



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 21 760 T2 2006.06.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 237 567 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 21 760.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/33220**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 984 018.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/041782**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/21 (2006.01)**

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
200708 P 09.12.1999 US

(73) Patentinhaber:
Chiron Corp., Emeryville, Calif., US

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
FREY, H., William, North Oaks, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG VON WIRKSTOFFEN IN DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM ODER LYMPHSYSTEM**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die medizinische Verwendung von Zytokinen bei der Herstellung eines Medikaments, das dem Zentralnervensystem oder dem lymphatischen System eines Säugetiers zuzuführen ist, wobei das Medikament an ein Gewebe der Nasenhöhle des Säugetiers zu verabreichen ist.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Das Zentralnervensystem (ZNS) umfasst mehrere Gewebe und Organe, wie beispielsweise das Gehirn, den Hirnstamm und das Rückenmark. Jedes dieser Organe und Gewebe besteht aus einer Vielzahl verschiedener Arten von Zellen und subzellulären Strukturen, z.B. Neuronen, Gliazellen, Dendriten, Axonen, Myelin und verschiedenen Membranen. Das ZNS wird von der externen Umgebung durch mehrere Membranen isoliert, welche diese Organe, Gewebe, Zellen und Strukturen sowohl polstern als auch schützen. So schützen zum Beispiel die Membranen, die die Bluthirnschranke bilden, das Gehirn vor bestimmten Bestandteilen des Blutes. Die Blut-Cerebrospinalflüssigkeits-Barriere schützt andere Teile des ZNS vor vielen Chemikalien und Mikroben.

[0003] Bei einigen Substanzen wird der Zugang zum ZNS durch spezialisierte aktive Transportsysteme oder durch passive Diffusion durch die protektive Membran in das ZNS bereitgestellt. Die gegenwärtigen Verfahren der Zuführung erwünschter therapeutischer Mittel zum ZNS sind üblicherweise invasiv. Zum Beispiel kann eine in die Brusthöhle implantierte Pumpe (eine intracerebroventrikuläre Pumpe) dem Gehirn eine Vielzahl nützlicher Stoffe wirksam zuführen. Das Implantieren einer solchen Pumpe erfordert jedoch eine Operation, die eine Vielzahl ernsthafter Komplikationen mit sich bringen kann. Bestimmte Verbindungen (z.B. epidurale Schmerzmittel) können direkt durch die protektive Membran in das ZNS injiziert werden. Eine solche Injektion ist jedoch bei den meisten Medikationen nicht durchführbar. Es werden bessere Verfahren der Verabreichung gewünschter Mittel zum ZNS, Gehirn, Rückenmark sowie zu den lymphatischen Kanälen benötigt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung eines humanen Zytokins oder einer biologischen aktiven Variante desselben bei der Herstellung eines Medikaments, wobei das Zytokin oder die Variante desselben zum Zentralnervensystem oder zum lymphatischen System eines Säugetiers zu transportieren ist, wobei das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem oder das lymphatische System bereitstellt, wobei das Medikament an ein Gewebe der Nasenhöhle des Säugetiers zu verabreichen ist, und wobei das humane Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interleukin, einem humanen Interferon und einem humanen Tumor-Nekrosefaktor, und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70 % Sequenzidentität zu dem humanen Zytokin aufweist.

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines humanen Zytokins oder einer biologischen aktiven Variante desselben bei der Herstellung eines Medikaments, wobei das Zytokin oder die Variante desselben zum Zentralnervensystem oder zum lymphatischen System eines Säugetiers zu transportieren ist, wobei das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem oder das lymphatische System bereitstellt, wobei das Medikament an ein Gewebe des Säugetiers zu verabreichen ist, das vom Nervus trigeminus innerviert ist und sich außerhalb der Nasenhöhle befindet; und wobei das humane Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interleukin, einem humanen Interferon und einem humanen Tumor-Nekrosefaktor, und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70 % Sequenzidentität zu dem humanen Zytokin aufweist.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0006] **Fig. 1** zeigt die Menge an Betaseron im Blutstrom über die Zeit nach sowohl intravenöser Verabreichung (I.V.) als auch intranasaler Verabreichung (I.N.) in einer Ratte.

Arten der Verabreichung

[0007] Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung ist das Zytokin an Gewebe zu verabreichen, das vom Nervus trigeminus und vom Nervus olfactorius (Geruchsnerv) innerviert ist. Solche Nervensysteme können für eine direkte Verbindung zwischen der äußeren Umgebung und dem Gehirn und damit für eine vorteilhafte Zuführung eines Zytokins zum ZNS, einschließlich Gehirn, Hirnstamm und/oder Rückenmark sorgen. Zytokine können die Bluthirnschranke vom Blutstrom ins Gehirn nicht oder nur ineffizient überwinden. Die medizinische Verwendung der vorliegenden Erfindung erlaubt die Zuführung des Zytokins über den Nervus olfactorius und/oder den Nervus trigeminus statt über das Kreislaufsystem. Dieses Verabreichungsverfahren erlaubt die wirksame Zuführung eines Zytokins zum Gehirn, Hirnstamm oder Rückenmark.

Der Geruchsnerv (Nervus olfactorius)

[0008] Die erfindungsgemäße medizinische Verwendung umfasst die Verabreichung eines Zytokins an ein Gewebe, das vom Nervus olfactorius innerviert ist. Vorzugsweise wird das Zytokin dem olfaktorischen Bereich im oberen Drittel der Nasenhöhle und insbesondere dem olfaktorischen Epithel zugeführt.

[0009] Fasern des Nervus olfactorius sind nicht myelinisierte Axone olfaktorischer Rezeptorzellen, die im oberen Drittel der nasalen Mukosa lokalisiert sind. Die olfaktorischen Rezeptorzellen sind bipolare Neurone mit Schwellungen, die von haar-ähnlichen Zilien bedeckt sind, welche in die Nasenhöhle hineinragen. Am anderen Ende sammeln sich Axone dieser Zellen zu Aggregaten und treten am Nasendach in die Cavitas cranii ein. Von einem dünnen Schlauch Pia mater umhüllt, durchqueren die Nervi olfactorii den Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) enthaltenden subarachnoidalen Raum und treten in die unteren Teile der Riechkolben ein. Sobald das Zytokin in der Nasenhöhle verteilt ist, kann das Zytokin einem Transport durch die Nasenmukosa in den Riechkolben und miteinander verbundene Bereiche des Gehirns, wie z.B. Hippokampus, Mandelkerne, Meynert'schen Nukleus basalis, Locus ceruleus, Hirnstamm u.ä., unterliegen.

Der Nervus trigeminus

[0010] Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung ist das Zytokin an Gewebe zu verabreichen, das vom Nervus trigeminus innerviert ist. Der Nervus trigeminus innerviert Gewebe des Kopfes eines Säugtiers (z.B. eines Menschen), einschließlich der Haut des Gesichts und der Kopfhaut, oraler Gewebe und Gewebe des Auges sowie das Auge umgebende Gewebe. Der Nervus trigeminus hat drei Hauptäste, den Nervus ophthalmicus, den Nervus maxillaris und den Nervus mandibularis. Das erfindungsgemäße Verfahren kann das Zytokin an Gewebe verabreichen, das von einem oder mehreren dieser Äste innerviert ist.

Der Nervus ophthalmicus und seine Äste

[0011] Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, das vom Nervus ophthalmicus-Ast des Nervus trigeminus innerviert ist. Der Nervus ophthalmicus innerviert Gewebe, einschließlich oberflächlicher und tiefliegender Teile des oberen Bereichs des Gesichts, wie das Auge, die Tränendrüse, die Konjunktiva und die Kopfhaut, der Stirn, des oberen Augenlids und der Nase.

[0012] Der Nervus ophthalmicus hat drei Äste, die als Nervus nasociliaris, als Nervus frontalis und Nervus lacrimalis bekannt sind. Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, das von einem oder mehreren der Äste des Nervus ophthalmicus innerviert ist. Der Nervus frontalis und seine Äste innervieren Gewebe einschließlich des oberen Augenlids, der Kopfhaut, insbesondere der Vorderseite der Kopfhaut und der Stirn, insbesondere des mittleren Teils der Stirn. Der Nervus nasociliaris bildet mehrere Äste, einschließlich der Nervi ciliares longi, der Ganglion-Äste, der Nervi ethmoidales und des Nervus infratrochlearis. Die Nervi ciliares longi innervieren Gewebe einschließlich des Auges. Die Nervi ethmoidales posteriores und anteriores innervieren Gewebe einschließlich des Sinus ethmoidalis und der unteren Zweidrittel der Nasenhöhle. Der Nervus infratrochlearis innerviert Gewebe einschließlich des oberen Augenlids und des Tränensacks. Der Nervus lacrimalis innerviert Gewebe einschließlich der Tränendrüse, der Konjunktiva und des oberen Augenlides. Vorzugsweise verabreicht das vorliegende Verfahren das Zytokin an den Nervus ethmoidalis.

Der Nervus maxillaris und seine Äste

[0013] Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, das vom Nervus maxillaris-Ast des Nervus trigeminus innerviert ist. Der Nervus maxillaris innerviert Gewebe einschließlich der Wurzeln mehrerer Zähne und Haut des Gesichts, wie die Haut auf der Nase, der oberen Lippe, dem unteren Augenlid, über dem Jochbein (Os zygomaticum), über dem Schläfenbereich. Der Nervus maxillaris hat Äste einschließlich des Nervus infraorbitalis, des Nervus zygomaticus facialis, des Nervus zygomaticus temporalis, des Nervus nasopalatinus, des Nervus palatinus major, der Nervi alveolares superiores posteriores, des mittleren Nervus alveolaris superioris und des Nervus alveolaris superioris interioris. Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, das von einem oder mehreren der Äste des Nervus maxillaris innerviert ist.

[0014] Der Nervus infraorbitalis innerviert Gewebe einschließlich der Haut auf der lateralen Seite der Nase, der Oberlippe und des unteren Augenlids. Der Nervus zygomaticus facialis innerviert Gewebe einschließlich der Haut des Gesichts über dem Os zygomaticum (Jochbein). Der Nervus zygomaticus temporalis innerviert Gewebe einschließlich der Haut über der Schläfenregion. Die Nervi alveolares superiores posteriores innervieren Gewebe einschließlich des Sinus maxillaris und der Wurzeln der Oberkiefer-Backenzähne. Der mittlere Nervus alveolaris superioris innerviert Gewebe einschließlich der Mukosa des Sinus maxillaris, der Wurzeln der vorderen Oberkiefer-Backenzähne und der mesiobukkalen Wurzel des ersten Backenzahns. Der Nervus alveolaris superioris anterioris innerviert Gewebe einschließlich des Sinus maxillaris, der Nasenscheidewand und der Wurzeln der zentralen und seitlichen Oberkiefer-Schneidezähne und Eckzähne. Der Nervus nasopalatinus innerviert Gewebe einschließlich der Nasenscheidewand. Der Nervus palatinus major innerviert Gewebe einschließlich der seitlichen Wand der Nasenhöhle. Vorzugsweise ist das Zytokin an den Nervus nasopalatinus und/oder Nervus palatinus major zu verabreichen.

Der Nervus mandibularis und seine Äste

[0015] Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, das vom Nervus mandibularis-Ast des Nervus trigeminus innerviert ist. Der Nervus mandibularis innerviert Gewebe einschließlich der Zähne, des Zahnfleischs, des Bodens der Mundhöhle, der Zunge, der Wange, des Kinns, der Unterlippe, Gewebe im Ohr und um das Ohr, der Kaumuskeln und Haut einschließlich der Schläfenregion, des seitlichen Teils der Kopfhaut und eines Großteils des unteren Teils des Gesichts.

[0016] Der Nervus mandibularis hat Äste einschließlich des Nervus buccalis, des Nervus auriculotemporalis, des Nervus alveolaris inferior und des Nervus lingualis. Bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung kann das Zytokin an einen oder mehrere Äste des Nervus mandibularis verabreicht werden. Der Nervus buccalis innerviert Gewebe einschließlich der Wange, insbesondere die Haut der Wange über dem Wangenmuskel und der die Wange auskleidenden Schleimhaut, und die wangenseitigen Unterkiefer-Gingiva (Zahnfleisch), insbesondere den hinteren Teil der Wangenoberfläche der Gingiva. Der Nervus auriculotemporalis innerviert Gewebe einschließlich der Auricula, des äußeren Gehörganges, die Mittelohrmembran (Trommelfell) und Haut in der Schläfenregion, insbesondere die Haut der Schläfe und den seitlichen Teil der Kopfhaut. Der Nervus alveolaris inferior innerviert Gewebe einschließlich der Unterkiefer-Zähne, insbesondere der Schneidezähne, die an die Schneidezähne grenzende Gingiva, die Mukosa der Unterlippe, die Haut des Kinns, die Haut der Unterlippe und die Lippen-Unterkiefer-Gingiva. Der Nervus lingualis innerviert Gewebe einschließlich der Zunge, insbesondere die vorderen Zweidrittel der Zunge, den Boden des Mundes, und die Gingiva der Unterkiefer-Zähne. Vorzugsweise ist das Zytokin bei der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung an einen oder mehrere von dem Nervus alveolaris inferior, dem Nervus buccalis und/oder dem Nervus lingualis zu verabreichen.

Von dem Nervus trigeminus innervierte Gewebe

[0017] Das Zytokin kann an jedes aus einer Vielzahl von Geweben, die vom Nervus trigeminus innerviert sind, verabreicht werden, z.B. an Haut, Epithel oder Mukosa des Gesichts oder um das Gesicht, an das Auge, die Mundhöhle, die Nasenhöhle, die Sinushöhlen oder das Ohr.

[0018] Vorzugsweise ist das Zytokin an Haut zu verabreichen, die vom Nervus trigeminus innerviert ist, z.B. Haut des Gesichts, der Kopfhaut oder des Schläfenbereichs. Geeignete Haut des Gesichts umfasst Haut des Kinns; der Oberlippe, der Unterlippe; der Stirn, insbesondere des mittleren Teils der Stirn; der Nase, einschließlich der Nasenspitze, des Nasenrückens und des seitlichen Teils der Nase; der Wange, insbesondere der Haut der Wange über dem Wangenmuskel oder Haut über dem Wangenbein; Haut um das Auge, insbesondere das

obere Augenlid und das untere Augenlid oder eine Kombination derselben. Geeignete Kopfhaut umfasst die Vorderseite der Kopfhaut, Kopfhaut über dem Schläfenbereich, den seitlichen Teil der Kopfhaut oder eine Kombination derselben. Geeignete Haut des Schläfenbereiches umfasst die Schläfe und die Kopfhaut über dem Schläfenbereich.

[0019] Vorzugsweise ist das Zytokin an Mukosa oder Epithel, das vom Nervus trigeminus innerviert ist, zu verabreichen, z.B. Mukosa oder Epithel vom oder um das Auge, wie Mukosa oder Epithel des oberen Augenlids, des unteren Augenlids, der Konjunktiva, des Tränensystems oder eine Kombination derselben. Das Zytokin kann auch an Mukosa oder Epithel der Sinushöhlen und/oder Nasenhöhle, wie der unteren Zweidrittel der Nasenhöhle und der Nasenscheidewand, verabreicht werden. Das Zytokin kann auch an Mukosa oder Epithel der Mundhöhle verabreicht werden, wie Mukosa oder Epithel der Zunge, insbesondere der vorderen Zweidrittel der Zunge und unter der Zunge; der Wange; der Unterlippe; der Oberlippe; des Bodens der Mundhöhle; der Gingiva (Zahnfleisch), insbesondere der Gingiva neben den Schneidezähnen, die Lippen-Unterkiefer-Gingiva und die Gingiva der Unterkiefer-Zähne oder eine Kombination davon. Vorzugsweise ist das Zytokin an Mukosa oder Epithel der Nasenhöhle zu verabreichen. Andere bevorzugte Bereiche der Mukosa oder des Epithels zur Verabreichung des Zytokins umfassen die Zunge, insbesondere sublinguale Mukosa oder Epithel, die Konjunktiva, das Tränensystem, insbesondere den Augenlid-Teil der Tränendrüse und die Ducti lacrimales, die Mukosa des unteren Augenlids, die Mukosa der Wange oder eine Kombination derselben.

[0020] Vorzugsweise ist das Zytokin an nasale Gewebe zu verabreichen, die vom Nervus trigeminus innerviert sind, z.B. nasale Gewebe einschließlich des Sinus, der unteren Zweidrittel der Nasenhöhle und der Nasenscheidewand. Vorzugsweise umfassen die nasalen Gewebe für die Verabreichung des Zytokins die unteren Zweidrittel der Nasenhöhle und die Nasenscheidewand.

[0021] Vorzugsweise ist das Zytokin an orale Gewebe zu verabreichen, die vom Nerv trigeminus innerviert sind, z.B. orale Gewebe wie die Zähne, das Zahnfleisch, der Boden der Mundhöhle, die Wangen, die Lippen, die Zunge, insbesondere die vorderen Zweidrittel der Zunge oder eine Kombination derselben. Geeignete Zähne umfassen Unterkiefer-Zähne, wie die Schneidezähne. Geeignete Teile der Zähne umfassen die Wurzeln mehrerer Zähne, wie die Wurzeln der Oberkiefer-Backenzähne, der vorderen Oberkiefer-Backenzähne, der zentralen und seitlichen Oberkiefer-Schneidezähne, der Eckzähne und die mesiobukkale Wurzel des ersten Backenzahns oder eine Kombination derselben. Geeignete Teile der Lippen umfassen Haut und Mukosa der Ober- und Unterlippen. Geeignetes Zahnfleisch umfassen die Gingiva, die an die Schneidezähne grenzt, und die Gingiva der Unterkiefer-Zähne, wie die Lippen-Unterkiefer-Gingiva oder eine Kombination derselben. Geeignete Teile der Wange umfassen die Haut der Wange über dem Wangenmuskel, die die Wange auskleidende Schleimhaut, und die Unterkiefer-Wangengingiva (Zahnfleisch), insbesondere den hinteren Teil der wangen-seitigen Oberfläche der Gingiva, oder eine Kombination derselben. Das bevorzugte orale Gewebe zur Verabreichung des Zytokins umfasst die Zunge, insbesondere sublinguale Mukosa oder Epithel, die Mukosa innerhalb der Unterlippe, die Mukosa der Wange oder eine Kombination derselben.

[0022] Vorzugsweise ist das Zytokin an ein Gewebe des Auges oder an ein Gewebe um das Auge zu verabreichen, das vom Nervus trigeminus innerviert ist. Zum Beispiel kann das Zytokin an Gewebe einschließlich des Auges, der Konjunktiva und der Tränendrüse einschließlich des Tränensacks, der Haut oder Mukosa des oberen oder unteren Augenlids oder einer Kombination derselben verabreicht werden. Bevorzugte Gewebe des Auges oder Gewebe um das Auge zur Verabreichung des Zytokins umfassen die Konjunktiva, das Tränensystem, die Haut oder Mukosa des Augenlids oder eine Kombination derselben. Zytokin, das über die Konjunktiva verabreicht wird, aber nicht durch die Mukosa der Konjunktiva absorbiert wird, kann durch nasolachrimale Tränen gänge in die Nase fließen, wo es zum ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark transportiert werden kann, als ob es intranasal verabreicht worden wäre.

[0023] Vorzugsweise ist das Zytokin an ein Gewebe des Ohrs oder an ein Gewebe um das Ohr zu verabreichen, das vom Nervus trigeminus innerviert ist, z.B. kann das Zytokin an Gewebe verabreicht werden, einschließlich der Auricula, des äußeren Gehörgangs, der Mittelohrmembran (Trommelfell) und der Haut im Schläfenbereich, insbesondere der Haut der Schläfe und des seitlichen Teils der Kopfhaut oder eine Kombination derselben. Bevorzugtes Gewebe des Ohrs oder Gewebe um das Ohr zur Verabreichung des Zytokins umfasst die Haut der Schläfe.

Zytokine

[0024] Erfindungsgemäß können die Zytokine an das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark verabreicht werden. Die Zytokine, die durch die erfindungsgemäße medizinische Verwendung verabreicht werden können,

sind Zytokine, die Immunmodulatoren, Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 und IL-10), Interferone und Tumor-Nekrosefaktor (z.B. TNF- α und TNF- β) sind, und die auf Zellen des Immunsystems gerichtete Aktivitäten aufweisen. Diese Zytokine sind als therapeutische Zytokine von Interesse, z.B. zur Behandlung viraler Erkrankungen und zur Kontrolle von Krebs. Es wird angenommen, dass nicht beobachtet wurde, dass solche Zytokine neurotrophe Aktivität oder andere direkte, günstige Wirkungen auf Neuronen aufweisen, die für den Nervenwachstumsfaktor und ähnliche Verbindungen typisch sind. Es wurde daher nicht erwartet, dass solche Zytokine in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark transportiert werden sollten, insbesondere nicht über einen neuralen Weg oder ausgehend von Geweben, die vom Nervus olfactorius oder vom Nervus trigeminus innerviert sind.

[0025] Ein bevorzugtes Zytokin zur Verwendung bei der Ausführung der Erfindung ist Mitglied der Interferon-Familie. Interferone (IFNs) sind eine Familie von Molekülen, die über 20 verschiedene Proteine umfassen und Mitglieder der Zytokinfamilie sind, die antivirale, antiproliferative, Antitumor- und/oder Zytokinwirkungen induzieren. IFNs sind relativ kleine, Speziespezifische, einzelkettige Polypeptide, die als Antwort auf eine Vielzahl von induzierenden Substanzen, wie Mitogene, Polypeptide, Viren u.ä. produziert werden. Bei Menschen werden Interferone in den Formen α , β , γ , ω und τ produziert. Synthetische Interferone sind im Stand der Technik ebenfalls bekannt. Siehe beispielsweise 6,114,145, die durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Bei der Sekretion durch Säugetierzellen binden Interferonmoleküle an einen Rezeptor auf der Oberfläche einer Zielzelle und lösen eine Kette von Ereignissen aus, die die Menge und Aktivität von Protein in der Zielzelle ändern können. Solche Änderungen können z.B. Änderungen der Gentranskription oder der enzymatischen Aktivität einschließen. Ein bevorzugtes Interferon zur Verwendung der Durchführung der Erfindung ist Interferon- β (IFN- β), Interferon- α (IFN- α) und Interferon- γ (IFN- γ).

[0026] Biologisch aktive Varianten von Zytokinen sind von der erfindungsgemäßen Verwendung ebenfalls erfasst. Solche Varianten sollten die biologische Aktivität des Zytokins beibehalten. Wenn das Zytokin beispielsweise ein Interferon, wie IFN- α , IFN- β , IFN- γ , ist, wird die Fähigkeit, ihre jeweiligen Rezeptorstellen zu binden, beibehalten werden. Solche Aktivität kann unter Verwendung von Standard-Bioassays gemessen werden. Repräsentative Assays, die die Fähigkeit der Variante nachweisen, mit einem Interferonrezeptor vom Typ 1 zu interagieren, können z.B. in US-Patent Nr. 5,766,864 gefunden werden. Vorzugsweise weist die Variante mindestens die gleiche Aktivität wie das native Molekül auf. Alternativ dazu kann die biologische Aktivität einer Variante des erfindungsgemäßen Zytokins durch Messung der Fähigkeit der Variante, die virale Resistenz einer Zelllinie unter Verwendung eines Standard-Virusreduktionsassays zu erhöhen, getestet werden. Siehe z.B. US-Patent Nr. 5,770,191. Andere Assays für die biologische Aktivität umfassen antiproliferative Assays, wie sie in US-Patent Nr. 5,690,925 beschrieben sind.

[0027] Geeignete biologisch aktive Varianten können Fragmente, Analoge und Derivate der Zytokin-Polypeptide sein. Mit "Fragment" ist ein Protein gemeint, das nur aus einem Teil der intakten Zytokin-Polypeptidsequenz besteht. Das Fragment kann eine C-terminale Deletion oder eine N-terminale Deletion des Zytokin-Polypeptids sein. Mit "Analog" ist ein Analog von entweder dem Polypeptid vollständiger Länge mit biologischer Aktivität oder einem Fragment desselben gemeint, das eine native Sequenz und Struktur mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen, -Insertionen oder -Deletionen aufweist. Peptide mit einem oder mehreren Peptiden (Peptidmimetika) sind ebenfalls von dem Begriff analog umfasst (siehe z.B. Internationale Publikationsnummer WO 91/04282). Mit "Derivat" ist jede geeignete Modifikation des nativen Polypeptids oder Fragmenten desselben oder ihre jeweiligen Analoga gemeint, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und andere Hinzufügung fremder Gruppen, solange die Aktivität beibehalten wird.

[0028] Vorzugsweise weisen natürliche oder nicht natürlich vorkommende Varianten eines Zytokins Aminosäuresequenzen auf, die mindestens zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, mehr bevorzugt zu 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % oder 95 % identisch mit der Aminosäuresequenz des Referenzmoleküls, z.B. des nativen humanen Interferons, oder mit einem kleineren Teils des Referenz-Interferonmoleküls sind. Mehr bevorzugt sind die Moleküle zu 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % identisch. Der Prozentsatz der Sequenzidentität wird unter Verwendung des Smith-Waterman-Homologiesuchalgorithmus bestimmt, wobei eine affine Lückensuche mit einer Strafe für Lückenöffnung von 12 und einer Strafe für Lückenerweiterung von 2 verwendet wird, BLOSUM-Matrix von 62. Der Smith-Waterman-Homologiesuchalgorithmus wird in Smith und Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489 beschrieben.

[0029] Eine Variante kann beispielsweise in nur 1 bis 10 Aminosäureresten (wie 6 bis 10), in nur 5, in nur 4, 3, 2 oder sogar nur in 1 Aminosäurerest abweichen.

[0030] In Bezug auf die optimale Gegenüberstellung von zwei Aminosäuresequenzen kann der zusammen-

hängende Teil der Aminosäuresequenz der Variante in Bezug auf die Referenzamino-säuresequenz zusätzliche Aminosäurereste oder deletierte Aminosäurereste aufweisen. Der zusammenhängende Teil, der zum Vergleich mit der Referenzamino-säuresequenz verwendet wird, wird mindestens 20 zusammenhängende Aminosäurereste einschließen und kann 30, 40, 50 oder mehr Aminosäurereste aufweisen. Es können Korrekturen zum Zwecke der Sequenzidentität durchgeführt werden, die mit konservativen Substitutionen von Resten oder Lücken assoziiert sind (siehe Smith-Waterman-Homologiesuchalgorithmus).

[0031] Wie weiter unten diskutiert wird, stellt der Stand der Technik wesentliche Anleitung bezüglich der Herstellung und Verwendung solcher Varianten bereit. Ein Fragment eines Zytokin-Polypeptids wird normalerweise mindestens etwa 10 zusammenhängende Aminosäurereste des Moleküls vollständiger Länge umfassen, bevorzugt etwa 15 bis 25 zusammenhängende Aminosäurereste des Moleküls vollständiger Länge und am meisten bevorzugt etwa 20 bis 50 oder mehr zusammenhängende Aminosäurereste des Zytokin-Polypeptids vollständiger Länge.

[0032] Konservative Aminosäuresubstitutionen können beispielsweise an einem oder mehreren vorhergesagten, vorzugsweise nichtessentiellen Aminosäureresten durchgeführt werden. Ein "nichtessentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der ausgehend von der Wildtyp-Sequenz eines Zytokins, wie eines Interferons (z.B. IFN- α , IFN- β oder IFN- γ) geändert werden kann, ohne dessen biologische Aktivität zu verändern, während ein "essentieller" Aminosäurerest für die biologische Aktivität erforderlich ist. Eine "konservative Aminosäuresubstitution" ist eine Substitution, in der der Aminosäurerest durch einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ersetzt wird. Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten sind im Stand der Technik definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), nichtpolaren Seitenketten (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Solche Substitutionen würden nicht bei konservierten Aminosäureresten oder bei Aminosäureresten, die sich in einem konservierten Motiv befinden, durchgeführt werden.

[0033] Alternativ dazu können Nukleotidsequenzen von Zytokin-Varianten hergestellt werden, indem Mutationen zufällig entlang des gesamten oder eines Teils einer für ein Zytokin kodierenden Sequenz eingefügt werden, z.B. durch Sättigungs-Mutagenese, und die erhaltenen Mutanten können auf biologische Zytokin-Aktivität gescreent werden, um Mutanten zu identifizieren, die Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann unter Verwendung von Standardassay-Techniken, die vorliegend beschrieben werden, bestimmt werden.

[0034] Alternativ dazu kann das Zytokin chemisch mittels einer von mehreren Techniken, die Fachleuten auf dem Gebiet der Peptide bekannt sind, synthetisiert werden. Siehe z.B. Li et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2216-2220, Steward und Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) und Baraney und Merrifield (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Hrsg. Gross und Meinhofer, Band 2 (Academic Press, New York, 1980) Seiten 3-254, die Festphasepeptidsynthese-Techniken diskutieren; und Bodansky (1984) Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Berlin) und Gross und Meinhofer, Hrsg. (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Band 1, (Academic Press, New York), die klassische Synthese in Lösung diskutieren. Das Zytokin kann auch chemisch durch das Verfahren simultaner, multipler Peptidsynthese hergestellt werden. Siehe z.B. Houghten (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 und US-Patent Nr. 4,631,211.

[0035] Das erfindungsgemäß verwendete Zytokin kann von jeder Tierspezies stammen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Vogel, Hund, Rind, Schwein, Pferd und Mensch. Wenn das Zytokin bei der Behandlung einer Säugetier-viralen, immunmodulatorischen oder neurologischen Erkrankung des ZNS, Gehirns oder Rückenmarks verwendet werden soll, stammt das Zytokin bevorzugt von einer Säugetierspezies, und mehr bevorzugt von einem Säugetier der gleichen Spezies wie das Säugetier, das einer Behandlung wegen einer solchen Erkrankung unterzogen wird.

Interferon- β

[0036] Die Bezeichnung "IFN- β " bezieht sich wie vorliegend verwendet auf IFN- β oder Varianten desselben, die manchmal als IFN- β -ähnliche Polypeptide bezeichnet werden. Humane IFN- β -Varianten, die natürlich vorkommen (z.B. allelische Varianten, die an dem IFN- β Locus vorkommen) oder rekombinant hergestellt sein können, weisen Aminosäuresequenzen auf, die zu der reifen nativen IFN- β -Sequenz gleich, ähnlich oder im

Wesentlichen ähnlich sind. DNA-Sequenzen, die humanes IFN- β kodieren, sind im Stand der Technik ebenfalls verfügbar. Siehe z.B. Goeddel et al. (1980) *Nucleic Acid Res.* 8:4057 und Tanigachi et al. (1979) *Proc. Japan Acad. Sci.* 855:464. Fragmente von IFN- β oder trunkierte Formen von IFN- β , die ihre Aktivität beibehalten, sind ebenfalls eingeschlossen. Diese biologisch aktiven Fragmente oder trunkierten Formen von IFN- β werden hergestellt, indem man Aminosäurereste von der IFN- β -Aminosäuresequenz vollständiger Länge entfernt, wobei man im Stand der Technik hinlänglich bekannte rekombinante DNA-Verfahren verwendet. IFN- β -Polypeptide können glykosyliert oder unglykosyliert sein, da in der Literatur berichtet wurde, dass sowohl die glykosylierten als auch unglykosylierten Formen von IFN- β quantitativ ähnliche spezifische Aktivitäten zeigen und dass daher die Glykosylreste bei der biologischen Aktivität von IFN- β keine Rolle spielen und nicht zu dieser beitragen.

[0037] Die IFN- β -Varianten, die vorliegend umfaßt sind, schließen Muteine der nativen reifen IFN- β -Sequenz ein, wobei ein oder mehrere Cysteinreste, die für die biologische Aktivität nicht essentiell sind, absichtlich deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt wurden, um Stellen entweder zur intermolekularen Quervernetzung oder zur inkorrekten intramolekularen Disulfidbrückenbindungsbildung zu eliminieren. IFN- β -Varianten dieser Art umfassen solche, die ein Glycin, Valin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Tryptophan, Serin, Threonin oder Methionin als Austausch für das Cystein enthalten, das bei Aminosäure 17 der reifen nativen Aminosäuresequenz gefunden wird. Serin und Threonin sind wegen ihrer chemischen Analogie zu Cystein der stark bevorzugte Austausch. Serin-Substitutionen sind am stärksten bevorzugt. Eine IFN- β -Variante kann beispielsweise einen Serinrest umfassen, der das Cystein, das an Aminosäure 17 der reifen nativen Sequenz gefunden wird, ersetzt. Cystein 17 kann auch unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren deletiert werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 4,588,585), was zu einer reifen IFN- β -Mutante führt, die eine Aminosäure kürzer als das native reife IFN- β ist. Somit sind IFN- β -Varianten mit einer oder mehreren Mutationen, die z.B. ihre pharmazeutische Nützlichkeit verbessern, ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0038] Der Fachmann wird erkennen, dass durch Mutation zusätzliche Änderungen in die für IFN- β kodierenden Nukleotidsequenzen eingebracht werden können, was zu Änderungen in der IFN- β -Aminosäuresequenz führt, ohne die biologische Aktivität des Interferons zu verändern. Somit kann ein Nukleinsäuremolekül hergestellt werden, das für eine IFN- β -Variante kodiert, welche eine Sequenz aufweist, die sich von humanem IFN- β unterscheidet, indem eine oder mehrere Nukleotidsubstitutionen, -Additionen oder -Deletionen in die entsprechende, vorliegend offenbarte Nukleotidsequenz eingebracht werden, sodass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -Additionen oder -Deletionen in das kodierte IFN- β eingebracht werden. Mutationen können durch Standardverfahren, wie zielgerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Solche IFN- β -Varianten sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst. Varianten von IFN- β werden in der Europäischen Patentanmeldung 18545981 und in den US-Patent Nrn. 4,518,584; 4,588,585 und 4,737,462 beschrieben.

[0039] Biologisch aktive IFN- β -Varianten, die von der Erfindung umfasst sind, schließen auch IFN- β -Polypeptide ein, die kovalent z.B. mit Polyethylenglykol (PEG) oder Albumin verbunden sind.

[0040] Von der Erfindung umfasste biologisch aktive IFN- β -Varianten sollten die IFN- β -Aktivitäten beibehalten, insbesondere die Fähigkeit, an IFN- β -Rezeptoren zu binden, oder sie sollten die immunmodulatorische oder antivirale Aktivität beibehalten. In manchen Ausführungsformen behält die IFN- β -Variante mindestens etwa 25 %, etwa 50 %, etwa 75 %, etwa 85 %, etwa 90 %, etwa 95 %, etwa 98 %, etwa 99 % oder mehr der biologischen Aktivität des nativen IFN- β -Polypeptids bei. IFN- β -Varianten, deren Aktivität im Vergleich zu der Aktivität des nativen IFN- β -Polypeptids erhöht ist, sind ebenfalls umfasst. Die biologische Aktivität von IFN- β -Varianten kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren gemessen werden. Beispiele solcher Assays können in Fellous et al. (1982) *Natl. Acad. Sci USA* 79:3082-3086; Czerniecki et al. (1984) *J. Virol.* 49(2):490-496; Mark et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:5662-5666; Branca et al. (1981) *Nature* 277:221-223; Williams et al. (1979) *Nature* 282:582-586; Herberman et al. (1979) *Nature* 277:221-223 und Anderson et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257(19):11301-11304, gefunden werden.

[0041] Nicht-einschränkende Beispiele für IFN- β -Polypeptide und IFN- β -Varianten-Polypeptide, die von der Erfindung umfasst sind, sind in Nagata et al. (1980) *Nature* 284:316-320; Goeddel et al. (1980) *Nature* 287:411-416; Yelverton et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:731-741; Streuli et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:2848-2852; EP 028033 B1, und EP 109748 B1. Siehe auch US-Patent Nrn. 4,518,584; 4,569,908; 4,588,585; 4,738,844, 4,753,795; 4,769,233; 4,793,995; 4,914,033; 4,959,314; 5,545,723 und 5,814,485 aufgeführt. Diese Zitate stellen ferner eine Anleitung in Bezug auf Reste und Bereiche des IFN- β -Polypeptids bereit, die ohne Verlust biologischer Aktivität verändert werden können.

[0042] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendete IFN- β das reife native humane IFN- β -Polypeptid. In einer anderen Ausführungsform ist das IFN- β das reife IFN- β C17S-Polypeptid. Die vorliegende Erfindung umfasst jedoch andere Ausführungsformen, in denen das IFN- β ein beliebiges biologisch aktives IFN- β -Polypeptid oder eine Variante ist, wie vorliegend an anderer Stelle beschrieben wird.

[0043] In manchen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das IFN- β rekombinant hergestellt. Mit "rekombinant hergestelltem IFN- β " ist IFN- β gemeint, das eine vergleichbare biologische Aktivität zu nativem IFN- β hat und das durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellt wurde. IFN- β kann hergestellt werden, indem eine Wirtszelle kultiviert wird, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der eine für ein IFN- β -Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz umfasst. Die Wirtszelle ist eine solche, die die Nukleotidsequenz transkribieren und das erwünschte Protein produzieren kann, und kann prokaryotisch (z.B. E. coli) oder eukaryotisch (z.B. Hefe, Insekten- oder Säugetierzelle) sein. Beispiele der rekombinanten Produktion von IFN- β werden in Mantei et al. (1982) Nature 297:128; Ohno et al. (1982) Nucleic Acids Res. 10:967; Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156 und in den US-Patent Nrn. 4,462,940, 5,702,699 und 5,814,485 beschrieben.

Interferon- α

[0044] Die Bezeichnung "IFN- α " bezieht sich wie vorliegend verwendet auf IFN- α oder Varianten desselben, die manchmal als INF- α -ähnliche Polypeptide bezeichnet werden. Humane α -Interferone umfassen eine Familie von etwa 30 Proteinspezies, die von mindestens 14 verschiedenen Genen und etwa 16 Allelen kodiert werden. Solche IFN- α -Polypeptide umfassen IFN- α a, IFN- α b, IFN- α c, IFN- α d, IFN- α h, IFN- α j, IFN- α j1, IFN- α j2 und IFN- α k. Humane IFN- α -Varianten, die natürlich vorkommen (z.B. allelische Varianten, die an dem IFN- α -Locus auftreten) oder rekombinant hergestellt sein können, weisen Aminosäuresequenzen auf, die zu der reifen nativen IFN- α -Sequenz gleich, ähnlich oder im Wesentlichen ähnlich sind. Für humanes IFN α -kodierende DNA-Sequenzen sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt. Siehe z.B. Goeddel et al. (1981) Nature 290:20-26 (Genbank Zugriffsnr. V00551 J00209); Nagata et al. (1980) Nature 284:3126-320; Bowden et al. (1984) Gene 27:87-99 (Genbank Zugriffsnr. NM_000605); und Ohara et al. (1987) FEBS Letters 211:78-82. Fragmente von IFN- α oder trunkierte Formen von IFN α -, die ihre Aktivität beibehalten, sind ebenfalls umfasst. Diese biologisch aktiven Fragmente oder trunkierten Formen von IFN α - werden hergestellt, indem man unter Verwendung von im Stand der Technik hinlänglich bekannter rekombinanter DNA-Verfahren Aminosäurereste von der IFN- α -Aminosäuresequenz vollständiger Länge entfernt. IFN- α -Polypeptide können weiterhin glykosyliert oder unglykosyliert sein.

[0045] Der Fachmann wird erkennen, dass zusätzliche Änderungen durch Mutation in die für INF- α kodierende Nukleotidsequenz eingeführt werden können, was zu Änderungen in der IF- α -Aminosäuresequenz führt, ohne die biologische Aktivität des Interferons zu verändern. Damit kann ein isoliertes Nukleinsäuremolekül hergestellt werden, das für eine INF- α -Variante mit einer von humanem INF- α abweichenden Sequenz kodiert, indem man eine oder mehrere Nukleotidsubstitutionen, -Additionen oder -Deletionen in die entsprechende vorliegend offenbarte Nukleotidsequenz einbringt, sodass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -Additionen oder -Deletionen in das kodierte INF- α eingebracht werden. Mutationen können durch Standardtechniken eingebracht werden. Solche Varianten von INF- α umfassen z.B. IFN- α -2a (Roferon-ATM), IFN- α -2b (Intron ATM) und IFN- α con-1 (InfergenTM). Eine weitere in den Verfahren der vorliegenden Erfindung nützliche Variante ist IFN- α 2a, die z.B. in EP 43980; Meada et al. (1980) PNAS 77:7010; und Levy et al. (1981) PNAS 78:6186 offenbart ist. Weitere Varianten von IFN- α können z.B. in US-Patent Nr. 5,676,942 gefunden werden, das vorliegend durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Diese Zitate stellen ferner eine Anleitung in Bezug auf Reste und Bereiche des IFN- α -Polypeptids bereit, die ohne Verlust biologischer Aktivität verändert werden können.

[0046] Biologisch aktive IFN- α -Varianten, die von der Erfindung umfasst sind, schließen auch IFN- α -Polypeptide ein, die kovalent z.B. mit Polyethylenglykol (PEG) oder Albumin verbunden sind. Siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5,762,923.

[0047] Von der Erfindung umfasste biologisch aktive Varianten von IFN- α sollten die INF- α -Aktivitäten beibehalten, insbesondere die Fähigkeit, an Interferon- α -Rezeptoren zu binden, oder sie sollten die immunmodulatorische, antivirale oder antiproliferative Aktivität beibehalten. In manchen Ausführungsformen behält die IFN- α -Variante mindestens etwa 25 %, etwa 50 %, etwa 75 %, etwa 85 %, etwa 90 %, etwa 95 %, etwa 98 %, etwa 99 % oder mehr der biologischen Aktivität des nativen IFN- α -Polypeptids bei. IFN- α -Varianten deren Aktivität im Vergleich zu der Aktivität des nativen IFN- α -Polypeptids erhöht ist, sind ebenfalls umfasst. Die biologische Aktivität von IFN- α -Varianten kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren gemessen werden. Beispiele solcher Assays sind oben beschrieben.

[0048] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das verwendete IFN- α das reife native humane IFN- α -Polypeptid. Die vorliegende Erfindung umfasst jedoch andere Ausführungsformen, in denen IFN- α ein beliebiges biologisch aktives IFN- α -Polypeptid oder eine Variante ist, wie vorliegend an anderer Stelle beschrieben wird.

[0049] In machen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das IFN- α rekombinant hergestellt. Mit "rekombinant hergestelltem IFN- α " ist IFN- α gemeint, das zu nativem IFN- α vergleichbare biologische Aktivität aufweist und das durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellt wurde. IFN- α kann hergestellt werden, indem eine Wirtszelle kultiviert wird, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der eine für ein IFN- α -Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz umfasst. Die Wirtszelle ist eine solche, die die Nukleotidsequenz transkribieren und das gewünschte Protein produzieren kann, und kann prokaryotisch (z.B. *E. coli*) oder eukaryotisch (z.B. eine Hefe, Insekten- oder Säugetierzelle) sein. Details der Klonierung von Interferon-cDNA und der direkten Expression derselben, insbesondere in *E. coli*, sind mittlerweile Gegenstand vieler Publikationen gewesen. So ist z.B. die Herstellung rekombinanter Interferone bekannt. Siehe z.B. (1982) *Nature* 295:503-508; (1980) *Nature* 284:316-320; (1981) *Nature* 290:20-26; (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057-4074; sowie auch die Europäischen Patent-Nrn. 32134, 43980 und 211148. Weitere Beispiele der rekombinanten Herstellung von IFN- α -2 werden in Nagata et al. (1980) *Nature* 284:316 und in dem Europäischen Patent 32134 bereitgestellt.

Interferon- γ

[0050] Die Bezeichnung IFN- γ bezieht sich wie vorliegend verwendet auf IFN- γ und Varianten desselben, die manchmal als IFN- γ -ähnliche Polypeptide bezeichnet werden. IFN- γ ist ein Glykoprotein, dessen reife Form 143 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von etwa 63–73 kDa aufweist. Die Aminosäuresequenz von IFN- γ kann z.B. in US-Patent Nr. 6,046,034, das vorliegend durch Bezugnahme eingeschlossen ist, gefunden werden. Humane IFN- γ -Varianten, die natürlich vorkommen (z.B. allelische Varianten, die an dem IFN- γ -Locus vorkommen) oder rekombinant hergestellt sein können, weisen Aminosäuresequenzen auf, die zu den reifen nativen IFN- γ -Sequenz gleich, ähnlich oder im Wesentlichen ähnlich sind. DNA-Sequenzen, die für humanes IFN- γ kodieren, sind im Stand der Technik ebenfalls verfügbar. Siehe z.B. Grey et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5842-5846. IFN- γ -Fragmente oder trunkierte Formen von IFN- γ , die ihre Aktivität beibehalten, sind ebenfalls umfasst. Diese biologisch aktiven Fragmente oder trunkierten Formen von IFN- γ werden hergestellt, indem man von der IFN- γ Aminosäuresequenz vollständiger Länge Aminosäurereste entfernt, wobei man im Stand der Technik hinlänglich bekannte rekombinante DNA-Verfahren verwendet. IFN- γ -Polypeptide können glykosyliert oder unglykosyliert sein.

[0051] Die vorliegend eingeschlossenen IFN- γ -Varianten umfassen Muteine der nativen reifen IFN- γ -Sequenz. Somit sind IFN- γ Varianten mit einer oder mehreren Mutationen, die z.B. ihre pharmazeutische Nützlichkeit verbessern, ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0052] Solche IFN- γ -Varianten sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst. Varianten von IFN- γ sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt. Zum Beispiel offenbart US-Patent Nr. 5,770,191 Peptide, die den C-Terminus von IFN- γ umfassen, und welche die biologische Aktivität des reifen IFN- γ beibehalten. Zusätzlich wurden in EP 0306870 A2 Varianten von humanem IFN- γ identifiziert, deren Aktivität durch Deletion der C-terminalen 7–11 Aminosäuren deutlich gesteigert wurde. Zusätzlich offenbart WO 92-08737 eine Variante von rekombinantem humanem IFN- γ (IFN- γ C-10L), die gesteigerte biologische Aktivität aufweist. Weitere Varianten von IFN- γ können z.B. in US-Patent Nr. 5,690,925 und US-Patent Nr. 6,046,034 gefunden werden, die beide Anleitung in Bezug auf Aminosäuresubstitution und -Deletionen bereitstellen, die ohne einen Verlust der biologischen Aktivität in IFN- γ durchgeführt werden können. Die obigen Beispiele stellen nicht einschränkende Beispiele von IFN- γ -Polypeptiden und IFN- γ -Varianten-Polypeptiden dar, die von der Erfindung umfasst sind. Diese Zitate stellen auch eine Anleitung in Bezug auf Reste und Bereiche des IFN- γ -Polypeptids bereit, die ohne Verlust der biologischen Aktivität verändert werden können.

[0053] Biologisch aktive IFN- γ -Varianten, die von der Erfindung umfasst sind, schließen ferner IFN- γ -Polypeptide ein, die kovalent z.B. mit Polyethylenglykol (PEG) oder Albumin verbunden sind.

[0054] Von der Erfindung umfasste biologisch aktive IFN- γ -Varianten sollten IFN- γ -Aktivitäten beibehalten, insbesondere die Fähigkeit, an IFN- γ -Rezeptoren zu binden, oder sie sollten die immunmodulatorischen, antiviralen oder antiproliferativen Aktivitäten beibehalten. In manchen Ausführungsformen behält die IFN- γ -Variante mindestens etwa 25 %, etwa 50 %, etwa 75 %, etwa 85 %, etwa 90 %, etwa 95 %, etwa 98 %, etwa 99 % oder mehr der biologischen Aktivität des nativen IFN- β -Polypeptids bei. IFN- γ -Varianten, deren Aktivität im Vergleich zu der Aktivität des nativen IFN- γ -Polypeptids erhöht ist, sind ebenfalls umfasst. Die biologische Ak-

tivität von IFN- γ -Varianten kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren gemessen werden. Beispiele solcher Assays sind oben beschrieben.

[0055] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das verwendete IFN- γ das reife native humane IFN- γ -Polypeptid. Die vorliegende Erfindung umfasst jedoch andere Ausführungsformen, in denen das IFN- γ ein beliebiges biologisch aktives IFN- γ -Polypeptid oder eine Variante ist, wie vorliegend an anderer Stelle beschrieben wird.

[0056] In manchen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird das IFN- γ rekombinant hergestellt. Mit "rekombinant hergestelltem IFN- γ " ist IFN- γ gemeint, das zu nativem IFN- γ vergleichbare biologische Aktivität aufweist und durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellt wurde. IFN- γ kann durch Kultivierung einer Wirtszelle produziert werden, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, welcher eine für ein IFN- γ -Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz umfasst. Die Wirtszelle ist eine solche, die die Nukleotidsequenz transkribieren und das gewünschte Protein produzieren kann, und kann prokaryotisch, (z.B. E. coli) oder eukaryotisch sein (z.B. eine Hefe, Insekten- oder Säugetierzelle). Beispiele der rekombinanten Herstellung von IFN- γ sind in 6,046,034 und 5,690,925 beschrieben.

Pharmazeutische Zusammensetzung

[0057] Steigerungen bezüglich der Menge von Zytokin im ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark auf ein therapeutisch wirksames Niveau können durch Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung erreicht werden, die eine therapeutisch wirksame Dosis dieses Zytokins umfasst. Mit "therapeutisch wirksamer Dosis" ist eine Zytokindosis gemeint, die das erwünschte Ziel erreicht, die Menge dieses Zytokins in einem relevanten Teil des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks auf ein therapeutisch wirksames Niveau zu erhöhen, was eine gewünschte biologische Aktivität des Zytokins ermöglicht.

[0058] Eine Zusammensetzung kann für die Zuführung eines Zytokins an das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark bei Verabreichung an Gewebe genutzt werden, das vom Nervus olfactorius und/oder vom Nervus trigeminus innerviert ist. Die Zusammensetzung kann z.B. ein beliebiges pharmazeutisch akzeptables Additiv, einen Träger oder ein Adjuvans umfassen, das (der) zur Verabreichung eines Zytokins an ein Gewebe, das vom Nervus olfactorius und/oder vom Nervus trigeminus innerviert ist, geeignet ist. Vorzugsweise kann die pharmazeutische Zusammensetzung bei Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Erkrankung, Störung oder Verletzung des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks genutzt werden. Vorzugsweise umfasst die Zusammensetzung ein Zytokin in Kombination mit einem pharmazeutischen Träger, Additiv und/oder Adjuvans, das (der) den Transfer des Zytokins in oder durch Gewebe steigert, das vom Nervus olfactorius und/oder vom Nervus trigeminus innerviert ist. Alternativ dazu kann das Zytokin mit Substanzen kombiniert werden, die dabei helfen, das Zytokin an Orte zu transportieren, an denen ein Nervenzellschaden vorliegt. Die Zusammensetzung kann ein oder mehrere Zytokine einschließen.

[0059] Die Zusammensetzung enthält üblicherweise einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, der mit dem Zytokin und anderen Komponenten in einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemischt ist. Mit "pharmazeutisch akzeptablem Träger" ist ein Träger gemeint, der normalerweise im Stand der Technik verwendet wird, um die Lagerung, Verabreichung und/oder die heilende Wirkung des Zytokins zu erleichtern. Ein Träger kann ferner jede unerwünschte Nebenwirkung des Zytokins verringern. Ein geeigneter Träger sollte stabil sein, d.h. er sollte nicht in der Lage sein, mit anderen Inhaltsstoffen der Formulierung zu reagieren. Er sollte bei den zur Behandlung verwendeten Dosierungen und Konzentrationen bei den Empfängern keine signifikanten lokalen oder systemischen Nebenwirkungen auslösen. Solche Träger sind im Stand der Technik allgemein bekannt.

[0060] Geeignete Träger für diese Erfindung schließen solche ein, die regelmäßig für große stabile Makromoleküle, wie Albumin, Gelatine, Kollagen, Polysaccharid, Monosaccharide, Polyvinylpyrrolidon, Polylactat, Polyglykolat, polymere Aminosäuren, fixierte Öle, Ethyloleat, Liposomen, Glucose, Sucrose, Laktose, Mannose, Dextrose, Dextran, Cellulose, Mannitol, Sorbitol, Polyethylenglykol (PEG) u.ä., verwendet werden.

[0061] Wasser, Salzlösung, wässrige Dextrose und Glykole sind bevorzugte flüssige Träger, insbesondere (solange sie isotonisch sind) für Lösungen. Der Träger kann aus verschiedenen Ölen, einschließlich solcher von Petroleum-, Tier-, Gemüse- oder synthetischer Herkunft ausgewählt sein, z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl, Mineralöl, Sesamöl und Ähnliches. Geeignete pharmazeutische Hilfsstoffe umfassen Stärke, Cellulose, Talk, Glucose, Laktose, Sucrose, Gelatine, Malz, Reis, Mehl, Kalk, Silikagel, Magnesiumstearat, Natriumstearat, Glycerolmonostearat, Natriumchlorid, getrocknete fettarme Milch, Glycerol, Propylenglykol, Wasser, Ethanol und Ähnliches. Die Zusammensetzungen können herkömmlichen pharmazeutischen Hilfen, wie Sterilisation,

unterworfen werden und können herkömmliche pharmazeutische Additive, wie Konservierungsstoffe, stabilisierende Zytokine, befeuchtende oder emulgierende Mittel, Salze zur Anpassung des osmotischen Drucks, Puffer und Ähnliches enthalten.

[0062] Eine zur intranasalen Verabreichung formulierte Zusammensetzung kann optional einen Geruchsstoff umfassen. Ein Geruchsmittel wird mit dem Zytokin kombiniert, um ein geruchsbildendes Gefühl bereitzustellen und/oder um die Inhalation der intranasalen Zubereitung zu fördern, um die Zuführung des aktiven Zytokins zum olfaktorischen Neuroepithel zu fördern. Das geruchsbildende Gefühl, das durch das Geruchsmittel bereitgestellt wird, kann angenehm, abstossend oder anderweitig übelriechend sein. Die Geruchsrezeptor-Neuronen sind in dem Geruchsepithel lokalisiert, das im Menschen nur einige wenige Quadratzentimeter im oberen Teil der Nasenhöhle einnimmt. Die Zilien der olfaktorischen neuronalen Dendriten, die die Rezeptoren enthalten, sind ziemlich lang (etwa 30 bis 200 µm). Das Geruchsmittel muss eine 10 bis 30 µm Schicht Schleim, die die Zilien umhüllt, durchdringen, um die Rezeptoren zu erreichen. Siehe Snyder et al. (1998) J. Biol. Chem. 263:13972-13974. Die Verwendung eines lipophilen Geruchsmittels mit moderater bis hoher Affinität für Geruchsbindungsprotein (odorant binding protein, OBP) ist bevorzugt. OBP hat eine Affinität zu kleinen lipophilen Moleküle, die in Nasensekretionen gefunden werden und kann als Träger wirken, um den Transport einer lipophilen Geruchssubstanz und Zytokinen zu den Geruchs-Rezeptor-Neuronen zu fördern. Es ist ferner bevorzugt, dass ein Geruchsmittel in der Lage ist, mit lipophilen Additiven wie Liposomen und Mizellen in der Zusammensetzung zu assoziieren, um die Zuführung der Zytokine mit Hilfe von OBP zum olfaktorischen Neuroepithel weiter zu verstärken. OBP kann auch direkt an lipophile Mittel binden, um den Transport des Zytokins zu neuronalen Geruchs-Rezeptoren zu verbessern.

[0063] Geeignete Geruchsstoffe mit einer hohen Affinität zu OBP umfassen Terpanoide wie Cetalva und Citronellol, Aldehyde wie Amylcinnamaldehyd und Hexylcinnamaldehyd, Ester wie Octylisovalerat, Jasmine wie CIS-Jasmin und Jasmal sowie Musk 89. Andere geeignete Geruchsmittel umfassen solche, die in der Lage sein könnten, geruchssensitive Enzyme wie Aderylatcyclase und Guanylatcyclase zu stimulieren, oder die in der Lage sein könnten, Ionenkanäle innerhalb des olfaktorischen Systems zu verändern, um die Absorption des Zytokins zu verbessern.

[0064] Andere akzeptable Bestandteile in der Zusammensetzung umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) pharmazeutisch akzeptable Mittel, die die Isotonizität modifizieren, einschließlich Wasser, Salze, Zucker, Polyole, Aminosäuren und Puffer wie Phosphat, Citrat, Succinat, Acetat und andere organische Säuren oder deren Salze. Üblicherweise umfasst der pharmazeutisch akzeptable Träger auch ein oder mehrere Stabilisierungssubstanzen, reduzierende Mittel, Antioxidantien und/oder antioxidierend wirkende Komplexbildner. Die Verwendung von Puffern, Stabilisierungsmitteln, reduzierenden Mitteln, Antioxidantien und Komplexbildnern bei der Herstellung von auf Protein basierenden Zusammensetzungen, insbesondere pharmazeutischen Zusammensetzungen, ist im Stand der Technik hinlänglich bekannt. Siehe Wang et al. (1980) J. Parent. Drug. Assn., 34 (6) :452-462; Wang et al. (1988) J. Parent. Sci. and Tech. 42:54-526 (Supplement); Lachmann et al. (1968) Drug and Cosmetic Industry, 102(1):36-38, 40 und 146-148; Akers, M.J. (1988) J. Parent. Sci. and Tech., 36(5):222-228; und Colowick et al. Methods in Enzymology, Band XXV, S. 185-188.

[0065] Geeignete Puffer umfassen Acetat, Adipat, Benzoat, Citrat, Lactat, Maleat, Phosphat, Tartrat, Borat, Tri(hydroxymethylaminomethan), Succinat, Glycin, Histidin, Salze verschiedener Aminosäuren oder Ähnliches oder Kombinationen derselben. Siehe Wang (1980), wie oben auf Seite 455 angegeben. Geeignete Salze und Substanzen zum Einstellen der Isotonizität umfassen Natriumchlorid, Dextrose, Mannitol, Sucrose, Trehalose und Ähnliches. Wenn der Träger eine Flüssigkeit ist, ist bevorzugt, dass der Träger gegenüber oralen, Konjunktiva- oder Hautflüssigkeiten hypotonisch oder isotonisch ist und einen pH im Bereich von 4,5 bis 8,5 aufweist. Wenn der Träger in Puderform ist, ist bevorzugt, dass der Träger auch einen akzeptablen nicht-toxischen pH-Bereich aufweist.

[0066] Geeignete reduzierende Mittel, die die Reduktion reduzierter Cysteine beibehalten, umfassen Dithiothreitol (DTT, auch als Cleland's Reagenz bekannt) oder Dithioerythritol bei 0,01 bis 0,1 % Gew./Gew., Acetylcystein oder Cystein bei 0,1 % bis 0,5 % (pH 2 bis 3), und Thioglycerol bei 0,1 % bis 0,5 % (pH 3,5 bis 7,0) und Glutathion. Siehe Akers (1988), wie oben auf den Seiten 225 bis 226 angegeben. Geeignete Antioxidantien umfassen Natriumbisulfit, Natriumsulfit, Natriummetabisulfit, Natriumthiosulfat, Natriumformaldehydsulfoxylat und Ascorbinsäure. Siehe Akers (1988), wie oben auf Seite 225 angegeben. Geeignete Komplexbildner, die in Spuren vorhandene Metalle komplexieren, um die von in Spuren vorhandenen Metallen katalysierte Oxidation reduzierter Cysteine zu verhindern, umfassen Citrat, Tartrat, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Dinatrium-, Tetranatrium- und Calciumdinatriumsalze und Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA). Siehe z.B. Wang (1980), wie oben auf den Seiten 457-458 und 460-461 angegeben, und Akers (1988), wie oben auf den

Seiten 224-227 angegeben.

[0067] Die Zusammensetzung kann ein oder mehrere Konservierungsstoffe, wie Phenol, Cresol, p-Aminobenzoessäure, BDSA, Sorbitrat, Chlorhexidin, Benzalkoniumchlorid oder Ähnliches, umfassen. Geeignete Stabilisierungsmittel umfassen Kohlenhydrate wie Trehalose oder Glycerol. Die Zusammensetzung kann ein Stabilisierungsmittel einschließen, wie ein oder mehrere von mikrokristalliner Cellulose, Magnesiumstearat, Mannitol, Sucrose, um z.B. die physikalische Form der Zusammensetzung zu stabilisieren; und ein oder mehrere von Glycin, Arginin, hydrolysiertem Kollagen oder Proteaseinhibitoren, um z.B. die chemische Struktur der Zusammensetzung zu stabilisieren. Geeignete suspendierende Additive umfassen Carboxymethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Hyaluronsäure, Alginat, Chondroitinsulfat, Dextran, Maltodextrin, Dextransulfat oder Ähnliches. Die Zusammensetzung kann einen Emulgator wie Polysorbat 20, Polysorbat 80, Pluronic, Triolein, Sojabohnenöl, Lecithine, Squalen und Squalane, Sorbitantrioleat oder Ähnliches umfassen. Die Zusammensetzung kann ein antimikrobielles Mittel wie Phenylethylalkohol, Phenol, Cresol, Benzalkoniumchlorid, Phenoxyethanol, Chlorhexidin, Thimerosol oder Ähnliches umfassen. Geeignete Verdickungsmittel umfassen natürliche Polysaccharide wie Mannane, Arabinane, Alginat, Hyaluronsäure, Dextrose oder Ähnliches; und synthetische wie die PEG-Hydrogele mit geringem Molekulargewicht sowie die bereits erwähnten suspendierenden Zytokine.

[0068] Die Zusammensetzung kann ein Adjuvans wie Cetyltrimethylammoniumbromid, BDSA, Cholat, Deoxycholat, Polysorbat 20 und 80, Acidum fusidicum oder Ähnliches umfassen, und sie kann im Falle der Zuführung von DNA vorzugsweise ein kationisches Lipid umfassen. Geeignete Zucker umfassen Glycerol, Threose, Glucose, Galaktose, Mannitol und Sorbitol. Ein geeignetes Protein ist humanes Serumalbumin.

[0069] Bevorzugte Zusammensetzungen umfassen ein oder mehrere die Löslichkeit verbessernde Additive, vorzugsweise ein Cyclodextrin; ein hydrophiles Additiv, vorzugsweise ein Monosaccharid oder Oligosaccharid; ein die Absorption förderndes Additiv, vorzugsweise ein Cholat, ein Deoxycholat, Acidum fusidicum oder ein Chitosan; ein kationisches Tensid, vorzugsweise ein Cetyltrimethylammoniumbromid; ein die Viskosität verbesserndes Additiv, vorzugsweise, um die Verweilzeit der Zusammensetzung am Ort der Verabreichung zu erhöhen, vorzugsweise eine Carboxymethylcellulose, ein Maltodextrin, eine Algininsäure, eine Hyaluronsäure oder ein Chondroitinsulfat; oder eine Matrix zur verzögerten Freisetzung, vorzugsweise ein Polyanhydrid, ein Polyorthoester, ein Hydrogel, ein teilchenförmiges Depotssystem zur langsamen Freisetzung, vorzugsweise ein Polylactid-co-Glycolid (PLG), ein Depot-Schaum, eine Stärke-Mikrosphäre, oder ein von Cellulose abgeleitetes Wangen-System; ein auf einem Lipid basierender Träger, vorzugsweise eine Emulsion, ein Liposom, ein Niosom oder eine Mizelle. Die Zusammensetzung kann ein die Doppelschicht-destabilisierendes Additiv, vorzugsweise ein Phosphatidylethanolamin; ein fusionsvermittelndes (fusogenic) Additiv, vorzugsweise ein Cholesterolhemisuccinat, umfassen.

[0070] Andere bevorzugte Zusammensetzungen zur sublingualen Verabreichung umfassen z.B. ein Bioadhäsiv, um das Zytokin sublingual zu halten, ein Spray, Farbe oder an die Zunge applizierte Tupfer; das Erhalten einer sich langsam auflösenden Pille oder Lutschtablette unter der Zunge oder Ähnliches. Andere bevorzugte Zusammensetzungen zur transdermalen Verabreichung umfassen ein Bioadhäsiv, um das Zytokin auf oder in der Haut zu halten, ein auf die Haut appliziertes Spray, eine Farbe, ein Kosmetikum oder ein Tupfer oder Ähnliches.

[0071] Diese Listen von Trägern und Additiven sind keinesfalls vollständig und ein Fachmann kann Hilfsstoffe aus der Liste von GRAS (generally regarded as safe, im Allgemeinen als sicher betrachtet)-Chemikalien, die in pharmazeutischen Zusammensetzungen erlaubt sind, und solchen, die im Moment in topischen und parenteralen Formulierungen erlaubt sind, auswählen.

[0072] Für die Zwecke dieser Erfindung kann die pharmazeutische Zusammensetzung, die das Zytokin umfasst, in einer Einheitsdosierung formuliert werden, und sie kann in einer Form wie als Lösung, Suspension oder Emulsion vorliegen. Das Zytokin kann als ein Puder, als ein Granulum, eine Lösung, eine Creme, ein Spray (z.B. ein Aerosol), ein Gel, eine Salbe, eine Infusion, eine Injektion, ein Tropfen oder eine Retard-Zusammensetzung wie eine Polymerscheibe, an Gewebe verabreicht werden, dass von Trigemini- und/oder Geruchsneuronen innerviert ist. Zur Wangen-Verabreichung können die Zusammensetzungen die Form von Tabletten oder Lutschtabletten annehmen, die in herkömmlicher Weise formuliert sind. Zur Verabreichung an das Auge oder an andere äußere Gewebe, z.B. Mund oder Haut, können die Zusammensetzungen an dem infizierten Teil des Körpers des Patienten als topische Salbe oder Creme appliziert werden. Diese Stoffe können in einer Salbe hergestellt werden, z.B. mit einer wasserlöslichen Salbengrundlage, oder in einer Creme, z.B. mit einer Öl-in-Wasser Creme-Basis. Zur Applikation an der Konjunktiva kann das Zytokin in bioabbauba-

ren oder nichtabbaubaren Okularen Inserts verabreicht werden. Das Medikament kann durch Matrixerosion oder passiv durch eine Pore (wie in Ethylen-Vinylacetat-Polymer-Inserts) freigesetzt werden. Für andere Schleimhaut-Verabreichungsformen, z.B. sublingual, können Puderscheiben unter der Zunge platziert werden und aktive Verabreichungssysteme können sich in situ durch langsame Hydratation bilden, wie bei der Formulierung von Liposomen aus getrockneten Lipidmischungen oder Pro-Liposomen.

[0073] Andere bevorzugte Formen von Zusammensetzungen zur Verabreichung umfassen eine Teilchensuspension, wie eine Emulsion, ein Liposom, ein Insert, das das Zytokin langsam freisetzt, und Ähnliches. Die Puder- und Granulatformen der pharmazeutischen Zusammensetzung können mit einer Lösung kombiniert werden, und mit einem verdünnenden, zerstreuenden oder oberflächenaktiven Zytokin. Zusätzliche bevorzugte Zusammensetzungen zur Verabreichung umfassen ein Bioadhäsiv, um das Zytokin am Ort der Verabreichung zu halten; ein an Mukosa oder Epithel appliziertes Spray, eine Farbe oder ein Tupfer; eine sich langsam auflösende Pille oder Lutschtablette oder Ähnliches. Die Zusammensetzung kann auch in Form eines lyophilisierten Puders vorliegen, das vor der Verabreichung in eine Lösung, Suspension oder Emulsion umgewandelt werden kann. Die pharmazeutische, Zytokin enthaltende Zusammensetzung wird vorzugsweise durch Membranfiltrierung sterilisiert und in Einheits-Dosis- oder Multi-Dosisbehältern wie in versiegelten Fläschchen oder Ampullen gelagert.

[0074] Das Verfahren zur Formulierung einer pharmazeutischen Zusammensetzung ist im Stand der Technik hinlänglich bekannt. Eine gründliche Diskussion von Formulierung und Auswahl pharmazeutisch akzeptabler Träger, Stabilisierungsmitteln und Isomolyten kann in Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Ausgabe, Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990) gefunden werden.

[0075] Das erfindungsgemäße Zytokin kann auch in Retard-Form formuliert werden, um die Anwesenheit des pharmazeutisch aktiven Zytokins in dem behandelten Säugetier zu verlängern, im Allgemeinen auf länger als einen Tag. Zahlreiche Verfahren der Herstellung einer Retard-Formulierung sind im Stand der Technik bekannt und sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Ausgabe, Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990) offenbart.

[0076] Im Allgemeinen kann das Zytokin in semi-permeablen Matrices aus festen hydrophoben Polymeren eingeschlossen werden. Die Matrices können als Filme oder Mikrokapseln ausgebildet sein. Beispiele solcher Matrices umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Polyester, Copolymere von L-Glutaminsäure und gamma-Ethyl-L-glutamat (Sidman et al. (1983) Biopolymers 22:547-556; Polylactide (US-Patent Nr. 3,773,919 und EP 58,481), Polylactatpolyglykolate (PLGA) wie Polylactid-co-glykolid (siehe z.B. US-Patent Nrn. 4,767,628 und 5,654,008), Hydrogele (siehe z.B. Langer et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105), nichtabbaubares Ethylen-Vinylacetat (z.B. Ethylen-Vinylacetat-Scheiben und Poly(ethylen-co-vinylacetat)), abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere wie das Lupron Depot, Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure (EP 133,988), Hyaluronsäuregele (siehe z.B. US-Patent 4,636,524), Alginsäure-Suspensionen und Ähnliches.

[0077] Geeignete Mikrokapseln können ferner Hydroxymethylcellulose oder Gelatin-Mikrokapseln und Polymethylmethacrylat-Mikrokapseln umfassen, die durch Koazervationsverfahren oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt wurden. Siehe PCT-Publikation WO 99/24061 mit dem Titel "Method for Producing Sustained-release Formulations", in der ein Protein in PLGA-Mikrosphären eingeschlossen wird. Zusätzlich können auch Mikroemulsionen oder kolloidale Wirkstoffverabreichungssysteme wie Liposomen und Albuminmikrosphären verwendet werden. Siehe Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Auflage, Mack Publishing Company & Co., Eaton, Pennsylvania, 1990). Andere bevorzugte Retard-Zusammensetzungen verwenden ein Bioadhäsiv, um das Zytokin am Ort der Verabreichung zu halten.

[0078] Unter den optionalen Substanzen, die in der pharmazeutischen Zusammensetzung mit dem Zytokin kombiniert werden können, sind lipophile Substanzen, welche die Absorption des Zytokins durch Mukosa oder Epithel der Nasenhöhle oder entlang eines neuralen, lymphatischen oder perivaskulären Weges zu geschädigten Nervenzellen im ZNS verstärken können. Das Zytokin kann allein oder in Kombination mit einem Träger mit einem lipophilen Adjuvans gemischt werden oder kann mit einer oder mehreren Arten von Mizellen- oder Liposomensubstanzen kombiniert werden. Unter den bevorzugten lipophilen Substanzen sind kationische Liposomen, die ein oder mehrere von Folgendem umfassen: Phosphatidylcholin, Lipofektin, DOTAP, ein Lipid-Peptoid-Konjugat, ein synthetisches Phospholipid wie Phosphatidyllysin oder Ähnliches. Diese Liposomen können andere lipophile Substanzen wie Ganglioside und Phosphatidylserin (PS) umfassen. Ferner sind mikzelläre Additive wie GM-1 Ganglioside und Phosphatidylserin (PS) bevorzugt, die alleine oder in Kombination mit dem Zytokin kombiniert werden können. GM-1-Gangliosid kann zu 1 bis 10 Molprozent in jede liposomale

Zusammensetzung oder in höheren Mengen in Mizelläre Strukturen eingeschlossen werden. Proteinzytokine können entweder in Teilchenstrukturen eingeschlossen werden oder als Teil des hydrophoben Teils der Struktur eingearbeitet werden, abhängig von der Hydrophobität des aktiven Zytokins.

[0079] Eine bevorzugte liposomale Formulierung verwendet Depot-Schaum. Ein Zytokin kann in multivesikulären Liposomen verkapselt werden, wie in WO-Publikation 99/12522, mit dem Titel "High and Low Load Formulations of IGF-I in Multivesicular Liposomes" offenbart ist. Die durchschnittliche Verweilzeit des Zytokins am Ort der Verabreichung kann mit einer Depot-Schaum-Zusammensetzung verlängert werden.

Verabreichung des Zytokins

[0080] Gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung sollte die pro Dosis verabreichte Gesamtmenge Zytokin in einem Bereich liegen, der ausreicht, um die Zuführung einer biologisch relevanten Menge des Zytokins zu gewährleisten (d.h. eine Menge, die ausreicht, um eine therapeutische Wirkung zu erzeugen). Die pharmazeutische Zusammensetzung mit einer Einheits-Dosis Zytokin kann in Form einer Lösung, Suspension, Emulsion oder einer Retard-Formulierung vorliegen. Das Gesamtvolumen einer Dosis der pharmazeutischen Zusammensetzung kann sich in dem Bereich von etwa 10 µl bis etwa 100 µl, z.B. zur nasalen Verabreichung, bewegen. Es ist klar, dass das geeignete Volumen sich mit Faktoren wie der Größe des Gewebes, an das das Zytokin verabreicht wird, sowie der Löslichkeit der Bestandteile der Zusammensetzung verändern kann.

[0081] Es ist verständlich, dass die Gesamtmenge des als Einheits-Dosis an ein bestimmtes Gewebe verabreichten Zytokins von der Art der verabreichten pharmazeutischen Zusammensetzung abhängen wird, d.h., von der Frage, ob die Zusammensetzung beispielsweise in Form einer Lösung, einer Suspension, einer Emulsion oder einer Retard-Formulierung vorliegt. Wenn die pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge Zytokin umfasst, z.B. eine Retard-Formulierung ist, wird das Zytokin in einer höheren Konzentration verabreicht. Eine subkutane Verabreichung ohne Nadel an ein extranasales Gewebe, das vom Nervus trigeminus innerviert ist, kann unter Verwendung einer Vorrichtung erreicht werden, die einen Überschall-Gasstrom als Energiequelle verwendet, um ein Mittel, das als Puder oder als ein Mikropartikel formuliert ist, in die Haut zu beschleunigen. Die Charakteristika eines solchen Zuführungsverfahrens werden durch die Eigenschaften des Partikels, die Formulierung des Mittels und die Gasdynamik der Zuführvorrichtung bestimmt werden. In ähnlicher Weise kann die subkutane Zuführung einer wässrigen Zusammensetzung ohne Nadel erreicht werden, indem eine durch Gasdruckfeder angetriebene, in der Hand gehaltene Vorrichtung verwendet wird, um einen Flüssigkeitsstrahl von großer Kraft zu erzeugen, der in der Lage ist, die Haut zu durchdringen. Alternativ dazu kann ein zur verzögerten Freisetzung einer Zusammensetzung formuliertes Haut-Pflaster für die transdermale Zuführung eines neuroregulatorischen Mittels zu einem Gewebe verwendet werden, das vom Nervus trigeminus innerviert ist. Wenn die pharmazeutische Zusammensetzung eine therapeutisch wirksame Menge eines Mittels oder eine Kombination von Mitteln in einer Retard-Formulierung umfasst, wird das Mittel/werden die Mittel in einer höheren Konzentration verabreicht.

[0082] Es sollte für den Fachmann verständlich sein, dass Veränderungen in Bezug auf die therapeutisch wirksame Dosis und die Häufigkeit der Verabreichung eines Zytokins in dieser Ausführungsform der Erfindung akzeptabel sind. Die Menge des verabreichten Zytokins wird invers mit der Häufigkeit der Verabreichung korrelieren. Somit wird eine Zunahme der Konzentration des Zytokins in einer einzelnen verabreichten Dosis oder eine Zunahme der mittleren Verweilzeit im Fall einer Retard-Form des Zytokins im Allgemeinen mit einer Abnahme der Häufigkeit der Verabreichung verbunden sein.

[0083] Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung sollten zusätzliche Faktoren bei der Bestimmung der therapeutisch wirksamen Dosis des Zytokins und der Häufigkeit seiner Verabreichung in Betracht gezogen werden. Solche Faktoren umfassen z.B. die Größe des Gewebes, den Oberflächenbereich des Gewebes, die Schwere der Krankheit oder Störung sowie Alter, Größe, Gewicht, Gesundheit und physischer Zustand des zu behandelnden Individuums. Im Allgemeinen wird eine höhere Dosis bevorzugt, wenn das Gewebe größer oder die Erkrankung oder Störung schwerer ist.

[0084] Ein geringes Ausmass an Experimentieren kann notwendig sein, um die wirksamste Dosis und Häufigkeit der Dosisverabreichung zu bestimmen, wobei dies zu den Fähigkeiten des Fachmanns gehört, sobald er von der vorliegenden Offenbarung in Kenntnis gesetzt wurde.

[0085] Zur Behandlung einer Störung des ZNS bei einem Menschen, einschließlich neurologischer, viraler, proliferativer oder immunmodulatorischer Störungen, ist eine therapeutisch wirksame Menge oder Dosis eines Zytokins von etwa 0,14 nmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 nmol/kg Gehirngewicht und von etwa 0,14 nmol/kg

Gehirngewicht bis etwa 69 nmol/kg Gehirngewicht. In manchen Behandlungsplänen umfassen therapeutisch wirksame Dosen zur Verabreichung eines Zytokins etwa 0,13, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 110, 120, 130 oder 140 nmol/kg Gehirngewicht. Bei der Behandlung einer Störung des ZNS bei einem Menschen, einschließlich neurologischer, viraler, proliferativer oder immunmodulatorischer Störungen, beträgt die therapeutisch wirksame Menge oder Dosis von IFN- β oder der biologisch aktiven Variante desselben von etwa 0,14 nmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 nmol/kg Gehirngewicht und von etwa 0,14 nmol/kg Gehirngewicht bis etwa 69 nmol/kg Gehirngewicht. In manchen Behandlungsplänen umfassen therapeutisch wirksame Dosen zur Verabreichung von IFN- β etwa 0,13, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 110, 120, 130 oder 140 nmol/kg Gehirngewicht.

[0086] Es ist ferner verständlich, dass die therapeutisch wirksame Menge oder Dosis eines Zytokins für einen Menschen geringer sein kann, wenn das Zytokin über das nasale Lymphsystem an verschiedene Gewebe des Kopfes und Nackens verabreicht wird, um Störungen oder Erkrankungen, die durch Immun- und inflammatorische Antworten charakterisiert sind (d.h. Erkrankungen, die zu akuten oder chronischen Entzündungen und/oder Infiltration durch Lymphozyten führen), zu behandeln oder vorzubeugen. In diesen Ausführungsformen kann das Zytokin (wenngleich das Zytokin in dem oben beschriebenen Dosisbereich verabreicht werden kann) auch von in einer Menge von etwa 0,02 bis etwa 138 pmol/kg Gehirngewicht verabreicht werden. Alternativ dazu kann das Zytokin in einer Menge von 0,02, 0,03, 0,08, 0,1, 0, 2, 0, 3, 0, 4, 0, 5, 0, 6, 0, 7, 0, 8, 0,9, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 110, 120, 130 oder 140 pmol/kg Gehirngewicht verabreicht werden. In ähnlicher Weise kann, wenn das Zytokin IFN- β ist, der Dosisbereich auch von etwa 0,02 bis etwa 138 pmol/kg Gehirngewicht betragen. Alternativ dazu kann das Zytokin in einer Menge von etwa 0,02, 0,03, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 110, 120, 130 oder 140 pmol/kg Gehirngewicht verabreicht werden.

[0087] Diese Dosierungen hängen von Faktoren ab, einschließlich der Effizienz, mit der das Zytokin IFN- β zum ZNS oder lymphatischen System transportiert wird. Eine größere Gesamtdosis kann durch mehrere Verabreichungen des Mittels zugeführt werden.

Intermittierende Dosierung

[0088] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die die therapeutisch wirksame Zytokindosis umfassende pharmazeutische Zusammensetzung intermittierend zu verabreichen. Mit "intermittierender Verabreichung" ist die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Zytokindosis, gefolgt von einem Zeitraum des Absetzens, der dann gefolgt wird von einer weiteren Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis usw., gemeint. Die Verabreichung der therapeutisch wirksamen Dosis kann kontinuierlich erreicht werden, wie z.B. mit einer Retard-Formulierung, oder kann gemäß eines erwünschten täglichen Dosierungsplans, wie z.B. durch ein, zwei, drei oder mehr Verabreichungen pro Tag, erreicht werden. Mit "Zeitraum des Absetzens" wird ein Absetzen der kontinuierlichen Retardverabreichung oder täglichen Verabreichung des Zytokins gemeint. Der Zeitraum des Absetzens kann länger oder kürzer als der Zeitraum der kontinuierlichen Retardverabreichung oder der täglichen Verabreichung sein. Während des Zeitraums des Absetzens ist der Zytokinspiegel in dem relevanten Gewebe wesentlich unter dem maximalen Spiegel, der während der Behandlung erreicht wird. Die bevorzugte Länge des Zeitraums des Absetzens hängt von der Konzentration der wirksamen Dosis und der verwendeten Form des Zytokins ab. Der Zeitraum des Absetzens kann mindestens 2 Tage sein, ist bevorzugt mindestens 4 Tage, mehr bevorzugt mindestens 1 Woche und überschreitet im Allgemeinen einen Zeitraum von 4 Wochen nicht. Bei Verwendung einer Retard-Formulierung muss der Zeitraum des Absetzens verlängert werden, um die größere Verweilzeit des Zytokins am Ort der Verletzung in Betracht zu ziehen. Alternativ dazu kann die Häufigkeit der Verabreichung der wirksamen Dosis der Retard-Formulierung demgemäß verringert werden. Ein intermittierender Verabreichungsplan des Zytokins kann weitergeführt werden, bis der gewünschte therapeutische Wirkung und schließlich die Behandlung der Erkrankung oder Störung erreicht wird.

[0089] In einer anderen Ausführungsform ist die intermittierende Verabreichung der therapeutisch wirksamen Dosis des Zytokins zyklisch. Mit "zyklisch" ist eine intermittierende Verabreichung, begleitet von Pausen in der Verabreichung gemeint, wobei Zyklen im Bereich von etwa 1 Monat bis etwa 2, 3, 4, 5 oder 6 Monate sind. Der Verabreichungsplan könnte zum Beispiel eine intermittierende Verabreichung der wirksamen Zytokindosis sein, wobei eine einzelne kurzfristige Dosis einmal pro Woche 4 Wochen lang gegeben wird, gefolgt von einer Pause der intermittierenden Verabreichung für einen Zeitraum von 3 Monaten, gefolgt von einer intermittierenden Verabreichung durch Verabreichung einer einzelnen kurzfristigen Dosis, die einmal pro Woche für 4 Wochen gegeben wird, gefolgt von einer Pause in der intermittierenden Verabreichung für einen Zeitraum von 3 Monaten usw. Als weiteres Beispiel kann eine einzelne kurzfristige Dosis 2 Wochen lang einmal pro Woche gegeben werden, gefolgt von einer Pause in der intermittierenden Verabreichung für einen Zeitraum von 1 Mo-

nat, gefolgt von einer einzelnen kurzfristigen Dosis, einmal pro Woche für 2 Wochen gegeben, gefolgt von einer Pause in der intermittierenden Verabreichung für einen Zeitraum von 1 Monat usw. Ein zyklisch intermittierender Verabreichungsplan des Zytokins an das Subjekt kann fortgeführt werden, bis die gewünschte therapeutische Wirkung und schließlich die Behandlung der Erkrankung oder Störung erreicht wird.

Neuraler Transport

[0090] Eine Ausführungsform der vorliegenden medizinischen Verwendung umfasst eine solche Verabreichung des Zytokins an das Subjekt, dass das Zytokin entlang eines neuralen Weges zum lymphatischen System, Tränenrinne, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark transportiert wird. Ein neuraler Weg umfasst Transport in oder entlang eines Neurons, durch oder über Lymphgefäßen, die an einem Neuron entlang laufen, durch oder über den perivaskulären Raum eines Blutgefäßes, das an einem Neuron oder neuralen Weg entlang läuft, durch oder über eine Adventitia eines Blutgefäßes, das an einem Neuron oder neuralen Weg entlang läuft, oder durch ein hämangiolympathisches System. Die Erfindung bevorzugt den Transport eines Zytokins über einen neuralen Weg eher als durch das Kreislaufsystem, sodass Zytokine, die nicht oder nur im geringen Maße in der Lage sind, die Bluthirnschranke vom Blutstrom in das Hirn zu überwinden, dem lymphatischen System, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark zugeführt werden. Sobald die Bluthirnschranke überwunden und das Zytokin im ZNS ist, kann das Zytokin durch lymphatische Kanäle, durch einen perivaskulären Raum oder Transport durch oder entlang Neuronen den verschiedenen Bereiche des Gehirns oder Rückenmarks zugeführt werden. In einer Ausführungsform sammelt sich das Zytokin vorzugsweise in Bereichen mit der höchsten Dichte von Rezeptoren oder Bindungsstellen für dieses Zytokin an.

[0091] Die Verwendung eines neuralen Weges zum Transport eines Zytokins zum lymphatischen System, Tränenrinne, Gehirn, Rückenmark oder anderen Teilen des Zentralnervensystems vermeidet das Hindernis, das durch die Bluthirnschranke dargestellt wird, sodass Medikamente, die normalerweise diese Schranke nicht überqueren können, direkt dem Hirn, Cerebellum, Hirnstamm oder Rückenmark zugeführt werden können. Obwohl das verabreichte Zytokin in den Blutstrom sowie auch in den neuralen Weg aufgenommen werden kann, führt das Zytokin systemisch vorzugsweise zu minimalen Wirkungen. Zusätzlich kann die Erfindung für die Zuführung einer konzentrierteren Menge des Zytokins an neurale Zellen sorgen, da das Zytokin nicht in der im Blutstrom vorhandenen Flüssigkeit verdünnt wird. Als solche stellt die Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Zuführung eines Zytokins zum lymphatischen System, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark bereit.

Der olfaktorische neurale Weg

[0092] Eine Ausführungsform der vorliegenden medizinischen Verwendung umfasst eine Zuführung des Zytokins an das Subjekt, sodass das Zytokin entlang eines olfaktorischen neuralen Weges in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark transportiert wird. Üblicherweise umfasst eine solche Ausführungsform die Verabreichung des Zytokins an Gewebe, das vom Nervus olfactorius innerviert und innerhalb der Nasenhöhle ist. Der olfaktorische neurale Weg innerviert primär das olfaktorische Epithel im oberen Drittel der Nasenhöhle, wie oben beschrieben wird. Die Anwendung des Zytokins an ein vom Nervus olfactorius innerviertes Gewebe kann das Zytokin an geschädigte Neuronen oder Zellen des ZNS, Gehirns oder Rückenmarks zuführen. Geruchs-Neuronen innervieren dieses Gewebe und können (so wird angenommen) aufgrund ihrer Rolle beim Riechen eine direkte Verbindung zum ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark herstellen.

[0093] Die Zuführung über den olfaktorischen neuralen Weg kann Lymphgefäße nutzen, die mit dem Nervus olfactorius zu verschiedenen Gehirnbereichen und von dort in durale Lymphgefäße, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind, führen. Der Transport entlang des Nervus olfactorius kann Zytokine auch einem Riechkolben zuführen. Ein perivaskulärer Weg und/oder ein hämangiolympathischer Weg, wie Lymphkanäle, die entlang der Adventitia cerebraler Blutgefäße verlaufen, können einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport therapeutischer Zytokine zum Gehirn und Rückenmark ausgehend von Geweben bereitstellen, die vom Nervus olfactorius innerviert sind.

[0094] Ein Zytokin kann an den Nervus olfactorius verabreicht werden, z.B. durch das Geruchsepithel. Solche Verabreichung kann extrazellulären oder intrazellulären (z.B. transneuralen) anterograden und retrograden Transport des Zytokins nutzen, das durch die Nervi olfactorii zum Gehirn und seinen Hirnhäuten, zum Hirnstamm oder zum Rückenmark eintritt. Sobald das Zytokin in oder auf vom Nervus olfactorius innervierten Gewebe verteilt ist, kann das Zytokin durch das Gewebe transportiert werden und entlang Geruchs-Neuronen in Bereiche des ZNS wandern, einschließlich des Hirnstamms, Cerebellums, Rückenmarks, Riechkolbens und kortikaler und subkortikaler Strukturen.

[0095] Die Zuführung durch den olfaktorischen neuralen Weg kann Bewegung eines Zytokins in oder über Mukosa oder Epithel in den Nervus olfactorius oder in ein Lymphgefäß, einen perivaskulären Raum eines Blutgefäßes, eine Adventitia eines Blutgefäßes oder ein Blutgefäß-Lymphgefäß, das mit dem Nervus olfactorius zum Gehirn wandert und von dort in meningiale Lymphgefäße, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind, nutzen. Blutgefäß-Lymphgefäße schließen Lymphkanäle ein, die sich um die Blutgefäße auf der Außenseite der Blutgefäße befinden. Dies bezeichnet man auch als das hämangiolympathische System. Das Einführen eines Zytokins in das Blutgefäß-Lymphsystem führt nicht notwendigerweise das Zytokin in das Blut ein.

Der trigeminale neurale Weg

[0096] Eine Ausführungsform der vorliegenden medizinischen Verwendung umfasst eine solche Zuführung des Zytokins an das Subjekt, dass das Zytokin entlang eines trigeminalen neuralen Weges in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark transportiert wird. Üblicherweise umfasst eine solche Ausführungsform die Verabreichung des Zytokins an ein vom Nervus trigeminus innerviertes Gewebe, einschließlich Gewebe innerhalb und außerhalb der Nasenhöhle. Der trigeminale neurale Weg innerviert verschiedene Gewebe des Kopfes und Gesichts, wie oben beschrieben wird. Insbesondere innerviert der Nervus trigeminus die/das nasale, sinusoidale, orale und konjunktivale Mukosa oder Epithel und die Haut des Gesichts. Die Anwendung des Zytokins auf ein vom Nervus trigeminus innerviertes Gewebe kann das Zytokin zu geschädigten Neuronen oder Zellen des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks oder zu Zellen des lymphatischen Systems bringen. Trigeminale Neurone innervieren diese Gewebe und können (so wird angenommen) aufgrund ihrer Rolle in dem allgemeinen chemischen Sinn einschließlich mechanischer Empfindung, thermischer Empfindung und Schmerzempfindung, (z.B. Detektion scharfer Gewürze und schädlicher Chemikalien) eine direkte Verbindung zum ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark bereitstellen.

[0097] Die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg kann Lymphgefäße nutzen, die entlang des Nervus trigeminus zum Pons und anderen Gehirnbereichen und von dort zu den duralen Lymphgefäßen, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind, wandern. Der Transport entlang des Nervus trigeminus kann Zytokine auch einem Riechkolben zuführen. Ein perivaskulärer Weg und/oder ein hämangiolympathischer Weg, wie Lymphgefäße, die innerhalb der Adventitia cerebraler Blutgefäße laufen, können einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport therapeutischer Zytokine zum Rückenmark bereitstellen, der von Gewebe ausgeht, das vom Nervus trigeminus innerviert ist.

[0098] Der Nervus trigeminus umfasst Axone mit großem Durchmesser, die mechanische Empfindungen, z.B. Berührung, vermitteln sowie Axone mit kleinem Durchmesser, die Schmerz und thermische Empfindungen vermitteln, wobei die Zellkörper von beiden in dem Ganglion semilunare (oder trigeminale) oder dem Nucleus tractus mesencephali nervi trigemini im Mittelhirn lokalisiert sind. Bestimmte Teile des Nervus trigeminus erstrecken sich in die Nasenhöhle, in die orale Mukosa und die Mukosa der Konjunktiva und/oder in das orale Epithel und das Epithel der Konjunktiva. Andere Teile des Nervus trigeminus erstrecken sich in die Haut von Gesicht, Stirn, oberem Augenlid, unterem Augenlid, Nasenrücken, Nasenseiten, oberer Lippe, Wange, Kinn, Kopfhaut und Zähne. Einzelne Fasern des Nervus trigeminus sammeln sich in einem größeren Bündel, wandern unterhalb des Gehirns und treten in die ventrale Seite des Pons ein. Ein Zytokin kann an den Nervus trigeminus verabreicht werden, z.B. durch die Nasenhöhlen-, orale, linguale und/oder Konjunktiva-Mukosa und/oder -Epithel, oder durch die Haut von Gesicht, Stirn, oberem Augenlid, unterem Augenlid, Nasenrücken, Nasenseiten, oberer Lippe, Wange, Kinn, Kopfhaut und Zähnen. Eine solche Verabreichung kann extrazellulären oder intrazellulären (z.B. transneuronalen) anterograden und retrograden Transport des Zytokins, das durch den zum Gehirn und seinen Hirnhäuten, zum Hirnstamm oder zum Rückenmark eintritt, nutzen. Sobald das Zytokin in oder auf vom Nervus trigeminus innerviertem Gewebe verteilt ist, kann das Zytokin durch das Gewebe transportiert werden und entlang trigeminaler Neurone in Bereiche des ZNS wandern einschließlich des Hirnstamms, Cerebellums, Rückenmarks, Riechkolbens und kortikaler und subkortikaler Strukturen.

[0099] Die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg kann die Bewegung eines Zytokins über Haut, Mukosa oder Epithel in den Nervus trigeminus oder in ein Lymphgefäß, in den perivaskulären Raum eines Blutgefäßes, in eine Adventitia eines Blutgefäßes oder in ein Blutgefäß-Lymphgefäß, das entlang des Nervus trigeminus zum Pons und von dort zu meningialen Lymphgefäßen verläuft, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind, nutzen. Blutgefäß-Lymphgefäße umfassen lymphatische Kanäle, die sich um die Blutgefäße auf der Außenseiten der Blutgefäße befinden. Dies wird auch als das hämangiolympathische System bezeichnet. Das Einführen eines Zytokins in die Blutgefäß-Lymphgefäße führt nicht notwendigerweise das Zytokin in das Blut ein.

Neurale Wege und nasale Verabreichung

[0100] In einer Ausführungsform kann die medizinische Verwendung der Erfindung die Zuführung über einen neuralen Weg, z.B. einen trigeminalen oder olfaktorischen neuralen Weg, nach Verabreichung in die Nasenhöhle nutzen. Bei Verabreichung in die Nasenhöhle kann die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg die Bewegung eines Zytokins durch die nasale Mukosa und/oder das nasale Epithel nutzen, um einen Nervus trigeminus oder einen perivaskulären und/oder lymphatischen Kanal zu erreichen, der entlang des Nervs verläuft. Nach Verabreichung in die Nasenhöhle kann die Zuführung über den olfaktorischen neuralen Weg die Bewegung eines Zytokins durch die nasale Mukosa und/oder das nasale Epithel nutzen, um den Nervus olfactorius oder einen entlang des Nervs verlaufenden perivaskulären und/oder lymphatischen Kanal zu erreichen.

[0101] Zum Beispiel kann das Zytokin so in die Nasenhöhle verabreicht werden, dass extrazellulärer oder intrazellulärer (z.B. transneuronaler) anterograder und retrograder Transport in und entlang des Nervus trigeminus und/oder des Nervus olfactorius genutzt wird, um das Gehirn, den Hirnstamm oder das Rückenmark zu erreichen. Sobald das Zytokin in und auf vom Nervus trigeminus und/oder vom Nervus olfactorius innervierter nasaler Mukosa und/oder nasalem Epithel verteilt ist, kann das Zytokin durch die nasale Mukosa und/oder das nasale Epithel transportiert werden und entlang trigeminaler und/oder olfaktorischer Nerven in Bereiche des ZNS wandern, einschließlich des Hirnstamms, Cerebellums, Rückenmarks, Riechkolbens und kortikaler und subkortikaler Strukturen. Alternativ dazu kann die Verabreichung in die Nasenhöhle zur Zuführung eines Zytokins in einen perivaskulären Raum eines Blutgefäßes oder in ein Lymphsystem führen, das entlang des Nervus trigeminus und/oder des Nervus olfactorius zum Pons, Riechkolben und zu anderen Gehirnregionen wandert, und von dort in meningiale Lymphgefäße, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind. Transport entlang des Nervus trigeminus und/oder des Nervus olfactorius kann in die Nasenhöhle verabreichte Zytokine auch zum Riechkolben, Mittelhirn, Diencephalon, Medulla und Cerebellum bringen. Ein in die Nasenhöhle verabreichtes Zytokin kann in die ventrale Dura des Gehirns eintreten und in Lymphkanäle innerhalb der Dura wandern.

[0102] Zusätzlich kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung so ausgeführt werden, dass sie einen perivaskulären Weg und/oder einen hämangiolympathischen Weg, wie einen lymphatischen Kanal nutzt, der entlang der Adventitia eines cerebralen Blutgefäßes verläuft, um einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport von Zytokinen zum Rückenmark ausgehend von nasaler Mukosa und/oder nasalem Epithel bereitzustellen. Ein über den hämangiolympathischen Weg transportiertes Zytokin tritt nicht notwendigerweise in den Kreislauf ein. Blutgefäß-Lymphgefäße, die mit dem Circulus arteriosus cerebri (circle of Willis) assoziiert sind, sowie auch Blutgefäße, die dem Nervus trigeminus oder dem Nervus olfactorius folgen, können beim Transport des Zytokins ebenfalls eine Rolle spielen.

[0103] Die Verabreichung in die Nasenhöhle unter Nutzung eines neuronalen Weges kann ein Zytokin zum lymphatischen System, Hirnstamm, Cerebellum, Rückenmark sowie zu kortikalen und subkortikalen Strukturen bringen. Das Zytokin kann diese Bewegung in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark allein bewerkstelligen. Alternativ dazu können der Träger oder andere den Transfer steigernde Faktoren beim Transport des Zytokins in und entlang des trigeminalen und/oder olfaktorischen neuralen Weges helfen. Die Verabreichung eines therapeutischen Zytokins in die Nasenhöhle kann die Bluthirnschranke durch ein Transportsystem von der nasalen Mukosa und/oder dem nasalen Epithel zum Gehirn und Rückenmark umgehen.

Neurale Wege und transdermale Verabreichung

[0104] In einer Ausführungsform kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung die Zuführung über einen neuralen Weg, z.B. einen trigeminalen neuralen Weg nach transdermaler Verabreichung nutzen. Bei transdermaler Verabreichung kann die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg die Bewegung eines Zytokins durch die Haut nutzen, um einen Nervus trigeminus oder einen perivaskulären und/oder lymphatischen Kanal, der entlang des Nervs verläuft, zu erreichen.

[0105] Zum Beispiel kann das Zytokin transdermal auf eine Art verabreicht werden, die extrazellulären oder intrazellulären (z.B. transneuronalen) anterograden und retrograden Transport in und entlang des Nervus trigeminus nutzt, um das Gehirn, den Hirnstamm oder das Rückenmark zu erreichen. Sobald das Zytokin in oder auf vom Nervus trigeminus innervierter Haut verteilt ist, kann das Zytokin durch die Haut transportiert werden und entlang trigeminaler Neurone in Bereiche des ZNS wandern, einschließlich des Hirnstamms, Cerebellums, Rückenmarks, Riechkolbens sowie kortikaler und subkortikaler Strukturen. Alternativ dazu kann die transdermale Verabreichung zur Zuführung eines Zytokins in einen perivaskulären Raum eines Blutgefäßes oder in ein

Lymphgefäß führen, das entlang des Nervus trigeminus zum Pons, Riechkolben und anderen Gehirnbereichen verläuft, und von dort in meningiale Lymphgefäße, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind. Der Transport entlang des Nervus trigeminus kann transdermal verabreichte Zytokine auch zu Riechkolben, Mittelhirn, Diencephalon, Medulla und Cerebellum bringen. Der ethmoidale Ast des Nervus trigeminus tritt in den kribriformen Bereich ein. Ein transdermal verabreichtes Zytokin kann in die ventrale Dura des Gehirns eintreten und in lymphatischen Kanälen in der Dura wandern.

[0106] Zusätzlich kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung so ausgeführt werden, dass sie einen perivaskulären Weg und/oder einen hämangiolympathischen Weg nutzt, wie einen lymphatischen Kanal, der entlang der Adventitia eines cerebralen Blutgefäßes verläuft, um einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport von Zytokin aus der Haut zum Rückenmark bereitzustellen. Ein vom hämangiolympathischen Weg transportiertes Zytokin tritt nicht notwendigerweise in den Kreislauf ein. Blutgefäß-Lymphgefäße, die mit dem Circulus arteriosus cerebri (circle of Willis) assoziiert sind, sowie auch Blutgefäße, die dem Nervus trigeminus folgen, können beim Transport des Zytokins ebenfalls eine Rolle spielen.

[0107] Die transdermale Verabreichung unter Nutzung eines neuralen Weges kann ein Zytokin zum Hirnstamm, Cerebellum, Rückenmark sowie zu kortikalen und subkortikalen Strukturen bringen. Das Zytokin kann diese Bewegung in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark allein bewerkstelligen. Alternativ dazu kann der Träger oder andere den Transfer fördernde Faktoren beim Transport des Zytokins in und entlang des trigeminalen neuralen Weges helfen. Die transdermale Verabreichung eines therapeutischen Zytokins kann die Bluthirnschranke durch ein Transportsystem von der Haut zum Gehirn und Rückenmark umgehen.

Neurale Wege und sublinguale Verabreichung

[0108] In einer anderen Ausführungsform kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung die Zuführung über einen neuralen Weg nutzen, z.B. einen trigeminalen neuralen Weg nach sublingualer Verabreichung. Bei sublingualer Verabreichung kann die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg die Bewegung eines Zytokins von unter der Zunge und über das linguale Epithel nutzen, um einen Nervus trigeminus oder einen perivaskulären oder lymphatischen Kanal zu erreichen, der entlang des Nervs verläuft.

[0109] Zum Beispiel kann das Zytokin sublingual so verabreicht werden, dass es extrazellulären oder intrazellulären (z.B. transneuralen) anterograden und retrograden Transport durch die orale Mukosa und anschließend in und entlang der trigeminalen Nerven nutzt, um das Gehirn, den Hirnstamm oder das Rückenmark zu erreichen. Sobald das Zytokin sublingual verabreicht wurde, kann das Zytokin mit Hilfe der peripheren Fortsätze trigeminaler Neurone durch die orale Mukosa in Bereiche des ZNS einschließlich des Hirnstammes, Rückenmarks und kortikaler und subkortikaler Strukturen transportiert werden. Alternativ dazu kann die sublinguale Verabreichung zur Zuführung eines Zytokins in Lymphgefäße führen, die entlang des Nervus trigeminus zum Pons sowie zu anderen Bereichen des Gehirns und von dort in meningiale Lymphgefäße führen, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind. Der Transport entlang des Nervus trigeminus kann sublingual verabreichte Zytokine auch zum Riechkolben, Mittelhirn, Diencephalon, Medulla und Cerebellum bringen. Der ethmoidale Ast des Nervus trigeminus tritt in den kribriformen Bereich ein. Ein sublingual verabreichtes Zytokin kann in die ventrale Dura des Gehirns eintreten und in lymphatischen Kanälen in Dura wandern.

[0110] Zusätzlich kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung so ausgeführt werden, dass sie einen hämangiolympathischen Weg wie einen lymphatischen Kanal, der entlang der Adventitia eines cerebralen Blutgefäßes verläuft, nutzt, um einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport eines Zytokins von der oralen Submukosa zum Rückenmark bereitzustellen. Ein von dem hämangiolympathischen Weg transportiertes Zytokin tritt nicht notwendigerweise in den Kreislauf ein. Blutgefäß-Lymphgefäße, die mit dem Circulus arteriosus cerebri (circle of Willis) assoziiert sind, sowie auch Blutgefäße, die dem Nervus trigeminus folgen, können beim Transport des Zytokins ebenfalls eine Rolle spielen.

[0111] Die sublinguale Verabreichung unter Nutzung eines neuralen Weges kann ein Zytokin zum Hirnstamm, Cerebellum, Rückenmark sowie zu kortikalen und subkortikalen Strukturen bringen. Das Zytokin kann diese Bewegung in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark allein bewerkstelligen. Alternativ dazu können der Träger und andere den Transfer fördernde Faktoren beim Transport des Zytokins in und entlang des trigeminalen neuralen Weges helfen. Die sublinguale Verabreichung eines therapeutischen Zytokins kann die Bluthirnschranke durch ein Transportsystem von der oralen Mukosa zum Gehirn und Rückenmark umgehen.

[0112] In einer anderen Ausführungsform kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung die Zuführung über einen neuralen Weg, z.B. einen trigeminalen neuralen Weg nach Konjunktiva-Verabreichung nutzen. Nach Konjunktiva-Verabreichung kann die Zuführung über den trigeminalen neuralen Weg die Bewegung eines Zytokins von der Konjunktiva (Bindehaut) durch das Konjunktiva-Epithel nutzen, um den Nervus trigeminus oder lymphatische Kanäle zu erreichen, die entlang des Nervs verlaufen.

[0113] Zum Beispiel kann das Zytokin an der Konjunktiva so verabreicht werden, dass extrazellulärer oder intrazellulärer (z.B. transneuronaler) anterograder und retrograder Transport durch die Konjunktiva-Mukosa und anschließend in und entlang der trigeminalen Nerven genutzt wird, um das Gehirn, den Hirnstamm oder das Rückenmark zu erreichen. Sobald das Zytokin an der Konjunktiva verabreicht wurde, kann das Zytokin mit Hilfe der peripheren Fortsätze trigeminaler Neuronen durch die Konjunktiva-Mukosa in Bereiche des ZNS einschließlich des Hirnstamms, Rückenmarks und kortikaler und subkortikaler Strukturen transportiert werden. Alternativ dazu kann die Konjunktiva-Verabreichung zur Zuführung eines Zytokins in Lymphgefäße führen, die entlang des Nervus trigeminus zum Pons und zu anderen Gehirnbereichen verlaufen, und von dort in meningealen Lymphgefäße, die mit Teilen des ZNS wie dem Rückenmark assoziiert sind. Der Transport entlang des Nervus trigeminus kann über die Konjunktiva verabreichte Zytokine auch zum Riechkolben, Mittelhirn, Diencephalon, Medulla und Cerebellum bringen. Der ethmoidale Ast des Nervus trigeminus tritt in den kribriformen Bereich ein. Ein über die Konjunktiva verabreichtes Zytokin kann in die ventrale Dura des Gehirns eintreten und innerhalb der Dura in lymphatischen Kanälen wandern.

[0114] Zusätzlich kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung so ausgeführt werden, dass sie einen hämangiolympathischen Weg nutzt, wie einen lymphatischen Kanal, der entlang der Adventitia eines cerebralen Blutgefäße verläuft, um einen zusätzlichen Mechanismus zum Transport eines Zytokins von der Konjunktiva-Submukosa zum Rückenmark bereitzustellen. Ein durch den hämangiolympathischen Weg transportiertes Zytokin tritt nicht notwendigerweise in den Kreislauf ein. Blutgefäß-Lymphgefäße, die mit dem Circulus arteriosus cerebri (circle of Willis) assoziiert sind, sowie auch Blutgefäße, die dem Nervus trigeminus folgen, können beim Transport des Zytokins ebenfalls eine Rolle spielen.

[0115] Die Konjunktiva-Verabreichung unter Nutzung eines neuronalen Weges kann ein Zytokin zu Hirnstamm, Cerebellum, Rückenmark sowie zu kortikalen und subkortikalen Strukturen bringen. Das Zytokin kann diese Bewegung in das ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark allein bewerkstelligen. Alternativ dazu können der Träger oder andere den Transfer fördernde Faktoren beim Transport des Zytokins in und entlang des trigeminalen neuralen Weges helfen. Die Konjunktiva-Verabreichung eines therapeutischen Zytokins kann die Bluthirnschranke durch ein Transportsystem von der Konjunktiva-Mukosa zum Gehirn und Rückenmark umgehen.

Ware und Verfahren der Herstellung

[0116] Vorliegend wird ferner gefertigte Ware beschrieben, die ein Zytokin zur Verabreichung an ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark bereitstellt. Die gefertigte Ware kann ein Fläschchen oder ein anderes Behältnis umfassen, das eine für das vorliegende Verfahren geeignete Zusammensetzung zusammen mit einem beliebigen Träger enthält, entweder trocken oder in flüssiger Form. Die gefertigte Ware umfasst ferner Anweisungen, um das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, in Form eines Schildes auf dem Behältnis und/oder in Form eines Beiblattes, das in einer Box, in der das Behältnis verpackt ist, eingeschlossen ist. Die Anweisungen können auch auf der Box, in der das Fläschchen verpackt ist, aufgedruckt sein. Die Anweisungen enthalten Informationen wie ausreichende Dosierung und Verabreichungsinformation, um dem Subjekt oder einem auf dem Gebiet Tätigen zu erlauben, das Zytokin zu verabreichen. Es wird angenommen, dass ein auf dem Gebiet Tätiger jeden Arzt, Krankenschwester, Techniker, Ehepartner oder anderen Helfenden umfasst, der das Zytokin verabreichen könnte. Das Zytokin kann auch durch das Subjekt selbst verabreicht werden.

[0117] Ein Zytokin kann zur Herstellung einer Zytokinzusammensetzung oder eines zur intranasalen, Konjunktiva-, transdermalen und/oder sublingualen Verabreichung geeigneten Medikaments verwendet werden. Zum Beispiel kann eine flüssige oder feste Zusammensetzung auf mehrere Arten hergestellt werden, wobei herkömmliche Methoden verwendet werden. Eine flüssige Zusammensetzung kann durch Auflösen eines Zytokins in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Wasser, bei einem geeigneten pH-Wert hergestellt werden, einschließlich Puffern oder anderen Hilfsstoffen, z.B. um eine wie oben beschriebene Lösung herzustellen.

Störungen des Zentralnervensystems

[0118] In einer Ausführungsform kann die vorliegende medizinische Verwendung genutzt werden, um dem Gehirn Zytokine, insbesondere IFN- β , zur Diagnose, Behandlung oder Prävention von Störungen oder Erkrankungen des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks zuzuführen. IFN- β erhöht die astrozytische Produktion von Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) (Boutros et al. (1997) Journal of Neurochemistry 69:939-946) und IFN- β unterstützt das neuronale Wachstum in Zellkultur (Plioplys et al. (1995) Neuroimmunomodulation 2:131-135). IFN- β wurde daher mit neurotropher Aktivität in Verbindung gebracht; daher können die erfindungsgemäßen medizinischen Verwendungen zur Zuführung eines Zytokins zum ZNS verwendet werden, um Störungen oder Erkrankungen des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks zu behandeln oder zu verhindern.

[0119] Störungen des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks können neurologische oder psychiatrische Störungen sein und umfassen z.B. Gehirnerkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Lewy-Körperchen-Demenz, Multiple Sklerose, Epilepsie, cerebelläre Ataxie, progressive supranukleäre Lähmung, amyotrophe Lateralsklerose, affektive Störungen, Angststörungen, obsessive Zwangsstörungen, Persönlichkeitsstörungen, Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung, Tourette-Syndrom, Tay Sachs-Syndrom, Nieman Pick-Syndrom und andere Lipidspeicher-Erkrankungen und genetische Gehirnerkrankungen und/oder Schizophrenie. Das Verfahren kann auch bei Subjekten angewendet werden, die an Nervenschäden durch cerebrovaskuläre Störungen wie Schlaganfall im Gehirn oder Rückenmark, an ZNS-Infektionen einschließlich Meningitis und HIV, an Tumoren des Gehirns und Rückenmarks oder an einer vorherigen Erkrankung leiden oder einem Risiko dafür ausgesetzt sind. Das Verfahren kann auch genutzt werden, um Zytokine zuzuführen, um Störungen des ZNS, die sich aus normaler Alterung (z.B. Anosmie oder Verlust des allgemeinen chemischen Sinnes), Gehirnverletzung oder Rückenmarksverletzung zu begegnen.

[0120] Multiple Sklerose ist eine bevorzugte Erkrankung oder Störung des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks. Trotz ihrer möglichen Anwesenheit in der Peripherie ist Multiple Sklerose eine Erkrankung des ZNS. Demgemäß kann Multiple Sklerose effizienter durch ein Verfahren begegnet werden, das Interferone zum ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark bringt.

[0121] Eine andere bevorzugte Erkrankung des ZNS, Gehirns und/oder Rückenmarks ist Meningitis.

[0122] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins ist eine Menge, die ausreicht, um die Symptome und/oder zugrundeliegenden Ursachen einer beliebigen der obigen Störungen oder vorliegend diskutierten Erkrankungen zu verhindern, zu behandeln, zu reduzieren und/oder zu verbessern. Manchmal ist eine "wirksame Menge" ausreichend, um die Symptome dieser Erkrankungen zu eliminieren und vielleicht die Krankheit selbst zu überwinden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung beziehen sich die Begriffe "Behandeln" und "Therapie" und Ähnliche auf Lindern, Verlangsamen der Progression, Prophylaxe, Aufhalten oder Heilen einer existierenden Erkrankung. Vorbeugen, wie vorliegend verwendet, bezieht sich auf Verzögern, Verlangsamen, Inhibieren, Reduzieren oder Verbessern des Beginns von ZNS- oder Gehirn-Erkrankungen oder -Störungen. Es wird bevorzugt, dass eine ausreichende Menge Zytokin in nicht-toxischem Niveau appliziert wird, um ein wirksames Aktivitätsniveau innerhalb des ZNS bereitzustellen, um der Erkrankung vorzubeugen oder sie zu behandeln. Die medizinische Verwendung der vorliegenden Erfindung kann bei jedem Säugetier angewendet werden. Beispielhafte Säugetiere umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf: Ratten, Katzen, Hunde, Pferde, Kühe, Schafe, Schweine und, mehr bevorzugt, Menschen.

Weitere Ausführungsformen

Modulation von Immunantwort und inflammatorischer Antwort

[0123] Die von der vorliegenden Erfindung bereitgestellte medizinische Verwendung der Zytokin-Verabreichung erlaubt die direkte Verabreichung des Zytokins an das nasale lymphatische System. Nach dem Eintritt des Zytokins in die nasalen Lymphgefäße kann das Zytokin über die Lymphgefäße des Kopf- und Nackenbereiches verteilt werden. Damit kann das Verfahren der vorliegenden Erfindung genutzt werden, um dem lymphatischen System Zytokine zur Behandlung oder Vorbeugung von Störungen und Erkrankungen, die durch Immun- und inflammatorische Antworten charakterisiert sind (d.h. Erkrankungen, die zu akuter oder chronischer Entzündung und/oder zur Infiltration durch Lymphozyten führen) zuzuführen, einschließlich z.B. der tiefen und oberflächlichen Halsknoten und der verschiedenen Gewebe des Kopfes und Nackens. Die vorliegende Erfindung als solche stellt ein Verfahren zur Modulation der Immunantwort bereit. Mit Modulation ist jede Hoch- oder Herunterregulierung der Immunantwort oder inflammatorischen Antwort gemeint (d.h. das Beeinflussen systemischer Immunfunktionen, Antigenpräsentation, Zytokinproduktion und Eintritt von Leukozyten in das

ZNS).

[0124] Von besonderem Interesse in dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Verabreichung von IFN- β . Wie berichtet wurde, dient IFN- β wie viele Interferone als Immunmodulator einer Anzahl von Zielzellen (Hall et al. (1997) J. Neuroimmunol. 72:11-19). Zum Beispiel scheint IFN- β eine antiproliferative Wirkung auf Makrophagen auszuüben, dem "mitogenen Stimulus bestimmter Zytokine" entgegenzuwirken, die Aktivität natürlicher Killerzellen zu verbessern, um eine Steigerung in der Produktion zytotoxischer T-Lymphozyten zu induzieren, und auf große granuläre Lymphozyten zu wirken, um die Aktivität von Killerzellen zu steigern. Zusätzlich steigert IFN- β die Proliferation von B-Zellen und die Sekretion von IgM, IgG und IgA. Es wurde gezeigt, dass es die Expression von MHC der Klasse I hochreguliert, um eine Steigerung der Präsentation von Klasse I Antigen-beschränkten CD8-Zellen zu bewirken (Hall et al. (1997) J. Neuroimmunol. 72:11-19). Umgekehrt hat IFN- β eine inhibitorische Wirkung auf die Hochregulation der Klasse II-Oberflächenexpression. Damit umfassen die immunmodulatorischen Aktivitäten von IFN- β z.B. das Beeinflussen systemischer Immunfunktion, Antigenrepräsentation, Zytokinproduktion und Eintritt von Leukozyten in das ZNS (Yong et al. (1998) Neurology 51:582-689). Die erfindungsgemäße direkte Zuführung des Zytokins zum Lymphsystem des Kopfes und Nackens erlaubt dem Zytokin, die Immunantwort zu modulieren, d.h. chronische und akute Entzündung, Wundheilung und Autoimmunantwort zu beeinflussen; die Funktion durch Lymphozyten zu modulieren (die Infiltrierung von Lymphozyten in verletztes Gewebe zu reduzieren), usw.

[0125] Die immunmodulatorische Rolle von Zytokinen vorausgesetzt, kann die vorliegende Erfindung genutzt werden, um Zytokine, vorzugsweise IFN- β , verschiedenen Geweben des Kopfes und Nackens zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Erkrankungen und Störungen, die durch eine Immunantwort und inflammatorische Antwort charakterisiert sind, zuzuführen. Störungen und Erkrankungen von besonderem Interesse umfassen Multiple Sklerose (MS), Meningitis und Primäres Sjögren-Syndrom.

[0126] MS zeigt sich in der weißen Substanz des ZNS und des Rückenmarks als eine Anzahl sklerotischer Läsionen oder Plaques (Prineas (1985) Demyelinating Diseases, Elsevier: Amsterdam; Raine (1983) Multiple Sclerosis; Williams und Wilkins: Baltimore; Raine et al. (1988) J. Neuroimmunol. 20:189-201; und Martin (1997) J. Neural Transmission (Suppl) 49:53-67). Die charakteristische MS-Läsion ist entzündet, zeigt axonale Demyelinierung, axonale Degeneration und wird um schmale Venulen gefunden. Diese Charakteristika entwickeln sich üblicherweise früh in der Plaque-Entwicklung, und es wird angenommen, dass sie als Ergebnis eines Versagens der Bluthirnschranke (blood-brain barrier, BBB) auftreten. Als Konsequenz des Versagens der Bluthirnschranke treten Infiltrate, die aus verschiedenen Lymphozyten und Makrophagen bestehen, in das Gehirn ein. Die Infiltrate bewirken eine Verringerung der Entzündung, während sie die Anwesenheit von Glia-Narbengewebe erhöhen und unvollständige Remyelinierung hervorrufen (Martin (1997) J. Neural Transmission (Suppl) 49:53-67). Weiterhin wird angenommen, dass dieser offensichtlich immunologische Angriff nicht nur auf die Myelinscheide zielt, sondern auch auf die Oligodendrozyten, die für die ZNS-Myelinproduktion notwendig sind. Es ist bekannt, dass Zytokine die Symptome von MS wirksam vermindern. Zum Beispiel interessierte man sich für Interferon- β (IFN- β) als Behandlung für rezidivierende wiederauftretende MS. Zusätzlich hat sich auch Interesse für die Verwendung von Interferon- τ als wirksame Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie MS entwickelt. Siehe US-Patent Nr. 6,060,450.

[0127] Die immunmodulatorische Aktivität von IFN- β beeinflusst die klinischen Symptome von MS. Daher kann IFN- β nach den Verfahren der vorliegenden Erfindung verabreicht werden, um MS zu behandeln. Während die vorliegende Erfindung nicht durch den Mechanismus der IFN- β -Wirkung gebunden ist, nimmt man an, dass der ZNS-Schaden, der bei MS-Patienten entsteht, wegen der Hypersensitivitätsantwort vom verzögerten Typ entsteht. Dies ist eine Zell-vermittelte Antwort. Zuerst werden T-Zellen von Antigenen aktiviert und zum lymphoiden Organ befördert (Aktivierung). Das lymphoide Organ aktiviert dann diese T-Zellen, während weiterhin mehr T-Zellen zu seinem Ort rekrutiert werden (Rekrutierung). Die aktivierten Lymphozyten proliferieren und kehren in den Kreislauf zurück (Expansion). Sobald sie in den Kreislauf zurückgekehrt sind, wandern die aktivierten Lymphozyten durch den Blutstrom, wobei sie die die Kapillaren auskleidenden Endothelzellen überwinden (Migration). Diese wandernden Lymphozyten und Makrophagen steuern den Entzündungsbereich an, und werden durch ihn angezogen (Anziehung). Als Ergebnis dieser Anziehung folgen andere Lymphozyten zum Bereich der Entzündung und Gewebe wird zerstört (Gewebezerstörung). In der Folge wird die akute Antwort supprimiert (über Gewebeerstörung) und die Wiederherstellung des entzündeten Bereichs, die bei MS ziemlich begrenzt ist, kann beginnen (Wiederherstellung) (Kelley (1996) J. of Neuroscience Nursing 28:114-120). Daher initiiert die Migration aktivierter Lymphozyten aus dem Blut die Immunantwort und erlaubt damit die Penetration aktivierter Lymphozyten durch die Bluthirnschranke.

[0128] Beweise legen nahe, dass die immunmodulatorische Aktivität von IFN- β die Hochregulierung von

IFN- γ inhibiert, indem sie das Expansionsstadium der Hypersensitivitätsantwort vom verzögerten Typ inhibiert und damit die klinischen Symptome von MS beeinflusst. Insbesondere die Verringerung von Myelinschäden scheint als Ergebnis zweier hypothetisch angenommener Mechanismen der IFN- β -Wirkung aufzutreten: (1) Inhibierung von IFN- γ -induzierter Makrophagenaktivierung und (2) Inhibierung monozytischer TNF-Freisetzung (Kelly (1996) *J. Neuroscience Nursing* 28:114-120). Mögliche Orte der IFN- β -Wirkung, die von diesen Hypothesen angenommen werden, umfassen systemische Immundefunktion, Antigenpräsentation, Zytokinproduktion und Eintritt von Leukozyten in das ZNS (Yong et al. (1998) *Neurology* 51:682-689). Jeder dieser Orte wurde in Menschen- und Tierexperimenten von MS sorgfältig durchdacht.

[0129] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung von MS gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die klinischen Symptome von MS zu verringern oder abzuschwächen. Zum Beispiel wird die experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) häufig als Tiermodell von MS verwendet. Eine therapeutisch wirksame Menge eines gemäß der vorliegenden Erfindung zugeführten Zytokins wird dergestalt sein, dass sie klinische Symptome von EAE in dem Versuchstier (d.h. Ratten oder Mäusen) verbessert. EAE wird in Ratten auf einer Skala von 0 bis 4 beurteilt: 0, klinisch normal; 1, Lähmung mit schlaffem Schwanz; 2, Schwäche der hinteren Glieder; 3, Lähmung der hinteren Glieder; 4, vordere und hintere Glieder beeinträchtigt. Eine wirksame gemäß der vorliegenden Erfindung verabreichte Menge Zytokin wird wirksam sein, wenn es eine mindestens 30%ige, 40%ige, 50%ige oder eine größere Verringerung des mittleren kumulativen Werts über mehrere Tage nach Einsetzen der Symptome der Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe gibt.

[0130] Weiterhin kann eine wirksame Behandlung von MS auf mehrere alternative Arten untersucht werden, einschließlich EDSS (extended disability status scale; erweiterte Skala des Behinderungsstatus), Auftreten von Verschlimmerungen oder MRI. Sofern beliebige der folgenden Kriterien erfüllt werden, belegt dies eine wirksame Behandlung.

[0131] EDSS ist ein Mittel, um die klinische Behinderung aufgrund von MS zu bewerten (Kurtzke (1983) *Neurology* 33: 1444). Acht funktionelle Systeme werden nach Art und Schwere der neurologischen Behinderung bewertet. Vor der Behandlung wird die Behinderung in folgenden Systemen bewertet: pyramidal, cerebellar, Hirnstamm, sensorisch, Darm und Blase, visuell, cerebral und andere. Nachfolgeuntersuchungen werden in bestimmten Intervallen durchgeführt. Die Skala bewegt sich im Bereich von 0 (normal) bis 10 (Tod wegen MS). Eine Verminderung eines ganzen Schrittes definiert im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine wirksame Behandlung (Kurtzke (1994) *Ann. Neurol.* 36:573-79).

[0132] Verschlimmerungen werden als Auftreten eines neuen Symptoms definiert, das MS zugeordnet werden kann und von einer passenden neuen neurologischen Abnormalität begleitet ist (IFN- β MS Study Group, siehe oben). Zusätzlich muss die Verschlimmerung mindestens 24 Stunden andauern und auf eine Stabilität oder Verbesserung von mindestens 30 Tagen folgen. Standardneurologische Untersuchungen führen dazu, dass die Verschlimmerungen gemäß Änderungen auf einer neurologischen Bewertungsskala (Sipe et al. (1984) *Neurology* 34:1368) entweder als mild, moderat oder schwer klassifiziert werden. Eine jährliche Verschlimmerungsrate und der Anteil von verschlimmerungsfreien Patienten werden bestimmt. Die Behandlung wird als wirksam betrachtet, wenn bei irgendeiner dieser Messungen ein statistisch signifikanter Unterschied in der Rate oder in dem Anteil von verschlimmerungsfreien Patienten zwischen der behandelten Gruppe und der Placebogruppe auftritt.

[0133] Mal kann verwendet werden, um aktive Läsionen unter Verwendung von Gadolinium-DPTA-verstärkter Bildgebung zu messen (McDonald et al. (1994) *Ann. Neurol.* 36:14) oder die Lokalisierung und das Ausmaß von Läsionen unter Verwendung von T₂-gewichteten Methoden zu messen. Es werden Basis-MRIs erhalten. Dieselbe Bildgebungsebene und Position des Patienten werden für jede darauffolgende Untersuchung verwendet. Bereiche mit Läsionen werden abgegrenzt und Schicht für Schicht für die gesamte Läsionsfläche aufsummiert. Drei Analysen können durchgeführt werden: Anzeichen neuer Läsionen, Geschwindigkeit des Auftretens aktiver Läsionen und prozentuale Änderungen der Läsionsfläche (Paty et al. (1993) *Neurology* 43:665). Eine Verbesserung durch eine Therapie wird festgestellt, wenn es eine statistisch signifikante Verbesserung bei einem individuellen Patienten im Vergleich zur Basis oder in einer behandelten Gruppe gegenüber einer Placebogruppe gibt.

[0134] Es ist weiterhin verständlich, dass zusätzliche Stoffe mit dem Zytokin verabreicht werden können, um eine therapeutische Wirkung zu bewirken. Zum Beispiel wurde IGF-1 mit der Vorhinderung einer Depletion reifer Oligodendrozyten und dem Fördern der Erholung von Demyelinierung bei MS und anderen demyelinisierenden Störungen in Verbindung gebracht. Siehe z.B. Mason et al. (2000) *J. Neuroscience* 20:5703-5708, vorliegend durch Bezugnahme eingeschlossen. Damit kann IFN- β in Verbindung mit IGF-1 zur Behandlung von

MS verabreicht werden. Die Stoffe können durch die erfindungsgemäßen Verfahren verabreicht werden. Alternativ dazu kann einer der Stoffe durch ein beliebiges im Stand der Technik bekanntes Verfahren verabreicht werden, einschließlich z.B. subkutaner und intramuskulärer Arten der Verabreichung.

[0135] Das gemäß der vorliegenden Erfindung verwendete IGF-1 kann in einer im Wesentlichen gereinigten, nativen, rekombinant hergestellten oder chemisch synthetisierten Form vorliegen. Zum Beispiel kann IGF-1 durch bekannte Verfahren direkt aus Blut isoliert werden, z.B. aus Serum oder Plasma. Siehe z.B. Phillips (1980) *New Eng. J. Med.* 302:371-380; Svoboda et al. (1980) *Biochemistry* 19:790-797; Cornell und Boughdady (1982) *Prep. Biochem.* 12:57; Cornell und Boughdady (1984) *Prep. Biochem.* 14:123; Europäisches Patent Nr. 123,228 und US-Patent Nr. 4,769,361. IGF-1 kann ferner in dem Hefestamm *Pichia pastoris* rekombinant hergestellt und im Wesentlichen wie in den US-Patent Nrn. 5,324,639, 5,324,660 und 5,650,496 und der Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 96/40776 beschrieben gereinigt werden.

[0136] Alternativ dazu kann IGF-1 mit einer beliebigen von mehreren, den Peptidfachleuten bekannten Techniken chemisch synthetisiert werden. Siehe z.B. Li et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2216-2220; Stewart und Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) und Barany und Merrifield (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Hrsg. Gross und Meienhofer, Band 2, (Academic Press, New York, 1980), Seiten 3-254, für Festphasenpeptidsynthesemethoden; und Bodansky (1984) *Principles of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin) und Gross und Meienhofer, Hrsg. (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Band 1 (Academic Press, New York) zur klassischen Synthese in Lösung. IGF-1 kann auch chemisch durch das Verfahren simultaner multipler Peptidsynthese hergestellt werden. Siehe z.B. Houghten (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135; und US-Patent Nr. 4,631,211. Ferner werden in WO 99/24062, mit dem Titel: Novel IGF-1 Compositions and Its Use Verfahren zur Herstellung einer hochkonzentrierten, wenig Salz enthaltenden, biologisch aktiven Form von IGF-1 oder einer Variante desselben bereitgestellt.

[0137] Verfahren zur Herstellung von IGF-1-Fragmenten, Analoga und Derivaten sind im Stand der Technik verfügbar. Siehe allgemein US-Patent Nrn. 4,738,921, 5,158,875 und 5,077,276; Internationale Veröffentlichung Nrn. WO 85/00831, WO 92/04363, WO 87/01038 und WO 89/05822; und Europäisches Patent Nrn. 135094, 123228 und 128733.

[0138] Zusätzlich sind mehrere IGF-1-Varianten im Stand der Technik bekannt und umfassen solche, die z.B. beschrieben sind in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986):4904-4907; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 (1987):398-404; *J. Biol. Chem.* 263 (1988):6233-6239; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989):766-771; Forsbert et al. (1990) *Biochem. J.* 271:357-363; US-Patent Nrn. 4,876,242 und 5,077,276 und Internationale Veröffentlichungen Nrn. WO 87/01038 und WO 89/05822. Repräsentative Varianten umfassen eine solche mit einer Deletion von Glu-3 des reifen Moleküls, eine Variante, bei der bis zu 5 Aminosäuren des N-Terminus trunziert sind, eine Variante mit einer Trunkierung der ersten drei N-terminalen Aminosäuren (als des(1-3)-IGF-1, des-IGF-1, tIGF-1 oder Gehirn-IGF bezeichnet) und eine Variante, die die ersten 17 Aminosäuren der B-Kette von humanem Insulin anstelle der ersten 16 Aminosäuren von humanem IGF-1 umfasst.

[0139] Meningitis bezieht sich auf einen inflammatorischen Prozess von Leptomeninx und CSF im subarachnoidalen Raum. Meningoencephalitis bezieht sich auf die Entzündung der Meninges und des Gehirnparenchyms. Meningitis wird normalerweise durch eine Infektion verursacht, aber die chemische Meningitis kann auch als Antwort auf ein in den subarachnoidalen Raum eingeführtes nicht-bakterielles Irritans auftreten. Eine Infiltration des subarachnoidalen Raums durch Karzinom wird als Meningealkarzinomatose und die Infiltration durch Lymphome als lymphompyogene (normalerweise bakterielle), aseptische (normalerweise virale) und chronische (meist jedes infektiöse Agens) bezeichnet.

[0140] Es wurde vorgeschlagen, dass Schaden am Zentralnervensystem, der bei viraler und bakterieller Meningitis auftritt, mehr auf die Invasion der Oberfläche des Gehirns durch die eigenen Lymphozyten des Wirts als Antwort auf das Meningitispathogen zurückzuführen ist, und nicht auf das Pathogen selbst oder ein durch das Pathogen produziertes Toxin (Lewis (1979) *The Medusa and The Snail*, Penguin Books). Tatsächlich werden viele Patienten trotz rascher Sterilisation der Cerebrospinalflüssigkeit unter Verwendung aktueller aggressiver Behandlungen, wie der Cephalosporine dritter Generation, Opfer der Erkrankung. Dieses unerwartete Ergebnis kann sich aus den schädlichen Wechselwirkungen zwischen Wirtszellen/Geweben und bakteriellen Komponenten ergeben, die durch Behandlung mit lytischen Antibiotika freigesetzt werden (Scand et al. (1991) *J. Infect. Dis. Supp.* 74:173-179). Der Ausbruch von Peptidoglycan, kapsulären Polysacchariden und Lipopolysaccharid, die von den Bakterien freigesetzt wurden, induziert die Produktion einer Anzahl von Mediatoren im Zentralnervensystem, einschließlich TNF- α , was zu meningealer und perivaskulärer Entzündung in dem

subarachnoidalen Raum führt. Daraus folgt eine Störung der Bluthirnschranke, die zu cerebralen Ödemen, Ischämie und einem dramatischen Anstieg im Interkranialdruck führt. Diejenigen, die die akute Phase der Erkrankung überleben, bleiben oft mit multiplen neurologischen Folgeerscheinungen zurück. Frühere Ergebnisse aus Versuchen unter Verwendung von auf Steroiden basierenden anti-inflammatorischen Mitteln (entweder vor oder gleichzeitig mit der Antibiotika-Verabreichung) legen nahe, dass ein solcher Ansatz wertvoll sein kann. Siehe z.B. Mustafa et al. (1990) *Amer. J. Diseases of Children* 144:883-887. Daher könnte die Verabreichung eines Zytokins, insbesondere von Interferon- β , unter Verwendung der Verfahren der vorliegenden Erfindung wirksam sein, um Schäden durch aktivierte Lymphozyten zu verhindern. Die Verfahren der Erfindung könnten in Verbindung mit den existierenden Behandlungen für Meningitis verwendet werden, um bei der Vermeidung von Hirnschäden zu helfen. Solche Behandlungen werden in Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, 1994), Seiten 2296-2309, beschrieben.

[0141] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung von Meningitis gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die klinischen Symptome von Meningitis zu verringern oder zu vermindern. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Zytokin in Verbindung mit einem antibiotischen Behandlungsplan zu verabreichen. Eine wirksame Menge des Zytokins verbessert, als solche die Aktivität der Antibiotika und führt zu einem verbessertem Überleben und/oder einem verbessertem klinischen Status der Tiere im Vergleich zu Tieren, die allein mit Antibiotika behandelt wurden. Solche klinischen Erscheinungsformen können z.B. 1) eine schnellere Normalisierung der ZNS-Entzündungsindices im Vergleich zu einer Kontrolle; 2) ein schnelleres Verschwinden von Fieber im Vergleich zu einer Kontrolle; 3) eine Verringerung der gesamten neurologischen Folgeerscheinungen; und/oder 4) eine verbesserte Mortalität im Vergleich zu einer Kontrolle umfassen. Ausführlichere Details in Bezug auf die klinischen Erscheinungsformen von Meningitis, die nach Verabreichung einer wirksamen Konzentration eines Zytokins verbessert sein können, können in Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, 1994), Seiten 2296-2309, gefunden werden.

[0142] Primäres Sjögren-Syndrom, auch als Trockenes Augen-Syndrom bekannt, ist durch eine verminderte Sekretion der Tränendrüsen charakterisiert, die die wässrige Lage des Tränenfilms bilden, welcher das Auge befeuchtet. Viele von Sjögren-Syndrom betroffene Patienten leiden wegen einer verringerten Sekretion der Speicheldrüsen auch an einem trockenen Mund. Dies ist eine durch chronische Entzündung und Infiltration der Tränen- und Speicheldrüsen durch Lymphozyten charakterisierte Autoimmunerkrankung. Aktivierte T-zellen des CD4⁺-Typs, die die Tränendrüse infiltrieren, vermitteln eine Gewebeerstörung (Tabbara et al. (1999) *Eur. J. Ophthalmol.* 9:1-7). Vor kurzem wurde gezeigt, dass nHu-IFN- α , das über die orale Mukosa-Route verabreicht wurde, die Leistung stimuliert (Ship et al. (1999) *J. Interferon Cytokine Res.* 19:480-488).

[0143] Daher sind gemäß der vorliegenden Erfindung Zytokine, insbesondere IFN- α und IFN- β , zu verabreichen, sodass die Stoffe direkt in das nasale, Lymphsystem eintreten. Das Interferon wird dann in den Lymphgefäßen des Kopf- und Nackenbereiches verteilt werden, wobei es die Funktion von Lymphozyten ändert, die die Tränen- und Speicheldrüsen beeinflussen. Es ist weiter verständlich, dass die Zuführung des Zytokins über den Nervus trigeminus oder den Nervus olfactorius zur direkten Zuführung des Zytokins zur Tränendrüse führen kann. Diese direkte Zuführung des Interferons zu den Lymphgefäßen des Kopf- und Nackenbereichs oder direkt zur Tränendrüse wird die Lymphozyteninfiltration der Tränen- und Speicheldrüsen verringern und das Sjögren-Syndrom behandeln.

[0144] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung von Sjögren-Syndrom gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die klinischen Symptome von Sjögren-Syndrom zu verringern oder zu vermindern. Eine wirksame Menge von Zytokin als solche führt zu einem verbesserten klinischen Status eines am Sjögren-Syndrom leidenden Patienten im Vergleich zu einem unbehandelten Patienten. Zum Beispiel umfasst ein verbesserter klinischer Status der oralen Symptome des Sjögren-Syndrom z.B. eine Gesamt-Erhöhung der Feuchtigkeit des Mundes, eine Verbesserung der Fähigkeit, trockenes Essen zu schlucken, eine Verbesserung der Fähigkeit, dauerhaft zu sprechen usw. Weiterhin umfasst eine wirksame Konzentration jede Verbesserung in den okularen Erscheinungsformen von Sjögren-Syndrom einschließlich z.B. einer Steigerung der Feuchtigkeit der Augen (d.h. eine Verringerung des sandigen oder kiesigen Gefühls unter den Augenlidern), eine Erhöhung des Tränenflusses und eine Verringerung von brennenden Empfindungen, von Röte, Jucken und Augenmüdigkeit. Verbesserungen umfassen auch eine Verbesserung der Tränendrüsenfunktion (d.h. eine Reduktion der Lymphozyteninfiltration in die Tränendrüse). Eine ausführlichere Beschreibung der klinischen Erscheinungsform von Sjögren-Syndrom kann in Harrison's Principles of Internal Medicine gefunden werden (McGraw Hill, 1994), Seiten 1662-1664, gefunden werden.

[0145] In einer anderen Ausführungsform kann die vorliegende medizinische Verwendung genutzt werden, um dem lymphatischen System, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark zur Behandlung, Diagnose oder Vorbeugen von Störungen oder Erkrankungen, die sich aus viraler Infektion ergeben, Zytokine und/oder antivirale Mittel zuzuführen.

[0146] Wie vorliegend verwendet, ist mit "Behandeln oder Vorbeugen einer viralen Infektion", gemeint, dass die Virusübertragung inhibiert wird, oder dass verhindert wird, dass das Virus sich in seinem Wirts-ZNS, -Gehirn oder -Rückenmark festsetzt, oder dass die Symptome der Erkrankung, die durch die virale Infektion verursacht werden, verbessert oder gelindert werden. Die Behandlung wird als therapeutisch betrachtet, wenn es eine Reduktion der Viruslast im ZNS, Gehirn oder Rückenmark, eine Verringerung der Mortalität und/oder Morbidität gibt. Von besonderem Interesse ist die Verabreichung eines Zytokins (insbesondere IFN- α oder IFN- β) durch die Verfahren der Erfindung zur Behandlung oder Prävention viraler Hepatitis.

[0147] Virale Hepatitis bezieht sich auf eine Infektion der Leber, die durch eine Gruppe von Viren mit einer besonderen Affinität zur Leber verursacht wird, und Hepatitis A Virus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Hepatitis D Virus und Hepatitis E Virus umfasst. Von besonderem Interesse ist die Verwendung der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Hepatitis C.

[0148] Eine akute Infektion mit Hepatitis C Virus führt in etwa 90 der Fälle zu persistenter viraler Replikation und zur Progression zu einer chronischen Hepatitis. Während eine chronische Hepatitis C Infektion normalerweise mit IFN- β und IFN- α behandelt wird, weisen weniger als 50 % der Patienten nach der Behandlung eine nachhaltige Remission (d.h. das Ausrotten des Hepatitis C Virus) auf. Siehe z.B. Barbaro et al. (1999) Scand J. Gastroenterol. 9:928-933; Oketani et al. (1999) J. Clin. Gastroenterol 28:49-51; Kakizaki et al. (1999) J. Viral Hepatitis 6:315-319. In ähnlicher Weise wurde auch gezeigt, dass eine IFN-Therapie eine wirksame Behandlung für chronische Hepatitis B ist, jedoch nur 25 bis 40 % der Patienten von einer langfristigen günstigen Antwort auf die aktuellen Interferon-Behandlungen profitieren. Kombinationstherapien gegen virale Hepatitis wurden ebenfalls entwickelt, die die IFN-Therapie mit antiviralen Mittel wie Ribavirin kombinieren. Diese IFN/antiviralen Therapien werden normalerweise systemisch verabreicht (d.h. intravenös), und somit sind die therapeutischen Mittel nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Damit kann das Hepatitis C Virus sich ins Zentralnervensystem zurückziehen, wohin die therapeutischen Mittel nicht vordringen. Reinfektion und Rückfall in virale Hepatitis-Symptome treten nach der Behandlung häufig auf. Zusätzlich kann eine virale Hepatitis-Infektion des ZNS ernste neurologische Konsequenzen haben. Siehe z.B. Bolay et al. (1996) Clin. Neurol. Neurosurg. 98:305-308. Daher sind neue Behandlungsverfahren bei der Behandlung viraler Hepatitis notwendig. Die Verwendungen der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um ein Zytokin und/oder ein antivirales Mittel oder eine beliebige Kombination derselben zur Behandlung oder Prävention einer viralen Hepatitis an das lymphatische System, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark zu verabreichen. Die Verwendungen der Erfindung können in Verbindung mit den bestehenden Behandlungen der viralen Hepatitis verwendet werden, um dabei zu helfen, die klinischen Symptome von Hepatitis zu verringern.

[0149] Wie vorliegend verwendet, wird eine "wirksame Menge" eines Zytokins oder eines antiviralen Mittels zur Behandlung viraler Hepatitis gemäß der vorliegenden Erfindung ausreichen, um die klinischen Symptome von Hepatitis zu verringern oder zu vermindern. Eine wirksame Menge des Zytokins oder antiviralen Mittels als solche, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung verabreicht wird, wird die Aktivität der systemisch verabreichten, im Stand der Technik zur Behandlung viraler Hepatitis verwendeten antiviralen/immunmodulatorischen Stoffe verbessern. Die Verfahren der Erfindung verbessern als solche das Überleben und/oder verbessern den klinischen Status der behandelten Tiere im Vergleich zu Tieren, die alleine mit systemischen Verabreichungsverfahren behandelt wurden. Die Verbesserung des klinischen Status umfasst z.B. die Prävention der Progression akuter viraler Hepatitis zur Chronizität, die Reduktion der Viruslast bei chronischer Hepatitis und/oder die Prävention oder Reduktion der Häufigkeit von Re-Infektion und Rückfall in Symptome viraler Hepatitis und/oder beugt neurologischem Schaden, der sich aus der viralen Infektion ergibt, vor und verringert ihn.

[0150] Antivirale Mittel und Zytokine von besonderem Interesse umfassen z.B. Ribavirin, Thymosine und Zytokine, wie IFN- β , IFN- α und IFN- γ . Siehe z.B. Musch et al. (1998) Hepato-Gastroenterology 45:2282-2294; Barbaro et al. (1999) Scand. J. Gastroenterol. 9(34):928-933; Oketani et al. (1999) J. Clin. Gastroenterol. 28:49-51; Kakizaki et al. (1999) J. Viral Hepatitis 6:315-319; US-Patent Nr. 6,030,785, US-Patent Nr. 5,676,942 und US-Patent Nr. 6,001,799.

[0151] Dem Verlauf der viralen Hepatitis und ihrer Antwort auf die durch die Verfahren der vorliegenden Er-

findung verabreichten Behandlungen kann durch klinische Untersuchung und Laborbefunde gefolgt werden, die im Stand der Technik häufig durchgeführt werden. Zum Beispiel ist es bekannt, dass bei unkontrollierter Hepatitis C erhöhte Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) auftreten. Eine vollständige Reaktion auf die Behandlung wird normalerweise als Normalisierung dieser Serumenzyme, insbesondere von ALT, definiert (Davis et al. (1989) *New England J. Med.* 321:1501-6). Alternativ dazu kann der Hepatitis C Virus-Replikation in Subjekten in Reaktion auf die antivirale/immunmodulatorische Behandlung der vorliegenden Erfindung durch die Messung von Hepatitis C Virus RNA in Serumproben gefolgt werden, z.B. durch einen verschachtelten Polymerasekettenreaktions-Test, der zwei Sätze von Primern nutzt, die von den NS3 und NS4 nicht-strukturellen Genbereichen des HCV-Genoms abgeleitet sind (Farci et al. (1991) *New England J. Med.* 325:98-104; Ulrich et al. (1990) *J. Clin. Invest.* 86:1609-14).

[0152] In einer anderen Ausführungsform kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung verwendet werden, um eine virale Infektion mit Herpes simplex zu behandeln oder dieser vorzubeugen. Herpes simplex Viren (HSV-1 und HSV-2) führen zu einer Anzahl an Infektionen, bei denen mukokutane Oberflächen, das Zentralnervensystem und manchmal Eingeweideorgane eine Rolle spielen. Zum Beispiel folgt einer akuten viralen Replikation an einem peripheren Ort wie der Hornhaut (Cornea) der Eintritt von Viren in die Nervenenden. Einer Infektion der Hornhaut folgt intra-axonaler Transport, der das Virus zu den trigeminalen Ganglien bewegt, wo vor Beseitigung des infektiösen Virus und Eintreten von Latenz eine weitere Replikation auftreten kann. Ein Versagen beim Beseitigen des Virus kann zu Infektionen des Zentralnervensystems, Encephalitis und Tod führen. Latenz kann periodisch als Antwort auf bestimmte Stimuli unterbrochen werden, was zu viraler Re-Aktivierung und Virusaustritt führt.

[0153] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Verabreichung eines Zytokins (z.B. über den Nervus trigeminus oder den Nervus olfactorius) zum trigeminalen Ganglion oder dem ZNS bereit, und erlaubt damit die Behandlung und/oder die Prävention einer viralen Infektion mit Herpes simplex.

[0154] Bei der Immunantwort auf eine akute Herpes simplex-Infektionen spielt sowohl die angeborene als auch erworbene Immunität eine Rolle. Schlüsselmediatoren der angeborenen Resistenz gegenüber viraler Infektion umfassen Zytokine, insbesondere Interferone wie IFN- α , IFN- β und IFN- γ . Zum Beispiel wurde gezeigt, dass IFN- α das Einsetzen von sofortig-früher Herpes simplex-Virus-Genexpression inhibiert (Oberman et al. (1988) *J. Gen. Virol.* 69:1167-1177). Ferner sind IFN- α und IFN- β in Mäusen starke Inhibitoren der Replikation in der Hornhaut. Studien bei Mäusen haben gezeigt, dass nach Hornhautinokulation der virale Titer von Herpes simplex sowohl in den Augen als auch den Ganglia trigeminali in IFN- α - oder IFN- β -Mutanten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen um bis zu 1000-fach erhöht war (Leib et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189:663-672). Die gleiche Studie zeigt ferner, dass IFNs deutlich die produktive virale Infektion verringern und die Ausbreitung des Virus von intakten Hornhäuten verringern. Ähnliche Studien sind auch durch Minagawa et al. (1997) *Antiviral. Res.* 36:99-105 durchgeführt worden.

[0155] Zusätzlich aktivieren IFN- α und IFN- β Wirtsverteidigungsmechanismen wie natürliche Killerzellen, von denen selbst gezeigt wurde, dass sie wichtig bei der Kontrolle von Herpes simplex Virus-Infektion und -Pathologie sind (Bouley et al. (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80:23-30). Es wurde auch vorgeschlagen, dass IFN- α und IFN- β wichtig zur Begrenzung des Fortschreitens von Infektionen aus peripheren Geweben zum Nervensystem sind (Halford et al. (1997) *Virology* 236:328-337). Ferner scheint IFN- γ eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Herpes simplex Virus aus der Hornhaut und bei der Resistenz gegenüber Encephalitis zu spielen, möglicherweise durch Inhibierung der Apoptose von Neuronen (Bouley et al. (1995) *J. Immunol.* 155:3964-3971), Geiger et al. (1997) *Virology* 238:189-197 und Imanishi et al. (2000) *J. Biochem.* 127:525-530. Daher spielen Interferone, insbesondere IFN- α , IFN- β und IFN- γ , eine wesentliche Rolle bei der Begrenzung der viralen Replikation von Herpes simplex in der Hornhaut, in den Ganglia trigeminali und im Nervensystem.

[0156] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung von Herpes simplex Virus gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die klinischen Symptome von Herpes simplex Virus zu verringern oder zu vermindern. Eine wirksame Menge des Zytokins, das durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung verabreicht wird, wird als solche die Aktivität des Virus attenuieren und damit das Überleben verbessern und/oder den klinischen Status des behandelten Tieres im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verbessern. Eine Verbesserung des klinischen Status umfasst z.B. die Prävention oder Reduktion von Encephalitis und/oder Apoptose im Zentralnervensystem (d.h. Steigerung der Neuroprotektion), eine Abnahme der Schwere der Infektion (d.h. Verbessern der Virus-Beseitigung aus der Hornhaut, den Ganglia trigeminali, und dem ZNS), eine Abnahme der Virusverbreitung, eine Zunahme in der Aufrechterhaltung von Latenz und/oder eine Abnahme der Häufigkeit des Wiederauftretens von Herpes simplex. Ausführlichere Details in Bezug auf die klinischen Erschei-

nungsbilder von Herpes simplex, die nach Verabreichung einer wirksamen Konzentration eines Zytokins verbessert sein können, können in Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, 1994), Seiten 782-787, gefunden werden.

[0157] In einer anderen Ausführungsform kann die erfindungsgemäße medizinische Verwendung zur Behandlung von humanem Immundefizienz-Virus (HIV) verwendet werden. HIV ist eine infektiöse Erkrankung des Immunsystems, die bei den meisten infizierten Subjekten durch eine progressive Verschlechterung des Immunsystems charakterisiert ist. Während der Progression der Erkrankung werden Schlüsselzellen, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, mit HIV infiziert, einschließlich z.B. CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen/Monozyten und Gliazellen. Anhaltende HIV-Infektion gipfelt häufig in der Entwicklung von AIDS. In den späten Stadien dieser Erkrankung ist das Immunsystem vom Verlust oder der Dysfunktion von CD4⁺ T-Zellen betroffen (Shearer et al. (1991) AIDS 5:245-253). Das Nervensystem ist ebenfalls ein Hauptziel der HIV-Infektion. Das Virus wird durch infizierte Monozyten zum Gehirn getragen und man nimmt an, dass die neurologischen Erscheinungsformen der HIV-Infektion durch virale Produkte und lösliche Faktoren entstehen, die durch die infizierten Makrophagen/Microglia produziert werden. Somit kann sich das HIV-Virus in das Zentralnervensystem zurückziehen, in das die therapeutischen Mittel nicht vordringen können. Re-Infektion und Rückfall in HIV-Symptome nach Behandlung treten häufig auf. Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verabreichung eines Zytokins, insbesondere eines Interferons wie IFN- α , IFN- β und IFN- γ , an das ZNS oder das lymphatische System zur Behandlung oder Prävention einer HIV-Infektion bereit.

[0158] Es ist bekannt, dass Interferone pleiotrophe antivirale Aktivitäten ausüben und viele verschiedene Stadien des HIV-Infektionszyklus beeinflussen. Zum Beispiel beeinflusst IFN- β die Aufnahme von HIV-Partikeln (Vieillard et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2689-2693), die reverse Transkription viraler genomischer RNA in provirale DNA (Baca-Regen et al. (1994) J. Virol. 68:7559-7565; Kornbluth et al. (1990) Clin. Immunol. Immunopathol. 54:200-219 und Shirazi et al. (1993) Virology 193:303-312); virale Proteinsynthese (Coccia et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23087-23094) und das Verpacken und Freisetzen viraler Partikel (Poll et al. (1989) Science 244:575-577). Zusätzlich sind aus IFN- β -behandelten Zellen freigesetzte Virionen bis zu 1000-fach weniger infektiös als die gleiche Anzahl von Virionen, die aus unbehandelten Zellen freigesetzt werden (Hansen et al. (1992) J. Virol. 66:7543-7548). Ferner haben Studien kürzlich gezeigt, dass genetisch veränderte humane CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv geringe Mengen von IFN- β produzieren, HIV in vivo vollständig ausrotten können, wobei ein Maustiermodell verwendet wurde, das die persistente replikative HIV-Infektion unterstützt. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass eine therapeutische Strategie auf Grundlage einer IFN- β -Transduktion von CD4⁺ T-Zellen bei der Kontrolle einer zuvor existierenden HIV-Infektion und dem Erlauben eines Wiederaufbaus des Immunsystems erfolgreich sein kann. Siehe z.B. Vieillard et al. (1999) J. Virol. 73:10281-10288. Es wurde auch gezeigt, dass IFN- γ die Empfänglichkeit von Makrophagen gegenüber HIV moduliert (Zaitseva et al. (2000) Blood 96:3109-3117).

[0159] Es ist verständlich, dass die Verabreichung des Zytokins mittels der erfindungsgemäßen medizinischen Verwendung zur Behandlung von HIV in Kombination mit jeder anderen HIV-Behandlung oder im Stand der Technik bekannten Therapie verwendet werden kann. Bei der Behandlung von HIV-Infektion verwendete Therapien schließen z.B. antiretrovirale Medikamente wie Inhibitoren der Reversen Transkriptase, Inhibitoren der virale Protease und Inhibitoren des viralen Eintritts ein (Caliendo et al. (1994) Clin. Infect. Dis. 18:516-524). Kürzlich wurde eine Behandlung mit Kombinationen dieser Mittel verwendet, bekannt als hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART), um wirksam die Replikation von HIV zu unterdrücken (Gulick et al. (1997) N. Engl. J. Med. 337:734-9 und Hammer et al. (1997) N. Engl. J. Med. 337:725-733).

[0160] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung von HIV gemäß der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die klinischen Symptome von HIV zu verringern oder zu vermindern. Eine wirksame Menge von Zytokin, das durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung verabreicht wird, wird als solche die Aktivität des Virus attenuieren (d.h. einen direkten antiviralen Wirkung haben) und/oder die HIV-induzierten immunologischen Dysfunktionen verbessern (d.h. die Fähigkeit eines HIVinfizierten Patienten verbessern, wirksam eine zelluläre Immunabwehr gegen aktiv replizierendes HIV aufzustellen). Unabhängig vom Wirkungsmechanismus wird eine wirksame Zytokinmenge das Überleben und/oder den klinischen Status der behandelten Tiere im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle verbessern. Eine Verbesserung des klinischen Status umfasst z.B. eine Reduktion einer zuvor existierenden HIV-Infektion und/oder der Rate des Fortschreitens der Erkrankung, ein verbessertes Überleben von CD4⁺ T-Zellen, ein Unterdrücken der durch HIV bewirkten Zytokin-Dysregulation (d.h. verbesserte Th1-artige Zytokinexpression), eine Inhibierung viraler Replikation und eine Verbesserung der proliferativen Expansion von Antigen-selektierten Lymphozyten, insbesondere der HIV-Antigen-spezifischen CD8⁺ Untergruppe von T-Zellen als Antwort auf eine Zunahme der Viruslast. Assays zur Messung dieser verschiedenen Verbesserungen sind im Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. (Vieillard et al.

(1999) J. Virol. 73:10281-10288, Vieillard et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11595-11600; US-Patent Nr. 5,911,990 und US-Patent Nr. 5,681,831. Ausführlichere Details in Bezug auf die klinischen Erscheinungsformen von HIV, die durch Verabreichung einer wirksamen Konzentration eines Zytokins verbessert werden können, können in Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, 1994), Seiten 1559-1617, gefunden werden.

Behandlung proliferativer Störungen des ZNS

[0161] In einer anderen Ausführungsform kann die vorliegende medizinische Verwendung genutzt werden, um dem lymphatischen System, ZNS, Gehirn und/oder Rückenmark Zytokine zur Behandlung, Diagnose oder Prävention einer proliferativen Störung oder Erkrankung zuzuführen.

[0162] Zytokine haben antiproliferative Aktivität. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Interferone sowohl eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen als auch eine indirekte zytotoxische Wirkung durch die Aktivierung natürlicher Killerzellen, Makrophagen oder anderer Immunzellen haben. Studien haben nahegelegt, dass IFN- γ -vermittelte Antitumor-Aktivität aus Modulieren des Zusammenspiels von B- und T-Zell-Bestandteilen des Immunsystems resultiert, genauso wie der Inhibierung von Tumor-Angiogenese (Saleh et al. (2000) Gene Ther 7:1715-24). Es wurde ferner gezeigt, dass IFN- α deutlich die durchschnittliche Tumorgroße vermindert und die durchschnittliche Überlebenszeit des behandelten Säugetiers erhöht (Wang et al. (1999) J. Neuropathol Exp. Neurol. 58:847-58). Intratumorinjektion von Liposomen, die das humane IFN- β -Gen enthalten, in Nacktmäuse inhibiert das Tumorwachstum, wobei eine vollständige Tumorregression nach multiplen intratumoralen Injektionen des Gens auftritt. Ferner wurde gezeigt, dass IFN- β eine wirksame Behandlung von hochgradigen Astrozytomen darstellt (Natsume et al. (1999) Gene Ther. 9:1626-33 und Fine et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:381-7). Es scheint, dass die antiproliferative Wirkung von IFN- β durch ein Anhalten der geordneten Progression durch die S-Phase oder durch eine Verringerung des Eintritts in die G2/M-Phase des Zellzyklus auftritt (Garrison et al. (1996) J. Neurooncol. 30:213-23). Damit sind Interferone, insbesondere IFN- α , IFN- β und IFN- γ , wirksame Mittel zur Behandlung oder Prävention einer proliferativen Störung des ZNS, Rückenmarks, Gehirns und lymphatischen Systems.

[0163] Mit "proliferativer Störung" ist jede Störung gemeint, die durch zelluläre Teilung unter Mißachtung normaler Gewebe-Homeostase-Mechanismen auftritt. Die proliferative Störung kann entweder maligne oder benigne sein und entweder aus einer Steigerung der Rate der Zellproliferation oder eine Verminderung der Rate von Zelltod resultieren. Die proliferative, durch die medizinische Verwendung der Erfindung behandelte Störung kann in jedem Entwicklungsstadium sein (d.h. einem Frühstadium mit minimaler oder mikroskopischer Tumormasse oder in fortgeschrittenen Stadien der Tumorentwicklung).

[0164] Proliferative Störungen des Zentralnervensystems, Gehirns oder Rückenmarks umfassen z.B. Gliome, neuronale Tumore, wenig differenzierte Neoplasmen und Meningioma. Von Gliazellen abgeleitet Gliome umfassen das Astrozytom (d.h. fibrilläre Astrozytome, Glioblastome multifforme, pilozytisches Astrozytom, pleomorphisches Xanthastrozytom und Hirnstammgliom), Oligodendrogliome und Ependymome und Läsionen der paraventriculären Substanz (d.h. myxopapilläre Ependymome, Subependymome, Plexus choroideus-Papilloma). Neuronale Tumore umfassen ZNS-Tumore, die reif erscheinende Neuronen (Ganglionzellen) enthalten, die die vollständige Zellpopulation der Läsion darstellen können; alternativ dazu ist die Läsion eine Mischung mit einem glialen Neuroplasma. wenig differenzierte Neoplasmen umfassen z.B. Medulloblastome. Andere proliferative Störungen des ZNS, Gehirns oder Rückenmarks umfassen primäre Gehirnlymphome, Meningiome und metastatische Tumore.

[0165] Es ist verständlich, dass die Verabreichung des Zytokins durch die erfindungsgemäße medizinische Verwendung zur Behandlung einer proliferativen Störung in Kombination mit jeder anderen Behandlung oder im Stand der Technik bekannten Therapie zur Behandlung von proliferativen Störungen verwendet werden kann. Bei der Behandlung proliferativer Störungen verwendete Therapien umfassen z.B. jede Form von Bestrahlung oder chemotherapeutischen Behandlungen. Siehe z.B. Hatano et al. (2000) Acta Neurochir 142:633-8, Burton et al. (1999) Curr Opin Oncol. 11:157-61, und Brandes et al. (2000) Anticancer 20:1913-20.

[0166] Eine "wirksame Menge" eines Zytokins zur Behandlung einer proliferativen Erkrankung oder Störung unter Verwendung der medizinischen Verwendung der vorliegenden Erfindung wird ausreichen, um die morphologischen und/oder klinischen Symptome der proliferativen Störung zu verringern oder zu vermindern. Eine wirksame Menge des durch die Verwendung der vorliegenden Erfindung verabreichten Zytokins wird als solche eine beliebige physiologische Antwort ausüben, die die Proliferation von Tumorzellen verringert und damit das Überleben verbessert und/oder den klinischen Status der behandelten Tieres im Vergleich zur unbehan-

delten Kontrolle verbessert. Solche physiologischen Antworten umfassen z.B. die Aktivierung von Immunzellen, die Inhibierung von Zellproliferation, die Induktion von Zelldifferenzierung, das Hochregulieren von Klasse I Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex-Antigenen, die Inhibierung von Angiogenese und die Bildung einer T-Helfer 1 (Th1)-Typ-Antwort. Die Verbesserung des klinischen Status umfasst z.B. eine Steigerung der Überlebensrate des behandelten Säugetiers (d.h. eine Erhöhung entweder der Einjahres- oder Zweijahres-Überlebensrate) und eine Abnahme der Tumorgroße. Assays zur Messung dieser verschiedenen Verbesserungen sind im Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. Hong et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:3354-60); Knupfer et al. (2000) Cytokine 12:409-12; Natsume et al. (1999) Gene Ther 6:1626-33 und US-Patent Nr. 4,846,782. Ausführlichere Details in Bezug auf die klinischen Erscheinungsformen proliferativer Störungen des ZNS, Gehirns, Rückenmarks oder lymphatischen Systems, die nach Verabreichung einer wirksamen Konzentration eines Zytokins verbessert sein können, können in Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill, 1994) gefunden werden.

[0167] Die vorliegende Erfindung kann mit Bezug auf die folgenden Beispiele besser verstanden werden. Diese Beispiele sind dazu gedacht, repräsentativ für besondere Ausführungsformen der Erfindung zu sein, und sollen den Umfang der Erfindung nicht einschränken.

VERSUCHE

Beispiel I: Intranasale Verabreichung von INF- β an das ZNS

Einführung

[0168] Die Intranasale Verabreichung von Interferon- β (IFN- β) ist ein wirksames Mittel, dieses Zytokin dem ZNS eines Tieres zuzuführen.

Material und Methoden

Intranasale Zuführung an das ZNS:

[0169] Männliche Sprague-Dawley-Ratten, 199 und 275 g, wurden mit intraperitonealem Pentobarbital (40 mg/kg) betäubt. Die Wirkstoff-Zuführung ins ZNS wurde nach intranasaler Verabreichung von 51 pmol und 57 pmol von ^{125}I -IFN- β in 20 mM HEPES, pH 7, 5, an die leichte bzw. schwere Ratte beurteilt. Die Ratten wurden auf ihrem Rücken platziert, und es wurden 100 μl ^{125}I -IFN- β in jede Nasenhöhle über 10 bis 22 Minuten verabreicht, wobei Tropfen alle 2 bis 3 Minuten zwischen linker und rechter Nasenhöhle gewechselt wurden. Während der intranasalen Verabreichung von IFN- β wurde eine Seite der Nase und des Mundes geschlossen gehalten. Dieses Verfahren der Verabreichung des Zytokins erlaubt es, dass sowohl Druck als auch Schwerkraft das Mittel in das obere Drittel der Nasenhöhle bringen. Die Ratten unterlagen anschließend innerhalb von Minuten nach dem Beenden der ^{125}I -IFN- β -Verabreichung einer Perfusion und Fixierung. Die Perfusion und Fixierung wurde vor der Sezierung von Gehirn und Rückenmark und der ^{125}I -Messung durch Gamma-Zählung mit 50–100 ml physiologischer Salzlösung, gefolgt von 500 ml Fixierungsmittel, das 4 % p-Formaldehyd in 0,1 M Sorensens Phosphatpuffer pH 7,4 enthielt, durchgeführt. Die seziierte Bereiche umfassten Rückenmark, Riechkolben, frontalen Kortex, Nukleus olfactorius anterioris, Hippokampus-Anordnung, Plexus chorioideus, Diencephalon, Medulla, Pons und Cerebellum.

Ergebnisse

[0170] Ein schnelles Auftreten von radioaktiver Markierung wurde im ganzen Rückenmark, Gehirnstamm und Gehirn beobachtet, wobei die Konzentrationen im Bereich von etwa 3 pM bis etwa 93 pM lagen. Detaillierte Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt. Die Beobachtung wesentlicher Interferon- β -Konzentrationen in Nervus olfactorius und trigeminus legt nahe, dass dieses Zytokin durch oder entlang dieser Nerven transportiert wird. Gewebe mit biologisch signifikanten Mengen Interferon- β umfassen die Riechkolben, den frontalen Kortex, Caudate Putamen, Nervus olfactorius anterioris, Hippokampus-Anordnung, Plexus chorioideus, Diencephalon, Pons, Medulla, ventrale Dura, Nervus trigeminus, olfaktorisches Epithel, Circulus arteriosus cerebri (circle of Willis) und oberes Hals-Rückenmark.

Tabelle 1: Daten bei intranasaler (I.N.) Verabreichung von Beteseron zum ZNS

Gewebeart	Konzentration (pM) (51 pmol Dosis)	Konzentration (pM) (57 pmol Dosis)
Linker Riechkolben	89,5	51,4
Rechter Riechkolben	92,9	67,7
Frontaler Kortex	9,19	29,1
Caudate/Putamen	7,09	34,0
Nervus olfactorius anterioris	46,9	97,4
Hippokampusanordnung (links)	5,81	11,7
Hippokampusanordnung (rechts)	11,1	21,0
Plexus chorioideus	79,0	33,2
Diencephalon	15,5	24,0
Mittelhirn	10,9	19,8
Pons	16,9	49,4
Medulla	24,7	90,2
Cerebellum	10,2	30,4
Dura (ventral)	263,0	896
Nervus trigeminus	36,7	362
Linkes olfaktorisches Epithel	3697	
Circulus arteriosus cerebri		189
Oberes Hals-Rückenmark	24,3	455
Hals-Rückenmark		6,88
Brustrückenmark	4,0	2,55
Lendenrückenmark	2,08	3,5
Rechtes olfaktorisches Epithel	22540	

[0171] Weitere Studien zur Quantifizierung bei intranasaler Verabreichung von [¹²⁵I]Beteseron wurden in Sprague-Dawley-Ratten im Wesentlichen wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Scans von Bereichen koronalen Hirngewebes zeigten eine bedeutende Markierung von Riechkolben, Caudate/Putamen, septalem Nukleus, periventrikulärer weißer Substanz, optischem Nerv und Colliculus superioris (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stimmen mit den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen überein. Die in 6 Tieren durchgeführten quantitativen Studien nach intranasaler Verabreichung von etwa 6 nmol Beteseron zeigten konsistent die Zuführung zu einer breiten Vielzahl von ZNS-Strukturen. Höchste Konzentration von IFN-β wurden in den Riechkolben (9 nM), Nukleus olfactorius anterioris (3,3 nM), Mittelhirn (1,9 nM), Medulla (1,8 nM), Pons (1,6 nM) und Cerebellum (1,4 nM) gefunden. Mittlere Konzentrationen wurden in der Hippokampus-Anordnung (1,3 nM), Diencephalon (1,3 nM), frontalem Kortex (1,1 nM), Hals-Rückenmark (1,1 nM) und Caudate/Putamen (0,83 nM) beobachtet.

[0172] Die sehr hohe Konzentration von [¹²⁵I]Beteseron, die im Nervus trigeminus (14 nM) und in der ventralen duralen Substanz (19 nM) beobachtet wurde, legen deutlich nahe, dass die Zuführung zum ZNS Bewegung nicht nur entlang des olfaktorischen neuralen Weges, sondern auch entlang des Nervus trigeminus-Weges einschließt. Die trigeminale Zuführung sollte zu hohen Mengen sowohl in den olfaktorischen Bereichen als auch in den Mittelhirn- und Hirnstammgebieten führen. Die Zuführung zum Rückenmark tritt wahrscheinlich über den trigeminalen Weg auf. Im Einklang mit der trigeminalen Verabreichung erreicht [¹²⁵I]Beteseron das Rückenmark innerhalb von 25 Minuten und zeigt abnehmende Konzentrationen, wenn man sich am Rückenmark abwärts bewegt.

[0173] Diese Ergebnisse verweisen auf einen direkten Transport von IFN-β entlang einem oder mehrerer neuraler Wege in das ZNS, Gehirn und Rückenmark.

Tabelle 2: Konzentration (nM) von IFN- β (Betaseron) in verschiedenen Rattengeweben nach I.N.-Verabreichung von ^{125}I -2FN- β + IFN- β .

Gewebe	IF11	IF12	IF13	IF14	IF15	IF16	Durchschnitt	SA
Blutprobe 1	1,12	1,53	0,92	0,74	1,70	0,85	1,1	0,2
Blutprobe 2	2,77	3,26	1,44	2,11	3,13	2,74	2,6	0,3
Blutprobe 3	3,72	6,62	2,81	3,87	5,02	4,22	4,4	0,5
Blutprobe 4	5,37	6,35	7,38	5,4	7,32	5,50	6,2	0,4
Blutprobe 5	7,29			6,69	8,15	7,95	7,5	0,3
Linker Riechkolben	9,02	6,11	3,01	5,93	18,29	18,46	10	3
Rechter	5,6	6,99	3,39	4,84	15,26	12,48	8,1	1,9

Riechkolben								
Frontaler Kortex	1,12	1,24	1,09	0,44	1,72	1,19	1,1	0,2
Caudate/Putamen	0,68	0,91	0,83	0,36	1,08	1,11	0,83	0,11
Nukleus Olf. Ant.	2,11	2,55	1,96	1,09	6,82	5,50	3,3	0,9
L. Hippokampusanordnung	0,84	1,63	1,24	0,37	2,23	1,71	1,3	0,3
R. Hippokampusanordnung	0,85	1,77	1,24	0,40	1,84	1,91	1,3	0,3
Diencephalon	0,86	1,52	1,39	0,44	2,05	1,72	1,3	0,2
Mittelhirn	0,80	1,69	1,53	0,44	5,07	1,91	1,9	0,7
Pons	0,76	1,91	1,76	0,38	2,71	2,04	1,6	0,4
Medulla	0,63	2,41	2,90	0,42	2,29	2,08	1,8	0,4
Cerebellum	0,89	1,72	1,56	0,36	2,19	1,84	1,4	0,3
Ventrale Dura	2,47	46,16	10,89	7,13	21,35	23,52	19	6
Nervus trigeminus	7,94	12,14	19,89	4,57	24,44	17,63	14	3
Spinale Dura			0,59	0,13		0,29	0,34	0,13
Hals-Rückenmark	0,33	0,88	3,12	0,38	0,98	1,00	1,1	0,4
Brust Rückenmark	0,14	0,11	0,39	0,29	0,33	0,15	0,24	0,05
Lenden Rückenmark	0,13	0,12	0,27	0,22	0,32	0,10	0,19	0,04
Deltoider Muskel	0,62	0,58	0,50	1,10	0,67	0,22	0,62	0,12
Leber	0,58	0,78	1,01	1,38	0,54	0,31	0,77	0,16
Niere	0,67	0,73	2,08	5,26	0,56	1,81	1,9	0,7
Lunge	1,87	0,56	2,18	0,72	0,85	0,99	1,2	0,3
Ösophagus	1,10	1,50	68,2	5234,83	1,44	22,40	888	869
Trachea	1,48	3,11	83,46	4,67	1,45	5,91	17	13
L. olfakt. Epithel	1175,9	75,64	14,08	1431,14	454,41	227,29	563	244
R. olfakt. Epithel	2083,1	411,32	45,66	1113,87	191,13	2765,47	1102	453

IF11-16 stellen individuelle Ratten dar

Mittleres Gewicht (g.) der Ratten: 243 g. (Bereich = 203 g – 268 g)

Mittlere verabreichte Konzentration: 6,0 nmol (Bereich = 4,8 nmol – 6,9 nmol)

Mittlere Radioaktivität (μCi): 39 μCi (Bereich = 32 μCi – 52 μCi)

Beispiel 2: Intranasale Verabreichung von IFN- β behält die pharmakologische Aktivität im ZNS bei

[0174] Tests wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob intranasal verabreichtes IFN- β pharmakologische Aktivität im ZNS beibehält. IFN- β aktiviert Signaltransduktions-Wege über einen Zelloberflächen-IFN-Rezeptor.

Der IFN-Rezeptor ist Teil eines prototypischen JAK-STAT-Signalgebungs-Komplexes. Er weist zwei Transmembranketten auf, die mit intrazellulären Signalgebungsproteinen assoziieren, einschließlich TYK2, JAK1 und zweier latenter Transkriptionsfaktoren, die als "signal transducers and activators of transcription" (STATs) bezeichnet werden. Die Bindung von IFN- β an den Rezeptor bringt die zwei Janus-Kinasen (TYK2 und JAK1) einander nahe, und sie werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die Kinasen aktivieren dann die zytoplasmatischen Schwänze der IFN-Rezeptoren durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten. Diese Phosphotyrosine stellen Andockstellen für die STATs bereit, was diese in angemessene Position zur Phosphorylierung durch die nahen Janus-Kinasen bringt. Bei Phosphorylierung verlagern sich die STATs in den Nukleus, binden spezifische DNA-Elemente und steuern die Transkription. Somit kann die pharmakologische Aktivität von IFN- β nach intranasaler Verabreichung durch Überwachung des Phosphorylierungsstatus von TYK2 und STAT1 in der Hirnrinde wirksam untersucht werden.

Verfahren:

Kontrolle/Wirkstoff-Behandlung:

[0175] Harlan Sprague-Dawley-Ratten wurden mit Pentobarbitol (50 mg/kg) betäubt. Es wurden entweder 80 μ l Wasser oder 80 μ l IFN- β in 5 Dosen über einen Zeitraum von 20 Minuten intranasal verabreicht. Es wurden 8 μ l in 5 Dosen in 2 Minuten-Intervallen an jedes Nasenloch verabreicht. Rekombinantes Ratten-Interferon- β (rrIFN- β) (35 pmol) wurde intranasal an Ratte IF35 (Wirkstoff-behandelt) verabreicht und H₂O (zur Verdünnung von rrIFN- β verwendeter Träger) wurde an Ratte IF33 (Kontrollbehandelt) verabreicht. Nach Verabreichung wurde das Tier mit 100 ml Salzlösung perfundiert und mit 200 ml 10 % Formalin fixiert. Anschließend wurde das Gehirn entfernt und in einer Gehirnmatrix in 2 mm-Sektionen geschnitten. Die Schnitte wurden in Kassetten gesammelt und in Paraffin eingebettet. Gewebe wurde auf 4 μ m geschnitten und auf Mikroskop-Objektträgern aufgebracht.

Immunhistologische Färbung:

[0176] Die Antikörper gegen phosphorylierte Formen der Proteine TYK2 und STAT1 wurden von Cell Signaling Technology (Produkt-Nummern 9321L bzw. 9171S) erworben.

[0177] Das Verfahren der immunhistologischen Färbung war die folgende. Die Gewebesektionen wurden von Paraffin entfernt und hydriert, indem die Objektträger für die angegebenen Zeiten in die folgenden Lösungen eingebracht wurden: Xylen für 10 min, 100 % EtOH für 5 min, 95 % EtOH für 5 min, 70 % EtOH für 5 min und 50 % EtOH für 5 min. Die Objektträger wurden aus Coplin-Gefäßen entfernt und in Wasser für 2 Minuten auf einem Schüttler gewaschen. Das Antigen (TYK2 und/oder STAT1) wurde demaskiert, indem die Objektträger in Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert und in einem Gemüsedampfkochtopf 45 Minuten erhitzt wurden. Die Objektträger wurden entfernt und in kaltem laufendem Leitungswasser 10 Minuten gewaschen. Die Schnitte wurden in 3 % H₂O₂ 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 5 Minuten in H₂O gewaschen. Danach wurden die Objektträger in einer Tris-gepufferten Salzlösung (50 mM Tris, 150 mM NaCl) mit 0,2 % Triton X-100 (TBST) in drei 5 Minuten-Waschgängen gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Objektträger mit 2 % Ziegen Serum in TBST (GSTBST) 1 Stunde bei RT geblockt. Nach drei 5 Minuten-Waschgängen in TBST wurden die Objektträger mit primärem Antikörper (Kaninchen anti-TYK2 polyklonalem Antikörper; 1:250 verdünnt in GSTBST) in einer feuchten Kammer bei RT 30 Minuten und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in TBST in drei 5 Minuten-Waschgängen gewaschen und mit Ziegen-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper war 1:400 in 10 mM Phosphat-gepuffertes Lösung (PBS, 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid) verdünnt, bei RT für 1 Stunde. Während der letzten 15 Minuten dieser Inkubation wurde das ABC-Reagenz hergestellt (5 ml PBS, 2 Tropfen Reagenz A, Mischen, 2 Tropfen Reagenz B, Mischen, Vector Technology Product # PK-6101) und es durfte bei RT stehen. Die Objektträger durchliefen drei zusätzliche 5 Minuten-Waschgänge in TBST, gefolgt von einer Inkubation mit ABC-Reagenz bei RT für 1 Stunde in einer feuchten Kammer. Es folgten drei zusätzliche 5 Minuten-Waschgänge in TBST. Etwa 100 bis 150 μ l (genug, um das Gewebe zu bedecken) Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) wurden zugefügt, und es durfte bei RT 10 Minuten inkubieren. Die Reaktion wurde durch einen Waschschrift von 2 Minuten mit H₂O gestoppt. Die Objektträger wurden danach in H₂O gewaschen, bis die Lösung klar war. Die Objektträger wurden die angegebenen Zeiten in den folgenden Lösungen dehydriert: 50 % EtOH für 2 min, 70 % EtOH für 2 min, 95 % EtOH für 2 min, 100 % EtOH für 2 min, 50/50 Xylen/ROH für 2 min und Xylen für 5 min. Überschüssiges Xylen wurde entfernt und die Objektträger wurden durch Hinzufügen von 2 bis 3 Tropfen Vectamount befestigt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Vectamount durfte vor der Betrachtung trocknen.

Ergebnisse:

[0178] Die Induktion des IFN- α/β -Weges wird durch Phosphorylierung von TYK2 und STAT1 charakterisiert. Daher wurden für die phosphorylierten Formen von TYK2 und STAT1 spezifische Antikörper verwendet, um die Menge der aktivierten Form dieser Proteine vor und nach intranasaler Zuführung von IFN- β zu messen. Die Quantifizierung zeigte, dass die Mengen an phosphoryliertem TYK2s in der gesamten Gehirnrinde nach intranasaler Zuführung von 35 pmol rekombinantem Ratten-IFN- β (Daten nicht gezeigt) anstiegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass IFN- β nach intranasaler Verabreichung gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung im ZNS pharmakologische Aktivität beibehält.

Beispiel 3: Intranasale Verabreichung von IFN- β an das lymphatische System

[0179] Die intranasale Zuführung von [125 I]Betaseron wurde in Sprague-Dawley-Ratten im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. 3,9–7,9 nmol Betaseron wurden in einem Volumen von 44–96 μ l über einen Zeitraum von 20 bis 29 Minuten verabreicht. Die Tiere wurden nach 30 Minuten perfundiert. Die von acht individuellen Tieren erhaltenen Daten sind in Tabelle 3 bereitgestellt. Die experimentellen Mittelwerte aus diesem Satz von Experimenten sind in Tabelle 4 dargestellt. Diese quantitativen Studien zeigten die Zuführung von [125 I]Betaseron zu den oberflächlichen Halsknoten und die tiefen Halsknoten des lymphatischen Systems. Durchschnittlich wurden nach den Verabreichungsverfahren der Erfindung 6,1 nM Betaseron in den oberflächlichen Halsknoten und 31,5 nM in den tiefen Halsknoten gefunden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 3. Betaseronkonzentration (nM) nach I.N.-Verabreichung von 125 I-2FN β + rhIFN β

Experiment	IF34	IF36	IF37	IF38
MikroCi	31	47	61	48
Nmol	3,9	6,9	7,9	6,6
Blutprobe #1	0,53	0,58	1,1	1,6
Blutprobe #2	1,6	4,3	2,8	3,9
Blutprobe #3	2,4	3,1	4,6	6,2
Blutprobe #4	3,6	4,7	5,1	8,3
Blutprobe #5	4,1	7,0	7,0	10
Blutprobe #6		8,2	8,5	10
Linkes olfaktorisches Epithel	65	862	388	643
Rechtes olfaktorisches Epithel	62	1103	1447	1876
Linker Riechkolben	1,6		3,5	5,6
Rechter Riechkolben	1,3		8,1	7,1
Nukleus olfactorius anterioris	0,96		1,3	2,5
Frontaler Kortex	0,28		0,84	0,97
Caudate/Putamen	0,09		0,57	1,7
L.+R. Hippokampus	0,38		0,62	0,82
Linker Hippokampus				
Rechter Hippokampus				
Diencephalon	0,65		0,74	0,95
Mittelhirn	0,48		0,61	0,88
Pons	0,45		0,75	0,91
Medulla	0,36		0,76	0,95
Cerebellum	0,34		0,54	0,69
Ventrale Gehirn-Dura	6,1	9,7	12	14
Optischer Nerv + Chiasmus	1,2	6,3	4,4	25
Nervus trigeminus	5,8	12	8,5	20
Spinale Dura	0,09	0,16	0,67	1,1
Oberes Hals-Rückenmark	0,43	2,3	0,92	1,1
Hals-Rückenmark	0,17	0,21	0,47	1,3
Brustrückenmark	0,13	0,20	0,35	0,58
Lendenrückenmark	0,17	0,29	0,39	0,49
Oberflächliche Halsknoten	8,1	6,3	4,0	6,1
L. oberflächlicher Halsknoten	3,9			
R. oberflächlicher Halsknoten	4,2			
Tiefer Halsknoten	9,7	16		68
Linker tiefer Halsknoten				
Rechter tiefer Halsknoten				

Gemeine Karotiden	14	27	38	22
Schilddrüse	250	462	830	725
Ösophagus	145	196	394	715
Trachea	177	41863	692	553
Muskel	0,52	0,64	0,74	1,1
Leber	0,47	1,9	0,83	1,2
Niere	1,0	0,79	2,92	1,8
Lunge	0,66	1,7	2,4	27

Tabelle 4. Experimentelle Mittelwerte der Betaseron-Konzentration (nM) nach I.N. -Verabreichung von ¹²⁵I-IFN β + rhIFN β

MikroCi/ Nmol	Durchschnitt für IF34, 37, 38	
	46,67	6,13
	Mittelwert	Standardabweichung
Blutprobe #1	1,1	0,53
Blutprobe #2	2,7	1,2
Blutprobe #3	4,4	1,9
Blutprobe #4	5,7	2,4
Blutprobe #5	7,1	3,1
Blutprobe #6	9,5	1,4
Linkes olfaktorisches Epithel	365	290
Rechtes olfaktorisches Epithel	1128	948
Linker Riechkolben	3,6	2,0
Rechter Riechkolben	5,5	3,7
Nukleus olfactorius anterioris	1,6	0,81
Frontaler Kortex	0,70	0,37
Caudate/Putamen	0,80	0,85
L.+R. Hippokampus	0,61	0,22
Linker Hippokampus		
Rechter Hippokampus		
Diencephalon	0,78	0,16
Mittelhirn	0,66	0,20
Pons	0,71	0,24
Medulla	0,69	0,30
Cerebellum	0,52	0,17
Ventrale Gehirn Dura	11	4,3
Optischer Nerv + Chiasmus	10	13
Nervus trigeminus	11	7,5
Spinale Dura	0,61	0,49
Oberes Hals-Rückenmark	0,83	0,36
Hals-Rückenmark	0,65	0,59
Brustrückenmark	0,35	0,23
Lendenrückenmark	0,35	0,17
Oberflächliche Halsknoten	6,0	2,1
L. oberflächlicher Halsknoten		
R. oberflächlicher Halsknoten		
Tiefer Halsknoten	39	42
Linker tiefer Halsknoten		
Rechter Halsknoten		
Gemeine Halsschlagader	25	12
Schilddrüse	602	309
Ösophagus	418	286
Trachea	474	266
Muskel	0,78	0,27

Leber	0,82	0,35
Niere	1,9	0,95
Lunge	10	15

Tabelle 5. Zusammenfassung der Betaseronkonzentration (nM) in den Hals-Lymphknoten nach I.N.-Verabreichung von ¹²⁵I-IFN β + rhIFN β

Experiment	IF34	IF36	IF37	IF38		
MikroCi	31	47	61	48		
Nmol	3,9	6,9	7,9	6,6	Durchschnitt	Standardabweichung
Oberflächliche Halsknoten	8,1	6,3	4,0	6,1	6,1	1,7
Tiefe Halsknoten	9,7	16		68	31	32

Durchschnittliche verabreichte Dosis = 46,75 μ G und 6,32 nmol

Beispiel 4: Intravenöse Verabreichung von Betaseron

[0180] Die intravenöse Verabreichung von Betaseron wurde untersucht, um das Ausmaß zu bestimmen, in dem die Zuführung zum ZNS und/oder zum lymphatischen System nach intranasaler Verabreichung auf die Absorption aus der Nasenhöhle in den Kreislauf gefolgt von anschließender Zuführung des ZNS und Lymphsystem zurückzuführen sein könnte.

[0181] Für diese Experimente wurden männliche Harlan Sprague-Dawley-Ratten, die 263–318 g wogen, verwendet. Die Ratten wurden mit Natriumpentobarbital (Nembutal, 50 mg/kg) betäubt. Jeder Ratte wurde intravenös über 60 bis 90 Sekunden durch eine Kanüle in die Oberschenkelvene 500 μ l-Lösung zugeführt, die ¹²⁵I-IFN- β und rhIFN- β 0,9 % NaCl enthielt. Durchschnittlich wurden jeder Ratte 560 pmol und 49 μ Ci IFN- β verabreicht. Dann wurden alle 5 Minuten 0,2 ml Blut von der Kanüle an der Aorta descendens gesammelt, insgesamt 5 Blutproben. Schließlich wurden die Ratten durch die Kanüle an der Aorta descendens mit 60 bis 90 ml 0,9 % NaCl, gefolgt von 400 ml Fixierungsmittel (4 % Paraformaldehyd in Sorensens Phosphatpuffer) perfundiert. Individuelle Gewebesektionen wurden herausseziert, in 5 ml Sarstedt-Röhrchen eingebracht und dann hinsichtlich der Gamm- α Strahlen in einem Packard Cobra II Autogammazähler ausgezählt.

[0182] Die oben beschriebenen Verfahren führten bei intravenöser Zuführung zum gleichen allgemeinen Blutspiegel von Betaseron, wie er in den intranasalen Verabreichungsstudien erreicht wurde. Tabellen 6 und 7 zeigen die Menge an Betaseron im Blut sowohl nach intravenöser Injektion als auch nach intranasaler Verabreichung dar. Die Menge an Betaseron im Blut nach intravenöser Verabreichung und intranasaler Verabreichung über die Zeit ist graphisch in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0183] Diese Studie zeigte, dass sehr wenig des intravenös verabreichten Betaserons entweder das ZNS oder das Lymphsystem erreicht. Demnach ist klar, dass das intranasale, in dieser Anmeldung beschriebene Verfahren der Zuführung sehr hilfreich beim Abzielen auf das ZNS und das Lymphsystem des Kopf- und Nackenbereichs ist. Dieses Verfahren der Zuführung nutzt nicht den Kreislauf, um das ZNS und das Lymphgefäße zu erreichen, sondern umgeht stattdessen den Kreislauf und die Bluthirnschranke, um die Zuführung zu erreichen. Da es nicht notwendig ist, das Kreislaufsystem zu nutzen, um die Medikation zum ZNS und/oder Lymphsystem zu bringen, können systemische Nebenwirkungen deutlich reduziert werden.

Tabelle 6: Menge an Betaseron im Blut nach intravenöser Verabreichung.

Experiment #	IF47	IF49	IF50	Mittelwert	Standardfehler
Zugeführte nmol	0,521	0,579	0,579	0,560	0,019
Zugeführte μ Ci	56	46	45	49	4
5 min Blutprobe	6,30	4,47	6,78	5,85	0,70
10 min Blutprobe	5,35	4,41	5,29	5,01	0,30
15 min Blutprobe	5,90	4,14	5,95	5,33	0,60
20 min Blutprobe	5,95	4,48	5,92	5,45	0,49
25 min Blutprobe	6,40	4,16	6,30	5,62	0,73

Tabelle 7. Menge an Betaseron im Blutstrom nach intranasaler Verabreichung

Experiment #	IF36	IF37	IF38	IF40	Mittelwert	Standardfehler
Zugeführte nmol	6,890	7,947	6,583	7,360	7,195	0,30
Zugeführte μ Ci	47	61	48	51	52	3
5 min Blutprobe	0,58	1,08	1,60	2,44	1,43	0,40
10 min Blutprobe	1,43	2,76	3,89	5,91	3,50	0,95
15 min Blutprobe	3,06	4,62	6,22	8,30	5,55	1,12
20 min Blutprobe	4,70	5,14	8,27	10,17	7,07	1,30
25 min Blutprobe	6,93	7,04	10,16	12,85	9,25	1,42

Tabelle 8. Konzentration (nM) nach intravenöser Verabreichung von IFN- β

	IF47	IF49	IF50	Mittelwert	Standardfehler
Zugeführte nmol	0,521	0,579	0,579	0,560	0,019
Zugeführte μ Ci	56	46	45	49	4
Blutprobe #1 (5 min)	6,30	4,47	6,78	5,85	0,70
Blutprobe #2 (10 min)	5,35	4,41	5,29	5,02	0,30
Blutprobe #3 (15 min)	5,90	4,14	5,95	5,33	0,60
Blutprobe #4 (20 min)	5,95	4,47	5,92	5,45	0,49
Blutprobe #5 (25 min)	6,40	4,16	6,30	5,62	0,73
Linkes olfaktorisches Epithel	0,27	0,72	0,86	0,62	0,18
Rechtes olfaktorisches Epithel	0,19	0,78	1,04	0,67	0,25
Linker Riechkolben	0,63	0,23	0,31	0,39	0,12
Rechter Riechkolben	1,01	0,22	0,23	0,49	0,26
Nukleus olfactorius anterioris	0,15	0,13	0,17	0,15	0,01
Frontaler Kortex	0,15	0,16	0,18	0,16	0,01
Caudate/Putamen	0,21	0,11	0,15	0,16	0,03
Hippokampus	0,13	0,11	0,14	0,13	0,01
Cerebellum	0,15	0,12	0,16	0,14	0,01
Diencephalon	0,14	0,12	0,14	0,13	0,01
Mittelhirn	0,16	0,12	0,14	0,14	0,01
Pons	0,13	0,11	0,03	0,09	0,03
Medulla	0,14	0,11	0,14	0,13	0,01
Dorsale Gehirn Dura		0,41	0,43	0,42	0,01
Ventrale Gehirn Dura	1,32	0,28	0,17	0,59	0,37
Optischer Nerv + Chiasmus		0,18	0,29	0,24	0,04
Nervus trigeminus	0,28	0,21	0,26	0,25	0,02
Spinale Dura	0,07	0,13	0,12	0,11	0,02
Oberes Hals-Mark	0,15	0,12	0,09	0,12	0,02
Hals-Mark	0,10	0,10	0,09	0,10	0,00
Brustrückenmark	0,08	0,09	0,11	0,09	0,01
Lendenrückenmark	0,11	0,12	0,14	0,12	0,01
Oberflächliche Halsknoten	0,42	0,28	0,64	0,45	0,10
Tiefe Halsknoten	0,10	0,34	0,40	0,28	0,09
Aximale Knoten		0,33	0,64	0,49	0,13
Gemeine Halsschlagadern	0,13	0,11	0,09	0,11	0,01
Schilddrüse	52,65	56,49	11,03	40,06	14,56
Ösophagus	0,92	0,91	0,29	0,71	0,21
Trachea	0,81	0,49	0,46	0,59	0,11

Deltoider Muskel	0,29	0,19	0,30	0,26	0,04
Leber	15,17	11,82	16,90	14,63	1,49
Niere	1,30	1,51	1,49	1,43	0,07
Lunge	16,02	30,02	33,14	26,39	5,26

[0184] Es sollte angemerkt werden, dass die Singularformen "ein", "eine" und "der/die/das", wie sie in dieser Beschreibung und den angefügten Ansprüchen verwendet werden, Plural-Referenzen einschließen, sofern der Inhalt nicht eindeutig etwas anderes vorgibt. Somit umfasst z.B. der Bezug auf eine Zusammensetzung, die "einen Stoff" enthält, eine Mischung von zwei oder mehreren Stoffen.

[0185] Alle Publikationen und Patentanmeldungen in dieser Beschreibung sind für das Niveau des Fachmannes bezeichnend, an den diese Erfindung gerichtet ist.

[0186] Die Erfindung wurde mit Bezug auf verschiedene spezifische und bevorzugte Ausführungsformen und Methoden beschrieben. Es sollte jedoch verständlich sein, dass viele Variationen und Modifikationen vorgenommen werden können, während man im Rahmen der Erfindung bleibt.

Patentansprüche

1. Verwendung eines humanen Zytokins oder einer biologisch aktiven Variante desselben bei der Herstellung eines Medikamentes, wobei das Zytokin oder die Variante desselben zum Zentralnervensystem oder zum

lymphatischen System eines Säugetiers zu transportieren ist, und wobei das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem oder das lymphatische System bereitstellt, wobei das Medikament an ein Gewebe der Nasenhöhle eines Säugetiers zu verabreichen ist, und wobei das humane Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interleukin, einem humanen Interferon und einem humanen Tumor-Nekrosefaktor, und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen Zytokin aufweist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem bereitstellt.

3. Verwendung nach Anspruch 1, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das lymphatische System bereitstellt.

4. Verwendung nach Anspruch 3, bei der das Zytokin oder die Variante desselben zu einem tiefen Halsknoten, einem oberflächlichen Halsknoten oder einer Kombination derselben zu transportieren ist.

5. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das Gewebe der Nasenhöhle das Nasendach umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das Gewebe der Nasenhöhle im oberen Drittel der Nasenhöhle ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, bei der das Gewebe im oberen Drittel der Nasenhöhle ein olfaktorischer Bereich der Nasenhöhle ist.

8. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das humane Zytokin das humane Interferon ist, und das humane Interferon ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interferon-alpha (IFN- α), einem humanen Interferon-beta (IFN- β) und einem humanen Interferon-gamma (IFN- γ), und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen Interferon aufweist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, bei der das Zytokin das humane IFN- β ist und die biologische aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen IFN- β aufweist.

10. Verwendung nach Anspruch 9, bei der das humane IFN- β das reife humane IFN- β ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, bei der die biologisch aktive Variante desselben die Aminosäuresequenz des reifen humanen IFN- β aufweist, wobei der Cystein-Rest in Position 17 durch Serin ersetzt ist.

12. Verwendung nach Anspruch 2, bei der das Zytokin oder die Variante desselben zu einem Cerebellum, einem Colliculus superioris, einer periventriculären weißen Substanz, einem Sehnerv, einem Mittelhirn, einer Pons, einem Riechkolben, einem Nucleus olfactorius anterioris oder einer Kombination derselben zu transportieren ist.

13. Verwendung nach Anspruch 2, bei der das Zytokin oder die Variante desselben zu einem Rückenmark, einem Hirnstamm, einer kortikalen Struktur, einer subkortikalen Struktur oder einer Kombination derselben zu transportieren ist.

14. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das Zytokin oder die Variante desselben in einem Dosierungsbereich von etwa 0,14 nmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 nmol/kg Gehirngewicht zu verabreichen ist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, bei der das Zytokin humanes Interferon-beta (IFN- β) ist und die Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen IFN- β aufweist.

16. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine virale Infektion verhindert oder verringert.

17. Verwendung nach Anspruch 16, bei der die virale Infektion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus viraler Meningitis, Herpes Simplex, Hepatitis C und humaner Immundefizienz (HIV).

18. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine Störung behandelt oder verhindert, die durch eine Immunantwort oder eine Entzündungsantwort charakterisiert ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, bei der die Störung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Alzheimer-Erkrankung, primärem Sjögren-Syndrom und Multipler Sklerose.

20. Verwendung nach Anspruch 2, 3 oder 4, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine proliferative Störung behandelt oder verhindert.

21. Verwendung nach Anspruch 20, bei der die proliferative Störung ein Gliom ist.

22. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, bei der das Zytokin oder die Variante desselben in einem Dosierungsbereich von etwa 0,02 pmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 pmol/kg Gehirngewicht zu verabreichen ist.

23. Verwendung eines humanen Zytokins oder einer biologisch aktiven Variante desselben bei der Herstellung eines Medikamentes, wobei das Zytokin oder die Variante desselben zum Zentralnervensystem oder zum lymphatischen System eines Säugetiers zu transportieren ist, und wobei das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem oder das lymphatische System bereitstellt, wobei das Medikament an ein Gewebe eines Säugetiers zu verabreichen ist, das vom Nervus trigeminus innerviert ist und sich ausserhalb der Nasenhöhle befindet; und wobei das humane Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interleukin, einem humanen Interferon und einem humanen Tumor-Nekrosefaktor, und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen Zytokin aufweist.

24. Verwendung nach Anspruch 23, bei der das Gewebe Haut umfasst.

25. Verwendung nach Anspruch 23, bei der das Gewebe eine Konjunktiva umfasst.

26. Verwendung nach Anspruch 24, bei der die Haut ein Gesicht, eine Stirn, ein oberes Augenlid, ein unteres Augenlid, einen Nasenrücken, eine Seite der Nase, eine Oberlippe, eine Wange, ein Kinn, eine Kopfhaut oder eine Kombination derselben umfasst.

27. Verwendung nach Anspruch 25, bei der die Verabreichung des Medikamentes an die Konjunktiva die Verabreichung des Medikamentes zwischen einem unteren Augenlid und einem Auge umfasst.

28. Verwendung nach Anspruch 27, bei der die Konjunktiva die Mukosa des oberen oder unteren Augenlids umfasst.

29. Verwendung nach Anspruch 23, bei der das Gewebe eine Mukosa oder ein Epithel der Mundhöhle umfasst.

30. Verwendung nach Anspruch 29, bei der das Gewebe ein Gingiva-Gewebe umfasst.

31. Verwendung nach Anspruch 29, bei der das Gewebe die vorderen zwei Drittel der Zunge umfasst.

32. Verwendung nach Anspruch 29, bei der das Gewebe die Mukosa einer Wange umfasst.

33. Verwendung nach Anspruch 29, bei der das Gewebe die Mukosa einer Ober- oder Unterlippe umfasst.

34. Verwendung nach Anspruch 29, bei der das Medikament über sublinguale Verabreichung an das orale Gewebe zu verabreichen ist.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das Zytokin ein humanes Interferon ist, und das humane Interferon ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem humanen Interferon-alpha (IFN- α), einem humanen Interferon-beta (IFN- β) und einem humanen Interferon-gamma (IFN- γ), und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen Interferon aufweist.

36. Verwendung nach Anspruch 35, bei der das Zytokin das humane IFN- β ist und die biologisch aktive Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen IFN- β aufweist.

37. Verwendung nach Anspruch 36, bei der das humane IFN- β das reife humane IFN- β ist.
38. Verwendung nach Anspruch 37, bei der die biologisch aktive Variante desselben die Aminosäuresequenz des reifen humanen IFN- β aufweist, wobei das Cystein in Position 17 durch Serin ersetzt ist.
39. Verwendung nach einem Ansprüche 23 bis 34, bei der das Zytokin oder die Variante desselben zu einem Gewebe eines Cerebellums, eines Colliculus superioris, einer periventriculären weißen Substanz, eines Sehnervs, eines Mittelhirns, einer Pons, eines Riechkolbens, eines Nucleus olfactorius anterioris oder einer Kombination derselben zu transportieren ist.
40. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, wobei das Zytokin oder die Variante desselben an ein Rückenmark, einen Hirnstamm, eine kortikale Struktur, eine subkortikale Struktur oder eine Kombination derselben zu transportieren ist.
41. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, wobei das Zytokin oder die Variante desselben in einem Dosierungsbereich von etwa 0,14 nmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 nmol/kg Gehirngewicht zu verabreichen ist.
42. Verwendung nach Anspruch 41, bei der das Zytokin humanes Interferon-beta (IFN- β) ist und die Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen IFN- β aufweist.
43. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das Zytokin oder die Variante desselben zu einem tiefen Halsknoten, einem oberflächlichen Halsknoten oder einer Kombination derselben zu transportieren ist.
44. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine virale Infektion verhindert oder verringert.
45. Verwendung nach Anspruch 44, bei der die virale Infektion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus viraler Meningitis, Herpes Simplex, Hepatitis C und humaner Immundefizienz (HIV).
46. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine Störung behandelt oder verhindert, die durch eine Immunantwort oder eine Entzündungsantwort charakterisiert ist.
47. Verwendung nach Anspruch 46, bei der die Störung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Alzheimer-Erkrankung, primärem Sjögren-Syndrom und Multipler Sklerose.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine proliferative Störung behandelt oder verhindert.
49. Verwendung Anspruch 48, bei der die proliferative Störung ein Gliom ist.
50. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, bei der das Zytokin oder die Variante desselben in einem Dosierungsbereich von etwa 0,02 pmol/kg Gehirngewicht bis etwa 138 pmol/kg Gehirngewicht zu verabreichen ist, und das transportierte Zytokin oder die Variante desselben eine diagnostische, eine protektive oder eine therapeutische Wirkung auf das Zentralnervensystem oder das lymphatische System hat.
51. Verwendung nach Anspruch 50, bei der das Zytokin humanes Interferon-beta (IFN- β) ist und die Variante desselben mindestens 70% Sequenzidentität zu dem humanen IFN- β aufweist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

