



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 324275

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61F 2/84 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/02 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19960226	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.07.19 PCT/CA94/00373
(22)	Inng.dag	1996.01.18	(85)	Videreføringsdag	1996.01.18
(24)	Løpedag	1994.07.19	(30)	Prioritet	1993.07.19, US, 94536
(41)	Alm.tilgj	1996.03.18			
(45)	Meddelt	2007.09.17			
(73)	Innehaver	The University of British Columbia, 2194 Health Sciences Mall, Room 331, IRC Building, Industry Liaison Office, BCV6T1Z3 VANCOUVER, CA Angiotech Pharmaceuticals Inc, 1618 Station Street, BCV6A1B6 VANCOUVER, CA			
(72)	Oppfinner	Helen M. Burt, Vancouver, BC, CA William L Hunter, 525 North Penticton Street, BCV5K3L7 VANCOUVER, CA Lindsay S. Machan, 2778 W 1st Street, BCV6K1H3 VANCOUVER, CA A. Larry Arsenault, Paris, ON, CA John K. Jackson, Vancouver, BC, CA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vikå, 0125 OSLO			

(54) Benevnelse **Stenter og fremgangsmåte for å fremstille slike**

(56) Anførte publikasjoner EP A 470569, WO A1 91/11193, WO A2 92/12717, WO A1 92/15286

(57) Sammendrag

Denne oppfinnelse fremskaffer blandinger som omfatter en anti-angiogen faktor og en polymer bærer. Representative eksempler på anti-angiogene faktorer er anti-invasiv faktor, retinsyre og derivater av denne, og taxol. Metoder som lukker igjen blodårer og eliminerer obstruksjoner i galleveier, urinrør, spiserør og luftrør/bronkier blir også beskrevet.

Teknisk område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører stenter og fremgangsmåter for å fremstille slike.

5 Bakgrunn for oppfinnelsen

10 Kreft er den nest hyppigste årsak til død i USA, og er ansvarlig for mer enn en femtedel av total dødelighet. I korthet er kreft karakterisert ved ukontrollert deling av en cellepopulasjon, som i de fleste tilfeller fører til dannelse av en eller flere svulster. Selv om kreft stort sett blir oppdaget raskere nå enn før, er mange kreftformer fremdeles ikke mulig å behandle til tross for tidlig diagnose.

15 En rekke metoder benyttes for tiden for å behandle kreft, for eksempel en rekke kirurgiske prosedyrer. Imidlertid vil mange pasienter som bare behandles med kirurgi (spesielt de med kreft i bryst, hjerne, tykktarm og lever) oppleve at sykdommen kommer tilbake. I tillegg til kirurgi blir mange kreftformer også behandlet med kombinasjoner av kjemoterapeutiske cellegifter (f.eks. vincristin, vinblastin, cisplatina, methotrexat, 5-fluoruracil (5-FU), etc.) og/eller stråling. Et problem med denne behandling er at strålings-terapeutiske og kjemoterapeutiske agens er toksiske også for normalt vev, noe som kan medføre livstruende bivirkninger. I tillegg er disse behandlingsmetoder svært ofte mislykket når man sammenligner med hyppigheten av vellykkete remisjoner.

20

I tillegg til kirurgiske, kjemiske og strålingsterapier har andre forsøkt å utnytte individets eget immunsystem for å eliminere kreftceller. For eksempel har noen foreslått bruk av bakterielle eller virale komponenter som tilsetningsstoff (adjuvanser) for å stimulere immunsystemet til å ødelegge svulstceller. (Se "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (ed.), Raven Press, New York, 1987.) Slike agens har vanligvis vært hjelpsomme som adjuvans og som uspesifikke stimuli i dyremodeller for kreftsvulster, men har til nå ikke blitt bevist å være generelt effektive i mennesker.

25

30 Lymfokiner har også blitt benyttet i behandling av kreft. I korthet er lymfokiner forbindelser som utskilles fra en rekke ulike celler, og som vanligvis har effekt på spesifikke celler under dannelsen av en immunrespons. Eksempler på lymfokiner er Interleukin (IL)-1, -2, -3 og -4, samt koloni-stimulerende faktorer (CSF) som G-CSF, GM-CSF og M-CSF. En forskergruppe har nylig benyttet IL-2 for å stimulere perifere blodceller, med den hensikt å ekspandere og produsere store mengder celler som kan være cytotoksiske mot svulstceller (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 313:1485-1492, 1985).

35

Andre har foreslått å benytte antistoff i behandling av kreft. I korthet kan antistoff fremskaffes som gjenkjenner visse antigener på celleoverflater som enten er unike eller mer hyppige på kreftceller enn på normale celler. Disse antistoff, eller "magiske kuler", kan benyttes enten
 5 alene eller konjugert med et toksin for spesifikt å oppsøke og drepe svulstceller (Dillman, "Antibody Therapy, Principles of Cancer Biotherapy, Oldham (ed.), Raven Press Lt., New York, 1987). Det er imidlertid et problem at de fleste monoklonale antistoff er fremskaffet fra mus, noe som medfører at hypersensitivitet mot museantistoff kan begrense dets effektivitet, spesielt etter gjentatte behandlinger. Vanlige bivirkninger er feber, svette- og frysetokter,
 10 utslett, leddbetennelser og nerverlammelser.

Et ytterligere problem med de nåværende metoder er at lokale tilbakefall og kontroll av lokalt begrenset sykdom utgjør store utfordringer i behandling av ondartet sykdom. Konkret har hvert år (i USA) totalt 630 000 pasienter lokalisert sykdom (ingen holdepunkter for
 15 spredning, metastaser) ved symptomdebut, dette representerer 64% av alle pasienter med kreftdiagnose (dette inkluderer ikke non-melanom hudkreft eller carcinoma in situ). For de fleste av disse pasienter representerer kirurgisk fjerning av sykdommen uten sammenligning den beste mulighet for å bli kurert, og faktisk vil 428 000 bli kurert etter den initielle behandling. Uheldigvis vil 202 000 (eller 32% av alle pasienter med begrenset sykdom) få
 20 tilbakefall etter behandlingen. Av disse vil 133 000 pasienter få tilbakefall på grunn av ny lokal sykdom (dvs. 21% av all med lokalisert sykdom), mens 68 000 pasienter vil få tilbakefall på grunn av fjernspredning (11% av alle med lokalisert sykdom). Ytterligere 102 139 pasienter vil dø hvert år som resultat av manglende evne til å kontrollere veksten av den lokale svulstsykdom.

25 Ingenting viser dette problem klarere enn brystkreft, som affiserer 186 000 kvinner hvert år i USA, og hvor dødeligheten er uendret de siste 50 år. Kirurgisk fjerning av sykdommen med operative inngrep som radikal mastektomi, modifisert mastektomi eller 'lumpektomi' er fortsatt den grunnleggende behandling for denne sykdom. Uheldigvis kommer 39% av de
 30 som kun har blitt behandlet med lumpektomi til å få lokale tilbakefall, og dette gjelder overraskende nok også 25% av de pasienter hvor mikroskopisk undersøkelse viser at operasjonskanten var fri for svulst og kreftceller. Opptil 90% av disse lokale tilbakefall vil komme innen 2 cm fra det tidligere operasjonsområde.

35 Tilsvarende har mer enn 113 000 dødsfall og 238600 nye tilfeller av spredning til lever blitt rapportert bare i Nordamerika i 1991. Gjennomsnittlig overlevelsestid for pasienter med leverspredning er bare 6,6 måned når leverlesjoner først har utviklet seg. Ikke-kirurgisk

behandling av leverspredning inkluderer systemisk kjemoterapi, stråling, kjemoembolisering (kjemisk blodproppdannelse), kjemoterapi i leverarterien, og intra-arteriell bestråling. Tiltross for at slike behandlingsregimer forbigående kan forminske størrelsen av leversvulstene (f.eks. i begynnelsen vil systemisk kjemoterapi og kjemoterapi i leverarterien redusere lesjoner hos

5 henholdsvis 15-20% og 80% av pasientene), så vil disse lesjonene alltid komme tilbake. Kirurgisk fjerning av leverspredning representerer den eneste mulighet for helbredelse, men en slik prosedyre er bare mulig hos 5% av pasienter med spredning, og bare hos 15-20% av pasienter med primær kreftsvulst i leveren.

10 En metode kalt 'terapeutisk embolisering' har blitt forsøkt for å behandle svulster med begrenset suksess. I korthet går denne ut på at blodårer som gir næring til en svulst blir lukket igjen ved at det injiseres et materiale som fremkaller blodproppdannelse i årene. Mange materialer har blitt utprøvet, omfattende autologe substanser som fett, blodpropper og opphakkete muskelfragmenter, i tillegg til ull, bomull, stålkuler, plast eller glasskuler,

15 "tantalum" pudder, forbindelser av silikon, radioaktive partikler, sterile absorberbare gelatinsvamper (Sterispon, Gelfoam), oksydert cellulose (Oxycel), stålfjærer, alkohol, frysetørket human dura mater ('den tykke hjernehinne') (Lyodura), mikrofibrillært kollagen (Avitene), kollagen fibriller (Tachotop), polyvinylalkohol svamp (PVA; Ivalon), barium-impregnerte silikonkuler (Biss) og avtagbare ballonger. Størrelsen på levermetastaser (spredningssvulstene) kan forbigående minske etter slik behandling, men svulstene

20 responderer vanligvis med at nye blodårer vokser inn i svulsten.

Kreftindusert blokkering av materialtransport gjennom kroppsveier, slik som galleganger, luftrør og bronkier, spiserør, blodårer og urinrør, er et problem som ofte oppstår ved

25 svulstdannelse. En anordning benevnt stent er blitt utviklet for å holde passasjer som har blitt blokkert av svulster eller andre stoffer åpne. Typiske eksempler på stenter er 'Wallstent', 'Strecker stent', 'Gianturco stent' og 'Palmaz stent'. Hovedproblemet med ulike stenter er imidlertid at de ikke hindrer innvekst av svulst eller betennelsesprodukter gjennom åpningene i stenten. Dersom dette materiale når innsiden av en stent og blokkerer hulrommet kan dette

30 resultere i en blokkering av kroppsveien hvor stenten ble plassert. I tillegg er tilstedeværelsen av en stent i kroppen et stimuli for at reaktivt vev eller betennelsesvev (f.eks. blodårer, celler som fibroblaster, hvite blodlegemer) skal invadere hulrommet i stenten og derved helt eller delvis lukke igjen passasjen.

35 Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer stenter og fremgangsmåter for å fremstille slike.

Sammendrag av Oppfinnelsen

I korthet fremskaffer denne oppfinnelsen stenter og fremgangsmåter for å fremstille slike. Stenten kjennetegnes ved at den omfatter en generelt rørformet struktur og paclitaxel, en
 5 paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat. Fremgangsmåte for fremstilling av stenten kjennetegnes ved at den omfatter belegging av en stent med (i) en anti-angiogen blanding omfattende en anti-angiogen faktor og en polymer bærer, eller (ii) en anti-angiogen faktor, der den anti-angiogene faktor er paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

10 Slike anordninger kan benyttes for behandling av kreft og andre angiogenese-avhengige sykdommer. En lang rekke molekyler kan benyttes som anti-angiogene faktorer, for eksempel anti-Invasiv Faktor, retinsyrer og deres derivater, taxol, taxol analoger og derivater, og medlemmer av gruppen som omfatter Suramin, vevsinhibitor av metalloproteinase-1, vevsinhibitor av metalloproteinase-2, plasminogen aktivator inhibitor-1 og plasminogen
 15 aktivator inhibitor-2. På samme måte kan en lang rekke polymerbærere benyttes, der representative eksempler er poly(etylen-vinylacetat) kryssbundet med 40% vinylacetat, poly(melkesyre-co-glykolsyre), polycaprolakton polymelkesyre, kopolymere av poly(etylen-vinylacetat) kryssbundet med 40% vinylacetat og polymelkesyre, og kopolymere av polymelkesyre og polycaprolakton. Blandingen kan være i form av partikler med en
 20 gjennomsnittlig størrelse på 15 til 200 mikrometer.

Anti-angiogene blandinger kan benyttes til å embolisere (lukke med blodpropp) en blodåre. Dette omfatter å tilføre blodåren en terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen blanding (som beskrevet over), slik at blodåren effektivt blir gjenlukket. Den anti-angiogene blanding
 25 kan tilføres en blodåre som ernærer en svulst.

Stenter og anti-angiogene blandinger kan benyttes til å utvide hulrommet i en kroppspassasje, noe som omfatter plassering av en stent som stort sett er rørformet og med overflaten belagt med en anti-angiogen blanding som beskrevet over i passasjen, slik at kroppspassasjen blir
 30 utvidet. Ulike metoder er beskrevet for å eliminere gallegangsobstruksjoner, omfattende innsetting av en gallestent i en gallepassasje; for å eliminere urinrørsobstruksjoner, omfattende innsetting av en stent i urinrøret; for å eliminere spiserørsobstruksjoner, omfattende innsetting av en stent i spiserøret; og for å eliminere obstruksjoner i luftrør/-bronkier, omfattende innsetting av en stent i luftrøret eller i bronkier. I hver av disse tilfellene
 35 har stenten en generelt rørformet struktur, og overflaten er dekket med en anti-angiogen blanding som beskrevet over.

Videre kan stenter og anti-angiogene blandinger benyttes til behandling av områder hvorfra svulster er fjernet, omfattende tilførsel av en anti-angiogen blanding som beskrevet over til kantene etter svulstfjernelsen når svulsten er tatt ut, slik at et lokalt tilbakefall med fremvekst av kreft og med dannelse av nye blodårer blir hemmet. Videre kan nydannelse av blodårer i hornhinnen (cornea) behandles omfattende tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen blanding, som beskrevet over, til hornhinnen, slik at dannelsen av blodårer blir hemmet. Den anti-angiogene blanding kan også omfatte et lokalt kortikosteroid.

Videre er metoder beskrevet som hemmer angiogenese hos pasienter med ikke-svulstdannende, angiogenese-avhengige sykdommer. Disse omfatter tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av en blanding omfattende taxol til en pasient med en ikke-svulstdannende, angiogenese-avhengige sykdom, slik at dannelsen av nye blodårer blir hemmet. Videre beskrives metoder for å embolisere blodårer i ikke-svulstdannende, angiogenese-avhengige sykdommer, omfattende tilførsel til blodåren av en terapeutisk effektiv dose av en blanding som omfatter taxol, slik at blodåren blir effektivt gjenlukket.

Videre beskrives metoder som ekspanderer hulrommet i en kroppspassasje, omfattende å føre en generelt rørformet stent som er blitt dekket med en blanding omfattende taxol i passasjen, slik at passasjen blir utvidet. Slike metoder medfører eliminasjon av gallegangsinnsnevninger, og omfatter innføring av en stent i en gallepassasje; eliminasjon av urinrørsinnsnevninger, omfattende å innføre en stent i urinrøret; eliminasjon av innsnevninger av spiserøret, omfattende innføring av en stent i spiserøret; og eliminasjon av innsnevninger i lufrør/bronkier, omfattende innføring av en stent i lufrør eller bronkier. I hver tilfelle har stenten en generelt rørformet struktur der overflaten er dekket med en blanding som omfatter taxol.

Videre beskrives metoder for behandling av områder hvor svulst har blitt fjernet, omfattende å tilføre en blanding omfattende taxol til kanten av operasjonssåret etter at svulsten har blitt fjernet, slik at lokalt tilbakefall med dannelse av kreft og nye blodårer på dette området blir hemmet. Videre beskrives metoder for behandling av dannelse av nye blodårer i hornhinnen, omfattende tilføring av en terapeutisk effektiv dose av en blanding som omfatter taxol til hornhinnen slik at dannelsen av nye blodårer blir hemmet.

Videre beskrives farmasøytiske produkter som omfatter (a) taxol i en beholder, og (b) et notat bundet til beholderen i en form som foreskrevet av et offentlig organ som regulerer produksjon, bruk eller salg av farmasøytiske produkter, og hvor dette notat informerer om godkjennelsen fra det offentlige organ av taxol for human eller veterinærbruk for å behandle

ikke-svulstdannende, angiogenese-avhengige sykdommer. I korthet krever Føderal lov i USA at bruk av et farmasøytisk midler for behandling av mennesker må være godkjent av et organ tilknyttet den føderale regjering. Ansvar for å gjennomføre denne bestemmelse er (i USA) the Food and Drug Administration, som utsteder relevante reguleringer for at man kan oppnå

5 slik godkjennelse, beskrevet i detalj i 21 U.S.C., paragrafene 301-392. Regulering av biologisk materiale omfattende produkter som er laget fra dyrevev er også beskrevet i 42 U.S.C., paragraf 262. Lignende godkjenninger blir forlangt i de fleste land, selv om reguleringene kan variere fra land til land.

10 Disse og andre aspekter av denne oppfinnelse vil bli klarlagt med henvisning til de følgende detaljerte beskrivelser og de vedlagte figurer. I tillegg gis ulike referanser i den videre tekst som i større detalj beskriver visse prosedyrer eller blandinger og som er inkludert som referanse i sin helhet.

15

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1A er et fotografi som viser en skallfri eggkultur på dag 6. Figur 1B er et digitalisert datamaskin-produsert bilde av levende, ufargete kapillærer tatt med et stereomikroskop

20 (forstørrelse 1040x). Figur 1C er en etseinnstøpning som viser "CAM" mikrovaskulatur, som får tilførsel av større underliggende blodårer (angitt med piler, 1300x). Figur 1D viser et lysmikroskopisk bilde av et 0,5 mm tykt plastikk-støpt snitt som er kuttet på tvers gjennom "CAM". Dette fotografi viser sammensetningen av "CAM", som består av et ytre dobbelt

25 ektoderm-lag (Ec), et mesoderm-lag (M) som inneholder kapillærer (piler) og spredte adventitia-celler, og et enkelt endoderm-lag (En) (400x). Figur 1E er et elektronmikroskopisk bilde (3500x) hvor en typisk kapillærstruktur er vist, med tynnveggede endotel-celler (pilhoder) og en tilknyttet pericytt-celle.

Figurene 2A, 2B, 2C og 2D er en serie av digitaliserte bilder av fire forskjellige, ufargete

30 CAM tatt etter de har blitt utsatt for taxol i 48 timer.

Figurene 3A, 3B og 3C er en serie fotografier av 0,5 mm tykke plastikksnitt kuttet på tvers gjennom et taxol-behandlet CAM på tre ulike steder innen den avaskulære sone.

35 Figurene 4A, 4B og 4C er en serie elektronmikroskopiske bilder som ble tatt på de samme steder som (henholdsvis) Figur 3A, 3B og 3C vist over.

Figur 5 er et søylediagram som viser størrelsesfordeling av mikrokuler uttrykt som antall (5% ELVAX med 10 mg natriumsuramin i 5% PVA).

Figur 6 er et søylediagram som viser størrelsesfordeling av mikrokuler uttrykt som vekt (5% ELVAX med 10 mg natriumsuramin i 5% PVA).

Figur 7 er et kurvediagram som viser vekten av innkapslet natriumsuramin som funksjon av suramin vekt i 1 ml 5% ELVAX.

Figur 8 er et kurvediagram som viser prosent innkapslet suramin som funksjon av suramin vekt i ELVAX.

Figur 9 er et søylediagram som viser størrelsesfordeling av 5% ELVAX mikrokuler som inneholder 10 mg natriumsuramin preparert i 5% PVA som inneholder 10% NaCl.

Figur 10 er et søylediagram som viser størrelsesfordeling uttrykt som vekt av 5% PLL mikrokuler som inneholder 10 mg natriumsuramin preparert i 5% PVA som inneholder 10% NaCl.

Figur 11 er et søylediagram som viser størrelsesfordeling uttrykt som antall av 5% PLL mikrokuler som inneholder 10 mg natriumsuramin preparert i 5% PVA som inneholder 10% NaCl.

Figur 12 er en kurve som viser frisetning av natriumsuramin som funksjon av tid.

Figur 13 er en illustrasjon av en representativ utførelse av leversvulstembolisering.

Figur 14 er en illustrering av innføring av en representativ stent dekket med en anti-angiogen blanding.

Figur 15A er en kurve som viser aggregering av mikrosfærer som funksjon av blandingsforholdet EVA:PLA. Figur 15B er et scanning elektronmikroskopisk bilde som viser størrelsen på 'små' mikrokuler. Figur 15C er et scanning elektronmikroskopisk bilde som viser størrelsen på 'store' mikrokuler. Figur 15D er en kurve som viser in vitro frisetning av taxol fra 0,6% vekt/volum taxol-tilsatt 50:50 EVA:PLA polymerblanding mikrokuler ut i fosfat-bufret saltvann (pH 7,4) ved 37°C som funksjon av tid. Åpne sirkler er 'små' mikrosfærer, lukkede sirkler er 'store' mikrosfærer. Figur 15E er et fotografi av et CAM som

viser resultater av taxol frisetning fra mikrosfærer (MS). Figur 15 F er et fotografi tilsvarende 15 E med større forstørrelse.

Figur 16A er en kurve som viser frisetningshastigheter fra polycaprolakton mikrosfærer med 1%, 2%, 5% eller 10% taxol i fosfat-bufret saltvann ved 37°C. Figur 16B er et fotografi som viser et CAM behandlet med kontroll-mikrosfærer. Figur 16C er et fotografi som viser et CAM behandlet med 5% taxol-tilsatte mikrokuler.

Figurene 17 A og 17B er to kurver som viser henholdsvis frisetning av taxol fra EVA hinner, og prosenten taxol som er igjen i de samme hinner. Figur 17C er en kurve som viser oppsvulming av EVA/F127 i fravær av taxol som funksjon av tid. Figur 17D er en kurve som viser oppsvulming av EVA/Span 80 hinner i fravær av taxol som funksjon av tid. Figur 17E er en kurve som viser relasjon spanning/trykk for ulike kombinasjoner av EVA/F127.

Figurene 18A og 18B er to kurver som viser smeltepunkter av PC/MePEG polymer blandinger som funksjon av prosent MePEG i formuleringen (18A), og prosent økning av tid nødvendig for PCL-krem ved 60°C for å begynne å gå over til fast form, som funksjon av mengden MePEG i formuleringen (18B). Figur 18 C er en kurve som viser skjørheten av ulike PCL/MePEG polymerblandinger. Figur 18 D er en kurve som viser prosent vektendring som funksjon av tid for polymerblandinger med varierende MePEG konsentrasjoner. Figur 18 E er en kurve som viser hastigheten av taxol frisetning som funksjon av tid fra ulike polymerblandinger tilsatt 1% taxol. Figurene 18F og 18G er kurver som viser effekten av å variere mengde taxol på den totale mengde taxol frisatt fra en 20% MePEG /PCL blanding. Figur 18H er en kurve som viser effekten av MePEG på tensjonsstyrken hos en MePEG/PCL polymer.

Figur 19A er et fotografi som viser kontroll (ikke-behandlet) termokrem på en CAM. Figur 19B er et fotografi av en 20% taxolholdig termokrem på en CAM.

Figurer 20A og 20B er to fotografier av en CAM som har en svulst behandlet med kontroll (ubehandlet) termokrem. Figurene 20C og 20D er to fotografier av en CAM som har en svulst behandlet med taxolholdig termokrem.

Figur 21A er en kurve som viser effekten av taxol/PCL på svulstvekst. Figurene 21B og 21C er to fotografier som viser effektene som henholdsvis kontroll, 10% og 20% taxolholdig termokrem har på svulstvekst.

Figur 22A er et fotografi av lysmikroskopisk snitt av et synovium fra et ledd injisert med fosfat-bufret saltvann. Figur 22B er et fotografi av synovium fra et ledd injisert med mikrosfærer. Figur 22C er et fotografi av lysmikroskopisk snitt av brusk fra et ledd injisert med fosfat-bufret saltvann, og Figur 22D er et fotografi av brusk fra ledd injisert med mikrosfærer.

Detaljert Beskrivelse av Oppfinnelsen

10 Foreliggende oppfinnelse angår en stent kjennetegnet at den omfatter en generelt rørformet struktur og paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

I en foretrukken utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter stenten en polymer. Polymeren kan være en biodegraderbar polymer eller en ikke-biodegraderbar polymer. I en foretrukken
15 utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter stenten poly (D,L-laktid-co-glykolid). I en annen foretrukken utførelsesform ifølge oppfinnelsen er stenten en vaskulær stent.

Foreliggende oppfinnelse angår videre en fremgangsmåte for fremstilling av en stent kjennetegnet ved at den omfatter belegging av stenten med

20 (i) en anti-angiogen blanding omfattende en anti-angiogen faktor og en polymer bærer, eller (ii) en anti-angiogen faktor, der den anti-angiogene faktor er paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

I en foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen belegges stenten ifølge punkt (i) ovenfor. I en foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge
25 oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor paclitaxel. I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor en paclitaxel analog. I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor et paclitaxel derivat.

30 I en foretrukken utførelseform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den polymere bæreren biodegraderbar. I en annen foretrukken utførelseform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den polymere bæreren ikke-biodegraderbar. I en annen foretrukken utførelseform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter den polymere bæreren poly
35 (D,L-laktid-co-glykolid).

I en foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen belegges stenten ifølge punkt (ii) ovenfor. I en foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor paclitaxel. I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor en paclitaxel analog. I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er den anti-angiogene faktor et paclitaxel derivat.

I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen bindes en anti-angiogen blanding direkte til stenten.

I en annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen belegges stenten med en subsans som vil absorbere den anti-angiogene blandingen eller den anti-angiogene faktor.

En annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter sammenveiving av et nettverk belagt med en anti-angiogen blanding inn i stenten.

En annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter innføring av stenten i et "erme" eller et nettverk som omfatter eller er dekket med en anti-angiogen blanding.

En annen foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter konstruering av en stent med en anti-angiogen blanding.

I en utførelsesform er stenten fremstilt ved fremgangsmåten i følge oppfinnelsen en vaskulær stent.

Flere metoder kan benyttes for å bestemme den anti-angiogene aktivitet av de ulike faktorer, for eksempel kylling chorioallantoimembran ("CAM") analyse. I korthet og beskrevet i større detalj nedenfor i eksempler 2A og 2C, blir en del av skallet fra et ferskt befruktet kyllingegg fjernet, og en metylcelluloseplate som inneholder en prøve av den anti-angiogene faktor som skal testes blir plassert på membranen. Etter flere dager (f.eks. 48 timer) kan hemmingen av blodårevekst som er fremkalt av prøven enkelt bli estimert ved å visualisere kylling chorioallantoimembranen i området rundt metylcelluloseplaten. Hemming av blodårevekst kan også bli bestemt kvantitativt, for eksempel ved å bestemme antall og

størrelse av blodårene som omgir metylcelluloseplaten, og sammenligne med en kontroll metylcelluloseplate. Spesielt effektive anti-angiogene faktorer gir komplett hemming av dannelse av nye blodårer i analysemetodene beskrevet over.

- 5 En rekke analysemetoder kan også benyttes for å bestemme effektiviteten av anti-angiogene faktorer in vivo, for eksempel musemodeller som har blitt utviklet for dette formål (se Robertson et al., Cancer Res. 51: 1339-1344, 1991). I tillegg beskrives en rekke representative in vivo analysemetoder, som er relevante for ulike aspekter ved oppfinnelsen som er beskrevet her i større detaljer i Eksempler 5-7 og 17-19.

10

Som beskrevet over angår denne oppfinnelse stenter omfattende en generelt rørformet struktur og paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat, og fremgangsmåte for fremstilling av en stent, omfattende belegging av stenten med (i) en anti-angiogen blanding omfattende en anti-angiogen faktor og en polymer bærer, eller (ii) en anti-angiogen faktor, 15 der den anti-angiogene faktor er paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

- Andre eksempler på anti-angiogene faktorer inkluderer anti-invasiv faktor, retinsyre og derivater av denne, taxol, og medlemmer av gruppen som består av suramin, vevsinhibitor av metalloproteinase-1, vevsinhibitor av metalloproteinase-2, plasminogen aktivator inhibitor-1, 20 og plasminogen aktivator inhibitor-2. Disse og andre anti-angiogene faktorer blir diskutert i større detalj senere.

- I korthet består anti-invasiv faktor, eller 'AIF', som fremstilles fra brusk ekstrakter, av bestanddeler som er ansvarlig for å hemme vekst av nye blodårer. Disse bestanddeler omfatter 25 en familie av 7 lavmolekylære proteiner (<50000 dalton) (Kuettner and Pauli, "Inhibition of neovascularization by a cartilage factor" in Development of the Vascular System, Pitman Books (Ciba Foundation Symposium 100), pp. 163-173, 1983), inkludert flere proteiner som har hemmende effekter på flere proteaser (Eisenstein et al., Am. J. Pathol. 81, 337-346, 1975; Langer et al., Science 193: 70-72, 1976, and Horton et al., Science 199:1342-1345, 1978).
- 30 AIF kan enkelt fremstilles ved metoder som er kjent innen faget (e.g., Eisenstein et al., supra; Kuettner and Pauli, supra; and Langer et al., supra). Rensete bestanddeler av AIF, som brusk-avledet inhibitor ("CDI") (se Moses et al., Science 248:1408-1410, 1990) kan også enkelt fremstilles og benyttes i denne oppfinnelse.

- 35 Retinsyrer endrer stoffskifte av komponenter i den ekstracellulære matriks, og fremkaller derved hemming av angiogenese. Tilsetning av prolinanaloger, angiostatisk steroider eller heparin kan benyttes for synergistisk å øke den anti-angiogene effekt av transretinsyre.

Retinsyre, samt derivater av denne som også kan benyttes, kan enkelt skaffes fra kommersielle kilder, for eksempel Sigma Chemical Co. (#R2625).

Taxol er et høykvalitets derivatisert diterpenoid (Wani et al., J. Am. Chem. Soc. 93:2325, 1971) som har blitt fremstilt fra høstet og tørket bark fra Taxus brevifolia (Stillehavsbarlind) og Taxomyces Andreanae og Endophytic Fungus fra Stillehavsbarlind (Stierle et al., Science 60:214-216, 1993). Generelt virker taxol ved å stabilisere mikrotubulære strukturer, idet tubulin bindes slik at det dannes unormale mitotiske spindler. 'Taxol' (som her må forstås å inkludere analoger og derivater av taxol, slik som for eksempel 'baccatin' og 'taxotere') kan enkelt fremstilles med teknikker som er kjent for fagpersoner (se også WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076, U.S Patent Nos. 5,294,637, 5,283,253, 5,279,949, 5,274,137, 5,202,448, 5,200,534, 5,229,526 og EP 590267) eller det kan skaffes fra en rekke kommersielle kilder, f.eks. Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri (#T7402 - fra Taxus brevifolia).

Suramin er en polysulfonert naftylureaforbindelse som vanligvis benyttes som en trypanosom-inaktiverende forbindelse. I korthet blokkerer suramin den spesifikke binding til celleoverflaten av en rekke vekstfaktorer, som f.eks. blodplatederivert vekstfaktor ('PDGF'), epidermal vekstfaktor ('EGF'), transformerende vekstfaktor ('TGF-beta'), insulinlignende vekstfaktor ('IGF-1') og fibroblast vekstfaktor ('beta-FGF'). Suramin kan fremstilles ved bruk av kjente teknikker eller fremskaffes fra en rekke kommersielle kilder, som f.eks. Mobay Chemical Co., New York (se Gagliardi et al, Cancer Res. 52:5073-5075, 1992; og Coffey, Jr., et al., J. of Cell Phys. 132:143-148, 1987).

Vevsinhibitor av metalloproteinaser-1 ('TIMP') blir utskilt fra endotelceller som også skiller ut MTPaser. TIMP er et glykoprotein med en molekylvekt på 28,5 kilodalton (kDa). TIMP-1 regulerer angiogenese ved å binde til aktiverte metalloproteinaser, og derved hemme innvekst av blodårer i den ekstracellulære matriks. Vevsinhibitor av metalloproteinaser-2 ('TIMP-2') kan også benyttes for å hemme angiogenese. I korthet er TIMP-2 et 21 kDa ikke-glykosylert protein som binder til metallproteinaser i både de aktive og latente proenzymformer. Både TIMP-1 og TIMP-2 kan skaffes fra kommersielle kilder som f.eks. Synergen, Boulder, Colorado.

Plasminogen-aktivator inhibitor-1 (PA) er et 50 kDa glykoprotein som er tilstede i blodplater, og som også kan syntetiseres av endotelceller og muskelceller. PAI-1 hemmer t-PA og urokinase-plasminogen-aktivator på den basolaterale side av endotelet, og regulerer i tillegg den fibrinolytiske, fibrinopløsende prosess. Plasminogen aktivator inhibitor-2 (PAI-2) er

vanligvis tilstede i blod bare under spesielle omstendigheter som f.eks. ved graviditet og under tilstedeværelse av svulster. I korthet er PAI-2 et 56 kDa protein som skilles ut av monocytter og makrofager. Det antas å regulere fibrinolytisk aktivitet, spesielt ved å hemme urokinase-plasminogen-aktivator og vevsplasminogen-aktivator, og derved forebygge fibrinolyse.

En stor gruppe andre anti-angiogene faktorer kan også benyttes. Representative eksempler inkluderer blodplatefaktor 4 (Platelet Factor 4) (Sigma Chem. Co., #F1385); protaminsulfat (Clupeine) (Sigma Chem. Co., #P4505); sulfaterte kitinderivater (fremstilt fra dronningkrabbeskall) (Sigma Chem. Co., #C3641; Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, 1991); sulfaterte polysakkarid-peptidoglykan kompleks (SP-PG) (funksjonen til dette kompleks kan økes ved tilstedeværelse av steroider som østrogener og tamoxifen citrat); staurosporin (Sigma Chem. Co., #S4400), modulatorer av matriks metabolisme, som for eks. prolinanaloger {[L-azetidin-2-karboksylsyre (LACA) (Sigma Chem. Co. #A0760), cishydroksyprolin, d,L-3,4-dehydroprolin (Sigma Chem. Co. #D0265), thiaprolin (Sigma Chem. Co., #T0631), alfa,alfa dipyridyl (Sigma Chem. Co., #D7505), beta-aminopropionitril fumarat (Sigma Chem. Co., #A3134)]}; MDL 27032 (4-propyl-5-(4-pyridinyl)-2(3H)-oxazon; Merion Merrel Dow Research Institute); Methotrexat (Sigma Chem. Co., #A6770; Hirata et al., Arthritis ad Rheumatism 32:1065-1073, 1989); Mitoxantron (Polverini and Novak, Biochem. Biophys. Res. Comm. 140:901-907); heparin (Folkman, Bio. Phar. 34:905-909, 1985; Sigma Chem. Co., #P8754); interferoner (e.g., Sigma Chem. Co., #13265); 2-makroglobulin-serum (Sigma Chem. Co., #M7151); ChIMP-3 (Pavloff et al., J. biol. Chem. 267:17321-17326, 1992); chymostatin (Sigma Chem. Co., #C7268; Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, 1992); cyclodekstrin tetradekasulfat (Sigma Chem. Co., #C4767); Eponemycin; Estramustin (tilgjengelig fra Sigma, Wang and Stearns, Cancer Res 48:6262-6271, 1988); Fumagallin (Sigma Chem. Co., #F6771; Canadian Patent No. 2,024,306; Ingber et al., Nature 348:555-557, 1990); gull natriumthiomalat ("GST"; Sigma G4022; Matsubara and Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, 1987); (D-penicillamin ("CDPT"; Sigma Cem. Co., "P4875 eller P5000(HCl)); beta-1-antikollagenase-serum; alfa2-antiplasmin (Sigma Chem. Co., A0914; Holmes et al., J. biol. Chem., 262(4):1659-1664, 1987) Bisantren (National Cancer Institute); Lobenzarit dinatrium(N-(2)-karboksyfenyl-4-kloroantronilsyre dinatrium eller "CCA"; Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, 1992); Thalidomid, angiostatisk steroid, AGM-1470, karboksyaminolmidazol, metalloproteinaseinhibitorer som BB94 og peptidet CDPGYIGSR-NH2 (Sekvens ID No. 1) (Iwaki Glass, Tokyo, Japan).

Anti-angiogene blandinger kan også omfatte en rekke forbindelser i tillegg til den anti-angiogene faktor og den polymere bærersubstans. For eksempel kan anti-angiogene

blandinger benyttet i fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen også inneholde en eller flere antibiotika, antiinflammatoriske forbindelser (antiflogistika), antivirale forbindelser, antifungale forbindelser og/eller antiprotoso forbindelser. Representative eksempler på antibiotika inkludert i blandingene som er beskrevet her inkluderer penicilliner, cephalosporiner som cefadroxil, cefazolin, cefaclor; aminoglykosider som gentamycin og torbramycin; sulfonamider som sulfamethoxazol; og metronidazol. Representative eksempler på anti-inflammatoriske forbindelser inkluderer steroider som prednison, prednisolon, hydrokortison, adrenokortikotroft hormon og sulfasalazin; og non-steroid anti-inflammatoriske medikamenter ('NSAIDS') som aspirin, ibuprofen, naproxyn, fenoporfen, indometacin og fenylobutazon. Representative eksempler på antivirale forbindelser inkluderer acyklovir, ganciklovir, zidovudin. Representative eksempler på antifungale medikamenter inkluderer: nystatin, ketoconazol, griseofulvin, flucytosin, miconazol, clotrimazol. Representative eksempler på antiprotoso-agens inkluderer: pentamidinisethionat, quinin, klorokvin og meflokin.

Anti-angiogene blandinger benyttet i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også inneholde et eller flere hormoner som skjoldbruskkjertel-hormon (tyroksin), østrogen, progesteron, kortison og/eller veksthormon, andre biologisk aktive molekyler slik som insulin, samt TH1 (f.eks. interleukiner -2, -12 og -15, gamma-interferon eller TH2 (f.eks. interleukiner -4 og -10) cytokiner.

Anti-angiogene blandinger benyttet i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også omfatte ytterligere ingredienser, som surfaktanter (overflateaktive forbindelser) (enten vanntiltrekkende, hydrofile eller vannavstøtende, hydrofobe; se Eksempel 13), antineoplastiske eller kjemoterapeutiske agens (f.eks. 5-fluoruracil, vinblastin, doxyrubicin, adriamycin, eller tamocifen), radioaktive forbindelser (f.eks. Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212, og Bi-212) eller toksiner (f.eks. ricin, abrin, difteritoksin, koleratoksin, gelonin, "pokeweed" antiviral protein, tritin, Shigella toksin og Pseudomonas eksotoksin A).

Som beskrevet over, omfatter de anti-angiogene blandinger en anti-angiogen faktor og en polymer bærersubstans. I tillegg til de mange anti-angiogene faktorer og andre forbindelser som er diskutert i teksten over kan anti-angiogene blandinger inneholde mange ulike polymere bærere, inkluderende for eksempel både biodegraderbare og ikke-biodegraderbare substanser. Representative eksempler på biodegraderbare substanser er albumin, gelatin, stivelse, cellulose, dextraner, polysakkarider, fibrinogen, poly(D,L- melkesyre), poly(D,L-laktid-co-glykolid), poly(glykolid), poly(hydroksybutyrat), poly(alkylkarbonat) og poly(ortho-

estere) (for generell oversikt, se Illum, L., Davids S.S. (eds.) "Polymers in Controlled Drug Delivery", Wright, Bristol, 1987; Arshady, J. *Controlled Release* 17:1-22, 1991; Pitt, *Int. J. Phar.* 59:173-196, 1990; Holland et al., *J. Controlled Release* 4:155-180, 1986).

Representative eksempler på ikke-degraderbare polymere er EVA-kopolymere, silikongummi og poly(metylmetakrylat). Spesielt gunstige polymere bærere er EVA- kopolymere (f.eks. ELVAX 40, poly(etylen-vinylacetat) kryssbundet med 40% vinyl acetat; DuPont), poly(melke-co-glykolsyre), polycaprolakton, polymelkesyre, kopolymere av poly(etylen-vinylacetat) kryssbundet med 40% vinylacetat og polymelkesyre, og kopolymere av polymelkesyre og polycaprolakton.

Polymere bærere kan fremstilles i en rekke ulike former, for eksempel som nanosfærer eller mikrosfærer, stavformete strukturer, piller, plater eller kapsler (se f.eks, Goodell et al., *Am. J. Hosp. Pharm.* 43:1454-1461, 1986; Langer et al., "Controlled release of Macromolecules from polymers" in *Biomedical Polymers, Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use*, Goldberg E.P., Nakagim, A. (eds.) Academic Press, pp.113-137, 1980, Rhine et al., *J. Pharm. Sci.* 69:265-270, 1980; Brown et al., *J. Pharm. Sci.* 72:1181-1185, 1983; and Bawa et al., *J. Controlled Release* 1:259-267, 1985).

Anti-angiogene blandinger (som omfatter en eller flere anti-angiogene faktorer og en polymer bærer) er fortrinnsvis laget på en måte som tar hensyn til det forventede bruksområde. Den anti-angiogene blanding burde, innen de foretrukne aspekter i denne oppfinnelse, være biokompatibel og frigi en eller flere anti-angiogene faktorer over et tidsrom på flere uker til måneder. I tillegg burde de anti-angiogene blandinger i denne oppfinnelse være stabile i flere måneder og kunne produseres og vedlikeholdes under sterile forhold.

De anti-angiogene blandinger kan bli produsert i alle størrelser varierende fra nanosfærer til mikrosfærer (f.eks. fra 0,1 mikrometer til 500 mikrometer), avhengig av det spesifikke bruksområdet. For eksempel er det vanligvis en fordel når man skal indusere embolisering av en svulst (som diskutert senere) å produsere den anti-angiogene blandingen i mikrosfærer på mellom 15 og 500 mikrometer, mer fordelaktig mellom 15 og 200 mikrometer og mest fordelaktig mellom 25 og 150 mikrometer størrelse. Slike nanopartikler kan også enkelt bli applisert som en dusj (spray) som størkner til en film eller et belegg. Nanopartikler (også kalt "nanosfærer") kan bli laget i mange størrelser, for eksempel fra 0,1 mikrometer til 3 mikrometer, fra 10 mikrometer til 30 mikrometer, og fra 30 til 100 mikrometer (se Eksempel 8).

Anti-angiogene blandinger kan også bli produsert for en rekke andre formål, utfra informasjonen som presenteres her. For å tilføre anti-angiogene blandinger til hornhinnen, for eksempel, kan blandingen bli inkorporert i polymere som nanopartikler (se generelt Kreuter J. Controlled Release 16:169-176, 1991; Couvreur and Vauthier J. Controlled Release 17:187-198, 1991). Slike nanopartikler kan også tilføres som dusj som storkner til en film eller et belegg. Nanopartikler (også kalt 'nanosfærer') kan lages i mange størrelser, for eksempel fra 0,1 mikrometer til 3 mikrometer, fra 10 mikrometer til 30 mikrometer, og fra 30 til 100 mikrometer (se Eksempel 8).

- 10 Anti-angiogene blandinger anvendt i fremgangsmåten ifølge oppfinnelse kan også produseres i en rekke ulike krem- eller geleformer. I en utførelse av oppfinnelsen er for eksempel anti-angiogene blandinger angitt som er flytende ved en temperatur (f.eks. temperatur over 37°C, slik som 40°C, 45°C, 50°C, 55°C eller 60°C), og er i fast form eller halvveis flytende ved en annen temperatur (f.eks. omgivelsestemperatur eller enhver temperatur som er under 37°C).
- 15 Slike termokremer kan enkelt bli preparert med de opplysninger som gis her (se f.eks. Eksempler 10 og 14).

- Den anti-angiogene blanding kan bli dannet som en film. Det er fordelaktig dersom slike filmer vanligvis er tynnere enn 5, 4, 3, 2 eller 1 mm, mer fordelaktig om de er tynnere enn 0,75 mm eller 0,5 mm, og mest fordelaktig dersom de er tynnere enn 500 til 100 mikrometer. Det er fordelaktig at slike filmer er fleksible med en god tensjonsstyrke (f.eks. større enn 50, mer fordelaktig større enn 100, og enda mer fordelaktig med størrelse over 150 eller 200 N/cm²), gode adhesjonsegenskaper (dvs. bindes lett til fuktige eller våte overflater), og har en kontrollert permeabilitet. Representative eksempler på slike filmer blir lagt frem i eksemplene (se f.eks. Eksempel 13).

Representative eksempler på inkorporering av anti-angiogene faktorer, slik som inn i en polymer bærersubstans, blir beskrevet i større detalj i Eksemplene 3, 4 og 8-15.

30 ARTERIELL EMBOLISERING

- Blandingene beskrevet over kan benyttes for å oppnå embolisering av en blodåre, noe som omfatter tilførsel inn i blodåren av en terapeutisk tilstrekkelig dose av en anti-angiogen blanding (som beskrevet over) slik at blodåren blir effektivt gjenlukket. Terapeutisk effektive doser som passer for å gjenlukke blodårer kan enkelt bli bestemt v.h.a. opplysningene som gies her, og som finnes i Eksempel 6. Den anti-angiogene blanding kan tilføres blodårer som gir næring til en svulst (se Figur 13).

I korthet finnes det en rekke kliniske situasjoner (f.eks. blødning, svulstutvikling) hvor det ville være ønskelig å redusere eller helt å fjerne blodtilførsel til et organ eller en kroppsdel. Som beskrevet i større detalj nedenfor, kan dette bli oppnådd ved å injisere anti-angiogene

blandinger inn i en ønsket blodåre gjennom et selektivt plassert kateter (se Figur 13). Løsningen vil da passere gjennom blodbanen til den kiles fast i mikrovaskulaturen og derved føre til en enten fysisk eller kjemisk tilstopping av blodåren. Den reduserte eller opphørte blodtilførsel til det utvalgte vevsområdet resulterer i et infarkt (celledød forårsaket av utilstrekkelig tilførsel av oksygen og næring) eller redusert blodtap fra en skadet blodåre.

For å bli brukt i emboliseringsbehandling bør anti-angiogene blandinger være ikke-toksiske, trombogene, lette å injisere gjennom blodårekatetere, og røntgentette, de bør fremkalle raske og permanente effekter, de bør være sterile, og de bør være lett tilgjengelige i ulike former eller størrelser på tidspunktet for prosedyren. I tillegg bør blandingen helst føre til en langsom (ideelt sett over et tidrom på flere uker til måneder) frisetning av en anti-angiogen faktor. Spesielt fordelaktige anti-angiogene blandinger bør ha en forutsigbar størrelse på 15-200 mikrometer etter injeksjon inn i blodåresystemet. Det er fordelaktig hvis de unngår å aggregere i større klumper både i løsning eller etter injeksjon. I tillegg bør de foretrukne blandinger ikke endre form eller fysikalske egenskaper under lagring før bruk.

Emboliseringsbehandling kan benyttes på minst tre hovedmåter for å bidra ved behandling av neoplasmer: (1) for en bestemt behandling av svulster (vanligvis godartete); (2) for preoperativ embolisering; og (3) for palliativ, lindrende embolisering. I korthet er det slik at godartete svulster i noen tilfeller kan bli behandlet med suksess ved embolisering alene.

Eksempler på slike svulster er enkle svulster utsprunget fra blodkarsystemet (f.eks. hemangiomer), endokrine svulster slik som paratyroide adenomer (kjertelsvulster fra biskjoldbruskkjertelen), og godartete bensvulster.

For andre svulster (f.eks. kreftsvulst i nyre) kan preoperativ embolisering benyttes timer eller dager før kirurgisk fjernelse av svulsten i den hensikt å redusere operativt blodtap, forkorte operasjonens varighet, og redusere risiko for spredning av levedyktige, ondartete celler forårsaket av kirurgisk manipulering av svulsten. Mange svulster kan bli embolisert preoperativt med suksess, som for eksempel svulster i nese-svelg, 'jugularis glomus-svulster', meningiomer, kjemodektomer og vagus-neuomer.

Embolisering kan også benyttes som en primær behandlingsteknikk for inoperable krefttilfeller, for å forlenge livslengden hos pasienter med langt fremskreden sykdom.

Embolisering kan gi en markert bedring i livskvalitet hos pasienter med ondartete svulster ved å forminske og forbedre ubehagelige symptomer som blødning, venøs blodoppopping, og sammenpressing av luftrør. Den største forbedring oppnådd via palliativ embolisering av svulster kan imidlertid finnes hos pasienter som lider av hormoneffekter fra ondartete endokrine svulster, hvor spredning av karsinoide tumorer og vekst av andre endokrine svulster som insulinomer og glukagonomer kan være meget langsomt voksende og likevel gi betydelige plager på grunn av de hormonelle syndromer som de forårsaker.

Generelt blir emboliseringsbehandling med anti-angiogene blandinger utført på samme måte uavhengig av lokalisering. I korthet utføres angiografi (et kart over blodårene) av det område som skal emboliseres ved å injisere et røntgentett kontrastmiddel gjennom et kateter som er lokalisert i en arterie eller vene (avhengig av stedet som skal bli embolisert) mens et røntgenbilde blir tatt. Kateteret kan innføres enten gjennom hud eller ved kirurgi. Blodåren blir så embolisert ved å sende anti-angiogene blandinger gjennom kateteret inntil blodstrømmen har stanset. Tilstopping av blodåren kan verifiseres ved å gjenta den angiografiske undersøkelse.

Emboliseringsbehandling resulterer vanligvis i at blandinger som inneholder anti-angiogene faktorer blir fordelt i de ekstracellulære områder av svulsten eller den vaskulære masse som skal behandles. Den fysik dominerende mengde av embolipartiklene som lukker igjen det arterielle hulrom resulterer i tilstopping av blodtilførsel. I tillegg til denne effekt hindrer også tilstedeværelsen av anti-angiogen faktor(er) dannelsen av nye blodårer som kan ernære svulsten eller den vaskulære masse, noe som forsterker den devitaliserende effekt ved at blodtilførselen er avbrutt.

Det burde derfor være klart at en rekke type svulster kan bli embolisert ved å benytte de beskrevne blandinger. Beskrevet i korthet blir svulster inndelt i to klasser: godartete (benigne) og ondartete (maligne). I en godartet svulst beholder cellene sine differensierte egenskaper, og de deler seg ikke på en helt ukontrollert måte. I tillegg er svulsten lokal og sprer seg ikke. I en ondartet svulst er cellene blitt udifferensierte, de svarer ikke på kroppens vekst- og hormonsignaler, og de deler seg på en ukontrollert måte; svulsten er invasiv og har evne til å spre seg til fjerne områder (metastasing).

Metastaser (sekundære svulster) i leveren kan bli behandlet ved å benytte emboliseringsterapi. I korthet blir et kateter innført via lårarterien eller overarmarterien og ført frem til leverarterien ved styring via gjennomlysning. Kateteret blir ført frem til arterietreet i leveren så langt som er nødvendig for en fullstendig blokkering av årene som forsyner svulst(ene) mens

så mange arteriegrener som mulig blir spart som forsyner normalt vev. Under ideelle betingelser ville dette være en segmental gren av leverarterien, men det er mulig at hele leverarterien etter forgrening av den gastroduodenale arterie (som forsyner magesekk og tolvfingertarm), eller t.o.m. flere separate arterier, må blokkeres, avhengig av størrelsen på svulsten og dens individuelle blodtilførsel. Med en gang den ønskete kateterposisjon er nådd, blir arterien embolisert ved å sprøyte inn anti-angiogene blandinger (som beskrevet over) gjennom arteriekateteret inntil blodstrømmen i arterien som skal blokkes opphører, helst etter 5 minutters observasjon. Tilstopping av arterien kan bli bekreftet ved å injisere røntgenkontrast gjennom kateteret og vise ved gjennomlysning eller røntgenbilde at blodåren som tidligere ble fylt med kontrastmiddel nå ikke lenger blir det. Den samme prosedyre kan repeteres for hver tilførende arterie som skal lukkes.

Som beskrevet over, kan både godartete og ondartete svulster bli embolisert under benyttelse av de tidligere beskrevne blandinger. Representative eksempler på godartete leversvulster er hepatocellulært adenom, kavernøst hemangiom, og fokal nodulær hyperplasi. Andre godartete svulster som er mer sjeldne og ofte ikke har kliniske manifestasjoner kan også bli behandlet. Disse inkluderer gallegangsadenomer, gallegangcystadenomer, fibromer, lipomer, leiomyomer, mesotheliomer, teratomer, myxomer og nodulære regenerative hyperplasier.

Ondartete leversvulster blir vanligvis inndelt i to kategorier: primære og sekundære. Primære svulster oppstår direkte fra vevet hvor de blir funnet. En primær leversvulst kommer således fra cellene som utgjør leveren (slik som hepatocytter og galleceller). Representative eksempler på primære leverkreftsvulster som kan bli behandlet med arteriell embolisering inkluderer hepatocellulært karsinom, cholangio-karsinom, angiosarkom, cystadenokarsinom, platecellekarsinom, og hepatoblastom.

En sekundær svulst eller metastase er en svulst som oppstod et annet sted i kroppen, men som nå har spredd seg til fjerntliggende organer. Den vanligste spredningsvei er direkte vekst inn i omgivende strukturer, spredning gjennom blodåre eller lymfeåresystemene, og langsmed vevsflater og kroppshuler (bukhulevæske, hjerne-ryggmargvæske etc). Sekundære leversvulster er en av de hyppigste dødsårsaker hos kreftpasienter, og uten sammenligning den hyppigste form for leversvulst. Selv om så å si alle svulster kan spre seg til leveren så er de svulstene som hyppigst sprer seg til leveren å finne blandt kreft i magesekk, tykktarm og bukspyttkjertel, melanom, kreft i lunge, munnhule og svelg, og urinblære, Hodgkins sykdom og andre lymfomtyper, samt kreft i brystet, eggstokker og blærehalskjertel. Hver av de beskrevne primære svulster består av mange ulike svulsttyper som kan behandles med

arteriell embolisering (for eksempel kan det være mer enn 32 ulike typer av kreft i eggstokkene).

Som beskrevet over, kan emboliseringsterapi med anti-angiogene blandinger også bli benyttet for en rekke andre kliniske situasjoner hvor det er ønskelig å lukke blodårer. Arteriovenøse misdannelser kan bli behandlet med tilførsel av en av de over beskrevne blandinger. I korthet beskriver arteriovenøse misdannelser (vaskulære misdannelser) en gruppe sykdommer hvor minst en (og vanligvis mange) unormale forbindelser mellom arterier og vener finnes, noe som resulterer i en lokal svulstliknende masse som hovedsaklig består av blodårer. Slike sykdommer kan være medfødt eller ervervet.

En arteriovenøs misdannelse kan bli behandlet ved å innføre et kateter via arterien i låret eller overarmen og føre det frem til den tilførende arterie under gjennomlysning. Kateteret blir helst ført frem så langt som nødvendig for å gi total blokkering av blodårene som ernærer blodåremisdannelsen, mens så mange som mulig av arteriegrenene som ernærer normale strukturer blir spart (ideelt sett er dette bare en arterie, men vanligvis må mange separate arterier bli blokkert, avhengig av misdannelsens størrelse/utstrekning og dens blodtilførsel). Idet den ønskete kateterposisjon er nådd kan hver arterie bli embolisert ved å benytte de beskrevne anti-angiogene blandinger.

Embolisering kan utføres for å behandle blødningstilstander. For eksempel kan menorrhagi (forøket menstruasjonblødning) bli behandlet med embolisering av livsmorarterier. I korthet er livmorsarterier grener som springer ut fra de interne bekkenarterier (arteria iliaca interna) på begge sider. I et tilfelle kan et kateter bli ført inn via arterien i låret eller overarmen og videre inn i hver livmorsarterie ved å styre gjennom arteriesystemet under gjennomlysning. Kateteret bør føres frem så langt som det er nødvendig for å gi komplett blokkering av blodårene til livmoren, mens så mange grener som mulig av livmorsarterien som forsyner normale strukturer blir spart. Ideelt sett kan en enkelt livmorsarterie på hver side bli embolisert, men av og til, avhengig av blodtilførselen, må flere adskilte arterier av og til bli blokkert. Når kateteret er i posisjon kan hver arterie bli embolisert ved å tilføre anti-angiogene blandinger som beskrevet over.

På en lignende måte kan arteriell embolisering benyttes ved en rekke andre tilstander, inkludert for eksempel akutte blødninger, vaskulære misdannelser, sykdommer i sentralnervesystemet og hypersplenisme.

BRUK AV ANTI-ANGIOGENE BLANDINGER SOM BELEGG I STENTER

Som beskrevet over fremskaffer denne oppfinnelse også stenter, som omfatter en vanligvis rørformet struktur (også omfattende spiralformer) med en overflate som er dekket med en blanding som beskrevet over. I korthet er en stent en avstivning, vanligvis rørformet, som kan bli ført inn i en kroppspassasje (f.eks. gallegang) som har blitt trang pga. en sykdomsprosess (f.eks. innvekst av en svulst) for å hindre at passasjen blir stengt eller stengt på ny. Stenter virker der de er plassert ved rent fysisk å holde hulrommet i en kroppspassasje åpent.

- 10 En rekke ulike stenter kan bli benyttet i forbindelse med denne oppfinnelsen, som f.eks. stenter i spiserør, blodårer, galleganger, bukspyttkjertel, urinledere og urinrør, tåreganger, ørenesegangen, eggledere og luftrør/bronkier.

- 15 Stenter kan enkelt skaffes fra kommersielle kilder, eller bli konstruert i overensstemmelse med velkjente teknikker. Representative eksempler inkluderer de beskrevet i U.S. Patent No. 4,776,337, tittel: "Expandable Intraluminal Graft, and Method and Apparatus for Implanting an Expandable Intraluminal Graft", U.S. Patent No. 5,176,626, med tittel "Indwelling Stent", U.S. Patent No. 5,147,370 med tittel "Ninitol Stent for Hollow Body Conduits", U.S. Patent No. 5,064,435 med tittel "Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length", U.S. Patent No. 5,052,998 med tittel "Indwelling Stent and Method of Use", og U.S. Patent No. 5,041,126 med tittel "Endovascular Stent and Delivery System".

- 25 Stenter kan dekkes med anti-angiogene blandinger eller anti-angiogene faktorer beskrevet ovenfor ved en rekke ulike metoder, som for eksempel: (a) ved direkte å binde en anti-angiogen blanding til stenten, (f.eks. enten ved å dusje stenten med en polymer/medikament film eller ved å dyppe stenten i en polymer/medikament løsning), (b) ved å belegge stenten med en substans som en 'hydrogel' som igjen vil absorbere den anti-angiogene blanding (eller anti-angiogene faktor beskrevet over), (c) ved sammenveving av et nettverk belagt med en anti-angiogen blanding (eller at en polymer selv danner nettverket) inn i stenten, (d) ved å 30 innføre stenten i et 'erme' eller et nettverk som omfatter eller er dekket med en anti-angiogen blanding, eller (e) å konstruere selve stenten med en anti-angiogen blanding. Innen de foretrukne utførelser av oppfinnelsen burde blandingen være hard festet til stenten under lagring og mens den føres på plass, og den burde ikke kunne falle av stenten når diameteren økes fra den kollapsede til den fullt ekspanderte størrelse. Den anti-angiogene blanding burde 35 også fortrinnsvis heller ikke nedbrytes under lagring, før innføring, eller ved oppvarming til kroppstemperatur etter utvidelse i kroppen. I tillegg burde den dekke stenten jevnt og glatt, med en jevn fordeling av angiogenese-hemmer, uten å endre formen på stenten. Innen

foretrukne utførelser av oppfinnelsen burde den anti-angiogene blanding sørge for en jevn, forutsigbar og langvarig frisetning av den anti-angiogene faktor ut i vevet som omgir stenten med en gang den blir benyttet. I tillegg til de beskrevne egenskaper bør blandingen i tilfelle blodårestenter unngå at stentene blir trombogene (dvs føre til dannelse av blodpropper) eller føre til dannelse av turbulens av betydning i blodstrømmen (mer enn det som ville forventes av stenten selv uten noe belegg).

Stentene kan benyttes til utvidelse av hulrom i kroppspassasjer, noe som omfatter å innføre en stent med en stort sett rørformet struktur inn i kroppspassasjen, der strukturens overflate er dekket med en anti-angiogen blanding (eller bare en anti-angiogen faktor), slik at passasjen blir utvidet. En rekke ulike utførelser blir beskrevet nedenfor, hvor hulrommet i en kroppspassasje blir utvidet for å eliminere en obstruksjon i galleganger, spiserør, luftrør/bronkier, urinrør eller blodårer. I tillegg er et representativt eksempel beskrevet i større detalj i Eksempel 7.

Generelt blir stenter ført inn på samme måte uansett stedet eller sykdommen som skal behandles. I korthet blir vanligvis en forundersøkelse utført før innføringen, oftest en diagnostisk bildefremstilling, endoskopi eller direkte visualisering under kirurgisk inngrep, med den hensikt å bestemme den korrekte posisjonering for stentinnføringen. En lede-tråd/wire føres deretter gjennom lesjonen eller det foreslåtte innføringssted, og over denne føres så et kateter som kan føre inn og levere en stent i kollapset tilstand. Det er vanlig at stenter kan bli sammenpresset slik at de kan bli innført gjennom meget små hulrom vha. små katetere, og deretter bli utvidet til en større diameter så snart de er kommet på riktig plass. Så snart de er utvidet vil stenten rent fysisk presse veggene i passasjen fra hverandre og holde hulrommet åpent. Som sådan kan de bli innført gjennom meget små åpninger, men har likevel evnen til å holde hulrom eller passasjer åpne med stor diameter. Stenten kan være selvekspanderende (f.eks. Wallstent og Gianturco stents), de kan utvides med ballong (f.eks. Palmar stent og Strecker stent), eller de kan implanteres ved en endring i temperatur (f.eks. Nitinol stent).

Stenter blir i typiske tilfeller manøvrert på plass under gjennomlysning eller under direkte visuell kontroll, hvor man legger spesiell vekt på å plassere stenten nøyaktig i innsnevringen i organet som blir behandlet. Leveringskateteret blir så fjernet, og stenten etterlates alene som en avstivning. En undersøkelse etter innføring, ofte et røntgenbilde, blir benyttet for å bekrefte en korrekt posisjon.

Videre beskrives metoder som eliminerer galleveisobstruksjoner, ved å innføre en generelt rørformet gallestent der overflaten er dekket med en blanding som beskrevet over i en galleveispasasje, slik at galleobstruksjonene blir opphevet. I korthet vil svulstvekst i den felles gallegang resultere i progressiv galleoppfopnings-gulsott som ikke er forenlig med liv.

- 5 Generelt er gallegangssystemet som tømmer galle fra leveren inn i tolvfingertarmen oftest innsnevret av (1) en svulst som består av gallegangceller (cholangiocarcinom), (2) en svulst som invaderer gallegangen (f.eks. bukspyttkjertelkreft), eller (3) en svulst som medfører et ytre press og komprimerer gallegangen (f.eks. forstørrede lymfeknuter).
- 10 Både primære gallesvulster og andre svulster som fører til sammenpressing av gallegangstreet kan behandles ved å benytte stentene som beskrives her. Et eksempel på primære gallesvulster er adenocarcinomer (som også kalles Klatskinsvulster når de finnes ved delingen av den felles levergang). Disse svulster blir også kalt biliære karsinomer, choledochoangiokarsinomer, eller gallesystemsadenokarsinomer. Godartete svulster som
- 15 affiserer gallegangen (f.eks. gallesystemsadenomer) og i sjeldne tilfeller platecellekarsinomer fra gallegangen og adenokarsinomer fra galleblæren kan også føre til sammenpressing av gallegangstreet, og derfor resultere i galleobstruksjon.

- Sammenpressing av gallegangstreet er oftest forårsaket av svulster fra lever eller
- 20 bukspyttkjertel som sammenpresser og derfor blokkerer gallegangene. De fleste svulster fra bukspyttkjertelen oppstår i celler fra bukspyttkjertelgangene. Dette er en kreftform med høy dødelighet (5% av alle kreftdødsfall; 26000 nye tilfeller pr år i USA) med en gjennomsnittlig overlevelse på 6 måneder og en ettårs overlevelse på kun 10%. Når disse svulster er lokalisert i bukspyttkjertelens hode fører de ofte til gallegangsobstruksjon, og dette fører til betydelig
 - 25 forringelse av pasientens livskvalitet. Mens alle typer bukspyttkjertelsvulster vanligvis kalles "karsinom i bukspyttkjertelen" er det histologiske subtyper som inkluderer: adenokarsinom, adenosquamøst carcinom, cystadenocarcinom og acinærcele carcinom. Leversvulster, som diskutert over, kan også forårsake sammenpressing av gallegangstreet, og derfor forårsake obstruksjon av gallegangene.

- 30 En gallestent kan for eksempel først føres inn i en gallegangspasasje på en av flere måter: fra toppen ved å føre en nål inn gjennom bukveggen og gjennom leveren (et perkutant transhepatisk cholangiogram, eller "PTC"); fra bunnen ved å kanylere gallegangen gjennom et endoskop som er ført inn gjennom munnen, magesekken og tolvfingertarmen (et endoskopisk
- 35 retrograd cholangiogram, eller "ERCP"), eller ved direkte innsnitt foretatt under en kirurgisk prosedyre. En undersøkelse utført før innføringen, PCT, ERCP eller direkte visualisering under kirurgien, burde generelt bli utført for å bestemme den beste posisjonen for innføring

av stenten. En ledetråden blir ført frem gjennom lesjonen og et leveringskateter blir så ført over ledetråden for å tillate at stenten blir ført inn i kollapset tilstand. Dersom den diagnostiske undersøkelse var PTC blir ledetråden og leveringskateter ført inn gjennom bukveggen, mens dersom den originale undersøkelse var et ERCP så vil stenten bli ført inn via munnen. Stenten blir deretter ført i posisjon under røntgenologisk gjennomlysning, endoskopisk eller direkte visuell kontroll, med spesiell forsiktighet for å plassere den nøyaktig i sammensnevringen i gallegangen. Leveringskateteret blir så fjernet, og etterlater stenten som en avstivning som holder gallegangen åpen. Et ytterligere cholangiogram blir utført for å dokumentere at stenten er korrekt plassert.

Stenten ifølge oppfinnelsen kan videre benyttes til å eliminere sammensnevninger av spiserør, omfattende å innføre en rørformet spiserørsstent som er belagt på overflaten med en anti-angiogen blanding slik som beskrevet over i spiserøret, slik at spiserørsinnsnevringen blir eliminert. En kort beskrivelse: Spiserøret (øsofagus) er det hulrør som transporterer føde og væsker fra munn til magesekken. Kreft i spiserøret eller invasjon av kreft som vokser i naboorganer (f.eks. kreft i magesekk eller lunger) medfører at evnen til å svelge føde eller spytt blir borte. I dette tilfelle bør en undersøkelse før innføring, vanligvis et røntgenbilde med bariumkontrast eller en endoskopisk undersøkelse, bli gjennomført for å kunne bestemme the beste posisjon for innføring av stenten. Et kateter eller et endoskop kan så bli plassert gjennom munnen og en ledewire bli ført gjennom blokkeringen. Et stentleveringskateter blir så ført langsmed ledewiren under gjennomlysnings- eller endoskopisk kontroll og en stent blir plassert nøyaktig i sammensnevringen i spiserøret. En undersøkelse etter innføringen, vanligvis en røntgenundersøkelse med bariumkontrast, kan benyttes for å bekrefte korrekt plassering.

Stenten ifølge oppfinnelsen kan videre anvendes til å eliminere luftrør og/eller bronkialobstruksjoner, omfattende å føre inn en rørformet luftrørs- eller bronkialstent som har en overflate dekket med en anti-angiogen blanding som beskrevet over i luftrør eller bronkier, slik at innsnevringen i luftrør/bronkier blir eliminert. En kort beskrivelse: luftrør (trakea) og bronkier er rør som fører luft fra munn og nese til lungene. Blokkeringen av luftrør forårsaket av kreft, invasjon av kreft i omliggende organer (f.eks. kreft i lungene) eller kollaps av luftrør eller bronkier p.g.a. chondromalaci (svekkelse av bruskringene) resulterer i manglende evne til å ventilere. I dette tilfelle bør en undersøkelse før innføringen, vanligvis en endoskopi, bli utført for å bestemme den optimale plassering for innføring av stenten. Et kateter eller endoskop blir så ført inn gjennom munnen og en ledewire føres frem gjennom blokkeringen. Et leveringskateter blir ført inn langsmed ledewiren for å kunne føre inn en kollapset stent. Stenten blir plassert under røntgenologisk eller endoskopisk kontroll for å kunne plassere det

nøyaktig i innsnevringen. Leveringskateteret kan så fjernes, og etterlater stenten som en avstivning. En etterfølgende undersøkelse, vanligvis en bronkoskopi, kan benyttes for å bekrefte korrekt plassering.

- 5 Stenten ifølge oppfinnelsen kan videre benyttes til å eliminere urinrørsobstruksjoner, omfattende å føre inn en rørformet urinrørsstent som har en overflate dekket med en anti-angiogen blanding som beskrevet over i et urinrør, slik at innsnevringen i urinrør elimineres. En kort beskrivelse: urinrøret (urethra) er røret som drenerer urinblæren gjennom penis. Ytre innsnevring av urinrøret under passasjen gjennom blærehalskjertelen (prostata), forårsaket av
10 hypertrofi i denne kjertelen, forekommer hos så å si alle menn over 60 år og forårsaker økende vanskeligheter med vannlating. I dette tilfellet bør en undersøkelse før innføringen, vanligvis en endoskopi eller et urethrogram, bli utført for å bestemme den optimale plassering for innføring av stenten, som er lokalisert over den ytre urinrørslukkemuskel i den nedre ende og nært opptil urinblærehalsen ved den øvre ende. Et kateter eller endoskop blir så ført inn
15 gjennom penisåpningen og en ledewire føres inn i blæren. Et leveringskateter blir så ført inn langsmed ledewiren for å kunne føre inn en stent. Leveringskateteret blir deretter fjernet, og stenten utvides på sin plass. En etterfølgende undersøkelse, vanligvis endoskopi eller retrograd urethrografi, kan benyttes for å bekrefte korrekt plassering.
- 20 Stenten ifølge oppfinnelsen kan videre benyttes til å eliminere blodåreobstruksjoner, ved å innføre en rørformet blodårestent som har en overflate dekket med en anti-angiogen blanding som beskrevet over i en blodåre, slik at forsnevringen i blodåren blir eliminert. En kort beskrivelse: stenter kan bli plassert i en rekke ulike blodårer, både arterier og vener, for å forhindre gjentatte innsnevninger på steder som sannsynligvis ville vært mislykket dersom de
25 ble behandlet med angioplastikk, og for å behandle innsnevninger oppstått etter kirurgi (f.eks. tilkoblingsstenose ved dialyse). Representative eksempler på passende lokalisasjoner er bekkenarterier (a. iliaca), nyrearterier (a. renalis), og hjertekransarterier (a. coronaria), den øvre hulvene (v. cava superior) og i dialysetilkoblinger. I en utførelse gjøres en angiografi først for å bestemme plasseringen av stenten. Dette gjøres vanligvis ved å injisere
30 røntgenkontrastmiddel gjennom et kateter som er ført inn i en arterie eller vene mens et røntgenbilde blir tatt. Et kateter kan så bli ført inn, enten gjennom hud eller ved kirurgisk inngrep, i lårarterien (a. femoralis), overarmarterien (a. brachialis), lårvenen (v. femoralis) eller overarmvenen (v. brachialis) og føres inn i den relevante blodåre ved å styre det gjennom blodåresystemet under gjennomlysning. En stent kan så bli plassert over den
35 vaskulære innsnevring. En etterfølgende angiografi kan også benyttes for å bekrefte korrekt plassering.

BRUK AV ANTI-ANGIOGENE BLANDINGER I KIRURGISKE PROSEDYRER

- Som beskrevet over kan anti-angiogene blandinger bli benyttet i et bredt spektrum av kirurgiske prosedyrer. For eksempel kan en anti-angiogen blanding (f.eks. i form av en dusj eller film) benyttes for å belegge eller dusje et område før fjerning av en svulst, for å isolere normalt omliggende vev fra ondartet vev, og/eller forebygge spredning av sykdom til det omliggende vev. I andre tilfeller kan anti-angiogene blandinger (f.eks. i form av en dusj) bli levert via endoskopiske metoder for å dekke svulster eller hemme angiogenese i et ønsket område. I enda et tilfelle kan kirurgiske nettverk som har blitt belagt med de beskrevne anti-angiogene blandinger bli benyttet i enhver prosedyre hvor et kirurgisk bind kan bli benyttet. For eksempel kan et kirurgisk bind med en anti-angiogen blanding bli brukt under kirurgisk fjerning av bukholekreft (f.eks. etter tykktarm-fjerning) for å fremskaffe støtte til strukturen, og for å frigi en mengde av den anti-angiogene faktor.
- Andre metoder for å behandle områder hvorfra svulster er fjernet, omfatter å tilføre en anti-angiogen blanding som beskrevet over til randsonen av en svulst etter fjerning, slik at lokale tilbakefall av kreft og dannelse av nye blodårer på stedet blir hemmet. I et tilfelle kan den (de) anti-angiogene blanding(er) (eller anti-angiogene faktor(er) alene) tilsettes svulstfjerningsstedet direkte (f.eks. tilsettes ved å gni, børste eller på annen måte å dekke reseksjonskanten av svulsten med den (de) anti-angiogene blanding(er) eller faktor(er). Som alternativ kan den (de) anti-angiogene blanding(er) eller faktor(er) bli inkorporert i kjente kirurgiske kremer før tilførsel. Den anti-angiogene blanding kan også tilføres etter leverfjerning og etter nevrokirurgiske operasjoner.
- De anti-angiogene blandinger (som beskrevet over) kan også bli tilført til reseksjonskanten etter fjerning av en lang rekke svulster, som for eksempel bryst-, tykktarm-, hjerne- og leversvulster. For eksempel kan anti-angiogene blandinger bli tilført til lokalisasjonen for en nevrologisk svulst etter fjerningen, slik at dannelsen av nye blodårer på dette sted blir hemmet. I korthet: hjernen er i høy grad funksjonelt lokalisert, dvs. hver spesifikk anatomisk region er spesialisert for å utføre en spesifikk funksjon. Det er derfor ofte lokaliseringen mer enn typen hjernesykdom som er viktig. En relativt liten lesjon i et nøkkelområde kan ha vesentlig verre effekter enn en mye større lesjon lokalisert i et mindre viktig område. På samme måte kan en lesjon på hjernens overflate være enkel å fjerne kirurgisk, mens den samme svulst lokalisert i dypet av hjernen ikke vil være det (det ville være nødvendig å kutte gjennom for mange vitale områder for å nå svulsten). Av mange grunner kan også godartete svulster være farlige: de kan vokse i et viktig område og forårsake betydelig skade; selv om de kunne kureres ved kirurgisk fjerning, kan denne behandling være umulig; og tilslutt,

dersom de blir etterlatt i fred, kan de fremkalle øket intra-kranielt trykk. Skallen er et lukket hulrom uten evne til utvidelse. Dersom noe vokser på et sted, må derfor noe annet bli sammenpresset på et annet sted - resultatet er øket trykk inne i skallen, øket intrakranielt trykk. Dersom denne tilstand forblir ubehandlet, kan vitalt viktige strukturer bli

5 sammenpresset og føre til død. Hyppighet av ondartet kreft i CNS (sentralnervesystemet) er 8-16 pr. 100.000. Prognosen for primære ondartete hjernesvulster er meget dårlig, med en median overlevelsestid på mindre enn ett år selv etter kirurgisk fjerning. Disse svulster, særlig gliomene, er hovedsaklig en lokal sykdom med tilbakefall innen 2 cm fra det originale syk-

10 domsfokus etter kirurgisk fjerning.

Representative eksempler på hjernesvulster som kan bli behandlet med blandingene og metodene som er beskrevet her inkluderer glia-svulster (som anaplastisk astrocytom, glioblastoma multiforme, pilocytisk astrocytom, oligodendrogliom, ependymom, myxopapillært ependymom, subependymom, choriooid plexus pappilom); nevronale svulster

15 (som f.eks. neuroblastom, ganglioneuroblastom, ganglionevrom og medulloblastom); svulster fra hjernebinnene (f.eks. meningiom, meningealt hemangiopericytom, meningealt sarkom); svulster fra nervedekk-celler (f.eks. Schwannom (neurolemmom) og neurofibrom); lymfomer (f.eks. Hodgkin og non-Hodgkin lymfom (med mange subtyper, både primære og sekundære)); misdannelsesvulster (f.eks. kraniopharyngiom, epidermoid cyster, dermoid

20 cyster, og kolloide cyster); og sekundære svulster (metastaser), som kan oppstå fra så å si enhver svulsttype, med de hyppigste primærsvulster i lunge, bryst, melanom, nyre og tarmtraktus.

ANDRE TERAPEUTISKE ANVENDELSER AV ANTI-ANGIOGENE BLANDINGER

I tillegg til svulster kan også mange andre ikke-tumorigene, angiogenese-avhengige sykdommer som karakteriseres av unormal vekst av blodårer, bli behandlet med de anti-angiogene blandinger eller anti-angiogene faktorer. Representative eksempler på slike ikke-

25 tumorigene, angiogenese-avhengige sykdommer inkluderer korneal neovaskularisering (innvekst av nye blodårer i hornhinnen), hypertrofiske arr og keloider, prolifererende diabetisk netthinnesykdom, kronisk leddgikt, arteriovenøse misdannelser (diskutert over), aterosklerotiske plakk (åreforkalkning), forsinket sårtilheling, bløderskadete ledd, benbrudd som ikke gror, Osler-Webers syndrom, psoriasis, pyogent granulom, sklerodermi, trakom,

30 menorrhagi (diskutert over) og blodåresammenvoksninger.

Spesielt behandles nyvekst av blodårer i hornhinnen, hornhinne neovaskularisering, (inkluderende blodårevekst ved transplantasjon av hornhinne). Dette omfatter tilførsel av en

terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen blanding (som beskrevet over) til hornhinnen slik at dannelsen av blodårer blir hemmet. I korthet er hornhinnen et vev som vanligvis mangler blodårer. Imidlertid kan kapillærer ved visse patologiske tilstander strekke seg inn i hornhinnen fra blodårenettverket som omgir hornhinnen. Når hornhinnen blir vaskularisert, blir den også ugjennomsiktig, noe som fører til nedsettelse av pasientens synsskarphet. Totalt tap av syn kan bli resultatet dersom hornhinnen blir helt ugjennomsiktig.

Blodårer kan penetrere hornhinnen i en rekke mønstre og dybder, avhengig av prosessen som starter neovaskulariseringen. Disse mønstre har tradisjonelt blitt beskrevet av øyeleger som:

Pannus trachomatosus, pannus leprosus, pannus phylctenulosus, pannus degenerativus, og glaukomatøs pannus. Hornhinnens vev kan også bli invadert av grener fra den fremre regnbuehinnearterie (a. ciliaris anterior) (kalt interstitiell vaskularisering) som fremkaller flere ulike kliniske lesjoner: Terminale løkker, et "børste-lignende" mønster, en blomsterkrans- ("umbel") form, en stillasform, interstitielle arkader (fra episklerale blodårer) og unormalt forløpende irregulære blodårer.

Flere forstyrrelser kan resultere i hornhinne neovaskularisering, inkludert for eksempel hornhinne infeksjoner (for eksempel trakom, herpes simplex keratitt, leismaniasis og onchocerciasis), immunologiske prosesser (for eksempel avstøtningsreaksjoner og Stevens-Johnson's syndrom), alkaliske brannskader, traumer, inflammasjon (uansett årsak), toksiske tilstander og underernæringstilstander og komplikasjoner ved bruk av kontaktlinser.

Mens årsaken til blodåredannelse i hornhinnen kan variere, er hornhinnens respons på skaden den samme uansett årsak. I korthet er det slik at lokalisasjonen av skaden er viktig, siden bare de lesjoner som er plassert innen en viss kritisk distanse til hornhinnens ytterkant vil initiere en angiogen respons. Dette er trolig forårsaket av at de angiogene faktorer som er ansvarlige for å stimulere blodåreinvasjonen blir dannet lokalt på skadestedet og må diffundere til de nærmeste blodårer (i hornhinneytterkanten) for å ha noen effekt. Utenfor en viss distanse fra denne ytterkant ville dette ikke lenger være mulig, og endotelcellene i hornhinneytterkanten ville ikke bli stimulert til å vokse inne i hornhinnen. Flere angiogene faktorer er sannsynligvis innblandet i denne prosess, hvorav mange er resultater av betennelsesreaksjoner. Det synes faktisk som om blodåreinnevekst i hornhinnen bare forekommer sammen med et infiltrat av betennelsesceller, og graden av blodårevekst er proporsjonal med betennelsesreaksjonens utstrekning. Hornhinneødem (væskeopphopning) gir videre forbedret blodåreinnevekst ved at hornhinnens vevsstruktur blir oppløst og gir en "minste motstands vei" som kapillærene kan vokse langs.

Etter den første betennelsesreaksjon foregår kapillærvækst inn i hornhinnen på samme måte som i andre vev. De vanligvis inaktive endotelceller i kapillærene og de små venyler i hornhinneytterkanten blir stimulert til celledeling og bevegelse. Endotelcellene strekker seg vekk fra blodårene de kom fra, fordøyer den omliggende basalmembran og vevet som de vil bevege seg gjennom, og beveger seg mot kilden til den angiogene stimulus. De blindendede knopper utvikler et hulrom, og forbinder seg så med hverandre for å danne kapillære sløyfer. Sluttresultatet er et blodårenettverk inne i hornhinnens vev.

Anti-angiogene blandinger har effekt ved at de blokkerer de stimulerende virkninger av stoffene som fremskynder angiogenesen, reduserer endotelcelledeling, reduserer endotelcellebevegeligheten og hemmer aktivitetene til de proteolytiske enzymer som frisettes av endotelet.

En anti-angiogen faktor kan bli preparert for topisk administrering i saltvann (kombinert med de konserveringsmidler og antimikrobielle midler som vanligvis benyttes i øyemedisiner), og tilsettes som øyedråper. Løsningen med den anti-angiogene faktor kan bli preparert i ren form og tilsatt flere ganger daglig. Som alternativ kan anti-angiogene blandinger, preparert som beskrevet over, også bli applisert direkte på hornhinnen. Den anti-angiogene blanding kan bli preparert sammen med en slimbindende polymer som binder til hornhinnen. Videre kan de anti-angiogene faktorer eller anti-angiogene blandinger bli benyttet som en hjelpetilsetning til vanlig behandling med steroider.

Lokal behandling kan også være nyttig som forebyggende behandling ved hornhinnelesjoner, som man vet har en høy sannsynlighet for å fremkalle en angiogen respons (som f.eks. kjemiske brannskader). I disse tilfeller kan behandlingen, trolig sammen med steroidbehandling, bli påbegynt umiddelbart for å forebygge etterfølgende komplikasjoner.

De anti-angiogene blandinger beskrevet over kan også bli injisert direkte i hornhinnens vev av en øyelege under mikroskopisk kontroll. Det foretrukne injeksjonssted kan variere med de ulike lesjoners morfologi, men målet for tilføselen vil være å plassere blandingen i fronten der blodårene rykker frem (dvs. mellom blodårer og den normale hornhinne). I de fleste tilfeller vil dette medføre en injeksjon nær hornhinneytterkanten for å "beskytte" hornhinnen mot de fremvoksende blodårer. Denne metoden kan også benyttes kort tid etter en hornhinneskade for å forebygge, beskytte og hindre hornhinnevaskularisering. I denne situasjon kan materialet bli injisert i hornhinneytterkanten, mellom hornhinnelesjonen og den potensielt uønskete blodtilførsel. Slike metoder kan også benyttes på en lignende måte for å hindre kapillærinvasjon i transplanterte hornhinner. Når gitt som en depotform kan

injeksjoner være nødvendige bare 2-3 ganger daglig. Et steroid kan også bli tilsatt injeksjonsblandingen for å redusere betennelsen som injeksjonen selv fremkaller.

5 Videre er metoder blitt utviklet for å behandle hypertrofiske arr og keloider, omfattende å tilføre en av de oven beskrevne anti-angiogene blandinger til et hypertrofisk arr eller keloid.

I korthet foregår sårtilheling og arrdannelse i tre faser: Betennelse, proliferasjon og modning. Den første fase, betennelse, er et resultat av en skade som er alvorlig nok til å åpne huden. Under denne fase, som varer 3-4 dager, danner blod og vevsvæske en adhesiv blodkoagel og et nettverk av fibrin som har til hensikt å binde sårflatene sammen. Dette er så fulgt av en proliferativ fase hvor det kommer innvekst av blodårer og bindevev fra sårkantene, og hudskaden blir lukket. Til sist, når kapillær- og bindevevsceller (fibroblaster) har sluttet å proliferere, begynner modningsprosessen som medfører at arret trekker seg sammen og mister blodårer og celler mens det får et flatt og hvitt utseende. Denne siste fase kan ta 6-12 måneder.

10
15

Dersom for mye bindevev blir dannet og såret forblir rikt på celler, kan såret bli rødfarget og hevet over hudens nivå. Dersom arret forblir innenfor grensene til det originale sår blir det betegnet et hypertrofisk arr, men dersom det strekker seg ut over det opprinnelige arr og inn i det omliggende vev blir det betegnet et keloid. Hypertrofiske arr og keloider blir dannet under den andre og tredje fase av arrdannelsen. Flere sårtyper har en spesiell tilbøyelighet til en altfor intens proliferasjon av endotelceller og fibroblaster, slik som brannskader, åpne sår og infiserte sår. Hva angår hypertrofe arr vil en viss grad av modning forekomme og gradvis bedring oppnåes. Hva angår keloid, dannes imidlertid en svulst, som kan bli ganske stor. I slike tilfeller er spontan bedring sjelden.

20
25

Derfor kan enten anti-angiogene faktorer alene eller anti-angiogene blandinger, som beskrevet over, bli injisert direkte inn i et hypertrofisk arr eller keloid for å forhindre videre vekst av disse lesjoner. Hyppigheten av injeksjonene avhenger av frigivelseshastigheten av den polymeren som evt. benyttes, og av den kliniske respons. Denne behandling er spesielt verdifull ved den forebyggende behandling av tilstander som man vet resulterer i utvikling av hypertrofiske arr og keloider (f.eks. brannskader), og blir fortrinnsvis påbegynt etter at den proliferative fase har fått tid til å utvikles, men før det utvikles hypertrofiske arr eller keloid.

30

35 Videre er det utviklet metoder for å behandle glaukom (grønn stær) forårsaket av blodåredannelse (neovaskulært glaukom), omfattende en tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av et anti-angiogen blanding til øyet slik at dannelsen av blodårer blir hemmet.

I korthet er neovaskulært glaukom en patologisk tilstand hvor nye kapillærer utvikles i øyets regnbuehinne. Blodåredannelsen oppstår vanligvis fra årer lokalisert ved pupillegrensen, og utvikles over regnbuehinnens basis og inn i det fibrøse nettverk. Fibroblaster og andre bindevevselementer er forbundet med vekst av kapillærene, og en fibrovaskulær membran utvikles derfor, som sprer seg over fremre overflate av regnbuehinnen. Når dette vevet når forkammervinkelen ("anterior chamber angle") danner den sammenvoksninger. Disse flyter sammen, blir til arrvev og trekker seg sammen slik at forkammervinkelen lukkes. Arrdannelsen hindrer adekvat drenasje av forkammervæske gjennom vinkelen og inn i årenettverket, noe som resulterer i økning av trykket i øyeeplet, som igjen kan føre til blindhet.

Neovaskulært glaukom forekommer vanligvis som en komplikasjon ved sykdommer hvor sviktende blodtilførsel til netthinnen dominerer. Omtrent en tredjedel av pasienter med denne sykdom har diabetisk netthinnesykdom og 28% har okklusjon av den sentrale netthinnevene. Andre årsaker er kronisk netthinneavløsning, glaukom i sluttstadie, obstruerende sykdom i halsarterien (a. carotis), retrolental fibroplasi, sigdcelleanemi, svulster i øyet, og cavernøs fistula i halsarterien. I de tidligere stadier kan neovaskulært glaukom bli diagnostisert med "biomikroskopi" med spaltelampe med sterk forstørrelse, hvor man ser små utvidete og dysorganiserte kapillærer (som lekker stoffet fluorescein) på overflaten av regnbuehinnen. Mens forkammervinkelen fremdeles er åpen, kan konservative behandlinger være til hjelp, men når kammervinkelen blir lukket, er kirurgiske inngrep nødvendige for å hjelpe på trykket.

Derfor kan de anti-angiogene faktorer (enten alene eller i en anti-angiogen blanding som beskrevet over) bli tilført øyet lokalt for å behandle tidlige former av neovaskulært glaukom.

Videre kan anti-angiogene blandinger bli implantert ved injeksjon inn i området rundt forkammervinkelen. Dette sikrer en langvarig økning av anti-angiogen faktor, og hindrer blodårevekst inn i området. Implanterte eller injiserte anti-angiogene blandinger som er plassert mellom de fremvoksende kapillærer i regnbuehinnen og forkammervinkelen kan "beskytte" den åpne vinkel fra blodårevekst. Siden kapillærer ikke vil vokse innen en betydelig avstand fra den anti-angiogene blanding, kan en åpen kammervinkel vedlikeholdes. I andre utførelser kan den anti-angiogene blanding også bli plassert på enhver plass hvor den anti-angiogene faktor kontinuerlig blir frisatt til kammervæsken. Dette vil øke konsentrasjonen av den anti-angiogene faktor inn i øyevæsken, som igjen bader regnbuehinnens overflate og de unormale kapillærer, noe som derved gir en annen mekanisme for å applisere medikamentet. Disse behandlingsmåter kan også være brukbare som profylakse og i kombinasjon med andre eksisterende behandlinger.

Videre er metoder fremskaffet for å behandle prolifererende diabetisk netthinnesykdom (retinopati), omfattende tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen blanding til øyet slik at dannelsen av blodårer blir hemmet.

5

I korthet er sykdomsutviklingen av diabetisk netthinnesykdom lignende den som er beskrevet over for neovaskulært glaukom. Spesifikt gjelder at "bakgrunn" diabetisk netthinnesykdom trolig går over i en proliferativ fase under påvirkning av oksygenmangel i netthinnen.

Vanligvis vil vev med nye blodårer vokse fra synsnerven (vanligvis innen 10 mm fra kanten) og fra netthinneoverflaten i regioner der blodgjennomstrømningen i vevet er dårlig. Initielt vil kapillærene vokse mellom netthinnens indre begrensende membran og den bakre overflate av glasslegemet. Etterhvert vil årene vokse inn i glasslegemet og gjennom den indre avgrensende membran. Etterhvert som glasslegemet trekker seg sammen blir årene satt under strekk, noe som ofte resulterer i at årene ryker og formørking av glasslegemet pga. blødning.

Sammentrekning av fibre fra arrdannelse i netthinnen kan også føre til netthinneavløsning.

15

Den konvensjonelle foretrukne behandling er "panretinal" fotokoagulering for å minske netthinnevev og derved minske netthinens behov for oksygen. Selv om dette til å begynne med er effektivt, er det en høy frekvens av tilbakefall, med nye lesjoner som dannes i andre deler av netthinnen. Komplikasjoner med denne behandling inkluderer en nedsettelse av perifert syn hos opptil 50% av pasientene, akutte glaukomer, og stimulering av blodårevekst under netthinnen (som kan resultere i synstap). Som resultat av dette blir denne prosedyre bare utført når flere risikofaktorer er tilstede og forholdet mellom risiko og nytte klart støtter aktiv intervensjon.

25

I slike tilfeller kan proliferativ diabetisk netthinnesykdom bli behandlet med injeksjon av en anti-angiogen faktor (eller faktorer) (eller anti-angiogen blanding) inn i kammervæsken eller glasslegemet, for å øke den lokale konsentrasjon av anti-angiogen faktor i netthinnen. Denne behandling bør fortrinnsvis påbegynnes før alvorlig sykdom har oppstått som nødvendiggjør fotokoagulering. I andre tilfeller kan arterier som gir næring til de nydannede årelesjoner bli embolisert (benytte de anti-angiogene blandinger som beskrevet over).

30

Videre er metoder fremskaffet som kan behandle retrolental fibroplasi, og som omfatter tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen faktor (eller anti-angiogen blanding) til øyet slik at dannelsen av blodårer blir hemmet.

35

I korthet er retrolental fibroplasi en tilstand som forekommer hos for tidlig fødte barn (premature) som får oksygenbehandling. Den perifere netthinneåresystem, særlig på tinningsiden, blir ikke ferdigdannet før slutten av fosterlivet. For høye oksygennivåer (t.o.m. nivåer som ville være normale ved fødsel) og dannelsen av frie oksygen radikaler antas å være viktige ved forårsakend av ødeleggelser av blodårene i den umodne netthinnen. Disse årer trekker seg sammen og blir deretter strukturelt tilintetgjort når de utsettes for oksygen. Som resultat blir den perifere netthinne ikke vaskularisert og blodmangel i netthinnen følger. Som respons på dette blir vekst av nye blodårer stimulert ved overgangen mellom den normal og den blodfattige netthinne.

I 75% av tilfellene vil disse blodårer spontant bli tilbakedannet. Imidlertid vil det i de gjenværende 25% være vedvarende kapillærvækst, sammentrekning av de fibrovaskulære komponenter og strekk på både blodårene og netthinnen. Dette resulterer i blødning i glasslegemet og/eller netthinneavløsning som kan føre til blindhet. Neovaskulært vinkel-avstengningsglaukom kan også være en komplikasjon til denne tilstand.

Siden det ofte er umulig å avgjøre hvilke tilfeller som spontant vil gå tilbake og hvilke som vil utvikles alvorlig, blir vanlig behandling (dvs kirurgi) kun påbegynt hos pasienter som har verifisert sykdom og en langt utviklet patologi. Denne "vent og se" tilnærming utelukker tidlig intervensjon, og tillater sykdommen å gå videre i de 25% som følger en komplisert utvikling. Derfor kan lokal tilførsel av anti-angiogene faktorer (eller anti-angiogene blandinger som beskrevet over) bli benyttet hos nyfødte som har høy risiko for å utvikle denne tilstand, i et forsøk på å senke hyppighet av progressiv retrolental fibroplasi. I andre utførelser kan injeksjoner i glasslegemet og/eller implantasjoner i øyet av en anti-angiogen blanding bli benyttet. Slike metoder er særlig å foretrekke i tilfeller med allerede etablert sykdom for å senke behovet for kirurgi.

Videre er metoder utarbeidet for å behandle kronisk leddgikt, omfattende tilførsel av en terapeutisk effektiv dose av en anti-angiogen blanding til et ledd slik at dannelsen av blodårer blir hemmet.

I korthet er kronisk leddgikt en tilstand hvor leddskade forårsakes av en kombinasjon av betennelse (inkluderende hvite blodlegemer og produkter fra hvite blodlegemer) og utvikling av "pannus" vev (et vev som består av neovaskulært vev, bindevev og betennelsesceller). Generelt sett er kronisk betennelse i seg selv ikke tilstrekkelig for å fremkalle skade av leddoverflaten, men en vedvarende svikt blir dannet så snart fibrovaskulært vev fordøyer bruskvevet.

I slike tilfeller kan anti-angiogene faktorer (inkluderende anti-angiogene blandinger som beskrevet over) bli tilført ved injeksjon i leddet, som en kirurgisk krem, eller som en oral medisiner (f.eks. inneholdende den anti-angiogene faktor thalidomid) for å hemme dannelsen av blodårer inne i leddet. Et representativt eksempel på en slik metode er beskrevet i større detalj under i Eksempel 19.

Som beskrevet over er vaskulære transplantater fremskaffet som omfatter en slange hvis overflate er dekket med en anti-angiogen blanding som beskrevet over. I korthet er vaskulære transplantater syntetiske slanger, vanligvis laget av Dacron eller Gortex, innført kirurgisk for å lede forbi arterieinnsnevninger, hyppigst fra hovedpulsåren til lårarterien eller fra lårarterien til knearterien. Et hovedproblem som spesielt kompliserer lår-knearterie 'bypass'-transplantater er dannelsen av en arrlignende reaksjon under endotelet i blodåren, kalt neointimal hyperplasi, som innsnevrer hulrommet inne i og nær inntil begge ender av transplantatet og som kan være fremadskridende. Et transplantat som er dekket av eller inneholder anti-angiogene faktorer (eller anti-angiogene blandinger som beskrevet over) kan bli benyttet for å begrense dannelsen av neointimal hyperplasi ved begge ender av transplantatet.

Transplantatet kan deretter bli plassert med standard teknikker.

Anti-angiogene blandinger kan også bli benyttet på en rekke andre måter. For eksempel kan de bli inkorporert i kirurgiske trådmaterialer for å hindre suturgranulom, implanteres i livmoren (på samme måte som intrauterin prevensjon, "spiral") for behandling av forøket menstruasjonsblødning, eller som en form for prevensjon, tilført enten som en væske for bukhulesskylling, eller for bukhulesskylling ved behandlingen av endometriose, bundet til et monoklonalt antistoff rettet mot aktive endotelceller som en form for systemisk kjemoterapi, eller benyttet i diagnostisk bildeanalyse når bundet til et radioaktivt merket monoklonalt antistoff som gjenkjenner aktive endotelceller.

De følgende eksempler blir presentert som illustrasjoner, og ikke som begrensninger.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

Preparering av Anti-Invasiv Faktor

Skulderbuen og skallen fra en "dogfish" blir fjernet og skrapet med en skalpell for å fjerne alt muskel- og assosiert bindevev fra brusken. Brusken blir så homogenisert med en vevsknuser

og ekstrahert ved kontinuerlig omrøring ved romtemperatur i 2-5 dager i en løsning som består av 2,0 M guanidinhydroklorid og 0,02 M MES ved pH 6,0.

Etter 2-5 dager blir bruskekstraktet filtrert gjennom gazebind for å fjerne store biter. Filtratet
 5 blir så filtrert gjennom en Amicon ultrafilteringsenhet som benytter spiralpatroner med en
 molekylær grense på 100 000. Filtratet (som inneholder proteiner med molekylvekt under
 100000 dalton) blir så dialysert mot 0.02 MES buffer (pH 6) med en Amicon ultra-
 filteringsenhet som holder igjen proteiner med molekylvekt over 3000 dalton. Ved å bruke
 10 denne metode blir proteiner med lav molekylvekt og småmolekylære substanser samt
 overskudd av guanidinhydroklorid fjernet. Dialysatet blir konsentrert til en
 sluttkonsentrasjon på 9 mg/ml.

EKSEMPEL 2

Analyse av ulike agens for anti-angiogen aktivitet.

15

A. Kylling Chorioallantois Membran ("CAM") Analyse

Befructete kyllingfoster ble inkubert i tre dager før skall-fri dyrkning. I denne prosedyre ble
 innehold av egget tømt ut ved å fjerne skallet rund luftrommet. Den indre skallmembran ble
 20 så kuttet og den motsatte ende av skallet ble perforert for å tillate egginneholdet forsiktig å gli
 ut fra den butte ende. Inneholdet av egget ble tømt i rundbunnede steriliserte glassskåler og
 dekket med petriskål lokk. Disse ble så puttet i en inkubator med 90% relativ fuktighet og 3%
 karbondioksyd og inkubert i tre dager.

25 Taxol (Sigma Chem. Comp, St. Louis, MO) ble blandet i konsentrasjonene 1, 5, 10, og 30 mg
 per 10 ml av 0,5% vandig metylcellulose. Siden taxol er uløselig i vann ble glasskuler brukt
 for å danne fine partikler. Ti mikroliter porsjoner av denne løsning ble tørket på 'Parafilm' i en
 time, resulterende i plater med 2 mm diameter. De tørkede plater som inneholdt taxol ble så
 forsiktig plassert på den voksende kant av hver CAM på sjette inkuberingsdag. Kontroller
 30 som inneholdt taxolfrie metylcellulose plater ble plassert på CAM over det samme tidsrom.
 Etter to dagers reaksjon (inkuberingsdag 8) ble vaskulaturen undersøkt med et
 stereomikroskop. Liposyn II, en hvit ugjennomsiktig løsning, ble injisert inn i CAM for å øke
 graden av synlighet av detaljer i blodårene. Vaskulaturen fra ufargete, levende foster ble
 bildeanalysert med et Zeiss stereomikroskop som var koblet til et videokamera (Dage-MTT
 35 Inc., Michigan City, IN). Disse videosignaler ble så vist med 160 gangers forstørrelse og
 samlet ved å bruke et bildeanalyse-system (Vidas, Kontron, Etching, Germany). Bil-

denegativer ble deretter preparert på en grafisk opptaksmaskin (Model 3000, Matrix Instruments, Orangeburg, NY).

Membranene fra 8 dagers gamle skall-frie fostre ble vasket med 2% glutaraldehyd i 0,1 M Na-kakodylatbuffer, ytterligere fikseringsvæske ble injisert under CAM. Etter 10 minutter in situ ble CAM fjernet og plassert i fersk fikseringsvæske i to timer ved romtemperatur. Vevet ble så vasket over natten i kakodylatbuffer med 6% sukrose. De interessante arealer ble postfiksert i 1% osmium tetroksyd i 1,5 timer ved 4°C. Vevene ble så dehydrert i en gradert serie av etanol, løsemiddelutvekslet med propylenoksyd og innstøpt i Spurr harpiks. Tynne snitt ble skåret med en diamantkniv, plassert på koppernett, farget og undersøkt i et Joel 1200EX elektronmikroskop. 0,5 mm snitt ble kuttet på samme måte og farget med tolueblå for lysmikroskopisk analyse.

På utviklingsdag 11 ble kyllingfoster brukt for korrosjons-innstøpningsteknikken. Mercos harpiks (Ted Pella Inc., Redding, CA) ble injisert i CAM vakulaturen med en 30-gauge injeksjonsnål. Støpningsmaterialet besto av 2,5 gram Mercocox CL-2B polymer og 0,05 gram katalysator (55% benzoyl peroksyd) som hadde en polymeriseringstid på 5 minutter. Etter injeksjonen fikk plasten være in situ i en time ved romtemperatur og deretter over natten i en ovn ved 65°C. CAM ble så plassert i 50% vandig løsning av natronlut for å løse opp og fordøye alle organiske komponenter. Plastavstøpningene ble grundig vasket med destillert vann, lufttørket, dekket med gull/palladium og studert i et Philips 501B Scanning elektronmikroskop.

Resultatene av disse eksperimenter blir vist i Figurene 1-4. I korthet blir de generelle trekk ved den normale eggfrie kylling kulturen vist i Figure 1A. På inkubasjonsdag 6 er fosteret sentralt plassert med et radiale utstrålende nettverk av blodårer, CAM utvikles like ved fosteret. Disse voksende blodårer ligger nær opptil overflaten, og kan lett sees, noe som gjør dette systemet en ideell modell for studiet av angiogenese. Levende ufargete nettverk av kapillærer i CAM kan bli visualisert med et stereomikroskop uten behov for invasive metoder. Figur 1B viser et slikt vaskulært område hvor de cellulære blodelementer innen kapillærene ble registrert ved bruk av et video-datamaskin system. Den tredimensjonale arkitektur av slike CAM kapillærnettverk blir vist med etsnins-innstøpningsmetoden og studert i scanning elektronmikroskop (Figur 1C). Disse innstøpninger viser de underliggende årer som projiserer mot overflaten av CAM, hvor de danner et enkelt lag av sammenkoblede kapillærer.

Tverrsnitt gjennom CAM viser en ytre ektoderm som består av et dobbelt cellelag, et bredere mesoderm som inneholder kapillærer som ligger oppunder ektodermen, adventitiaceller, og et indre enkelt endodermalt cellelag (Figur 1D). På elektronmikroskopnivå vises de typiske strukturdetaljer av CAM-kapillærene. Vanligvis ligger disse årer i tett forbindelse med det indre laget av ektodermen (Figur 1E).

Etter 48 timers kontakt med taxol (i konsentrasjoner på 1, 5, 10 eller 30 mg pr 10 ml) ble hver CAM studert under intakte, levende forhold med et stereomikroskop utstyrt med et video/datamaskin system for å evaluere effekter på angiogenese. Dette bildesystem ble brukt ved en 160 gangers forstørrelse som tillot direkte visualisering av blodceller inne i kapillærene, derved kunne blodstrømning i interessante områder enkelt bli vurdert og registrert. For denne studie ble hemning av angiogenese definert som et område på en CAM som var uten kapillærnettverk, og som varierte fra 2-6 mm diameter. Områder med hemning manglet vaskulær blodstrømning og ble således bare sett under eksperimentelle betingelser hvor metylcellulosen inneholdt taxol, under kontroll-betingelser uten taxol fantes ingen effekt på det voksende kapillærsystem. De doseavhengige eksperimentelle data som viser taxol-effektene ved varierende konsentrasjoner vises i Tabell II.

TABELL II

Angiogen hemming fremkalt av Taxol

Taxol konsentrasjon (mikrogram)	Foster studert (positive/totalt)	% Inhibisjon
30	31/31	100
10	16/21	76
5	18/25	72
1	6/15	40
Kontroll	0/30	0

Typiske taxolbehandlede CAM (Figurene 2A og 2B) vises med de transparente metylcelluloseplater plassert sentralt over den avaskulære sone som måler 6 mm i diameter. Ved en lett økning i forstørrelse blir omkretsen av slike avaskulære soner tydelige (Figur 2C). De omgivende og funksjonelle årer ble ofte dirigert vekk fra området med taxol (Figurene 2C og 2D). Slik omdirigering av blodstrøm ble aldri observert ved normale forhold. En annen av taxols effekter var dannelsen av blodøyer innen den avaskulære sone, disse representerer aggregering av blodceller.

De assosierte morfologiske endringer i de taxolbehandlede CAM er tydelige både ved lys- og elektronmikroskopisk analyse. For å forenkle beskrivelsen blir tre forskjellige overgangsnivåer fra den normale til en avaskulær sone vist. Nær ytterkanten av den avaskulære sone er CAM karakterisert av et overskudd av mitotiske celler (celler i deling) innen alle tre lag (Figurene 3A og 4A). Denne økte celledeling var også en konsistent observasjon i kapillærenes endotelceller. Imidlertid forble endotelcellene bundet sammen uten noen utstrømming av blodceller. Med videre degradering ble CAM karakterisert av en ødeleggelse og oppløsning av kapillærene (Figurer 3B og 4B). Den sannsynlige endotelcelle, som vanligvis ikke var i celledeling, opprettholdt en nær romlig relasjon til blodcellene og ligger tett under ektodermen, disse celler er imidlertid ikke sammenbundet med hverandre. Den mest sentrale region av den avaskulære sone ble karakterisert av fortykkete ektoderm- og endodermag (Figurene 3C og 4C). Selv om disse lag var fortykket, forble cellenes forbindelser intakte og lagene opprettholdt deres strukturelle karakteristika. I mesodermen var spredte, mitotisk stoppete celler tilstede i overflod, disse celler viste ikke endotelcellenes polarisering som ble observert i den tidligere fase. Degerenerende celler var også vanlige i hele denne sone, noe som ble demonstrert ved de elektrontette vakuoler og det cellulære nedbrytningsmateriale (Figur 4C).

For å summere resultatene viste denne studie at etter 48 timers applikasjon av taxol til CAM var angiogenesen hemmet. Hemming av blodårer dannet en avaskulær sone som ble representert av tre overgangssoner som viste effekter av taxol. Den sentrale og mest affiserte del av den avaskulære sone inneholdt avbrutte kapillærer med blodceller utenfor blodårene, dette antydte at forbindelsene mellom endotelcellene var forsvunnet. Cellene i endoderm og ektoderm opprettholdt deres forbindelser, og disse kimlag forble derfor intakte, de var imidlertid lett fortykket. Idet man nærmet seg den normalt vaskulariserte sone, bevarte blodårene sine intercellulære forbindelser og forble derfor intakte. Ved periferien av den taxolbehandlede sone var videre vekst av blodårer hemmet, noe som ble vist ved den typiske redigering eller "albue" effekten på blodårene (Figur 2-4D).

Taxolbehandlede avaskulære soner viste også et overskudd av celler som var stoppet i celledeling i alle tre kimlag i CAM, dette var enestående for de taxolbehandlede preparater, siden ingen tidligere studier har vist en slik effekt. Ved at endotelcellene var stoppet i celledeling kunne de ikke gjennomføre deres normale stoffskiftefunksjoner som er involvert i angiogenese. Til sammenligning vil de avaskulære soner dannet av suramin og kortisonacetat ikke danne celler stoppet i celledeling og kortisonacetat ikke danne celler stoppet i celledeling i CAM, de vil kun forhindre ytterligere blodårer fra å vokse inn i området. Selv om mange

agens er anti-angiogene, er det derfor mange ulike mekanismer hvor den angiogene prosess kan moduleres.

Vi observerte også taxols effekter over et tidsrom på 48 timer og noterte at hemning av angiogenese opptrer allerede 9 timer etter tilsetning. Histologiske snitt viste den samme morfologi som sett i den første overgangsfase i den avaskulære sone etter 48 timer, illustrert i Figurene 3A og 4A. Vi observerte også revaskulariseringsprosessen inn i den avaskulære sone som tidligere har blitt beskrevet. Det har blitt vist at den avaskulære sone dannet av heparin og angiostatisk steroider ble revaskularisert 60 timer etter tilsetning. I vår studie ble taxolbehandlede avaskulære soner ikke revaskularisert innen 7 dager etter applikasjon, noe som tyder på en kraftigere langtidseffekt.

EKSEMPEL 3

Innkapsling av Suramin

En milliliter av 5% ELVAX (poly(etylen-vinylacetat) kryssbundet med 5% vinylacetat) i diklorometan ("DCM") blandes med en fast vekt av submikron knust natriumsuramin. Denne blanding blir tilsatt 5 ml 5% polyvinylalkohol ("PVA") i vann i et 30 ml flatbunnet reagensrør. Rør som inneholder ulike mengder av medikamentet blir så satt i et vannbad ved 40°C i 90 minutter med automatisk omrøring. Blandingene fjernes og mikrosfæreprøver tas for analyse av størrelse. Rørene blir sentrifugert ved 1000xg i 5 minutter. PVA supernatanten blir fjernet og oppbevart for analyse (ikke-innkapslet medikament). Mikrosfærene blir så vasket på en "vortex" mikser i 5 ml vann og resentrifugert. Vasken på 5 ml blir oppbevart for analyse (overflate-bundet medikament). Mikrosfærene blir deretter fuktet med 50 mikroliter metanol og mikset i 1 ml DCM for å løse opp ELVAX. Mikrosfærene blir så oppvarmet til 40°C, og 5 ml av 50°C vann blir tilsatt langsomt under omrøring. Denne prosedyre resulterer i umiddelbar fordampning av DCM, noe som fører til frisetting av natrium suramin ut i 5 ml vann. Alle tre 5 ml prøver ble så analysert med henblikk på mengde medikament.

Natrium suramin absorberer ultrafiolett/synlig lys med et maksimum ved 312 nanometer bølgelengde. Absorpsjonen er lineær i området 0 til 100 mikrogram/ml både i vann og i 5% PVA. Medikamentet fluorescerer sterkt med et eksitasjonsmaksimum ved 312 nanometer, og emisjonsmaksimum ved 400 nanometer. Denne fluorescens kan kvantifisere innen 0 til 25 mikrogram/ml området.

Resultater vises i Figurene 5-10. I korthet synes størrelsesfordelingen av mikrosfærene å være uaffisert av tilstedeværelsen av medikamentet i DCM (se Figurer 5 og 6). Godt utbytte av 20-60 mikrometer mikrosfærer kan oppnåes.

Innkapslingen av suramin er meget lite effektiv (<1%) (se Figur 8). Imidlertid øker den totale mengde av innkapslet medikament ned øket mengde av medikament i DCM, selv om prosentvis innkapsling sank. Som vist i Figur 7 kan 50 mikrogram medikament bli innkapslet i 50 ml ELVAX. Innkapsling av natrium suramin i 5% PVA som inneholdt 10% NaCl vises i Figurene 9-10.

EKSEMPEL 4

Innkapsling av Taxol

Fem hundre mikrogram av enten taxol eller baccatin (en taxol analog, tilgjengelig fra Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, British Columbia, Canada) blir oppløst i 1 ml av en 50:50 ELVAX:poly-l-melkesyre blanding i DCM. Mikrosfærer blir deretter preparert i en oppløsningsmaskin (Sixspindle dissolution tester, Vander Kanp, Van Kell Industries Inc., USA) i triplikat ved 200 omdreininger pr. minutt ved 42°C i 3 timer. Mikrosfærer preparert på denne måten blir vasket to ganger i vann og størrelsen analysert i mikroskop.

Bestemmelse av innkapsling av taxol blir foretatt i en ultrafiolett/synlig lys (uv/vis) analyse (uv maks absorpsjon ved 237 nanometer, fluorescens ved eksitasjon 237 nanometer, emisjon ved 325 nanometer bølgelengde; fluorescensresultater gies i kantparenteser []). Ved å bruke metoden beskrevet over kan 58 ± 12 [75 ± 25] mikrogram taxol bli innkapslet fra et totalt startmateriale på 500 mikrogram. Dette representerer $12 \pm 2,4$ [15 ± 5] % av begynnelsemengden, eller $1,2 \pm 0,25$ [$1,5 \pm 0,5$] % per polymervekt. Etter 18 timers miksing i en ovn ved 37°C hadde $10,3 \pm 10$ [$6 \pm 5,6$] % av det totale taxol blitt frigjort fra mikrosfærene.

Hva angår baccatin, ble 100 ± 15 [83 ± 23] mikrogram innkapslet fra et startmateriale på 500 mikrogram. Dette representerer 20 ± 3 [17 ± 5] % av den originale mengde baccatin, og $2 \pm 0,3$ [$1,7 \pm 0,5$] % av polymervekten. Etter 18 timers miksing i en ovn ved 37°C hadde 55 ± 13 [60 ± 23] % av baccatin blitt frigjort fra mikrosfærene.

EKSEMPEL 5

Analyse av kirurgisk krem inneholdende anti-angiogene blandinger.

- 5 Fisher rotter med vekt på ca. 300 gram blir anestesert, og et 1 cm øvre buksnitt blir gjort. 0,2 ml saltvann inneholdende 1 million levende 9L gliosarkomceller (eluert umiddelbart før bruk fra vevskulturer) blir injisert i to av de fem leverlapper ved å stikke en 27-dimensjons nål en cm gjennom leverkapselen. Buksåret blir lukket med 6,0 resorberbare suturer og hudklemmer og anestesia blir avsluttet.
- 10 Etter 2 uker vil svulstene måle ca. 1 cm. Ved denne tid blir begge leversvulster fjernet og den udekkete leveroverflate blir dekket med et blodstillende agens. Rottene blir delt i to grupper: halvparten får tilført polymer bærer, den andre halvpart får en anti-angiogen blanding.

- 15 Rottene blir avlivet 2, 7, 14 og 84 dager etter leverfjerningen ved å injisere Euthanyl i den øvre halevene. Leveren, milten og begge lunger blir fjernet og histologisk analyse utføres for å studere svulstene med henblikk på evidens for anti-angiogen aktivitet.

EKSEMPEL 6

Embolisering av rottearterier

- 20 Fisher rotter med kroppsvekt på ca. 300 gram blir bedøvet. Under bruk av aseptiske prosedyrer blir et 1 cm øvre buksnitt gjort, og leveren blir identifisert. 0,2 ml saltvann inneholdende 1 million levende 9L gliosarkomceller (eluert umiddelbart før bruk fra vevskulturer) blir injisert i hver av de fem leverlapper ved å stikke en 27-dimensjons nål en centimeter gjennom leverkapselen. 0,1 ml fysiologisk saltvann blir injisert i nålen mens den trekkes tilbake for å hindre at celler kommer ut i bukhalen. En dott gelfoam blir plassert på hvert av innstikkstedene for å sikre at blødning stopper. Buksåret lukkes med 6,0 resorberbar tråd med hudklemmer, og bedøvelsen avsluttes. Rottene returneres til dyreavdelingen for å få en standard diett i 14 dager, på et tidspunkt hvor hver svulst vil måle 1 cm i diameter. Den
- 25 samme prosedyre blir repetert med Wistar rotter og en tykktarmkrefts cellelinje (Radiologic Oncology Lab., MD Anderson, Houston, Texas). I dette tilfelle trengs 3 uker post injectionem før svulstene måler 1 cm i diameter.
- 30

- 35 Etter 2-3 uker, avhengig av rottetype, blir den samme standard bedøvelse repetert, og et midtlinjesnitt i bukveggen blir gjort. Tolvfingertarmen blir vippt over, og arteria gastroduodenalis (CDA) blir identifisert og frigjort. Tråder blir lagt rundt midtpartiet av arterien ovenfor og nedenfor et innsnittsted, og 0,96 mm polyetylenslange blir ført retrograd

inn mot strømrretningen vha. et operasjonsmikroskop. Trådene under innføringspunktet vil ligere (lukke) arterien, mens den på oversiden vil holde kateteret på plass. Angiografi blir så utført ved at det injiseres 0,5 ml av 60% røntgentett kontrastmiddel gjennom kateteret mens et røntgenbilde blir tatt. Leverarterien blir så embolisert ved å sende partikler med diameter 15-200 mikrometer gjennom CDA inntil strømning observert med operasjonsmikroskopet stopper i minst 30 sekunder. Tilstopning av leverarterien bekreftes ved å gjenta angiografien gjennom GDA kateteret. Under bruk av denne prosedyre mottar halvparten av rottene bare 15-200 mikrometer polymer partikler, mens den andre halvpart får 15-200 mikrometer partikler med polymer-anti-angiogenfaktor blanding. Den øvre GDA ligatur blir tilstrammet for å lukke igjen GDA mens kateteret blir trukket tilbake, for å sikre stopp av blødning, og leverarterien (selv om den nå er embolisert) blir forlatt intakt. Bukveggen blir lukket med 6,0 resorberbare suturer og kirurgiske klemmer.

Rottene blir så avlivet 2, 7, 14, 21 og 84 dager etter embolisering for å bestemme effektiviteten av den anti-angiogene faktor. I korthet blir dette utført under generell anestesi og under aseptiske betingelser. Et midtlinjesnitt blir gjort, GDA blir igjen frigjort, en ligatur blir plassert nær der GDA og leverarterien løper sammen (dvs. godt ovenfor det tidligere innstikksted), en 0,96 mm polyetylenslange blir ført inn vha en snitt i arterien og angiografi blir utført. Rotten blir så avlivet ved injeksjon av Euthanyl i halevenen. Med en gang euthanasien er bekreftet blir leveren tatt ut en bloc sammen med magesekkien, milten og begge lunger.

Histologisk analyse blir utført på snitt farget med hematoxylin og eosin (H + E farge). I korthet utføres dette ved at lungene blir kuttet med 1 cm mellomrom for at embolisert materiale lettere skal passere inn i det høyresidige sirkulasjonssystem. Magesekk og milt blir snittet for å kontrollere evt. uønsket immobilisering forårsaket av reflux av partikler inn i den cøliakale tilgang til kollateralsirkulasjonen.

EKSEMPEL 7

Transplantasjon av gallestenter hos rotter.

Generell bedøvelse blir gitt til 300 grams Fisher rotter. Et 1 cm tverrsnitt blir gjort i øvre bukvegg, og leveren identifisert. 0,2 ml saltvann inneholdende 1 million 9L gliosarkomceller (eluert fra vevskultur like før bruk) blir injisert i den mest overfladiske leverlapp via en 27-størrelse nål til en dybde av 1 cm inn i leverkapselen. Blodstans blir sikret etter fjernelse av nålen ved å plassere en dott gelfoam på innstikkstedet. Saltvann er injisert mens nålen blir

trukket ut for å hindre at celler kommer inn i bukhulen eller langs stikkanalen. Bedøvelsen avsluttes og dyret bringes til dyreavdelingen hvor det blir satt på en normal diett.

5 To uker senere blir generell bedøvelse igjen benyttet. Under aseptiske betingelser blir leverlappen med svulsten identifisert via et midtlinjesnitt. En 16-størrelse angiografi nål blir ført gjennom leverkapselen inn i svulsten, en 0,96 mm føretråd blir innført gjennom nålen som fjernes over føretråden. Et nr. 5 'Fransk tilførselskateter' blir så ført over tråden med en selvekspanderende "Wallstent" av rustfritt stål (5 mm i diameter og 1 cm lang). Stenten blir plassert i svulsten og tilførselskateteret blir fjernet. En tredjedel av rottene får en vanlig rustfri stålstent ført inn, en tredjedel får en rustfri stålstent belagt med polymer, og en tredjedel får en stent belagt med polymer pluss anti-angiogen faktor. Bedøvelsen blir avsluttet og dyret returnert til dyreavdelingen.

15 Et vanlig røntgenbilde av buken blir tatt etter 2 dager for å se på hvor åpen stenten er. Rotter blir avlivet 2, 7, 14, 28 og 56 dager etter stentinnføringen ved å injisere Euthanyl, og deres lever blir fjernet i sin helhet når rotten er død. Etter 48 timers fiksering i formaldehyd blir leveren kuttet med 0,5 cm intervaller, dette inkluderer overskjæring av stenten, ved bruk av ferskt blad for hver skive. Histologiske snitt blir farget med H + E og analysert med henblikk på svulstvekst inn i hulrommet i stenten.

20

EKSEMPEL 8

Produksjon av mikrosfærer

25 Utstyr som benyttes for produksjon av mikrosfærer beskrevet under inkluderer: 200 ml vanndekkete begere (Kimax eller Pyrex), Haake sirkulerende vannbad, rører og kontroller med to tommers diameter (4 blads propelltype rustfritt stål rører - Fisher product), 500 ml glass beger, varmeplate/magnetrører (Corning), 4 x 50 ml polypropylen- sentrifugerør (Nalgene), glass scintillasjonstellekar med plastkorker, en benktoppsentrifuge (GPR Beckman), høyhastighetssentrifuge, gulvmodell (JS 21 Beckman), Mettler analysevekt (AJ 30 100, 0,1 mg), Mettler digital toppinnlasting vekt (AE 163, 0,01 mg), automatpipetter (Gilson). Reagenser inkluderer Polykaprolacton ("PCL" - mol vekt 10000 til 200000, Polysciences, Warrington Pennsylvania, USA), "vasket" etylen vinylacetat ("EVA", vasket for å fjerne antioksydanten BHT), poly (DL) melkesyre ("PLA" - mol vekt 15000 til 25000, Polysciences), polyvinylalkohol ("PVA" - mol vekt 124000 til 186000; 99% hydrolysert, Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI, USA), diklorometan ("DCM" eller "metylenklorid", 35 HPLC grad, Fisher Scientific), og destillert vann.

A. Preparering av 5% (vekt/volum) polymerløsninger

Avhengig av hvilken polymerløsning som blir preparert blir enten 1,00 g av PLC eller PLA, eller 0,5 g hver av PLA og vasket EVA veiet opp i et 20 ml glass tellekar. 20 ml DCM blir
 5 tilsatt og karet blir godt lukket. Karet blir lagret ved romtemperatur (25°C) i en time (intermitterende rysting kan brukes) eller inntil all polymer har gått i løsning (løsningen skal da være gjennomsiktig). Løsningen kan lagres ved romtemperatur i minst to uker.

B. Preparering av 5% (vekt/volum) stamløsning av PVA

10 25 gram PVA blir veiet rett opp i et 600 ml begerglass. 500 ml destillert vann blir tilsatt, sammen med en 3 tommers Teflon magnetrører. Begerglasset dekkes med glass for å senke tap fra fordampning og plassert i et 2000 ml beger med 300 ml vann (som fungerer som vannbad). PVA blir omrørt med 300 omdreininger pr min ved 85°C (Corning
 15 varmplate/rører) i to timer eller til alt er i løsning. Oppløsning av PVA kan sjekkes ved å ta en titt, løsningen skal være klar. Løsningen overføres så til en glass lagringsbeholder med skrukork og lagret ved 4°C i et maksimum av to måneder. Løsningen bør varmes til romtemperatur før bruk eller fortynning.

20 C. Prosedyre for å produsere Mikrosfærer

Basert på størrelsen av mikrosfærene som blir laget (se tabell I) blir 100 ml av PVA løsningen (konsentrasjoner gies i tabell III) plassert i det vannomgitte 200 ml beger. Haake sirulerende vannbad blir forbundet til dette beger og innholdet blir ekvilibrert ved 27°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) i 10
 25 minutter. Basert på størrelsen av mikrosfærene som blir laget (se tabell III) blir starthastighet på omrøreren bestemt, og omrørerbladene plassert halvveis nede i PVA løsningen. Røreren startes opp og 10 ml av polymerløsning (hvilken polymerløsning som brukes baseres på typen mikrosfærer som skal produseres) blir tilsatt dråpevis til PVA i løpet av 2 minutter vha. en 5 ml automatisk pipette. Etter 3 minutter blir røringshastighet justert (se Tabell III) og
 30 løsningen omrørt i ytterligere to og en halv time. Omrøringsbladene blir så fjernet fra mikrosfærepreparatet og renses med 10 ml destillert vann, rensenvannet tilføres mikrosfærepreparatet. Mikrosfærene helles i et 500 ml beger og det vanndekket beger blir vasket med 70 ml destillert vann, som også tilsettes mikrosfærepreparatet. Det 180 ml store mikrosfærepreparat blir så rørt med en glasstav, og like deler helles i fire polypropylen 50 ml
 35 sentrifugerør. Disse korkes og sentrifugeres i 10 minutter (sentrifugalkraft se Tabell I). En 5 ml automatisk pipette eller vakuumsug blir benyttet for å fjerne 45 ml av PVA supernatant fra hvert mikrosfærebunnfall.

TABELL III

PVA konsentrasjoner, omrøringshastigheter og sentrifugal-krefter nødvendig for preparering
av ulike mikrosfære-diameterområder

	PRODUKSJONS STADIE	MIKROSFÆREDIAMETER OMRÅDER		
		30 - 100 μm	10 - 30 μm	0,1 - 3 μm
10	PVA konsen- trasjon	2,5% (w/v) (dvs fortynnn 5% stam- løsning i dest. vann)	5% (w/v) (dvs ufor- tynnet stamløsning)	3,5% (w/v) (dvs fortynnn 5% stam- løsning i dest. vann)
15	Rørers start- hastighet	500 rpm ± 50	500 rpm ± 50	3000 rpm ± 200
20	Justert hastighet	500 ± 50 rpm	500 ± 50 rpm	2500 ± 200 rpm
25	Sentrifugal kraft	1000 ± 100 g (benktopt modell)	1000 ± 100 g (benktopt modell)	10000 ± 1000 g (benktopt modell)

rpm, omdreininger pr. minutt; μm , mikrometer.

30 Fem milliliter destillert vann blir så tilsatt til hvert sentrifugerrør som blir ristet for å
resuspendere mikrosfærene. De fire mikrosfæresuspensjoner blir samlet i ett sentrifugerør
sammen med 20 ml destillert vann og sentrifugert i ytterligere 10 minutter (kraft oppgitt i
Tabell I). Denne prosess blir gjentatt to ganger, totalt tre vaskeprosedyrer. Mikrosfærene blir
35 så sentrifugert en siste gang og resuspendert i destillert vann. Etter den siste vask blir
mikrosfærepreparatet overført til et tellekar som er veiet på forhånd. Karet blir lukket og
forblir over natten ved romtemperatur (25°C) for å la mikrosfærene sedimentere pga

tyngdekraften. Mikrosfærer i størrelse 0,1 til 3 mikrometer vil ikke sedimentere under disse betingelser, slik at disse forblir i suspensjonen.

D. TØRKING AV 10 MIKROMETER TIL 30 MIKROMETER, OG 30 MIKROMETER TIL 100 MIKROMETER DIAMETER MIKROSFÆRER

Etter at mikrosfærene har sittet i romtemperatur over natten blir en 5 ml automatisk pipette eller vakuumsug brukt for å fjerne supernatantene fra de sedimenterte mikrosfærer.

Mikrosfærene tillates å tørke i de åpne kar i en skuff i en uke eller til de er helt tørre (karet oppnår konstant vekt). Raskere tørking kan oppnås ved at de åpne tellekar settes under en langsom strøm av nitrogengass (strøm ca. 10 ml/min) i avtrekk. Når tørrhet er oppnådd (karet har konstant vekt) blir tellekaret veiet og lukket med kork. Det merkete og lukkede tellkar blir lagret ved romtemperatur i en skuff. Mikrosfærer blir vanligvis ikke lagret mer enn tre måneder.

E. TØRKING AV 0,1 TIL 3 MIKROMETER DIAMETER MIKROSFÆRER

Denne størrelse mikrosfærer sedimenterer ikke ut av løsning, så de forblir i suspensjon ved 4°C i maksimum fire uker. For å bestemme konsentrasjonen av mikrosfærer i suspensjonen blir en 0,2 ml prøve av suspensjonen pipettert opp i et 1,5 ml mikrosentrifugerør som har blitt veiet på forhånd. Røret blir sentrifugert ved 10000xg (Eppendorf benktopp Microfuge), supernatanten fjernes og røret blir tørket ved 50°C over natten. Røret blir så veiet på nytt for å bestemme vekten på mikrosfærer i røret.

F. PRODUKSJON AV TAXOLHOLDIGE MIKROSFÆRER

For å preparere Taxolholdige mikrosfærer blir en passende mengde taxol (basert på prosent taxol som skal innkapsles) plassert rett i et 20 milliliter tellekar. Ti milliliter av en passende polymerløsning blir så tilsatt karet, som så blir ristet til taxol har gått i løsning.

Mikrosfærer som inneholder taxol kan så bli produsert slik beskrevet over i avsnitt (C) t.o.m. (E).

EKSEMPEL 9

Produksjon av stentbeleggingsmateriale.

Reagenser og utstyr som benyttes i det følgende eksperiment inkluderer: Stenter av medisinsk kvalitet ble skaffet kommersielt fra ulike produsenter, f.eks. "'Strecker' stent", og holdestativ,

20 milliliter glasstellekar med kork (plast type), TLC "atomizer", nitrogen gasstank, glass reagensrør, (ulike størrelser fra 1 ml og oppover), glassbegere (ulike størrelser), Pasteur pipetter, pinsetter, polycaprolakton ("PCL", mol. vekt 10000 til 20000, Polysciences), Taxol (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, 95% renhet), etylen-vinylacetat ("EVA" - vasket - se over), poly(D,L)melkesyre ("PLA" - mol. vekt 15000 til 25000, Polysciences), diklormetan ("DCM" - HPLC grad, Fisher Scientific).

A, En prosedyre for dusjete stenter.

10 I det følgende beskrives en typisk metode som bruker en 3 mm krøllet diameter innskutt metaltrådstent av ca. 3 mm. lengde. For stenter med større diameter brukes større volumer av polymer/medikament løsning.

15 Vei opp tilstrekkelig mengde polymer i et 20 ml glass tellekar og tilsett tilstrekkelig DCM til man oppnår en 2% (vekt/volum) løsning. Lukk karet og bland løsningen for å løse opp polymeren (håndristing). Sett opp stenten vertikalt. Dette kan gjøres med et stykke nylon, og ved at man binder stenten til et stativ. Plasser dette stent-holdende apparat 12-30 cm over avtrekksgulvet på en passende støtte (f.eks. 2000 ml glassbeger snudd oppned). Ved bruk av en automatisk pipette overføres et passende volum (minimum 5 ml) av 2% polymer løsningen
20 til et separat 20 ml gass tellekar. Tilsett en passende mengde taxol til løsningen og løs den opp ved å riste karet med hånden.

For å gjøre klar for dusjing fjernes korken fra dette tellekaret og (bare) trommelen til en TLC atomizer dyppes i polymerløsningen. Noter her at atomizerens reservoar ikke benyttes i denne
25 prosess, idet 20 ml tellekaret virker som reservoar. Koble nitrogentanken til glassinnkoplingen på atomizeren. Øk gradvis trykket til atomisering og dusjing begynner. Noter trykket og bruk dette gjennom hele prosedyren. For å dusje stenten brukes 5 sekunder dusjer med en 15 sekunders tørketid mellom dusjene. Etter 5 dusjer roteres stenten 90 grader og denne del av stenten dusjes. Dette gjentas inntil alle sider av stenten har blitt dusjet. Under
30 tørketiden klemmes gasstilførselen igjen for å unngå bortkastet dusjing. Dusjing fortsetter til en passende mengde polymer har blitt avleiret på stentene. Disse mengder kan baseres på den planlagte bruk av stenten in vivo. For å bestemme denne mengde veies stentene etter at dusjingen er avsluttet og stentene har tørket. Trekk originalvekten fra sluttvekten av stenten, dette gir mengden polymer (pluss taxol) som er bundet til stenten. Lagre den belagte stenten i
35 en forseglet beholder.

B. Prosedyre for neddyppete stenter.

I det følgende beskrives en typisk metode med en 3 mm krøllet diameter innskutt metalltrådstent av ca. 3 mm. lengde. For stenter med større diameter blir større volumina av polymer/medikament løsning brukt i større reagensrør.

Vei inn 2 grm EVA i et 20 ml glass tellekar og tilsett 20 ml DCM. Sett kork på karet og la det stå i to timer for å løse opp innholdet (hyppig håndrysting vil hjelpe oppløsningsprosessen). Vei inn en kjent mengde taxol i et 1 ml reagensrør og tilsett 0,5 ml av polymerløsning. Løs opp taxol ved å dra løsningen opp og ned i en Pasteur pipette. Med en gang taxol er gått i løsning holdes reagensrøret nesten horisontalt (den seige polymerløsning vil ikke renne ut). Før inn stenten med pinsett helt til bunnen av røret. La polymerløsningen flyte nesten til rørets åpning ved å vippe røret over og deretter tilbake til litt over horisontalen. Mens man langsomt roterer stenten i røret fjerner man stenten (på ca. 30 sekunder).

Hold stenten vertikalt for å tørke. Noen av de lukkede perforasjoner kan sprette opp slik at et hull dannes i den kontinuerlige lag av polymer. Dette kan rettes på ved å gjenta neddyppingsprosedyren, men repetisjon av prosedyren kan også føre til mere oppsprekking og et generelt ujevnt lag av polymer. Det er vanligvis bedre å dyppe stenten bare en gang og å skjære ut en del som ikke har noen oppsprettete perforasjoner. Den dyppede stenten lagres i en lukket beholder.

EKSEMPEL 10

Produksjon av kirurgiske kremer.

Som beskrevet over gir denne oppfinnelse en rekke polymer-inneholdende medikamentblandinger som kan brukes innen ulike kliniske situasjoner. For eksempel kan blandinger produseres: (1) som en 'termokrem' som appliseres på en ønsket sted som væske og som ved en spesifikk temperatur (f.eks. kroppstemperatur) størkner til fast konsistens med den ønskete form, (2) som en dusj (f.eks. "nanodusj") som kan tilføres et ønsket sted enten direkte eller gjennom et spesielt apparat (f.eks. endoskopi), og som deretter konsoliderer til en fast substans som adherer til vevet der det er applisert, (3) som en angiogenese-hemmende, motstandsdyktig og fleksibel polymerfilm som adhererer til det ønskete sted enten direkte eller via et spesielt apparat, og som fortrinnsvis binder til det sted hvor det appliseres, og (4) som en væske sammensatt av en suspensjon mikrosfærer i et passende bærermedium, som appliseres til et ønsket sted enten direkte eller via et spesialisert apparat og etterlater et lag

med mikrosfærer på applikasjonsstedet. Representative eksempler på hver av disse utførelser blir beskrevet i større detalj under.

A. Prosedyre for produksjon av Termokrem

5

Reagenser og utstyr som brukes i det følgende eksperiment inkluderer en steril glassprøyte (1 ml), Corning varmeplate/magnetrører, 20 ml glass tellekar, former (f.eks. 50 mikroliter DSC panne eller den indre del av kork til 50 milliliter sentrifugerør), skalpell og pinsetter, polycaprolakton ("PCL" - mol. vekt 10000 til 20000, Polysciences, Warrington, PA, USA) og taxol (Sigma, grade 95% renhet minimum).

10

Vei inn 5,00 gram polycaprolakton rett i et 20 ml tellekar, plasser karet i et 600 ml begerglass som inneholder 50 ml vann. Varm forsiktig opp begeret til 65°C og hold det på denne temperatur i 20 minutter. Dette tillater polymeren å smelte. Bland en kjent mengde taxol eller andre angiogeneshemmere godt inn i den smeltete polymer ved 65°C. Hell den smeltete polymer inn i en på forhånd varmet (60°C ovn) form. Bruk en spatel til å hjelpe hellingsprosessen. La formen kjøles så polymeren størkner. Kutt opp og knus polymeren i små biter (ca. 2mm x 2mm x 2mm i størrelse). Disse biter må passe i en 1 ml glassprøyte. Fjerne stempelet fra glassprøyten (ikke ta vekk korken over spissen) og plasser den på vekten. Tarer vekten.

15

20

Vei inn 0,5 gram av biter direkte opp i den åpne ende av sprøyten. Plasser sprøyten vertikalt (den lukkede spiss ned) i et 500 ml glassbeger som inneholder destillert vann (65°C, Corning varmeplate) slik at vann ikke kommer inn i sprøytesylindren. Polymeren smelter fullstendig innen 10 minutter i dette apparat. Etter at polymerbitene har smeltet fjernes sprøyten fra vannbadet, holdes horisontalt og man fjerner korken. Sett stempelet tilbake i sprøyten og komprimer den smeltete polymer til en seig klump i spissen av sprøyten. Sett kork på sprøyten og la den kjøles til romtemperatur.

25

30

Før bruk kan sprøyten bli oppvarmet til 60°C og tilsettes som en væske som størkner ved nedkjøling til kroppstemperatur.

B. Prosedyre for produksjon av "Nanodusj"

35

Nanodusj er en suspensjon av små mikrosfærer i saltvann. Dersom mikrosfærene er meget små (dvs. under 1 mikrometer i diameter) danner de et kolloid slik at suspensjonen ikke vil felles ut av tyngdekraften. Som beskrevet i større detaljer under kan en suspensjon av 0,1 til 1

mikrometer mikropartikler bli dannet som passer til å deponeres på vevet via en hånddrevet aerosol. Utstyr og reagenser som kan bli brukt for å lage nanodusj inkluderer et 200 ml vann-isolert beger (Kimax eller Pyrex), Haake sirkulerende vannbad, røreapparat med kontroll med 2 tommers diameter (4 blads rører av propelltype med rustfritt stål, Fisher type), 500 ml glassbeger, varmeplate/rører (Corning type), 4x50 ml polypropylen sentrifuge rør (Nalgene), glass tellekar med plastkorker, benketoppsentrifuge (Beckman), høyhastighets sentrifuge (gulvmodell, Beckman JS 21), Mettler analytiske vekter (AJ 100, 0,1 mg), Mettler digital toppinnlastings vekt (AE 163, 0,01 mg), automatpipetter (Gilson), sterile pipettespisser, pumpetype aerosol (Pfeiffer Pharmaceuticals) 20 milliliter, laminærstrøms avtrekk, polycaprolakton ("PCL" - mol. vekt 10000 til 20000, polysciences, Warrington, PA, USA), "vasket" (se tidligere) etylen vinylacetat ("EVA"), poly(D,L)melkesyre ("PLA" - mol. vekt 124000 til 186000, 99% hydrolysert, Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA), diklorometan ("DCM" eller "metylen klorid", HPLC grad, Fisher Scientific), destillert vann, sterilt fysiologisk saltvann (Becton og Dickenson ekvivalent).

1. Preparering av 5% (w/v) Polymerløsninger

Avhengig av hvilken polymerløsning som blir laget blir 1,00 gram av PCL eller PLA, eller 0,5 g av PLA og vasket EVA veiet rett opp i et 20 ml glass tellekar. Ved å bruke en målesylinder tilsettes 20 ml DCM, og karet lukkes tett. La karet stå ved romtemperatur (25°C) i en time eller inntil all polymer er oppløst (rysting med hånd av og til kan brukes). Oppløsning av polymer kan estimeres med synet, løsningen skal være gjennomsiktig. Merk karet med navn på løsning og produksjonsdato. Lagre løsningene ved romtemperatur og bruk dem innen to uker.

2. Preparering av 3,5% (vekt/volum) Stamløsning av PVA

Løsningen kan lages ved å følge protokollen som beskrives nedenfor, eller ved å fortynne den 5% (vekt/volum) PVA stamløsning som ble laget for å produsere mikrosfærer (se Eksempel 8). I korthet blir 17,5 gram PVA veiet rett opp i et 600 ml begerglass og 500 ml destillert vann blir tilsatt. Plasser en Teflon magnetrører i begerglasset, dekk begeret med et dekkglass for å redusere fordampningstap. Plasser begeret i et 2000 ml glassbeger med 300 ml vann, som fungerer som vannbad. Rør PVA løsningen (300 omdreinger pr. minutt, 85°C, på en Corning varmeplate/magnetrører) i to timer eller inntil alt har gått i løsning. Oppløsning av polymer kan vurderes med synet, løsningen skal være gjennomsiktig. Bruk pipette til å overføre løsningen til en beholder med glass skrukork, for så å lagres ved 4°C opptil to måneder. Denne løsning bør varmes til romtemperatur før bruk eller fortynning.

3. Prosedyre for produksjon av Nanodusj

- 5 Plasser omrøringsapparatet i et avtrekk. Sett 100 ml av 3,5% PVA løsningen i det 200 ml vann-isolert beger. Tilkoble Haake vannbadet til dette beger og la inneholdet ekvilibrere ved 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) i ti minutter. Sett starthastighet for røreapparatet på 3000 (± 200) omdreininger pr minutt. Plasser bladmikseren halvveis nede i PVA løsningen og begynn omrøringen. Drypp 10 ml av en polymerløsning (type polymer bestemmes av type nanodusj som lages) i PVA løsningen under omrøring, benyttende en automatisk 5 ml pipette over en periode av 2
- 10 minutter. Etter 3 minutter justeres røringshastighet til 2500 (± 200) omdreininger pr. minutt, og apparatet får arbeide i to og en halv time. Etter denne tid fjernes omrøringsbladet fra nanodusjpreparatet og renses med 10 ml destillert vann. Tilsett rensenvæsken til nanodusjpreparatet.
- 15 Hell mikrosfærepreparatet over i et 500 ml begerglass. Vask det isolerte vannbad med 70 ml destillert vann, tilsett vaskevæsken til nanodusjpreparatet. Rør det 180 ml store mikrosfærepreparat med en glasstav og hell like mengder inn i fire polypropylen 50 ml sentrifugerør. Lukk rørene med kork, sentrifuger rørene i 10 minutter ved 10000 (± 1000) x g. Fjern 45 ml av PVA løsningen fra hvert rør ved hjelp av 5 ml automa pipetter eller
- 20 vakuumsug og kast dette. Tilsett 5 ml destillert vann til hvert sentrifugerør og rist med en Vortexmaskin for å resuspendere mikrosfærene i hvert rør. Ved å bruke 20 ml destillert vann samles de fire mikrosfæresuspensjoner i et sentrifugerør. Sentrifuger røret i 10 minutter ved 10000 (± 1000) x g for å vaske mikrosfærene. Sug av supernatanten fra mikrosfærebunnfallet, tilsett 40 ml destillert vann og repeter dette to ganger, totalt tre vasker.
- 25 Gjør en fjerde vask, men bruk nå kun 10 ml (ikke 40 ml) destillert vann til å resuspender mikrosfærene. Etter denne fjerde vask overføres mikrosfærepreparatet til et på forhånd veiet glass tellekar.
- 30 Lukk karet med kork og la det stå i en time ved romtemperatur (25°C) for å la 2 og 3 mikrometers diameter mikrosfærer sedimentere under tyngdekraftvirkning. Etter en time overføres 9 ml fra toppen av suspensjonen med en 5 ml automatisk pipette til en 50 ml, sterilt lukket sentrifugerør. Sentrifuger suspensjonen i 10 minutter ved 10000 (± 1000) x g. Kast supernatanten og resuspender bunnfallet i sterilt fysiologisk saltvann. Mengden saltvann avhenger av den ønskete sluttkonsentrasjon av suspensjonen (vanligvis 10% w/v). Vask
- 35 aerosolapparatet grundig i sterilt saltvann og tilsett nanodusjsuspensjonen til aerosolen.

C. Produksjon av Nanodusj med Taxol

Benytt Taxol (Sigma grad 95% renhet) for å produsere nanodusj med taxol. Vei inn den riktige mengde av taxol direkte i et 20 ml glass tellekar for å preparere stamløsning av polymer og medikament. Den korrekte mengde bestemmes ut fra prosent taxol som ønskes i nanodusjen. For eksempel for 5% taxol (sluttkons.) ville mengden taxol være 25 mg, siden mengde polymer som tilsettes er 10 ml av en 5% polymer i DCM løsning (se neste trinn).

Tilsett 10 ml av den korrekte 5% polymerløsning til røret som inneholder taxol. Sett på kork og rist eller roter dette for å løse opp taxol (kontroller visuelt at taxol virkelig går i løsning). Merk karet med produksjonsdato. Dette må benyttes samme dag.

Følg prosedyrene som beskrevet over, med unntak av at polymer/medikament (f.eks. taxol) stamløsning blir benyttet istedenfor polymerløsningen.

D. Prosedyre for å produsere filmer

Begrepet film viser til en polymer som er produsert i mange geometriske former. Filmen kan være et tynt elastisk lag eller en 2 mm tykk plate av polymer. Denne filmen blir laget for å plasseres på utsatt vev slik at ethvert innkapslet medikament blir frigjort fra polymeren over en lang tidsperiode over på vevet. Filmer kan bli laget via mange prosesser, inkluderende for eksempel støpning eller dusjing.

I innstøpningsprosedyren blir polymeren enten smeltet og helt inn i en form, eller løst i diklorometan og helt inn i en form. Polymeren vil da henholdsvis enten størkne under nedkjøling eller mens løsningsmiddelet fordamper. I dusjmetoden blir polymeren oppløst i løsningsmiddel og dusjet på glass, slik at polymer vil størkne på glasset mens løsningsmiddelet fordamper. Gjentatte dusjer tillater en oppbygning av polymer til en film som kan taes vekk fra glasset.

Reagenser og utstyr som ble brukt i disse eksperimenter inkluderer et lite begerglass, Corning varmeplate/rører, støpeformer (f.eks. korker til 50 ml sentrifugerør) og apparat for å holde formene, 20 ml glass tellekar med plastkorker, TCL atomizer, nitrogen gasstank, polycaprolacton ("PCL" - mol. vekt 10000 til 20000, Polysciences), Taxol (Sigma 95% renhet), etanol, 'vasket' (se tidligere) etylen vinylacetat ("EVA"), poly(D,L)melkesyre ("PLA" - mol. vekt 15000 til 25000, Polysciences), dikloromethan (HPLC grad, Fisher Scientific).

1, Prosedyre for å lage filmer - Smeltestøping

Vei inn en kjent mengde PCL i et lite glassbeger. Plasser dette i et større begerglass med vann (fungerer som vannbad) og sett det på varmeplaten som holder 70°C i 15 minutter (eller til polymeren har smeltet fullstendig). Tilsett en kjent mengde medikament til den smeltete polymer og rør grundig i blandingen. For å hjelpe på finfordeling av medikament i den smeltete polymer kan medikamentet bli suspendert eller oppløst i et lite volum (<10% av det smeltete PCL) av 100% etanol. Denne etanolsuspensjon blir så blandet i den smeltete polymer. Hell polymeren i en form og la den kjøle. Etter kjøling lagres filmen i en beholder.

2. Prosedyre for å lage filmer - Løsningsinnstøping

Vei inn tilstrekkelig polymer i et 20 ml glass tellekar og tilsett tilstrekkelig DCM til å oppnå en 2% løsning (w/v). Sett kork på karet og bland løsningen for å løse opp polymeren (ved håndristing). Sett formene loddrett i et passende apparat for å holde formene i avtrekket. Sett dette apparat 15 til 30 cm over gulvet i avtrekket, på en passende støtte (f.eks. et 2000 ml glassbeger snudd oppned) for å tillate horisontal dusjing. Ved å bruke en automatisk pipette overføres et passende volum (minimum 5 ml) av 2% polymerløsningen til separate 20 ml glass tellekar. Tilsett tilstrekkelig taxol til løsningen og oppløs dette med håndristing av det lukkede tellekar. For å gjøre klart for dusjing fjernes korken fra dette kar og en TLC atomizer "barrel" blir dyppet i polymerløsningen. Noter: Reservoaret til TLC atomizer blir ikke brukt i prosedyren, det 20 ml glasskar fungerer som reservoar.

Forbind nitrogentanken til gassinntaket på atomizeren. Øk gradvis trykket til "atomization" og dusjing begynner. Noter trykket og benytt denne verdi gjennom hele prosedyren. Det benyttes 5 sekunders vibrerende dusjer for å dusje formene, med en 15 sekunders tørkepause mellom hver dusj. Under tørkingen klemmes gasslangen av med fingrene for å hindre unødig dusjing. Dusjingen fortsetter til en passende mengde polymer er deponert på formen. Tykkelsen baseres på behov. La de dusjete filmene forbli på formene, og lagre disse i lukkede beholdere.

E. Prosedyre for å lage Nanokrem

En nanokrem er en suspensjon av mikrosfærer i en hydrofil gelbase. Innen et aspekt av denne oppfinnelse kan gelen eller kremen være smurt på et vev som en metode for å lokalisere mikrosfærer med medikament nært inntil målvevet. Siden den er vannbasert vil kremen snart bli fortynnet med kroppsvæsker, dette fører til et fall i kremens klistrethet, og en tendens til at

mikrosfærene blir deponert på vevet rundt. Et lager med medikament-holdige mikrosfærer blir derved lokalisert nær målvevet.

Reagenser og utstyr som ble benyttet under disse eksperimenter inkluderer glassbegere, Carbopol 925 (farmasøytisk grade, Goodyear Chemical Co.), destillert vann, 1 M natronlut (NaOH) i vandig løsning, 5M natronlut i vandig løsning, mikrosfærer i 0,1 til 3 mikrometer diameter størrelsesområde suspendert i vann til en 20% (vekt/volum) suspensjon (se tidligere).

1. Preparering av 5% (vekt/volum) Carbopol Gele

Tilsett en tilstrekkelig mengde av carbopol til 1 M natronlut så det dannes en 5% løsning. La blandingen stå ca. en time for at carbopol skal løses i natronluten. Under denne perioden røres blandingen med en glasstav. Etter en time måles pH i blandingen. En lav pH indikerer at carbopolen ikke er fullstendig oppløst, og den ønskete pH verdi er 7,4. Bruk 5M NaOH for å justere pH. Dette oppnåes ved langsom tilsetning av dråper 5M NaOH til løsningen, omrøring og pH måling. Det tar vanligvis ca. en time å justere pH til 7,4. Med en gang pH 7,4 er oppnådd blir gelen tildekket og hensatt i to-tre timer. Etter denne periode sjekkes pH igjen for å sikre at den fremdeles er 7,4. Hvis den har endret seg, juster den tilbake til 7,4 med 5M NaOH. La gelen stå i noen timer for å sikre at pH er stabil på 7,4. Repeter denne prosess til den ønskete pH verdi er nådd. Merk beholder med navn på produkt og produksjonsdata. Gelen må brukes for å produsere nanokrem innen en uke.

2. Prosedyre for å lage Nanokrem

Tilsett tilstrekkelig av 0,1 til 3 mikrometer mikrosfærer til vann for å få en 20% suspensjon av mikrosfærer. Putt 8 ml av 5% carbopolgel opp i et glassbeger. Tilsett 2 ml av 20% mikrosfæresuspensjonen til begerglasset. Rør i blandingen med en glasstav eller en blandespatel slik at man får en grundig fordeling av mikrosfærene i hele gelen. Dette tar vanligvis 30 minutter. Når mikrosfærene er fordelt i gelen blir den plassert i et lagringskar. Lagring foregår ved 4°C, og preparatet må brukes innen en måned.

EKSEMPEL 11

KONTROLLERT TILSETNING AV TAXOL FRA MIKROSFÆRER SAMMENSATT AV EN BLANDING AV ETYLEN-VINYLACETAT KOPOLYMER OG POLY(D,L MELKESYRE). IN VIVO TEST AV MIKROSFÆRER PÅ CAM-TESTEN.

5

Dette eksempel beskriver preparering av taxol-holdige mikrosfærer sammensatt av en blanding med biodegraderbare poly(D,L-melkesyre) (PLA) polymer og ikkedegraderbare etylen-vinylacetat (EVA) kopolymer. I tillegg blir in vitro frigjøringshastighet og den anti-angiogene aktivitet av taxol demonstrert.

10

Reagenser som ble brukt i disse eksperimenter inkluderer taxol, kjøpt fra Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO), PLA (mol. vekt. 115000 til 25000) og EVA (60% vinylacetat) (fra Polysciences, Warrington, PA), polyvinylalkohol (PVA, mol. vekt 124000-186000, 99% hydrolysert, fra Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) og diklorometan (DCM) (HPLC grad, fra Fisher Scientific Co.). Destillert vann brukes overalt.

15

A. Preparering av mikrosfærer

Mikrosfærer lages essensielt som beskrevet i Eksempel 8 ved å bruke løsning-fordampningsmetoden. I korthet blir 5% vekt/volum polymer løsning i 20 ml DCM laget med blandinger av EVA:PLA mellom 35:65 og 90:10. Til 5 ml av 2,5% vekt/volum PVA i vann i et 20 ml glasskar tilsettes 1 ml av polymerløsningen dråpevis under omrøring. Seks like glasskar settes i et røreapparat for test av oppløsning (Vanderkamp) og blandes ved 200 omrøringer pr minutt. Temperaturen i karene økes over en periode på 15 minutter fra romtemperatur til 40°C og holdes så der i to timer. Karene blir sentrifugert ved 500 x g og mikrosfærene vaskes tre ganger i vann. Ved noen EVA:PLA blandinger klumpet mikrosfærene seg under vaskingen p.g.a. av det disperaserende og emulgerende agens PVA blir fjernet. Denne effekt kunne bli analysert semikvantitativt siden aggregerte mikrosfærer smeltet sammen og den sammensmeltet polymermasse fløt på overflaten av vaskevannet. Dette polymerlaget ble kastet under vaskebehandlingene, og det gjenværende bunnfall ble vasket. Prosent aggregering kan bli bestemt fra

20

25

30

$$\% \text{ aggregering} = \frac{1 - (\text{vekt av mikrosfærer i bunnfall}) \times 100}{\text{begynnelsesvekt av polymer}}$$

35

Taxol-inneholdende mikrosfærer (0,6% vekt% taxol) lages ved å løse opp taxol i 5% polymer løsning i DCM. Polymerblandingen benyttet er 50:50 ERVA:PLA. En 'stor størrelse' fraksjon

og en 'liten størrelse' fraksjon av mikrosfærer lages ved å tilsette taxol/polymerløsning dråpevis til henholdsvis 2,5% vekt/volum PVA og 5% vekt/volum PVA. Blandingene omrøres (200 omdreininger pr minutt) ved 40°C i to timer, sentrifugeres og vaskes tre ganger i vann som beskrevet. Mikrosfærer blir lufttørket og prøver blir analysert for størrelse v.h.a. et lysmikroskop med mikrometer. Mer enn 300 mikrosfærer blir studert pr. prøve. Kontroll mikrosfærer (minus taxol) blir preparert og målt som beskrevet.

B. Innkapslingseffektivitet

Kjent vektmengde av taxol-innholdende mikrosfærer oppløses i 1 ml DCM, og 20 ml av 40% acetonitril i vann, 50°C, blir tilsatt og ristet til DCM har fordampet. Konsentrasjonen av taxol i 40% acetonitril blir bestemt ved HPLC (høytrykks væskekromatografi) på en C8 revers-fase søyle (Beckman) med en mobil fase av vann:metanol:acetonitril (37:5:58) og en strømningshastighet på 1 ml/min (Beckman isokratisk pumpe), og ultrafiolett deteksjon ved 232 nanometer bølgelengde. For å bestemme gjenvinningseffektivitet av denne ekstraksjonsprosedyre blir kjente mengder av taxol fra 100-1000 mikrogram løst i 1 ml DCM og utsatt for samme ekstraksjon i triplikat som beskrevet. Gjenvinning er alltid høyere enn 85% og verdiene for innkapsling blir korrigert etter dette.

C. Studier over medikamentfrisetting

Til 15 ml glassrør med skrukork blir tilsatt 10 ml av 10 mM fosfatbufret saltvann (PBS), pH 7,4 og 35 mg taxol-holdige mikrosfærer. Rørene roteres ved 37°C og ved gitte tidsintervaller blir de sentrifugert (1500 x g i 5 minutter), supernatanten samles for analyse.

Mikrosfærebunnfall blir resuspendert i fersk PBS (10 ml) ved 37°C og reinkubert. Taxol konsentrasjoner blir bestemt ved ekstraksjon i 1 ml DCM etterfulgt av inntørkning under nitrogen, rekonstituering i 1 ml av 40% acetonitril i vann og analyse med HPLC som beskrevet.

D. Scanning elektronmikroskopi (SEM)

Mikrosfærer blir plassert på prøveholdere, belagt med gull og bilder blir tatt med et Philips 501B SEM ved 15 kV.

E. CAM-studier

Befruktete kyllingfoster blir inkubert i fire dager før skallfri dyrking. Innholdet i eggene blir inkubert i 90% relativ fuktighet og 3% CO₂ i to dager. På dag 6 av inkuberingen blir 1 ml prøver av 0,6% taxol-inneholdende eller taxolfri (kontroll) mikrosfærer plassert rett på CAM overflaten. Etter to dagers eksponering blir vaskulaturen studert med et stereomikroskop koblet til et videokamera, videosignalene blir så vist på en dataskjerm og videotrykket.

F. Resultater

Mikrosfærer laget fra 100% EVA var fritt suspendert i PVA løsninger, men aggregerte og smeltet sammen under etterfølgende vaskeprosedyrer i vann for å fjerne PVA. Blanding av EVA med økende mengder PLA ga mikrosfærer som viste en lavere tendens til å aggregere og smmensmelte under vasking i vann som beskrevet i Figure 15A. En 50:50 blanding av EVA:PLA dannet mikrosfærer med god fysikalsk stabilitet, dvs. mikrosfærene forble separate og godt fordelt med neglisjerbar aggregering og sammensmelting.

Størrelsesområdet for 'liten dimensjon' fraksjonen av mikrosfærer ble funnet å være >95% av mikrosfæreprøven (som vekt) i 10-30 mikrometer området og for 'stor dimensjon' ble fraksjonen av mikrosfærer funnet å være >95% av mikrosfæreprøven (som vekt) i 30-100 mikrometer området. Representative scanning elektronmikroskopibilder av taxolholdige 50:50 EVA:PLA mikrosfærer i henholdsvis 'liten dimensjon' og 'stor dimensjon' størrelsesområder vises i Figurene 15B og 15C. Mikrosfærene er runde med en glatt overflate og uten antydning til fast medikament på overflaten av sfærene. Effektiviteten av innkorporering av taxol i 50:50 EVA:PLA mikrosfærer er mellom 95-100% ved startkonsentrasjoner av taxol mellom 100-1000 mg taxol pr 50 mg polymer. Det er ingen signifikant forskjell (Student's t-test, $p < 0,05$) mellom innkapslingseffektivitet for enten de små eller store mikrosfærer.

Tidskurven for frisetning av taxol fra 0,6% vekt/volum inneholdende 50:50 EVA:PLA mikrosfærer vises i Figur 15D for 'små' (åpne sirkler) og 'store' (lukkete sirkler) mikrosfærer. Frisetningsstudiene er gjort i triplikat i tre separate eksperimenter. Frisetningsprofilene er bifasiske, med en intial rask frisetning av taxol, eller 'utbruddsfase', i løpet av de første fire dager, som kommer fra begge størrelser av mikrosfærer. Dette følges av en langsommere frisetningsfase. Det er ingen signifikant forskjell mellom frisetning fra 'små' og 'store' mikrosfærer. Mellom 10-13% av det totale innhold av taxol blir frigjort på 50 dager.

Taxolholdige mikrosfærer (0,6% vekt/volum) testes med CAM metoden, resultatene vises i Figur 15E. Taxol mikrosfærer frigjorde tilstrekkelig medikament til å danne en sone uten blodårer i det omgivende vev (Figur 15F). Noter at umiddelbart inntil mikrosfærene ("MS" i Figurene 15E og 15F) finnes et område hvor blodårer er totalt fraværende (Sone 1), lenger vekk fra mikrosfærene er et område med avbrutte, nonfunksjonelle kapillærer (Sone 2), og det er bare i en avstand på ca. 6 mm fra mikrosfærene at kapillærene går tilbake til normale. I CAM behandlet med kontroll mikrosfærer (uten taxol) er det et normalt nettverk av kapillærer.

10 Diskusjon

Kjemisk embolisering av arterier er en invasiv kirurgisk teknikk. Ideelt sett skulle derfor en kjemoembolisk formulering av et anti-angiogent eller medikament mot kreft frisette medikamentet nær ved svulstens plassering, i konsentrasjoner tilstrekkelige for aktivitet over en lang tidsperiode, på størrelsesorden med flere måneder. EVA er en vevsforlikelig, nondegraderbar polymer som har blitt mye brukt for å levere makromolekyler i lange perioder (>100 dager).

EVA ble først valgt som et polymert biomateriale for å lage mikrosfærer med taxol fordelt i polymermatrix. Imidlertid fant vi at mikrosfærer laget med 100% EVA aggregerte og smeltet sammen nesten totalt under vaskeprosedyrene.

Polymere og kopolymere basert på melkesyre og glykolsyre reagerer ikke med fysiologiske prosesser og er biokompatible, samt nedbrytes ved hydrolyse til toksikologisk akseptable produkter. Kopolymere av melkesyre og glykolsyre har en raskere nedbrytning enn PLA, og medikamentholdige mikrosfærer laget med disse kopolymere er ikke brukbare til forlenget, kontrollert frisetning over flere måneder. Dollinger og Sawan blandet PLA med EVA og viste at nedbrytningslevetid for PLA økte hvis forholdet av EVA i blandingen ble øket. De antydte at blandinger av EVA og PLA burde gi en polymermatrix med bedre mekanisk stabilitet og kontroll av medikament-frisetningen enn PLA.

Figur 15A viser at en økning av mengde PLA i en EVA:PLA blanding senket aggregering av mikrosfærer i suspensjon. Blandinger av 50% eller mindre EVA i EVA:PLA matrix ga fysikalsk stabile mikrosfæresuspensjoner i vann eller PBS. En blanding av 50:50 EVA:PLA ble derfor valgt for alle videre studier.

Ulike størrelsesfraksjoner av mikrosfærer kunne lages ved å endre konsentrasjonen av emulgerende stoff, PVA, i vannfasen. 'Små' mikrosfærer ble laget ved høyere PVA konsentrasjoner (5% vekt/volum), mens 'store' mikrosfærer ble laget ved 2,5% (vekt/volum) PVA. Alle andre produksjons-variable er identiske for begge mikrosfærefraksjoner. Den høyere konsentrasjon av emulgator ga en seigere vandig fordelingsløsning og ga derfor mindre dråper polymer/taxol/DCM emulgert i vannfasen, og således mindre mikrosfærer. Taxolholdige mikrosfærer inneholdt mellom 95-100% av startmengden med taxol, tilsatt den organiske fase, innkapslet i de faste mikrosfærer. Den lave vannløselighet av taxol fordelte stoffet preferentielt i den organiske fase som inneholdt polymeren.

Frisetningshastighet av taxol fra de 50:50 EVA:PLA mikrosfærer er meget langsom, med mindre enn 15% av tilsatt taxol frigjort innen 50 dager. Den første utbruddsfase av medikamentfrisetning kan være forårsaket av diffusjon av medikament fra området nær overflaten av mikrosfærene.

Mekanismen for medikamentfrisetning fra ikkedegraderbare polymermatriser som EVA antas å representere diffusjon av vann gjennom den finfordelte medikamentfase innen polymeren, oppløsning av medikamentet og diffusjon av løst stoff gjennom en serie av sammenhengende, væskefylte porer. Blandinger av EVA og PLA har blitt vist å være ikke blandbare eller bikontinuerlige over områder fra 30 til 70% EVA i PLA. I nedbrytningsstudier, foretatt i PBS ved 37°C, ble PLA etter en introduksjons- eller forsinkelsesperiode hydrolytisk nedbrutt og vasket ut fra EVA:PLA polymeren, etterlatende et inaktivt svamp-lignende skjelett. Selv om induksjonperioden og nedbrytningshastigheten for PLA samt utvaskingen fra de blandede matriser var avhengig av proporsjonen PLA i matrix og av prosesshistorien, er det reproduserbart lite eller intet tap av PLA før etter 40-50 dager.

Selv om noen erosjon av PLA fra 50:50 EVA:PLA mikrosfærer kan ha forekommet innen de 50 dager som in vitro frisetningsstudien varte (Figur 15C), er det sannsynlig at den primære mekanisme for medikamentfrisetning fra polymerblandingen er diffusjon av løst stoff gjennom et nettverk av porer i polymermatrix.

Ved avslutning av studien over frisetningshastighet ble mikrosfærene analysert med henblikk på gjenværende medikament. Verdiene av prosent taxol fremdeles tilstede i 50 dagers inkuberte mikrosfæreprøver er 94±9% og 89±12%, henholdsvis, for 'store' og 'små' størrelsesfraksjoner.

Mikrosfærer med 6mg pr g polymer (0,6%) ga en utstrakt hemning av angiogenese ved plassering på CAM fra fosterkyllinger (Figurene 15E og 15F).

EKSEMPEL 12

5 TAXOL INNKAPSLING I POLY (E-CAPRONLAKTON) MIKROSFÆRER. HEMMING AV ANGIOGENESE PÅ CAM-TEST AV TAXOLHOLDIGE MIKROSFÆRER.

10 Dette eksempel evaluerer in vitro frisetningsprofiler av taxol fra biodegraderbare mikrosfærer av poly(e-caprolakton) og viser den anti-angiogene aktivitet av taxol frigjort fra disse mikrosfærer når de plasseres på CAM.

15 Reagenser som ble brukt i disse eksperimenter inkluderer: poly(e-caprolakton) ("PCL") (mol. vekt. 35000 - 45000, fra Polysciences (Warrington, PA)), diklorometan ("DCM") fra Fisher Scientific Co., Canada, polyvinylalkohol (PVA) (molekylvekt 1200-18000, 99% hydrolysert) fra Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WIS, og taxol fra Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). Hvis ikke annet er beskrevet, ble alle reagenser og kjemikalier brukt som innkjøpt. Destillert vann ble brukt overalt.

20 A. Preparering av mikrosfærer

Mikrosfærer ble laget essensielt som beskrevet i Eksempel 8 ved å benytte løsningsfordampingsmetoden. I korthet ble 5 vekt% taxolholdige mikrosfærer laget ved å løse opp 10 mg taxol og 190 mg PCL i 2 ml DCM, tilsette dette til 100 ml av 1% PVP vandig løsning og omrøring ved 1000 omdreining pr minutt ved 25°C i to timer.

25 Mikrosfæresuspensjonen ble sentrifugert ved 1000 x g i 10 minutter (Beckman GPR), supernatanten fjernet og mikrosfærene vasket tre ganger med vann. De vaskete mikrosfærer ble lufttørket over natten og lagret ved romtemperatur. Kontrollmikrosfærer (uten taxol) ble preparert som over. Mikrosfærer med 1% og 2% taxol ble også laget. Mikrosfærer ble størrelsesbestemt med et lysmikroskop med micrometer.

30 B. Innkapslingseffektivitet

35 En kjent vekt av medikamentholdige mikrosfærer (ca. 5 mg) blir løst i 8 ml acetonitril og 2 ml destillert vann blir tilsatt for å felle ut polymeren. Blandingen blir sentrifugert ved 1000 x g i 10 minutter og mengden taxol innkapslet blir utregnet fra absorbans av supernatanten, målt i et UV (ultrafiolett) spektrofotometer (Hewlett-Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer) ved 232 nanometer bølgelengde.

C. Medikamentfrisetningsstudier

Omtrent 10 mg taxolholdige mikrosfærer blir suspendert i 20 ml av 10 mM fosfatbufret saltvann, pH 7.4 (PBS) i skrukorkrør. Rørene roteres ende-over-ende ved 37°C, og ved visse
 5 tidspunkter blir 19,5 ml supertant fjernet (etter at mikrosfærene har fått sedimentere til bunnen), filtrert gjennom et 0,45 mm membranfilter og oppbevart for taxol analyse. Det samme volum PBS tilsettes hvert rør for å vedlikeholde avløpsbetingelser gjennom studien. Filtratene blir ekstrahert med 3 x 1 ml DCM, DCM-ekstraktene blir fordampet til tørrhet
 10 under en nitrogenstrøm, oppløst påny i 1 ml acetonitril og analysert på HPLC med en mobil fase av vann:metanol:acetonitril (37:5:58) og en strømningshastighet på 1 ml/min (Beckman Isokratisk Pumpe), en C8 reversfase søyle (Beckman) og ultrafiolett deteksjon (Shimadzu SPD A) ved 232 nanometer.

15 D. CAM-studier

Befruktete kyllingfoster blir inkubert i fire dager før skallfri dyrking. På dag 6 av inkuberingen blir 1 mg prøver av 5% taxolholdige eller kontroll (taxolfri) mikrosfærer plassert rett på CAM overflaten. Etter to dagers eksponering blir vaskulaturen undersøkt med
 20 et stereomikroskop koblet til et videokamera, videosignalene blir vist på en dataskjerm og videotrykket.

E. Scanning elektronmikroskopi

25 Mikrosfærer blir plassert på prøveholdere, belagt med gull og deretter plassert i et Philips 501B Scanning Elektronmikroskopi som virker ved 15 kV.

F. Resultater

30 Størrelsesområdet for mikrosfæreprøver er mellom 30-100 μ m selv om det er klart at det i alle taxolholdige og kontrollprøver finnes noen sfærer som faller utenfor disse verdier. Effektiviteten av taxolinkorporering i PCL mikrosfærer er over 95% i alle de medikamentholdige sfærer som ble studert. Scanning elektronmikroskopi viste at mikrosfærene alle var runde, mange viste en ujevn eller hullede overflatemorfologi. Det syntes
 35 ikke å være noe fast medikament på overflaten av mikrosfærene.

Tidskurven for taxolfrisettning fra 1%, 2% og 5% taxolholdige PCL mikrosfærer vises i Figur 16A. Frisettningshastighetskurvene er bifasiske. Det er en initial frisettning av taxol eller 'utbruddsfase' ved alle medikamentkonsentrasjoner. Utbruddsfasen oppsto dag 1-2 ved 1% og 2% taxol, og dag 3-4 ved 5% taxolholdige mikrosfærer. Denne initiale fase ble fulgt av en fase med klart langsommere frisettning. For mikrosfærer med 1% og 2% taxol var det ikke videre frisettning av medikament etter dag 21. Fra 5% taxolholdige mikrosfærer hadde omtrent 20% av taxol blitt frisatt etter 21 dager.

Figur 16B viser CAM som har blitt behandlet med kontroll PCL mikrosfærer og Figur 16C viser behandling med 5% taxolholdige mikrosfærer. CAM med kontroll mikrosfærer viser et normalt kapillærnettverk. CAM behandlet med taxol-PCL mikrosfærer viser markert vaskulær tilbaketrekning, og områder som mangler et kapillærnettverk.

G. Diskusjon

Oppløsnings-fordampingsmetoden for å lage taxol-holdige mikrosfærer ga meget høy taxol innkapslingseffekt, mellom 95-100%. Dette er p.g.a. den lave vannløselighet av taxol og dets hydrofobe egenskaper, som leder til at stoffet fordeler seg i den organiske fases løsningsmiddel, som jo inneholder polymeren.

Den bifasiske frisettningsprofil for taxol er typisk for frisettningsmønsteret for mange medikamenter fra biodegraderbare polymere matriser. Poly(ϵ -caprolakton) er en alifatisk polyester som kan bli degradert ved hydrolyse under fysiologiske betingelser, den er ikke giftig og er vevsforlikelig. Nedbrytning av PCL er betydelig langsommere enn nedbrytning for de vel studerte polymere og kopolymere som baseres på melkesyre og glykolsyre, og passer derfor godt for utvikling av langsomme medikamentfrisettningssystemer. Den initiale raske fase av taxolfrisettning antas å komme fra diffusjon av medikamentet fra de overflatiske regioner av mikrosfærer (nær sfærenes overflate). Frisettning av taxol i den langsommere andre fase er trolig ikke forårsaket av degradering eller utvasking av PCL siden *in vitro* studier har vist at det ikke er klart vekttap eller utvasking av overflaten av PCL i løpet av en 7,5 ukes periode i vann. Den langsommere fase av taxolfrisettning er trolig forårsaket av oppløsning av medikamentet inne i væskefylte porer i polymermatrix og diffusjon gjennom porene. Den større hastighet i frisettning fra mikrosfærer med høyere taxolinnehold er trolig et resultat av et mere utbredt nettverk av porer i polymermatrix.

Taxol mikrosfærer med 5% taxol har blitt vist å frigjøre nok medikament til å fremkalle utbredt hemning av angiogenese når de ble plassert på CAM. Hemning av blodårevekst resulterte i en avaskulær sone, som vist i Figur 16C.

5 EKSEMPEL 13

TAXOLHOLDIGE POLYMERFILMER SAMMENSATT AV ETYLEN VINYLACETAT OG SURFAKTANT (OVERFLATEAKTIVT STOFF)

- 10 To typer filmer ble laget essensielt som beskrevet i Eksempel 10, rene EVA filmer med taxol og EVA/surfaktant blandingsfilmer (f.eks. Pluronic F127, Span 80 og Pluronic L101) med taxol.

- 15 Surfaktantene som undersøkes er to hydrofobe (Span 80 og Pluronic L101) og en hydrofil (Pluronic F127) surfaktant. Pluronic surfaktantene er også polymere, noe som er en tiltrekkende egenskap siden de kan blandes med EVA for å optimalisere ulike egenskaper som medikamentleverandører. Span 80 er et mindre molekyl som på en måte er fordelt i polymer matrix og som ikke danner en blanding.
- 20 Surfaktanter kan være til hjelp for å modulere frisetning av taxol fra filmer og for å optimalisere noen av filmenes fysiske egenskaper. Et aspekt av surfaktantblandingsfilmene som viser at medikamentfrisettning kan bli kontrollert er evnen til å variere hastighet og utstrekning hvormed stoffene vil svulme opp i vann. Diffusjon av vann inn i en polymer-medikament matrix er kritisk for frisetning av medikamentet fra bæreren. Figurene 17C og
- 25 17D viser grad av filmenes oppsvulming når surfaktantnivå i blandingen endres. Ren EVA film svulmer ikke målbart opp i løpet av to måneder. Ved derimot å øke mengde surfaktant med EVA er det mulig å øke oppsvulming av stoffet, og ved å øke hydrofile egenskaper kan oppsvulming også økes.

- 30 Resultater av eksperimenter med disse filmer vises i Figurene 17A-E. I korthet viser Figure 17 frisetning av taxol (i milligram) over tid fra rene EVA filmer. Figur 17B viser prosent av medikament som er igjen i de samme filmer. Som vist i disse to figurer øker medikamentfrisettning med mengde taxol tilsatt (dvs. prosent taxol pr. vekt økes), noe som viser den forventete avhengighet av konsentrasjon. Ettersom taxol økes øker også prosenten
- 35 av taxol som blir igjen i filmen, noe som indikerer at høyere innhold kan være attraktivt i formuleringer for langtidsfrisettning.

Fysikalsk styrke og elastisitet av filmene blir vurdert i Figur 17E. I korthet viser Figur 17E "stress/strain" (forlengelse som funksjon av øket spenning) kurver i rene EVA og EVA-surfaktant blandingsfilmer. Dette grove mål på spenning demonstrerer at filmenes elastisitet øker ved tilsetning av Pluronic F127, og at spenningsstyrken (spenning idet filmen ryker) øker med konsentrasjonen av tilsatt Pluronic F127. Elastisitet og styrke er viktige egenskaper når man utvikler en film som skal bli manipulert i ulike kliniske situasjoner uten å føre til deformering av stoffet.

De beskrevne data viser den evne visse surfaktanter har som additiver i å kontrollere frisetting av medikamenter og i å endre fysikalske karakteristika av bærerstoffet.

EKSEMPEL 14

INKORPORERING AV METOKSYPOLYETYLENGLYKOL 350 (MePEG) I POLY(E-CAPROLAKTON) FOR Å UTVIKLE EN FORMULERING FOR KONTROLLERT FRISETNING AV TAXOL FRA EN KREM.

Reagenser og utstyr som ble brukt i disse eksperimenter inkluderer metoksypropyetylenglykol 350 ("MePEG" - Union Carbide, Danbury, CT). MePEG er en væske ved romtemperatur, med et frysepunkt på 10°C til -5°C.

A. Preparering av en MePEG/PCL taxolholdig krem.

MePEG/PCL krem lages ved først å løse en mengde taxol i MePEG og deretter innkorporere dette i smeltet PCL. En fordel med metoden er at DCM ikke er nødvendig.

B. Analyse av smeltepunkt.

Smeltepunktet til PCL/MePEG polymerblandingen kan bestemmes ved differensiell kalorimetri fra 30°C til 70°C ved en oppvarmingshastighet på 2,5°C pr minutt. Resultater fra dette eksperiment vises i Figurene 18A og 18B. I korthet (Figur 18) senkes MePEG smeltepunktet av polymerblandingen (bestemt ved termisk analyse) på en konsentrasjon-savhengig måte. Smeltepunktet av polymer blandingen som funksjon av MePEG konsentrasjoner vises i Figur 18A. Dette lavere smeltepunkt fører også til en forlenget tid før polymerblandingen går over til fast form, som vist i Figur 18B. En 30:70 blanding av MePEG:PCL trenger mer enn dobbelt så lang tid som PCL alene for å gå over i fast form.

C. Måling av sprøhet

Inkorporering av MePEG i PCL synes å gi en mindre sprø konsistens i forhold til PCL alene.

- 5 Som en grov måte å kvantitere dette ble en veiet nål sluppet fra en viss høyde ned i polymerblandinger med fra 0% til 30% MePEG i PCL, og distansen nålen trengte inn i stoffet ble målt. Den resulterende kurve vises som Figur 18C. Punkter presenteres som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik fra fire analyser.
- 10 For sammenligningsformål ble også paraffinvoks tested. Her trengte nålen $7,25 \pm 0,3$ mm inn.

D. Måling av taxolfrisettning.

- 15 Klumper av polymer (PCL med 0,5%, 5%, 10% eller 20% MePEG) ble inkubert i fosfatbufret saltvann (PBS, pH 7,4) ved 37°C, og prosentvis endring i polymervekt ble målt ved ulike tidspunkt. Som vist i Figur 18D øker vekttapet med øket konsentrasjon av MePEG i den originale blanding. Det er trolig at dette vekttap kommer av frisettning av MePEG fra polymermatrix ut i den omgivende væske. Dette kan indikere at taxol lett vil bli frisatt fra en MePEG/PCL blanding siden taxol først blir oppløst i MePEG før det inkorporeres i PCL.

20

E. Effekt av varierende mengder MePEG på frisettning av taxol.

- Termokremer lages med mellom 0,8% og 20% MePEG i PCL. Disse inneholder 1% taxol. Frisettning av taxol fra 10 mg klumper i PBS ved 37°C følges over tid med HPLC analyse.
- 25 Som vist i Figur 18E har mengde av MePEG i formuleringen ingen effekt på mengde av taxol som frisettes.

F. Effekt av varierende mengde taxol på totalt frisatt taxol fra en 20% MePEG/PCL-blanding

- 30 Termokremer lages med 20% MePEG i PCL og fylles med mellom 0,2% og 10% taxol. Frisettning av taxol over tid måles som beskrevet over. Som vist i Figur 18F øker mengde taxol frisatt over tid med den økte taxolmengde tilsatt. Ved grafisk analyse (Figur 18G) av prosent taxol frisatt er imidlertid rekkefølgen reversert. Dette gir informasjon om det gjenværende taxol i kremen, og tillater, dersom visse antagelser blir gjort om gyldigheten av en ekstrapolering av disse data, en projekson av den tidsperioden hvor taxol vil bli frisatt fra termokrem med 20% MePEG.
- 35

G. Styrkeanalyse av ulike MePEG/PCL-blandinger

En CT-40 mekanisk styrketester benyttes for å måle styrke av faste polymer "tabletter" med diameter på 0,88 cm og en gjennomsnittstykkelse på 0,56 cm. Polymertablettene er blanding av MePEG (konsentrasjoner 0%, 5%, 10% eller 20%) i PCL.

Resultater av denne test vises i Figur 18H, hvor både tensjonsstyrke og tid før svikt er oppgitt som funksjon av prosent MePEG i blandingen. Enkeltvariabel ANOVA (variensanalyse) viste at tabletttykkelse innen hver gruppe ikke var forskjellig. Som vist i Figur 18H senket tilsetning av MePEG til PCL hardheten av det resulterende faste stoff.

EKSEMPEL 15

Effekt av Taxolholdig termokrem på angiogenese in vivo.

Befruktete kyllingfoster ble inkubert i fire dager før skallfri dyrking som beskrevet i Eksempel 2. Inneholdet av egget ble fjernet og tømt opp i sterilisert glassboller med rund bunn, og dekket med petriskållokk.

Taxol ble inkorporert i termokremen i konsentrasjoner på 5%, 10% og 20% (vekt/volum) essensielt som beskrevet over (eksempel 10), og benyttet i det følgende eksperiment. Tørket og oppkuttet termokrem ble varmet til 60°C og presset mellom to lag av parafilm, jevnet ut og nedkjølt. Seks fostere fikk 20% taxolholdig termokrem og 6 foster fikk kontrollkrem som var preparert på denne måte uten taxol. Et foster døde i hver gruppe, slik at kontrollgruppe og behandlet gruppe begge hadde fem foster.

Kontrolltermokrem og termokrem med 20% taxol ble også varmet til 60°C og plassert rett på den voksende kant av hver CAM på sjette inkuberingsdag, disse forsøk ble gjort i duplikat.

Det ble ikke funnet forskjeller i resultatene som ble oppnådd med de ulike tilsetningsmetoder, noe som indikerer at temperaturen av kremen da den ble applisert ikke var en faktor i de endelige resultater.

Termokrem med 10% taxol ble applisert til 11 CAM, mens 11 andre CAM fikk kontrollkrem uten taxol. Termokrem med 5% taxol ble applisert til 10 CAM, mens 10 andre CAM fikk kontrollkrem uten taxol. Etter to dagers eksposisjon (inkubasjonsdag 8) ble vaskulaturen

undersøkt med et stereomikroskop. Liposyn II, en hvit ugjennomsiktig løsning, ble injisert i CAM for å øke synligheten av detaljer i blodårene.

I fostrene som var behandlet med 5% taxolholdig krem viste bare to dyr maksimal hemning av angiogenese, mens de gjenværende 8 kun var marginalt affisert. I fostrene som var behandlet med 10% taxolholdig krem viste bare to dyr maksimal hemning av angiogenese, mens de gjenværende 9 kun var marginalt affisert.

Termokrem med 20% taxol viste utstrakte områder med manglende blodårer (Figur 19B) i alle de fem behandlede CAM. Den høyeste hemningsgrad ble definert som en avaskulær region som dekket 6mm x 6mm. Alle CAM behandlet med 20% taxolholdig termokrem viste en slik grad av angiogenesehemning.

Til sammenligning viste kontrolltermokremen ingen hemning av angiogenese på CAM (se Figur 19A, noter at kanten av kremen sees i toppen av bildet), i stor forstørrelse sees at blodårene er uaffisert selv nær inntil kanten av termokremen. Dette tyder på at effekten observert kommer av vedvarende frisetning av taxol, og ikke av polymeren selv eller en sekundær trykkeffekt av kremen på den voksende vaskulatur.

Denne studie viser at termokrem frisetter tilstrekkelig mengder angiogenesehemmer (i dette tilfelle taxol) til at den normale utvikling av CAM blodårene blir hemmet.

EKSEMPEL 16

Effekt av taxolholdig termokrem på svulstvekst og svulstangiogenese in vivo

Befruktete kyllingfostre ble inkubert i tre dager før skallene fjernes. Innehold av eggene tømmes ved å fjerne skall rundt luftrommet, kutte over den indre skallmembran, perforere den motsatte ende av skallet og la egginneholdet forsiktig gli ut fra den butte ende. Innholdet ble tømt i steriliserte gassboller med rund bunn, dekket med petriskållokk og inkubert ved 90% relativ fuktighet og 3% karbondioksyd (se Eksempel 2).

MDAY-D2 celler (en lymfoid svulst fra mus) ble injisert i mus og fikk utvikles til svulster på 0,5 - 1 gram. Musene avlives, svulstområdene vaskes med alkohol og taes ut, plasseres i sterilt vevsdyrkingsmedium og kuttet i 1 mm stykker under en laminær luftstrømskappe. Før de dissekerte svulster blir plassert på 9 dagers kyllingfostrene blir CAM overflatene forsiktig skrapet med en nål (dimensjon 30 gauge) for å sikre implantasjon av svulst. Svulstene blir så

plassert på CAM etter 8 dagers inkubering (fire dager etter fjernelse av skall) og tillates vokse på CAM i fire dager for å etablere blodtilførsel. Fire fostre blir preparert med denne metode, hver av disse får tre svulster. En av svulstene mottar 20% taxolholdig termokrem, den andre svulst får kontroll (uten taxol) termokrem og den tredje svulst får ingen behandling.

5 Behandlingen fortsettes i to dager før resultatene ble beskrevet.

De eksplanterte MDAY-D2 svulster frigjør angiogene faktorer som stimulerer innvekst av kapillærer (fra CAM) inn i svulstmassen, og tillater den å øke i størrelse. Siden alle blodårer i svulsten kommer fra CAM, mens alle celler er fra svulsten, er det mulig å vurdere effekten av
10 behandlings-intervensjoner på disse to prosesser uavhengig av hverandre. Denne metode har blitt benyttet for å bestemme effektiviteten av taxolholdig termokrem på: (a) hemning av vaskularisering av svulsten, og (b) hemning av svulstcellenes egen vekst.

Direkte in vivo stereomikroskopisk evaluering og histologisk analyse av fiksert vev fra denne
15 studie viste følgende: I svulster behandlet med 20% taxolholdig termokrem var det en reduksjon av antall blodårer som ernærte svulsten (se Figurene 20C og 20D), en reduksjon i antall blodårer innen svulsten, og en reduksjon av antall blodårer i svulstens periferi (det område som vanligvis er mest vaskularisert i en fast svulst) når sammenlignet med en kontroll svulst. Svulstene begynte å minske i størrelse og masse på de to dager som ble studert. I
20 tillegg ble mange endotelceller funnet å ha stoppet sin celledeling, tydende på at proliferasjon av endotelcelle var var affisert. Svulstceller ble også ofte funnet stoppet i celledeling. Alle fire fostre viste et konsistent mønster med nedsatt vaskularitet forårsaket av 20% taxolholdig termokrem, mens kontrolltermokrem var uten effekt.

25 Til sammenligning var svulstene i CAM som var blitt behandlet med kontrolltermokrem godt vaskularisert og viste økning i antall og tetthet av blodårer når sammenlignet med det normale omgivende vev, og dramatisk flere blodårer enn det som ble sett i svulster behandlet med taxolholdig krem. De nydannete årer gikk inn i svulstene fra alle sider, og fremsto som eiker på et hjul (se Figurene 20A og 20B). Kontrollsvulster fortsatte å øke i størrelse og masse
30 under hele eksperimentet. Histologisk analyse viste mange utvidete kapillærer med tynne vegger i svulstens periferi, og få endotelceller ble funnet i celledeling. Vevet var godt vaskularisert og levedyktig gjennom hele svulsten.

Som et eksempel ble følgende data observert i to svulster som var av samme størrelse ved
35 tidspunkt for explantering på den samme CAM. Svulsten som ble behandlet med 20% taxolholdig termokrem målte 330mm x 597mm, den umiddelbare svulstperiferi hadde 14 blodårer, mens svulstmassen selv bare hadde 3-4 små kapillærer. Svulsten som ble behandlet

med kontrolltermokrem målte 623mm x 678mm, den umiddelbare svulstperiferi hadde 54 blodårer, mens svulstmassen selv hadde 12-14 små blodårer. I tillegg har den omgivende CAM selv mange flere blodårer sammenlignet med områdene rundt den taxolbehandlede svulst.

5

Denne studie viser at termopasta frigjør tilstrekkelig mengder av angiogenesehemmer (her taxol) til at en patologisk angiogenese som følger svulstvekst og utvikling hemmes. Under disse forhold er angiogenese maksimalt stimulert av svulstcellene som produserer angiogene faktorer med evne til å indusere innvekst av kapillærer fra det omgivende vev inn i svulstmassen. Den 20% taxolholdige termokrem har evne til å blokke denne prosess, og begrense svulstvevets evne til å opprettholde adekvat blodtilførsel. Dette resulterer i en nedgang i svulstmasse, både via en celledrepende effekt av medikamentet på svulstcellene, og ved å ta fra vevet næringsstoffer som er nødvendig for vekst og utvidelse.

10

15 EKSEMPEL 17

Effekt av termokrem med angiogenesehemmer på svulstvekst in vivo i en musesvulstmodell.

Musesvulstmodellen MDAY-D2 kan brukes til å studere effekten av lokalt langsom frisetning av kjemoterapeutiske og anti-angiogene stoffer som taxol på svulstvekst, svulstspredning og dyrenes overlevelse. MDAY-D2 svulstcellelinjen dyrkes i en cellesuspensjon som består av 5% føtalt kalve serum i alfa-MEM media. Cellene blir inkubert ved 37°C i en fuktig atmosfære tilsatt 5% karbondioksyd, og fortynnes med en faktor på 15 hver tredje dag til et tilstrekkelig antall celler er fremskaffet. Etter inkubasjonsperioden blir cellenes levedyktighet studert med lysmikroskopi, og de blir så sentrifugert ved 1500 omdreininger pr minutt i fem minutter. PBS tilsettes cellene til en fortykning på en million celler pr milliliter.

20

25

Ti uker gamle DBA/2j hunmus blir akklimatisert i 3-4 dager etter ankomst. Hver mus blir så injisert subkutan i bakre sideflanke med 100000 MDAY-D2 celler i 100 µl PBS. Tidligere studier har vist at dette etter 3-4 dager gir en synlig svulst på injeksjonsstedet, som oppnår en størrelse på 1,0 -1,7 gram etter 14 dager, og danner synlige spredninger (metastaser) i leveren 19-25 dager etter injeksjon. Avhengig av hva man ønsker å studere kan en behandling påbegynnes på ethvert punkt i sykdommens utvikling.

30

Under bruk av denne modellen ble 20 mus injisert med 140000 MDAY-D2 celler subkutan og svulstene fikk vokse. På dag 5 ble dyrene delt i grupper på fem. Svulstområdene ble kirurgisk åpnet under bedøvelse, den lokale region behandlet med medikamentholdig termokrem eller kontroll termokrem uten å forstyrre det eksisterende svulstvev, og såret ble

35

lukket. Gruppene på fem mottok enten ingen behandling (såret ble bare lukket), eller det ble nær svulsten implantert polymer alene, 10% taxolholdig termokrem eller 20% taxolholdig termokrem (bare 4 dyr ble injisert i siste gruppe). På dag 16 ble dyrene avlivet, svulstene ble dissekert og dyrene undersøkt både makroskopisk og histologisk for deres svulstvekst, spredning, lokale og generelle systemiske toksiske virkninger av behandling, effekt på sårtilheling, effekt på svulstens vaskularitet, og tilstanden til kremen som var igjen på snittstedet.

Vekt av svulstene for hvert dyr vises nedenfor i Tabell IV.

Tabell IV
Svulstvekt (gram)

Dyr nr.	Kontroll (tom)	Kontroll (PCL)	10% Taxol termokrem	20% Taxol Termokrem
1	1,387	1,137	0,487	0,114
2	0,589	0,763	0,589	0,192
3	0,461	0,525	0,447	0,071
4	0,606	0,282	0,274	0,042
5	0,353	0,277	0,362	
Gj.snitt	0,6808	0,6040	0,4318	0,1048
St. avvik	0,4078	0,3761	0,1202	0,0653
p-verdi		0,7647	0,358	0,036

Termokrem med 20% taxol reduserte svulstvekst med over 85% (gjennomsnitt vekt 0,105 g) sammenlignet med kontrolldyr (gjennomsnitt 0,681 g). Dyr behandlet med termokrem alene eller termokrem med 10% taxol hadde bare svak effekt på svulstvekst, vekt av svulstene ble bare redusert med henholdsvis 10% og 35% (Figur 21A). Derfor var termokrem med 20% taxol mere effektivt i å redusere svulstvekt enn termokrem med 10% taxol (Se Figur 21C, også Figur 21B).

Termokrem ble oppdaget i noen av dyrene på tilsetningsstedet. Polymervekt varierte, mellom 0,026 g og 0,078 g ble funnet i 8 av 15 mus. Hvert dyr i gruppen med 20% taxolholdig termokrem hadde noe restpolymer, tydende på at denne krem var mindre lett å løse opp.

Histologisk innhold svulstene behandlet med taxolholdig krem lavere celletetthet og mere vevsnekrose enn kontrollsvulstene. Vaskulaturen var redusert og endotelceller ble ofte sett i celledelingsstopp. Taxolholdig termokrem syntes ikke å affisere integriteten eller celleinnholdet i hud eller vev rundt svulsten. Makroskopisk var sårtilheling ikke affisert.

5

EKSEMPEL 18

Bruk av kirurgiske filmer med angiogenesehemmer for å forebygge iatrogen spredning av svulstceller under kirurgisk fjerning av kreft.

10

En steril, bøyelig og elastisk medikamentholdig polymerforbindelse ville være hensiktsmessig ved prosedyrer for å fjerne kreftsvulster. Det er ofte ønskelig å isolere det normale omgivende vev fra det ondartete vev under fjerningsoperasjoner for å forebygge iatrogen ('fremkalt av lege') spredning av sykdommen til omgivende organer, gjennom uaktsom kontaminasjon med kreftceller. En parafilm med medikament kan bli strukket over normalt vev før manipulering av svulsten. Dette ville være til svært god hjelp hvis den ble plassert rundt leveren og andre bukorganer under fjernelse av tarmkreft for å hindre spredning i bukhulen av sykdommen til leveren. En biodegraderbar film kan man la være på plass.

15

20

Snittsteder er også vanlige steder hvor postoperativt tilbakefall av kreft forekommer. Dette tror man kommer av kontaminasjon av sårområdet med svulstceller under den kirurgiske prosedyre. For å studere disse problemer ble eksperimenter utført for å bestemme om filmer med hemmere av angiogenese kunne forebygge dette fenomen.

25

A. Materialer og metoder

Preparering av kirurgiske filmer. Kirurgiske filmer blir laget som i Eksempel 10. Tynne filmer som måler ca. 1 cm x 1 cm blir laget enten av polymer alene (PCL) eller PCL med 5% taxol.

30

Rotte leversvulstmodell. I en initial studie ble Wistar rotter (ca 300 g kroppsvekt) lagt i generell anestesi og et 3-5 cm buksnitt ble lagt i midtlinjen. 1 cm snitt ble lagt i levervevet i den største leverlappen, og del av leverkanten fjernes. 1 million levende 9L gliomtumor celler (eluert fra vevskultur like før bruk) suspendert i 100 µl fosfatbufret saltvann ble deponert på den oppkuttete leverkant med en nål (dimensjon 30 gauge). Den kirurgiske filmen ble så plassert over den kuttete leverkant med svulstceller og fiksert på plass med gelfoam. To dyr fikk PCL filmer med 5% taxol og to dyr fikk filmer med PCL. Bukveggen ble lukket med 3,0

35

Dexon sutur og hudklemmer. Bedøvelsen ble avsluttet og dyret får komme til seg selv. Ti dager senere ble dyrene avlivet og leveren undersøkt histologisk.

B. Resultater

5

Lokal vekst av svulstene sees i de to leverer som ble behandlet med polymer alene. Begge leverer behandlet med taxolholdig polymer er helt fritt for svulstvev, vurdert med histologisk analyse. Også av betydning er at leverkapselen hadde regenerert og vokst over polymerfilmen og den oppskårne leveroverflate, noe som tyder på at det ikke er noen klar effekt på

10 sårtilheling. Det er ingen tegn på lokal levertoksisitet rundt noen av de kirurgiske filmer (med eller uten medikament).

C. Diskusjon

15 Denne studie indikerer at kirurgiske filmer, plassert rundt normalvev og snittsteder under kirurgi, kan ha evnen til å senke hyppigheten av uønsket implantering av svulstceller i omgivende normalt vev under kirurgisk fjerning av ondartete svulster. Dette kan hjelpe i å senke hyppighet av det betydelige problem man har med postoperative lokale tilbakefall av sykdommen.

20

EKSEMPEL 19

25 INTRAARTIKULÆR INJEKSJON AV BIODEGRADERBARE MIKROSFÆRER MED ANGIOGENESEHEMMERE VED BEHANDLING AV LEDDBETENNELSE (ARTRITT)

Leddskaade i leddgikt forårsakes av en kombinasjon av betennelse (med hvite blodlegemer og deres produkter) og utvikling av pannusvev (et vev av nye blodårer, bindevev og betennelsesceller). Taxol har blitt valgt i de første studier siden det er en kraftig hemmer av

30 neovaskularisering. På denne måte kan taxol i høye doser vise seg å være et stoff som modifierer artrittsykdom.

For å studere om mikrosfærer har en ødeleggende virkning på ledd ble de følgende eksperimenter utført. I korthet ble kontroll og taxolholdige PCL mikrosfærer laget som

35 beskrevet i Eksempel 8.

Tre kaniner ble injisert i ledd med mikrosfærer med 0,5-5, 10-30 eller 30-80 mikrometer diameter i 2,0 ml totalvolum (med totalt 0,5 mg mikrosfærer). Leddene ble vurdert visuelt (klinisk) daglig. Etter to uker ble dyrene avlivet og leddene undersøkt histologisk for å se etter betennelse og mangel på proteoglykaner.

5

Kaninmodellene av leddbetennelse og slitasjegikt blir benyttet for å evaluere bruken av mikrosfærer med henblikk på å redusere betennelse av synovialhinnen og brusknedbrytning. Degenerativ artritt blir induisert ved en delvis skade av korsbånd og menisk i kneet. Etter 4-6 uker utvikler kaninene erosjoner i brusken som er like de man ser i human slitasjegikt.

10 Betennelsesartritt fremkalles ved å immunisere kaniner med bovint serumalbumin (BSA) i Komplette Freundes Adjuvans (CFA). Etter tre uker får kaniner som har en høy titer av anti-BSA antistoff en injeksjon av BSA (5 mg) i leddet. Leddhevelse og uttalt betennelse av synovialhinnen er tydelig etter 7 dager, lave mengder av proteoglykan finnes etter 7-14 dager, og bruskerosjoner sees etter 4-6 uker.

15

Leddbetennelse ble fremkalt som beskrevet over. Etter fire dager ble leddene injisert med mikrosfærer som inneholder 5% taxol eller løsningsmiddel. En gruppe dyr ble avlivet etter 14 dager, en annen etter 28 dager. Leddene ble studert histologisk m.h.p. tegn til betennelse og bruskødeleggelse. Eksperimentet var planlagt for å avgjøre om taxol mikrosfærer kan affisere leddbetennelse og bruskødeleggelse.

20

Mikrosfærer med angiogenesehemmer kan også bli studert i en modell av slitasjegikt. I korthet blir slitasjegikt (degenerativ artritt) fremkalt som beskrevet over, og leddene får en intraartikulær injeksjon av mikrosfærer (med 5% taxol eller løsemiddel) etter fire dager.

25 Dyrene avlives på dag 21 og dag 42, og leddene studeres histologisk m.h.p. tegn på brukødeleggelse.

Studiene blir utført for å vurdere angiogenesehemmere, tilført via intraartikulære mikrosfærer, som bruskbeskyttende midler.

30

Resultater

Kontroll PCL mikrosfærer av varierende størrelser (0,5-5, 10-30 eller 30-80 mikrometers diameter) ble injisert intraartikulært i kaniners kneledd. Resultatene vises i Figurer 22A-D. I korthet er Figur 22A et fotografi av synovialhinne fra ledd injisert med PBS, Figur 22B er et fotograf fra ledd injisert med mikrosfærer. Figur 22C er et fotografi av brusk fra ledd injisert med PBS, og Figur 22D er et fotografi av brusk fra ledd injisert med mikrosfærer.

35

- Som det sees i disse fotografier er det ingen histologiske forskjeller mellom ledd med og uten mikrosfærer injisert. Klinisk var det ikke tegn på leddbetennelse i de 14 dager som eksperimentet varte. Makroskopisk fantes ingen tegn på leddbetennelse eller
- 5 bruskødeleggelse i ledd hvor mikrosfærer var injisert sammenlignet med ubehandlede normale ledd.

Konklusjoner

- 10 Mikrosfærer kan bli injisert i ledd uten å forårsake noen klare endringer i leddoverflaten. Dette tyder på at denne metode kan være en effektiv anordning for å oppnå målrettet tilførsel av et sykdomsmodifiserende agens til syke ledd, med minimalisering av den toksisitet som er forbundet med systemisk tilførsel av slike biologisk aktive forbindelser.
- 15 Som diskutert over kan mikrosfærer bli formulert i spesifiserte størrelser med definerte kinetiske egenskaper m.h.p. å frigjøre medikamenter. Det er også vist at taxol er en potent hemmer av angiogenese og at stoffet blir frisatt fra mikrosfærer i mengder tilstrekkelige for å blokkere neovaskularisering i CAM testen. Derfor skulle intraartikulær tilføring av mikrosfærer med angiogenesehemmer (f.eks. taxol) kunne blokkere den neovaskularisering
- 20 som forekommer i sykdommer som kronisk leddgikt og fører til ødeleggelse av leddbrusken. På denne måte kan de medikamentholdige mikrosfærer virke som 'bruskbeskyttende' agens som hindrer den irreversible ødeleggelse av brusk som forårsakes av det invaderende neovaskulære pannusvev.
- 25 Fra det foregående synes klart at selv om spesifikke utførelser av oppfinnelsen har blitt beskrevet med den hensikt å være illustrasjoner, kan ulike modifikasjoner gjøres uten at man fjerner seg fra omfanget og ånden av oppfinnelsen. Oppfinnelsen er derfor ikke begrenset unntatt i henhold til de vedlagte krav.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

(i) SØKER: Hunter, Willilam L.
 Machan, Lindsay S.
 Arsenault, A. Larry
 Burt, Helen M.

(ii) OPPTINNELSESTITTEL: Anti-angiogene blandinger og
 fremgangsmåter for anvendelse.

(iii) ANTALL SEKVENSER: 1

(iv) KORRESPONDANSEADRESSE:

(A) Adresse: SEED AND BERRY
 (b) Gate: 701 Fift Avenue, 6300 Columbia Center
 (c) By: Seattle
 (d) Stat: Washigton
 (e) Land: USA
 (f) Zipkode: 98104

(v) DATAMASKIN-LESBAR FORM

(A) MEDIUM: Floppy disk
 (B) DATAMASKIN: IBM PC lesbar
 (C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) PROGRAMVARE: PatentIn Release nr.1,0, Vers.1,25

(vi) SØKNADSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER:
 (B) INNLEVERINGSDATO:
 (C) KRASSIFISERING:

(vii) FULLMEKTIG/AGENT INFORMASJON:

(A) NAVN: McMasters, David D
 (B) REGISTRERINGSNR.: 33.963
 (C) REFERANSE NR: 110129.401

(ix) TELEKOMMUNIKASJONSINFORMASJON:

(A) TELEFON: (206) 622-4900
 (B) TELEFAX: (206) 682-6031
 (C) TELEX: 3723836

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 1:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 9 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre

- (C) KJEDER: enkeltkjedet
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYP: Peptid
(v) FRAGMENT-TYPE: N-terminal
5 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR.:
Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

Patentkrav

1.

5 Stent, karakterisert ved at den omfatter en generelt rørformet struktur og paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

2.

Stent ifølge krav 1, som omfatter paclitaxel.

10 3.

Stent ifølge krav 1, som omfatter en paclitaxel analog.

4.

15 Stent ifølge krav 1, som omfatter et paclitaxel derivat.

5.

Stent ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, videre omfattende en polymer.

6.

20 Stent ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, videre omfattende en biodegraderbar polymer.

7.

25 Stent ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, videre omfattende poly (D,L-laktid-co-glykolid).

8.

Stent ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4 videre omfattende en ikke-biodegraderbar polymer.

30

9.

Stent ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor stenten er en vaskulær stent.

10.

Fremgangsmåte for fremstilling av en stent, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter belegging av en stent med

- 5 (i) en anti-angiogen blanding omfattende en anti-angiogen faktor og en polymer bærer, eller
(ii) en anti-angiogen faktor,
der den anti-angiogene faktor er paclitaxel, en paclitaxel analog eller et paclitaxel derivat.

11.

- 10 Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor stenten belegges ifølge (i).

12

Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor den anti-angiogene faktor er paclitaxel.

15 13.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor den anti-angiogene faktor er en paclitaxel analog.

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor den anti-angiogene faktor er et paclitaxel derivat.

20

15.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 14, hvor den polymere bæreren er biodegraderbar.

- 25 16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 14, hvor den polymere bæreren omfatter poly (D,L-laktid-co-glykolid).

17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 14, hvor den polymere bæreren er ikke-biodegraderbar.

30

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor stenten belegges ifølge (ii).

19.

- 35 Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvor den anti-angiogene faktor er paclitaxel.

20.

Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvor den anti-angiogene faktor er en paclitaxel analog.

5 21.

Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvor den anti-angiogene faktor er et paclitaxel derivat.

22,

10 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10-21, hvor en anti-angiogen blanding bindes direkte til stenten.

23.

15 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10-21, hvor stenten med en subsans som vil absorbere den anti-angiogene blandingen eller den anti-angiogene faktor.

24.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10-21, hvor den omfatter sammenveving av et nettverk belagt med en anti-angiogen blanding inn i stenten.

20 25.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 21, hvor den omfatter innføring av stenten i et "erme" eller et nettverk som omfatter eller er dekket med en anti-angiogen blanding.

25 26.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10-21, hvor den omfatter konstruering av en stent med en anti-angiogen blanding.

27.

30 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10-26, hvor stenten er en vaskulær stent.

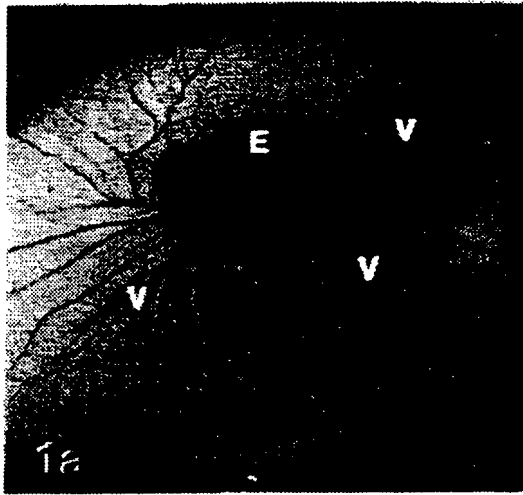


FIG. 1A



FIG. 1B

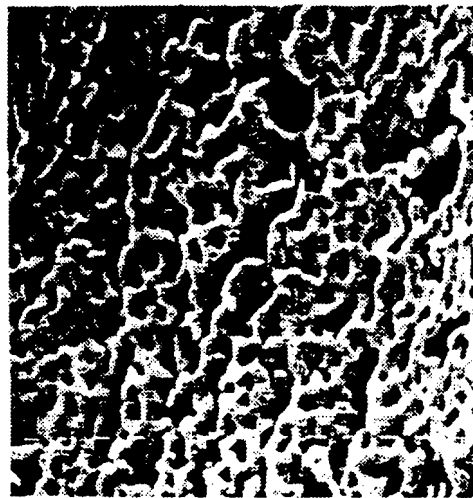
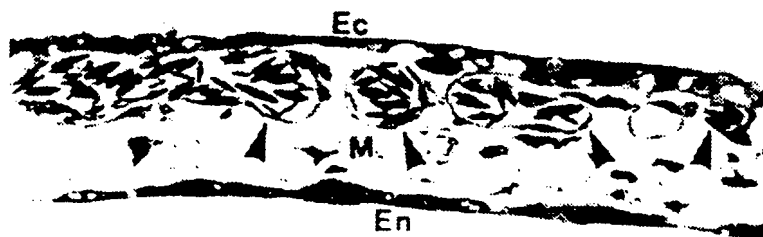


FIG. 1C

FIG. 1D



d



FIG. 1E

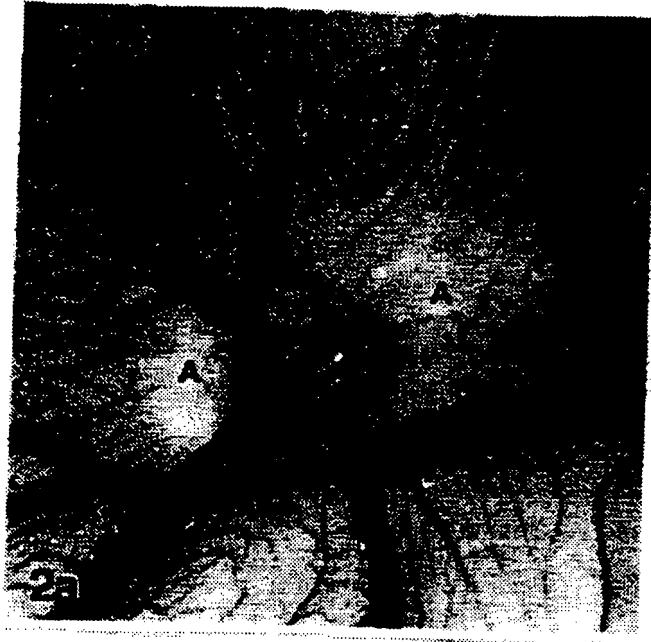


FIG. 2A



FIG. 2B

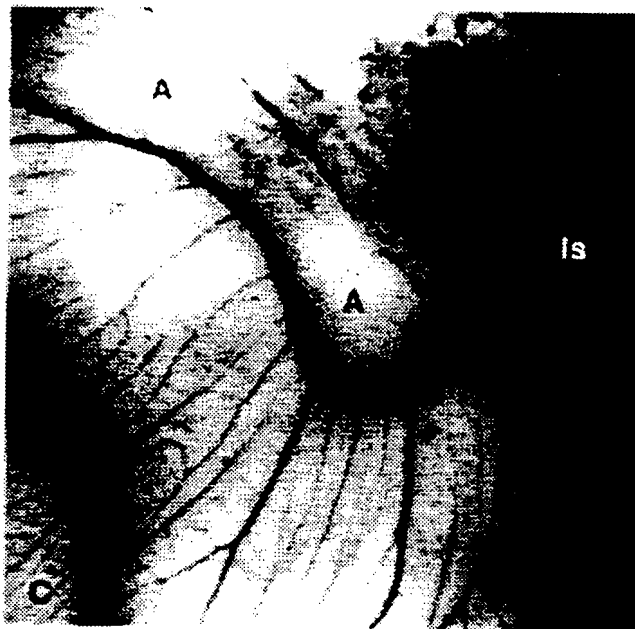


FIG. 2C



FIG. 2D

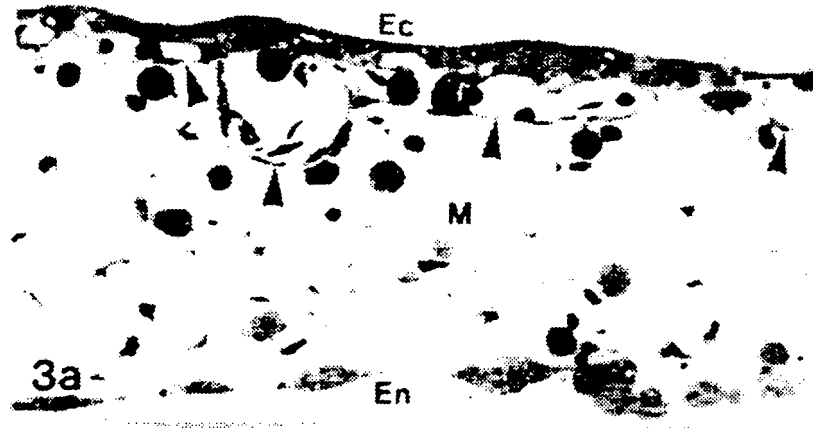


FIG. 3A

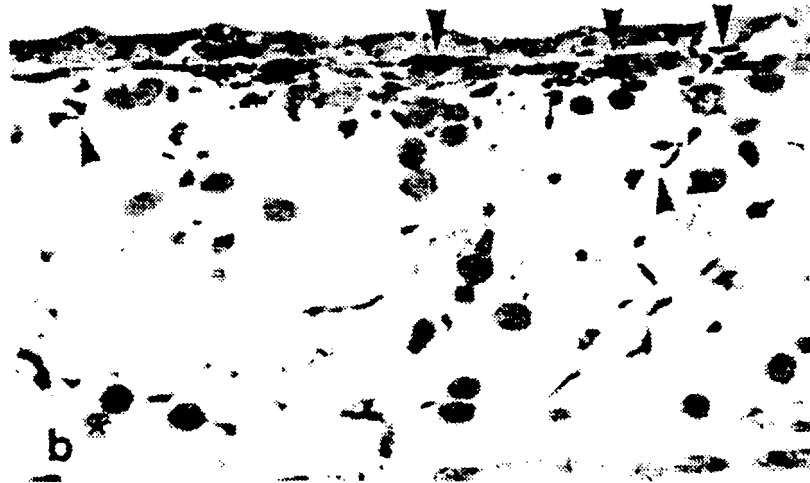


FIG. 3B



FIG. 3C

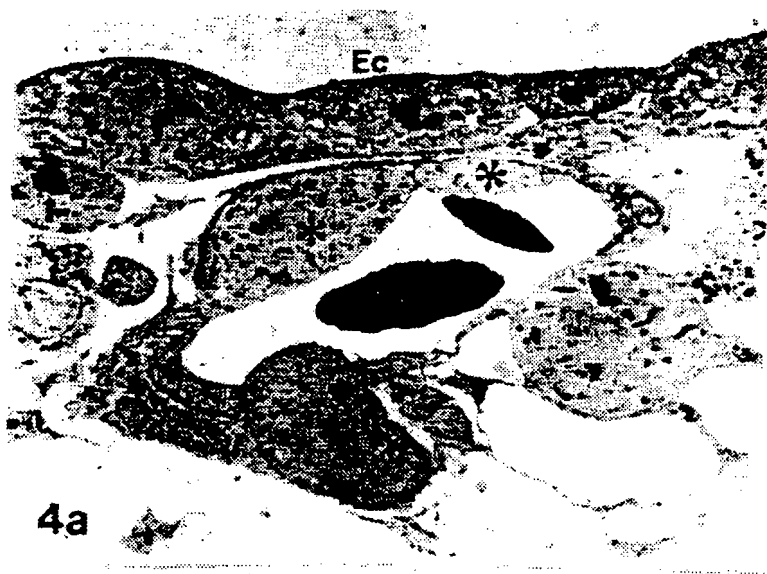


FIG. 4A

4a

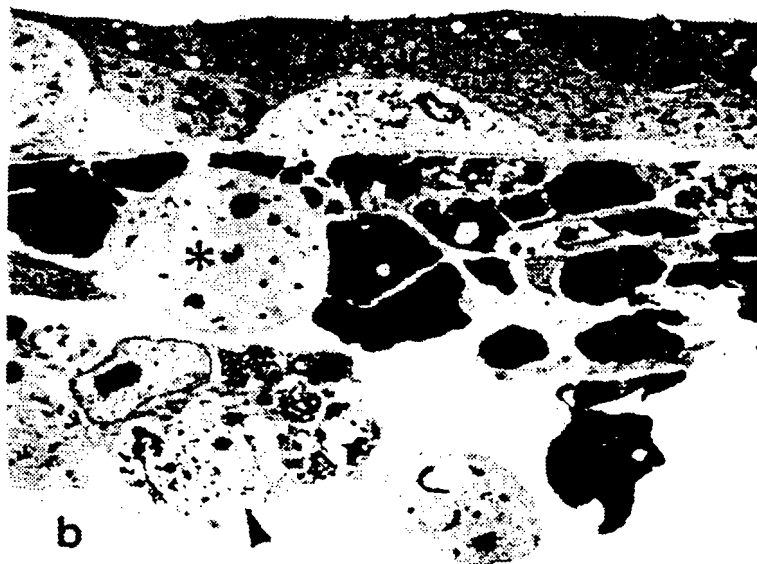


FIG. 4B

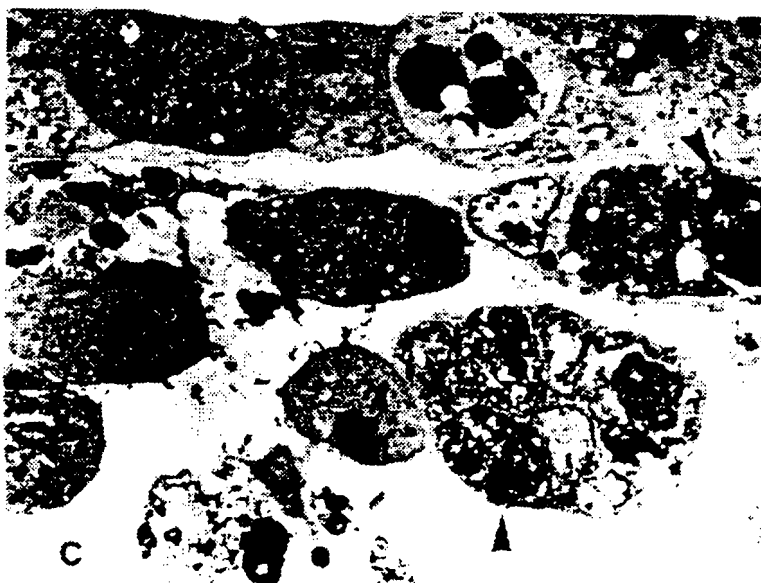


FIG. 4C

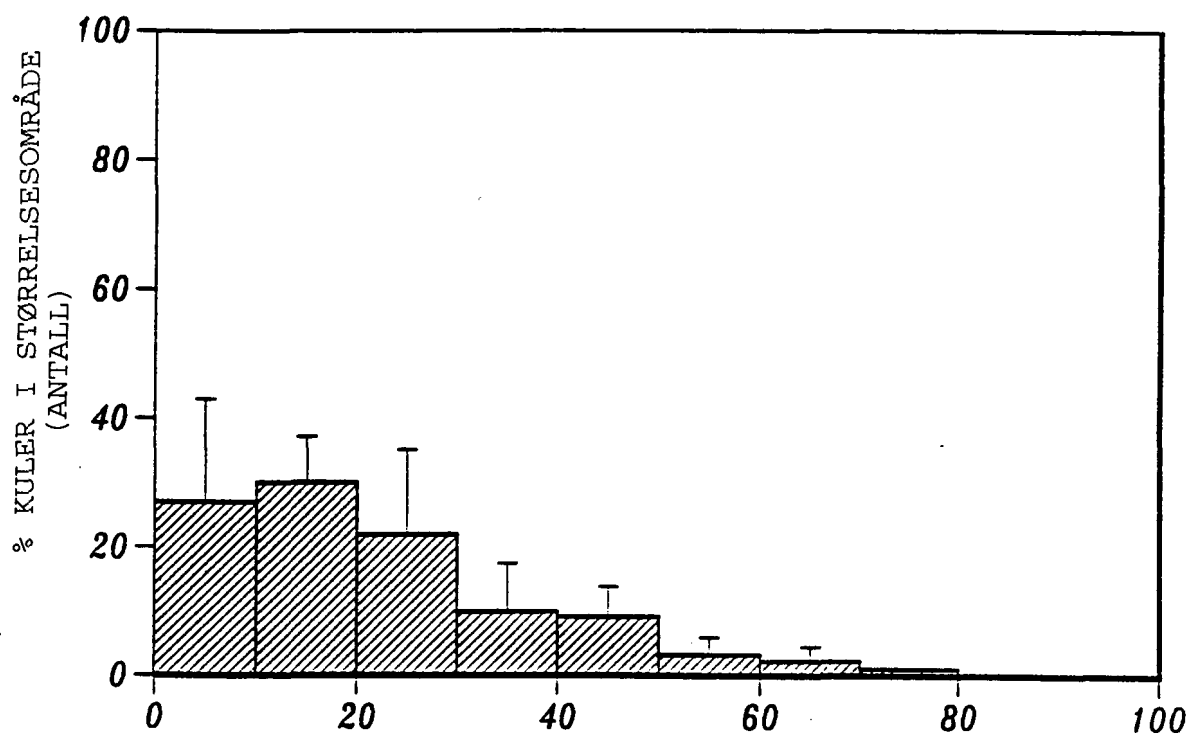


FIG. 5. STØRRELSESOMRÅDE (MIKROMETER DIAMETER)

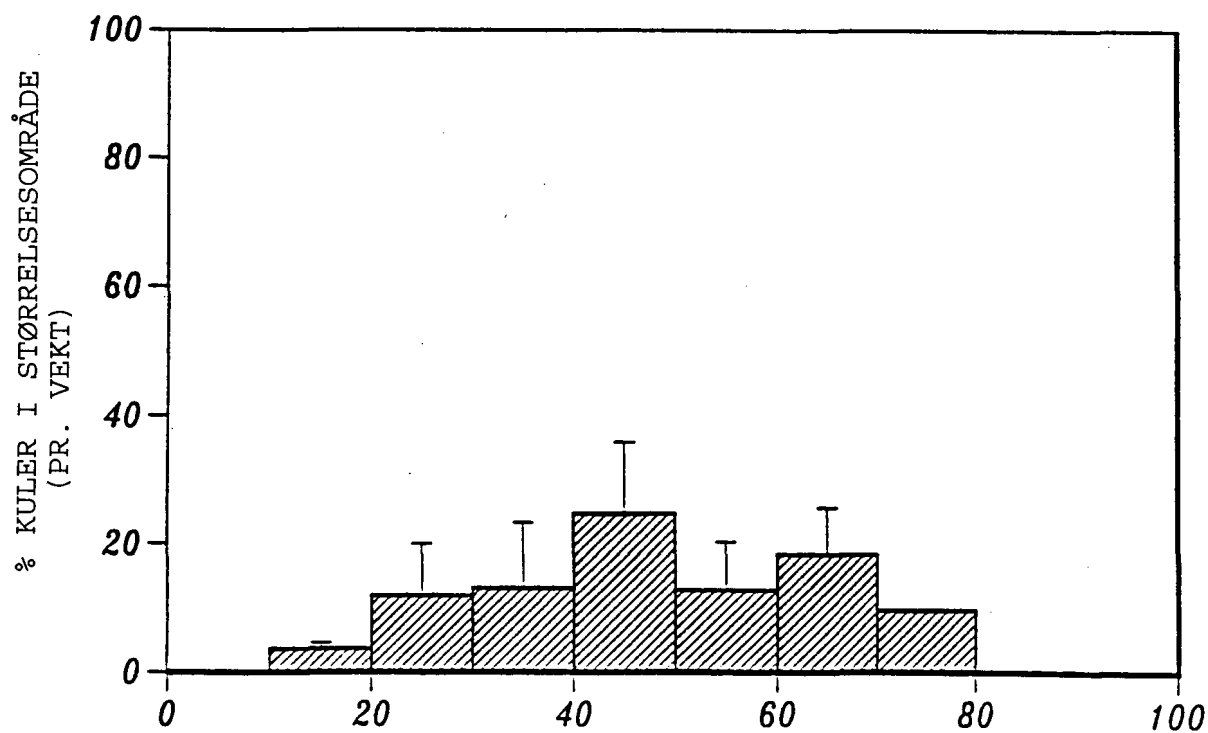


FIG. 6. STØRRELSESOMRÅDE (MIKROMETER DIAMETER)

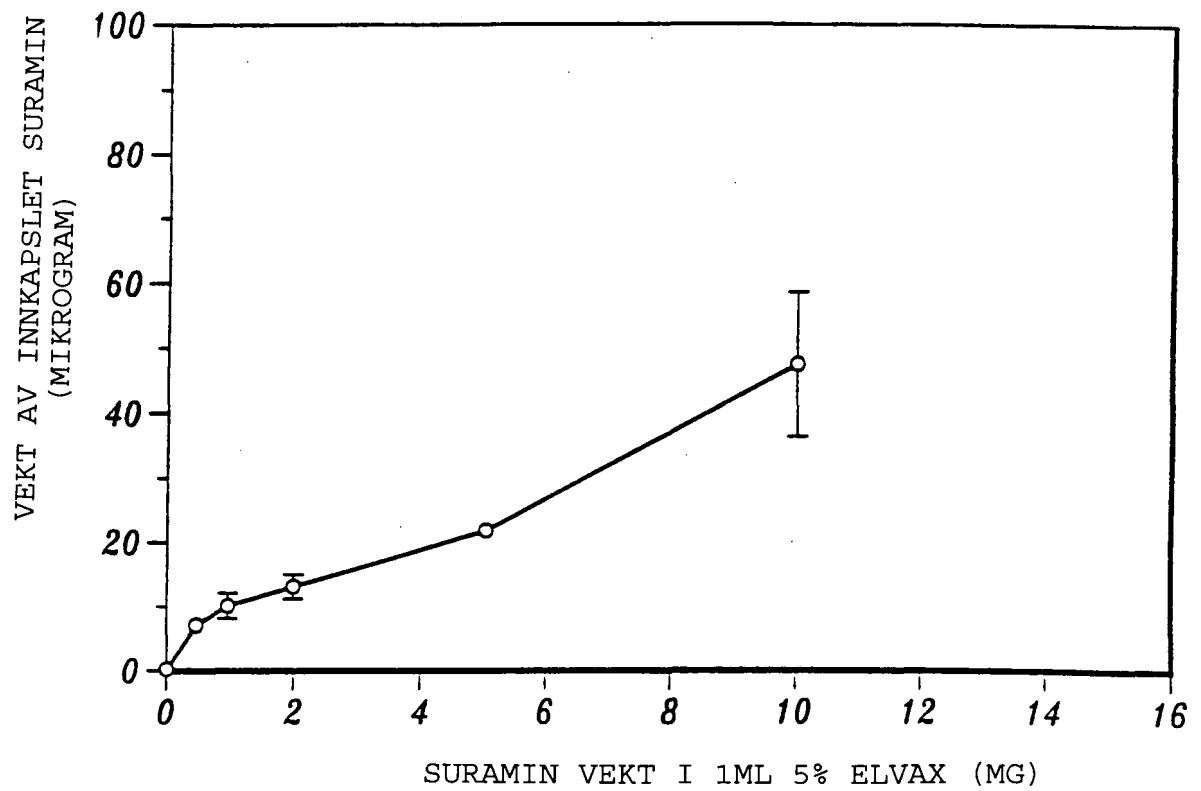


FIG. 7.

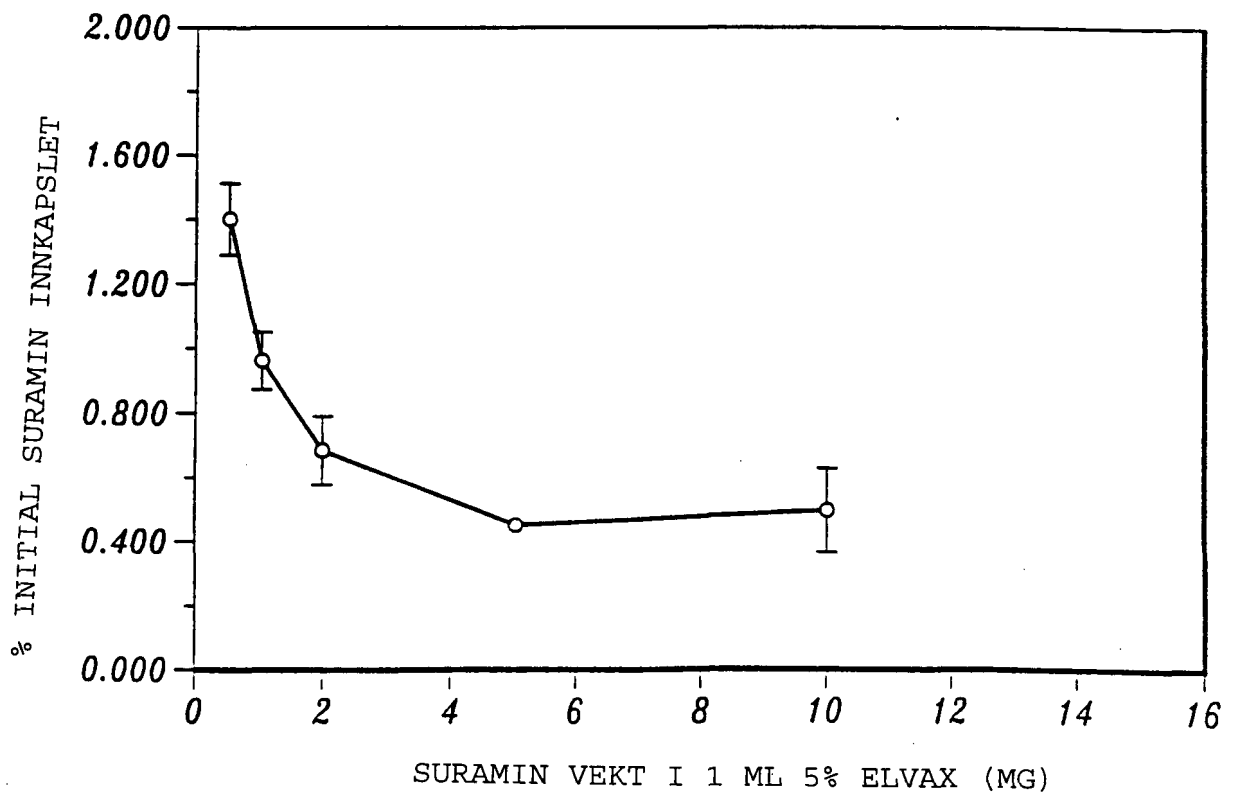


FIG. 8.

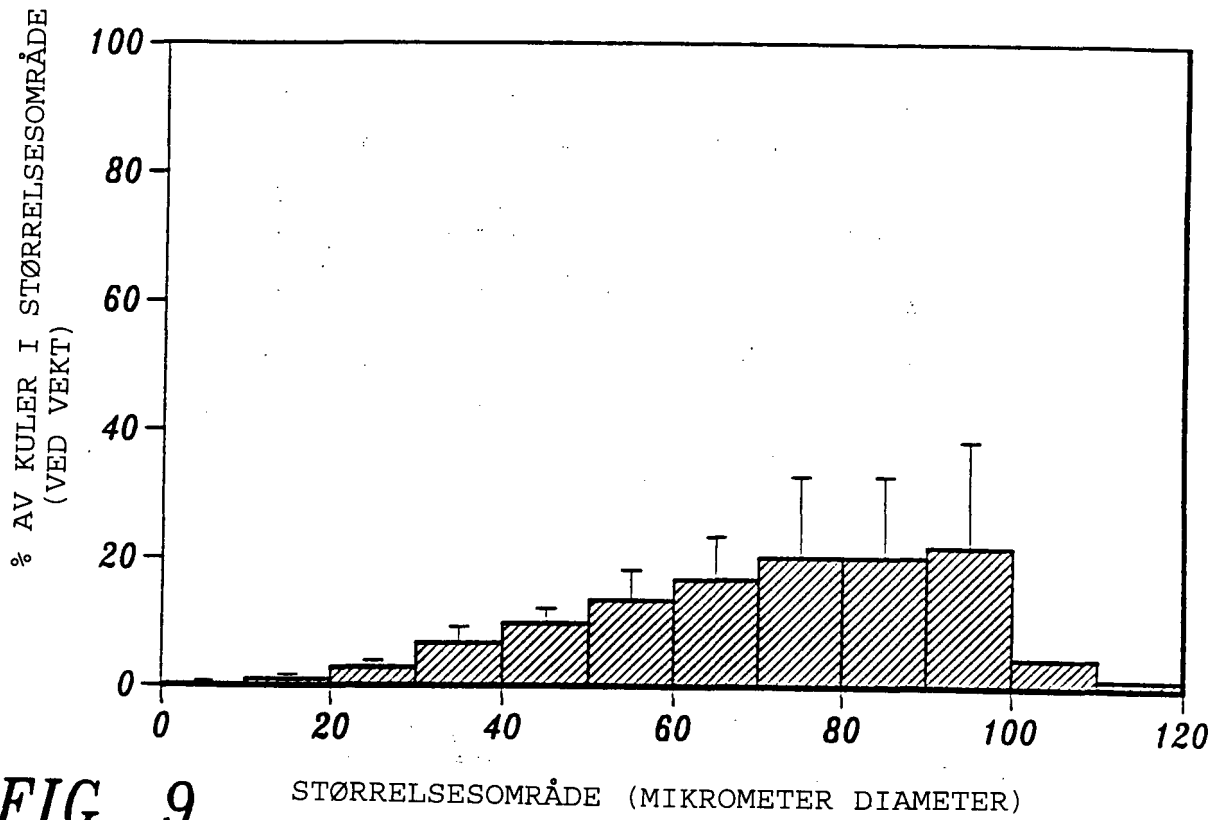


FIG. 9.

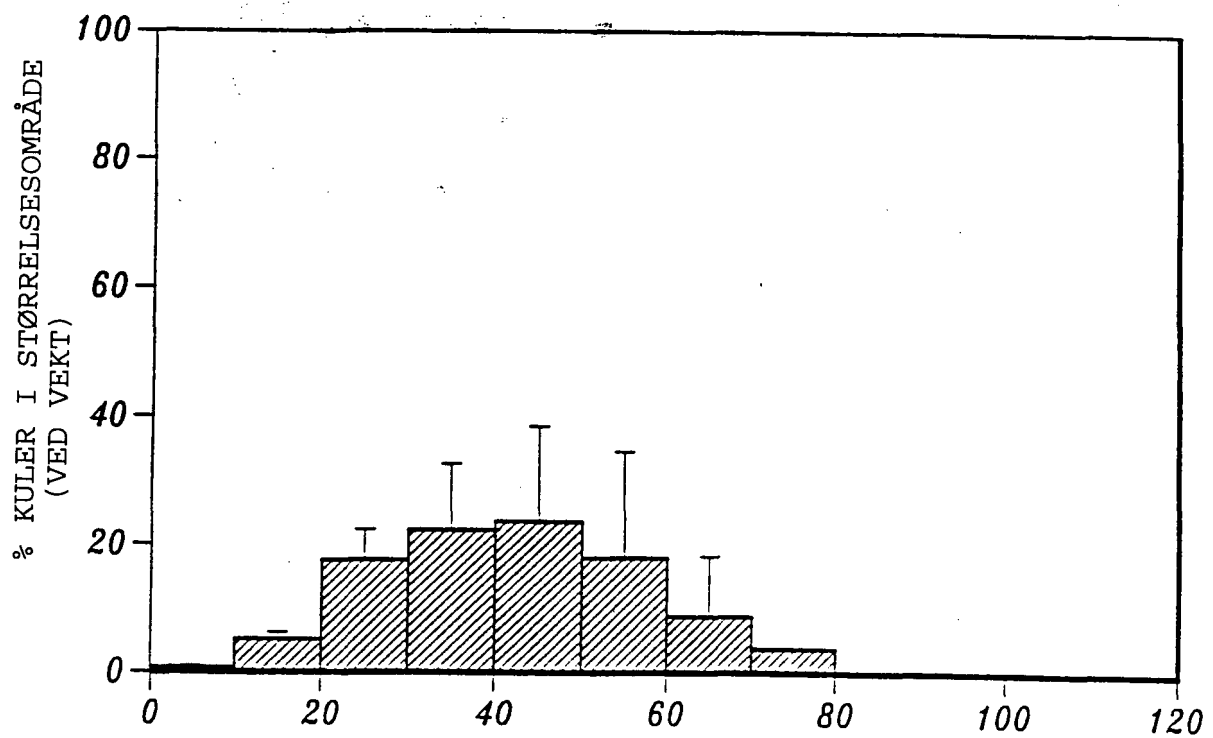
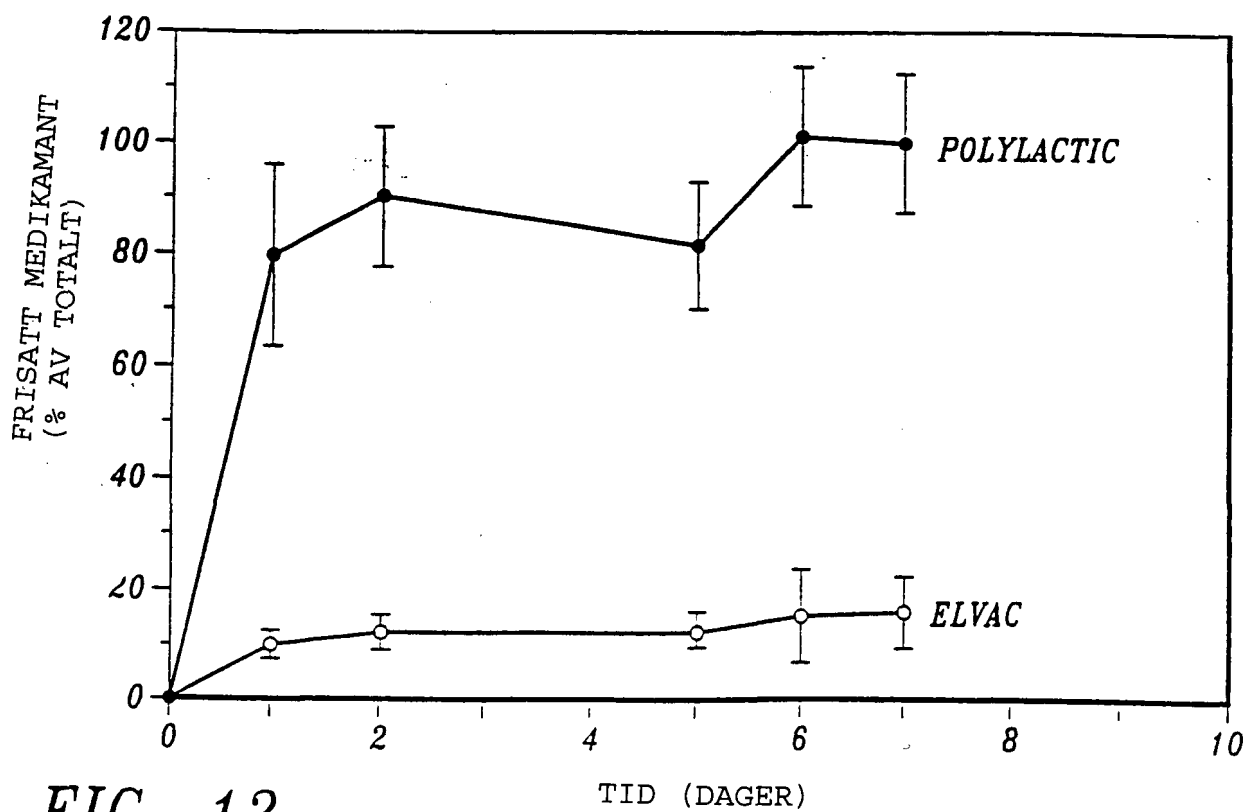
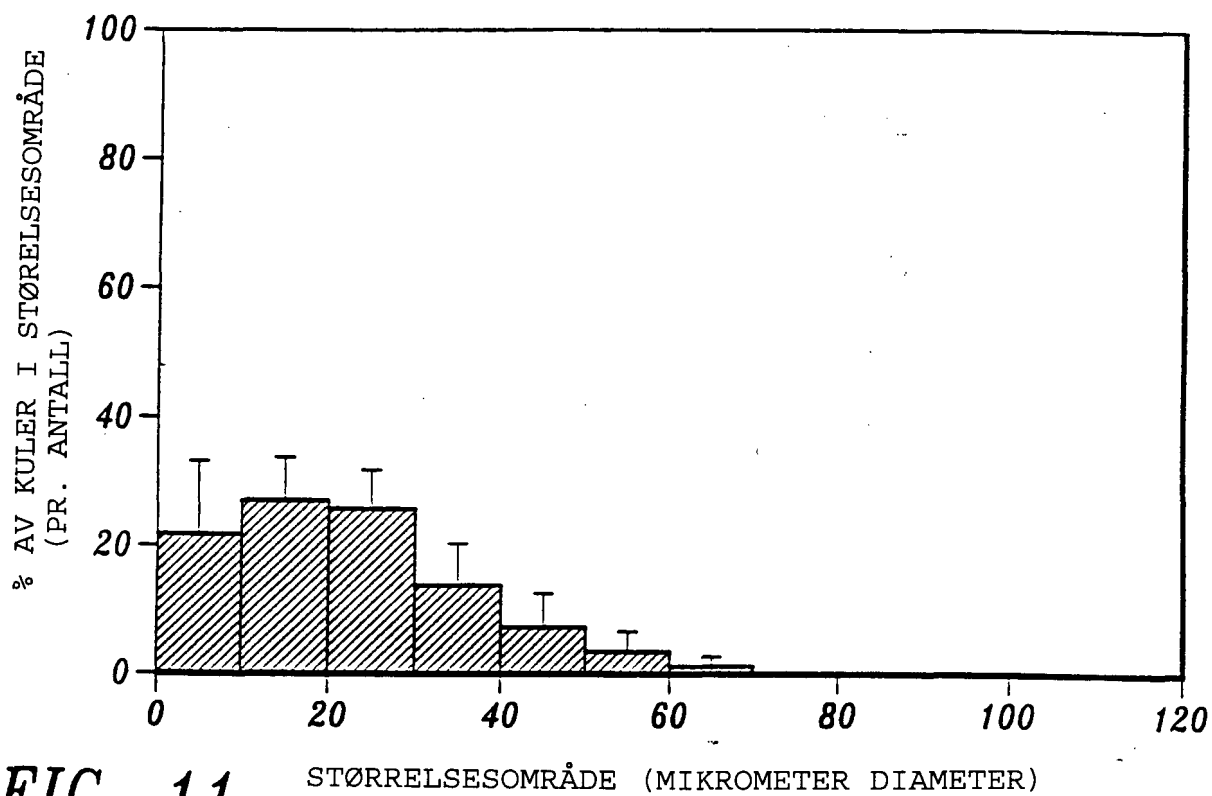


FIG. 10.



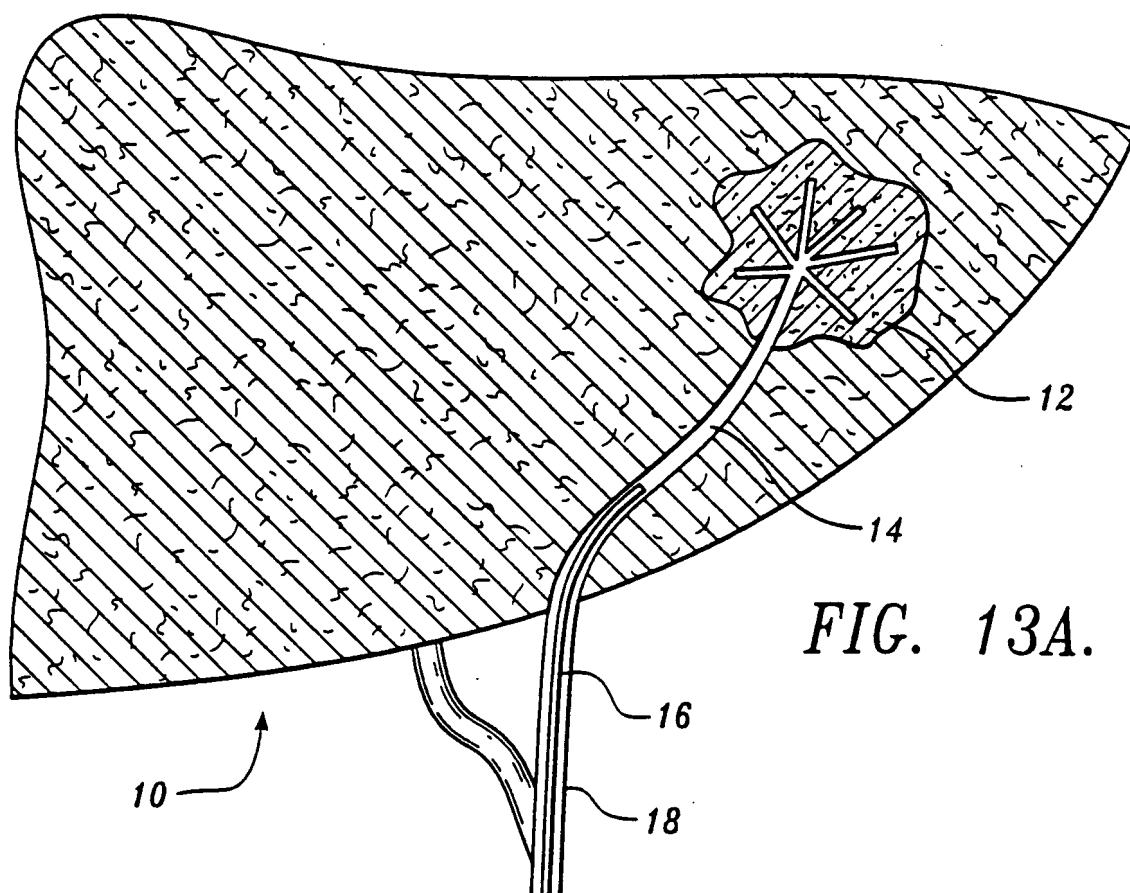


FIG. 13A.

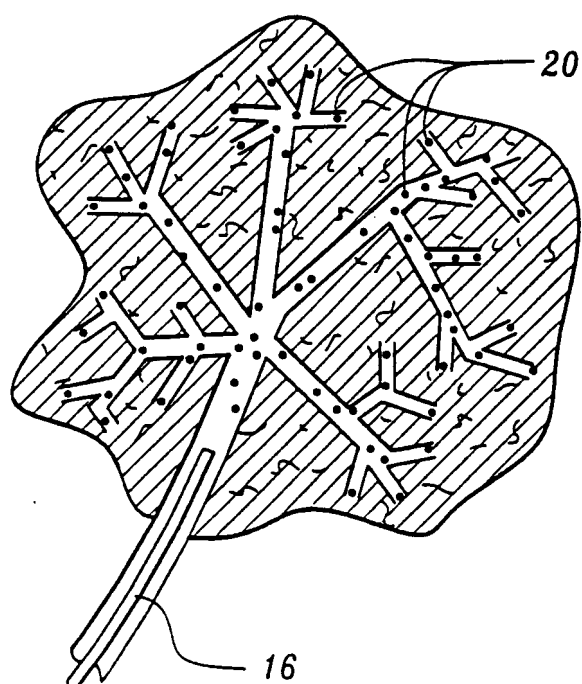
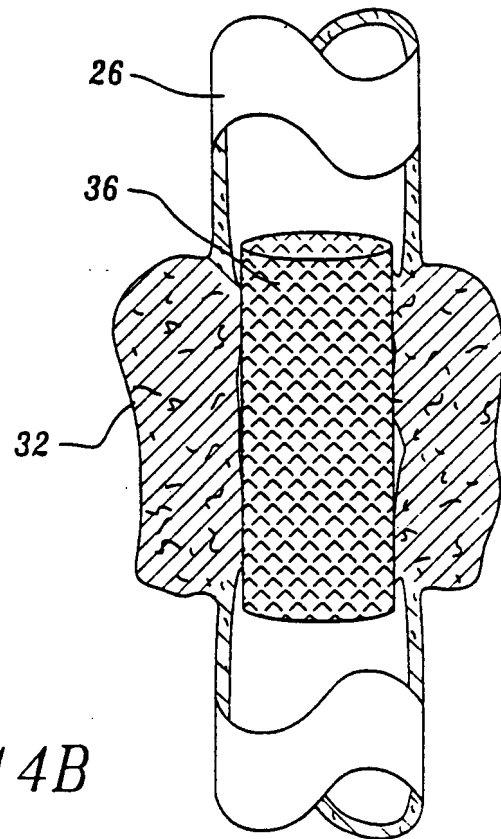
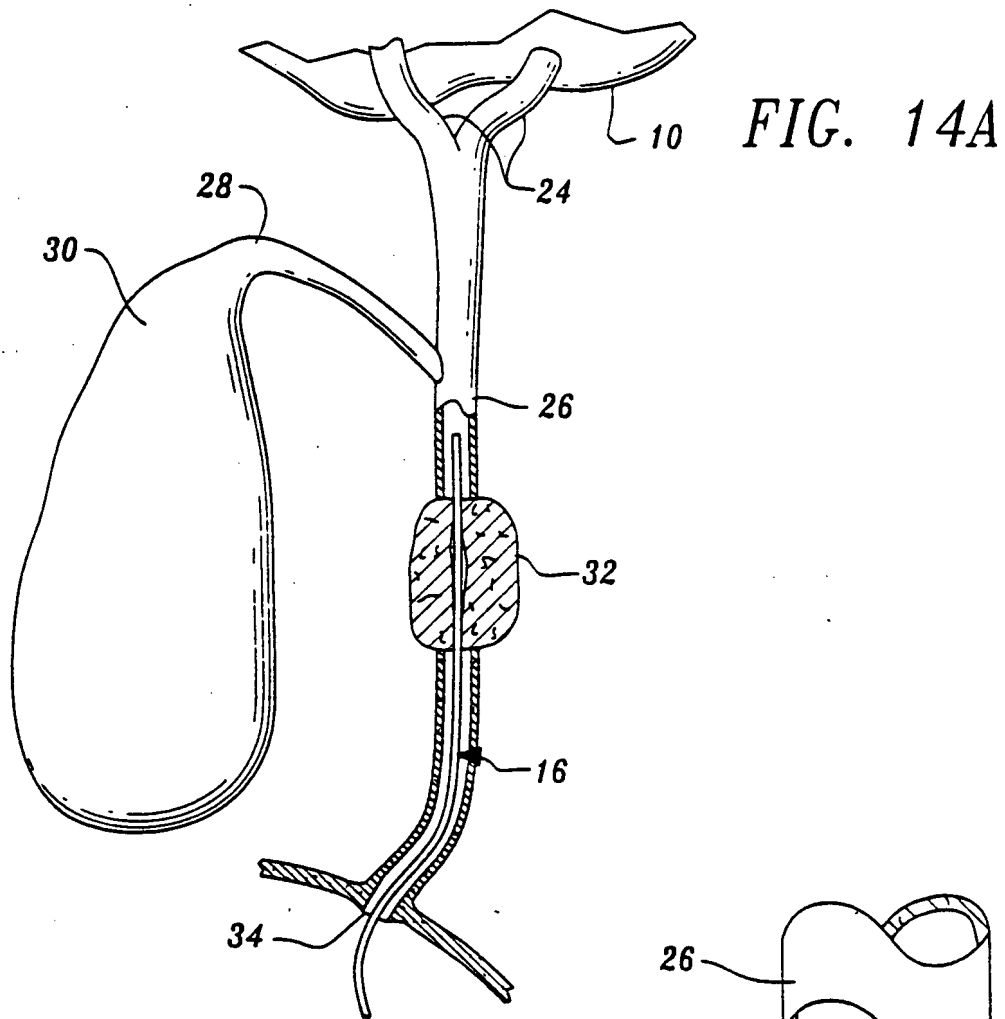
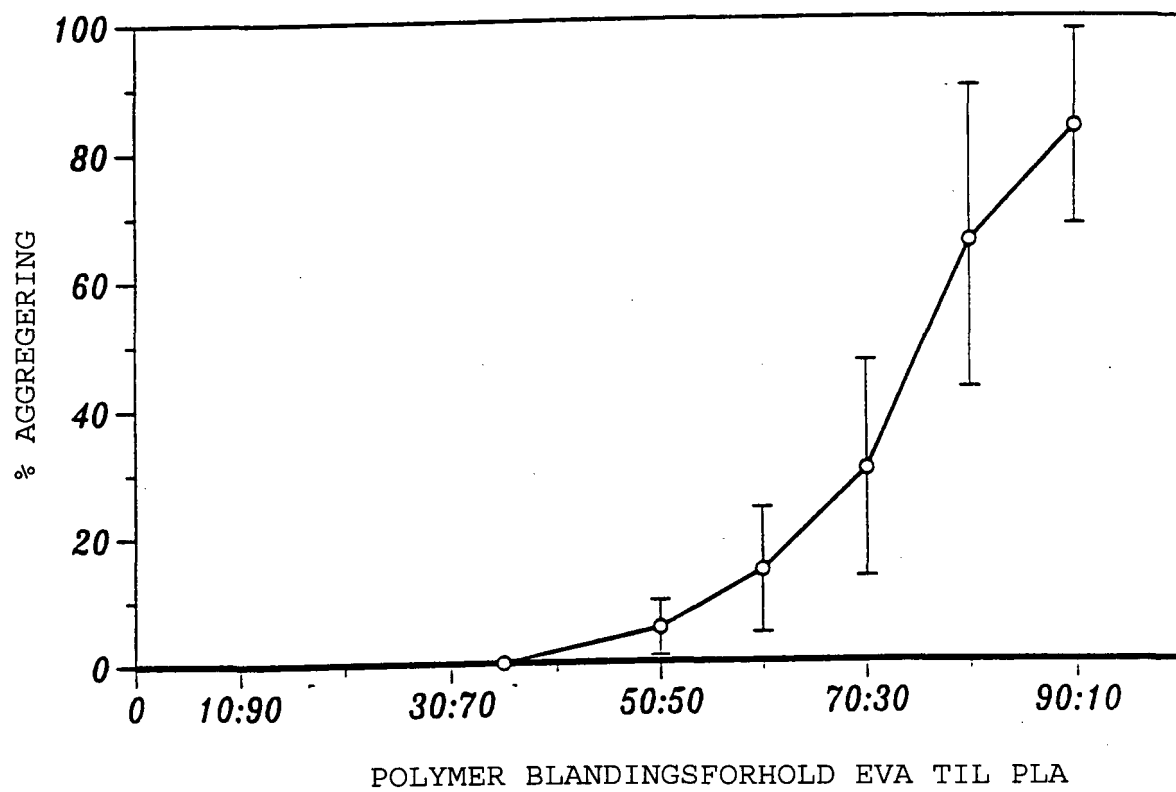


FIG. 13B.



*FIG. 15A.*

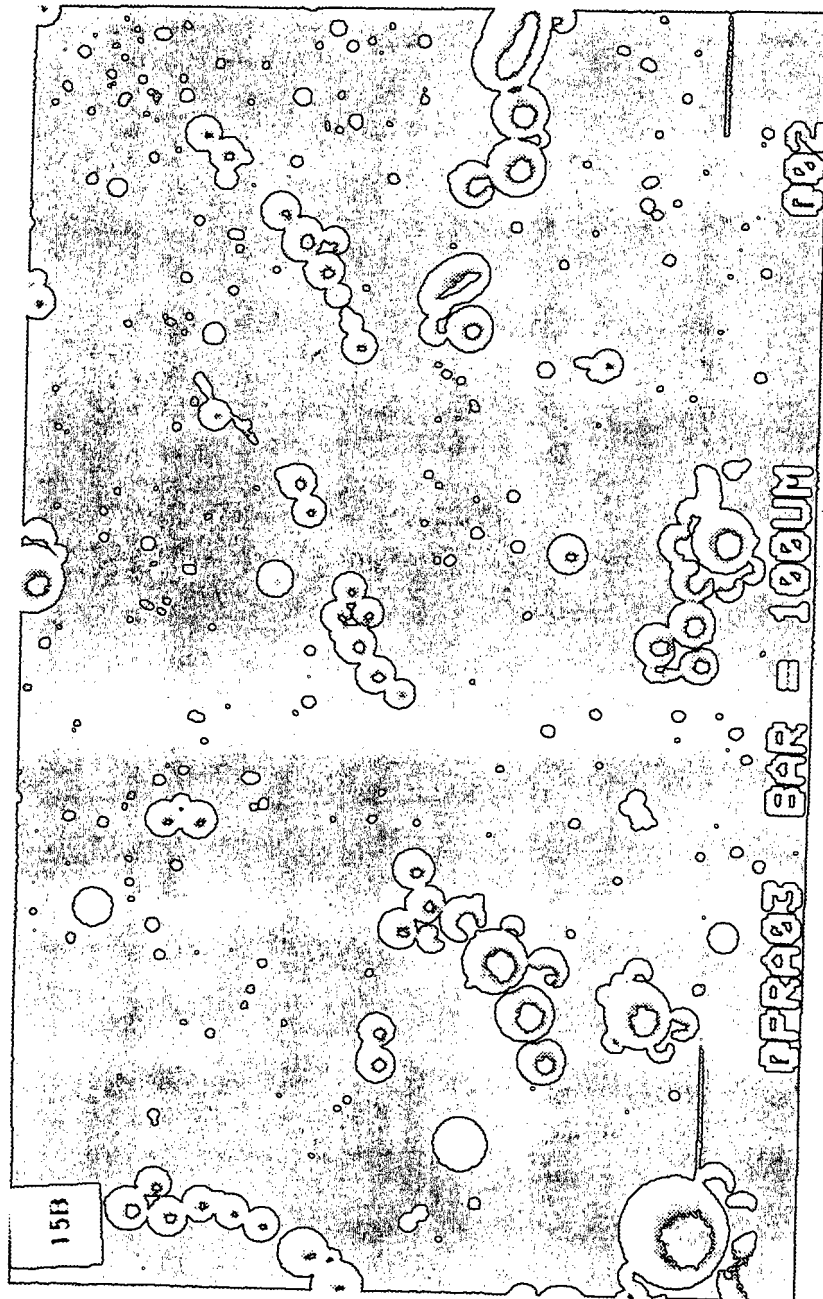


FIG. 15B

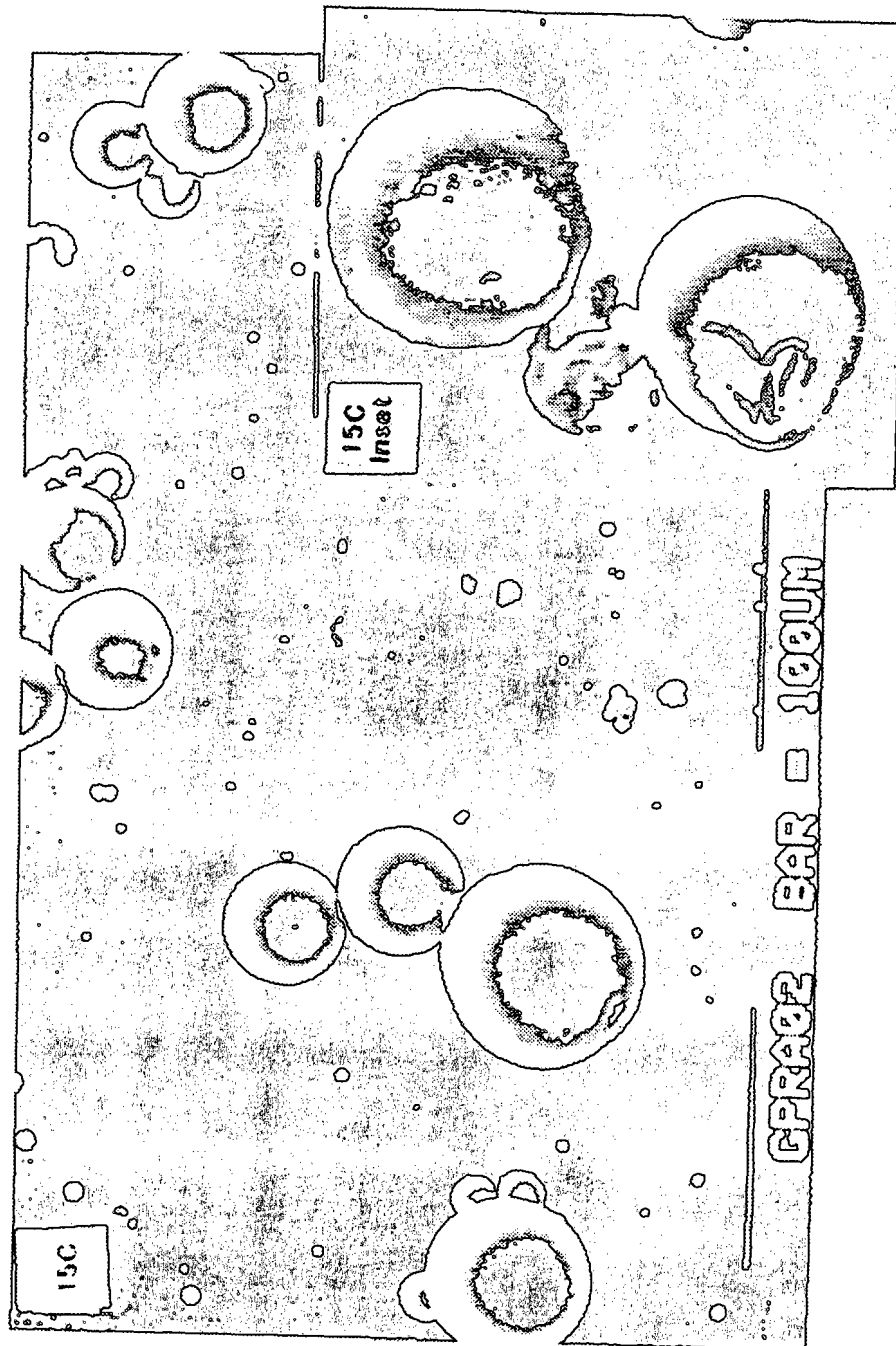


FIG. 15C

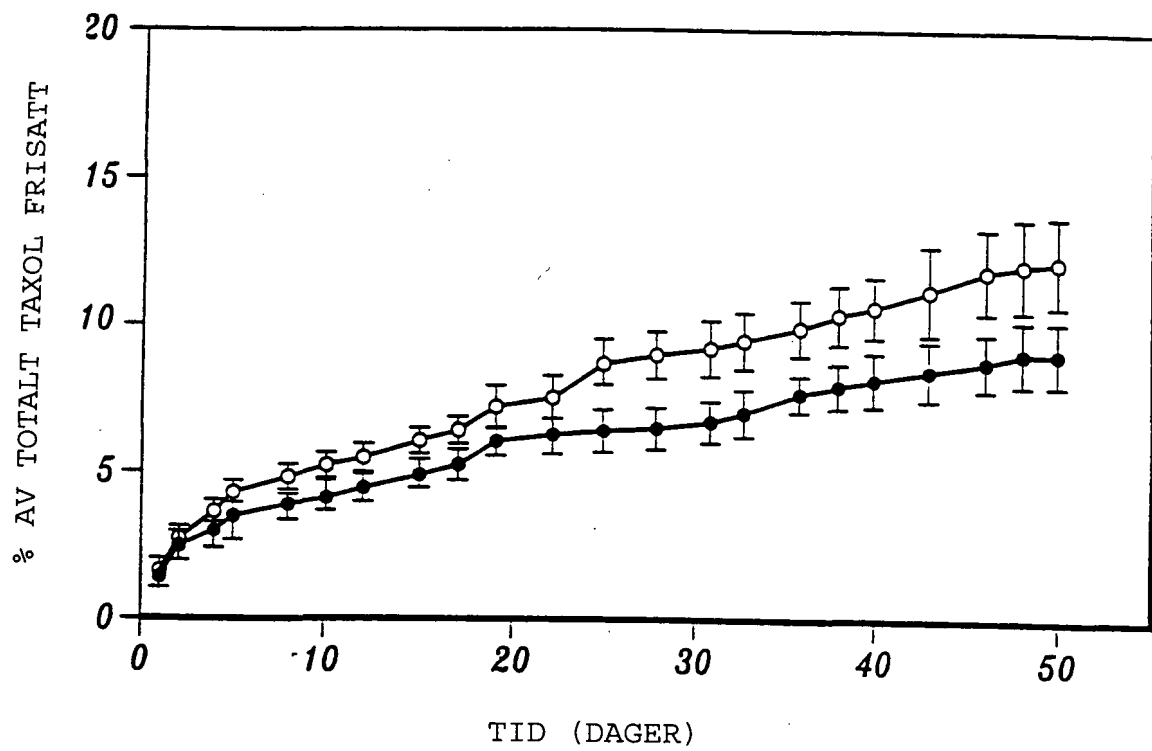
*FIG. 15D.*



FIG. 15E



ZONE 1

MS

FIG. 15F

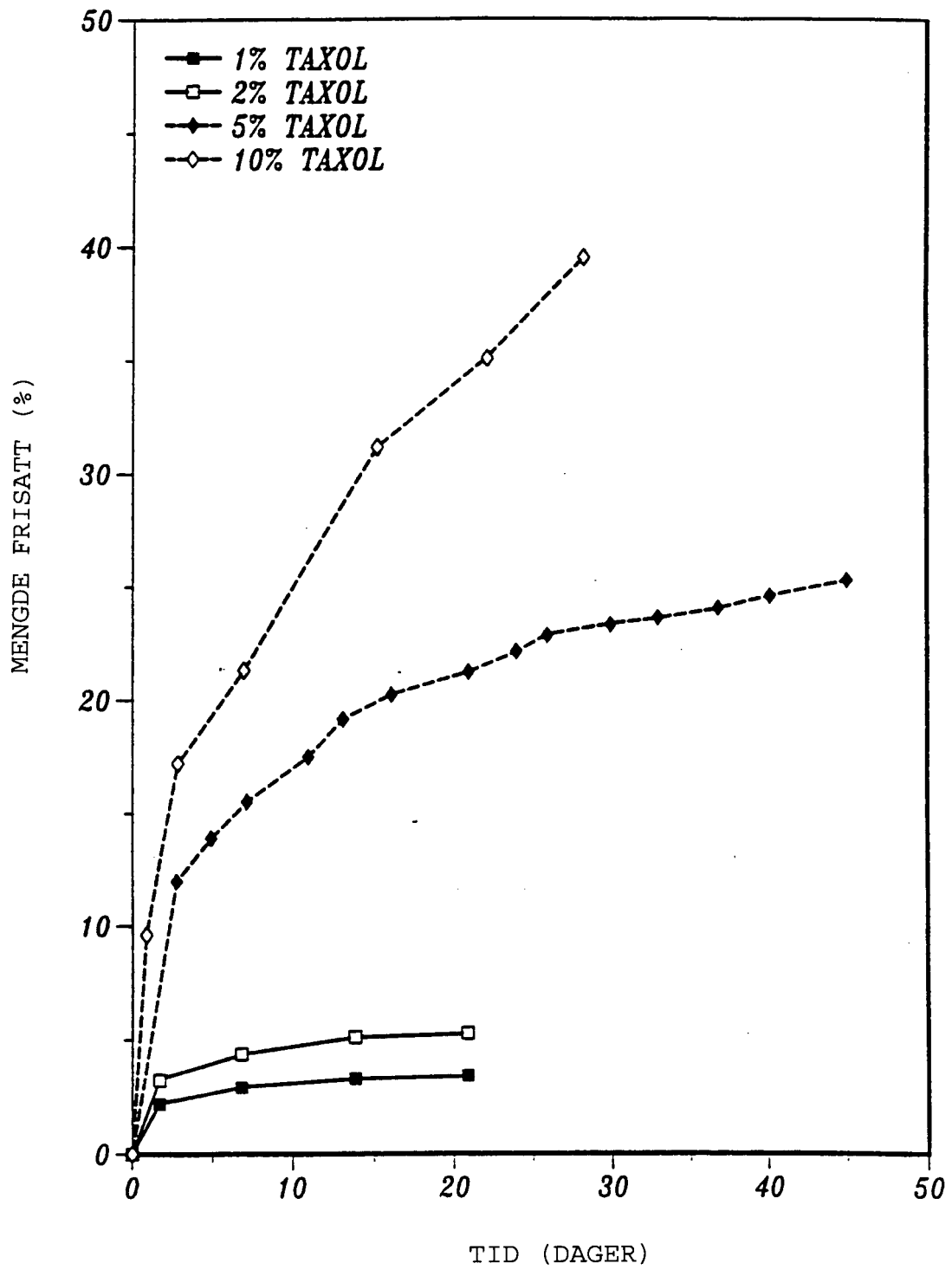


FIG. 16A.



FIG. 16B

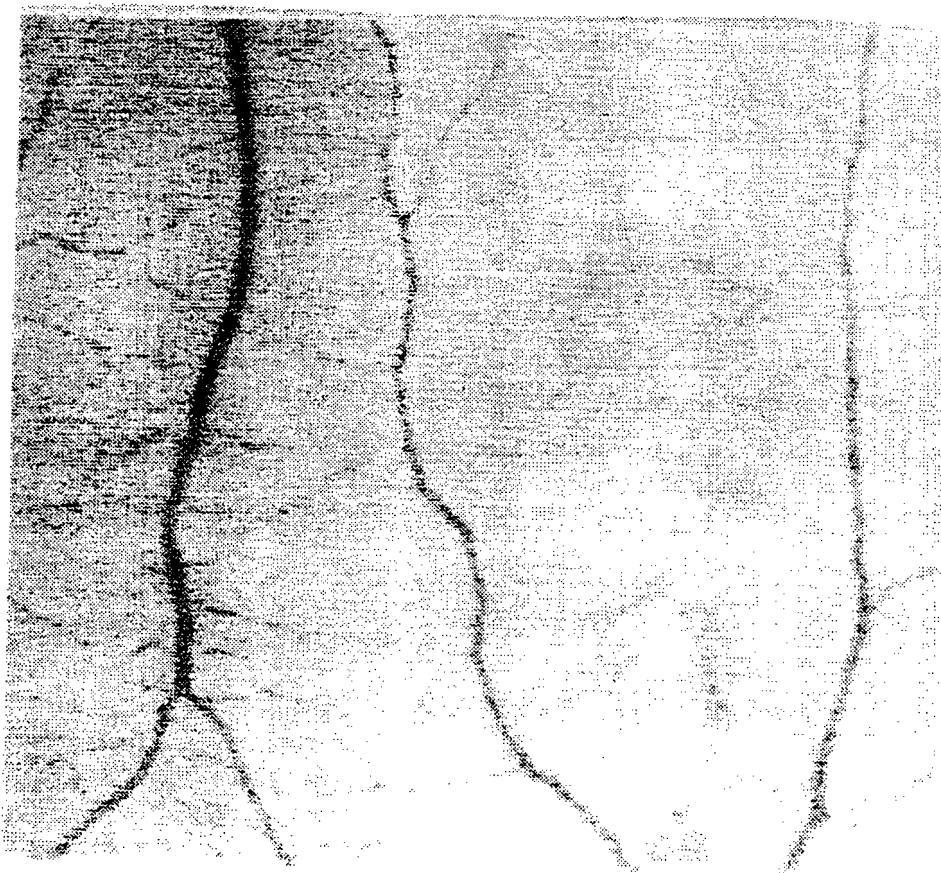


FIG. 16C

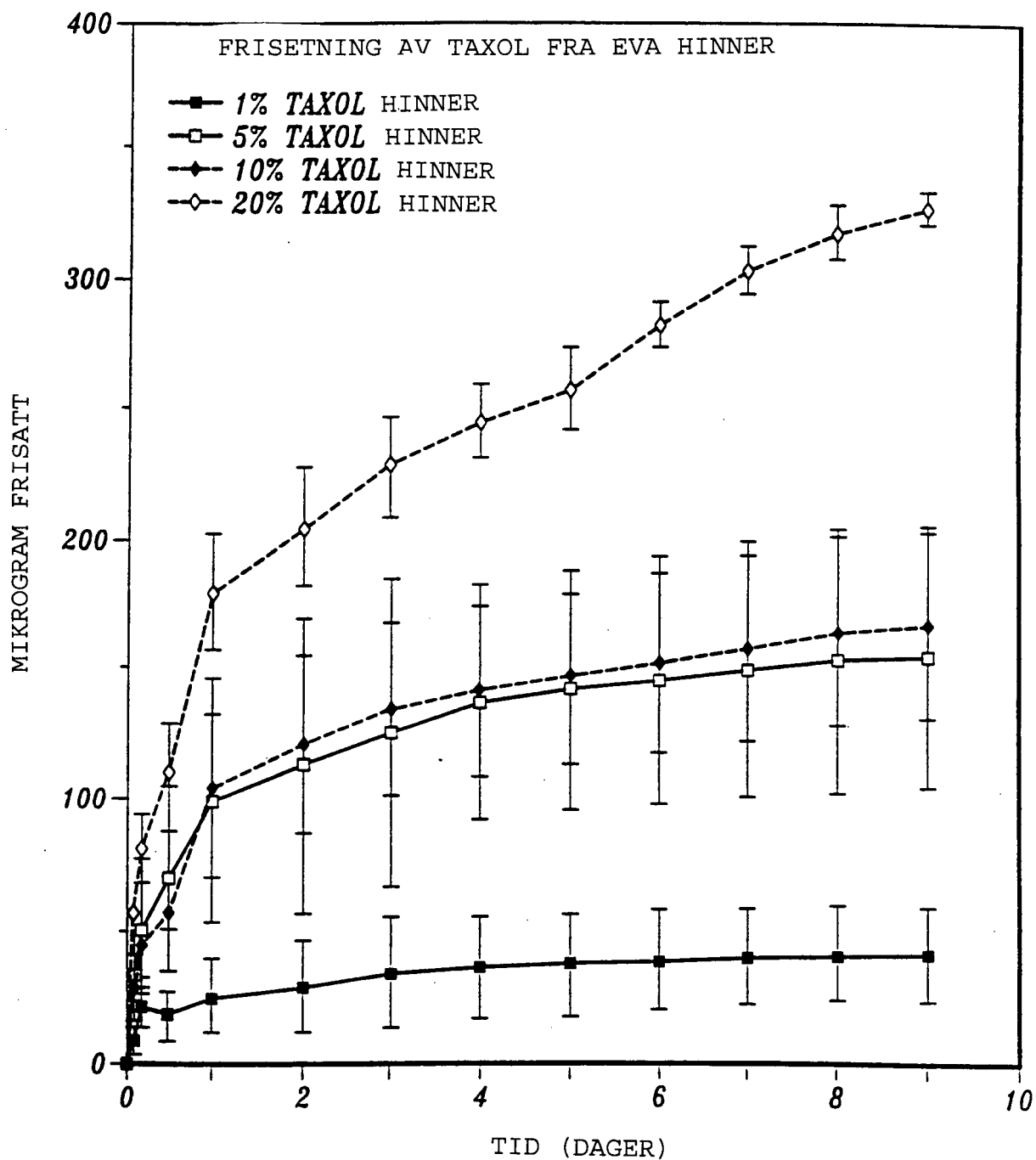


FIG. 17A.

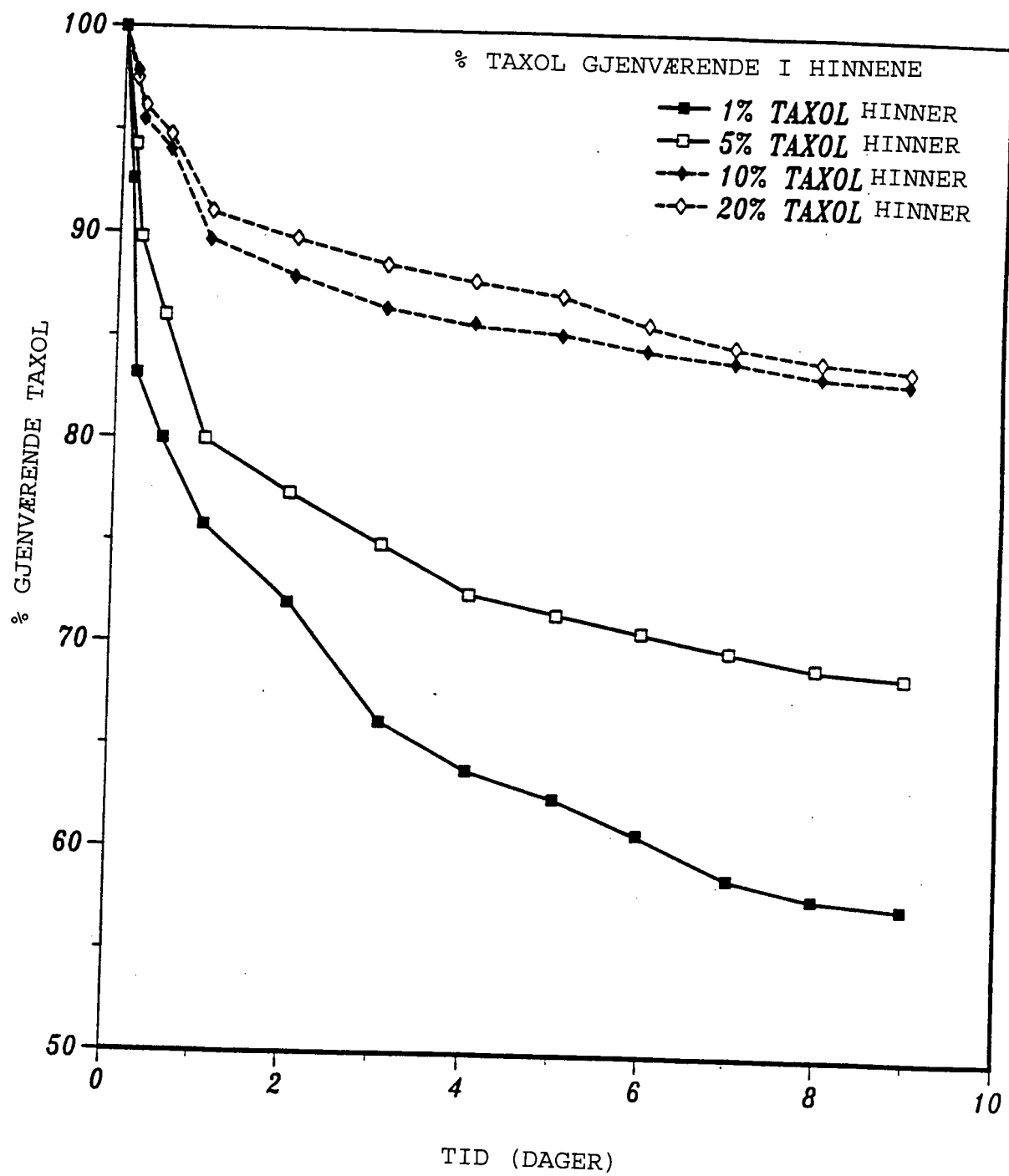


FIG. 17B.

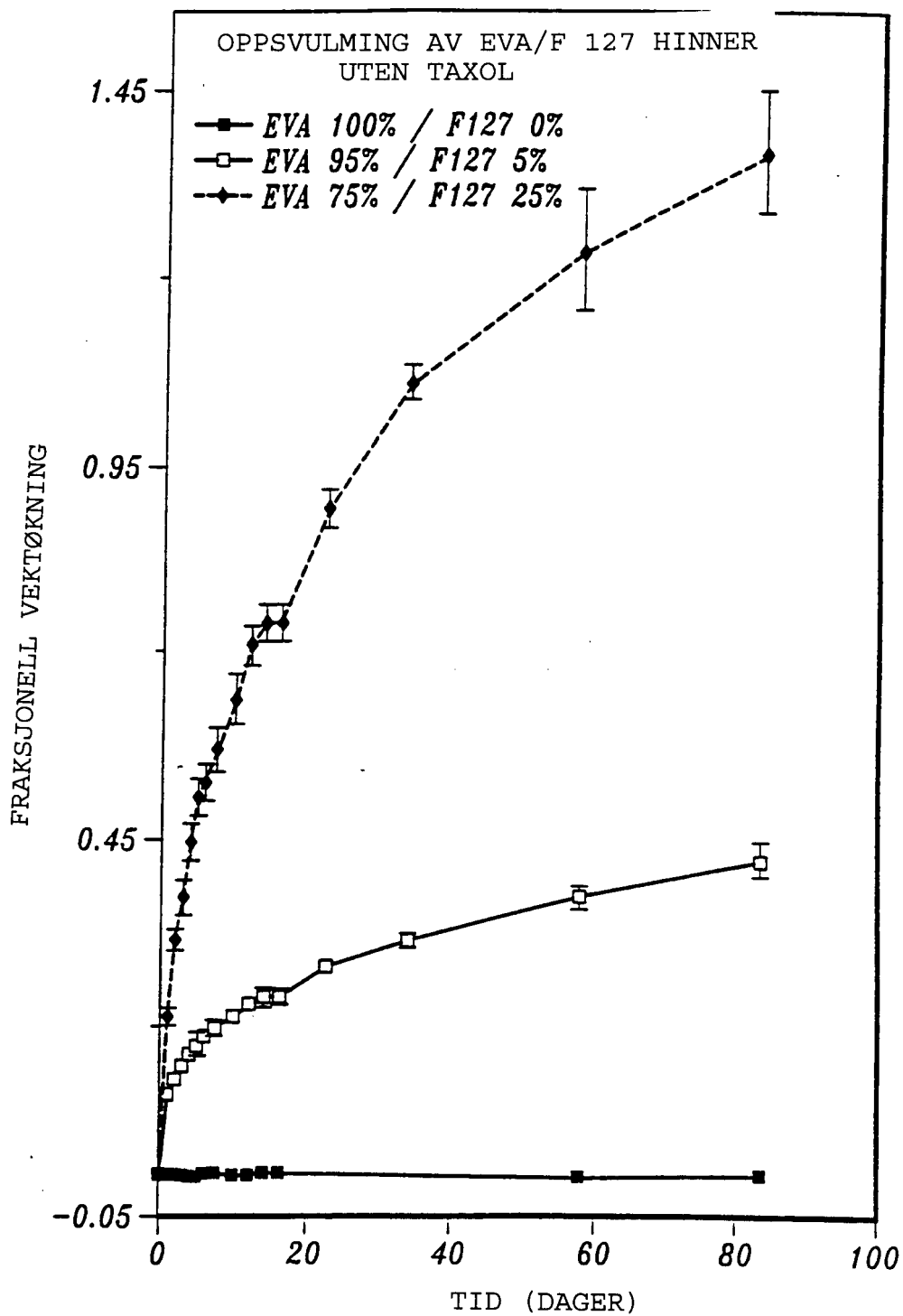


FIG. 17C.

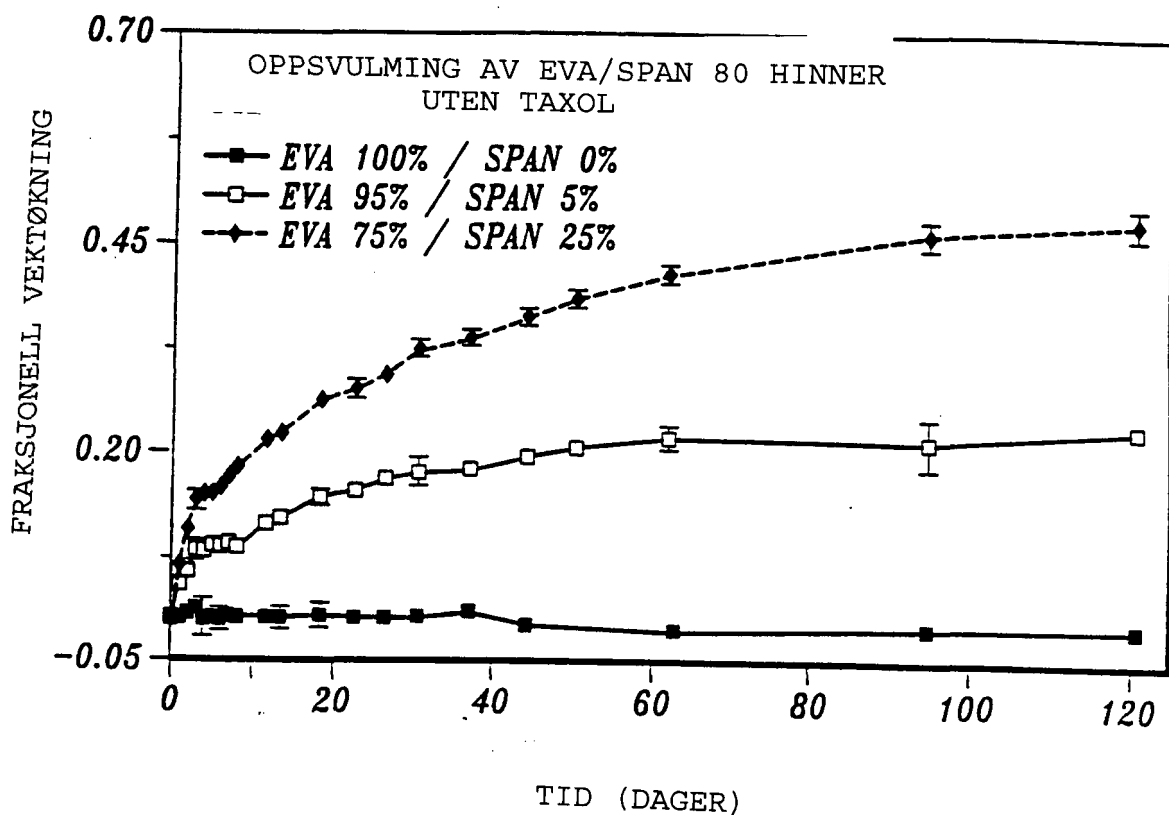


FIG. 17D.

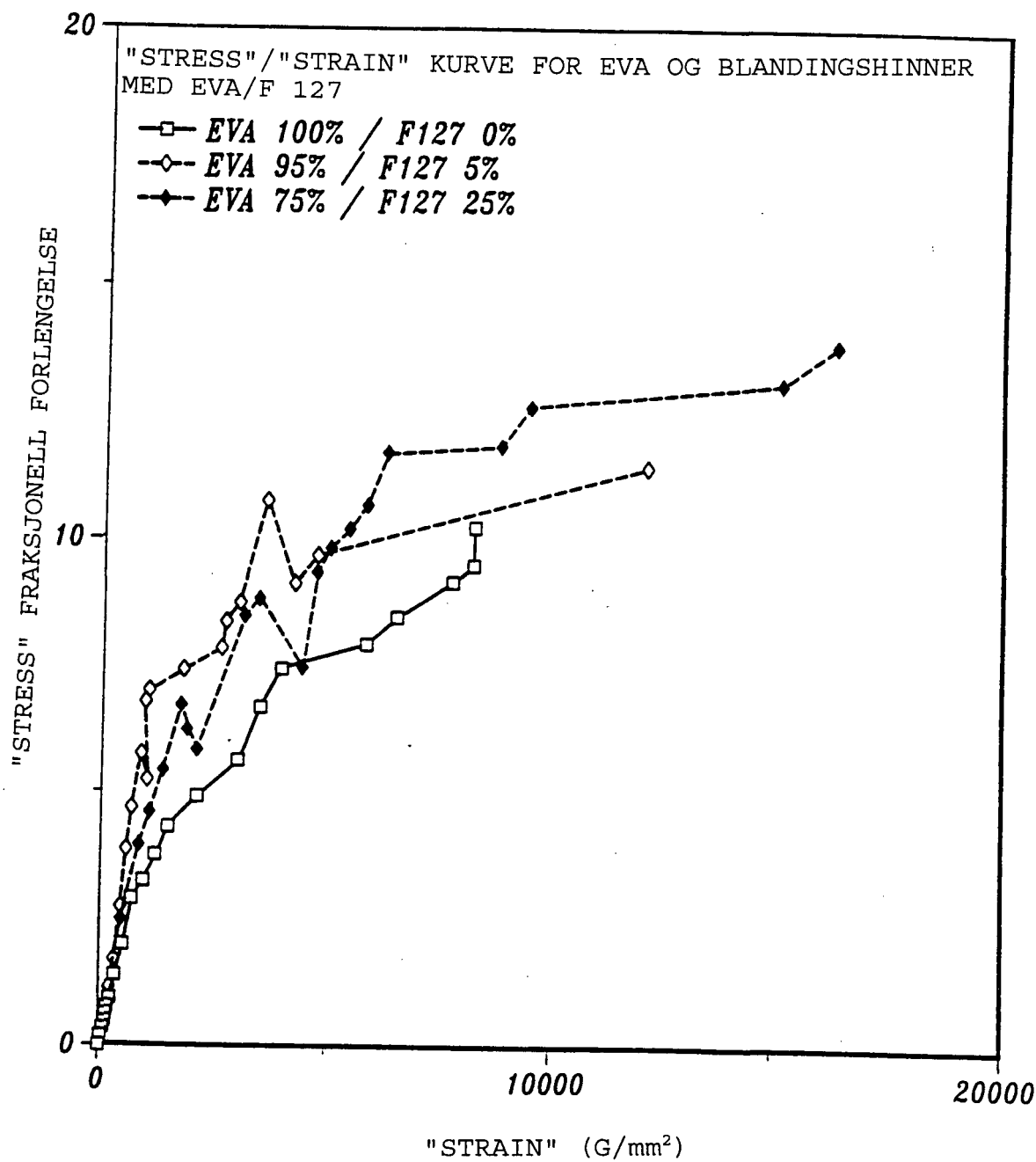


FIG. 17E.

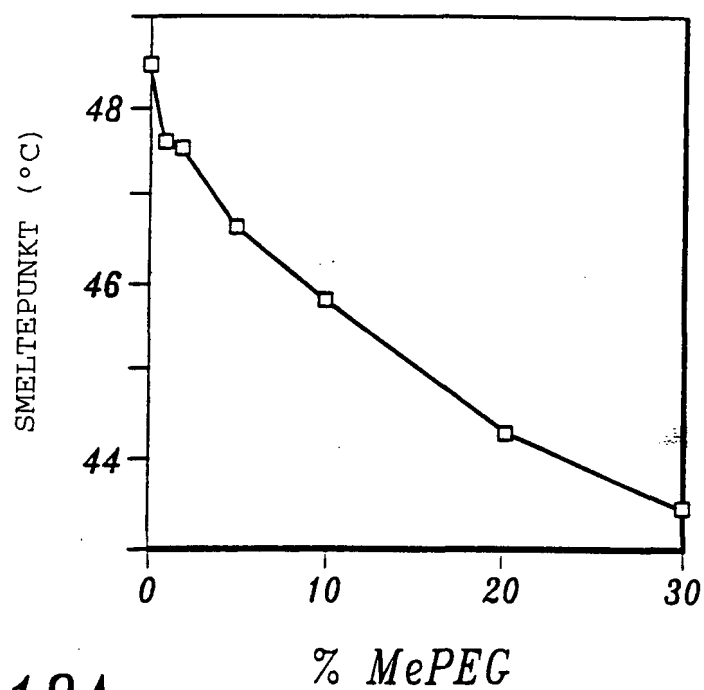


FIG. 18A.

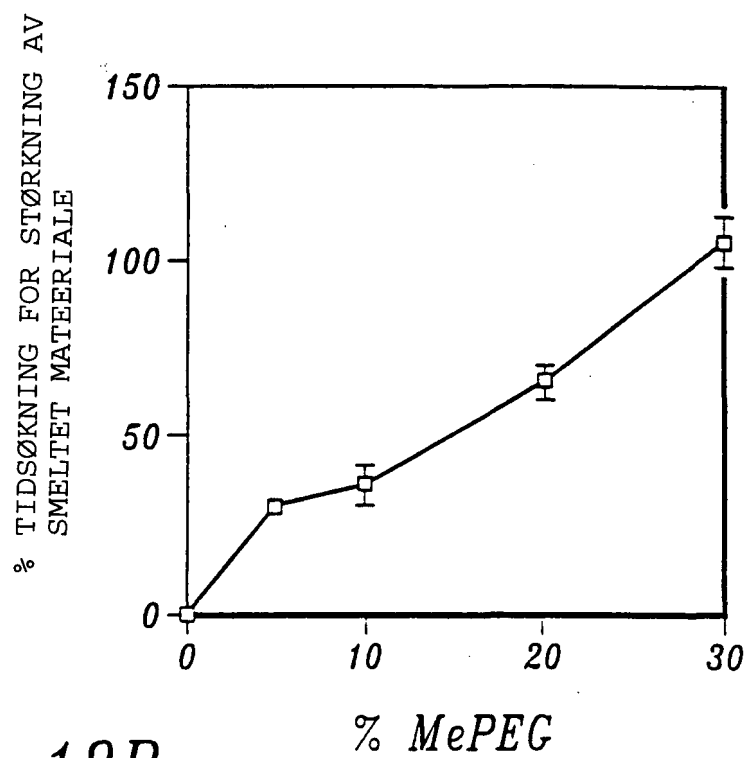


FIG. 18B.

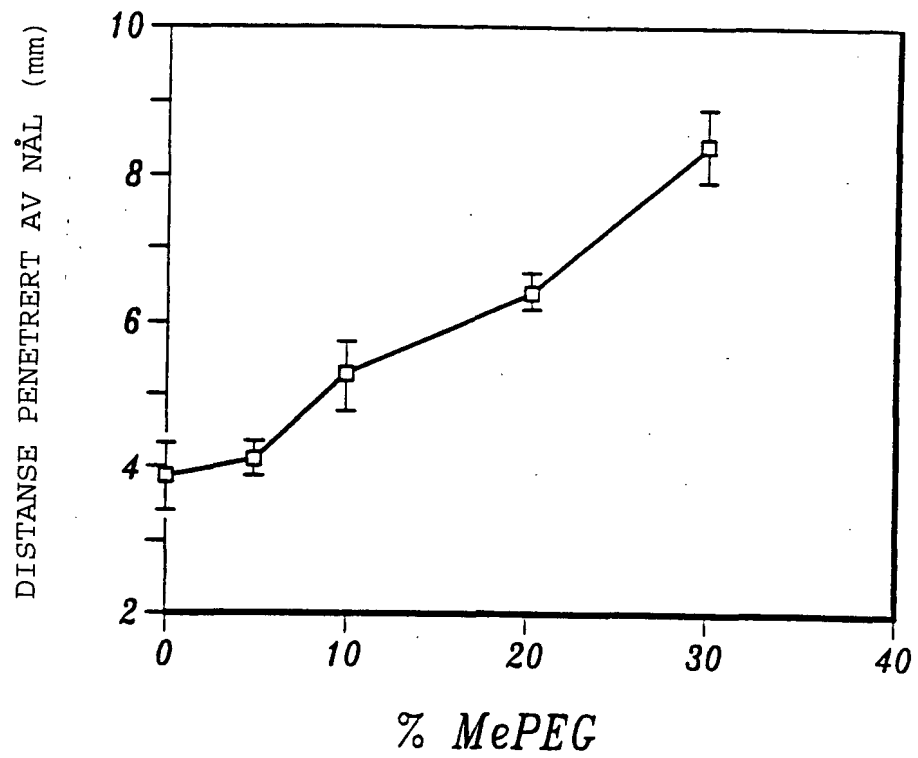


FIG. 18C.

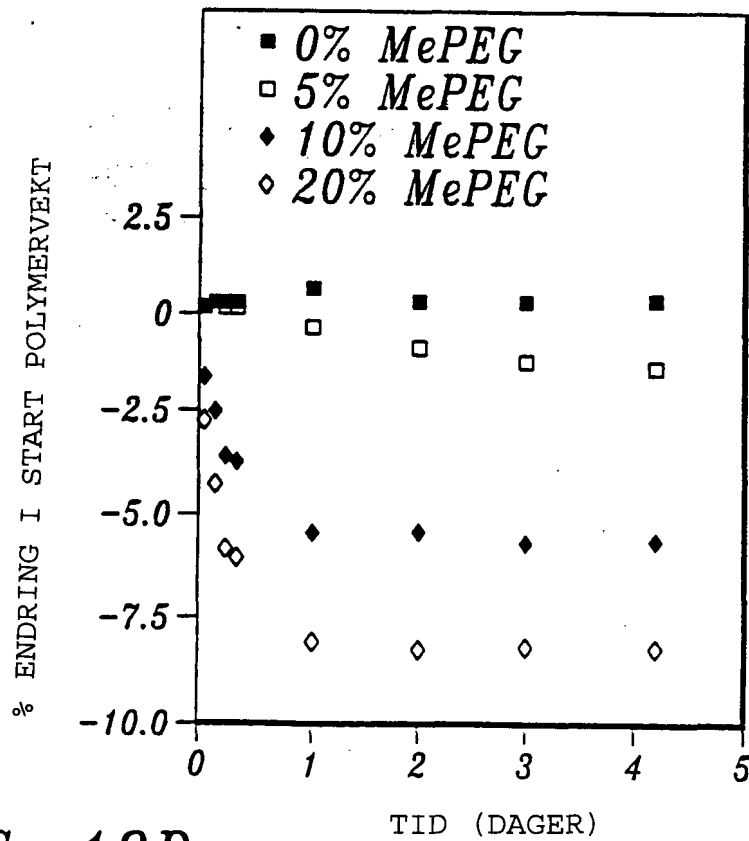
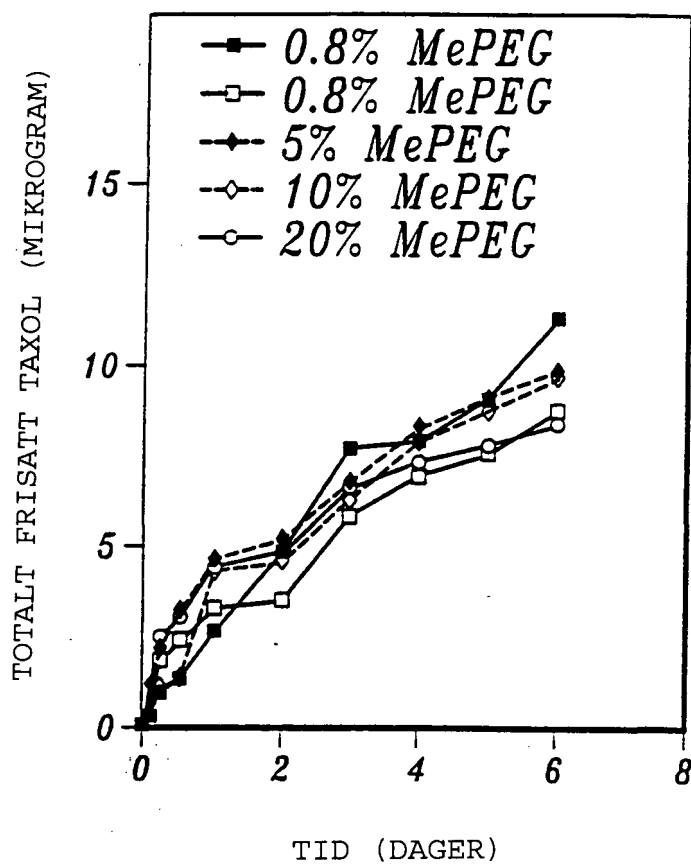


FIG. 18D.

*FIG. 18E.*

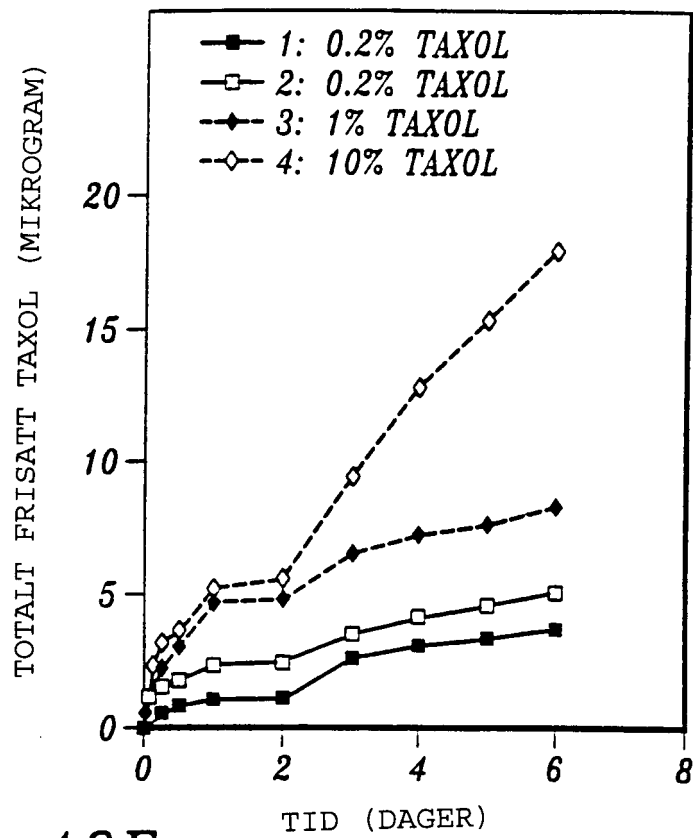


FIG. 18F.

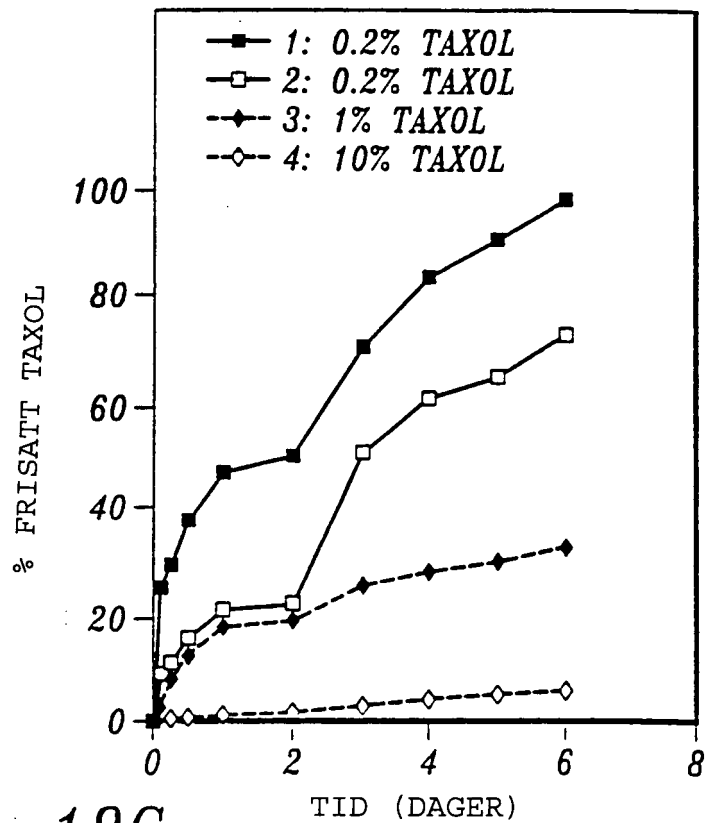


FIG. 18G.

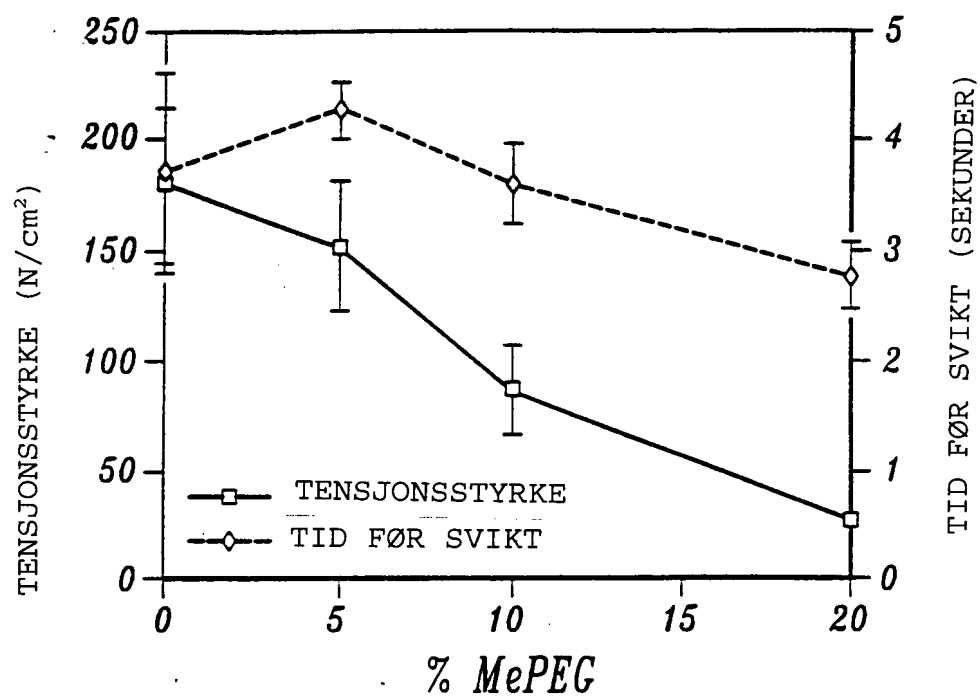
*FIG. 18H.*



FIG. 19A

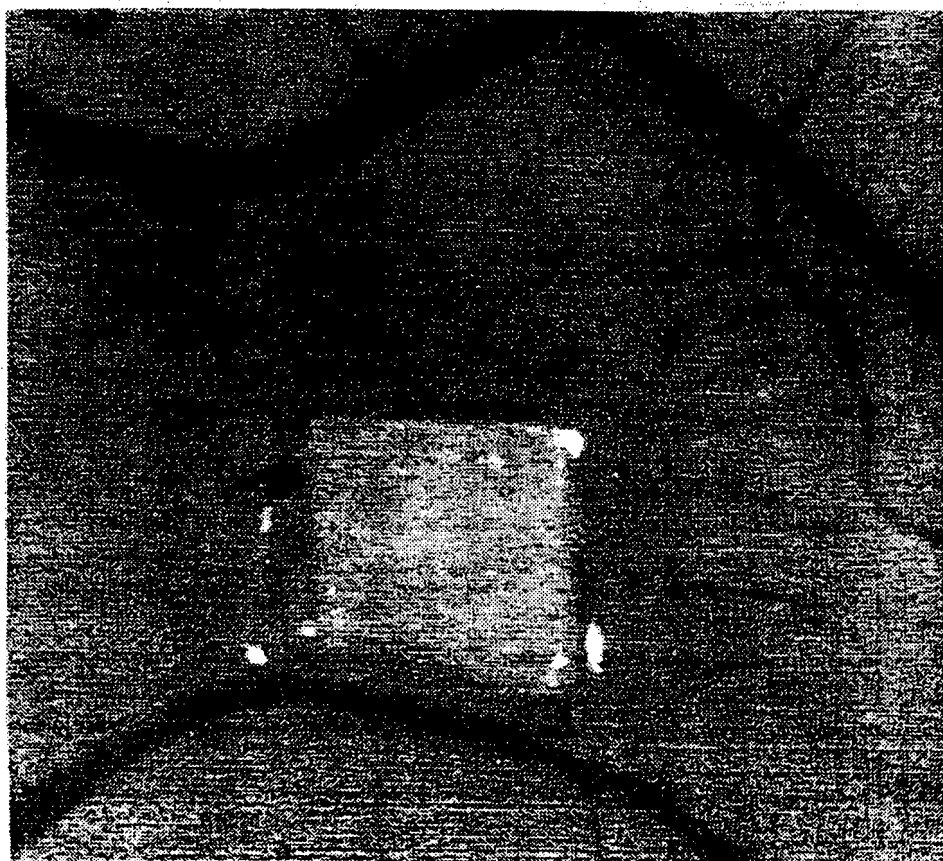


FIG. 19B

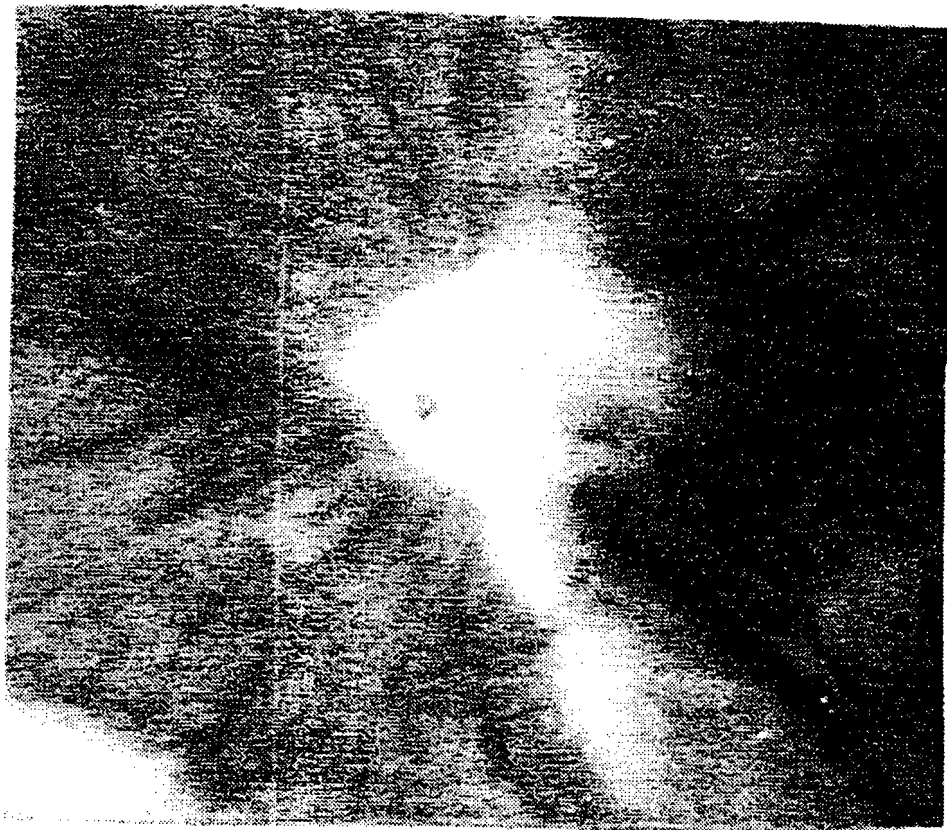


FIG. 20A

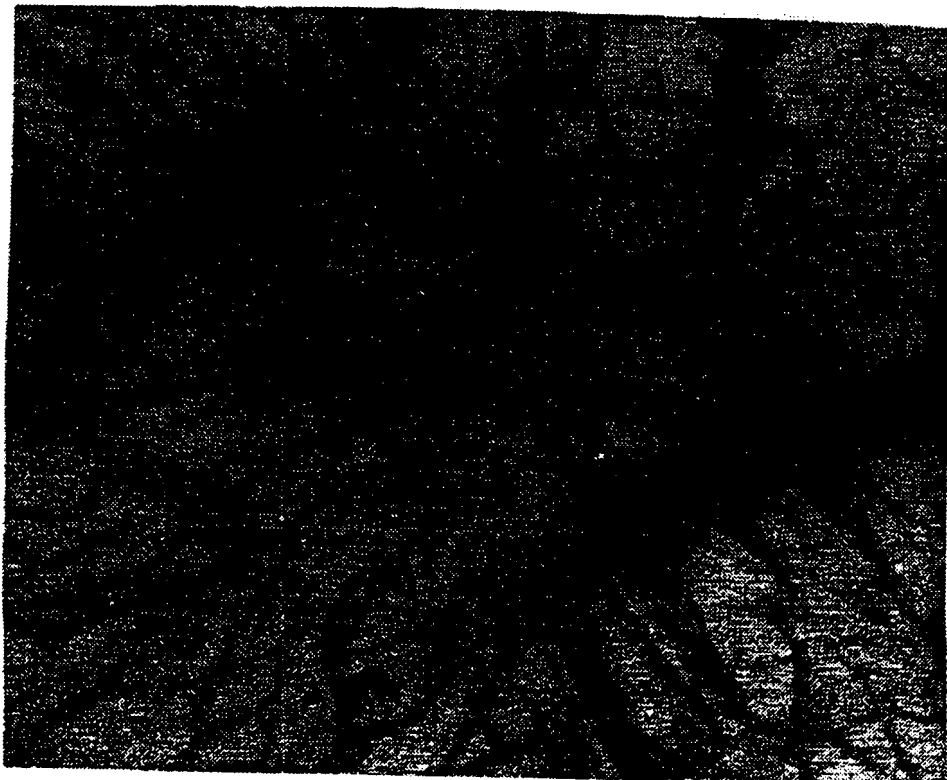


FIG. 20B

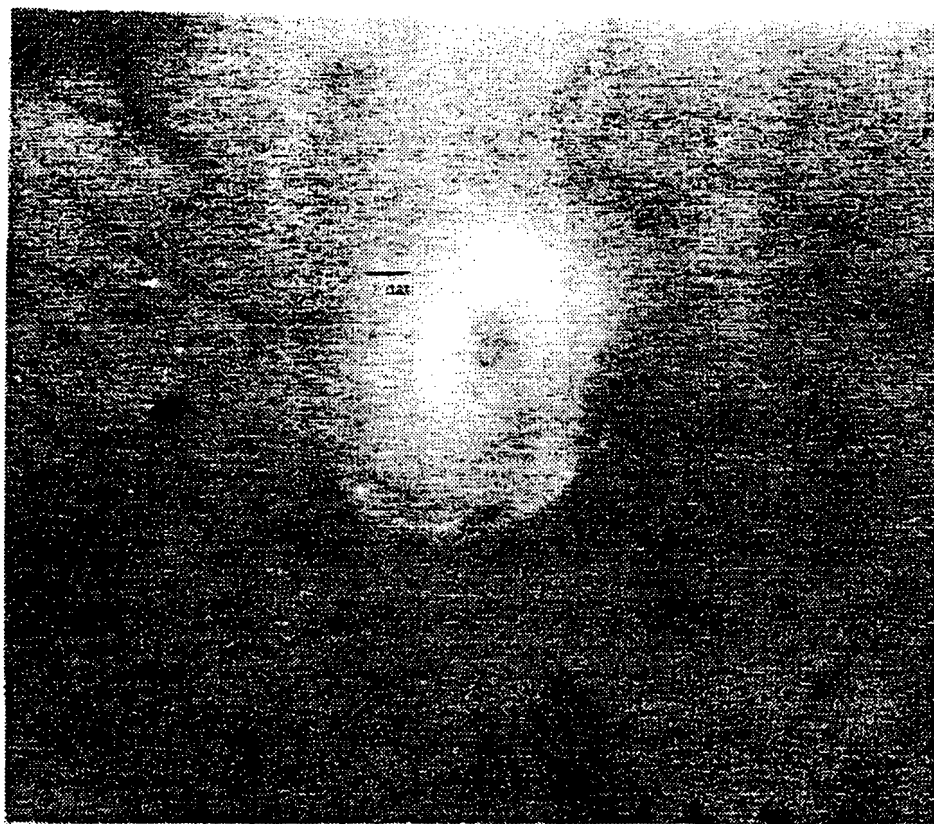


FIG. 20C

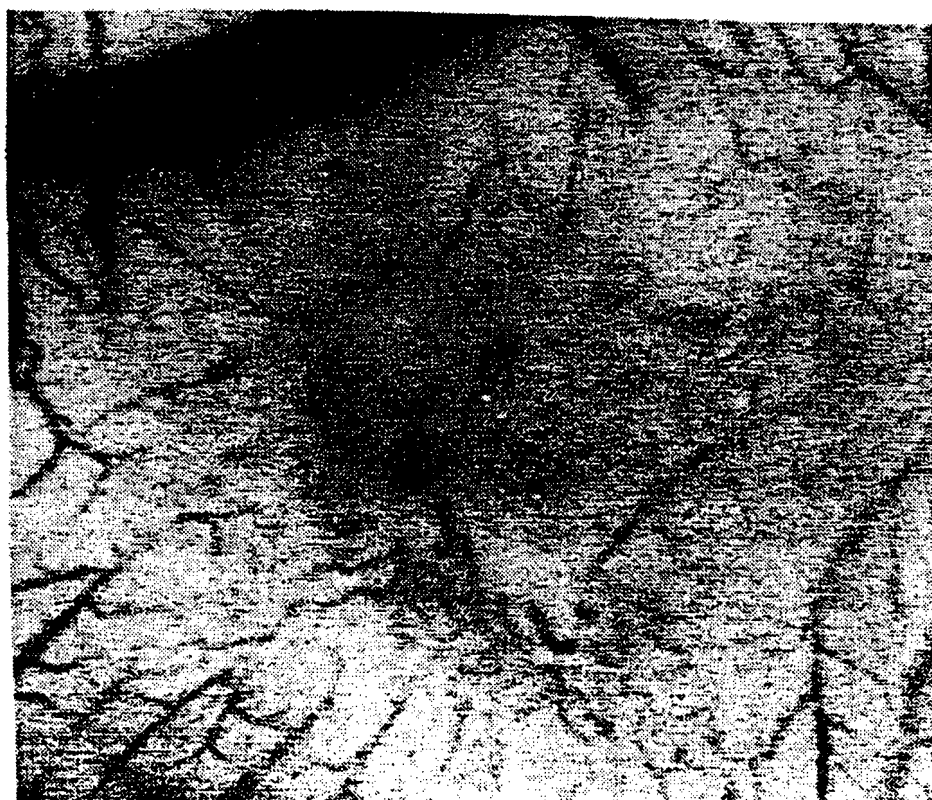
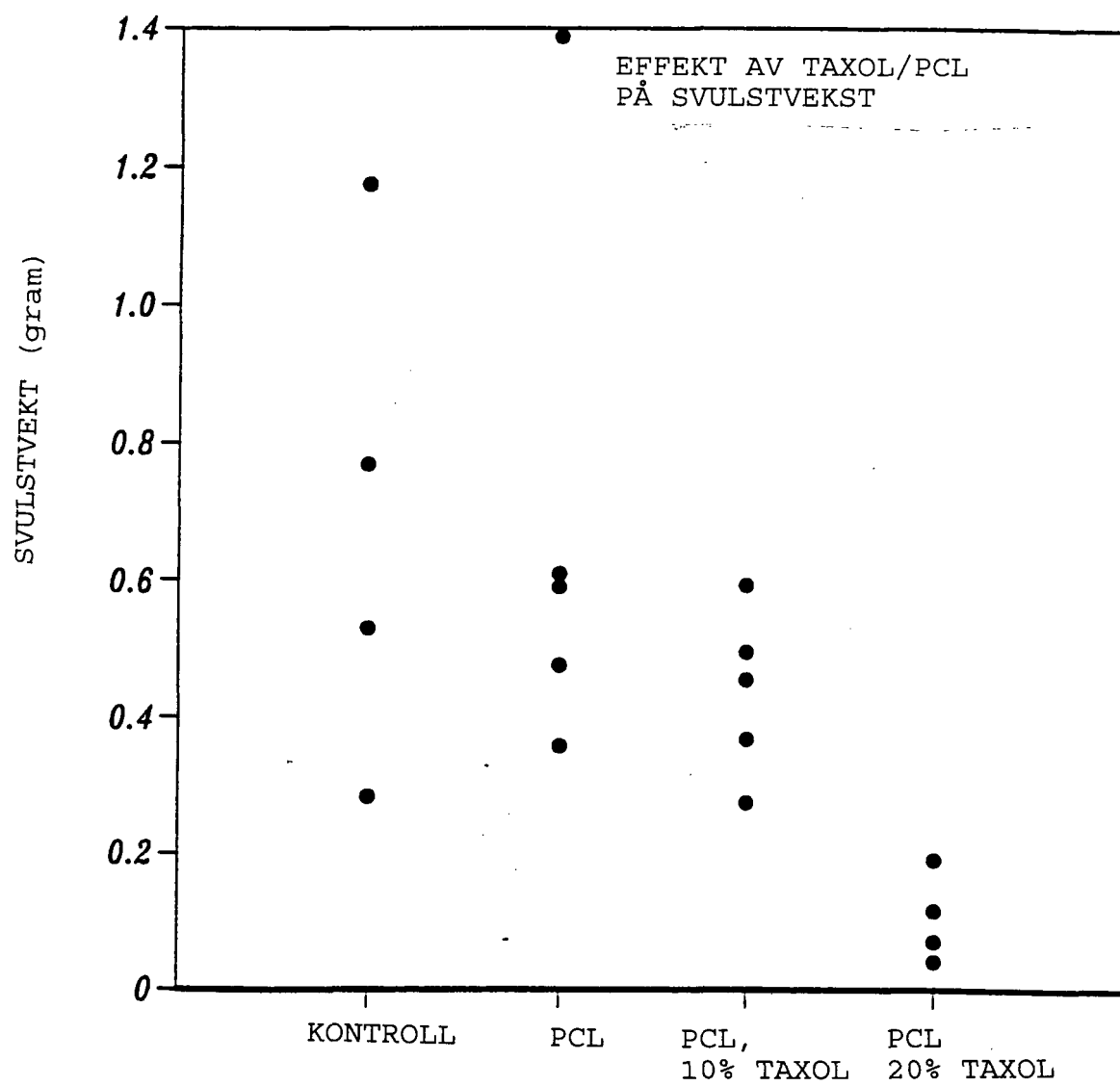
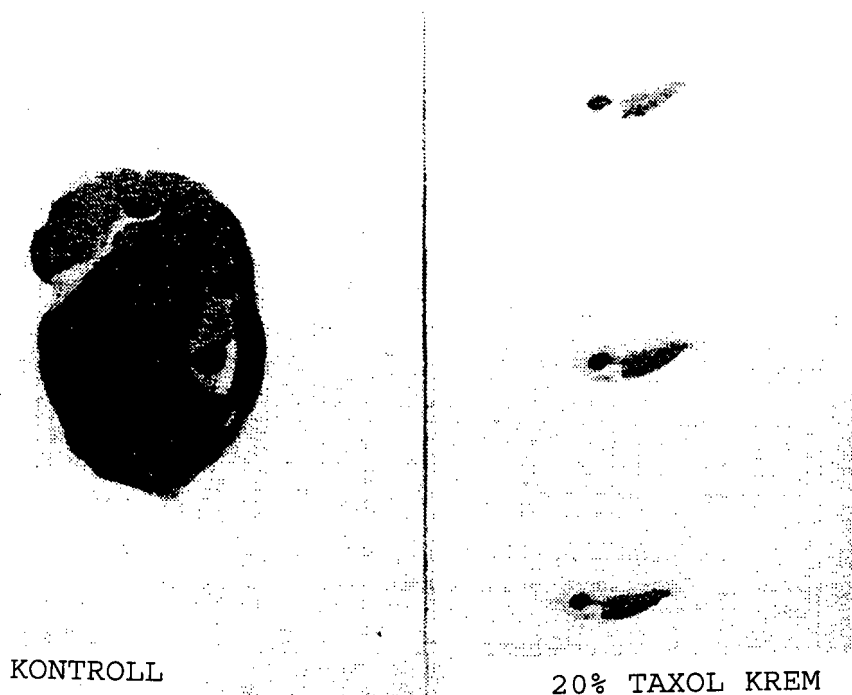


FIG. 20D

*FIG. 21A.*

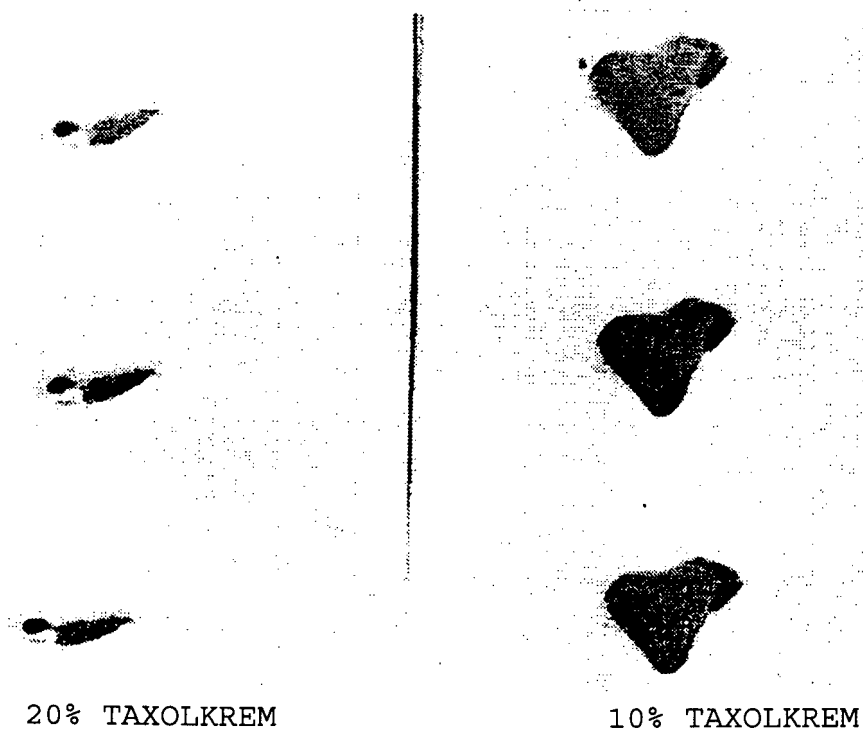


KONTROLL

20% TAXOL KREM

TVERRSNITT AV SVULSTER

FIG. 21B



20% TAXOLKREM

10% TAXOLKREM

TVERRSNITT AV SVULSTER

FIG. 21C



FIG. 22A

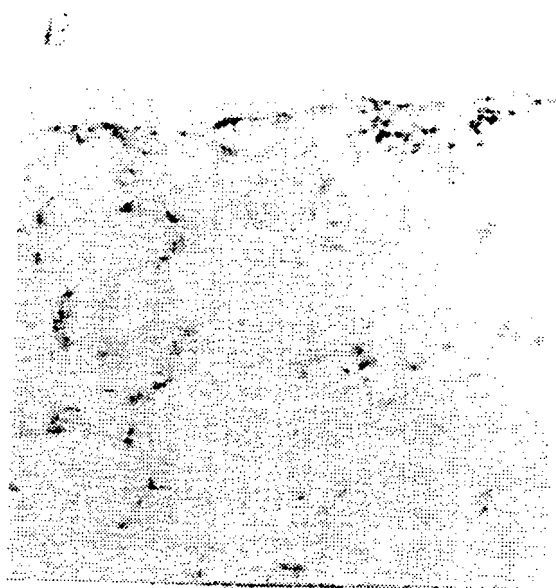


FIG. 22B



FIG. 22C

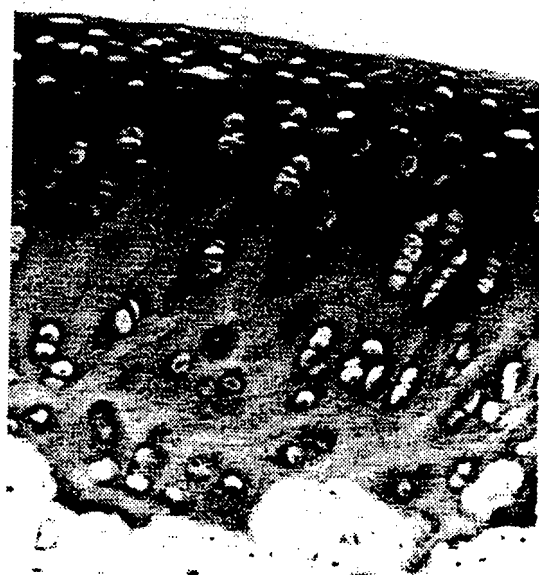


FIG. 22D