(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 736 T2** 2005.12.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 889 731 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 736.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/04643**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 916 168.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/034624**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.03.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.09.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.01.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.11.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/16**

(30) Unionspriorität:
619780 **20.03.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, ES, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
Allergan, Inc., Irvine, Calif., US

(74) Vertreter:
Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(72) Erfinder:
AOKI, Roger, Kei, Laguna Hills, US; WHEELER, A., Larry, Irvine, US; GARST, E., Michael, Newport Beach, US

(54) Bezeichnung: **INJEKTIONSBEHANDLUNG ZUR BEHERRSCHUNG VON MUSKELKRÄMPFEN UND DAMIT EINHERGEHENDEN SCHMERZEN**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung und Auswahl von Muskelrelaxantien bzw. neuromuskulären Blockieragentien (neuromuscular blocking agents) mit einer Aktivitätsdauer, die kürzer als die Muskelrelaxans-Aktivität von Botulinum-Toxin ist.

[0002] Botulinum-Toxin ist ein Neurotoxin, das durch das Bakterium Clostridium botulinum hergestellt wird, wovon sieben Subtypen A–G vorliegen und welches ein Molekulargewicht von 150,000 aufweist. Dieses Toxin bindet an Hämagglutinin und andere nicht-toxische Proteine zum Bilden eines viel größeren molekularen Komplexes.

[0003] Ein Bakterientoxin, Botulinum-Toxin, insbesondere Botulinum-Toxin Typ A wurde bei der Behandlung einer Anzahl an neuromuskulären Störungen und Zuständen verwendet, an denen ein muskulärer Spasmus bzw. Krampf beteiligt ist; beispielsweise Strabismus, Blepharospasmus, Torticollis spasmodicus (zervikale Dystonie), oromandibuläre Dystonie und spasmodische Dysphonie (laryngale Dystonie). Das Toxin bindet schnell und stark an präsynaptische, cholinerge Nervenenden und inhibiert die Exozytose von Acetylcholin durch Verringern der Acetylcholin-Freisetzungsfrequenz. Dies führt zu örtlicher Paralyse und folglich zu einer Relaxation des vom Spasmus betroffenen Muskels.

[0004] Für ein Beispiel einer Behandlung von neuromuskulären Störungen wird auf die Patentschrift US 5,053,005 an Borodic verwiesen, die eine Behandlung der Krümmung der jugendlichen Wirbelsäule, d. h. von Skoliose, mit einem Acetylcholin-Freisetzungs-Inhibitor, vorzugsweise Botulinum-Toxin A, vorschlägt.

[0005] Hinsichtlich der Behandlung von Strabismus mit Botulinum Toxin Typ A wird auf Elston, J. S., et al., British Journal of Ophthalmology, 1985, 69, 718–724 und 891–896 verwiesen. Hinsichtlich einer Behandlung von Blepharospasmus mit Botulinum Toxin Typ A wird auf Adenis, J. P., et al., J. Fr. Ophthalmol., 1990, 13 (5), Seiten 259–264 verwiesen. Hinsichtlich einer Behandlung eines Schielens wird auf Elston, J. S., Eye, 1990, 4(4): VII verwiesen. Hinsichtlich einer Behandlung von spasmodischer und oromandibulärer Dystonia torticollis wird auf Jankovic et al., Neurology, 1987, 37, 616–623 verwiesen.

[0006] Spasmodische Dysphonie wurde mit Botulinum-Toxin Typ A behandelt, siehe Blitzer et al., Ann. Otol. Rhino. Laryngol, 1985, 94, 591–594. Linguale Dystonie wurde mit Botulinum Toxin Typ A gemäß Brin et al., Adv. Neurol. (1987) 50, 599–608 behandelt. Schließlich offenbart Cohen et al., Neurology (1987) 37 (Suppl. 1), 123–4, die Behandlung eines Schreibkrampfes mit Botulinum Toxin Typ A.

[0007] Der Begriff Botulinum-Toxin ist ein generischer Begriff, welcher die Toxin-Familie umfasst, die durch das anaerobe Bakterium Clostridium botulinum hergestellt wird, wobei bis jetzt sieben immunologisch unterschiedliche Neurotoxin-Serotypen identifiziert wurden. Diese erhielten die Bezeichnungen A, B, C, D, E, F und G. Für weitere Informationen über die Eigenschaften der verschiedenen Botulinum-Toxine wird auf den Artikel von Jankovic und Brin, The New England Journal of Medicine, Band 324, Nr. 17, 1990, S. 1186–1194 und auf den Review-Artikel von Charles L. Hatheway in Kapitel 1 des Buches mit dem Titel "Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin", L. L. Simpson, Hrsg., das durch Academic Press Inc., San Diego, Kalifornien, 1989 veröffentlicht wurde, verwiesen.

[0008] Botulinum-Toxin wird kommerziell erhalten, indem C. botulinum Kulturen in einem Fermenter angesiedelt und gezüchtet werden und anschließend das fermentierte Gemisch gemäß bekannter Techniken geerntet und gereinigt wird.

[0009] Botulinum-Toxin Typ A, der Toxin-Typ, der im Allgemeinen zur Behandlung neuromuskulärer Zustände verwendet wird, ist gegenwärtig im Handel aus verschiedenen Quellen erhältlich, beispielsweise von Porton Products Ltd. UK, unter dem Handelsnamen "DYSPORT" und von Allergan, Inc., Irvine, Kalifornien unter dem Handelsnamen BOTOX® Botulinum Toxin Typ A gereinigter Komplex.

[0010] Die Injektion von Botulinum-Toxin in einen betroffenen, hyperaktiven Muskel führt zu einer selektiven Schwächung dieses Muskels allein. Die Genauigkeit des Setzens der Injektion kann durch die Verwendung von elektromyographischer (EMG) Unterstützung verbessert werden. Bei diesem Verfahren wird das Toxin abwärts einer hohlen EMG Elektrode injiziert, wobei die Elektrode zunächst verwendet wurde, um den hyperaktiven Muskel oder Teil des Muskels zu lokalisieren. Bei dieser Technik zeigte sich, dass sie sowohl die Ergebnisse einer Behandlung verbessert, als auch die Inzidenz der Nebenwirkungen verringert.

[0011] Die Paralyse, die durch die Injektionen hervorgerufen wird, weist in Abhängigkeit von der verwendeten Toxindosis (does of toxin) und der Muskelgröße ein variables Ausmaß auf, wobei größere Muskeln größerer Dosen erfordern. Die Anlaufzeit (onset time) liegt typischerweise zwischen zwei und fünf Tagen, wobei bei der Wirkung eine Spitze bei 7–14 Tagen vorliegt, und die Wirkungsdauer beträgt normalerweise etwa drei Monate. Nach jeder Rückkehr des Muskeltonus kann eine weiter verlängerte Wirkung für einige Zeit aufgrund des Muskelschwunds vorliegen, der aus der Nichtverwendung des Muskels resultiert. Folglich erfordert die Injektion gewöhnlich, dass sie alle vier bis sechs Monate wiederholt wird, damit die therapeutische Wirkung über eine verlängerte Zeitspanne aufrechterhalten wird. Die Behandlung kann unbegrenzt wiederholt werden.

[0012] In Hinblick auf die langsame Anlaufzeit ist es wünschenswert, dass eine korrekte Verabreichung des Botulinum-Toxins erfolgt und dass eine korrekte Stelle der Injektion vor der tatsächlichen Injektion identifiziert werden kann. Die vorliegende Erfindung betrifft einen derartigen Vorgang und die Bewertung und Auswahl von Muskelrelaxantien, die zur Verwendung bei der Verabreichung von Botulinum-Toxin und in getrennter Weise bei Kurzzeit-Muskelrelaxantien geeignet sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst die diagnostische Verwendung von Botulinum-Toxin die Schritte eines Auswählens mindestens eines Muskelrelaxans bzw. Muskelrelaxantiums mit einer Aktivitätsdauer, die kürzer als die Muskelrelaxans-Aktivität von Botulinum-Toxin ist. Anschließend wird mindestens ein Muskel, in den das gewählte Agens intramuskulär zu injizieren ist, aus einer Muskelgruppe ausgewählt. Eine Beobachtung einer Muskelrelaxation sowohl in dem ausgewählten Muskel, als auch in anderen, nicht-ausgewählten Muskeln in der Muskelgruppe erfolgt zur Bestimmung von "Spill-over" Abdeckungs-Muskeltonus (spill-over cover muscle tone) und Gleichgewicht bzw. Ballance (balance).

[0014] Die Injektion in gewählte Muskeln und eine Relaxationsbeobachtung wird wiederholt bis eine endgültige Muskelauswahl erfolgt ist. Anschließend wird Botulinum-Toxin in die andere Muskelauswahl intramuskulär injiziert. Auf diese Weise kann ein intramuskuläres Blockieragens, das eine Aktivitätsdauer aufweist, die kürzer als jene von Botulinum-Toxinen ist, nicht nur zum Identifizieren und Auswählen von Muskeln für eine Injektion von Botulinum-Toxin, sondern auch zum Sicherstellen einer korrekten Platzierung der Injektion nach innen bei der späteren Einsatzstelle bzw. zum späteren Einsetzen (later onset) und der Affekte bzw. Wirkungen von Botulinum-Toxin verwendet werden, die für viele Tage anhalten, wirksam injiziert werden und verstärkt demzufolge die Langzeitwirkung des Botulinum-Toxins.

[0015] Insbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren Vecuronium oder Erabutoxin-b oder Kombinationen von beiden verwenden.

[0016] Weiterhin kann insbesondere der Schritt eines Auswählens mindestens eines vorausgewählten bzw. begrenzten bzw. genauen bzw. engen (narrow) muskulären Blockieragens gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen, den Schritt eines Stimulierens einer Gruppe von Muskeln mit elektrischen Pulsen in dem Labortier, um darin Krampf bzw. Spasmus zu induzieren; anschließend ist in einen ausgewählten Muskel der Muskelgruppe des Labortieres mit einem vorgeschlagenen Agens zu injizieren.

[0017] Dann wird ein Beobachten hinsichtlich einer Krampfverminderung des injizierten ausgewählten Muskels des Labortieres durchgeführt, ebenso wie ein Beobachten einer Spasmusverringerung von nicht-ausgewählten Muskeln der Muskelgruppe des Labortieres, und anschließend erfolgt ein Vergleichen der Beobachtungen zum Bestimmen von "Spillover"- bzw. Ausbreitungs-Wirkungen von dem injizierten Muskel auf nicht-injizierte Muskeln.

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt eine diagnostische Verwendung für Patienten bereit, die unter irgendeinem Zustand leiden können, der die neuromuskuläre Funktion beeinträchtigt. Diese Zustände können unter den erfindungsgemäßen Vorgehensweisen vor einer Injektion von Botulinum-Toxin erfasst werden, auf die der Patient eine gesteigerte Antwort zeigen kann.

KURZE BERSCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0019] Die Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden klar durch die folgende Beschreibung, wenn diese zusammen mit dem Beigefügten betrachtet wird, worin:

[0020] **Fig.** 1 erläutert die Ergebnisse einer intravenösen Verabreichung von Vecuronium (μg kg^{-1}) in Soleus

und Tibialis anterior, Kurve A, wobei die durch Herzfrequenz-Bradycardie erzeugte Vagus-Stimulierung alle 100 Sekunden gezeigt wird, Kurve B, mit induzierten Spasmen gezeigt, in den Soleus Muskel, Kurve C, in den Tibialis Anterior Muskel, gezeigt in Kurve D, bei Stimulierung bei 0,1 Hz, und Membrana nictitans, Kurve E, bei preganglionischer Stimulierung alle 100 Sekunden.

[0021] Fig. 2 ist repräsentativ für Dosis-Inhibitionskurven für die intravenöse Verabreichung von Vecuronium an die Soleus und Tibialis Muskeln;

[0022] **Fig.** 3 ist ähnlich zu **Fig.** A, wobei Vecuronium bei 50 μg kg^{-1} an dem markierten Punkt in den Tibialis interior Muskel injiziert wird, wobei die Lücke zwischen den Paneelen 10 Minuten darstellt;

[0023] **Fig.** 4 stellt drei Injektionen von Vecuronium (50 mg) dar, die in rascher Aufeinanderfolge auf verschiedene Teile des Bauchs des Tibialis interior Muskels bei dem Pfeil erfolgt sind, wobei die Kurven A, B, C und D wie in **Fig.** 1 identifiziert sind;

[0024] **Fig.** 5 ist ähnlich wie **Fig.** 4, wobei sie drei Injektionen von Vecuronium und 200 μg bei dem Pfeil zeigt und wobei gezeigt wird, dass sich die Blockierung schneller in dem nicht-injizierten Soleus-Muskel (c) als in dem injizierten Tibialis-Muskel (d) entwickelt;

[0025] **Fig.** 6 stellt dar, eine Muskelblockierung, die erfolgte, durch die intramuskuläre Injektion von Erabutoxin-b, wobei die Injektion in den Tibialis anterior Muskel bei dem Pfeil erfolgte, der in Kurve A gezeigt ist, und den kontralateralen nicht-injizierten Tibialis interior Muskel, wobei Kurve B aufgezeichnet wurde, wobei der Pfeil eine Injektion von 0,2 mg an Erabutoxin-b anzeigt und die Zeitlücken zwischen dem dritten und vierten Paneel 60 Minuten darstellen;

[0026] Fig. 7 ist ein Plot einer Zeitinhibition für Erabutoxin-b in drei verschiedenen Katzen bei 0,1 Hz Stimulationsfrequenz, wobei der Prozentsatz an Steuer-Zuckungs-Höhe auf der Vertikalachse und Zeit und Minuten auf der Horizontalachse gezeigt werden, worin gezeigt wird, in der unteren Linie eine Blockierung in dem injizierten Muskel, wobei die obere Linie eine Abstoßung (rejection) und eine Zuckungs-Spannung (twitch tension) in dem nicht-injizierten Muskel zeigt, und wobei die Mittellinie darstellt, die Blockierung in dem injizierten Muskel unter Korrektur für die Verringerung der Zuckungs-Spannung in den nicht-injizierten Muskeln;

[0027] **Fig.** 8 ist eine Darstellung der Ergebnisse der innermuskulären Injektion von sowohl Vesamicol, als auch Lignocain, wobei beide Tibialis anterior Muskeln bei 1 Hz stimuliert wurden und die Agentien bei den Pfeilen injiziert wurden, wobei Kurve A die Wirkungen der anfänglichen Injektion des Vesamicols bei 3 mg zeigt, wobei Kurve B zum Vergleich die Wirkungen einer Injektion von 0,1 ml einer 2% Lösung von Lignocain zeigt (Diese Injektion erfolgte 5 Stunden nach bzw. von der initialen Dosis an Vesamicol nach bzw. von an dem Ende des Experiments), wobei Kurve C zeigt, die Wirkungen einer zweiten Dosis an Vesamicol (3 mg), die 2½ Stunden nach der ersten Dosis injiziert wurde, wobei die Zeitlücke, wie in Kurve C gezeigt, fünfzehn Minuten beträgt.

[0028] Fig. 9 zeigt die Ergebnisse aufgrund einer intramuskulären Injektion von Erabutoxin-b, worin beide Tibialis interior Muskeln bei 1 Hz stimuliert wurden und Erabutoxin-b bei 0,2 mg in den Muskel in der oberen Spur bei dem Pfeil injiziert wurde, wobei die Zeitlücken zwischen den Aufnahmen, 45 Minuten darstellen und die Gesamtexpositionszeit gegenüber Erabutoxin-b 4 Stunden beträgt;

[0029] Fig. 10 ist ein Zeit-/Inhibition-Plot für Erabutoxin-b bei dem in **Fig.** 8 gezeigten Experiment, wobei die Prozentsatz-Kontroll-Zuckungs-Höhe auf der Vertikalachse und die Zeit in Minuten auf der Horizontalachse gezeigt wird, wobei die untere Linie die Blockierung in dem injizierten Muskel zeigt, wobei die obere Linie die Verringerung an Zuckungs-Spannung in dem nicht-injizierten Muskel zeigt und wobei die Mittellinie die Blockierung in dem injizierten Muskel darstellt, die wegen der Verringerung an Zuckungs-Spannung in dem nicht-injizierten Muskel korrigiert wurde;

[0030] **Fig.** 11 ist ein Diagramm einer innermuskulären Injektion von Erabutoxin-b und Vesamicol in Kombination, wobei die Antworten von beiden Tibialis interior Muskeln stimuliert werden, und 1 Hz, Blutdruck, Kurve A, vagale bzw. Vagus-Nerv betreffende, Kurve B und Membrana nictitans, Kurve C, Antworten ebenfalls in diesem Plot gezeigt werden, wobei die Papiergeschwindigkeit in Vergleich zu jener verdoppelt ist, die in **Fig.** 1-Fig. 10 gezeigt ist, wobei das linke Panel eine Injektion von Erabutoxin-b bei 0,1 mg an dem Pfeil zeigt, wobei bei dem zweiten Panel Vesamicol und 1 mg injiziert wird, bei dem Pfeil, wobei die Zeit zwischen den zwei Injektionen 16 Minuten beträgt und die Zeiten zwischen dem zweiten und dritten, und dritten und vierten

Panel 10 beziehungsweise 15 Minuten betrugen;

[0031] **Fig.** 12 zeigt intramuskuläre Injektionen von Erabutoxin-b und Vesamicol, wobei das obere linke Panel eine Injektion von Erabutoxin-b bei 0,1 mg und Vesamicol bei 1 mg zeigt, die simultan in den Muskel injiziert werden, in der unteren Spur D gezeigt, wobei Blutdruck, Spur A, Vagus-Antworten, Spur B, ebenfalls gezeigt sind, wobei das obere rechte Panel eine zweite Dosis an Vesamicol zeigt, bei 1 mg, wobei die Injektion 1 Stunde nach der Kombinationsinjektion erfolgte und weitere Injektionen von Vesamicol 1 mg in stündlichen Intervallen erfolgten, wobei die untere linke und die zentralen Spuren und das untere rechte Panel die Blockierung zeigen, die nach 1½ Sunden nach den initialen Injektionen und nach Injektion von drei Dosen 1, 2 und 2 mg zwischen dem zentralen unteren und den rechten unteren Panelen erfolgen;

[0032] Fig. 13 ist ein Plot, der eine quantitative Bewertung einer Blockierung zeigt, die durch eine Kombination von Erabutoxin-b und Vesamicol erzeugt wird, wobei der Zeit/Inhibierungs-Plot, eine Prozentsatz-Kontoll-(bzw. Steuer-)Zuckungs-Spannung auf der Vertikalachse und Zeit in Minuten auf der Horizontalachse zeigt, wobei die Kurven den Mittelwert von sechs Experimenten darstellen, wobei zum Zeitpunkt Null Erabutoxin-b bei 0,1 mg in einen Tibialis-Muslkel injiziert wurde, gefolgt von zwei Injektionen von Vesamicol 1 mg bei 20 beziehungsweise 40 Minuten, wobei die untere Linie die Zuckungs-Erniedrigung in dem injizierten Muskel zeigt, wobei die obere Linie die Erniedrigung in dem Kontrollmuskel mit Salzlösungsinjektion bzw. mit physiologischer Kochsalzlösungsinjektion (saline injected) zeigt und die Mittellinie die neuromuskuläre Blockierung darstellt, die wegen der Salzlösungskontrollwirkungen korrigiert ist; und

[0033] Fig. 14 ist ein Zeit-/Inhibitions-Plot, ähnlich zu Fig. 13, worin die Zeitbasis verlängert ist, um eine 4 Stunden Verabreichungszeitspanne abzudecken, wobei nach 15 Minuten die Daten Ergebnisse von 5 Katzen darstellen und die gepunktete Linie die überlagerten Daten von einem Experiment zeigt, das mit Erabutoxin-b allein bei 0,2 mg bei der selben Stimulierungsfrequenz durchgeführt wurde.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0034] Ein weiter Bereich von Protein-Toxinen kann in der vorliegenden diagnostischen Verwendung verwendet werden, beispielsweise jene in Tabelle 1 Aufgeführten, die Toxine aufführt, die bei einer lokalen Therapie wirksam sind, zusammen mit einer Wirkungsstelle relativ zur neuromuskulären Verknüpfung (NMJ, Neuromuscular Junction) und einer Pharmakologischen Klasse.

[0035] Insbesondere verwenden bestimmte hier dargestellte Studien und Daten Protein-Toxine von Schlangen, die irreversible Blocker von Nikotin-Muskel-Typ-Rezeptoren sind, derart wie Vecuronium, Erabutoxin-b und Lignocain. Allgemein wird nach der Auswahl eines geeigneten Toxins, derart wie die hierin vorstehend erwähnten Schlangen-Toxine, die eine Aktivitätsdauer aufweisen, die kürzer als die Muskelrelaxans-Aktivität der Botulinum-Toxine ist, das ausgewählte Toxin mit kürzerer Aktivität in den ausgewählten Muskel eines Patienten injiziert und eine Muskelrelaxation sowohl in dem ausgewählten Muskel, als auch in anderen nicht-ausgewählten Muskeln zum Bestimmen von "Spill-over" Muskel-Tonus und Ballance. Wenn die Platzierung des Toxins derart bestimmt ist, so wird dann Botulinum-Toxin zur Behandlung des Patienten injiziert, in einer Menge an Botulinum-Toxin und in einem Typ hiervon, der typischerweise zur therapeutische Behandlung verwendet wird, wie es im Stand der Technik wohlbekannt ist.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft nicht die Menge oder den Typ an verwendeten Botulinum-Toxin, sondern vielmehr ein Verabreichungsverfahren an einen Patienten von jener Menge, von der bekannt ist, dass sie im Stand der Technik wirksam ist, in einer genauen Weise.

[0037] Wie nachstehend detaillierter diskutiert, wurden eine Anzahl an Stimulations-Protokollen analysiert, einschließlich langsamer und schneller einzelner Schocks und intermittierender kurzer Tetani, wobei sich eine schnelle (1 Hz) Einzelschock-Stimulierung am wirksamsten bei der Erfassung der Wirkungen der hierin beschriebenen Agentien erwiesen hat. Erabutoxin-b ist ein irreversibler, kompetitiver Nikotin-Antagonist, während Vesamicol ein Inhibitor von vesikulärer Acetylcholin-Speicherung ist.

Tabelle 1

Verbindung	**Wirkungsstelle relativ zu NMJ**	**Pharmakologische Klasse**
Acetylcholin-Esterase-Induktoren	Synaptisch	ACh-Esterase-Induktoren
Aconitin	Präsynaptisch	Natriumkanal-Aktivator
Adenoregulin (aus dem Frosch *Phyllomedeusa bicolor*)	Präsynaptisch	Adenosin-Rezeptor-Regulator
Adenosin Agonist	Prä- & Post-Synaptisch	Adenosin
Adenosin Antagonist	Prä- & Post-Synaptisch	Adenosin
Adenosin-regulierendes Agens	Prä- & Post-Synaptisch	Adenosin
Adrenerge Verbindungen	Präsynaptisch	Alpha-adrenerg
Anatoxin-A	Postsynaptisch	AChR-Agonist
Antiepileptika	ZNS	Antiepileptika
Antisense	Prä- & Post-Synaptisch	Antisense-Technologie für spezifische Proteine oder Nachrichten, die von Wichtigkeit sind für Neuro-transmitter-Abgabe, Rezeptor-Produktion.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Anxiolytika	ZNS	Anxiolytika Antiepileptika
Atacurium	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Atracurium besylat (Tracurium?)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Baclofen (Lioresal®, Geigy; Intrathecal, Medtronic Neurological; generic, Athena, Biocraft, Warner Chilcott)	Präsynaptisch	GABA analog
Bakterielle, Pflanzliche und Pilzliche Produkte		
Batrachotoxin	Präsynaptisch	Natriumkanal-Aktivator
Benzylpiperidine	Synaptischer Spalt	ACh-Esterase-Inhibitoren (nicht traditionell)
Botanische Neurotoxine	Prä- und Post-Synaptisch, sowie Synaptischer Spalt	variiert

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Bungarotoxin-β (β-BuTX)	Präsynaptisch	PLA2 und Spannungsempfindliche Kaliumionenblocker. Schlangentoxin von Bungarus multicinctus.
Bupivacain	Prä- und Post-Synaptisch	Lokalanästhetikum Myotoxin
Captopril (Capoten®, Squibb; Capzide®, Squibb)	Präsynaptisch	Antihypertensiv, ACE-Inhibitor Zink-Endopeptidase-Inhibitor
Cholinacetyltransferase-Inhibitoren	Präsynaptisch	CAT-Inhibitoren
Cholinesterase-Inhibitoren	Synaptischer Spalt	ACh-Esterase-Inhibitoren
Ciguatoxine	Präsynaptisch	Natriumkanal
Conotoxin MI (alpha Conotoxin)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist
Conotoxin-μ GIIIA (mu-CT)		Na+ Kanal -Blocker

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	**Wirkungsstelle relativ zu NMJ**	**Pharmakologische Klasse**
Conotoxin-Ω GVIA (omega-CT)		Ca2+ Kanal-Blocker nur in Neuronen
Curare	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierend
Dantrolen Natrium (Dantrium, P & G)	Postsynaptisch	Skelettmuskel-Relaxans
Dauricin	Postsynaptisch	AChR-Antagonist
Decamethonium Bromid	Präsynaptisch	Ganglienblocker
Dendrotoxin	Prä- und Post-Synaptisch	Kaliumkanalblocker
Diaminopyridin (3-4 DAP)	Präsynaptisch	Botulinum-Toxin-Intoxikations-Umkehr
Diazepam	ZNS	Anxiolytisch
Doxacurium chlorid (Nuromax®, Burroughs Wellcome)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Doxorubicin (Adriamyocin, Adria; Rubex, Immunex; Cetus Oncology)	Postsynaptisch	Myotoxin Chemo Myektomie

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Epibatidin Dihydrochlorid	Postsynaptisch	AChR-Agonist
Felbamate (Felbatol, Carter-Wallace liz. an Schering-Plough)	Präsynaptisch ZNS	Antiepileptisch
Foroxymithine	Präsynaptisch	Angiotensin I Converting Enzym-Inhibitor
Gabapentin (Neurontin, Parke- Davis)	Präsynaptisch ZNS	Antiepileptisch GABA-Analogon
Gallamine	Postsynaptisch	AChR-Antagonist
Grayantoxin	Präsynaptisch	Natriumkanal-Aktivator
Hexahydroazepinyl Acetamid und andere chemische Klassen	Präsynaptisch	ACh-Freisetzer
Huperzine A	Synaptischer Spalt	ACh-Esterase-Inhibitor
Insektengifte		

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	**Wirkungsstelle relativ zu NMJ**	**Pharmakologische Klasse**
Ionenkanal-Blocker	Prä- und Post-Synaptisch	Kanal-Blocker
Ionenkanal-Stimulantien	Prä- und Post-Synaptisch	Kanal-Stimulantien
Latrotoxin-α	Präsynaptisch	Kalzium-Ionophor Giftkomponente der Spinne Schwarze Witwe
Lidocain, Procain, Mepivacain, etc.	Präsynaptisch	Lokalanästhetika
Linopirdine (DuP 996, Dupont Merck)	Präsynaptisch	ACh-Freisetzungsverstärker
Lophotoxin und Analoga	Postsynaptisch	AChR-Antagonist irreversibel
Natürliche Meeresprodukte		
Methocarbamol (Robaxin, Robins Co.)		ZNS-Depression, Muskelrelaxation
Methyllycaconitine		
Mivacurium-chlorid (Mivacron®, BW-BW1090U, BurroughsWellcome)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Modifizierte Clostridium Toxine	Präsynaptisch	ACh-Freisetzungs-Inhibitor

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Monoklonale Antikörper gegen NMJ Komponenten		Rezeptor, Agrin, Neurotransmitter, Plasma-Membran-Komponenten, inaktivierende Enzyme, etc.
Muscarin-Agonist und Antagonisten	Prä- und Post-Synaptisch, ZNS	Muscarin- Agonist Antagonist
Neosaxitoxin	Präsynaptisch	Natriumkanal-Blocker
Neosurugatoxin		Autonomer Ganglien-AChR-Blocker. (Keine Wirkung bei NMJ)
Muskelrelaxantien	Postsynaptisch	AChR-Antagonisten AChR Depolarisierend
Neurotoxine von Reptilien, Insekten und anderen Quellen	Prä- und Post-Synaptisch, sowie Synaptischer Spalt	variiert
Pancuronium-Bromid (Organon)	Postsynaptisch	AChR Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Pancuronium-3-OH Metaboliten (Organon)	Postsynaptisch	AChR Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Papaverin HCl (30 mg/ml)		Relaxans für glatte Muskulatur
Physostigmin und Analoga	Synaptischer Spalt	ACh Esterase-Inhibitor
Pipercuronium (Arduan, Organon)	Postsynaptisch	AChR Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Präsynaptische Nerven-End-Rezeptoren	Präsynaptisch	irgendwelche extra- oder intraneuronale Rezeptoren auf Nerven-Ende

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Short Neurotoxin alpha	Postsynaptisch	AChR-Antagonist
β-Bungarotoxin (β-BuTX)	Präsynaptisch	Schlangentoxin von Bungarus multicinctus.
Succinylcholin-chlorid (Anectine, Burroughs Wellcome)	Postsynaptisch	AChR-Rezeptor-Agonist Depolarisierendes Skelettmuskelrelaxans
Tetanus-Toxin	Präsynaptisch	EAA-Freisetzungsinhibitor
Tetanus-Toxin-Transporter	Präsynaptisch	
Tetrahydroaminoacridin (THA)	Synaptischer Spalt	ACh-Esterase-Inhibitor
Tetrodotoxin	Prä- und Post-Synaptisch	Natriumkanal-Blocker
Tiagabin (Novo Nordisk)	ZNS	Antiepileptisch GABA-Aufnahme-Inhibitor
Transglutaminase Inhibitoren oder Induktion Prävention	Prä- und Post-Synaptisch	Enzyme
Valium		Diazepam ZNS anxiolytisch
Vecuronium (Norcuron, Organon)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Vecuronium-3-OH Metaboliten (Organon)	Postsynaptisch	AChR-Antagonist Nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans
Veratridin	Präsynaptisch	Natriumkanal-Aktivator

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verbindung	Wirkungsstelle relativ zu NMJ	Pharmakologische Klasse
Vigabatrin (Sabril, Marion Merrell Dow)	Präsynaptisch ZNS	Antiepileptisch GABA-Metabolismusinhibitor (irreversibel)
Vesamicol und Drogen mit gleichem Mechanismus	Präsynaptisch	ACh Vesikel-Transport-Inhibitor
Zink-Endopeptidase und andere Proteasen, zugeführt durch Botulinum-Toxin oder Tetanus-Toxin Transporter	Präsynaptisch	Enzyme. Verringerung von Neurotransmitter-Freissetzung

Verfahren

[0038] Experimente wurden an Katzen beiderlei Geschlechts ausgeführt, die mit einem Gemisch an α-Chloralose (80 mg kg^{-1}) und Pentobarbiton Natrium (5 mg kg^{-1}) anästhesiert wurden, das intraperitonal injiziert wurde. Die Tiere wurden mit Raumluft bei einer Rate von 26 Atemzügen pro Minute unter Verwendung eines Atemvolumens von 13 ml kg^{-1} beatmet. Das linke und das rechte hintere Gliedmaß wurden durch Drills immobilisiert, die in die Knöchel und Kniegelenke eingeführt waren. Die kontraktilen Antworten der Tibialis anterior und Soleus Muskeln auf eine Stimulation des Nervus sciaticus wurden aufgezeichnet. Der Nervus sciaticus wurde bei Raten von 0.1 Hz–200 Hz stimuliert, wobei Rechteck-Pulse von 0.2 ms Dauer und einer Stärke verwendet wurden, die größer ist als zum Erzeugen einer maximalen Zuckung erforderlich. Arterieller Blutdruck wurde von der Carotis-Arterie aufgezeichnet unter Verwendung eines Statham PC45 Druckwandlers. Der Blutdruckpuls wurde verwendet, um einen Cardiotachograph zum Anzeigen der Herzrate auszulösen. Bei einigen Experimenten waren beide Vagus-Nerven ligiert und bei 100 s Intervallen wurde der rechte Vagusnerv stimuliert mit 10 s Dauerfolgen bei einer Frequenz von 2–5 Hz und mit Pulsen von 0.5 ms Dauer und bei einer Stärke, die größer ist, als es zum Erzeugen einer maximalen Verringerung bei der Herzrate erforderlich ist. Kontraktionen der Membrana nictitans wurden alle 100 s durch eine präganglionische Stimulation des zervikalen sympathetischen Nervs mit 10 s Dauerfolgen bei einer Frequenz von 5 Hz und einer Stärke zum Hervorrufen maximaler Kontraktionen der Membrana nictitans hervorgerufen. Kontraktile Antworten der Muskeln wurden unter Verwendung von Grass FT03C und FT10C Kraft-Versetzungs-Wandlern (force displacement transducers) aufgezeichnet. Alle Antworten wurden auf einem Oszillographen Modell Grass 5 ink writing angezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Wirkungen von reversiblen kompetitiven Inhibitoren auf intravenösem und intramuskulärem Wege

[0039] Anfängliche Experimente wurden entworfen, um das Vermögen von reversiblen kompetitiven Muskelrelaxans-Drogen auf dem intravenösen und intramuskulären Wege zu vergleichen. Im Falle einer intravenösen Verabreichung (**Fig.** 1 und Fig. 2) wurde Vecuronium durch Bolus-Injektionen in Intervallen von 1 Stunde verabreicht. Der ED_{50} Wert betrug auf dem Soleus Muskel 36 ± 9 µg kg^{-1} (n = 5) und auf dem Tibialis anterior Muskel 40 ± 7 µg kg^{-1} (n = 5). Diese Werte stellen einen nahen Vergleich zu jenen dar, die zuvor im Labor unter Verwendung dieser Zubereitungen erhalten wurden.

[0040] Intramuskuläre Injektion von Vecuronium erfolgte in den Zentralbereich des Bauchs des Tibialis anterior Muskels, der bei 0. I Hz über den Nervus sciaticus stimuliert wurde. Die lokalen Wirkungen in dem Tibialis Muskel wurden mit systemischen Wirkungen auf den ipsilateralen Soleus Muskel verglichen. Die Wirkungen

von Vecuronium auf dem intramuskulären Weg waren gering, variabel und nicht offensichtlich Dosis-abhängig. Versuche wurden unternommen, um eine bessere Blockierung zu erhalten, indem in verschiedene Bereiche des Muskels, einschließlich bzw. vorliegend in einer Katze, Injektionen vorgenommen wurden, wobei 3 Injektionen virtuell gleichzeitig in verschiedene Bereiche erfolgten. Keiner dieser Versuche war erfolgreich. Eine Untersuchung der Nerven-Zufuhr an den Muskel zeigte die diffuse Natur der Innervation zu verschiedenen Teilen dieser großen Muskelmasse.

[0041] Dosen von zwischen 20 und 100 µg an Vecuronium wurden intramuskulär injiziert, wobei eine maximale Blockierung von etwa 25% Tibialis-Zuckungshöhe erreicht wurde.

[0042] Die erzeugten Blockierungen waren von langer Dauer (einige Stunden), wobei geringe oder keine Erholungszeichen hinsichtlich Kontrollniveaus erreicht wurden (**Fig.** 3). Auf den niedrigsten erzeugten Blockierungsniveaus, etwa 5%, betrug die schnellste beobachtete Erholungszeit 1 Stunde. Dies ermöglicht einen Vergleich mit 10–15 Minuten Gesamtdauer an Wirkung von Vecuronium auf den Tibialis-Muskel nach intravenöser Injektion (**Fig.** 1).

[0043] "Over-Spill" des Vecuroniums von der intramuskulären Injektionsstelle in den allgemeinen Kreislauf wurde aus den Antworten des ipsilateralen Soleus Muskel festgestellt, der durch eine gewöhnliche Nervus sciaticus-Elektrode stimuliert wurde. Der "Over-Spill" war ähnlich wie die erzeugte neuromuskuläre Blockierung variabel, war jedoch in einer offensichtlicheren Weise Dosis-bezogen. Folglich war bei den kleineren verwendeten Dosen (20–50 µg), virtuell kein "Spill-over" ersichtlich (**Fig.** 3). In einem Experiment, bei dem 100 µg Vecuronium i. m. injiziert wurden, wurde eine maximale langdauernde Blockierung von 25% in dem injizierten Muskel erzeugt; in dem Soleus Muskel wurde ein Blockierung von 60% erzeugt, die 8 Minuten zum Erreichen einer maximalen Wirkung brauchte und während 25 Minuten zurückging. In einem anderen Experiment, bei dem drei Dosen an Vecuronium (50 µg jeweils) in rascher Folge verabreicht wurden, war eine größere Blockierung in dem nicht-injizierten Tibialis Muskel ersichtlich (**Fig.** 4).

[0044] Das extremste Beispiel an "Spill-over" wurde in einem Experiment beobachtet, bei dem drei aufeinanderfolgende Dosen an 200 µg Vecuronium i. m. in den Tibialis Muskel injiziert wurden, d. h. insgesamt 600 µg (200 µg kg^{-1} auf Basis des gesamten Katzenkörpergewichts; oder 120 mg kg^{-1} auf Basis des Tibialis anterior Gewichts von etwa 5 g). In dieser Katze wurde ein maximale Blockierung von 60% am Tibialis Muskel beobachtet, wobei jedoch eine vollständige Blockierung auf dem Soleus Muskel (**Fig.** 5) ersichtlich war. Dies stimmte mit den Wirkungen des intravenös verabreichten Vecuroniums in der gleichen Katze überein. Diese Blockierung auf dem Tibialis Muskel entwickelte sich später als jene auf dem Soleus Muskel, und die Blockierungen auf den Muskeln begannen sich in 20 Minuten in dem Tibialis Muskel und 30 Minuten beim Soleus Muskel zu verringern. Die relativ kleine Blockierung in Anbetracht der massiven injizierten Dosis und die relativ kurze Wirkungsdauer deuten darauf hin, dass obwohl die beobachteten Blockierungen wahrscheinlich eher durch den "Spill-over" in den venösen Kreislauf, als durch eine lokale Wirkung bedingt waren ein wesentlicher Anteil der großen injizierten Dosis in einem Depotlager in dem injizierten Muskel zurückgehalten sein muss.

Die Wirkungen von α-Schlangentoxinen auf intramuskulärem Wege

[0045] Zwei postjunktional aktive α-Schlangenneurotoxine wurden verwendet, Erabutoxin-b, ein vergleichsweise kurzkettiges Toxin, das von Laticauda semifasciata abgeleitet ist und ein längerkettiges Toxin, das von Naja naja siamensis (Toxin-3) abgeleitet ist. Bei diesen Experimenten mit α-Schlangentoxinen wurden die Antworten der beiden Tibialis anterior Muskeln aufgezeichnet; der injizierte Muskel und der kontralaterale Muskel, der als eine Kontrolle zur Feststellung eines "Spill-overs" diente.

[0046] Zwei Experimente wurden mit Siamensis-Toxin-3 durchgeführt. In einem Experiment erzeugte die erste Injektion von Toxin eine kleine Menge an Blockierung in dem injizierten Muskel, wobei jedoch einige Anzeichen eines "Spill-overs" in den allgemeinen Kreislauf vorlagen, da eine leichte Blockierung in dem nicht-injizierten kontralateralen Tibialis beobachtet wurde. Weitere Injektionen zeigen deutliche Anzeichen eines "Spill-overs". In dem zweiten Experiment erzeugte Siamensis-Toxin-3 überhaupt keine erfassbaren Wirkungen trotz wiederholten intramuskulären Injektionen in verschiedene Bereiche des Muskels.

[0047] Eine intramuskuläre Injektion an Erabutoxin-b erwies sich als die erfolgreichste von allen getesteten Drogen. Die meisten Experimente wurden unter alleiniger Verwendung dieses Toxins durchgeführt oder in Kombination mit Vesamicol (siehe späterer Abschnitt).

[0048] In den Experimenten unter Verwendung von Erabutoxin-b allein, wurde 0,2 mg des Toxins injiziert. Die

Stimulationsrate betrug 0,1 Hz. In vier Experimenten erzeugte Erabutoxin-b eine sehr langsam sich entwickelnde Blockierung in dem injizierten Muskel (**Fig.** 6 und Fig. 7). In dem kontralateralen Tibialis-Muskel lagen keine Anzeichen an Blockierung vor, was ein Fehlen eines signifikanten "Spill-overs" in den allgemeinen Kreislauf zeigt. Das Maxmalniveau an neuromuskulärer Blockierung, das erreicht wurde, betrug von 25–60% an Blockierung. Die maximale Blockierung wurde in 1½–2 Stunden erreicht und anschließend stabilisiert. In 3 der Katzen wurde die Blockierung während 4 Stunden nach Injektion überwacht, lediglich in einem Tier lag eine kleine Menge an Erholung vor; in den anderen zwei zeigte die Blockierung keine Zeichen einer Erholung von ihrem Plateau-Wert.

[0049] Das Fehlen an "Spill-over" in den allgemeinen Kreislauf wurde in einer Katze bestätigt, in der keine Erholung in dem injizierten Muskel 4 Stunden nach Injektion ersichtlich war. In dieser Katze wurden 0,2 mg Erabutoxin-b i. m. in den kontralateralen Muskel injiziert. Die Rate an Blockierungsentwicklung war ähnlich wie jene, die in dem vier Stunden zuvor injizierten Muskel ersichtlich war. Dies deutet an, dass kein Erabutoxin-b in Sub-Blockierungskonzentrationen in dem allgemeinen Kreislauf vorlagen, d. h. dass der Sicherheitsfaktor in der Übertragung nicht verringert wurde.

[0050] Die Wirkungen von intravenösem Erabutoxin-b wurden in einer Katze getestet, die zuvor zwei Injektionen an Erabutoxin-b in den gleichen Tibialis anterior Muskel erhalten hat. Erabutoxin-b (0.2 mg i. v.) hatte keine erfassbare Wirkung auf den teilweise blockierten, zuvor injizierten Muskel oder auf den nicht-betroffenen, kontralateralen Muskel; 0,5 mg Erabutoxin-b i. v. erzeugte eine vollständige Blockierung beider Muskeln innerhalb von 5 Minuten.

[0051] α-Schlangentoxine sind in hohem Maße spezifisch für Acetylcholinrezeptoren an der neuromuskulären Verknüpfung. Deshalb war es nicht überraschend, dass keine Wirkungen, die dem Toxin zuweisbar sind, an Gewebeantworten auf autonome Stimulation beobachtet wurden. Es wird auch angenommen, dass das Fehlen an "Spill over" in dem allgemeinen Kreislauf ein beitragender Faktor zum Fehlen an autonomen Wirkungen ist.

[0052] Insgesamt waren die Wirkungen von Erabutoxin-b vielversprechend, wobei konsistente Wirkungen auf Injektion und eine langdauernde Blockierung erzeugt werden. Rechtliche Betrachtungen machten es unmöglich die Blockierung über langer als die vier berichteten Stunden zu verfolgen. Das Fehlen einer "Spill-over"-Wirkung könnte durch eine echte Toxinbindung an Stellen in dem Muskel selbst oder durch eine Zerstörung von kleinen Mengen an Peptid, die in dem Blutstrom eingetreten sein könnten, bedingt sein.

Die Wirkungen eines Inhibitors von Acetylcholinspeicherung auf dem intramuskulären Wege

[0053] Die logische Grundlage für die Verwendung von Vesamicol (2-[4-Phenylpiperidino] cyclohexanol), einem Inhibitor der Acetylcholinspeicherung durch cholinerge synaptische Vesikel ist, dass die Wirkung der Verbindung in hohen Maße Frequenz-abhängig ist. Folglich führt eine rasche Stimulation in der Gegenwart von Vesamicol zu einer Entleerung von Acetylcholin-Speichern und einem möglichen Versagen einer Übertragung. Jedoch sollte man es sich vergegenwärtigen, dass Vesamicol, bei höheren Dosen und in den wenigen in vivo Experimenten, die berichtet wurden, einige andere Wirkungen aufweist, einschließlich einer post-junktionalen Blockierung und lokal-anästetischer Wirkung. Diese zwei Wirkungen können in einer Beziehung stehen.

[0054] Bei den Experimenten mit Vesamicol wurden die Tibialis anterior Muskeln von beiden Beinen bei 1 Hz stimuliert. Unter diesem Stimulationsmuster braucht die Zuckungs-Spannung eine beträchtliche Zeit zum Stabilisieren sogar in der Abwesenheit von Drogen. Folglich wurde es ermöglicht, dass nach dem Ansetzen der Aufzeichnung bis zur Injektion von Drogen etwa 1 Stunde verstreicht; dieses Stimulationsprotokoll wurde in nachfolgenden Experimenten verwendet.

[0055] Vesamicol (3 mg) i. m. erzeugt ohne Wirkung auf den kontralateralen Muskel einen unmittelbare Wirkung in dem injizierten Muskel (**Fig.** 8). Eine Blockierung von etwa 50% wurde bei der ersten Injektion bei vollständiger Erholung in etwa 10–15 Minuten erreicht. Bei der sehr schnellen Wirkung von Vesamicol und seiner kurzen Wirkungsdauer, wobei keines von beiden mit seiner bekannten Wirkung auf die Acetylcholinspeicherung konsistent ist, erfolgt zwei Stunden nach vollständiger Erholung der Zuckungshöhe von der ersten Injektion eine zweite Injektion in den zuvor injizierten Muskel. Diese zweite Injektion erzeugte eine biphasische Blockierung, sowohl hinsichtlich von Onset-, als auch hinsichtlich von Offset-Charakteristika (**Fig.** 8). Die anfängliche Wirkung der Injektion war schnell, ähnlich zu jener der ersten Dosis.

[0056] Jedoch folgte auf diese schnell einsetzende unmittelbare Wirkung eine sich langsamer entwickelnde

Blockierung, die von dem Typ war, der normalerweise mit der Inhibierung des Acetylcholin-Metabolismus assoziiert ist. Eine Blockierung von 100% wurde erreicht. Nach 30 Minuten begann eine Erholung bei einer graduellen Rate, gefolgt von einer schnelleren Erholungsrate. Die Gesamtdauer der Wirkung betrug 1¼–1½ Stunden. Keine "Spill-over"-Wirkung wurde während dieser langdauernden Blockierung beobachtet, die durch die zweite Injektion von Vesamicol in einen zuvor mit Vesamicol injizierten Muskel erzeugt ist.

[0057] Die biphasische Wirkung von Vesamicol deutet an, dass mehr als ein Mechanismus beteiligt war. Eine Möglichkeit war, dass die lokal-anästhetisierende Wirkung von Vesamicol für die schnell einsetzende Blockierung von relativ kurzer Dauer verantwortlich war. Diese Möglichkeit wurde durch die i. m. Injektion von Lignocain bestätigt.

[0058] Ähnlich wie die erste Injektion von Vesamicol erzeugte Lignocain (2 mg) eine unmittelbare relativ kurz dauernde Blockierung ohne "Spill-over"-Wirkung (**Fig.** 8). Kein sekundäres, langsames Einsetzen von neuromuskulärer Blockierung war vorhanden. Deshalb wurde geschlossen, dass die sekundäre, langdauernde neuromuskuläre Blockierung, die durch Vesamicol erzeugt ist, wahrscheinlich die Wirkung der Verbindung auf eine Acetylcholin-Speicherung widerspiegelt. Das Fehlen einer sekundären, langsamen Blockierung auf die erste Injektion deutet möglicherweise an, dass bei dieser Dosis eine Acetylcholin-Freisetzung nicht unter die für die Endplattenpotentiale erforderlichen Schwelle gefallen ist, um die Muskelwirkungspotentiale in allen Fasern auszulösen.

Die Auswirkungen von Veränderungen in der Stimulationsfrequenz auf eine durch eine intramuskuläre Injektion erzeugte neuromuskuläre Blockierung

[0059] Ausgehend von der Tatsache, dass es die logische Grundlage für eine intramuskuläre Injektion ist, die schnell entladenden (firing) Muskel in spezifischer Weise zu betreffen, wurde eine kleine Anzahl an Experimenten ausgeführt, wobei eher kurze intermittierende Tetani, statt einer kontinuierlichen Einzel-Schock-Stimulation verwendet wurden. Folglich wurde der Nervus sciaticus bei 200 Hz für 150 ms alle 10 Sekunden stimuliert. Unter Verwendung dieses Stimulierungsmusters erzeugte Erabutoxin-b (0.2 mg) vernachlässigbare Wirkungen und es wurde deshalb angenommen, dass dieser Typ von Stimulation keinen Vorteil gegenüber einer Einzelschockstimulation bei 0.1 oder 1 Hz bietet. Das Fehlen eines Vorteil des Tetani-Stimulationsprotokolls wurde in einem Experiment unter Verwendung von intravenös injiziertem Vecuronium bestätigt, bei dem nur eine geringe Empfindlichkeitsdifferenz von dem Tibialis anterior Muskel auf Vecuronium bei 0.1 Hz kontinuierlicher Stimulation und bei 200 Hz intermittierender Tetani-Stimulation (tetanic stimulation) vorliegt.

[0060] Das Ergebnis mit Erabutoxin-b und Tetani-Stimulation war nicht vollständig unerwartet. Obwohl reversible, kompetitive Nikotin-Antagonisten einen deutlichen Tetani-Schwund (tetanic fade) erzeugen, so tritt dieses Phänomen zumindest bei in vitro Experimenten gewöhnlich bei α-Schlangentoxinen nicht auf. Wie zuvor erwähnt, ist es bekannt, dass die Wirkung von Vesamicol sich bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigt. Die vorhergehenden Experimente mit Erabutoxin-b wurden jedoch alle bei 0,1 Hz ausgeführt. Folglich wurde ein Experiment ausgeführt, um die Wirkungen des Toxins bei 1 Hz festzustellen. Bei diesem Experiment erzeugte Erabutoxin-b (0.2 mg i. m.) eine Blockierung von etwa 50% nach 100 Minuten Exposition (**Fig. 9** und **Fig. 10**). Dies bietet einen Vergleich zu der Blockierung von 30–40% (n = 3), die in den bei 0.1 Hz durchgeführten Experimenten ersichtlich ist.

[0061] Deshalb wurde gefolgert, dass eine 1 Hz Stimulation geeignet ist, um die Wirkungen von sowohl Erabutoxin-b, als auch von Vesamicol zu erfassen. Demgemäß wurden nachfolgende Experimente bei der kontinuierlichen 1 Hz Stimulierung ausgeführt.

Wirkungen von Kombinationen von Erabutoxin-b und Vesamicol

[0062] Ausgehend von der Fähigkeit von Erabutoxin-b zum Erzeugen einer langdauernden, jedoch sich langsam entwickelnden Blockierung im Vergleich zu Vesamicol, wurde die Fähigkeit von Vesamicol eine schneller einsetzende Blockierung zu erzeugen, und ausgehend von den verschiedenen Wirkungsstellen der zwei Drogen wurden Kombinationen der beiden betrachtet.

[0063] Drei Pilotversuche wurden durchgeführt, zwei bei 1 Hz und einer bei 0,1 Hz. Bei dem ersten bei 1 Hz wurde Erabutoxin-b bei 0,1 mg injiziert, d. h. die Hälfte der Dosis der vorhergehenden Experimente mit Erabutoxin-b allein wurde verwendet. Lediglich eine sehr schwache Blockierungswirkung war in dem injizierten Muskel ersichtlich (**Fig.** 11). Vesamicol (1 mg) wurde 20 Minuten nach der Injektion von Erabutoxin-b injiziert, wobei eine Verringerung von 80–90% an Zuckungs-Spannung erzeugt wurde (**Fig.** 11). Die Blockierung wies dann

ein Plateau während 30 Minuten vor Erholung auf (**Fig.** 11). Eine zweite Injektion mit Vesamicol (1 mg) erzeugte nahezu identische Wirkungen. Keine Anzeichen für einen "Spill-over" der Drogen in den allgemeinen Kreislauf wurde beobachtet. Die Plateau-Phase der neuromuskulären Blockierung, die in diesem Experiment ersichtlich ist, war von Interesse. Die Zuckungs-Spannung verblieb in bemerkenswerter Weise während dieses Plateaus konstant, wobei die Antworten den maximalen Zuckungen in ihrer Konsistenz ähneln. Gleichwohl liegt kein unmittelbar offensichtlicher Weg zum Testen dieser Hypothese vor, dass die verbleibenden Zuckungen nicht von dem Tibialis-Muskel selbst ausgegangen sind, sondern von einem der darunter liegenden nicht-injizierten Muskeln in der gleichen Muskelgruppe, beispielsweise dem Flexor hallucis longus. Die Charakteristika des Zeitverlaufs der Blockierung mit einem abrupten Abflachen der einsetzenden Phase (onset phase), wenn das Plateau erreicht war, und einer fast ebenso abrupten Umwandlung von dem Plateau zur Erholungsphase, unterstützten diese Vermutung. Folglich ist es möglich, dass Vesamicol eine vollständige Blockierung des Tibialis-Muskels selbst nach einer Vorbehandlung mit Erabutoxin-b erzeugt, wobei ein in naher Weise proximaler Muskel unbeeinflusst verbleibt.

[0064] Die zwei verbleibenden Pilotversuche wurden ausgeführt, indem Erabutoxin-b und Vesamicol gleichzeitig injiziert wurden. Bei ersterem wurde bei 0,1 Hz eine unmittelbare Blockierung erzeugt, ohne eine "Spill-over"-Wirkung. Die Blockierung vertiefte sich dann langsam über eine Zeitspanne von einigen Stunden. Eine zweite Injektion an Vesamicol erhöhte die Blockierung schwach, wobei nachfolgend Vesamicol Injektionen ohne Wirkung waren.

[0065] Bei dem abschließenden Pilotexperiment wurde eine langsam einsetzende Blockierung durch eine simultane Injektion von den zwei Drogen hergestellt (**Fig.** 12). Anschließende "top-up" ("obenauf') Injektionen von Vesamicol erzeugten relativ langsam einsetzende (7 Minuten bis zur Maximalwirkung), zusätzliche Blockierungen, die eher konsistent mit den Wirkungen hiervon auf einen ACh Transport, als mit einer lokal anästhetisierenden Wirkung hiervon waren. Bei diesem Experiment wurde die vorstehend beschriebene "Plateau-Wirkung" mit einer "top-up"-Dosis von Vesamicol wieder beobachtet, die eine große zusätzliche Blockierung erzeugte.

[0066] Auf der Basis dieser Pilotexperimente wurde eine quantitative Bewertung der Wirkungen einer Kombinationsdosierung in Katzen unternommen. Bei diesen Experiment wurden beide Tibialis anterior Muskeln bei 1 Hz stimuliert; einer wurde für eine intramuskuläre Injektion von Drogen und der zweite für gleichzeitige Kontrollen mit gleichen Volumina an Salzlösung verwendet. Nach Zuckungs-Spannungsstabilisierung wurde Erabutoxin-b (0.1 mg) zum Zeitpunkt Null injiziert, gefolgt von zwei Injektionen von Vesamicol (1 mg) bei 20 Minuten und 40 Minuten. Die resultierende Blockierung wurde für 4 Stunden überwacht. Eine Katze starb nach 75 Minuten und die nachstehend angeführten Ergebnisse stellen die Ergebnisse von 5 Tieren dar. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz einer Verringerung von der Kontrolle in bzw. zu dem Drogeninjizierten Muskel angegeben und sind ebenso hinsichtlich einer Verringerung in der Spannung in dem mit Salzlösung injizierten Muskel korrigiert.

[0067] Antworten wurden in Intervallen von 2 Minuten während der ersten 80 Minuten nach Erabutoxin-b – Verabreichung erfasst und anschließend in Intervallen von 20 Minuten. Die Ergebnisse sind in graphischer Form gezeigt.

[0068] Bei diesen Experimenten erzeugte Erabutoxin-b einen anfänglichen Abfall von 10% hinsichtlich der Zuckungs-Spannung unmittelbar nach einer Injektion, gefolgt von einer sehr graduellen Vertiefung der Blockierung in dem injizierten Muskel von etwa 15% nach 20 Minuten (**Fig. 13** und **Fig. 14**). Die erste Injektion von Vesamicol vertiefte die Blockierung rasch auf 40%, eine weitere Vertiefung erfolgte langsam über die nächsten 10 Minuten auf 45% und erholte sich dann langsam. Die zweite Injektion von Vesamicol erfolgte, wenn sich die Blockierung auf nahezu 40% erholt hatte. Diese sekundäre Injektion erzeugte eine weniger schroffe Blockierung als jene der ersten Injektion, bei einer Blockierungs-Ablesung von 55% in 10 Minuten vor Beginn einer Erholung. Eine Erholung von den Wirkungen von Vesamicol schritt für weitere 20 Minuten fort, bevor die Gesamt-Blockierung sich wieder zu entwickeln begann, vermutlich aufgrund der zunehmenden Wirkungen oder bzw. von Erabutoxin-b mit der Zeit. Die Blockierung vertiefte sich dann weiter über die nächsten 3 Stunden in dem injizierten Muskel.

[0069] Bei einer Korrektur der Antworten in dem injizierten Muskel hinsichtlich der Wirkungen der sehr graduellen Verringerung hinsichtlich der Spannung in dem Kontrolle-Muskel, in den Salzlösung injiziert wurde, so entstand ein im Wesentlichen ähnliches Bild zu dem vorstehend Beschriebenen (**Fig. 13** und **Fig. 14**). Jedoch ist ersichtlich, dass sich die nach 70–80 Minuten beobachtete Blockierung, wenn sich die Vesamicol-Wirkungen anscheinend aufgebraucht hatten, nur mit einer sehr geringen Rate (weniger als 10% über 2½–3 Stunden)

nach Korrektur entwickelt.

[0070] Das beschriebene Modell mit anästhetisierter Katze scheint ein nützliches System zum Untersuchen einer neuromuskulären Blockierung zu sein, die durch intramuskulär injizierte Drogen hervorgerufen wird, die zur vorstehend beschriebenen Verabreichung von Botulinum-Toxin geeignet sind. Das Modell wurde verwendet, um zu zeigen, dass örtliche Injektionen von reversibel kompetitiven Muskelrelaxantien (derart wie Vecuronium) geringe Wirkungen erzeugen, die nicht Dosis-bezogen sind. Injektion von größeren Dosen jener Drogen scheinen zu einem "Spill-over" der Verbindung in den allgemeinen Kreislauf zu führen.

[0071] Im Gegensatz hierzu, erzeugten intramuskuläre Injektionen von Erabutoxin-b, einem irreversiblen kompetetiven Nikotin-Antagonisten, eine sich langsam entwickelnde und lang andauernde neuromuskuläre Blockierung ohne einen "Spill-over" in den allgemeinen Kreislauf. Im Gegensatz hierzu, erzeugten intramuskuläre Injektionen von Erabutoxin-b, einem irreversiblen komptetitiven Nikotin-Antagonisten, eine langsam sich entwickelnde und lang andauernde neuromuskuläre Blockierung ohne einen "Spillover" in den allgemeinen Kreislauf.

[0072] Schließlich erzeugten lokale Injektionen von Vesamicol, einem Inhibitor vesikulärer Acetylcholinspeicherung, eine sich schnell entwickelnde und kurzlebige neuromuskuläre Blockierung. Gleichzeitige lokale Injektionen von Erabutoxin-b und Vesamicol erzeugten eine beträchtliche neuromuskuläre Blockierung ohne "Spill-over". Vesamicol erhöhte die neuromuskuläre Erabutoxin-b-Blockierung, wobei jedoch die Wirkungen hiervon noch ziemlich kurzlebig waren und ihre gleichzeitige Injektion nicht die nachfolgende, durch Erabutoxin-b erzeugte, neuromuskuläre Langzeit-Blockierung, zu beeinflussen schien. Klar ist, dass die "Langzeit"-Blockierung durch Erabutoxin-b, die in Stunden erfasst wurde, tatsächlich kurz in Vergleich zu der Wirkung von Botulinum-Toxin ist, wenn eine Messung über Wochen erfolgt, wie hier vorstehend beschrieben.

Patentansprüche

1. Verwendung mindestens eines Muskelrelaxantiums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
Aconitin
Adenoregulin (aus dem Frosch Phyllomedusa bicolor)
α-Neurotoxin
Anatoxin-A
Atacurium
Atracurium-besylate
Baclofen
Batrachotoxin
Bungarotoxin-β
Bupivacain
Captopril
Ciguatoxin
Conotoxin M1 (α-Conotoxin)
Conotoxin-μ G111A
Conotoxin-Ω GV1A
Curare
Natriumdantrolen
Dauricin
Decamethoniumbromid
Dendrotoxin
Diaminopyridin (3–4 DAP)
Diazepam
Doxacuriumchlorid
Doxorubicin
Erabutoxin-b
Epibatidindihydrochlorid
Felbamat
Foroxymithin
Gabapentin
Gallamin
Grayantoxin
Hexhydroazepinyl-Acetamid

Huperzin A
Latrotoxin-α
Lidocain, Procain, Mepivacain
Linopirdin
Lophotoxin
Methocarbamol
Methyllycaconitin
Mivacuriumchlorid
Neosaxitoxin
Neosurugatoxin
Pancuroniumbromid
Pancuronium-3-OH-Metabolit
Papaverin-HCl
Physostigmin
Pipercuronium
Kurzes Newtoxin-Alpha
Succinylcholinchlorid
Tetanustoxin
Tetanustoxintransporter
Tetrahydroaminoacridin
Tetrodotoxin
Tiagabin
Valium
Vecuronium
Vecuronium-3-OH-Metabolit
Veratridin
Vigabatrin
Vasamicol
Zink-Endopeptidase
zur Herstellung eines Diagnosemittels für die Auswahl eines Muskels und der geeigneten Stelle innerhalb des Muskels zur anschließenden Verabreichung durch intramuskuläre Injektion von Botulinustoxin.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Auswahl des Muskels zur darin erfolgenden Verabreichung von Botulinustoxin bestimmt wird durch:
a) Auswählen mindestens eines Muskels einer Muskelgruppe;
b) Injizieren des gewählten Muskels mit dem ausgewählten Mittel;
c) Beobachten von Muskelrelaxation in sowohl dem ausgewählten Muskel als auch anderen nicht-ausgewählten Muskeln in der Muskelgruppe, um Spillover, Muskeltonus und Ballance zu bestimmen;
d) Wiederholen von Schritten a) bis c) bis eine endgültige Muskelauswahl getroffen wird.

3. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das oder jedes Muskelrelaxantiums ausgewählt wird durch:
a) Stimulieren einer Gruppe von Muskeln mit elektrischen Pulsen in einem Labortier, um darin Krampf zu induzieren;
b) Injizieren eines ausgewählten Muskels der Muskelgruppe des Labortieres mit einem vorbereiteten Mittel;
c) Beobachten einer Krampfverminderung des injizierten ausgewählten Muskels des Labortieres;
d) Beobachten der Krampfverminderung eines nicht-ausgewählten Muskels der Muskelgruppe des Labortieres; und
e) Vergleichen der in den Schritten c) und d) gemachten Beobachtungen.

4. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Muskelrelaxantium Vecuronium umfasst.

5. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Muskelrelaxantium ein Schlagen α-Neurotoxin umfasst.

6. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Muskelrelaxantium Erabutoxin-b umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Auswahl eines Muskels zur Verabreichung darin von Botuli-

nustoxin bestimmt wird durch:
a) Stimulieren einer Gruppe von Muskeln mit elektrischen Pulsen, um Krampf darin zu induzieren;
b) Injizieren eines ausgewählten Muskels von der Muskelgruppe mit einem vorbereiteten Mittel;
c) Beobachten einer Krampfverminderung des injizierten ausgewählten Muskels;
d) Beobachten einer Krampfverminderung eines nicht-ausgewählten Muskels der Muskelgruppe; und
e) Vergleichen der in den Schritten c) und d) gemachten Beobachtungen:

8. Verwendung nach Anspruch 3 oder Anspruch 7, wobei der Schritt des Stimulierens einer Gruppe von Muskeln, Stimulieren der Gruppe bei einer Rate zwischen ungefähr 0,1 Hz bis ungefähr 200 Hz umfasst.

9. Verwendung nach Anspruch 3 oder Anspruch 7, wobei der Schritt des Stimulierens einer Gruppe von Muskeln weiter umfasst, Stimulieren der Muskelgruppe mit Rechteckpulsen von ungefähr 0,2 ms Dauer und einer Stärke, die ausreicht, um maximalen Krampf zu erzeugen.

10. Verwendung nach Anspruch 3 oder einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei der zu injizierende Muskel einen Tibialis-anterior Muskel umfasst.

11. Verwendung nach Anspruch 3 oder einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei der Schritt des Beobachtens einer Krampfverminderung eines nicht-ausgewählten Muskels, Beobachten einer Krampfverminderung eines ipsilateralen Soleus Muskels umfasst.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1A.



FIG. 1B.

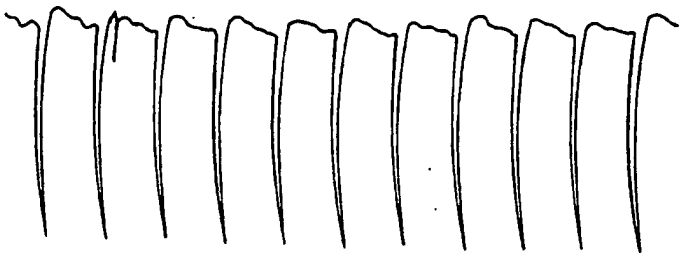


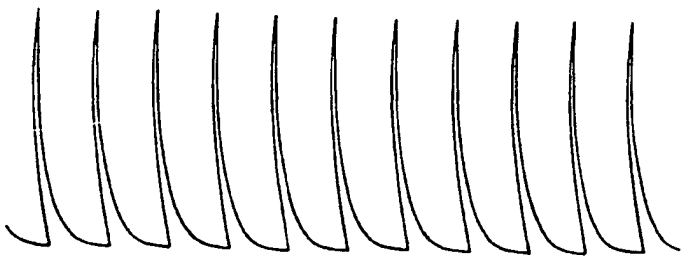
FIG. 1C.



FIG. 1D.



FIG. 1E.



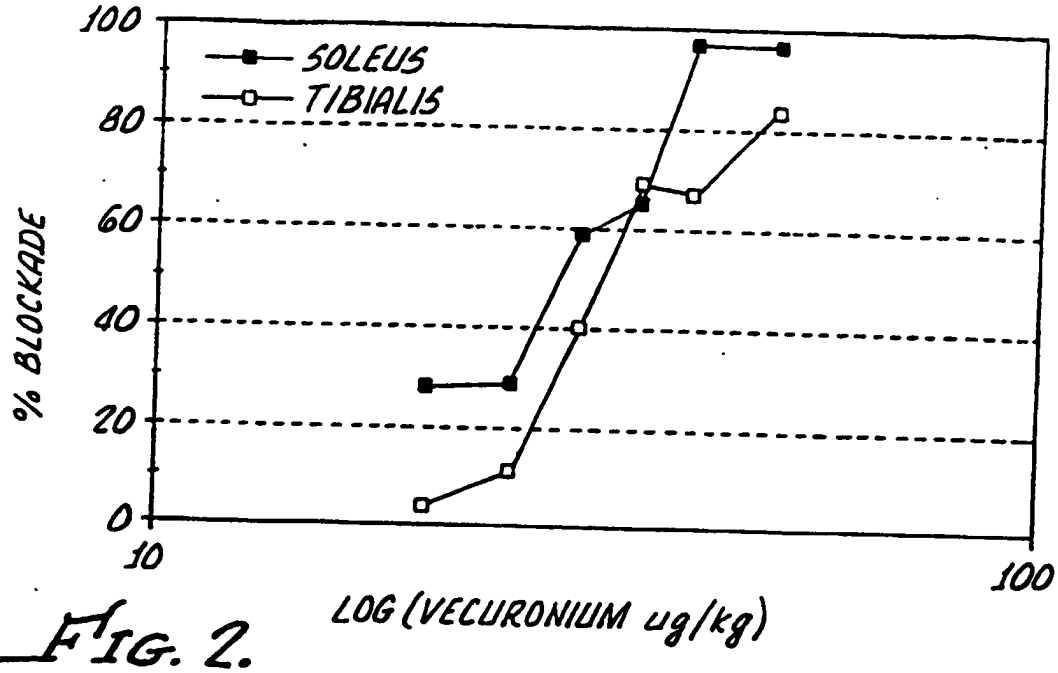

100
80
60
40
20
0
% BLOCKADE
SOLEUS
TIBIALIS
10
100
LOG (VECURONIUM ug/kg)

FIG. 2.

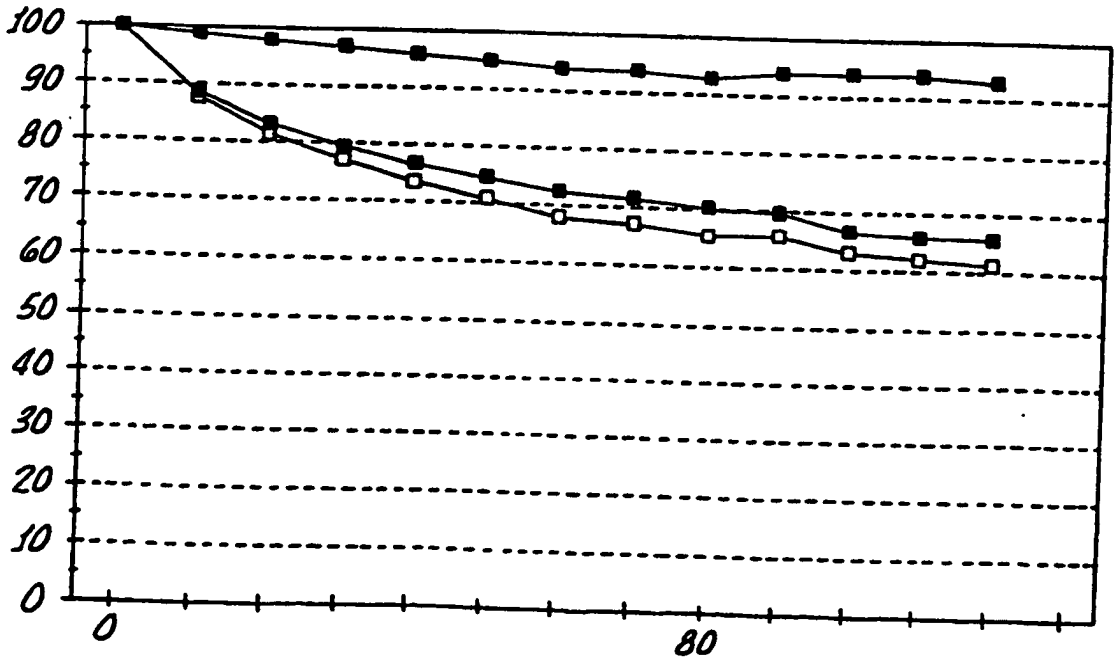

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
80

FIG. 7.

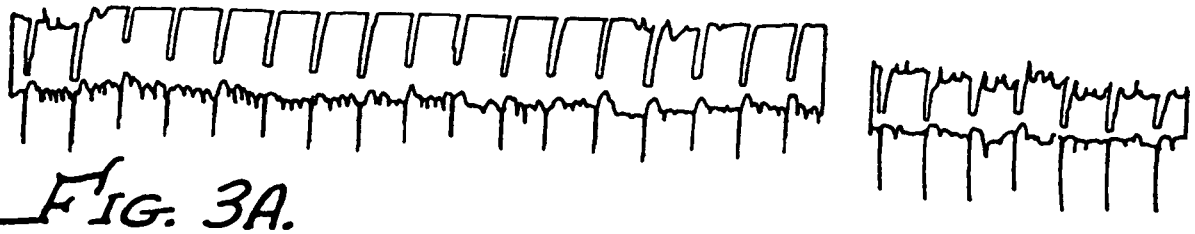


FIG. 3A.

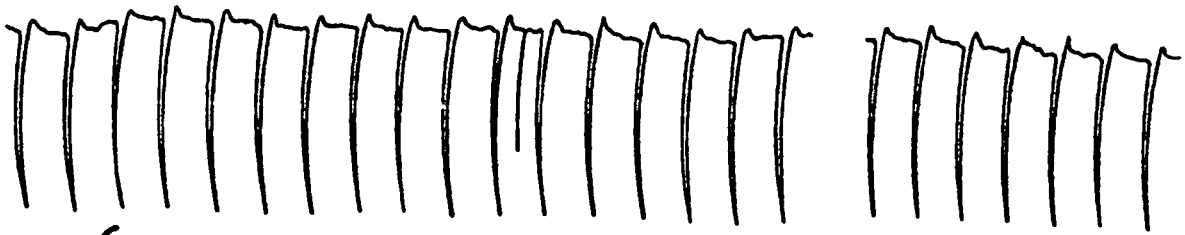


FIG. 3B.

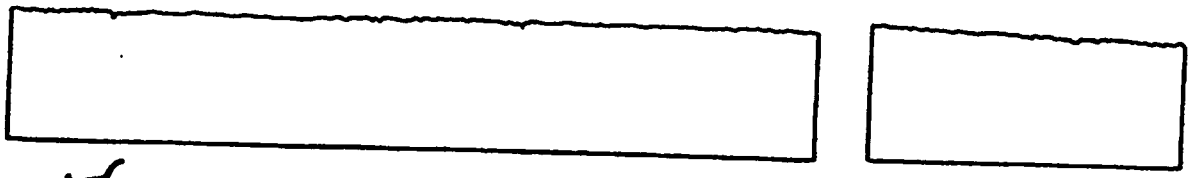


FIG. 3C.

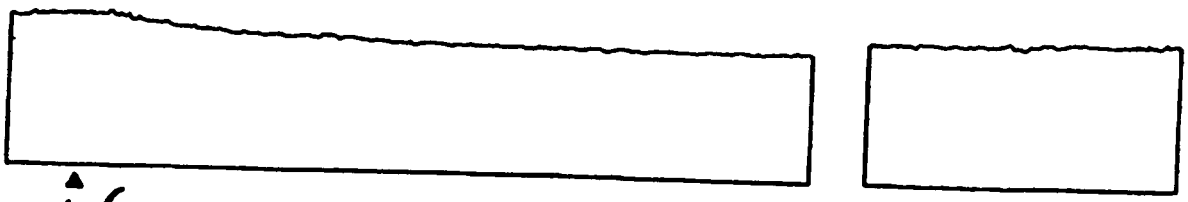


FIG. 3D.

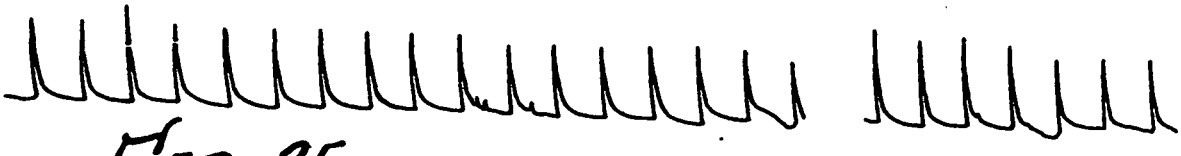


FIG. 3E.

FIG. 4A.

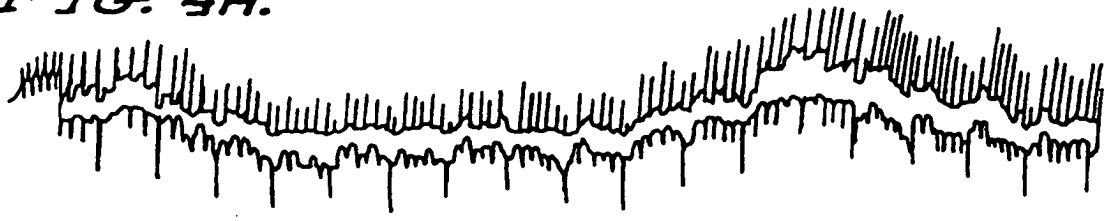


FIG. 4B.

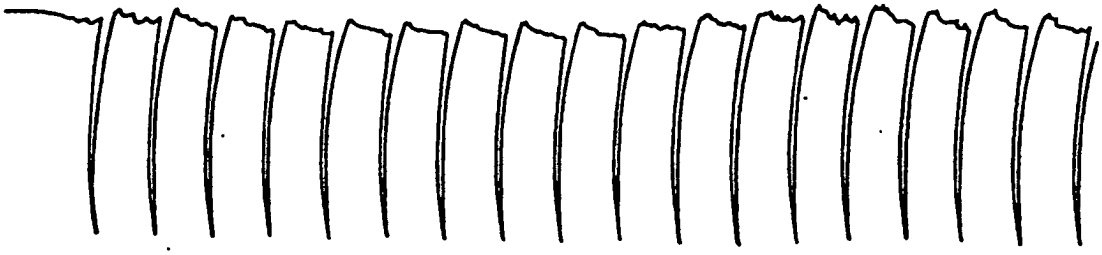
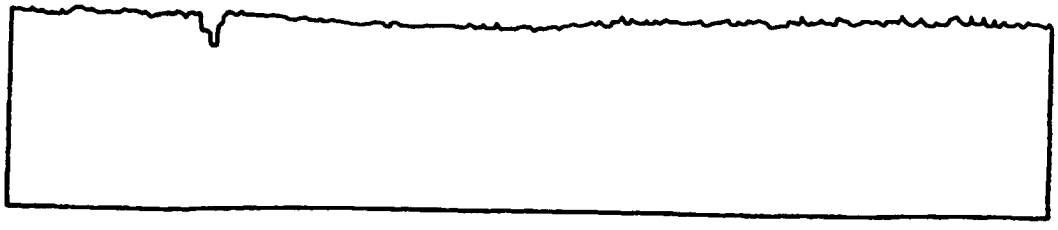


FIG. 4C.



FIG. 4D.



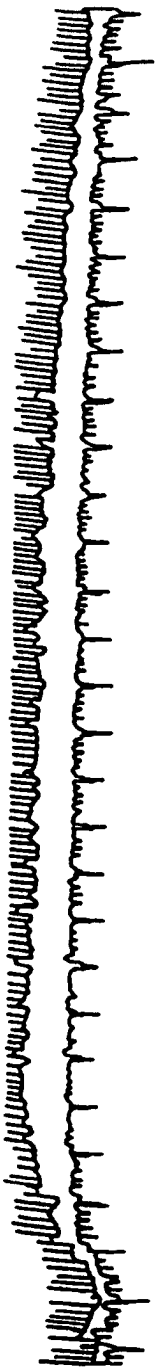


FIG. 5A.

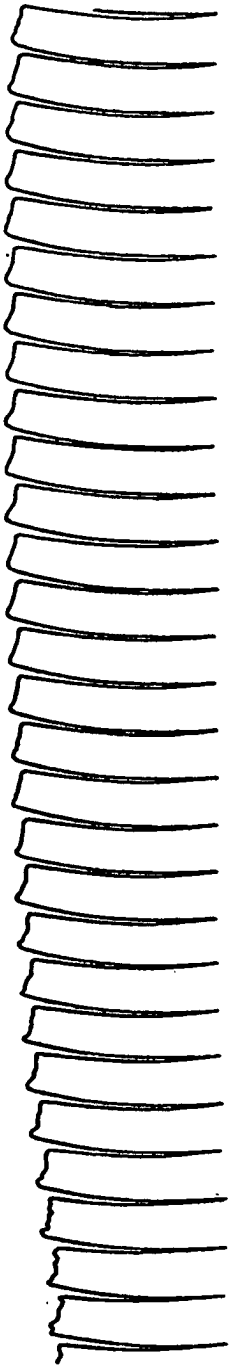


FIG. 5B.

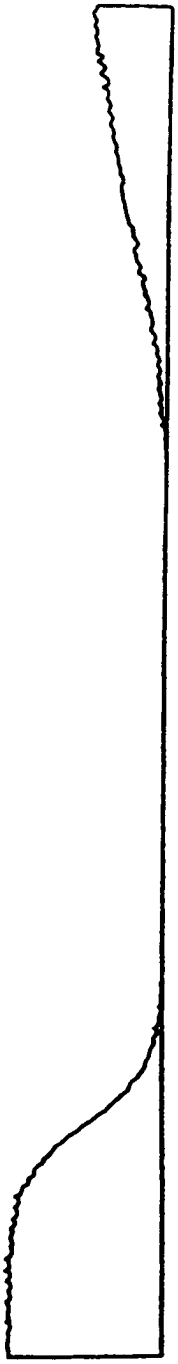


FIG. 5C.

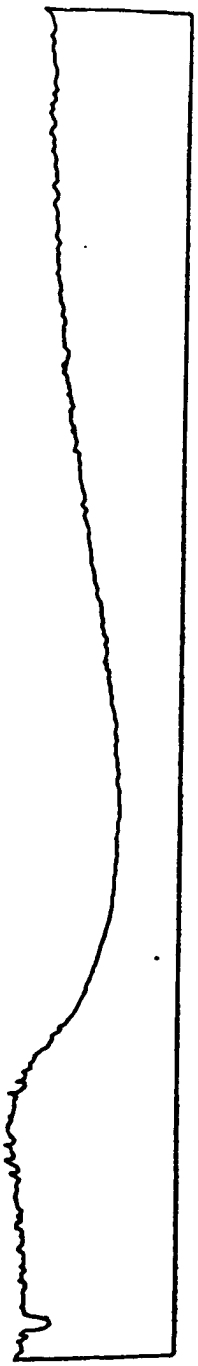


FIG. 5D.

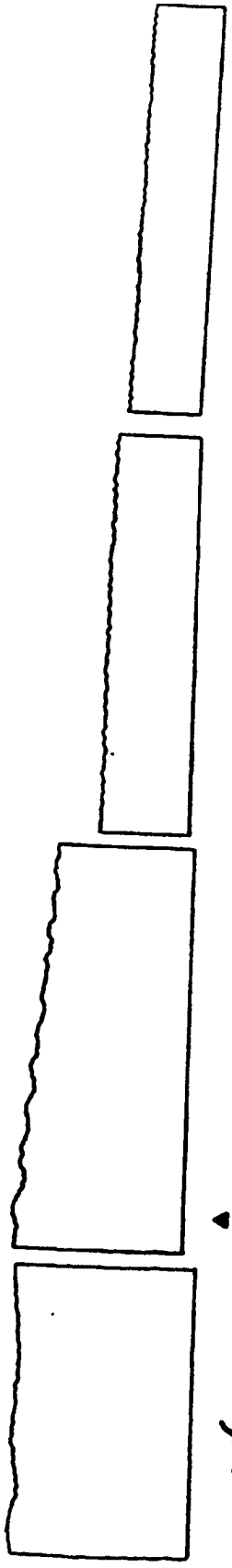


FIG. 6A.

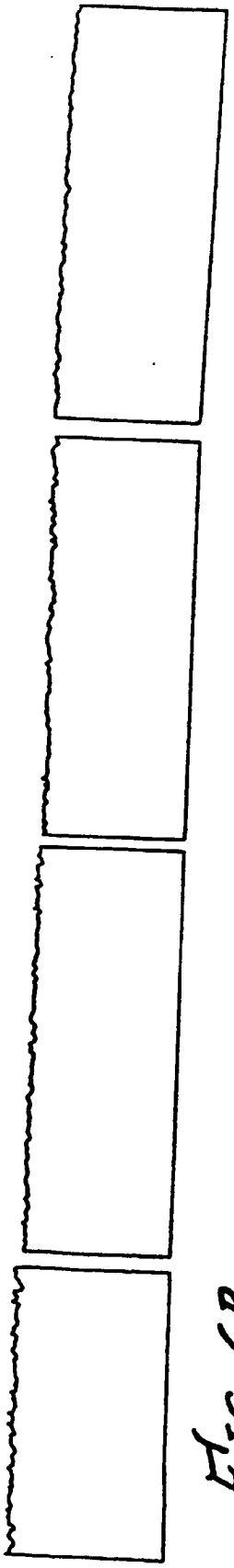


FIG. 6B.

FIG. 8A.

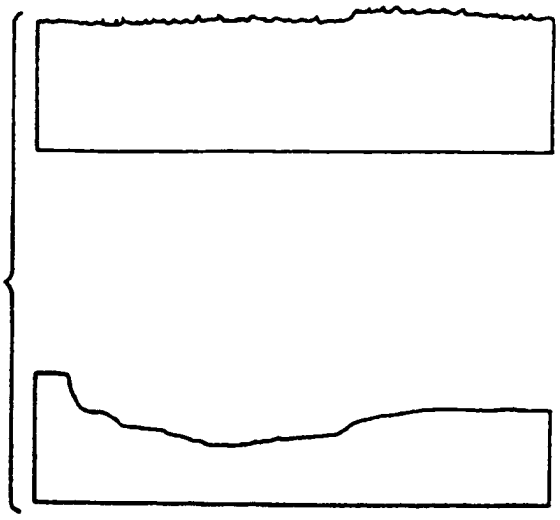


FIG. 8B.

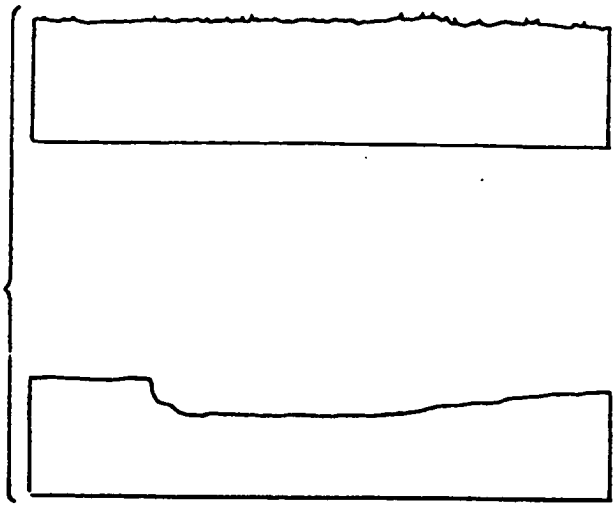
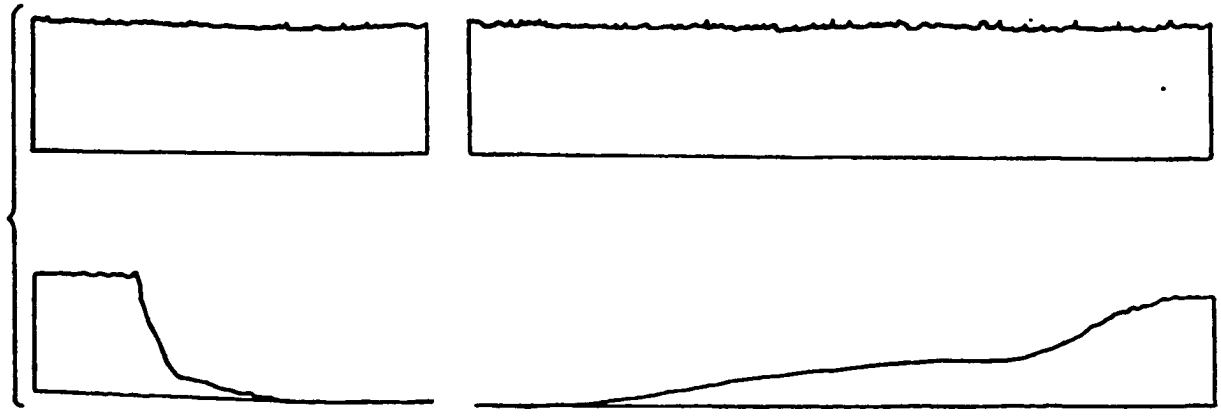


FIG. 8C.



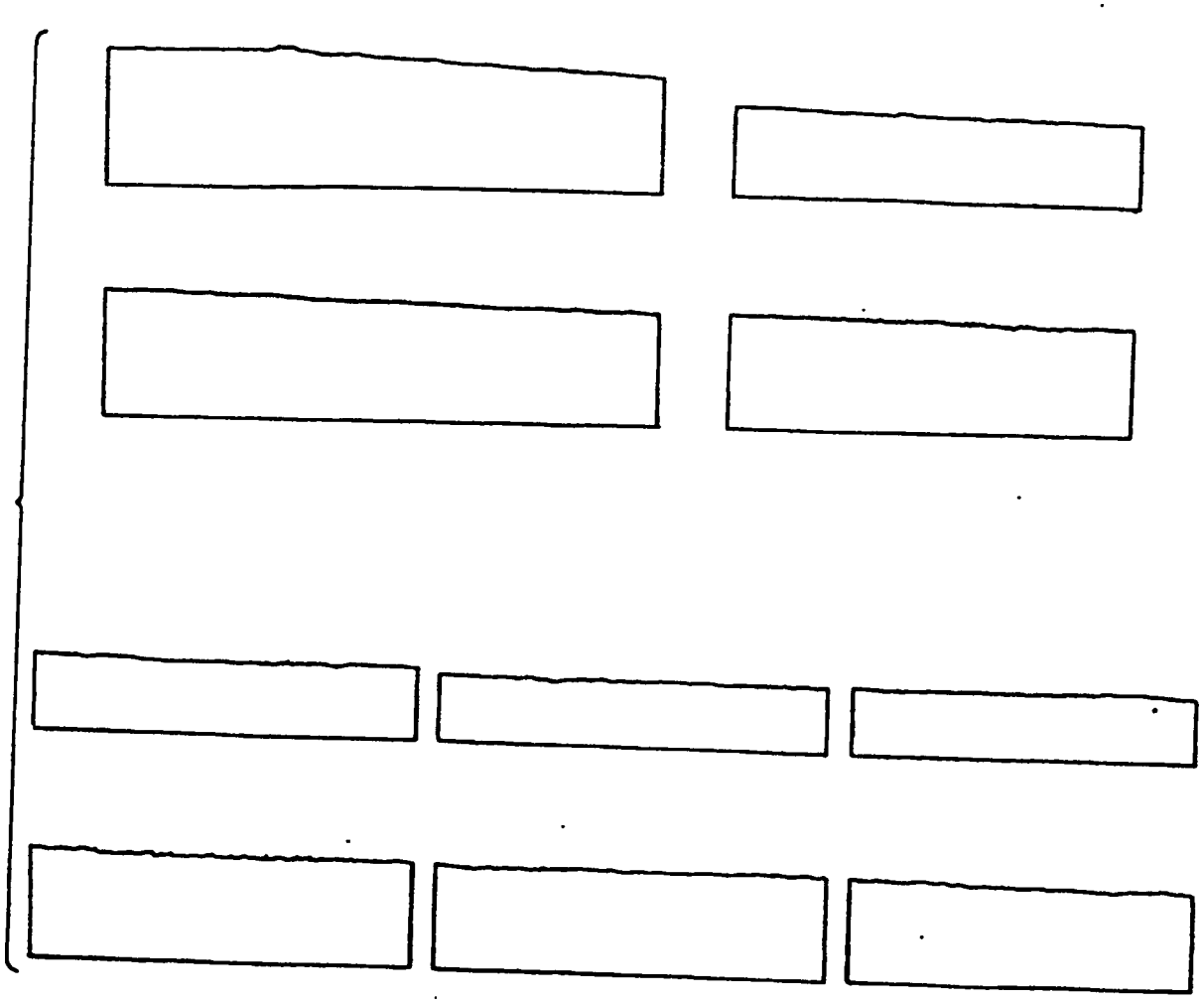


FIG. 9.

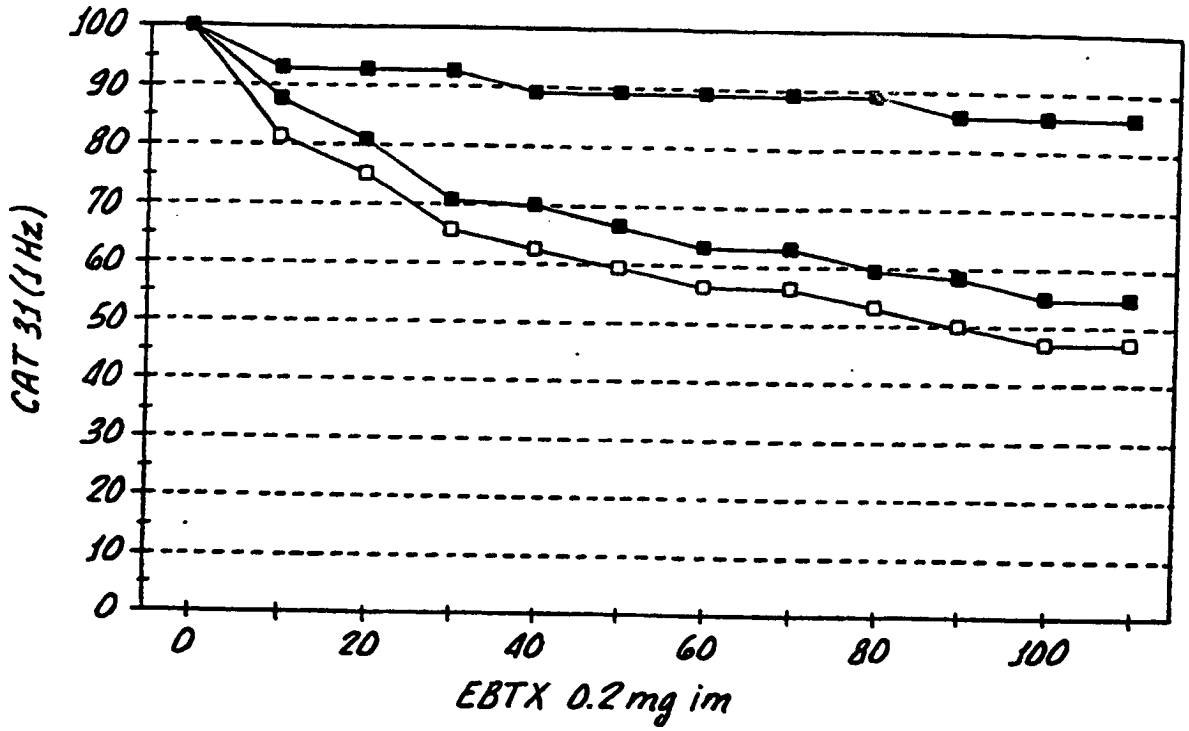

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CAT 31 (1 Hz)
0
20
40
60
80
100
EBTX 0.2 mg im

FIG. 10.

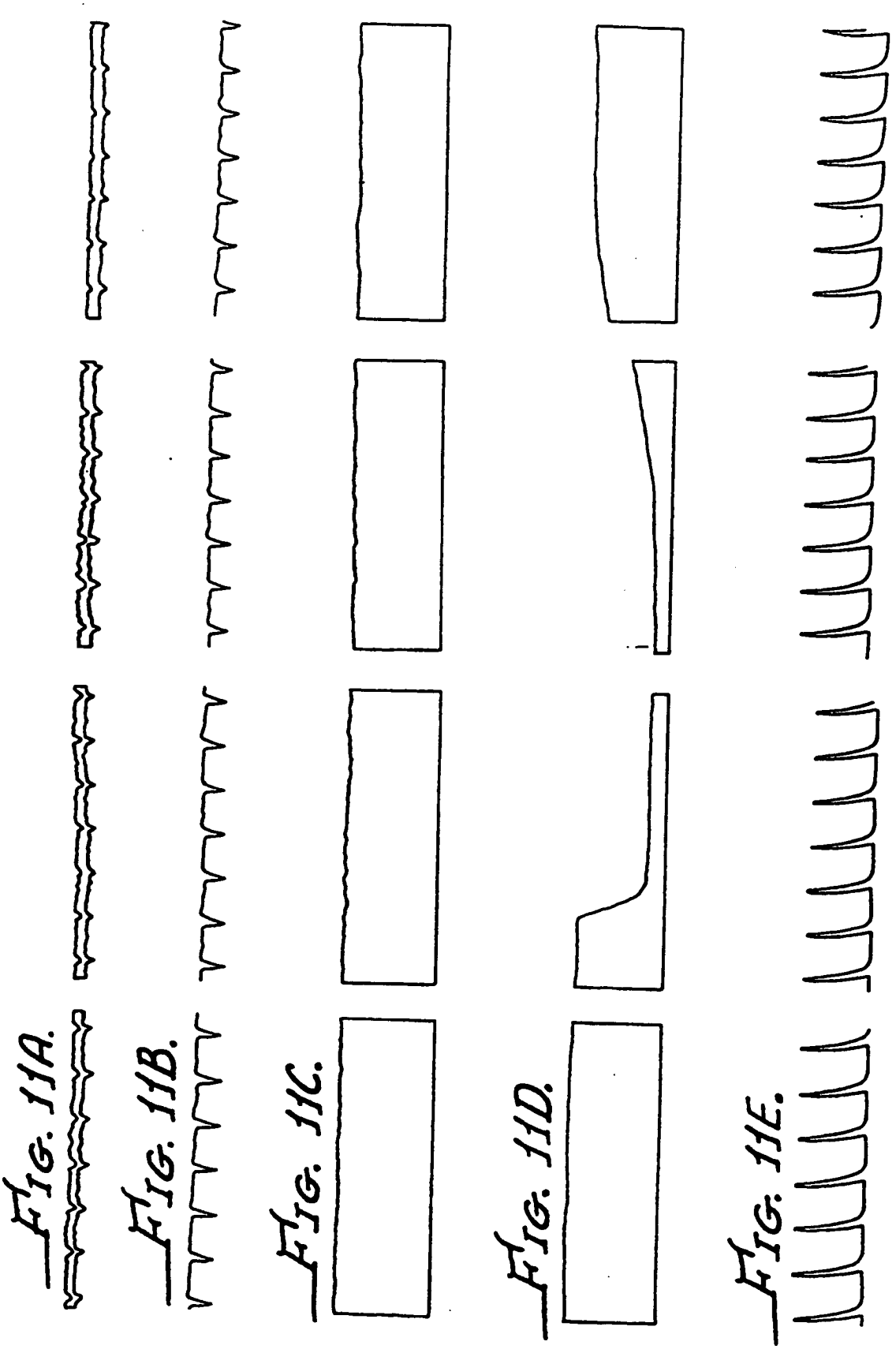


FIG. 11A.

FIG. 11B.

FIG. 11C.

FIG. 11D.

FIG. 11E.

FIG. 12A.

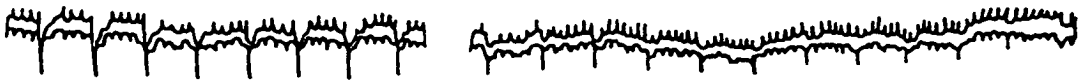


FIG. 12B.

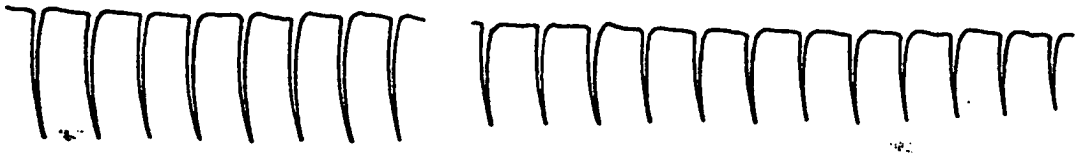


FIG. 12C.



FIG. 12D.

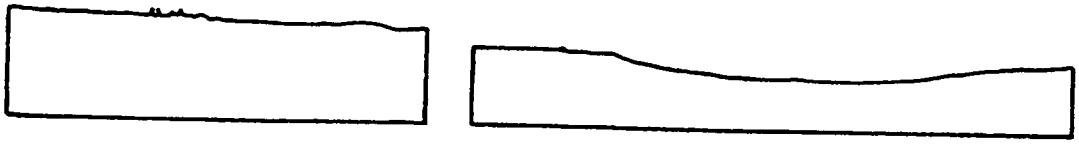


FIG. 12A.

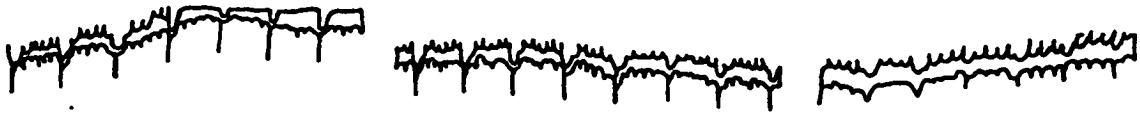


FIG. 12B.



FIG. 12C.

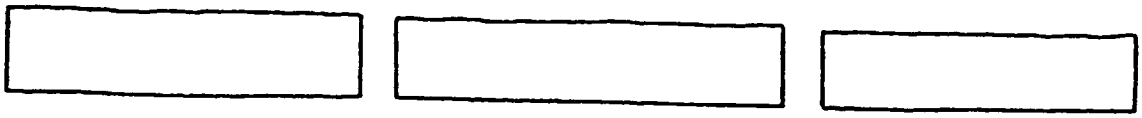
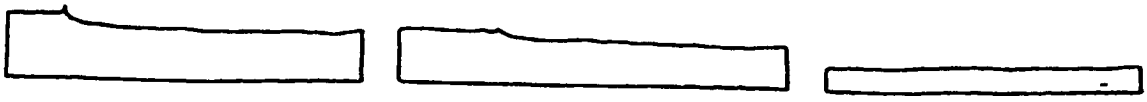


FIG. 12D.



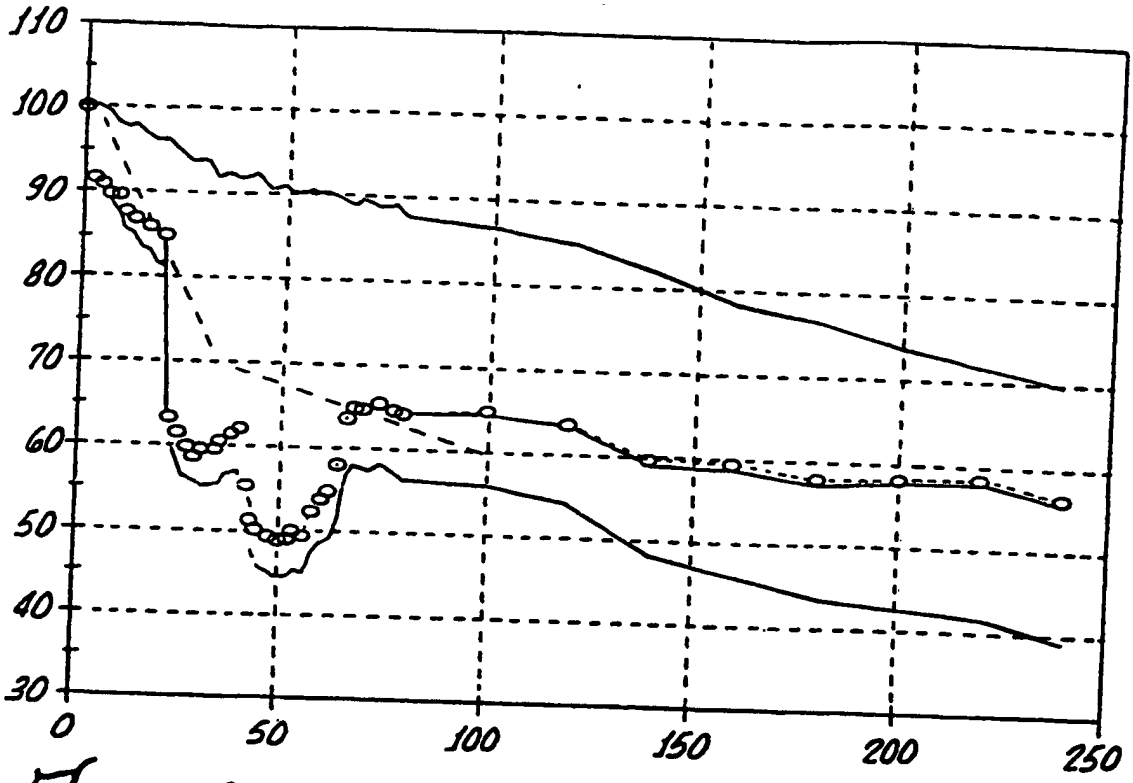

110
100
90
80
70
60
50
40
30
0
50
100
150
200
250

FIG. 13.

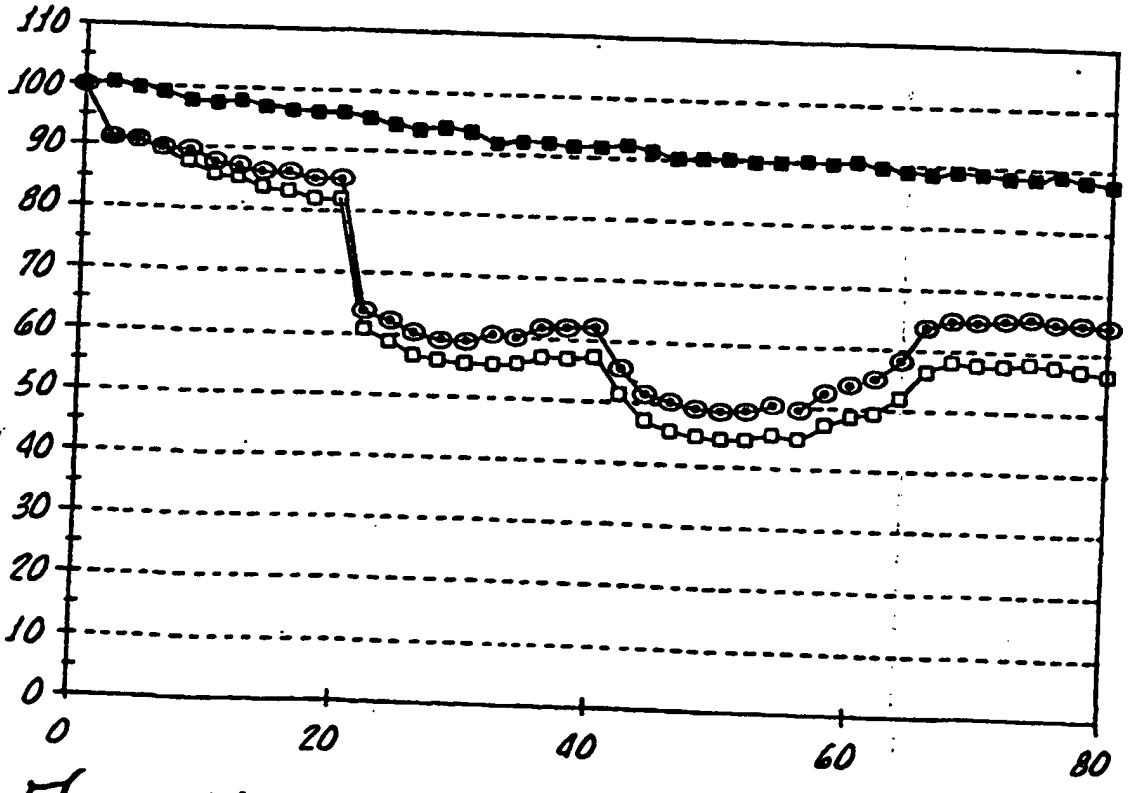

110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80

FIG. 14.