbindung ein Mitglied einer Gruppe mit einer Formel ist:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

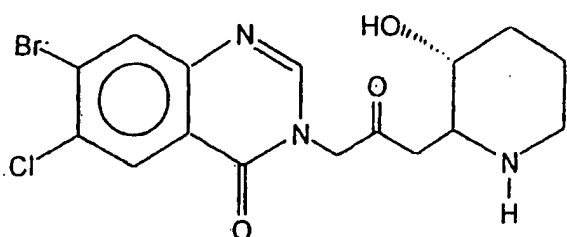
**[0038]** Gemäß einer vierten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Verwendung einer Verbindung bereitgestellt mit einer Formel:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes einer derartigen Verbindung; zur Herstellung eines Medikaments, um im Wesentlichen Herzfibrose zu verhindern.

**[0039]** Gemäß bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung Halofuginon. Nachstehend wird der Begriff "Halofuginon" als eine Verbindung festgelegt mit einer Formel:



und pharmazeutisch verträgliche Salze davon. Die Zusammensetzung umfasst vorzugsweise einen pharmazeutisch verträglichen Träger für die Verbindung.

**[0040]** Vorzugsweise können alle die vorstehend erwähnten Verbindungen entweder die Verbindung selbst, wie durch die Formel beschrieben, und/oder pharmazeutisch verträgliche Salze davon sein.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0041]** Die Erfindung wird hierin ausschließlich durch Beispiele hinsichtlich der beigefügten Zeichnungen beschrieben, worin:

**[0042]** die [Fig. 1](#) gewisse beispielsweise Gesichtspunkte der extrazellulären Matrixökonomie zeigt;

**[0043]** die [Fig. 2](#) die dosisabhängige Inhibierung der Typ IV Kollagenase Aktivität in T50 Blasenkarzinom Zellkulturen in der Gegenwart von Halofuginon zeigt;

**[0044]** die [Fig. 3](#) die Inhibierung der Expression des H19 Gens in den RT112 und 5376 Blasenkarzinom Zelllinien durch Halofuginon zeigt;

**[0045]** die [Fig. 4](#) einen Northernblot mit dem Effekt von Halofuginon auf die Integrin  $\alpha_v$  Kettenexpression zeigt;

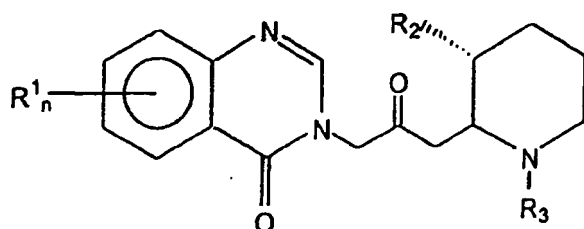
**[0046]** die [Fig. 5](#) den Effekt von Halofuginon auf die mittels RT-PCR bestimmte  $\beta$  Untereinheit Expression zeigt;

**[0047]** die [Fig. 6](#) den Effekt von Halofuginon auf eine ventrikuläre Kollagenvolumenfraktion (CVF) in einem Rattenherzen zeigt;

**[0048]** die [Fig. 7](#) den Effekt von Halofuginon auf Kollagen  $\alpha 1(I)$  Genexpression in einem Rattenherzen zeigt; und

**[0049]** die [Fig. 8](#) den Effekt von Halofuginon auf TGF- $\beta$  Expression in einem Rattenherzen zeigt.

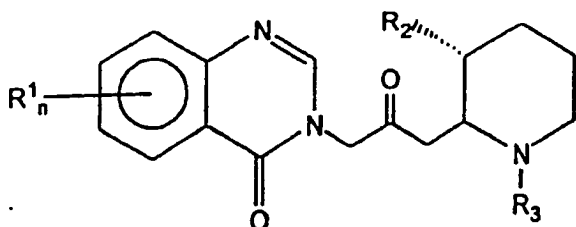




worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist. Pharmazeutisch verträgliche Salze davon zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Herzfibrose sind ebenso umfasst.

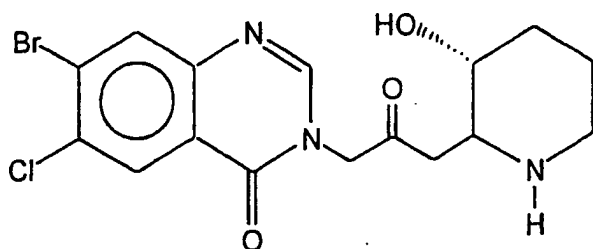
**[0050]** Gemäß anderer erfindungsgemäßer Ausführungsformen wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, um im Wesentlichen Herzfibrose zu verhindern, umfassend eine pharmazeutisch effektive Menge einer Verbindung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei die Verbindung ein Mitglied einer Gruppe mit einer Formel ist:



worin:

$R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niedrigem Alkyl, Phenyl und niedrigem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niedrigerem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niedrigem Alkenoxy-Carbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

**[0051]** Gemäß bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung vorzugsweise Halofuginon. Nachstehend wird der Begriff "Halofuginon" als eine Verbindung festgelegt mit einer Formel:



und pharmazeutisch verträgliche Salze davon. Die Zusammensetzung umfasst vorzugsweise einen pharmazeutisch verträglichen Träger für die Verbindung.

**[0052]** Vorzugsweise können alle die vorstehend erwähnten Verbindungen entweder die Verbindung selbst, wie durch die Formel beschrieben, und/oder pharmazeutisch verträgliche Salze davon sein.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0053]** Die Erfindung wird hierin ausschließlich durch Beispiele hinsichtlich der beigefügten Zeichnungen beschrieben, worin:

**[0054]** die [Fig. 1](#) gewisse beispielsweise Gesichtspunkte der extrazellulären Matrixökonomie zeigt;

**[0055]** die [Fig. 2](#) die dosisabhängige Inhibierung der Typ IV Kollagenase Aktivität in T50 Blasenkarzinom Zellkulturen in der Gegenwart von Halofuginon zeigt;

[0056] die Fig. 3 die Inhibierung der Expression des H19 Gens in den RT112 und 5376 Blasenkarzinom Zelllinien durch Halofuginon zeigt;

[0057] die Fig. 4 einen Northernblot mit dem Effekt von Halofuginon auf die Integrin  $\alpha_v$  Kettenexpression zeigt;

[0058] die Fig. 5 den Effekt von Halofuginon auf die mittels RT-PCR bestimmte  $\beta$  Untereinheit Expression zeigt;

[0059] die Fig. 6 den Effekt von Halofuginon auf eine ventrikuläre Kollagenvolumenfraktion (CVF) in einem Rattenherzen zeigt;

[0060] die Fig. 7 den Effekt von Halofuginon auf Kollagen  $\alpha 1(I)$  Genexpression in einem Rattenherzen zeigt; und

[0061] die Fig. 8 den Effekt von Halofuginon auf TGF- $\beta$  Expression in einem Rattenherzen zeigt.

#### Kurze Beschreibung der Erfindung

[0062] Es wurde unerwarteterweise, wie in den nachstehend beschriebenen Beispielen beschrieben, gefunden, dass der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus von Halofuginon bei der Inhibierung von all diesen pathogenen Reaktionen auf Gewebetrauma die Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie auf dem Molekularen Niveau beinhaltet.

[0063] Wie hierin offenbart, zeigen die vorliegenden experimentellen Ergebnisse ebenso das Halofuginon die Expression von NF- $\kappa$ B (Nuklearer Faktor  $\kappa$ B) eindeutig inhibiert, ebenso parallel mit der Inhibierung der Expression von Kollagen. NF- $\kappa$ B wurde zum Mittelpunkt eines großen Interesses; da es gezeigt wurde in Zellen durch eine große Vielzahl von stimulierenden Faktoren aktiviert zu werden, die mit Stress oder Verletzungen zusammenhängen. Von NF- $\kappa$ B wurde gezeigt, durch eine große Anzahl von Faktoren, wie beispielsweise IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) und Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (Mercurio und Manning, Curr. Op. In Cell Biol. 11 (1999) p. 226-32), induziert zu werden. Interessanterweise wurde von diesen spezifischen Faktoren in den vorliegenden experimentellen Ergebnissen gezeigt, ebenso durch Halofuginon inhibiert zu werden. Von vielen entzündlichen Faktoren wurde ebenso gezeigt NF- $\kappa$ B zu induzieren, so dass von einer großen Vielzahl von Induktionsmechanismen angenommen wird sich diesem besonderen Ziel anzunähern. Daher kann der Effekt von Halofuginon auf die Inhibierung der NF- $\kappa$ B Expression mindestens eine Eigenschaft des Mechanismus zur Induzierung des Effekts von Halofuginon auf die Inhibierung von fibrotischen Vorgängen anzeigen, während die physiologisch gewöhnliche und erwünschte extrazelluläre Matrixökonomie reguliert und beibehalten wird.

[0064] Von NF- $\kappa$ B wurde wiederum gezeigt, eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Expression des Typs VII Kollagens (Col7A1) zu spielen. NF- $\kappa$ B vermittelt den Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Expression von Col7A1 durch Binden an einen bestimmten Abschnitt des Promotors dieses Gens, der als "TNF-  $\alpha$  Antwortelement" bekannt ist. (Kon et al., Oncogene, 18 (1999) p. 1837-44). Interessanterweise weist Col7A1 zwei getrennte Elemente in dem Promotorbereich auf: Das vorstehend erwähnte "TNF- $\alpha$  Antwortelement" und ein getrenntes Antwortelement für TGF- $\beta$ . Daher können die offensichtlichen Effekte von Halofuginon hinsichtlich TNF- $\alpha$  und NF- $\kappa$ B aber nicht auf TGF- $\beta$  es letztendlich Halofuginon ermöglichen, die erwünschten inhibitorischen Effekte auf die pathologischen Vorgänge einer Fibrose aufzuweisen, im Wesentlichen ohne die physiologisch gewöhnliche und erwünschte extrazelluläre Matrixökonomie schädlich zu inhibieren oder herunter zu regulieren.

[0065] Ein anderes wichtiges molekulares Ziel des Halofuginon ist der cKrox Transkriptionsfaktor für die Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens. cKrox stellt einen neuen Zinkfinger enthaltenen Transkriptionsfaktor dar, der an die  $\alpha 1(I)$  und  $\alpha 2(I)$  Kollagen Genpromotoren bindet und von dem gezeigt wurde, die Transkription des  $\alpha 1(I)$  Prokollagenpromotors zu hemmen (Widom R L; Culic I; Lee J Y; Korn J H; Gene; (1997 Oct. 1) 198:407-20.) Wie in den vorstehenden Beispielen gezeigt, wurde von Halofuginon wiederum gezeigt den Effekt von cKrox und daher die Inhibierung der Kollagensynthese zu verstärken.

[0066] Von cKrox wurde ebenso gefunden zu einem viel höherem Niveau bzw. Grad in der Haut als im Knochen vorzuliegen, was erklären kann warum Halofuginon eine übermäßige Kollagenablagerung in der Haut verringern kann, während die Bruchigkeit der Knochen nicht erhöht wird (Galera P; Musso M; Ducey P; Karsenty G; PNAS, 91 (1994) p. 9372-6).

**[0067]** Andere wichtige Effekte, von denen gezeigt wurde durch die Verabreichung von Halofuginon aufzutreten, beinhalten bzw. umfassen eine Abnahme der Expression des spezifischen Kollagenchaperon Hitzeschock Proteins HSP47 Gens parallel mit der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens und Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , während die Expression von NF- $\kappa$ B inhibiert wird; allerdings ohne die Expression von TGF $\beta$  zu beeinflussen.

**[0068]** Von HSP47 wurde gezeigt, ein molekulares Chaperon zu sein, das spezifisch für Kollagen und insbesondere für Prokollagen ist (Nagata und Hosokawa; Cell Structure and Function; 21 (1996) p. 425-30). HSP ist ein Protein, welches in dem endoplasmatischen Retikulum (ER) vorliegt und welches an ein neu bzw. neu synthetisiertes Prokollagen bindet bis die Prokollagenkette in den Golgikörper eintritt. HSP47 kann bei der Bildung von korrekten Kollagenproteinstrukturen helfen, wie beispielsweise der dreifach Helix Struktur von Kollagen. Zur weiteren Unterstützung der funktionellen Bedeutung von HSP47 für Kollagen zeigten frühere Ergebnisse, dass die Expression von HSP47 in verschiedenen Zellen mit der Expression von Kollagen eng zusammenhängt (Nagata und Hosokawa; Cell Structure and Function; 21 (1996) p. 425-30). Insbesondere wurde ein erhöhte Expression von HSP47, ebenso parallel zu der gesteigerten Expression von Kollagen Typ I, während des Fortschreitens einer Leberfibrose gefunden, die durch die Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff an Ratten induziert wurde.

**[0069]** Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse zeigen interessanterweise, dass Halofuginon die Expression HSP47 parallel zu der Expression von Kollagen eindeutig inhibiert. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, das Halofuginon auf einen allgemeinen Wurzelmechanismus für eine Anzahl von verschiedenen Vorgängen wirkt, die mit der pathologischen Synthese und Ablagerung von Kollagen und anderen ECM Komponenten in dem fibrotischen Krankheitszustand zusammenhängen.

**[0070]** In jedem Fall hängen alle diese Mechanismen mit der Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie zusammen. Eine derartige Regulierung ist nicht nur die Inhibierung von allen Vorgängen, die mit der extrazellulären Matrix und Kollagenablagerung zusammenhängen, da von Halofuginon bereits von den Erfindern gezeigt wurde eine übermäßige Kollagenablagerung zu inhibieren, die mit Keloiden und einer anderen abnormen Narbenbildung zusammenhängen, wobei Halofuginon jedoch nicht die Stärke bzw. Beanspruchbarkeit der Wunde senkte wie in der US 5,852,024 gezeigt wurde.

**[0071]** Die korrekte Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie führt zu der Inhibierung der pathologischen Antwort auf Gewebetrauma, so dass alle der möglichen Ziele für den Wirkungsmechanismus von Halofuginon und anderer Effektoren derartig pathologische Antworten im wesentlichen ohne Inhibieren oder Ändern anderer erwünschter physiologischer Aktivität verhindern können. In der Tat wird der Begriff "Effektor" hierin verwendet, um im Wesentlichen irgendeine Verbindung oder Zusammensetzung davon zu betreffen, die in der Lage ist, die extrazelluläre Matrixökonomie zu regulieren, wodurch pathologische Vorgänge inhibiert werden, die mit Gewebetrauma und mechanistisch zusammenhängenden Vorgängen spezifisch zusammenhängen.

**[0072]** Der Ausdruck "mechanistisch zusammenhängende Vorgänge" umfasst jene pathologischen Zustände, die mindestens einen zugrunde legenden Mechanismus mit abnormen Antworten auf Gewebetrauma teilen. Beispielsweise stellt die Metastase von bösartigen Zellen ein Beispiel für einen mechanistisch zusammenhängenden Vorgang dar, da eine derartige Metastase von Neo-Angiogenese abhängt, die wiederum von der Ablagerung von extrazellulären Matrixbestandteilen einschließlich Kollagen abhängt, wie in der PCT Anmeldung WO 98/34613, eingereicht am 11. Februar 1998, gezeigt wurde.

**[0073]** Ähnlich dazu hängen abnorme Antworten auf Gewebetrauma, wie die Verwachsungsbildung, ebenso von der Kollagenablagerung ab. Daher kann von all diesen pathologischen Vorgängen gesagt werden mechanistisch zusammen zu hängen.

**[0074]** Andere Mechanismen der "extrazellulären Matrixökonomie" beinhalten die Inhibierung der Angiogenese, die Verhinderung der ECM Ablagerung, die Inhibierung der Kollagenase Typ IV Erzeugung, die Inhibierung der Integrin Expression, die Induktion von Apoptose und die Inhibierung der H19 Genexpression, ohne darauf begrenzt zu sein. Die Gesamtstruktur der extrazellulären Matrixökonomie und der Effekt von Halofuginon hinsichtlich dieser Ökonomie werden in [Fig. 1](#) gezeigt. Wie gezeigt beinhalten die spezifischen Effekte von Halofuginon auf die extrazelluläre Matrixökonomie die Inhibierung oder Verbesserung von Zuständen, die mit Tumoren, Fibrose, einschließlich Nierenfibrose, Scleroderma und GVHD, Restenose und Hautverletzung zusammenhängen. Durch Verbessern gewisser Effekte oder Faktoren, die mit der extrazellulären Matrixökonomie zusammenhängen, können Halofuginon und andere Effektoren die Kollagen Typ I Synthese inhibieren und dadurch pathologische Zustände verbessern, die mit Gewebetrauma zusammenhängen, während es gewöhnli-

chen, gewünschten physiologischen Vorgängen ermöglicht ist weiter anzudauern.

**[0075]** Hinsichtlich spezifischer Gesichtspunkte dieser Mechanismen wurden Angiogenese und ECM Ablagerungen bereits beschrieben. Die Kollagenase Typ IV ist ein zentrales Metallproteaseenzym das in Metastase und Zellinvasion mit einbezogen ist. Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, der wie bereits bemerkt in bösartigen Zellen blockiert ist, die daher als "unsterblich" beschrieben werden. Das H19 Gen ist ein Tumormarker Gen das mit den frühen Stadien von Blasenkarzinom zusammenhängt. Das H19 Gen ist genauer ein entwicklungsgemäß reguliertes Gen, dessen Expression während der fötalen Entwicklung Spitzen aufweist, wenn die Gewebedifferenzierung auftritt. Chromosomale Abnormalität in dem H19 enthaltenen Bereich hängen mit frühen Stadien von bösartigen Tumoren zusammen, wie beispielsweise des Wilms Tumors, adrenocorticalen Karzinom, Hepatoblastom, Rhabdomyosarcom, Lungentumoren, trophoblastischen Tumoren und Blasenkarzinom, (B. Tycko, Am. J. Path., Vol. 144 (1994) p. 431-439; de Groot, N. et al., Trophoblast. Res., Vol. 8 (1994) p. 2285-2302; Rachmilewitz, J. et al., Oncogene, Vol. 11 (1995) p.863-870).

**[0076]** Die Wichtigkeit der extrazellulären Matrixökonomie besteht darin, dass der Wirkungsmechanismus von Halofuginon viele gewünschte Aktivitäten fördern kann, wie beispielsweise die cytostatische Inhibierung von bösartigen Tumoren, die Verringerung oder Vermeidung von Fibrose und Verwachsungen und anderen pathologischen Antworten auf Gewebetrauma oder mechanistisch zusammenhängende Aktivitäten, im Wesentlichen ohne unerwünschte Nebeneffekte zu verursachen, wie beispielsweise die Stärke der Wundheilung zu verringern oder die Remodellierung der Struktur der Knochen zu ändern.

#### Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen

**[0077]** Es wurde unerwarteterweise gefunden, wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben, dass der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus von Halofuginon bei der Inhibierung von all diesen pathogenen Antworten auf Gewebetrauma die Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie auf dem molekularen Niveau beinhaltet. Eine derartige Regulierung umfasst die folgenden Effekte: Erhöhen der Aktivitäten des cKrox Transkriptionsfaktors, der wiederum eine Transkription des  $\alpha 1(I)$  Prokollagen Promoters unterdrückt; Verringerung der Expression des Kollagen molekularen Chaperons HSP47 parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; Abnahme der Freisetzung der Cytokine I1-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , während einer Inhibierung der Transkription von NF- $\kappa$ B; aber ohne Beeinflussung der Expression von TGF $\beta$ .

**[0078]** Halofuginon ist ebenso weiterhin in andere Gesichtspunkte der extrazellulären Matrixökonomie einbezogen, einschließlich der Inhibierung der Kollagenase Typ IV Herstellung und der Inhibierung der H19 Genexpression, ebenso wie der Gesamtregulierung von ECM (extrazelluläre Matrix) Ablagerung und Remodellierung, der Verbesserung und/oder Verhinderung einer chronisch entzündlichen Erkrankung und der Inhibierung von Neo-Angiogenese. Andere Mechanismen der "extrazellulären Matrixökonomie" beinhalten, sind aber nicht darauf begrenzt, die Inhibierung von Angiogenese, die Verhinderung der ECM Ablagerung, die Inhibierung der Kollagenase Typ IV Produktion, die Inhibierung der Integrin Expression, die Induktion von Apoptose und die Inhibierung der H19 Genexpression. Eine derart spezifische Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie wurde niemals zuvor, insbesondere in vivo, gezeigt.

**[0079]** Während die Erfindung nun im Zusammenhang mit gewissen bevorzugten Ausführungsformen in den nachstehenden Figuren und Beispielen gezeigt wird, so dass Gesichtspunkte davon besser verstanden und erkannt werden können, ist die Erfindung nicht beabsichtigt durch diese besonderen Ausführungsformen begrenzt zu werden. Im Gegenteil sind alle alternativen Modifikationen und Äquivalente umfasst im Bereich der Erfindung zu liegen, wie durch die anstehenden Ansprüche festgelegt. Daher dienen die folgenden Figuren und Beispiele, die bevorzugte Ausführungsform umfassen, zur Darstellung der Ausführung dieser Erfindung, wobei es klar sein sollte, dass die gezeigten Besonderheiten mittels Beispiel und zu Zwecken der darstellenden Diskussion bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ausschließlich gezeigt werden und gezeigt werden, um Bereitzustellen was am meisten nützlich von bereits bekannten Beschreibungen von Formulierungsvorgängen erachtet wird ebenso wie die Prinzipien und konzeptuellen Gesichtspunkte der Erfindung.

**[0080]** Die vorliegende Erfindung kann hinsichtlich der folgenden darstellenden Beispiele und Figuren besser verstanden werden. Es sollte angemerkt werden, dass obgleich ausschließlich auf Halofuginon Bezug genommen wurde, es angenommen wird, dass die anderen Quinazolinonderivate wie in der US 3,320,124 beschrieben und beansprucht, ähnliche Eigenschaften aufweist.

## Beispiel 1 Förderung der cKrox Aktivität und Inhibierung der Kollagen Typ I Genexpression durch Halofuginon

**[0081]** Wie bereits angemerkt ist eines der wichtigsten Ziele für die Wirkung von Halofuginon und anderer verwandter Quinazolinone und Effektoren die Förderung der cKrox Aktivität und die begleitende Inhibierung der Kollagen Typ I Genexpression. Diese beiden Aktivitäten wurden mit Halofuginon wie nachstehend beschrieben gezeigt.

**[0082]** Zuerst wurde die Möglichkeit des Halofuginon die Kollagen Typ I Genexpression zu inhibieren wie nachstehend beschrieben gezeigt. Myometriale und Leiomyosarcom Zellen wurden von dem gleichen Patienten entnommen und in 10 cm Platten in DMEM plattiert, das mit 10% FCS ergänzt ist. Wenn die Zellen 80% Konfluität bzw. Konfluenz erreichten, wurde das Medium durch serumfreies DMEM plus 0,1% BSA für 48 Stunden ersetzt, gewaschen und ansteigenden Konzentration von Halofuginon in dem gleichen Medium für ungefähr 48 Stunden bei ungefähr 37°C ausgesetzt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und einer RNA Extraktion und Northernblot Analyse auf Kollagen Typ I Genexpression unterzogen. Halofuginon inhibierte die Kollagen Typ I Genexpression (Produkte bei 5,4 und 4,8 kb) auf eine dosisabhängige Art.

**[0083]** Anschließend wurden menschliche Hautfibroblasten von einem Subjekt entnommen und in einer primären Kultur gehalten. Kontrollzellen wurden mit Vehikel behandelt, während Halofuginon behandelte Zellen mit Halofuginon wie vorstehend beschrieben behandelt wurden. Die Zellen wurden anschließend geerntet und einer RNA Extraktion und Northernblot Analyse auf Kollagen Typ I Genexpression und auf cKrox Genexpression unterzogen. Halofuginon förderte cKrox Genexpression während zugleich die Kollagen Typ I Genexpression inhibiert wurde. Daher besteht ein wichtiges molekulares Ziel für den Wirkungsmechanismus von Halofuginon eindeutig in der Erhöhung der cKrox Genexpression und somit der cKrox Aktivität, die wiederum zu der Inhibierung der Kollagen Typ I Genexpression führt.

**[0084]** Ein derartiges Abzielen auf die Wirkung von Halofuginon ist neu und wurde im Stand der Technik weder gelehrt noch vorgeschlagen. Die Aufklärung dieses Mechanismus ist allerdings eindeutig von Wichtigkeit für die Entwicklung und Gestaltung neuer Behandlungen für die pathologischen Vorgänge die mit Gewebetraumata zusammenhängen. Derartige Ergebnisse stellen weiterhin eine eindeutig mechanistische Erklärung für die Möglichkeit von Halofuginon bereit pathologische Kollagensynthese zu inhibieren, während gewöhnlich physiologische Vorgängen, die mit Kollagen zusammenhängen, ermöglicht wird ohne unerwünschte Nebeneffekte voranzuschreiten. Insbesondere Moleküle und chemische Zusammensetzungen die ebenso eine pathologische Kollagensynthese inhibieren können, während gewöhnlichen physiologischen Vorgängen, die mit Kollagen zusammenhängen, ermöglicht wird ohne unerwünschte Seiteneffekte fortzufahren, werden jetzt durch Abzielen auf die Verstärkung der cKrox Genexpression und/oder Aktivität für eine therapeutische Intervention ermöglicht.

## Beispiel 2 Inhibierung des Typ IV Kollagenase Produktion durch Halofuginon in vitro

**[0085]** Eine andere wichtige Eigenschaft der Regulierung der Extrazellulären Matrixökonomie ist die Inhibierung der Typ IV Kollagenase Produktion durch Halofuginon.

**[0086]** Tumorzellen sekretierten Enzyme, die das ECM verdauen und es den Zellen ermöglichen sich durch angrenzendes Gewebe zu graben und in andere Gewebe einzudringen. Zahlreiche Studien haben Matrixmetalloproteasen (MMP), insbesondere die Typ IV Kollagenase, mit dem Vorgang der Tumordinvasion und Metastase zusammengebracht. Die Typ IV Kollagenase erscheint als zwei 72 und 92 kDa Proteine, die durch eine einzelne mRNA kodiert werden.

**[0087]** Wie in der [Fig. 2](#) gezeigt wurde, wurde eine profunde Inhibierung der Aktivität von MMP2 (72 kDa Typ IV Kollagenase) in T50 Blasenkarzinom Zellkulturen in der Gegenwart von 25 ng/ml Halofuginon erreicht, während eine beinahe vollständige Inhibierung bei 100 ng/ml Halofuginon erzielt wurde. Subkonfluente Zellkulturen wurden 6 bis 24 h in serumfreiem DMEM inkubiert. Die kollagenolytische Aktivität wurde auf einem Gelatine imprägnierten (1 mg/ml, Difco, Detroit, MI) SDS-Page 8% Gel bestimmt. In Kürze wurden Kulturmediumproben auf den mit Substrat imprägnierten Gelen unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt, gefolgt durch eine 30 Min. Inkubation in 2,5% Triton X-100 (BDH, England). Die Gele wurden anschließend für 16 Stunden bei 37°C in 50 mM Tris, 0,2 M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% Brij 35 (Gewicht/Volumen) bei pH 7.5 inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Gele mit 0,5% Coomassie G250 (Bio-Rad, Richmond, CA) in Methanol/Essigsäure/H<sub>2</sub>O (30:10:60) gefärbt. Die Intensität der verschiedenen Banden wurde auf einem computerisierten Densitometer (Molecular Dynamics Typ 300A) bestimmt.



**[0088]** Unter Verwendung des Boyden Kammer Invasionsassay (Daten nicht gezeigt) wurde von Halofuginon ebenso gefunden eine Zellinvasion durch Matrigel ECM zu inhibieren. Eine derartige Inhibierung unterstützt den Einbezug der Typ IV Kollagenase Inhibierung als Teil des extrazellulären Matrixökonomie Mechanismus, in dem Halofuginon unerwünschte pathologische Vorgänge wie beispielsweise Tumorwachstum, voranschreitende Metastase, wie vorstehend beschrieben, inhibiert.

#### Beispiel 3 Inhibierung der Tumor-Marker Genexpression durch Halofuginon in vitro

**[0089]** Ein noch weiterer Gesichtspunkt der extrazellulären Matrixökonomie besteht in der Regulierung der Tumor-Marker Genexpression und insbesondere der Inhibierung der Expression des H19 Gens.

**[0090]** Das H19 Gen ist ein entwicklungsgemäß reguliertes Gen, dessen Expression während fötaler Entwicklung Spitzen aufweist, während sich Gewebedifferenzierung ereignet. Das H19 Gen ist durch die Eltern geprägt (parenterally imprinted) und nur durch das mütterliche Allel exprimiert. H19 ist ebenso ein Tumor-Marker Gen, das mit frühen Stadien bösartiger Tumoren, wie dem Wilms Tumor, adrenocorticalen Karzinom, Hepatoblastom, Rhabdomyosarcom, Lungentumoren, trophoblastischen Tumoren und Blasenkarzinom zusammenhängt. Das experimentelle Verfahren war wie nachstehend.

**[0091]** RT112 und 5376 menschliche Blasenkarzinom Zelllinien wurden in der Abwesenheit und Anwesenheit von Halofuginon (130 ng/ml, 24 h oder 72 h nach Impfen hinzugefügt), kultiviert und die Expression des H19 Gens wurde mittels Northernblot Analyse bestimmt (Nagler A. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Vol. 17 (1997) p. 194-202). Eine Aussetzung gegenüber Halofuginon führte zu einer wesentlichen Verringerung der Expression des H19 Gens in den getesteten RT112 und 5376 menschliche Blasenkarzinom Zelllinien, wie in **Fig. 3** gezeigt wird. Eine derartige Inhibierung unterstützt ebenso den Einbezug der Inhibierung der H19 Genexpression als Teil des extrazellulären Matrixökonomie Mechanismus, wie vorstehend beschrieben.

#### Beispiel 4 Inhibierung der Integrin Expression

**[0092]** Ein weitere wichtiger Gesichtspunkt des Effekts von Halofuginon und verwandten Quinazolinonen auf die extrazelluläre Matrixökonomie umfasst die Möglichkeit dieser Verbindungen Integrin Expression zu inhibieren, wie durch den Effekt der beispielhaften Verbindung Halofuginon beispielhaft gezeigt wird.

**[0093]** Von Integrinen wurde gezeigt in vivo bei Vasculogenese und Angiogenese zu funktionieren bzw. wirken. Eine Injektion eines neutralisierenden Antikörpers gegen die  $\beta_1$  Untereinheit blockierte die Bildung eines Aortalumens in Wachtelembrys (Drake, C.J. et al., in vivo. Dev. Dyn. Vol. 193 (1992) p. 83-91). Cheresch und Kollegen haben Beweise bereitgestellt das  $\alpha_v\beta_3$  für das Wachstum von Blutgefäßen benötigt wird (Brooks PC et al., Science, Vol. 264 (1994) p. 569-71). Ein Antikörper (LM609) gegen den  $\alpha_v\beta_3$  Integrin Komplex inhibierte gewöhnliches Gefäßwachstum und ebenso FGF-2 stimulierte oder Tumor induzierte Angiogenese in dem CAM Assay, wobei allerdings keine bereits vorhandenen Gefäße unterbrochen wurden. Der Mechanismus durch den der  $\alpha_v\beta_3$  mAb eine Angiogenese unterbricht erscheint Apoptose mit einzubeziehen. Eine einzelne intravasculäre Injektion eines zyklischen RGD Peptid Antagonisten von  $\alpha_v\beta_3$  Integrin oder des Lm609 monoklonalen Antikörpers führt zu der schnellen Rückbildung von menschlichen Tumoren, die in das CAM transplantiert wurden. Tumorzellen die das  $\alpha_v$  Gen und damit das  $\alpha_v\beta_3$  Integrin nicht exprimieren, verloren Ihre Befähigung zur Adhäsion bzw. Haftung und wiesen eine signifikant reduzierte Tumorgenizität bei Transplantation in athymische Nacktmäuse auf. Eine stabile Transfektion von  $\alpha_v$  cDNA in diese Zellen führte zu der vollständigen Wiederherstellung ihres tumorigenen Potentials (Felding-Habermann, B. et al., J. Clin Invest., Vol. 89 (1992) p. 2018-2022). Von Halofuginon wurde weiterhin gefunden Angiogenese und Tumorwachstum zu inhibieren.

**[0094]** Daher wurde der Effekt von Halofuginon auf die Expression von  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  Integrin Untereinheiten in der hoch aggressiven MDA435 menschlichen Brust Karzinomzelllinie untersucht. Zellen wurden in der Abwesenheit (**Fig. 4**, Spuren A&B) oder Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen (10-400 ng/ml) Halofuginon für 24 h (Spur C: 400 ng/ml), 48 h (Spuren D bis G: 10, 50, 200, und 400 ng/ml jeweils) oder 72 h (**Fig. 4**, Spur H: 400 ng/ml) kultiviert. Gesamt RNA wurde extrahiert, einer 1,1% Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese unterzogen, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten PCR Sonde entsprechend zu  $\alpha_v$  hybridisiert. Wie in **Fig. 4** gezeigt, führte eine Aussetzung der Brustkarzinom Zellen für 48 h von 10 und 50 ng/ml Halofuginon zu einer Hochregulierung der  $\alpha_v$  mRNA (**Fig. 4**, Spuren D&E). Dieser Effekt war bei höheren Konzentrationen (200-400 ng/ml) Halofuginon (**Fig. 4**, Spuren F-H) minimal. Anschließend wurde RT-PCR verwendet, um den Effekt von Halofuginon auf die Expression der  $\beta_3$  und  $\beta_5$  Integrinketten durch die MDA 435 Brustkarzinom Zellen zu analysieren. Wie in **Fig. 5** gezeigt, inhibierte Halofuginon die Expression der mRNA auf eine dosisabhängigen Art und führte zu einer beinahe vollständigen Inhibierung bei 200 ng/ml

([Fig. 5](#), Spur 1: Kontrolle; Spuren 2-5: 24 h Aussetzung zu 10, 50, 200 und 400 ng/ml Halofuginon jeweils). Im Gegensatz gab es keinen Effekt auf die Expression der  $\beta_5$  mRNA. Da der  $\alpha_v\beta_3$  Integrinkomplex eine wichtige Rolle bei der Tumorangiogenese spielt, kann der anti-Angionese Effekt von Halofuginon teilweise durch seine Inhibierung der  $\beta_3$  Genexpression vermittelt werden.

**[0095]** Daher ist die Inhibierung der Expression der Integringene eindeutig ein anderer Gesichtspunkt der Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie durch Halofuginon.

#### Beispiel 5 Inhibierung von Herzfibrose

**[0096]** Wie bereits angemerkt, wurde die Möglichkeit von gewissen Molekülen die extrazelluläre Matrixökonomie durch Inhibierung abnormer Antworten auf Gewebetrauma und andere mechanistisch verwandten pathologischen Vorgängen zu regulieren, während gewöhnliche physiologische Vorgänge aufrecht erhalten werden, durch den Effekt der beispielhaften Verbindung Halofuginon beispielhaft verdeutlicht. Allerdings lehrte oder schlug keines dieser Ergebnisse die Eignung von Quinazolinon enthaltenden Verbindungen, wie beispielsweise Halofuginon, für eine Behandlung von Herzfibrose vor. Ein derartiges Ergebnis ist unerwartet, da Herzgewebe aus hochdifferenzierten Zellen zusammengesetzt ist, die ein hohes Gesamtniveau an Organisation aufrecht erhalten müssen, um effektiv zu funktionieren.

**[0097]** Weiterhin muss myocardiales Gewebe als eine einzelne Einheit in Reaktion auf ein elektrisches Signal kontrahieren, was keine Eigenschaft darstellt, die mit anderen bereits studierten Geweben für die Behandlung von Fibrose und anderen Arten von Gewebetrauma mit Halofuginon zusammenhängt. Diese Eigenschaft ist für Herzgewebe spezifisch und erhöht den schädlichen Effekt einer Fibrose, da fibrotisches Gewebe nicht auf diese Art kontrahieren kann. Außerdem kontrahiert beschädigtes myocardiales Gewebe nicht auf die richtige Weise: eher als Initiieren der Kontraktion des Herzens bei einem einzelnen Brennpunkt, gefolgt durch die Erstreckung des Potentials durch das Herzgewebe, können sich Arrhythmien in beschädigten Geweben entwickeln in welchen sich viele derartiger Brennpunkte ereignen, die unangebrachte Kontraktionen die eventuell den Tod verursachen. Das Herzgewebe muss drittens als eine einzelne Einheit funktionieren. Andere Gewebe wie beispielsweise Lunge und Leber setzen sich aus verschiedenen Gewebearten und Strukturen zusammen, die mehr oder weniger unabhängig funktionieren können. Das gesamte Herz jedoch, muss als eine einzelne Einheit funktionieren. Daher kann der Erhalt/Wiederherstellung einer richtigen myocardialen Funktion durch Halofuginon, entweder zuvor oder nach dem Beginn des fibrotischen Vorgangs, vom Stand der Technik nicht vorhergesagt oder gelehrt werden.

**[0098]** Von Halofuginon wurde weiterhin nur gezeigt ein Kollagen Typ I Inhibitor zu sein. Die Bildung von fibrotischen Gewebe in dem Herzen ist allerdings durch die Ablagerung von abnorm großen Mengen von extrazellulären Matrixkomponenten gekennzeichnet. Daher kann die Möglichkeit von Halofuginon die Kollagen Typ I Synthese und Ablagerung zu inhibieren nicht die Möglichkeit von Halofuginon vorhersagen, die Pathogenese von Herzfibrose zu verlangsamen, zu verringern oder anderweitig zu verbessern.

**[0099]** Wie weiterhin nachstehend beschrieben, kann Halofuginon eine Herzfibrose durch Inhibierung der Ablagerung des Typ 1 Kollagen vorbeugen, ohne die Synthese von TGF  $\beta$  (Transformations-Wachstumsfaktor) herunter zu regulieren oder anderweitig zu ändern, welches ein Cytokin ist, das im allgemeinen die Synthese und Ablagerung von mehreren ECM Komponenten beeinflusst. Ohne durch einen einzelnen Mechanismus begrenzt zu sein, kann Halofuginon seinen Effekt durch einen Einfluss auf die Typ I Kollagentranskription ausüben. Daher sind die Effekte von Halofuginon spezifisch und begrenzt, aber dennoch in der Lage Herzfibrose zu verhindern.

**[0100]** Obgleich die Pathogenese von Herzfibrose nicht vollständig verstanden wurde, wurden Tiermodelle für die Erkrankung erfolgreich entwickelt. Herzfibrose wurde in Ratten durch die chronische Verabreichung von Angiotensin II (ANG II) induziert.

**[0101]** Verbindungen die für die Inhibierung von Herzfibrose gedacht sind, müssen in einem in vivo Modell, wie dem vorstehend beschriebenen Ang II Modell, auf ihre Befähigung zur Verlangsamung oder Anhalten des pathologischen Vorgangs getestet werden, der zur Ablagerung von fibrotischem Gewebe führt. Derartige Versuche wurden für den Kollagen Typ I Synthese Inhibitor Halofuginon, wie nachstehend ausführlicher beschrieben, durchgeführt.

**[0102]** Eine histologische Untersuchung von Herzproben der Kontroll- und mit Ang II (Angiotensin II) behandelten Ratten zeigte, dass Ang II spezifische morphologische Änderungen in Rattenherzen hervorrief, ein-

schließlich eines gestiegenen Kollagenfieber Gehaltes. Halofuginon inhibierte im Wesentlichen das Auftreten dieser morphologischen Veränderungen, was dem Rattenherzen eine gewöhnlichere Erscheinung verlieh.

**[0103]** Das experimentelle Verfahren war wie nachstehend. Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden in vier Gruppen geteilt. Zwei Gruppen wurden chronisch Ang II mit einer Rate von 0,150 ng/min durch eine implantierte Minipumpe verabreicht. Dieses Dosierungsregimen wird eine schwere Herzfibrose hervorrufen. Die zwei anderen Gruppen von Ratten, Kontrollratten, wurden mit einer Salzlösung induziert. Einer Gruppe von mit Ang II behandelten Ratten und einer Kontrollgruppe wurde täglich intraperitoneal 16 Mikrogramm Halofuginon injiziert. Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Ratten geopfert, das Herz wurde entfernt und gewogen.

**[0104]** Herzproben wurden für eine histologische Untersuchung verwendet. In Kürze wurden die Gewebeproben in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gesammelt und über Nacht in 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C fixiert. Serielle 5 µm Schnitte wurden nach der Dehydrierung in gestuften Ethanollösungen hergestellt, in Chloroform geklärt und in Paraplast eingewickelt. Unterschiedliche Färbung von Kollagen und nicht-Kollagen Proteinen wurde mit 0,1% Siriusrot und 0,1% Fast Green als eine Gegenfärbung in Pikrinsäure durchgeführt. Dieses Verfahren färbt Kollagen rot (Gascon-Barre, M., et al., J. Histochem. Cytochem., 37 (1989) p. 377-81).

**[0105]** Herzproben wurden anschließend mit einer Sonde für Rattenkollagen  $\alpha 1(I)$  Expression oder mit einer Sonde für TGF  $\beta 1$  Expression hybridisiert. Für eine Hybridisierung mit einer dieser genetischen Sonden wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, durch eine gestufte Reihe von Ethanollösungen rehydriert, in destilliertem Wasser 5 Minuten gespült und anschließend in  $2 \times$  SSC bei 70°C für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser gespült, und mit Pronase, 0,125 mg/ml in 50mM Tris-HCL, 5mM EDTA, pH 7,5, für 10 Minuten behandelt. Nach Verdau wurden die Folien mit destilliertem Wasser gespült, in 10% Formalin in PBS postfixiert und in 0,2% Glycin blockiert. Nach Blockieren wurden die Folien in destilliertem Wasser gespült, schnell mittels gestufter Ethanollösungen dehydriert und für mehrere Stunden luftgetrocknet. Vor einer Hybridisierung wurde das 1600 by Rattenkollagen  $\alpha 1(I)$  Insert in aus dem ursprünglichen Plasmid pUC18 ausgeschnitten und in das pSafyre Plasmid eingefügt. Die Schnitte wurden anschließend mit dieser Sonde nach Digoxigenin Markierung hybridisiert (M. Pines et al. Matrix Biology, 14 (1996) p. 765-71). Andere Folien wurden ähnlich mit einer Sonde TGF- $\beta 1$  hybridisiert.

**[0106]** Die [Fig. 6](#) zeigt das Ergebnis der Kollagen Volumenquantifizierung des Rattenherzens nach Videodensitometrie. Schnitte von Rattenlebergewebe wurden mit Siriusrot gefärbt, um den Kollagengehalt des Gewebes zu zeigen. Ein geringes Volumen an Kollagen wurde in Kontrollratten (CON) und Ratten beobachtet, die Halofuginon allein (HAL) erhielten. Ein hohes Volumen an Kollagen wurde in Ratten beobachtet, die Ang II (A II) allein erhielten, war aber allerdings erheblich in Ratten verringert denen sowohl Ang II als auch Halofuginon (A II + HAL), verabreicht wurde, was die Möglichkeit von Halofuginon anzeigt den pathophysiologischen Vorgang der durch Ang II induzierten Fibrose wesentlich zu inhibieren. In der Tat war die ventrikuläre Kollagen-volumen Fraktion (CVF) um das dreifache ( $p < 0,05$ ) in mit Ang II behandelten Ratten im Vergleich zu Ratten erhöht, die mit entweder Halofuginon allein oder Halofuginon mit Ang II behandelt wurden. Darüber hinaus war das ventrikuläre CVF für Kontrollratten identisch zu dem von Ratten, die mit Halofuginon allein behandelt wurden. In der Tat änderte Halofuginon über einen zwei Wochen Zeitraum nicht das ventrikuläre CVF, wenn alleine, ohne Ang II, verabreicht wird. Daher wies Halofuginon eine starke Befähigung zum Verhindern des Anstiegs einer ventrikulären CVF auf, die durch Ang II induziert wird, ohne einen Effekt alleine auf ventrikuläres CVF aufzuweisen.

**[0107]** Die [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse der Densitometriemessungen nach in situ Hybridisierung eines Schnitts von Rattenherzgewebes mit Rattenkollagenese  $\alpha 1(I)$  Sonde. Eine geringe Expression des  $\alpha 1(I)$  Gens wird beim Herzgewebe von Ratten beobachtet, denen Halofuginon allein (HALO) verabreicht wird. Ein merklicher Anstieg bei der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens wurde in der Leber von Ratten beobachtet denen Ang II allein (Ang II) verabreicht wurde. Ratten denen sowohl Halofuginon als auch Ang II verabreicht wurde, zeigen eine deutliche Verringerung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens (Ang II + HALO) im Vergleich zu Ratten denen Ang II allein verabreicht wurde. Obgleich diese Dosis an Halofuginon im Wesentlichen die Zunahme bei der Ratten Kollagen  $\alpha 1(I)$  Genexpression verringerte, die durch Ang II verursacht wird, inhibierte sie nicht vollständig eine derartige Expression. Die im Wesentlichen reduzierte Ratten Kollagen  $\alpha 1(I)$  Genexpression zeigt allerdings, dass Halofuginon gegen die pathologische Induktion einer Expression durch Ang II effektiv ist. Daher wurde die fünffache Zunahme bei dem Typ I Kollagen mRNA Niveau ( $p < 0,05$ ), die durch Ang II induziert wurde, durch Halofuginon abgemildert.

**[0108]** Die [Fig. 8](#) zeigt, das obgleich Ang II eine Zunahme bei der Expression von mRNA für TGF  $\beta$  ( $p < 0,05$ ) verursachte, diese Erhöhung nicht durch die Verabreichung von Halofuginon beeinflusst wurde. Insbesondere



war das Niveau der TGF  $\beta$  Expression signifikant und gleichsam höher in Ratten, denen entweder Ang II (Ang II) oder Ang II plus Halofuginon (Ang II + HALO) verabreicht wurde, als in Ratten denen Halofuginon allein (HALO) verabreicht wurde. Daher scheint es nicht, das Halofuginon den Vorgang einer extrazellulären Matrixsynthese und Ablagerung inhibiert, die durch TGF  $\beta$  kontrolliert wird.

**[0109]** Daher kann Halofuginon Herzfibrose durch Inhibieren der Ablagerung von Typ I Kollagen verhindern ohne die Synthese von TGF  $\beta$  zu verändern, welches ein Cytokin ist, dass die Synthese und Ablagerungen von mehreren ECM Komponenten beeinflusst. Die Effekte von Halofuginon scheinen spezifisch für einen bestimmten Gesichtspunkt des Wegs für eine Extrazelluläre Matrixsynthese zu sein, der im Stande der Technik weder gelehrt noch vorgeschlagen wurde. Daher scheint die Spezifität von Halofuginon auf einen bestimmten Mechanismus der Kollagensynthese und Ablagerung gerichtet zu sein, ein Mechanismus der nicht durch TGF  $\beta$  kontrolliert zu sein scheint.

**[0110]** Insgesamt konnte Halofuginon das Auftreten der Effekte einer Ang II induzierten Fibrose auf allen Niveaus einschließlich einer erheblichen Verringerung erheblicher und geringer morphologischen Änderungen verhindern, die durch Ang II induzierte Fibrose hervorgerufen wurden. Die Effekte von Halofuginon sind eindeutig sowohl wirksam als auch spezifisch für die Vorbeugung der morphologischen Veränderungen während des pathologischen Vorgangs einer Herzfibrose.

#### Beispiel 6 Co-Regulierung von mehreren Genen mit Halofuginon

**[0111]** Wie nachstehend detaillierter beschrieben, wurde von Halofuginon unerwarteterweise gezeigt bei der Co-Regulierung von mehreren Genen effektiv zu sein, von deren Aktivität nicht bekannt ist co-reguliert zu sein. Eine derartige Co-Regulierung ist spezifisch, so dass gewisse Gene, von denen bekannt ist mit den regulierten Genen in anderen Systemen möglicherweise verbunden zu sein, nicht durch Halofuginon co-reguliert werden. Weiterhin zeigt eine derartig spezifische Co-Regulierung eindeutig einen gemeinsamen zugrunde liegenden Mechanismus für all diese Effekte von Quinazolinonderivaten, wie beispielsweise Halofuginon.

**[0112]** Insbesondere zeigen Versuchsergebnisse, dass Halofuginon eine Anzahl von Effekten verursacht von denen es nicht zuvor bekannt war notwendigerweise zusammen zu hängen und die die Abnahme der Expression von Kollagen Typ I, insbesondere durch Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens, beinhalten; Inhibierung der Kollagenase Typ IV Herstellung; Inhibierung der H19 Genexpression; Abnahme der Expression des HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF  $\alpha$ , während einer Inhibierung der Expression von NF- $\kappa$ B; allerdings ohne die Expression von TGF  $\beta$  zu beeinflussen.

**[0113]** Wie bereits detaillierter beschrieben, scheint Halofuginon eine Anzahl von zusammenhängenden inhibitorischen Effekten hinsichtlich der Expression dieser Gene auszuüben. Beispielsweise wurde für Halofuginon gezeigt, die Expression von HSP47, eines für Kollagene spezifischen molekularen Chaperons, herunter zu regulieren parallel zu der Expression von Typ I Kollagen. Andererseits wurde eine erhöhte Expression von HSP47 während des Voranschreitens einer Leberfibrose, die durch die Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff an Ratten induziert wurde, ebenso parallel zu der erhöhten Expression von Kollagen Typ I gefunden, so dass die parallele Inhibierung von sowohl HSP47 als auch Kollagen Typ I durch Halofuginon einen Gesichtspunkt des Mechanismus anzeigen kann gemäß welchem Halofuginon eine bestimmte Anzahl von verschiedenen Vorgängen beeinflusst, welche die pathologische Synthese und Ablagerung von Kollagen und anderer ECM Komponenten in dem fibrotischen Krankheitszustand betreffen.

**[0114]** Weiterhin wurde von Halofuginon eindeutig gezeigt die Expression von NF- $\kappa$ B (Nuklearer Faktor  $\kappa$ B) zu inhibieren, ebenso parallel zu der Inhibierung der Expression von HSP47 und der Expression von Kollagen. Von NF- $\kappa$ B wurde gezeigt durch eine große Anzahl von Faktoren induziert zu werden, wie beispielsweise IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) und Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Mercurio und Manning; Curr. Op. In Cell Biol. 11 (1999) p. 226-32), die sich unter den spezifischen Faktoren befanden, die ebenso durch Halofuginon in den vorliegenden Versuchen inhibiert wurden.

**[0115]** Daher können die offenkundigen Effekte von Halofuginon hinsichtlich TNF $\alpha$  und NF- $\kappa$ B aber nicht TGF- $\beta$  letztendlich Halofuginon ermöglichen die gewünschten inhibitorischen Effekte auf die pathologischen Vorgänge der Fibrose aufzuweisen, im Wesentlichen ohne die physiologischen, gewöhnlichen und erwünschten extrazellulären Matrixökonomie schädlich zu inhibieren oder herunter zu regulieren.

## Inhibierung von Biochemischen Vorgängen

**[0116]** Die Möglichkeit von Halofuginon verschiedene biochemische Vorgänge gemäß einem Satz von Assays zur Bestimmung der prozentualen Inhibierung eines spezifischen Bindens oder Aktivität von bestimmten zellulären Proteinen wird ausführlicher nachstehend in Tabelle 1 beschrieben. Die Assays wurden von MDS Panlabs Inc. (Bothell, Wisconsin, USA) durchgeführt. Diese Assays beinhalteten: die Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  und die Inhibierung der Transkription von NF- $\kappa$ B. Die Ergebnisse waren wie nachstehend:

Tabelle 1:

| <u>Primärer Assay</u>            | <u>IC<sub>50</sub></u> |
|----------------------------------|------------------------|
| Cytokin IL-1 $\beta$ Freisetzung | 31.7 nM                |
| Cytokin TNF $\alpha$ Freisetzung | 6.8 nM                 |
| NF- $\kappa$ B Transkription     | 25.0 nM                |

**[0117]** Daher zeigen diese Ergebnisse eindeutig die Konstellation von inhibitorischen Effekten durch Halofuginon, wie vorstehend beschrieben. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse einen starken und signifikanten Effekt durch Halofuginon für diese spezifischen Funktionen, während andere untersuchte Funktionen im Wesentlichen von Halofuginon unbeeinträchtigt blieben (Daten nicht gezeigt).

## Beobachtung von Veränderungen bei der Genexpression mit Halofuginon

**[0118]** Wie detaillierter nachstehend beschrieben, wurde der Effekt von Halofuginon auf Expression von mehreren Genen durch Verwendung von Atlas cDNA Expressionarrays (Clontech Ltd.) untersucht, die es ermöglichen eine große Anzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Die Ergebnisse werden nachstehend in Tabelle 2 (herunter Regulierung von Genen nach Behandlung mit Halofuginon) für Atlas funktionelle Arrays gezeigt und in den Tabellen 3 (herauf Regulierung von Genen nach Behandlung mit Halofuginon) und 4 (herunter Regulierung von Genen nach Behandlung mit Halofuginon) für Atlas menschliche Wechselwirkungsarrays. Das Versuchsverfahren war wie nachstehend.

**[0119]** Der Atlas Human cDNA Expressions Array, cat. No. 7740-1, wurde verwendet. Der Atlas cDNA Expressionsarray umfasst 588 humane bzw. menschliche cDNAs, die in Duplikaten auf einer positiv geladenen Nylonmembran gespottet sind, 9 Organisationskontroll DNAs für eine Normalisierung eines mRNA Überschusses, zusammen mit Plasmid und Bakteriophagen DNAs, die als Negativkontrollen beinhaltet sind, um die Hybridisierungsspezifität zu bestätigen. Die cDNAs werden in mehrere verschiedene funktionelle Klassen, einschließlich Transkriptionsfaktoren, Cytokine, Onkogene und Tumorsuppressorgene, dargestellt und angeordnet. Die auf jeden Atlas Array immobilisierten cDNAs wurden besonders vorbereitet um die Schwierigkeit einer nicht spezifischen Hybridisierung zu minimieren. Jedes cDNA Fragment weist 200-600 by auf und wurde von einem Bereich des Transkripts amplifiziert, das den poly-A Schwanz, repetitive Elemente oder andere hoch homologe Sequenzen nicht aufweist. Ein transparentes Orientierungsraster wurde ebenso verwendet, um eine Identifizierung von cDNAs zu ermöglichen, die positiven Hybridisierungssignalen entsprechen.

**[0120]** Zuerst wurde 1  $\mu$ g jeder RNA Population durch Verwendung der bereitgestellten Reagenzien ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dATP revers-transkribiert. Die radioaktiv markierten komplexen cDNA Sonden wurden über Nacht auf dem Atlas Array unter Verwendung von ExpressHyb Hybridisierungslösung getrennt hybridisiert, die ebenso bereitgestellt wurde. Nach einem Waschschrift hoher Stringenz wurde das Hybridisierungsmuster, wie nachstehend ausführlicher beschrieben, mittels Autoradiografie hybridisiert und/oder Phosphorimaging quantifiziert. Die relativen Expressionsniveaus einer gegebenen cDNA in zwei verschiedenen RNA Quellen wurde durch Vergleich des Signals, das mit einer Sonde von einer RNA Quelle erhalten wurde, zu demjenigen bestimmt, das mit einer Sonde von einer anderen Quelle erhalten wurde.

**[0121]** Gesamt RNA wurde aus primären menschlichen Fibroblasten hergestellt. Zellen wurden in 15 mm Kulturschalen in der Anwesenheit von 10% FCS in DMEM (Dulbecco's modified Eaglemedium) Kulturmedien wachsen gelassen. Bei ungefähr 70-90% Konfluität wurden die Zellen mit 10<sup>-8</sup> M Halofuginon für 1 h behandelt. Sowohl behandelte als auch unbehandelte Zellen wurden einer gesamt RNA Präparation unter Verwendung des SV Gesamt RNA Isolationssystems (Promega, cat. No. Z3100) oder Tri Reagenz (Molecular Research Center Inc., cat No. TR-118) unterzogen.

**[0122]** Gemäß des Protokolls von Promega wurden 2 ml Lysepuffer zu der 15 mm Platte gegeben, die lysierten Zellen wurden unter Verwendung einer 200-1000 Mikroliter Spitze gesammelt und auf die nächste Platte übertragen bis die Zellen in den gesamten 5 Platten lysiert und gesammelt waren. Das Lysat wurde in Mikrozentrifugen Röhrchen, 175 µl Lysat pro Röhrchen, insgesamt 10 Röhrchen für jede 5 Platten, übertragen. 350 µl SV RNA Verdünnungspuffer wurden zu jedem 175 µl an Zelllysate hinzugegeben und die Lösung wurde durch 3-4 Mal Umdrehen des Röhrchens gemischt. Anschließend an die Inkubation bei 70°C für 3 Minuten wurden die Lysate bei 11000 g für 10 Minuten bei R.T. zentrifugiert.

**[0123]** Für jede Probe wurde eine Drehsäulenordnung (spin column assembly) vorbereitet. Jede Drehsäulenordnung besteht aus einem Drehkorb (spin basket) und einem Sammelröhrchen (collection tube). Die Deckel auf den Drehkörben wurden entfernt und die Sammelröhrchen beschriftet und in ein Gestell für Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Das geklärte Lysat wurde in frische Mikrozentrifugenröhrchen übertragen ohne den Debris aufzuwirbeln. 200 µl 95% Ethanol wurden zu jedem Lysatröhrchen hinzugegeben und durch 3-4 Mal pipettieren gemischt. Die Mischung wurde in die Drehsäulenordnung übertragen und bei 11000 g für 1 Min. bei R.T. zentrifugiert.

**[0124]** Der Drehkorb wurde von der Drehsäulenordnung entnommen und die Flüssigkeit in dem Sammelröhrchen wurde verworfen. Der Drehkorb wurde wieder mit dem Sammelröhrchen zusammen gebracht und 600 µl SV RNA Waschlösung wurden zu der Drehröhrchenanordnung hinzugegeben und die Säulen wurden bei 11000 g für 1 Min. zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde wie vorstehend geleert und in ein Gestell platziert. Für jede durchzuführende Isolierung, wurde ein DNase Inkubationsmix mittels Kombinieren von 40 µl Yellow Core Puffer, 5 µl 0,90 M  $MnCl_2$  und 5 µl DNase I Enzym pro Probe in einem sterilen Röhrchen (in dieser Reihenfolge) hergestellt. Der Inkubationsmix wurde durch pipettieren (kein Vortexen) vorsichtig durchmischt und auf Eis gehalten. 50 µl dieses frisch hergestellten DNase Inkubationsmix wurden unmittelbar auf die Membran in dem Drehkorb aufgebracht, wobei sicher gestellt wurde, dass die Lösung in Kontakt mit der Membran stand und komplett bedeckte. Anschließend an die Inkubation für 15 Min. bei R.T., wurden 200 µl SV DNase Stopplösung zu dem Drehkorb hinzugegeben und bei 11000 g für 1 Minute zentrifugiert, wobei 600 µl SV RNA Waschlösung nach der Zentrifugation bei 11000 g für 1 Minute hinzugegeben wurden. Das Sammelröhrchen wurde geleert, 250 µl SV RNA Waschlösung wurden hinzugegeben und bei hohen 11000 g für zwei Minuten zentrifugiert.

**[0125]** Für jede Probe wurde ein Eluierungsröhrchen vorbereitet; der Drehkorb wurde vom Sammelröhrchen zum Eluierungsröhrchen transferiert und 100 µl Nuklease freies Wasser wurden auf die Membran gegeben, während die Oberfläche der Membran mit Wasser vollständig bedeckt war. Die Drehkorbanordnungen wurden in der Zentrifuge mit den Deckeln der Eluierungsröhrchen nach außen zeigend platziert und bei 11000 g für eine Min. zentrifugiert. Der Drehkorb wurde entfernt und verworfen.

**[0126]** Gemäß des Trireagenzverfahrens wurden die Zellen unmittelbar in den Kulturschalen lysiert. 1 ml Trireagenz wurde zu jeder Platte hinzugegeben und das Zelllysate wurde mehrere Male durch eine Pipette gezogen. Jede 5 Platten (behandelt und unbehandelt) wurden vereint. Die Homogenate wurden bei R.T. für 5 Min. gelagert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Zu den Homogenaten wurden 0,2 ml Chloroform für jedes 1 ml an Trireagenz gegeben und die Proben wurden für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Die erhaltene Mischung wurde bei R.T. für 15 Min. inkubiert und bei 12000 g für 15 Min. bei 40°C zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Mischung in eine untere, rote Phenolchloroformphase, Interphase, und die farblose, obere, wässrige Phase getrennt, die die RNA enthält. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und RNA wurde durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol für jedes 1 ml Trireagenz ausgefällt, das für den anfänglichen Schritt verwendet wurde.

**[0127]** Die Proben wurden bei R.T. für 10 Min. inkubiert und bei 12000 g für 8 Min. bei 40°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet wurde mit 75% Ethanol (mindestens 1 ml pro anfänglich verwendetem Trireagenz) mittels Vortexen gewaschen und anschließend bei 7500 g für 5 min bei 40°C zentrifugiert. Die erhaltene RNA wurde luftgetrocknet und in Wasser wieder aufgenommen.

**[0128]** Die Ausbeute an erhaltener Gesamt RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorptionseinheit ( $A_{260}$ ) 40 µg einzelsträngiger RNA/ml entspricht. Die Vollständigkeit bzw. Integrität der gereinigten RNA wurde ebenso mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt, bei der das Verhältnis von 28S zu 18S eukaryotischen ribosomalen RNAs ungefähr 2:1 mittels Ethidiumbromid Färbung betragen sollte, was anzeigt, dass kein übermäßiger Abbau an RNA stattgefunden hat.

**[0129]** Eine Kontamination durch genomische DNA ist besonders lästig. Daher wurden alle RNA Proben mit

RNase freier DNase I vor der Verwendung als eine Sonde behandelt. Die folgenden Reagenzien wurden für jede Probe zusammengegeben:

500 µl Gesamt RNA (0,5 µg)

100 µl 10 × DNase I Puffer (400 mM Tris-HCL; pH 7,5; 100 mM NaCl; 60 mM MgCl<sub>2</sub>)

50 µl DNase I (RQ1 RNase freie DNase, Promega, Katalog Nr. M6101; unverdünnt; 1 Einheit/µl)

395 µl deionisiertes H<sub>2</sub>O

**[0130]** Die Lösung wurde durch mehrere Male auf und ab Pipettieren gut durchmischt. Die Reaktionsmischungen wurden bei 37°C für 1 h in einem Wasserbad inkubiert, anschließend wurden 100 µl 10 × Endmischung (0,1 M EDTA [pH 8,0]; 1 ng/ml Glykogen [Typ IX von Rinderleber, Sigma, Katalog Nr. G0885]) hinzugegeben und durch auf und ab Pipettieren gemischt.

**[0131]** Jede Reaktion wurde in zwei 1,5 ml Mikro-Zentrifugenröhrchen (550 µl/Röhrchen) aufgetrennt und 550 µl Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zu jedem Röhrchen hinzugegeben, die Mischungen wurden kräftig durchmischt bzw. gevortext und in einer Mikrozentrifuge bei 14000 UpM für 10 Min. zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere wässrige Schicht wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, wobei die Interphase und die untere Phase verworfen wurden. Nachdem die erhaltene wässrige Phase dieser Extraktion wiederholt unterzogen wurde, wurden 550 µl einer Mischung von Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) zu der letzten erhaltenen wässrigen Schicht hinzugegeben, gefolgt von kräftigem Durchmischen. Die Röhrchen wurden bei 11.000 g für 10 Min. zur Trennung der Phasen zentrifugiert und die erhaltene obere wässrige Schicht wurde entfernt und in ein 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. 1/5 Volumen (100 µl) 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc und 2,5 Volumen (1,5 ml) 96% Ethanol wurden hinzugegeben, die Mischungen wurden kräftig durchmischt und bei 14000 UpM für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet wurde mit 100 µl 80% Ethanol vorsichtig überschichtet und bei 14000 UpM zentrifugiert. Nach entfernen des Überstands wurde das Pellet für ungefähr 10 Min. getrocknet, um verbliebenes Ethanol zu verdampfen. Das Pellet wurde in 250 µl deionisiertem H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen, die zwei gleichen Röhrchen wurden kombiniert und die RNA wurde einer Oligo (dT) Reinigung von Poly A+RNA unterzogen.

**[0132]** Gesamt RNA wurde einer Poly A+RNA Isolierung unter Verwendung des Promega Poly A Tract mRNA Isolations-Systems III (Katalog Nr. Z5300) unterzogen. 500 µl Volumen an Gesamt RNA wurden in einem Wasserbad bei 65°C für 10 Min. inkubiert. 3 µl der biotinylierten Oligo (dT) Sonde und 13 µl 20 × SSC wurden zu der RNA hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und bei R.T. bis zur vollständigen Abkühlung inkubiert (ungefähr 10 Min.). Streptavidin paramagnetische Teilchen (SA-PMPs) (Röhrchen per RNA Probe) wurden durch vorsichtiges Flenzen (flicking) der Unterseite des Röhrchens resuspendiert bis sie vollständig dispergiert waren, anschließend wurden sie durch Platzieren des Röhrchens in dem magnetischen Standplatz aufgefangen bis die SA-PMPs an der Seite des Röhrchens (ungefähr 30 Sekunden) gesammelt wurden. Der Überstand wurde entfernt und die SA-PMPs wurden dreimal mit 0,5 × SSC (0,3 ml/Waschschritt) gewaschen, wobei sie jedes Mal unter Verwendung des magnetischen Standplatzes aufgefangen wurden und der Überstand anschließend vorsichtig entfernt wurde. Die gewaschenen SA-PMPs wurden in 0,1 ml 0,5 × SSC resuspendiert.

**[0133]** Die gesamten Inhalte der Annealing-Reaktion wurden zu dem Röhrchen hinzugegeben, das die gewaschenen SA-PMPs enthielt, die Mischung wurde bei R.T. für 10 Min. (die Mischung wurde durch Umdrehen der Röhrchens alle 1-2 Min. vorsichtig gemischt) inkubiert und die SA-PMPs wurden unter Verwendung des magnetischen Standplatzes aufgefangen und der Überstand wurde ohne Stören des SA-PMP Pellet vorsichtig entfernt. Die Teilchen wurden viermal mit 0,1 × SSC (0,3 ml/Waschschritt) durch vorsichtiges Flenzen der Unterseite des Röhrchens gewaschen, bis alle Teilchen resuspendiert waren. Nach dem letzten Waschschritt wurde sorgfältig soviel der wässrigen Phase wie möglich entfernen, ohne die SA-PMP Teilchen zu stören. Um die mRNA zu eluieren, wurde das letzte SA-PMP Pellet in 0,1 ml des RNase freien Wasser resuspendiert und die Teilchen wurden durch vorsichtiges Flenzen vorsichtig resuspendiert. Die SA-PMPs wurden magnetisch aufgefangen und die eluierte mRNA wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen übertragen.

**[0134]** Der Elutionsvorgang wurde durch Wiederaufnahme des SA-PMP Pellets in 0,1 ml RNase freien Wassers wiederholt, die Teilchen wurden aufgefangen und die eluierte mRNA wurde mit der eluierten mRNA des vorigen Schrittes gepoolt bzw. vereint. Um irgendwelche Teilchen zu entfernen wurde die eluierte mRNA bei 10000 g für 10 Min. zentrifugiert und die mRNA wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen übertragen.

**[0135]** Die Konzentration und Reinheit der eluierten mRNA wurden spektrophotometrisch, wie vorstehend beschrieben, bestimmt.

**[0136]** Um cDNA Sonden herzustellen wurde cDNA aus poly A + RNA hergestellt. 1 µg Poly A + RNA wurden

einer cDNA Synthese unter Verwendung der Clontech Atlas cDNA Expressionsarray Bestandteile unterzogen. Eine Mastermischung wurde für alle Markierungsreaktionen hergestellt:

5 × Reaktionspuffer 2,0 µl

10 × dNTP Mischung (für dATP Markierung) 1,0 µl

[ $\mu$ -32P] dATP (3,000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; Amersham #PB10204) 3,5 µl

DTT (100mM) 0,5 µl

MLLV Reverse Transkriptase (50 Einheiten/µl) 1,0 µl

**[0137]** Für jede Reaktion wurden 8,0 µl der Mastermischung hinzugegeben. Der PCR Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra) wurde auf 70° Celsius vorgeheizt. Für jeden Versuch- Poly A + RNA und die Kontroll- Poly A + RNA wurden die folgenden Bestandteile in einem 0,2 ml PCR Röhrchen (Tamar, Katalog Nr. 431 M) kombiniert:

Poly A + RNA Probe

1 µg (2 µl)

10 × CDS Primer Mischung

1 µl

**[0138]** Die Röhrchen wurden mittels Vortexen gemischt und in einer Mikrozentrifuge kurz zentrifugiert. Die Röhrchen wurden in dem vorgeheizten PCR Thermocycler bei 70°C für 2 Min. inkubiert und anschließend für 2 Min. bei 50°C inkubiert. 8 µl Mastermischung wurden zu jedem Reaktionsröhrchen hinzugegeben (wobei darauf geachtet wurde keine RNA Proben länger als notwendig von dem Thermocycler zu entfernen, um die Mastermischung hinzu zugeben), die Inhalte der Röhrchen wurden durch Pipetieren vorsichtig durchmischt und unverzüglich in den Thermocycler zurückgestellt. Die Röhrchen wurden in dem PCR Thermocycler bei 50°C für 25 Min. inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 10 × Endmischung (0,1 M EDTA; pH 8,0; 1,0 mg/ml Glykogen [Type IX von Rinderleber, Sigma]) abgestoppt.

**[0139]** Um die <sup>32</sup>P-markierte cDNA von nicht aufgenommenen <sup>32</sup>P-markierten Nukleotiden und kleinen (< 0,1 kb) cDNA Fragmenten zu reinigen, wurde jedes Röhrchen dem nachstehenden Verfahrensschritt unterzogen: für jede Reaktion wurde ein CHROMA SPIN-200 DEPC-H<sub>2</sub>O Säulchen entfernt um die Gelmatrix vollständig zu resuspendieren. (Im Fall von Luftblasen in der Säulen-Matrix wurde die Säule wieder umgedreht). Der untere Deckel der Säule wurde entfernt und anschließend wurde der obere Deckel langsam entfernt. Die Säule wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchenkühlschrank platziert und ermöglicht auf Raumtemperatur für ungefähr 1 h aufzuwärmen. Die Säule wurde umgedreht, um das Fluid durch die Säule laufen zu lassen bis die Oberfläche der Gelkügelchen in der Säulen-Matrix gesehen werden konnten. Die Oberseite der Säulen-Matrix sollte 1,0 ml sein. Das gesammelte Fluid wurde verworfen und die Probe wurde vorsichtig und langsam auf den Mittelpunkt der flachen Oberfläche des Gelbetts aufgebracht und es wurde der Probe ermöglicht vollständig in das Harzbett aufgenommen zu werden bevor zu dem nächsten Schritt übergegangen wurde.

**[0140]** 40 µl deionisiertes Wasser wurden auf die Säule gegeben und ermöglicht vollständig aus der Säule zu laufen und verworfen. 250 µl deionisiertes H<sub>2</sub>O wurden auf die Säule gegeben und ermöglicht, vollständig aus der Säule zu laufen bis keine Flüssigkeit über dem Gelbett verblieb, und verworfen.

**[0141]** Vier Fraktionen wurden wie nachstehend gesammelt. Die Säule wurde in ein reines 1,5 ml Mikro-Zentrifugenröhrchen übertragen, 100 µl deionisiertes H<sub>2</sub>O wurden zu der Säule hinzugegeben und ermöglicht vollständig aus der Säule zu laufen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Aufnahme von <sup>32</sup>P in die Sonde wurde unter Verwendung des Cherenkov-Verfahrens für Scintillationszählen überprüft, indem die gesamte Probe auf dem Tritiumkanal gezählt wurde, ohne Zugabe des Scintillationscocktails zu dem Röhrchen hinzugegeben wurde.

**[0142]** Das Hybridisierungsverfahren wurde wie nachstehend beschrieben durchgeführt, indem zuerst eine Test-Hybridisierung mit einer leeren Membran durchgeführt wurde. Bevor die vorbereiteten <sup>32</sup>P markierten cDNA Sonden auf den Atlas Array hybridisiert wurden, wurde die Qualität jeder Versuchs- cDNA Sonde durch deren Hybridisierung auf die beigefügten Kontroll- (leeren) Nylonmembranen überprüft. Dies ermöglichte ein Abschätzen des Niveaus des nicht spezifischen Hintergrunds, der von Unreinheiten in den RNA Proben herrührt.

**[0143]** Die Nylonmembran wurde bei -20°C gelagert und über das gesamte Verfahren hinweg feucht gehalten. 15 ml ExpressHyb Lösung wurden bei 68°C vorgewärmt und 1,5 ml gescherte Lachshoden DNA (10 mg/ml; Sigma #D-7656) wurden bei 95-100° Celsius für 5 Min. erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Die hitzedenaturierte, gescherte Lachshoden DNA wurde mit vorgewärmten ExpressHyb gemischt und bei 68°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

**[0144]** Der Atlas Array wurde mit deionisiertem H<sub>2</sub>O benetzt, der Überschuss wurde abgeschüttet und der Atlas Array wurde in einer vorher zubereiteten 10 ml Hybridisierungslösung platziert. Eine Prähybridisierung wurde für 30 Min. unter andauerndem Rühren bei 68°C durchgeführt.

**[0145]** Der Gesamtpool an markierter cDNA Sonde (ungefähr 200 µl, 2 und 4-10 × 10<sup>6</sup> cpm, jeweils für Blindprobe und Atlas Array) wurden mit 1/10 des gesamten Reaktionsvolumen von 10 × Denaturierungslösung (1 M NaOH, 10 mM EDTA) gemischt und bei 68°C für 20 Min. inkubiert. Anschließend wurden 5 µl (1 µg/µl) Cot-1 DNA und ein gleiches Volumen (ungefähr 225 µl) 2 × Neutralisationslösung (1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7,0]) hinzugegeben und die Inkubation wurde bei 68°C für 10 Min. fortgesetzt.

**[0146]** Die radioaktive Mischung wurde zu den verbleibenden 5 ml der ExpressHyb-Lösung hinzugegeben; die Prähybridisierungslösung wurde ausgeschüttet und die Hybridisierungslösung wurde hinzugegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht unter andauerndem Rühren bei 68°C statt.

**[0147]** Lösungen 1 (2 × SSC; 1% SDS) und 2 (0,1 × SSC; 0,5% SDS) wurden bei 68°C vorgewärmt. Die Hybridisierungslösung wurde sorgfältig entfernt und der Atlas Array wurde mit 200 ml Lösung 1 für 30 Min. unter andauerndem Rühren bei 68°C gewaschen. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Zwei zusätzliche 30 Min. Waschröte wurden mit Lösung 2 ebenso durchgeführt.

**[0148]** Der Atlas Array wurde von dem Behälter entfernt und überschüssige Lösung wurde abgeschüttelt ohne der Membran zu ermöglichen zu trocknen. Die Membran wurde unverzüglich mit einer Plastikhülle umhüllt und der Atlas Array wurde einem Röntgenfilm bei -70°C ausgesetzt, mit einem Intensivierungsschirm (intensifying screen) für 3 Tage.

**[0149]** Nach Entwicklung des Films wurden die cDNA Sonden von dem Atlas Array abgestreift (stripped) und die Membran wurde wieder verwendet. 0,5% SDS-Lösung wurden zum Sieden erhitzt, die Plastikhülle wurde von dem Atlas Array entfernt und die Membran wurde unverzüglich in die siedende Lösung für 10 Min. platziert. Die Lösung wurde von der Hitzequelle entfernt und ermöglicht für 10 Min. abzukühlen. Die Effizienz des Strip-pens wurde mittels Aussetzen gegenüber dem Röntgenfilm überprüft und das Stripverfahren wurde wiederholt bis keine Radioaktivität mehr nachgewiesen wurde.

**[0150]** Die Gene auf dem Atlas Array wurden in verschiedene funktionelle Klassen gruppiert:

- A. Onkogene; Tumorsuppressorgene; Kontrollproteine des Zellzyklus.
  - B. Stress Reaktionsproteine; Ionenkanäle und Transportproteine, Modulatoren und Effektoren der intrazellulären Signaltransduktion.
  - C. Apoptose Gene; DNA Synthese, Wiederherstellungs- und Rekombinationsgene.
  - D. Transkriptionsfaktoren, allgemeine DNA-Bindeproteine.
  - E. Rezeptoren: Wachstumsfaktoren und Chemokine, Interleukine und Interferone, Hormone, Neurotransmitter; Zelloberflächen-Antigene; Zell-Adhensions-Proteine.
  - F. Zell-Zell Kommunikationsproteine: Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine; Interleukine und Interferone; Hormone.
  - G. Haushaltsgene.
- Negative Kontrollen: G2-4, 9-11, 16-18.  
Leere bzw. Blindproben (blank) Punkte: G1, 8, 15.

**[0151]** Sowohl Negativkontrollen als auch leere Punkte verhielten sich bei der Hybridisierung wie sie es sollten. Nach 3 Tagen Aussetzen, wurden die zwei identischen Atlas Arrays auf die die zwei verschiedenen Sonden hybridisiert, verglichen und die Gene, die verschiedene Expressions-Intensitäten zwischen den beiden zeigten, wurden zu weiteren Untersuchung ausgewählt.

Tabelle 2: Herunterregulierung von Genen nach Behandlung mit Halofuginon

| Gen   | Effekt von Halofuginon |
|---|------------------------|
| RAS-ähnliches Protein RAB-5A                  | --                     |
| Apopain (Cysteinprotease CPP32 Isoform Alpha) | -                      |
| Apopain (Cysteinprotease Mch2 Isoform Beta)   | --                     |
| MUTL Protein Homolog                          | --                     |
| UV Entfernungswiederherstellungsprotein RAD23 | --                     |
| Nuklearer Faktor NF90                         | ---                    |
| Homeobox Protein HOX-D3                       | --                     |
| Glyceraldehyd 3-Phosphat                      | -----                  |
| Dehydrogenase (G3PDH)                         |                        |

Die Regulierung der menschlichen Zell-Wechselwirkungsgene nach Behandlung mit Halofuginon

**[0152]** Das gleiche Protokoll wie vorstehend wurde verwendet. Primäre menschliche Fibroblasten wurden 1 h mit  $10^{-8}$  M Halofuginon behandelt. Das Halofuginon wurde zuvor auf dem Niveau von RNA getestet und bei der Behandlung mit Halofuginon wurde gefunden, dass Kollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA verringert wurde. cDNA Sonden wurden entweder aus mRNA von mit Halofuginon behandelten oder unbehandelten Zellen hergestellt und gegen Clontechs Atlas cDNA Expressionsarrays hybridisiert: Atlas menschlicher Zellen Wechselwirkungsarray (Atlas Human Cell Interaction Array) Kat.nr. 7746-1. Die Arrays beinhalten 265 Gene, von denen bekannt ist, dass sie in verschiedene Arten bzw. Typen von Zellwechselwirkungen einbezogen sind. Nach der Hybridisierung wurden die beiden Membranen verglichen und Gene, die verschiedene Expressionsintensitäten zwischen den zwei aufwiesen, wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

Tabelle 3: Hochregulierung von menschlichen Zell-Wechselwirkungsgenen nach Behandlung

mit Halofuginon

| Gen                           | Effekt von Halofuginon |
|-------------------------------|------------------------|
| Lamininrezeptor               | +++                    |
| IGFBP6                        | +                      |
| Integrin Alpha 3              | +                      |
| TIMP-1                        | ++                     |
| TIMP-2                        | ++                     |
| CD59                          | ++                     |
| Nucleosid Diphosphat Kinase B | ++                     |
| Transformationsprotein RHOA   | ++                     |

Tabelle 4: Herunterregulierung von menschlichen Zell-Wechselwirkungsgenen nach Behandlung mit Halofuginon

| Gen                          | Effekt von Halofuginon |
|------------------------------|------------------------|
| G3PDH                        | -----                  |
| 23 kDA hochbasisches Protein | --                     |
| CD9                          | --                     |
| Wnt-13                       | --                     |
| Caveolin-1                   | --                     |
| rhoG                         | --                     |

**[0153]** Aus diesen Versuchsergebnissen folgt, dass Halofuginon die Regulierung einer Anzahl von verschiedenen Genen eindeutig ändert und dadurch die extrazelluläre Matrixökonomie hinsichtlich einer großen Anzahl verschiedener Genprodukte beeinflusst. Allerdings sind viele dieser Effekte auf verschiedene Gene vermutlich sekundär zu dem Haupt-Wirkungsmechanismus von Halofuginon und ähnlichen Molekülen dieser Klasse, was ein Inhibieren der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens einschließt; Inhibieren der Kollagenase Typ IV Herstellung; Inhibierung der H19 Genexpression; Abnahme der Expression des HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , während die Transkription von NF- $\kappa$ B inhibiert wird; allerdings ohne die Expression von TGF $\beta$  zu beeinflussen.

**[0154]** Daher können die offensichtlichen Effekte von Halofuginon hinsichtlich TNF $\alpha$  und NF- $\kappa$ B aber nicht TGF- $\beta$  es letztendlich Halofuginon ermöglichen die erwünschten inhibitorischen Effekte auf die pathologischen Vorgänge von Fibrose aufzuweisen, im Wesentlichen ohne die physiologisch gewöhnliche und erwünschte extrazelluläre Matrixökonomie schädlich zu inhibieren oder herunterzuregeln.

#### Beispiel 7 Effektoren zur Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie

**[0155]** Wie eindeutig vorstehend gezeigt, kann die extrazelluläre Matrixökonomie durch Halofuginon und andere Effektoren bei einer Anzahl von Interventionspunkten reguliert werden. Diese Interventionspunkte ermöglichen pathologischen Vorgängen, die mit Gewebetrauma und anderen mechanistisch ähnlichen Vorgängen zusammenhängen, selektiv inhibiert zu werden, während im Wesentlichen eine gewöhnliche Aktivität von physiologisch erwünschten Vorgängen beibehalten wird. Wie vorstehend angemerkt betrifft der Ausdruck "mechanistisch ähnliche Vorgänge" jene pathologischen Zustände, die einen oder mehrere zugrunde legende Mechanismen mit den abnormen Antworten auf Gewebetrauma teilen. Ein Beispiel für einen derartigen mechanistisch ähnlichen Vorgang ist das Wachstum und die Metastase von bösartigen Krebszellen.

**[0156]** Der Halofuginon zugrunde liegende Wirkungsmechanismus bei der Inhibierung all dieser pathologischen Vorgänge bezieht die Inhibierung der Kollagen Typ I Synthese auf dem molekularen Niveau ein, insbesondere durch Fördern der cKrox Aktivität und dadurch Inhibieren der Expression der Kollagen  $\alpha 1(I)$  Genexpression, ebenso durch Abnahme der Expression des HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , während die Transkription von NF- $\kappa$ B inhibiert wird; allerdings ohne die Expression von TGF $\beta$  zu beeinflussen. Der Ausdruck "Fördern der cKrox Aktivität" beinhaltet die Hochregulierung der cKrox Genexpression und die Verstärkung der Aktivität des cKrox Proteins oder Proteine, ist allerdings nicht darauf begrenzt.

**[0157]** Andere mögliche molekularen Ziele von Halofuginon beinhalten die Inhibierung der Kollagenase Typ IV Herstellung und die Inhibierung der H19 Genexpression, ebenso wie die Gesamtregulierung der ECM (extrazelluläre Matrix) Ablagerung und Remodellierung und die Inhibierung der Neo-Angiogenese. Andere Mechanismen der "extrazellulären Matrixökonomie" beinhalten die Induktion von Apoptose und die Inhibierung der H19 Genexpression. Die Aufklärung dieser Mechanismen und der selektiven Gesamtregulierung der extrazellulären Matrixökonomie zeigt eindeutig neue und nicht-offensichtliche Verfahren zur therapeutischen Intervention, die im Stand der Technik weder gelehrt noch vorgeschlagen wurden.

**[0158]** Daher betrachtet die vorliegende Erfindung ebenso das Einbeziehen von Verfahren und Zusammensetzungen für die Regulierung der extrazellulären Matrixökonomie und insbesondere für die Förderung der



cKrox Aktivität und für die Inhibierung des HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens; die Abnahme der Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , mit der Inhibierung der Transkription von NF- $\kappa$ B; allerdings im Wesentlichen ohne die Expression von TGF $\beta$  zu beeinflussen.

**[0159]** Diese Verfahren und Zusammensetzungen beinhalten die Verabreichung eines Effektors an ein Subjekt. Der Ausdruck "Effektor", wie hierin verwendet, betrifft im Wesentlichen jede chemische Verbindung oder Kombination davon, die die extrazelluläre Matrixökonomie, wie vorstehend beschrieben, regulieren kann. Der Effektor kann vorzugsweise die cKrox Aktivität fördern. Mehr bevorzugt wird eine derartige Förderung durch ein Erhöhen der Expression des cKrox Gens verursacht. Alternativ und vorzugsweise kann der Effektor das HSP47 Gens parallel zu der Inhibierung der Expression des Kollagen  $\alpha 1(I)$  Gens inhibieren; die Freisetzung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  herabsetzen, ebenso wie die Transkription von NF- $\kappa$ B zu inhibieren; wobei er diese Effekte bewirken kann im Wesentlichen ohne die Expression von TGF $\beta$  zu beeinflussen. Mehr bevorzugt kann der Effektor diese Effektkonstellation als eine Gruppe induzieren.

**[0160]** In bevorzugten Ausführungsformen von Verbindungen der vorliegenden Erfindung beinhalten diese Verbindungen ein Quinazolinonderivat als den Effektor. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beinhalten diese Verbindungen Halofuginon als den Effektor.

**[0161]** Der Effektor der vorliegenden Erfindung kann einem Subjekt in einer Anzahl von Wegen verabreicht werden, die alle im Stand der Technik bekannt sind. Nachstehend betrifft der Ausdruck "Subjekt" den Menschen oder ein niedrigeres Tier, denen der Effektor verabreicht wurde. Beispielsweise kann die Verabreichung topisch (einschließlich ophthalmisch, vaginal, rektal, intranasal) oral oder parenteral, beispielsweise durch intravenöse Tropfinfusion, oder durch intraperitoneale, subkutane oder intramuskuläre Injektion erfolgen.

**[0162]** Formulierungen für topische Verabreichungen können Lotionen, Salben, Gele, Cremes, Zäpfchen, Tropfen, Flüssigkeiten, Sprays und Pulver enthalten, sind allerdings nicht darauf begrenzt. Gewöhnliche pharmazeutische Träger, wässrig, auf Pulver- oder Ölbasis, Verdickungsmittel und ähnliches können notwendig oder wünschenswert sein.

**[0163]** Zusammensetzungen für eine orale Verabreichung beinhalten Pulver oder Körnchen, Suspensionen oder Lösungen in Wasser oder nicht-wässrigen Medien, Beutel, Kapseln oder Tabletten. Verdickungsmittel, Verdünnungsmittel, Aromastoffe, Dispersionshilfen, Emulgatoren oder Bindemittel können wünschenswert sein.

**[0164]** Formulierungen zur parenteralen Verabreichung können sterile wässrige Lösungen beinhalten, die ebenso Puffer, Verdünnungsmittel oder andere geeignete Additive beinhalten können.

**[0165]** Die Dosierung hängt von der Schwere der Symptome und von der Empfindlichkeit des Subjekts auf den Effektor ab. Fachmänner können optimale Dosierungen, Dosierungsmethodik und Wiederholungsraten einfach bestimmen.

**[0166]** Das nachstehende Beispiel ist nur eine Veranschaulichung eines Regulierungsverfahren der extrazellulären Ökonomie mit einem Effektor, wie beispielsweise Halofuginon, um einen pathologischen Zustand zu behandeln, der mit Gewebetrauma oder einem mechanistisch ähnlichen Zustand zusammenhängt.

#### Beispiel 8 Verfahren zur Behandlung von Herzfibrose

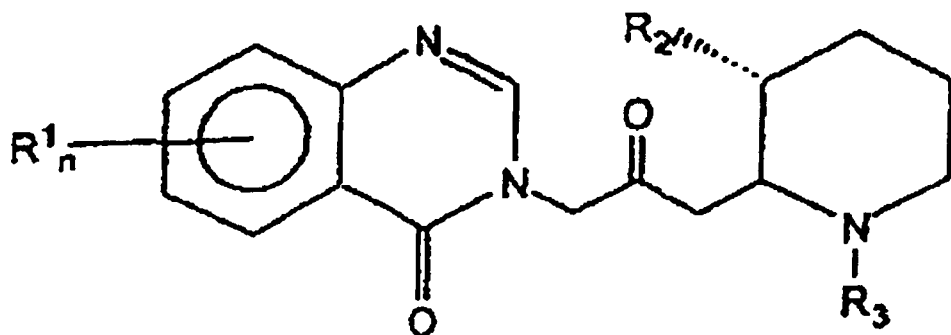
**[0167]** Wie vorstehend angemerkt wurde von Halofuginon gezeigt ein effektiver Inhibitor der Herzfibrose zu sein. Das nachstehende Beispiel ist nur eine Veranschaulichung eines Verfahrens zur Behandlung von Herzfibrose mit Halofuginon.

**[0168]** Das Verfahren beinhaltet den Schritt der Verwendung von Halofuginon in einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wie vorstehend in Beispiel 7 beschrieben, zur Verabreichung an ein zu behandelndes Subjekt. Halofuginon wird gemäß einer effektiven Dosierungsmethodik verabreicht, vorzugsweise bis ein bestimmter Endpunkt, wie beispielsweise die Abwesenheit eines weiteren Voranschreitens von Herzfibrose in dem Subjekt, die Inhibierung von Herzfibrose oder die Vorbeugung der Entstehung von Herzfibrose, erreicht wird.

#### Patentansprüche

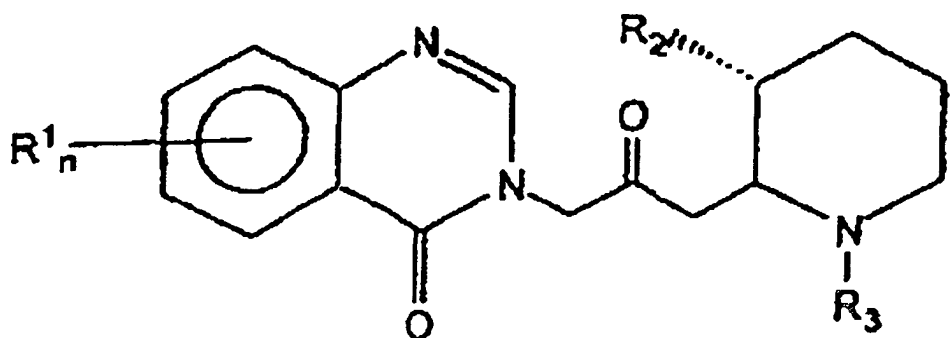
1. Ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Herzfibrose, das den Schritt der

Platzierung einer pharmazeutisch wirksamen Menge einer Verbindung in ein pharmazeutisch verträgliches Trägermittel umfasst, wobei die Verbindung ein Mitglied aus einer Gruppe mit der folgenden Formel ist:



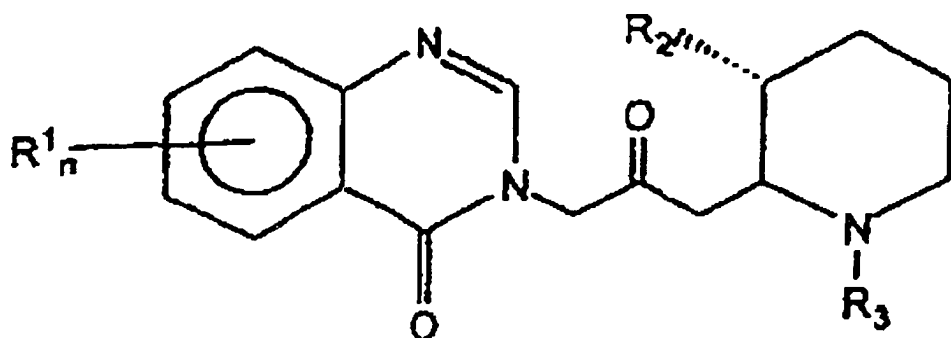
worin  $R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niederem Alkyl, Phenyl und niederem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niederem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niederem Alkenoxycarbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

2. Verwendung einer Verbindung mit einer Formel:



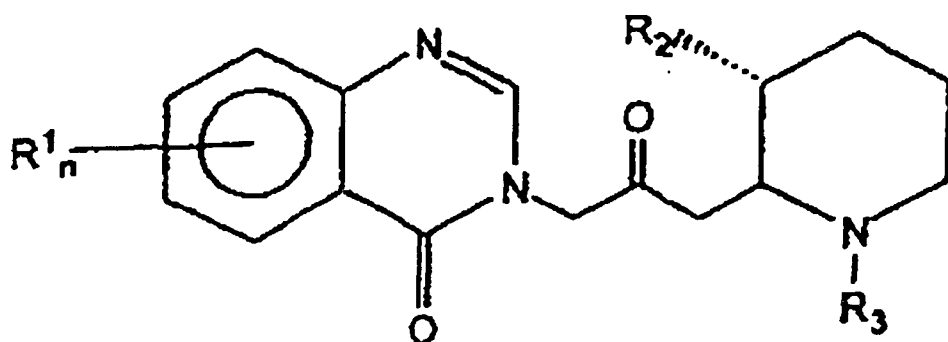
worin  $R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niederem Alkyl, Phenyl und niederem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niederem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niederem Alkenoxycarbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer solchen Verbindung, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Herzfibrose.

3. Ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung einer Herzfibrose, das den Schritt der Platzierung einer pharmazeutisch wirksamen Menge einer Verbindung in ein pharmazeutisch verträgliches Trägermittel umfasst, wobei die Verbindung ein Mitglied aus einer Gruppe mit der folgenden Formel ist:



worin  $R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niederem Alkyl, Phenyl und niederem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niederem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niederem Alkenoxycarbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

4. Verwendung einer Verbindung mit einer Formel:



worin  $R_1$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Nitro, Benzo, niederem Alkyl, Phenyl und niederem Alkoxy ist;  $R_2$  ein Mitglied der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Acetoxy und niederem Alkoxy ist;  $R_3$  ein Mitglied aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und niederem Alkenoxycarbonyl ist; und  $n$  entweder 1 oder 2 ist; oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer solchen Verbindung, zur Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung einer Herzfibrose.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

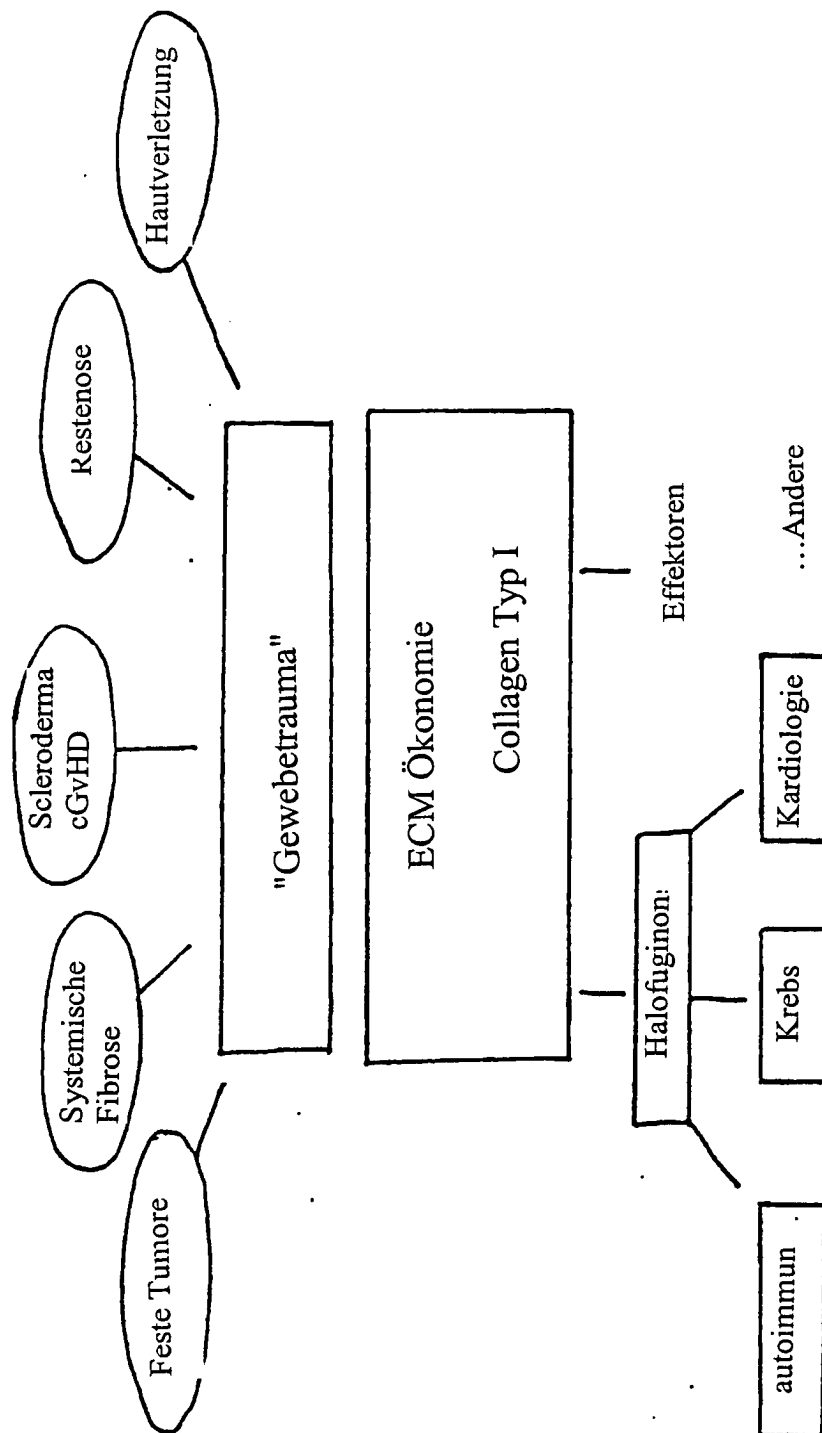


FIG. 1

Halofuginon konz. (ng/ml)  
in T50 Zellen Wachstumsmedium

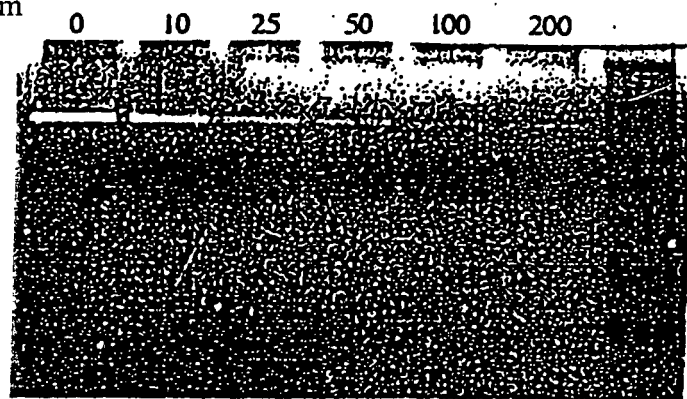
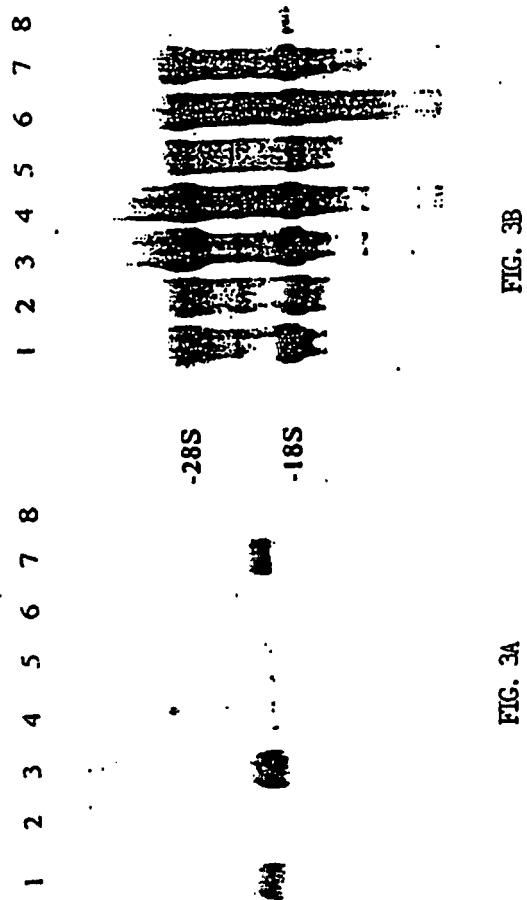


FIG. 2



Effekt von Halofuginon auf Integrine

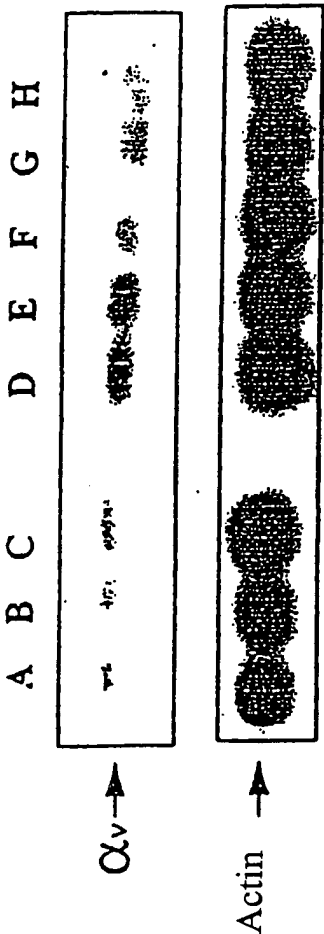


FIG. 4

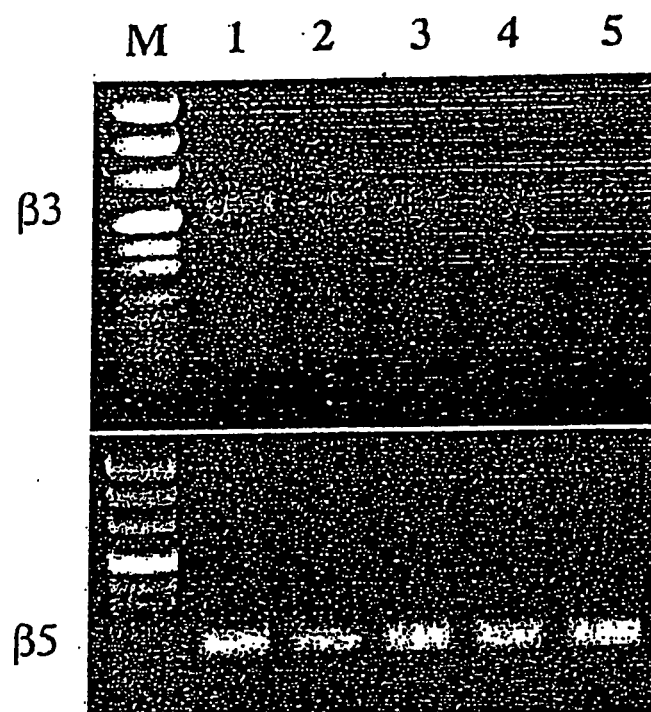


FIG. 5



Collagen Volumenquantifizierung im Rattenherz

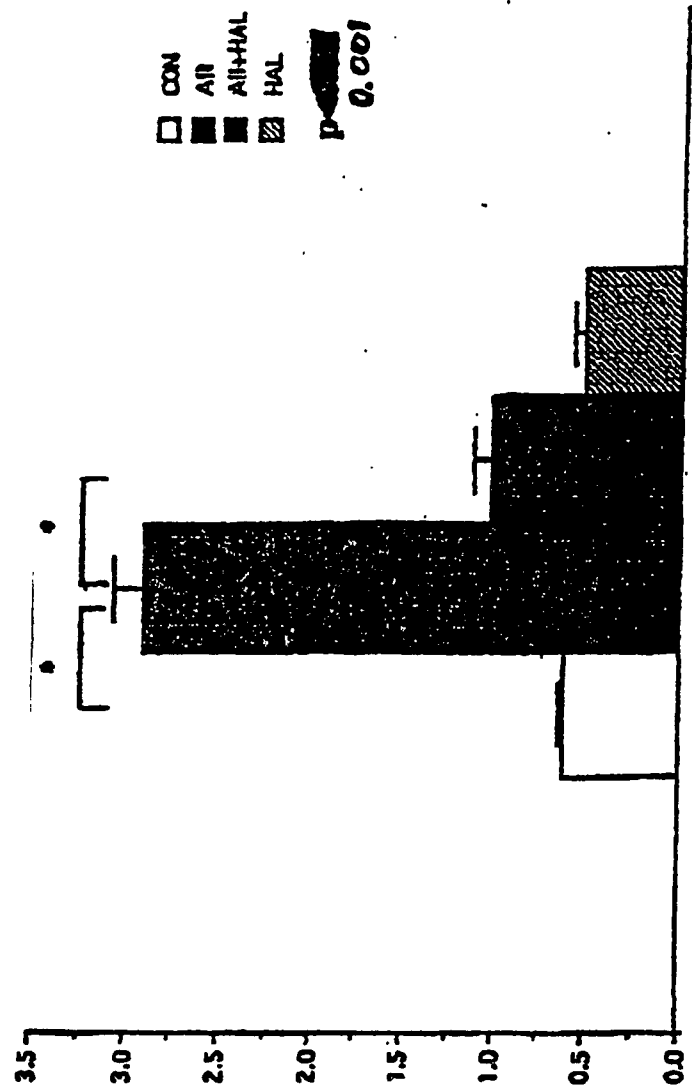


FIG. 6

Typ I Collagen mRNA Expression im Rattenherz

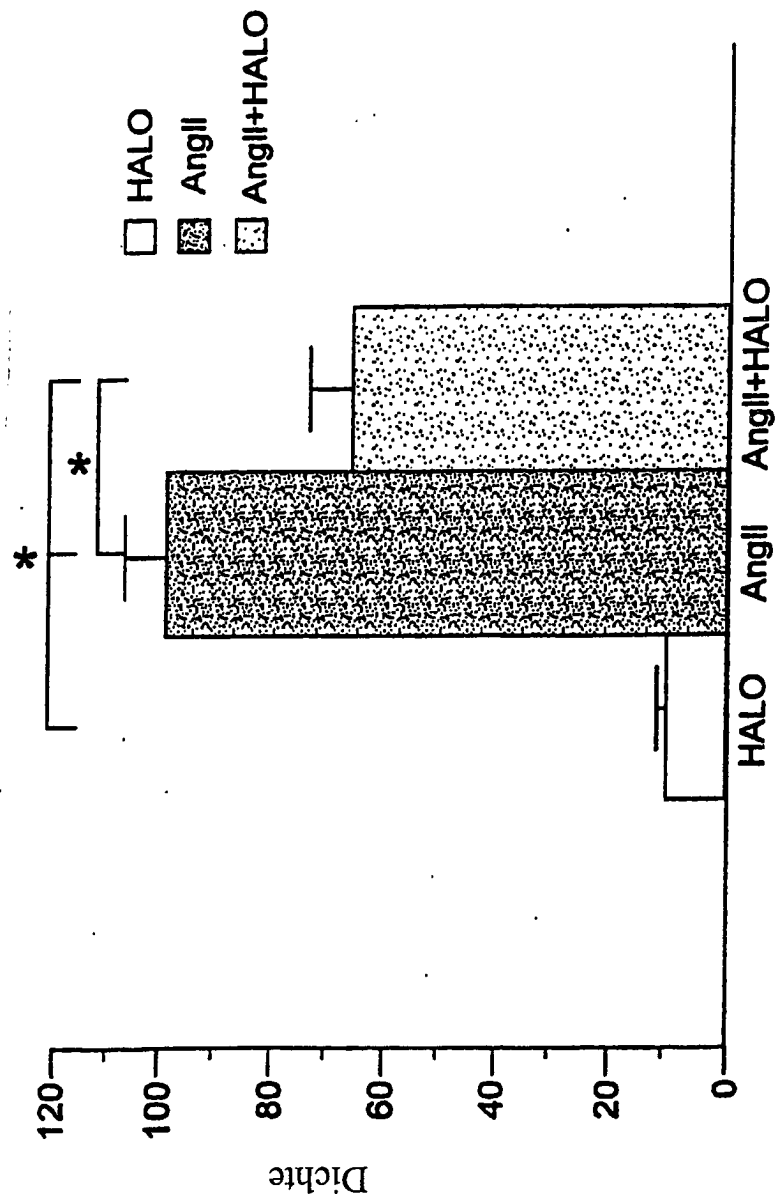


Fig. 7

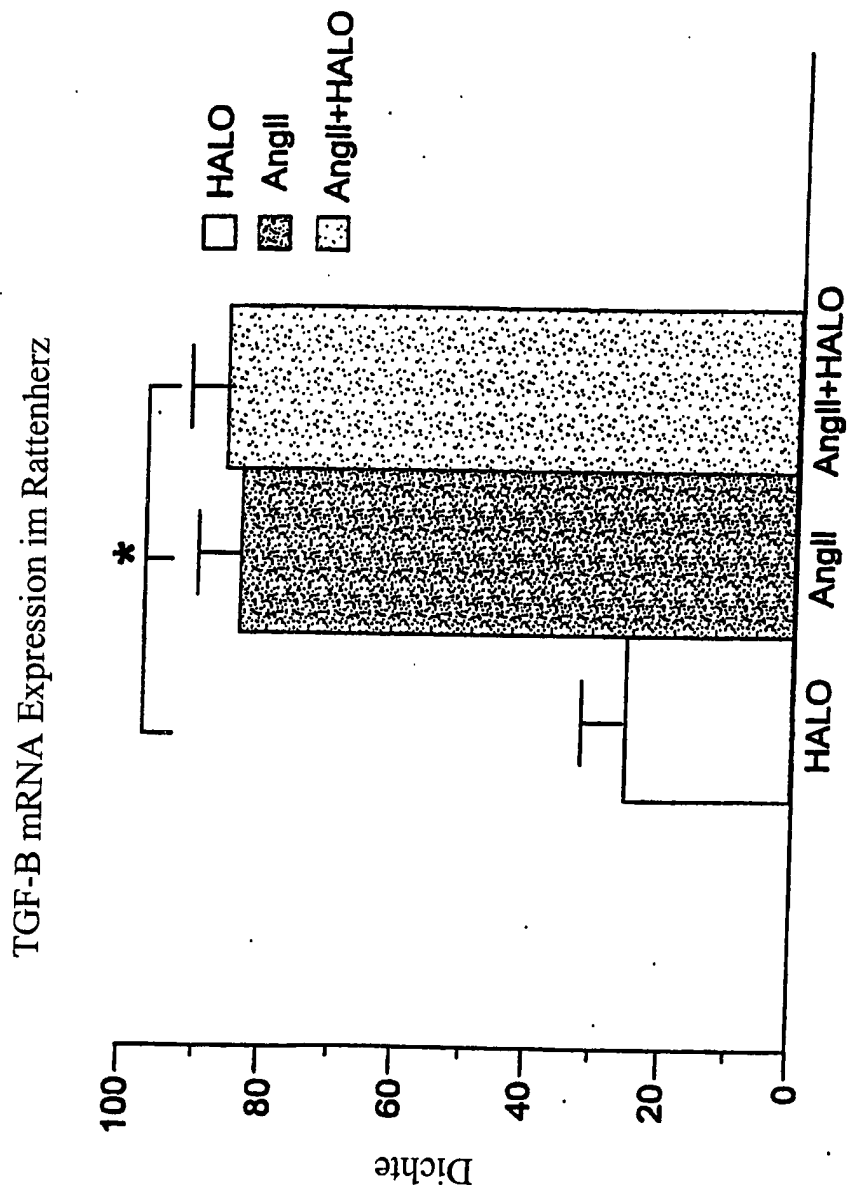


Fig. 8