



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 21 011 T3** 2009.01.08

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

(97) **EP 1 019 082 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 21 011.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/06233**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 951 483.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/017798**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.10.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **15.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.01.2004**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **04.06.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.01.2009**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/19** (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

97117155 **02.10.1997** **EP**

(73) Patentinhaber:

**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 80539 München, DE**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 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:

**BUSCHMANN, R., Ivo, D-61231 Bad Nauheim, DE;
SCHAPER, Wolfgang, D-61231 Bad Nauheim, DE**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Modulierung der Neovaskularisierung und/oder des Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien aus bestehenden arteriolären Verbindungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Modulierung der Neovaskularisierung und/oder des Wachstums kollateraler Arterien oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verstärkung der Neovaskularisierung und/oder des Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen bereit, das das Inkontaktbringen eines Organs, Gewebes oder von Zellen mit einem Koloniestimulierenden Faktor (CSF) oder einem Nucleinsäuremolekül, das den CSF codiert, umfasst. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung eines CSF oder eines Nucleinsäuremoleküls, das den CSF codiert, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Verstärkung der Neovaskularisierung und/oder des kollateralen Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen.

[0002] Bei der Behandlung von Personen mit arteriellen Verschluss-Erkrankungen zielen die meisten der gegenwärtigen Behandlungsstrategien darauf ab, deren Wirkung zu verbessern. Die einzigen kurativen Ansätze beinhalten Angioplastie (Ballondilatation) oder Bypass-Operation. Der erstgenannte trägt ein hohes Risiko an Restenose und kann ausschließlich bei bestimmten arteriellen Verschluss-Erkrankungen durchgeführt werden, wie ischämische Erkrankungen des Herzens. Der letztere ist invasiv und ebenfalls auf bestimmte Arten von arteriellen Verschluss-Erkrankungen beschränkt. Es gibt keine etablierte Behandlung für die Verstärkung von Neovaskularisierung und/oder von kollateralem Wachstum.

[0003] Das vaskuläre Wachstum in erwachsenen Organismen erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen, das Sprießen von Kapillaren (Angiogenese) und die in situ-Ausweitung von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen in echte kollaterale Arterien (Schaper, J. Collateral Circulation – Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993). Neueste Studien haben Mechanismen offenbart, die zu Angiogenese führen, wobei der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) eine hauptsächliche Komponente darstellt (Tuder, J. Clin. Invest. 95 (1995), 1798–1807; Plate, Nature 359 (1992), 845–848; Ferrara, Endocrine Reviews 13 (1992), 18–42; Klagsbrun, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991), 217–239; Leung, Science 246 (1990), 1306–1309). Dieses spezifische endotheliale Mitogen wird durch Hypoxie hochreguliert und ist in der Lage, Gefäßwachstum zu verstärken, wenn es nach femoraler Arterienentnahme in die hinteren Gliedmaßen von Kaninchen infundiert wird (Takeshita, J. Clin. Invest. 93 (1994), 662–670; Bauters, Am. J. Physiol. 267 (1994), H1263–H1271). Diese Studien unterschieden jedoch nicht zwischen dem Sprießen von Kapillaren, einem Mechanismus, der Angiogenese genannt wird, und dem echten kollateralen Arterienwachstum. Während VEGF ausschließlich für endotheliale Zellen mitogen ist, benötigt kollaterales Arterienwachstum die Proliferation von endothelialen Zellen und von glatten Muskelzellen, und es treten ausgeprägte Remodellierungsprozesse auf (Schaper, J. Collateral Circulation – Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993; Jakeman, J. Clin. Invest. 89 (1992), 244–253; Peters, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 8915–8919; Millauer, Cell 72 (1993), 835–846; Pasyk, Am. J. Physiol. 242 (1982), H1031–H1037). Darüberhinaus wird in ischämischen Territorien, zum Beispiel im Schweineherz oder in schnell wachsenden Tumoren, hauptsächlich das Sprießen von Kapillaren beobachtet (Schaper, J. Collateral Circulation – Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993; Plate, Nature 359 (1992), 845–848; Bates, Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996), 12–19; Bates, Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996), 12–19; Görge, Basic Res. Cardiol. 84 (1989), 524–535). Echtes kollaterales Arterienwachstum ist jedoch in den meisten untersuchten Modellen zeitlich und räumlich von Ischämie losgelöst (Schaper, J. Collateral Circulation – Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993; Paskins-Hurlburt, Circ. Res. 70 (1992), 546–553). Deshalb werden andere oder zusätzliche Mechanismen wie diejenigen, die für Angiogenese in ischämischen Territorien beschrieben sind, benötigt, um das kollaterale Arterienwachstum zu erklären. Von früheren Studien ist bekannt, dass diese kollateralen Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen auswachsen (Schaper, J. Collateral Circulation – Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993). Während Mittel wie VEGF und andere Wachstumsfaktoren gegenwärtig verwendet werden, um die Entwicklung von Angiogenese nach arteriellem Verschluss zu stimulieren, werden solche Mittel jedoch nicht so gesehen, als seien sie in der Lage, das Wachstum von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen in echte kollaterale Arterien zu modulieren.

[0004] Somit ist das technische Problem der vorliegenden Erfindung, Arzneimittel und Verfahren zur Modulierung von Neovaskularisierung und/oder des Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen bereitzustellen.

[0005] Die Lösung dieses technischen Problems wird erreicht, indem die Ausführungsformen bereitgestellt werden, die in den Ansprüchen charakterisiert sind.

[0006] Demgemäß betrifft die Erfindung ein in vitro-Verfahren zum Verstärken des Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen, umfassend das Inkontaktingen von Organen, Gewebe oder Zellen mit einem Kolonie-stimulierenden Faktor (CSF).

[0007] Der Begriff "Neovaskularisierung" im Rahmen der Bedeutung der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf einen Übersichtsartikel von Sasayama, *Circulation Res.* 85 (1992), 1197–1204.

[0008] Für den Zweck der vorliegenden Erfindung wird das Wachstum von Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen auch "Arteriogenese" genannt. Insbesondere ist "Arteriogenese" das in situ-Wachstum von Arterien durch Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen, die ischämische Gewebe, einen Tumor oder entzündete Stellen mit Blut versorgen. Diese Gefäße wachsen weitgehend außerhalb des betroffenen Gewebes, sind jedoch viel wichtiger für die Bereitstellung von Nährstoffen für das ischämische Territorium, den Tumor oder den Entzündungsort als Kapillaren, die durch angiogenetische Prozesse in das erkrankte Gewebe sprießen.

[0009] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich "Kolonie-stimulierender Faktor (CSF)" auf Proteine und Peptide, die auf Makrophagen wirken können und die in der Lage sind, kollaterales Arterienwachstum durch direkte Aktivierung, Proliferation und/oder Potenzierung der Wirkfunktionen ansässiger und neu rekrutierter Makrophagen zu verstärken. So können gemäß der vorliegenden Erfindung jeder beliebige CSF oder andere Substanzen, die mit einem CSF funktionell äquivalent sind, das heißt, in der Lage sind, kollaterales Arterienwachstum zu verstärken, für den Zweck der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Wirkung des CSF, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, muss nicht auf die vorstehend beschriebene Spezifität beschränkt sein, sondern sie kann auch auf zum Beispiel eosinophile Zellen, Lymphocyten-Subpopulationen und/oder Stammzellen wirken. Vorteilhafterweise ist das CSF antiatherogen.

[0010] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass der lokal verabreichte Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) eine signifikante Zunahme des kollateralen Arterienwachstums verursachte. Diese Ergebnisse begründeten sich auf einem bemerkenswerten Anstieg kollateraler Leitfähigkeits-Messungen. Periphere Drücke und kollaterale Flussrate wurden bei maximaler Erweiterung der Blutgefäße gemessen, wobei Statham-Druckumwandler, fluoreszierende Mikrosphären und FACS-Analyse verwendet wurden, was die Berechnung der kollateralen Leitfähigkeiten aus Druck-Flussrate-Beziehungen erlaubte. Darüberhinaus machten post mortem-Angiogramme eine signifikant höhere Anzahl kollateraler Arterien im Vergleich mit unbehandelten Tieren deutlich. Nach bestem Wissen und Gewissen der Erfinder ist dieses der allererste Bericht darüber, dass antiatherogene und großflächig klinisch etablierte Koloniestimulierende Faktoren in der Lage sind, Neovaskularisierung und/oder kollaterales Arterienwachstum und/oder das Wachstum anderer Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen in vivo signifikant zu verstärken. Infolgedessen sind CSFs, die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, besonders für die Behandlung von Arteriosklerose geeignet.

[0011] Experimente, die im Rahmen des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, zeigen, dass die lokale Infusion von GM-CSF sowohl die kollaterale als auch die periphere Leitfähigkeit nach femoralem Arterienverschluss durch seine proliferativen Auswirkungen auf Makrophagen aufgrund von verstärktem Gefäßwachstum erhöht. Somit können CSFs oder Nucleinsäuremoleküle, die CSFs codieren, für die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen verwendet werden, was wiederum zu Neovaskularisierung und/oder dem Wachstum von kollateralen Arterien, wie auch zu Wachstum von Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen führt, was für die Heilung einiger Verschluss-Erkrankungen erforderlich ist. Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) gehören zu einer Familie von glycoproteinartigen Wachstumsfaktoren, die für das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen erforderlich sind. Deshalb wurde diese Substanz klinisch verwendet, um Patienten mit hämatologischen und onkologischen Störungen zu behandeln. Man glaubte, dass die Wirkung dieser CSF-Moleküle auf die Zellen hämatopoietischen Ursprungs beschränkt ist (Demetri, *Semin. Oncol.* 19 (1992), 362–385; Lieschke, *N. Engl. J. Med.* 327(1992), 28–35/Comments 99–106). Darüberhinaus haben einige Studien gezeigt, dass diese Kolonie-stimulierenden Faktoren auch im Lipid-Metabolismus eine bedeutende Rolle haben.

[0012] Obwohl kürzliche Experimente gezeigt haben, dass GM-CSF in der Lage ist, eine Reihe von Makrophagen- und Granulocyten-Effektor-Funktionen direkt zu verstärken, einschließlich Zell-Überleben (Selgas, *Kidney International* 50 (1996), 2070–2078; Lopez, *J. Clin. Invest.* 78 (1986), 1220–1228; Fischen, *J. Immunol. Meth.* 147 (1991), 3408–3412; Vincent, *Exp. Hematol.* 20 (1992), 17–23; Mangan, *J. Immunol.* 147 (1991), 3408–3412), Aktivierung, Proliferation (Hoedemakers, *Hepatology* 13 (1994), 666–674; Matsushime, *Japanese*

se Journal of Clinical Hematology 36 (1995), 406–409), Differenzierung (Munn, Cancer Immunology, Immunotherapy 41 (1995), 46–52) und Migration von lokalen Gewebe-Makrophagen (Bussolini, Nature 337 (1989), 471–473), war es nicht bekannt, dass GM-CSF oder andere Koloniestimulierende Faktoren bei der Entwicklung kollateraler Arterien und bei der Arteriogenese eine Rolle spielen.

[0013] Die CSFs, die in den Verfahren und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können aus verschiedenen Quellen erhalten werden, die im Stand der Technik beschrieben sind; vgl. z. B. Gartner, Bioconjugate Chemistry 3 (1992), 262–268; Dexter, European Journal of Cancer 30A (1994), 15-9; Rohde, Developments in Biological Standardization 83 (1994), 121–127; Lu, Protein Expression & Purification 4 (1993), 465–472; Itoh, Tanpakushitsu Kakusan Koso – Protein, Nucleic Acid, Enzyme 35, 2620–2631. Es existiert das Potenzial zur Herstellung verschiedener Derivate von Kolonie-stimulierendem Faktor (CSF), die einen funktionellen Teil davon umfassen, oder von Proteinen, die funktionell mit CSFs äquivalent sind, wie vorstehend beschrieben, indem rekombinante DNA-Technologie verwendet wird. In diesem Zusammenhang, wie in dieser Spezifikation verwendet, bedeutet "funktionell äquivalent" oder "funktioneller Teil" eines CSF, ein Protein, das einen Teil der oder die vollständige primäre(n) strukturelle(n) Konformation eines CSF enthält, die mindestens die biologische Eigenschaft besitzt, mindestens eine der vorstehend erwähnten Makrophagen- oder Granulocyten-Effektor-Funktionen zu verstärken. Der funktionelle Teil dieses Proteins oder das funktionell äquivalente Protein kann ein Derivat eines CSF sein, das durch Aminosäure-Deletion(en), -Substitution(en), -Insertion(en), -Addition(en) und/oder -Austausch(e) der Aminosäure-Sequenz, zum Beispiel mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese der zugrunde liegenden DNA, erhalten wird. Rekombinante DNA-Technologie ist dem Fachmann gut bekannt und zum Beispiel in Sambrook et al. (Molecular cloning; A Laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)) beschrieben. Modifizierte CSFs sind zum Beispiel in Yamasaki, Journal of Biochemistry 115 (1994), 814–819 beschrieben.

[0014] CSFs oder funktionelle Teile davon oder Proteine, die funktionell äquivalent zu CSFs sind, können anhand bekannter konventioneller chemischer Synthesen oder mit Hilfe rekombinanter Verfahren hergestellt werden, die die Aminosäure- und DNA-Sequenzen verwenden, die im Stand der Technik beschrieben sind; vgl. z. B. EP-A-0 177 568; Han, Source Gene 175 (1996), 101–104; Kothari, Blood Cells, Molecules & Diseases 21 (1995), 192–200; Holloway, European Journal of Cancer 30A (1994), 2–6. CSFs können zum Beispiel durch Züchten einer geeigneten Zelle oder Zelllinie hergestellt werden, die mit einer DNA-Sequenz transformiert wurde, die einen CSF oder einen funktionellen Teil davon oder ein Protein, das funktionell zu CSF äquivalent ist codiert, wobei die DNA-Sequenz unter der Kontrolle regulatorischer Sequenzen exprimiert wird. Geeignete Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen sind z. B. in Sambrook vorstehend beschrieben. Verfahren unter Verwendung von chemischen synthetischen Mitteln zur Herstellung von CSFs und von Proteinen, wie vorstehend beschrieben, die für die Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung zweckmäßig sind, sind dem Fachmann ebenfalls bekannt.

[0015] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Granulocyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF), Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF), funktionell äquivalenten Stoffen und funktionellen Derivaten davon für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Verstärken des kollateralen Wachstums von kollateralen Arterien und/oder anderen Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen.

[0016] Das Arzneimittel umfasst mindestens einen CSF, wie vorstehend definiert, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipienten. Beispiele für geeignete pharmazeutische Träger sind im Stand der Technik gut bekannt und beinhalten Phosphat gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen wie Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Benetzungsmitteln, sterile Lösungen etc. Zusammensetzungen, die solche Träger umfassen, können durch herkömmliche Verfahren formuliert werden. Die Arzneimittel können dem Patienten in einer geeigneten Dosierung verabreicht werden. Die Dosis-Verordnung kann durch den behandelnden Arzt bestimmt werden, indem dieser den Zustand des Patienten, die Schwere der Erkrankung und andere klinische Faktoren berücksichtigt. Die Verabreichung der geeigneten Zusammensetzungen kann auf unterschiedliche Arten durchgeführt werden, z. B. durch intravenöse, intraperitoneale, subkutane, intramuskuläre, topische oder intradermale Verabreichung. Die Dosis-Verordnung wird durch den behandelnden Arzt und andere klinische Faktoren bestimmt. Wie es im medizinischen Stand der Technik gut bekannt ist, hängen die Dosierungen für jeden einzelnen Patienten von zahlreichen Faktoren ab, einschließlich der Größe des Patienten, der Körperoberfläche, dem Alter, der jeweiligen zu verabreichenden Verbindung, dem Geschlecht, der Zeit und der Verabreichungsart, dem allgemeinen Gesundheitszustand und von anderen Arzneistoffen, die gleichzeitig verabreicht werden. Im Allgemeinen sollte die Verordnung als eine reguläre Verabreichung des Arzneimittels im Bereich von 1 µg bis 10 mg Einheiten pro Tag liegen. Falls es sich bei der

Verordnung um eine fortlaufende Infusion handelt, sollte diese ebenfalls im Bereich von 1 µg bis 10 mg Einheiten pro kg Körpergewicht pro Minute betragen. Ein Fortschritt kann durch periodische Beurteilung kontrolliert werden. Die Dosierungen werden variieren. Eine mögliche Dosis für die intravenöse Verabreichung von DNA liegt jedoch im Bereich von ungefähr 10^6 bis 10^{12} Kopien des DNA-Moleküls. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können lokal oder systemisch verabreicht werden. Die Verabreichung wird im Allgemeinen parenteral erfolgen, z. B. intravenös; DNA kann auch direkt an die Zielstelle verabreicht werden, z. B. durch biologische Verabreichung an eine interne oder externe Zielstelle oder mit Hilfe eines Katheters an eine Stelle in einer Arterie.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der CSF, der für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF), Granulocyten-Koloniestimulierendem Faktor (G-CSF), Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (M-CSF), Kolonie-stimulierendem Faktor I (CSF-I), funktionell äquivalenten Stoffen oder funktionellen Derivaten davon.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Verwendungen für Erkrankungen verwendet werden, die durch eine vaskuläre Erkrankung oder einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall verursacht werden, oder für irgendeine Erkrankung, bei der eine Zunahme der Blutzufuhr mit Hilfe von Kollateralen, Arterien etc. benötigt wird.

[0019] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Verwendungen derart entworfen, dass sie bei einem Patienten angewendet werden können, der an Arteriosklerose, einer koronaren Arterienerkrankung, einer cerebralen Verschlusserkrankung, einer peripheren Verschlusserkrankung, einer visceralen Verschlusserkrankung, einer Nieren-Arterienerkrankung, einer mesenterialen arteriellen Insuffizienz oder einem ophthalmischen oder retinalen Verschluss leidet oder für irgendeine Erkrankung, bei der atherosklerotische Plaques in der Gefäßwand zu einer Verstopfung des Gefäßdurchmessers führen.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Verwendungen so entworfen, dass sie bei einem Patienten angewendet werden, während oder nachdem dieser einem Stoff oder einer Bestrahlung oder chirurgischen Behandlung ausgesetzt wird oder wurde, wobei Arterien beschädigt oder zerstört werden.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der CSF, der für die erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen verwendet wird, ein rekombinanter CSF. DNA-Sequenzen, die CSFs codieren, die in den erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen verwendet werden können, sind im Stand der Technik beschrieben; vgl. z. B. Holloway, European Journal of Cancer 30A (1994), 2–6 oder die Referenzen, auf die vorstehend Bezug genommen wurde. Darüberhinaus sind DNA- und Aminosäuresequenzen der CSFs in der Gene Bank-Datenbank erhältlich. Wie vorstehend beschrieben, sind Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine dem Fachmann gut bekannt; vgl. z. B. Sambrook, vorstehend.

[0022] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Verwendung derart entworfen, dass er/sie gemeinsam mit einem Wachstumsfaktor, vorzugsweise Fibroblasten-Wachstumsfaktor oder vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) verwendet werden kann. Diese Ausführungsform ist für die Verstärkung von sowohl dem Sprießen von Kapillaren (Angiogenese) als auch für die in situ-Vergrößerung von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen in echte kollaterale Arterien geeignet. Arzneimittel, die zum Beispiel CSF wie GM-CSF und einen Wachstumsfaktor wie VEGF umfassen, können für die Behandlung von peripheren vaskulären Erkrankungen oder der koronaren Arterienerkrankung verwendet werden.

[0023] Das in vitro-Verfahren kann umfassen

- (a) Erhalten von Zellen, Gewebe oder einem Organ von einem Individuum;
- (b) Einbringen eines Nucleinsäuremoleküls in die Zellen, das Gewebe oder Organ, wobei das Nucleinsäuremolekül den CSF codiert und in vivo exprimieren kann; und
- (c) Wiedereinbringen der Zellen, des Gewebes oder Organs, die/das in Schritt (b) erhalten wurde(n), zum Wiedereinbringen in dasselbe Individuum oder ein unterschiedliches Individuum.

[0024] Es ist vorgesehen, dass durch die vorliegende Erfindung die CSFs entweder alleine oder in Kombination verabreicht werden und gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipienten. Diese Nucleinsäuremoleküle können stabil in das Genom der Zelle integriert sein oder können in einer extrachromosomalen Form erhalten werden, vgl. z. B. Calos, Trends Genet. 12 (1996), 463–466. Ande-

rerseits können virale Vektoren verwendet werden, die im Stand der Technik beschrieben sind, um bestimmte Zellen, Gewebe oder Organe zu transfizieren.

[0025] Darüberhinaus ist es möglich, ein Arzneimittel für eine Gentherapie zu verwenden, das ein Nucleinsäuremolekül umfasst, das einen CSF codiert. Geeignete Gen-Verabreichungssysteme können unter anderem Liposomen, Rezeptor vermittelte Verabreichungssysteme, nackte DNA und virale Vektoren wie Herpes-Viren, Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren beinhalten. Die Verabreichung von Nucleinsäuremolekülen an eine spezifische Stelle im Körper zur Gentherapie kann auch erhalten werden, indem ein biologisches Verabreichungssystem verwendet wird, wie das, das von Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726–2729) beschrieben wurde.

[0026] Standard-Verfahren, um Zellen mit Nucleinsäuremolekülen zu transfizieren, sind den Fachleuten auf dem Fachgebiet der Molekularbiologie gut bekannt, vgl. z. B. WO 94/29469. Gentherapie, um die Entwicklung von Erkrankungen zu verhindern oder zu erniedrigen, die hierin beschrieben sind, können durchgeführt werden, indem das Nucleinsäuremolekül, das einen CSF codiert, einem Patienten direkt verabreicht wird oder indem Zellen mit diesem Nucleinsäuremolekül ex vivo transfiziert werden und die transfizierten Zellen in den Patienten infundiert werden. Darüberhinaus ist Forschung, die den Gentransfer in Zellen der Keimbahn betrifft, eines der am schnellsten wachsenden Gebiete in der Reproduktionsbiologie. Gentherapie, die auf dem Einbringen therapeutischer Gene in Zellen durch ex vivo- oder in vivo-Verfahren beruht, ist eine der wichtigsten Verwendungen des Gentransfers. Geeignete Vektoren und Verfahren für die in vitro- oder in vivo-Gentherapie sind in der Literatur beschrieben und den Fachleuten bekannt; vgl. z. B. Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 634–639; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911–919; Anderson, Science 256 (1992), 808–813; Isner, Lancet 348 (1996), 370–374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077–1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714–716; WO94/29469; WO 97/00957 oder Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635–640, und Referenzen, auf die darin Bezug genommen wird. Die Nucleinsäuremoleküle, die in den Arzneimitteln umfasst sind, können zum direkten Einbringen in die Zelle entworfen sein oder zum Einbringen mit Hilfe von Liposomen oder viralen Vektoren (z. B. adenoviral, retroviral), die dieses Nucleinsäuremolekül enthalten. Vorzugsweise ist diese Zelle eine Keimbahnzelle, embryonale Zelle oder Eizelle oder stammt davon ab.

[0027] Es soll so verstanden werden, dass die eingebrachten Nucleinsäuremoleküle, die CSF codieren, diesen CSF nach Einbringen in diese Zelle exprimieren und vorzugsweise während der Lebensdauer dieser Zelle in diesem Stadium verbleiben. Zelllinien, die zum Beispiel diesen CSF stabil exprimieren, können gemäß den Verfahren, die den Fachleuten gut bekannt sind, gentechnisch verändert werden. Eher als Expressionsvektoren zu verwenden, die virale Replikationsursprünge enthalten, können die Wirtszellen mit dem erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekül oder -Vektor und einem selektierbaren Marker, entweder im gleichen oder in verschiedenen Vektoren, transformiert werden. Nachfolgend dem Einbringen der fremden DNA kann den gentechnisch veränderten Zellen erlaubt werden, ein bis zwei Tage lang in einem angereicherten Medium zu wachsen und dann werden sie in ein selektives Medium überführt. Der selektierbare Marker in dem rekombinanten Plasmid verleiht Resistenz für die Selektion und ermöglicht die Selektion von Zellen, die das Plasmid stabil in ihre Chromosomen integriert haben und wachsen, um Herde (Foci) zu bilden, die wiederum cloniert und in Zelllinien ausgeweitet werden können. Dieses Verfahren kann in vorteilhafter Weise verwendet werden, um Zelllinien gentechnisch zu verändern, die einen CSF exprimieren. Solche Zellen können auch in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln, Verfahren und Verwendungen verabreicht werden.

[0028] Eine Reihe von Selektionssystemen kann verwendet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf die Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase (Wigler, Cell 11 (1977), 223), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026) und Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (Lowy, Cell 22 (1980), 817) in tk⁻, hgprt⁻ bzw. aprt⁻-Zellen. Es kann auch Antimetaboliten-Resistenz als Grundlage für die Selektion auf dhfr, das Resistenz gegen Methotrexat verleiht (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527), gpt, das Resistenz gegen Mycophenolsäure verleiht (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, das Resistenz gegen das Aminoglycosid G-418 verleiht (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1); hygro, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht (Santerre, Gene 30 (1984), 147; oder Puromycin (pat, Puromycin N-acetyltransferase) verwendet werden. Weitere selektierbare Gene sind beschrieben worden, zum Beispiel trpB, das Zellen erlaubt, Indol anstelle von Tryptophan zu verwenden; hisD, das Zellen erlaubt, Histinol anstelle von Histidin zu verwenden (Hartmann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); und ODC (Ornithin-Decarboxylase), das Resistenz gegen den Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor verleiht, 2-(Difluormethyl)-DL-ornithin, DEMO (McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.).

[0029] Somit wird in einer bevorzugten Ausführungsform das Nucleinsäuremolekül, das in dem oben genann-

ten Arzneimittel umfasst ist, für die Expression des CSF von Zellen in vivo durch zum Beispiel direktes Einbringen dieses Nucleinsäuremoleküls oder durch Einbringen eines Plasmids, eines Plasmids in Liposomen oder eines viralen Vektors (z. B. adenoviral, retroviral), das/der dieses Nucleinsäuremolekül enthält, entworfen.

[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform des/der erfindungsgemäßen Verfahrens und Verwendungen ist das CSF-Derivat oder die funktionell äquivalente Substanz ein Antikörper, ein (Poly)Peptid, eine Nucleinsäure, eine kleine organische Verbindung, ein Ligand, ein Hormon, PNA oder ein Peptidomimeticum.

[0031] In diesem Zusammenhang ist es selbstverständlich, dass die CSFs, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden sollen, zum Beispiel durch herkömmliche Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, modifiziert sein können. Es ist zum Beispiel möglich, Fragmente zu verwenden, die die biologische Aktivität von CSFs, wie vorstehend beschrieben, erhalten und zwar die Fähigkeit, kollaterales Arterienwachstum zu verstärken. Dies erlaubt weiter die Erzeugung von chimären Proteinen und Peptiden, in denen andere funktionelle Aminosäuresequenzen entweder durch z. B. chemische Mittel physikalisch an den CSF gekoppelt sein können oder durch rekombinante DNA-Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, fusioniert sein können. Darüberhinaus können Faltungs-Simulationen und Computer-Neugestaltung struktureller Motive der CSFs oder ihrer Rezeptoren unter Verwendung von geeigneten Computerprogrammen durchgeführt werden (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286–299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675–679). Die Computer-Modellierung der Proteinfaltung kann für die konformative und energetische Analyse ausführlicher Rezeptor- und Proteinmodelle verwendet werden (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995–1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37–45). Insbesondere können die geeigneten Programme verwendet werden, um die interaktiven Stellen des CSF und seines Rezeptors durch Computerassistiertes Suchen nach komplementären Peptidsequenzen zu identifizieren (Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114–120). Darüberhinaus sind geeignete Computersysteme für das Entwerfen von Proteinen und Peptiden im Stand der Technik beschrieben, zum Beispiel in Berry, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033–1036; Wodak, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1–13; Pabo, *Biochemistry* 25 (1986), 5987–5991. Die Ergebnisse, die aus den vorstehend beschriebenen Computeranalysen erhalten werden, können zum Beispiel für die Herstellung von Peptidomimetika der CSFs oder von Fragmenten davon verwendet werden. Solche Pseudopeptid-Analoga der natürlichen Aminosäuresequenz des Proteins können das parentale Protein oder Peptid sehr effizient nachahmen (Benkirane, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 33218–33224). Die Aufnahme von zum Beispiel leicht erhältlichen achiralen Ω -Aminosäureresten in ein CSF-Protein oder ein Fragment davon resultiert in der Substitution der Amidbindungen durch Polymethylen-Einheiten einer aliphatischen Kette, wobei eine zweckmäßige Strategie zur Erzeugung eines Peptidomimetinums bereitgestellt wird (Banerjee, *Biopolymers* 39 (1996), 769–777). Superaktive Peptidomimetin-Analoga von kleinen Peptidhormonen für andere Systeme sind im Stand der Technik beschrieben (Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996), 327–331). Geeignete Peptidomimetika von CSF können auch durch die Synthese von kombinatorischen Peptidomimetikum Bibliotheken anhand von sukzessiver Amid-Alkylierung und Testen der resultierenden Verbindungen identifiziert werden, z. B. gemäß den Verfahren, die im Stand der Technik beschrieben sind. Verfahren zur Erzeugung und Verwendung von kombinatorischen Peptidomimetikum Bibliotheken sind im Stand der Technik beschrieben, zum Beispiel in Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220–234 und Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709–715. Darüberhinaus können Antikörper oder Fragmente davon verwendet werden, die z. B. nach Bindung an einen CSF-Rezeptor die biologische Aktivität eines CSF nachahmen.

[0032] Darüberhinaus kann eine dreidimensionale und/oder kristallographische Struktur des CSF oder seines Rezeptors zum Entwerfen von Peptidomimetikum-Inhibitoren der biologischen Aktivität eines CSF verwendet werden (Rose, *Biochemistry* 35 (1996), 12933–12944; Rutenber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545–1558).

[0033] Wie vorstehend diskutiert, ist die Neovaskularisierung und das Wachstum von Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen für die Bereitstellung von Nährstoffen für Tumore notwendig. Somit kann Suppression und/oder Hemmung von Tumorwachstum erwartet werden, falls das Wachstum dieser Gefäße zu dem Tumor supprimiert werden würde.

[0034] Tumor-Makrophagen benötigen spezifische Wachstumsfaktoren, z. B. M-CSF/CSF-1, für ihre Proliferation durch die G1-Phase des Zellzyklus. Sobald Zellen in die S-Phase eingetreten sind, vervollständigen Makrophagen die Mitose in Abwesenheit von M-CSF/CSF-1. Während der G1-Phase wird Cyclin D (ein Zellzyklus-Regulator, der zusammen mit Cyclin-abhängiger Kinase (cdk4) das Eintreten der Zelle in die M-Phase fördert (Alberts, *Biology of the Cell* (1989), Zweite Ausgabe)) durch M-CSF/CSF-1-Stimulation induziert. Die enzymatische Aktivität von Cyclin D konnte durch vor kurzem berichtete inhibitorische Proteine negativ reguliert werden, um den Zeitpunkt des Eintretens in die S-Phase in Makrophagen zu bestimmen (Matsushime, *Japanese Journal of Clinical Hematology* 36 (1995), 406–409).

[0035] Es konnte gezeigt werden, dass unter CSF-abhängigen Makrophagen besonders Monocyten sowie Gewebe-spezifische Makrophagen (im weiblichen Fortpflanzungstrakt) für ihre weitere Differenzierung von CSF-1 abhängig zu sein scheinen (Maito, *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997), 85–91). Darüberhinaus sind GM-CSF/M-CSF für das Makrophagen-Überleben notwendig. Da in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung gezeigt werden konnte, dass CSFs Neovaskularisierung und kollaterales Arterienwachstum verstärken, sollte der Entzug dieser Faktoren in Hemmung oder Verminderung von Neovaskularisierung und/oder kollateralem Arterienwachstum resultieren und somit in der Suppression von Tumorwachstum. Mittel, die Neovaskularisierung und/oder das Wachstum kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen supprimieren, können Peptide, Proteine, Nucleinsäuren, Antikörper, kleine organische Verbindungen, Hormone, neurale Transmitter, Peptidomimetika oder PNAs sein (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879–880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237–245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193–198). Für die Herstellung und Verwendung solcher Verbindungen kann ein Fachmann die im Stand der Technik bekannten Verfahren verwenden, zum Beispiel diejenigen, auf die vorstehend Bezug genommen wurde.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform hemmt das Mittel, das in den erfindungsgemäßen Verfahren und Zwecken verwendet wird, wie vorstehend beschrieben, die biologische Aktivität eines CSF und/oder hemmt ein intrazelluläres Signal oder eine Signalkaskade, die MAPK und/oder JNK/SAPK umfasst und in Makrophagen durch den Rezeptor für CSF ausgelöst werden. Verschiedene Rezeptoren für CSFs sind im Stand der Technik beschrieben, zum Beispiel in *Chemokine Receptors. Immunology Today* (1996), Erg. S: 26–27; Bendel, *Leukemia & Lymphoma* 25 (1997), 257–270; Perentesis, *Leukemia & Lymphoma* 25 (1997), 247–256; Bishay, *Scandinavian Journal of Immunology* 43 (1996), 531–536; Kluck, *Annals of Hematology* 66 (1993), 15–20; Raivich, *Journal of Neuroscience Research* 30 (1991), 682–686 oder in Wong, *Cellular Immunology* 123 (1989), 445–455.

[0037] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist dieser Rezeptor ein CSF-Rezeptor. Dieser Rezeptor oder spezifische Domänen davon, die für das Auslösen eines Signals verantwortlich sind, das zu kollateralem Arterienwachstum führt, können durch die hierin beschriebenen Verfahren blockiert oder moduliert werden.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Mittel, das für die erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen verwendet wird, ein Antikörper, ein (Poly)peptid, eine Nucleinsäure, eine kleine organische Verbindung, ein Ligand, ein Hormon, eine PNA oder ein Peptidomimetikum.

[0039] Nucleinsäuremoleküle, die spezifisch mit CSF codierenden Genen und/oder deren regulatorischen Sequenzen hybridisieren, können für die Repression der Expression dieses Gens verwendet werden, zum Beispiel aufgrund einer Antisinn- oder Dreifach-Helix-Wirkung, oder sie können für die Erzeugung geeigneter Ribozyme verwendet werden (vgl. z. B. EP-B1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257), die spezifisch die (prä)-mRNA eines Gens spalten, das einen CSF codiert. Die Nucleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen, die CSFs codieren, sind im Stand der Technik bekannt und zum Beispiel beschrieben in Han, *Source Gene* 175 (1996), 101–104; Kothari, *Blood Cells, Molecules & Diseases* 21 (1995), 192–200 oder in Holloway, *European Journal of Cancer* 30A (1994), 2–6. Die Auswahl geeigneter Zielstellen und entsprechender Ribozyme kann durchgeführt werden, wie zum Beispiel beschrieben in Steinecke, *Ribozymes, Methods in Cell Biology* 50, Galbraith et al., Hrsg., Academic Press, Inc. (1995), 449–460.

[0040] Nucleinsäuren umfassen DNA oder RNA oder Hybride davon. Darüberhinaus kann diese Nucleinsäure zum Beispiel Thioester-Bindungen und/oder Nucleotid-Analoga enthalten, die im Allgemeinen für Oligonucleotid-Antisinn-Verfahren verwendet werden. Diese Modifikationen können zur Stabilisierung des Nucleinsäuremoleküls gegen Endo- und/oder Exonucleasen in der Zelle zweckmäßig sein. Darüberhinaus kann die sogenannte "Peptid-Nucleinsäure" (PNA)-Technik für die Hemmung der Expression eines Gens, das CSF codiert, verwendet werden. Die Bindung von PNAs an komplementäre sowie verschiedene einzelsträngige RNA- und DNA-Nucleinsäuremoleküle kann zum Beispiel systematisch untersucht werden, indem z. B. thermale Denaturierung und BIACore-Oberflächen-Interaktions-Verfahren (Jensen, *Biochemistry* 36 (1997), 5072–5077) verwendet werden. Die Synthese von PNAs kann entsprechend den Verfahren durchgeführt werden, die im Stand der Technik bekannt sind, zum Beispiel wie beschrieben in Koch, *J. Pept. Res.* 49 (1997), 80–88; Finn, *Nucleic Acids Research* 24 (1996), 3357–3363. Darüberhinaus können Faltungs-Simulationen und Neugestaltung struktureller Motive der CSFs und ihrer Rezeptoren mit Hilfe des Computers, wie vorstehend beschrieben, durchgeführt werden, um Arzneistoffe zu entwerfen, die in der Lage sind, die biologische Aktivität von CSFs zu hemmen.

[0041] Darüberhinaus können Antikörper verwendet werden, die CSF oder deren Rezeptoren oder Teile, d.

h. spezifische Fragmente oder Epitope, solcher CSFs und Rezeptoren spezifisch erkennen, wobei der CSF oder der CSF-Rezeptor inaktiviert wird. Diese Antikörper können monoclonale Antikörper, polyclonale Antikörper oder synthetische Antikörper sein, sowie Fragmente von Antikörpern wie Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente, etc.. Antikörper oder Fragmente davon können erhalten werden, indem Verfahren verwendet werden, die z. B. in Harlow und Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 oder EP-B1 0 451 216 und in Referenzen, auf die darin Bezug genommen wird, beschrieben sind. Es kann zum Beispiel Oberflächen-Plasmonresonanz verwendet werden, wie sie in dem BIAcore-System eingesetzt wird, um die Wirksamkeit von Phagen-Antikörpern zu erhöhen, die an ein Epitop des CSF oder seines Rezeptors binden (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97–105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7–13).

[0042] Mutmaßliche Inhibitoren, die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, einschließlich Peptide, Proteine, Nucleinsäuren, Antikörper, kleine organische Verbindungen, Liganden, Hormone, Peptidomimetika, PNAs und ähnliche, die in der Lage sind, die biologische Aktivität eines CSF oder seines Rezeptors zu hemmen, können entsprechend den Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, identifiziert werden, zum Beispiel wie in EP-A-0 403 506 oder in den anhängenden Beispielen beschrieben.

[0043] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Substanz, die die Interaktion des CSF und seines Rezeptors blockiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

- (i) einem anti-CSF-Antikörper und einem anti-CSF-Rezeptor-Antikörper; und/oder
- (ii) einer nichtstimulatorischen Form eines CSF-Proteins und einer löslichen Form eines CSF-Rezeptors.

[0044] Solche Antikörper sowie inaktive und lösliche Formen von CSFs bzw. deren Rezeptoren sind beschrieben in z. B. Kogut, Inflammation 21 (1997) oder in Shimamura, Journal of Histochemistry & Cytochemistry 38 (1990), 283–286 und können entsprechend den Verfahren erhalten werden, die im Stand der Technik bekannt sind; vgl. z. B. vorstehend.

[0045] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Arzneimittel für die erfindungsgemäße Verwendung zur Verabreichung mit Hilfe eines Katheters auf intra arteriellen, intravenösen, intraperitonealen oder subkutanen Wegen entworfen. In den Beispielen der vorliegenden Erfindung wurde das CSF-Protein lokal mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe verabreicht.

[0046] Diese und andere Ausführungsformen sind offenbart oder sind offensichtlich von und umfasst von der Beschreibung und den Beispielen der vorliegenden Erfindung. Weitere Literatur, die irgendwelche Verfahren, Verwendungen und Verbindungen betreffen, die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können aus öffentlichen Bibliotheken erhalten werden, wobei zum Beispiel elektronische Hilfsmittel verwendet werden. Die öffentliche Datenbank "Medline", die im Internet z. B. unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html> erhältlich ist, kann zum Beispiel verwendet werden. Weitere Datenbanken und Adressen wie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/> sind dem Fachmann bekannt und können auch erhalten werden, indem z. B. <http://www.lycos.com> verwendet wird. Ein Überblick über Patent-Information in der Biotechnologie und eine Erfassung relevanter Quellen zur Patent-Information, die für eine rückschauende Suche und für die gegenwärtigen Erkenntnisstand verwendbar sind, werden in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352–364 bereitgestellt.

[0047] Die erfindungsgemäßen Verwendungen und Verfahren können zur Behandlung aller Arten von Krankheiten verwendet werden, von denen bisher nicht bekannt war, dass sie mit der Modulation der Neovaskularisierung und/oder dem Wachstum kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriellen Verbindungen in Bezug stehen oder davon abhängig sind. Die erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen können erstrebenswerterweise in Menschen verwendet werden, obwohl die Behandlung von Tieren ebenfalls durch die hierin beschriebenen Verfahren und Verwendungen umfasst ist.

Die Figuren zeigen

[0048] **Fig. 1:** Angiographie des gesamten rechten Beines eines Tieres, das mit GM-CSF behandelt wurde.

[0049] **Fig. 2:** Angiographie des gesamten rechten Beines (A) und des kollateralen Kreislaufs (B) (ohne Os femoris) eines Tieres, das mit GM-CSF behandelt wurde.

[0050] **Fig. 3:** Angiographie des kollateralen Kreislaufs (ohne Os femoris) eines Tieres, das mit GM-CSF be-

handelt wurde.

[0051] [Fig. 4](#): Angiographie des gesamten rechten Beines eines Tieres, das mit PBS behandelt wurde.

[0052] [Fig. 5](#): Angiographie der kollateralen Zirkulation (ohne Os femoris) eines Tieres, das mit PBS behandelt wurde.

[0053] Die Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

Beispiel 1: Femoraler Arterienverschluss von Tieren und lokale Verabreichung von Substanzen

[0054] Die vorliegende Studie wurde mit der Erlaubnis des Bundeslandes Hessen, Regierungspräsidium Darmstadt, gemäß Absatz 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Dieser stimmt überein mit dem Guide for the Care und Use of Laboratory Animals, veröffentlicht vom US National Institut of Health (NIH-Publikation Nr. 85-23, 1985 überarbeitet).

[0055] 6 Kaninchen wurden 7 Tage lang einem rechten femoralen Arterienverschluss unterzogen. Sie wurden zufällig ausgewählt, um entweder GM-CSF (Novartis, Nürnberg, Deutschland) (2ML-2, Alza Corp; 3 µg in 2 ml PBS in einer Rate von 10 µl/h) oder PBS lokal mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe zu erhalten. Für die anfängliche Implantation der osmotischen Minipumpen wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von Ketaminhydrochlorid (40 bis 80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 bis 9 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Zusätzliche Dosierungen Anästhetikum (10% bis 20% der anfänglichen Dosis) wurden bei Bedarf intravenös verabreicht. Das operative Verfahren wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die femoralen Arterien wurden freigelegt und mit einem sterilen Polyethylen-Katheter (innerer Durchmesser: 1 mm; äußerer Durchmesser: 1,5 mm) kannuliert, wobei dieser stromaufwärts zeigt und die Spitze des Katheters distal von der Verzweigung der Arteria circumflexa femoris positioniert wurde. Der Katheter selbst wurde mit der osmotischen Minipumpe (2ML-2, Alza Corp) verbunden, die unter die Haut des unteren rechten Abdomens implantiert wurde. Danach wurden die Tiere mit einem speziell entworfenen Körperanzug ausgestattet, der ihnen erlaubte sich frei zu bewegen, der sie aber an einer Selbstverstümmelung hinderte. Die Kaninchen waren einzeln untergebracht mit freiem Zugang zu Wasser und Futter, um ihre Mobilität sicherzustellen. Das Körpergewicht und die Körpertemperatur von Kaninchen, die mit GM-CSF behandelt worden waren, war nicht signifikant verschieden von dem von Kontrollratten. Serumwerte von Gesamtprotein, Albumin, Glutamin-oxalacetat-Transaminase und Glutamat-pyruvat-Transaminase waren durch die GM-CSF-Behandlung nicht signifikant verändert.

[0056] Sieben Tage nach Implantation wurden die Tiere erneut für eine Tracheostomie und künstliche Beatmung mit einer intramuskulären Injektion von Ketaminhydrochlorid und Xylazin anästhesiert. Die Anästhesie wurde mit Pentobarbital (12 mg/kg Körpergewicht pro Stunde) verstärkt. Die Halsschlagader wurde für die kontinuierliche Drucküberwachung kannuliert. Die Arteria saphena magna (anteriore tibiale Arterie in Menschen und die Hauptarterie, die in Kaninchen die hintere Extremität und den hinteren Fuß versorgt) wurde direkt oberhalb des Knöchels freigelegt und mit einem sterilen heparinisierten Polyethylen-Schlauch (innerer Durchmesser 0,58 mm; äußerer Durchmesser 0,96 mm) kannuliert. Dieser wurde mit einem Statham P23DC-Druckwandler (Statham, Spectramed) für die Messung der peripheren Drücke (PP) verbunden. Nach Heparinisierung mit 5.000 Einheiten Heparin wurde die linke femorale Arterie als die Microsphären-Referenzprobe freigelegt und mit einem sterilen Polyethylen-Katheter (innerer Durchmesser: 1 mm; äußerer Durchmesser: 1,5 mm) kannuliert. Nach Kannulierung der abdominalen Aorta wurde ein Nebenanschluss installiert, um den Strom von mit Sauerstoff angereichertem Blut aus der Halsschlagader über die Kanüle in die abdominale Aorta im rechten und linken Bein zu gewährleisten. Eine Strömungs-sonde wurde installiert, um den Gesamtdurchfluss in beide Hintergliedmaßen zu messen.

Beispiel 2: Ex vivo Druck-Flussrate-Beziehungen

[0057] Eine maximale Erweiterung der Blutgefäße wurde erhalten, wenn 20 mg Papaverin (Sigma) in einer Flussrate von 20 ml pro Minute in den Nebenanschluss injiziert wurden. Nach Stabilisation der peripheren und zentralen Drücke wurden beide Beine mittels vier unterschiedlicher Drücke künstlich durchblutet. Jeder Druck-Gradient wurde mit einem Bolus von Microsphären kombiniert.

[0058] Fünf verschiedene Perfusionsdrücke (30, 40, 50, 60, 80 mmHg) wurden in vivo mit einer Walzenpumpe erzeugt, die in dem vorstehend erwähnten Nebenanschluss zwischen der Halsschlagader und der abdominalen Aorta installiert worden war. Die peripheren Drücke und der kollaterale Blutfluss wurden unter maximaler Gefäßerweiterung (Papaverin) gemessen, wobei Statham-Druckumwandler verwendet wurden.

[0059] Für jeden Druckpegel wurden Microsphären mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzfarbe (entweder purpurrot, scharlachrot, blau-grün, rot oder blau) in die Mischkammer injiziert, die in dem Halsschlagader-abdominale Aorta-Nebenanschluss installiert worden war.

[0060] Die folgenden Muskeln des Beins wurden freigelegt: Quadrizeps, Adduktor longus, Adduktor magnus, Gastrocnemius, Soleus und peroneale Muskeln. Jeder Muskel wurde vom proximalen zum distalen Ende in drei aufeinanderfolgende Proben aufgeteilt. Der gesamte Muskel und danach jede Probe wurden gewogen und in kleine Stücke geschnitten. Die Muskelprobe wurde dann lose in (12 mm × 75 mm)-Polystyrol-Röhrchen gegeben (Becton Dickinson & Co, Lincoln Park, NJ) und 3 ml SDS-Lösung [SDS-Lösung (Boehringer Mannheim Corp.): 1% SDS (Boehringer Mannheim Corp.), 0,5% Natriumazid (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) und 0,8% Tween-80 (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) in 50 Millimolar Tris-Puffer, pH 8 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)], 30 µl Proteinase K-Lösung (Boehringer Mannheim Corp.) und 1 ml Microsphären als interner Standard wurden zugegeben (13,7 µm, Fluorescein-Kit, Flow Cytometry Standards, Corp. San Juan, P. R.). Jedes Röhrchen wurde verschlossen und 24 bis 48 Stunden lang in einem Schüttelwasserbad befestigt. Die Proben wurden dann nachfolgend 45 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und der Rückstand wurde in 1 ml PBS (pH 7,4) resuspendiert. Vor der FACS-Analyse wurden die Proben heftig geschüttelt. Die Microsphären wurden gezählt, wobei ein Durchflusscytometer (FACS-Calibur) verwendet wurde, das mit einem zweiten Laser und einem Detektor für eine vierte Fluoreszenz ausgestattet war. Die Flussraten für jede Probe wurden anhand der Anzahl der Microsphären in der Probe (m^s), der jeweiligen Microsphärenzahl in der Referenzprobe (m^{rs}), dem internen Standard in der Probe (ISs), dem internen Standard in der Referenzprobe (IS rs), dem Gewicht der Referenzprobe (W) und der Zeit, während welcher die Referenzprobe abgesetzt wurde, berechnet, wobei die nachfolgende Gleichung verwendet wurde.

$$\text{Flussrate [mg/ml]} = \frac{m \cdot IS^{rs}}{IS^s \cdot m^{rs}} \cdot \frac{w}{t}$$

m^s = Proben-Microsphäre
 IS^{rs} = interne Standard-Referenzprobe
 IS^s = interne Standardprobe
 m^{rs} = Microsphären-Referenzprobe
 w = Gewicht
 t = Zeit

[0061] In dem vorliegenden Modell stellen kollaterale Arterien, die sich nach femoralem Arterienverschluss mit typischer Korkenzieher-Formation entwickeln, Blut für die distale Adduktor-Region und die hinteren Gliedmaßen bereit. Der systemische Druck [SP] und der periphere Druck [PP] wurden gemessen. Der venöse Druck war gleich dem atmosphärischen Druck [AP] (Null im vorliegenden Fall). Da die arteriellen Widerstände viel niedriger sind als die kollateralen und peripheren Widerstände, können sie vernachlässigt werden. SP repräsentiert den Druck in der Stammregion der kollateralen Arterien. PP ist der Druck an der Wiedereintrittsregion und ist identisch mit der Druckhöhe der Zirkulation im Unterschenkel; AP, der Druck am venösen Ende der peripheren Zirkulation. Der kollaterale Blutfluss ist gleich der Summe des Blutflusses zu dem Gewebe des distalen Adduktors plus dem Blutfluss zu dem Gewebe des Unterschenkels. Der kollaterale Widerstand wurde definiert als Druckdifferenz zwischen SP und PP, geteilt durch den Blutfluss, der zu dem distalen Adduktor und dem Unterschenkel vorliegt. Periphere Resistenz wurde definiert als PP, geteilt durch den Blutfluss in den Unterschenkel, und die Masseleitfähigkeit wurde definiert als SP, geteilt durch den Masseblutfluss, der mit der Ultraschall-Strömungssonde aufgezeichnet wurde. Die reziproken Werte dieser Widerstände repräsentieren kollaterale, periphere und Masseleitfähigkeit. Da sogar bei maximaler Gefäßerweiterung eine positive Druck-Unterbrechung („pressure intercept“) beobachtet wird, wurden alle Leitfähigkeiten anhand der Steigung der Druck-Flussrate-Beziehungen berechnet. Die Ergebnisse sind beschrieben als Durchschnittswerte ± SD (Standard-Abweichung; standard deviation). Unterschiede bei den Ergebnissen wurden unter Verwendung des unpaarigen Student-t-Test für gruppenübergreifende Vergleiche und dem Mann-Whitney-Reihen-Summen-Test für ungleiche mittlere quadratische Abweichungen berechnet. Werte von $p \leq 0,05$ waren für die Annahme einer statistischen Signifikanz erforderlich.

[0062] Die kollaterale Leitfähigkeit war nach einer Woche Verschluss in mit GM-CSF behandelten Tieren verglichen mit Tieren ohne diese Behandlung signifikant höher.

Tabelle 1

Kollaterale Leitfähigkeit [ml/min/100 mmHg]

	GM-CSF	PBS	p
Durchschnitt	68,685	21,101	0,001

Beispiel 3: Post mortem-Angiographie

[0063] Die Beine wurden mit gepufferter physiologischer Krebs-Henseleit-Kochsalzlösung in einem auf 37°C angewärmten Wasserbad 1 Minute lang bei einem Druck von 80 mmHg perfundiert, gefolgt von einer Perfusion mit Kontrastmedium (8 bis 10 Minuten bei 80 mmHg) auf der Grundlage von Wismut und Gelatine gemäß einer Formel, die von Fulton entwickelt wurde (Fulton: The Coronary Arteries, Thomas Books, 1965). Nachfolgend ließ man das Kontrastmedium gelieren, indem die Extremitäten 45 Minuten lang auf zerkleinertes Eis gelegt wurden. Die Angiogramme wurden in zwei verschiedenen Winkeln mit einem Balteau Radiographie-Gerät (Machlett Laboratories) gemacht, wobei ein einfach beschichteter Structurix D7DW-Film (AGFA) verwendet wurde. Die resultierenden stereoskopischen Bilder erlaubten die Analyse des kollateralen Wachstums in drei Dimensionen.

[0064] Um zur weiteren Quantifizierung zwischen kollateralen Gefäßen und Muskel-Gefäßen zu unterscheiden, wurde die Definition von Longland für kollaterale Arterien verwendet (Longland et al. 1954 "Description of collateral arteries" Verlag: Thomas). Der Stamm, der mittlere Bereich und der Wiedereintrittsbereich wurden mit Hilfe stereoskopischer Darstellung identifiziert, wobei eine dreifache Vergrößerung unserer Angiogramme verwendet wurde. Die kollateralen Arterien wurden dann in zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe eins bestand aus Gefäßen, deren Stamm sich von der Arteria circumflexa femoris lateralis abzweigte. Gruppe zwei der Arterien entsprang aus der Arteria profunda femoris. Die Länge des mittleren Bereiches in jeder Gruppe war ungefähr gleich, sodass ihre Messung keine weitere Information bereitstellte. Der Wiedereintrittsbereich der Kollateralen aus der ersten Gruppe stieg gewöhnlich in die Arteria genus descendens ab, aus der zweiten Gruppe in die Arteria caudalis femoris. Nur etwa 10% der kollateralen Arterien entstehen aus anderen Gefäßen, z. B. aus der A. iliaca externa oder aus der A. iliaca interna.

[0065] Die kollateralen Gefäße wurden nach dem Zählen markiert, um sicherzustellen, dass kein Gefäß zweimal gezählt wurde. Eine weitere dreifache Vergrößerung wurde verwendet, um den Durchmesser der Gefäße mit einer Genauigkeit von 0,1 mm zu messen. Post mortem-Angiogramme zeigten korkenzieherartige Kollaterale, hauptsächlich im Adduktor longus, Adduktor magnus und im Vastus intermedius, die das Perfusionsbett der Arteria femoralis profunda mit dem der Arteria saphene parva in den Adduktoren-Muskeln und das Perfusionsbett der Arteria circumflexa femoris lateralis mit dem der Arteriae genuales im Quadrizepsmuskel verbinden. Die Angiogramme, die von den hinteren Gliedmaßen der Tiere gemacht wurden, die mit GM-CSF behandelt wurden, zeigen einen bemerkenswerten Anstieg des Durchmessers und der Dichte dieser kollateralen Gefäße (Tabelle 2, [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#)).

Tabelle 2

Kollaterale Arterien

	GM-CSF	PBS	p
Durchschnitt	26	14	0,02

[0066] Die Ergebnisse der Experimente, die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, zeigen, dass CSFs in der Lage sind, Neovaskularisierung und/oder kollaterales Arterienwachstum und/oder das Wachstum von Arterien von bereits bestehenden arteriolären Verbindungen aufgrund von Macrophagen-Rekrutierung, die durch einen direkten Effekt von CSFs auf die Macrophagen-Aktivierung, -Proliferation, -Motilität und das Überleben vermittelt sein könnte, und sekundär durch chemotaktische Moleküle zu vermitteln, die als Antwort auf lokal verabreichte CSFs freigesetzt werden. Somit stellt die vorliegende Erfindung neue Mittel und Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen bereit, die von Neovaskularisierung und/oder kollateralem Arterienwachstum abhängen.

[0067] Die vorliegende Erfindung ist durch die Beschreibung ihrer spezifischen Ausführungsformen in ihrem Schutzzumfang nicht eingeschränkt, die als einzelne Veranschaulichungen individueller Aspekte der Erfindung gedacht sind und alle beliebigen Proteine, Nucleinsäuremoleküle oder Verbindungen, die funktionell äquivalent sind, liegen innerhalb des Schutzzumfangs der Erfindung. In der Tat sind anhand der vorangehenden Beschreibung und der beigefügten Zeichnungen den Fachleuten verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu denjenigen, die hierin gezeigt und beschrieben sind, offensichtlich.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Granulocyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF), Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF), funktionell äquivalenten Stoffen und funktionellen Derivaten davon für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Verstärken des kollateralen Wachstums von kollateralen Arterien und/oder anderen Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die pharmazeutische Zusammensetzung den CSF entweder allein oder in Kombination und gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipienten umfasst.

3. In-vitro-Verfahren zum Verstärken des Wachstums kollateraler Arterien und/oder anderer Arterien von bereits bestehenden arteriolen Verbindungen umfassend das In-Kontakt-Bringen von Organen, Gewebe oder Zellen mit einem Koloniestimulierenden Faktor (CSF).

4. Verfahren oder Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei der CSF GM-CSF ist.

5. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1, 2 oder 4, bei der die pharmazeutische Zusammensetzung einem Individuum verabreicht werden soll, das an einer vaskulären Erkrankung oder einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall leidet.

6. Verwendung nach Anspruch 5, bei der die vaskuläre Erkrankung Arteriosklerose und/oder ein hyperlipidämischer Zustand, eine koronare Arterienerkrankung, zerebrale Verschlusskrankung, periphere Verschlusskrankung, viszerale Verschlusskrankung, Nierenarterienerkrankung, mesenteriale arterielle Insuffizienz oder ein ophthalmischer oder retinaler Verschluss ist.

7. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1, 2 oder 4, bei der die pharmazeutische Zusammensetzung einem Individuum während oder nach dem Aussetzen gegenüber einem Stoff, einer Strahlung oder einer chirurgischen Behandlung, die Arterien beschädigen oder zerstören, verabreicht werden soll.

8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 3 bis 7 oder Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1, 2 oder 4 bis 7, wobei der CSF ein rekombinanter CSF ist.

9. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 3 bis 8, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen des Organs, Gewebes oder der Zelle mit einem Wachstumsfaktor.

10. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1, 2 oder 4 bis 8, bei der die pharmazeutische Zusammensetzung zur Verabreichung in Verbindung mit einem Wachstumsfaktor bestimmt ist.

11. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 3 bis 9 oder Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1, 2, 4 bis 8 oder 10, wobei das CSF-Derivat oder der funktionell äquivalente Stoff ein Antikörper, ein (Poly)peptid, eine kleine organische Verbindung, ein Ligand, ein Hormon oder ein Peptidomimetikum ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

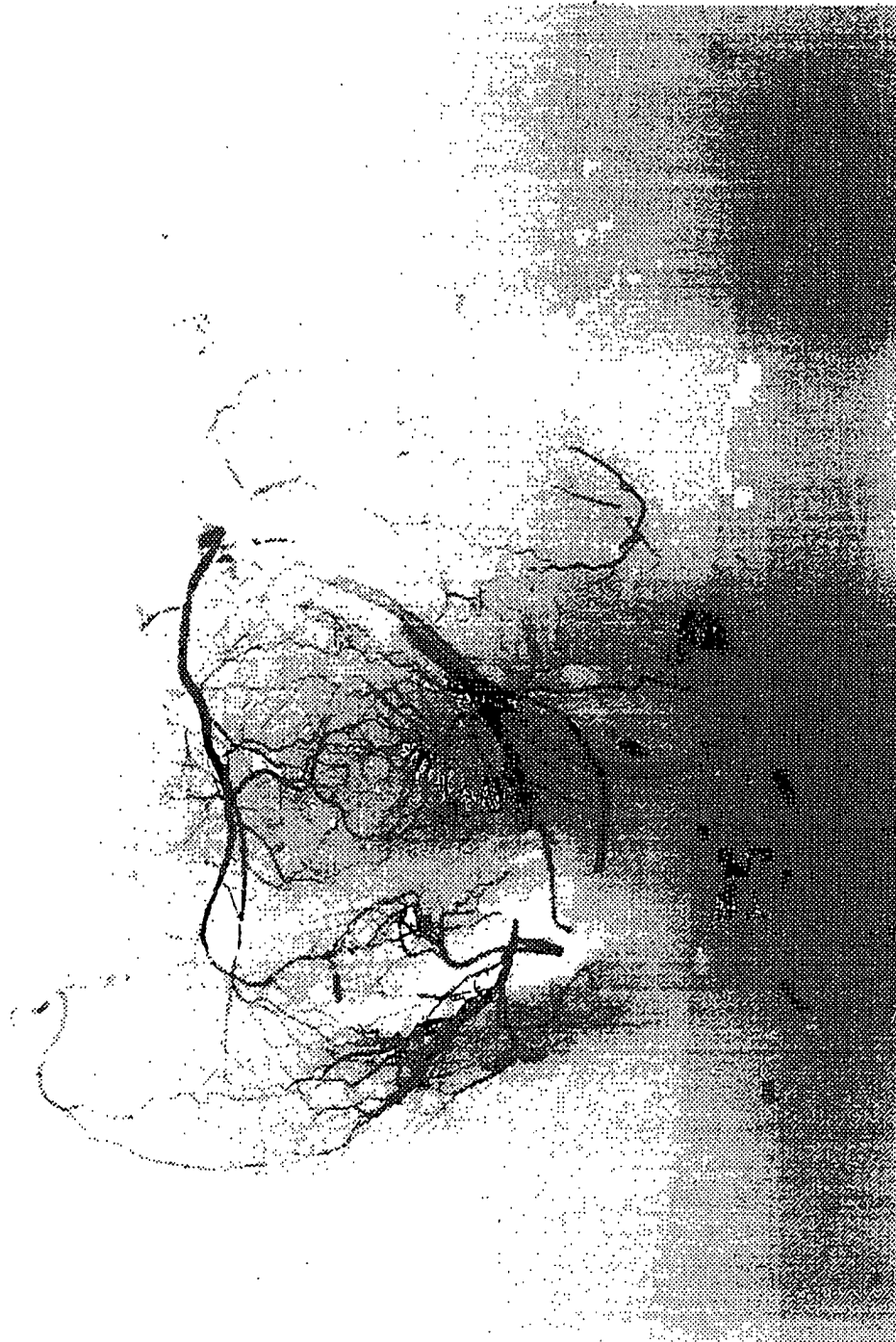
Anhängende Zeichnungen



Figur 1



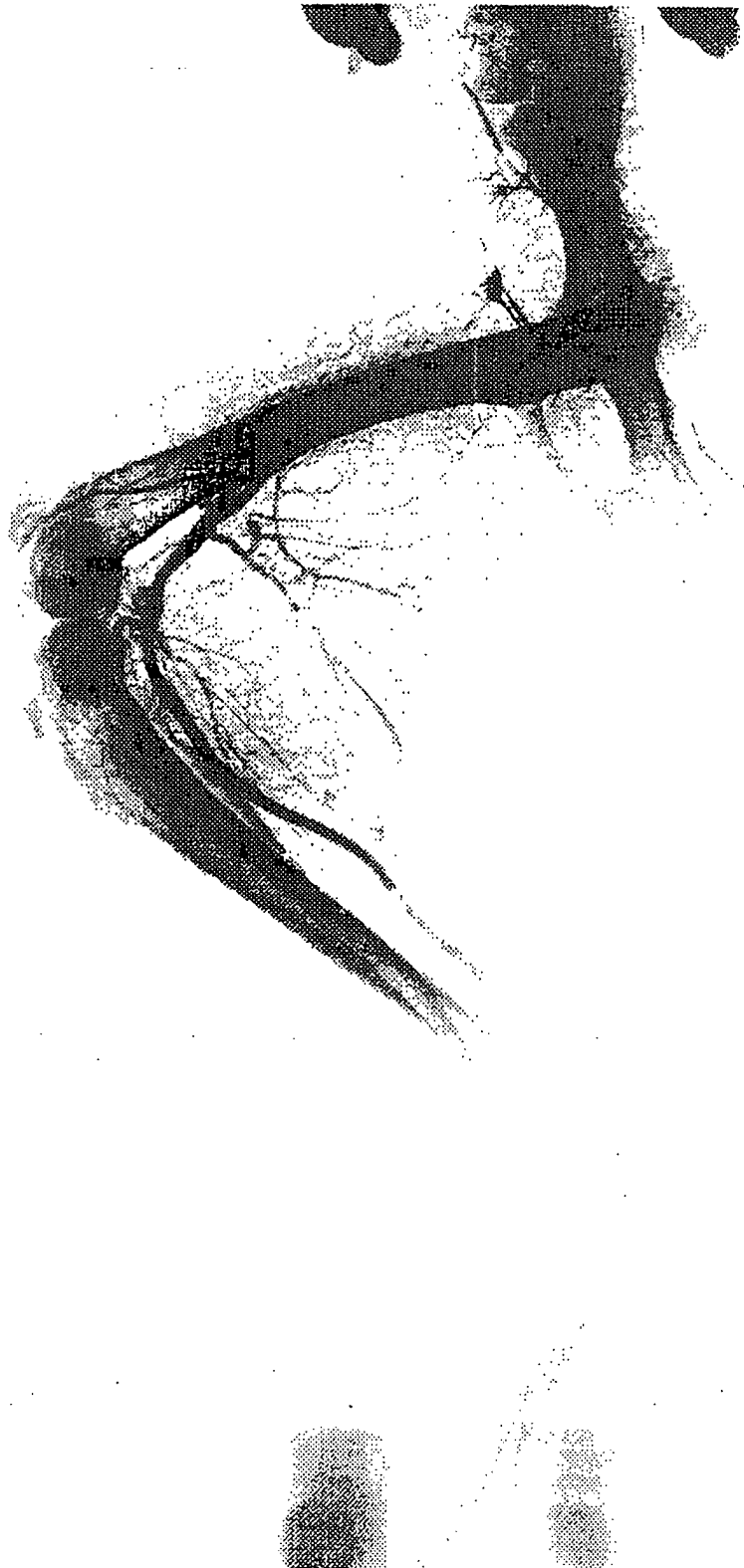
Figur 2A



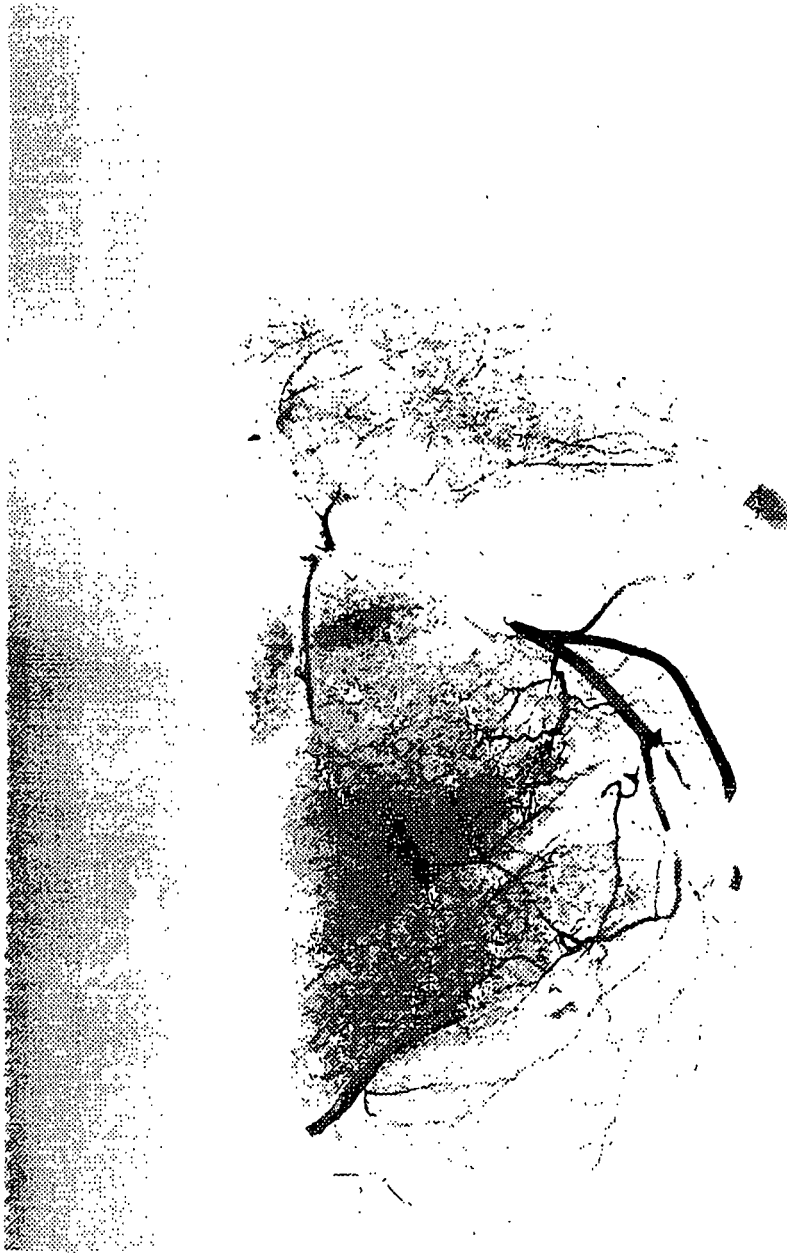
Figur 2B



Figur 3



Figur 4



Figur 5