

Innovative Biotherapie

**Fortschritte der Zell-, Molekular-
und Immunbiologie**

Karl E. Theurer

7 Abbildungen, 4 Tabellen

Karl E. Theurer
Innovative Biotherap

Innovative Biotherapie

Fortschritte der Zell-, Molekular-
und Immunbiologie

Karl E. Theurer

7 Abbildungen, 4 Tabellen



Hippokrates Verlag Stuttgart

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Theurer, Karl E.:

Innovative Biotherapie : Fortschritte d. Zell-,
Molekular- u. Immunbiologie / Karl E. Theurer. -
Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1987.
ISBN 3-7773-0852-8

Anschrift des Verfassers:

Professor Dr. med. Karl E. Theurer
(extraord. Prof. Universidad Nacional Autonomade Mexico)
Brunnwiesenstraße 23
7302 Ostfildern 1 (Ruit)

Wichtiger Hinweis

Medizin als Wissenschaft ist ständig im Fluß. Forschung und klinische Erfahrung erweitern unsere Kenntnisse, insbesondere was Behandlung und medikamentöse Therapie anbelangt. Soweit in diesem Werk eine Dosierung oder eine Applikation erwähnt wird, darf der Leser zwar darauf vertrauen, daß Autoren, Herausgeber und Verlag größte Mühe darauf verwandt haben, daß diese Angabe genau dem **Wissensstand** bei Fertigstellung des Werkes entspricht. Dennoch ist jeder Benutzer aufgefordert, die Beipackzettel der verwendeten Präparate zu prüfen, um in eigener Verantwortung festzustellen, ob die dort gegebene Empfehlung für Dosierungen oder die Beachtung von Kontraindikationen gegenüber der Angabe in diesem Buch abweicht. Das gilt nicht nur bei selten verwendeten oder neu auf den Markt gebrachten Präparaten, sondern auch bei denjenigen, die vom Bundesgesundheitsamt (BGA) in ihrer Anwendbarkeit eingeschränkt worden sind.

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, daß es sich um einen freien Warennamen handelt.

ISBN 3-7773-0852-8

© Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 1987

Jeder Nachdruck, jede Wiedergabe, Vervielfältigung und Verbreitung, auch von Teilen des Werkes oder von Abbildungen, jede Abschrift, auch auf fotomechanischem Wege oder im Magnettonverfahren, in Vortrag, Funk, Fernsehsendung, Telefonübertragung sowie Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bedarf der ausdrücklichen Genehmigung des Verlages. Printed in Germany 1987. Druck: Voralpendruck, 8961 Sulzberg.

Inhalt

Vorwort

1 Nachdruck von Veröffentlichungen

- 1 1 Pharmakologie: Eingliederung der Therapie mit makromolekularen Organextrakten in die moderne Pharmakologie "Der Kassenarzt" 21 (1981) Heft 12 11
- 1 2 Modifikationen der Eigenblutbehandlung - Die Gegensensibilisierung und die Behandlung mit Antikörperfragmenten: Physikalische Medizin und Rehabilitation 15 (1974) Heft 12 22
- 1 3 Zur wissenschaftlichen Bewertung der sog. "Gegensensibilisierung" einer modifizierten Eigenblutbehandlung: Therapiewoche 35 (1985) Heft 13 27
- 1 4 Basistherapeutikum mit Zelltropismus zum Immunsystem und zu Zellmembranen: Erfahrungsheilkunde 35 (1986) Heft 10, 684 - 687 33

2 Europäische Patentschriften

- 2 1 Verfahren zur Herstellung von künstlichen biomimetischen Haptenen bzw. Antigenen
EP-Nr 85102586 6 vom 07 03 85
Prioritäten: DE 3437757 vom 16 10 84
DE 3501705 vom 19 01 85
DE 3417022 vom 09 05 84
EP 84105554 vom 15 05 84
DE 3441764 vom 15 11 84 39
- 2 2 Verfahren zur schonenden Sterilisation von biologischen Wirkstoffen, insbesondere von Organgeweben für therapeutische Zwecke gegenüber Mikroorganismen und Viren
EP-Nr 84112944 8 vom 07 10 80
Priorität: DE 2944278 vom 02 11 79 46
- 2 3 Herstellung von Arznei- und Diätmitteln aus Milch, Sahne oder Butterfett und deren Verwendung
EP-Nr 84111391 3 vom 25 09 84
Prioritäten: DE 3413541 vom 11 04 84
DE 3433609 vom 13 09 84 50
- 2 4 Träger- und Begleitstoffe für biologische Wirk- und Regulationsfaktoren aus Zellen und Geweben und deren Anwendung
EP-Nr 84105554 4 vom 16 05 84
Priorität: DE 3417022 vom 09 05 84 56
- 2 5 Erzeugnisse zur intravasalen Applikation von wasserlöslichen bzw. emulgierbaren antigenen Organextrakten
EP-Nr 82100130 2 vom 06 01 82 64
- 2 6 Verfahren zur Vorbereitung von alloplastischen Implantationen und Organtransplantationen
(gemeinsam mit Dr. med. Karl Georg Theurer, Stuttgart)
EP-Nr 81106054 0 vom 01 08 81
Prioritäten: EP 81105731 vom 21 07 81
EP 80106066 vom 07 10 80 73
- 2 7 Verwendung von Fc-Fragmenten bzw. deren C-terminalem Anteil aus Immunglobulinen
EP-Nr 81105245 2 vom 07 07 81 86
- 2 8 Verfahren zur Anreicherung von tumorhemmenden Wirkfaktoren
EP-Nr 80106066 6 vom 07 10 80 91

3 US-Patent

- 3 1 Process for Producing biologically active factors
 Patent Number 4621055 of 04 11 86
 Prioritäten: DE 2944277 vom 02 11 79
 DE 2944278 vom 02 11 79
 EP 80106066 6 vom 07 10 86
 Japan 55152382 vom 31 10 80 101

4 Deutsche Patentschriften

- 4 1 Verwendung von Anti-Idiotyp-Antikörpern als Zusatz zu EP 3501705 8
 DE 3613848 7 vom 24 04 86 127
- 4 2 Verfahren zur Herstellung von künstlichen, biomimetischen Haptenen
 bzw. Antigenen als Zusatz zu DP 3437757 3
 DE 3501705 vom 19 01 85
 s 2 1 EP-Nr 85102586 6 vom 07 03 85
- 4 3 Verfahren zur Herstellung von künstlichen, biomimetischen Haptenen
 bzw. Antigenen
 DE 3437757 vom 16 10 84
 s 2 1 EP-Nr 85102586 6 vom 07 03 85
- 4 4 Verfahren zur Synthese von biologischen Peptidwirkstoffen
 (zusammen mit Dr rer nat Harald Porcher, Stuttgart)
 DE-Nr 2819110 vom 29 04 78 130
- 4 5 Verfahren zur Herstellung von suspendierbaren korpuskulären Partikeln
 aus klebrigen, molekular langfaserig vernetzten Materialien
 DE 3518150 8 vom 21 05 85 133
- 4 6 Herstellung von Präparaten zur spezifischen Beeinflussung der humoralen
 und zellulären Immunreaktion
 DE 3513572 vom 16 04 85 135
- 4 7 Verfahren zur immunologischen Sensibilisierung von Teilen einer permanent
 gezüchteten, nicht sensibilisierten Zelllinie von malignen Zellen des Immun-
 systems oder von Hybridomzellen
 DE 3509153 vom 14 03 85 143
- 4 8 Herstellung von konjugierten Antigenen und dagegen gerichteten Anti-
 körpern (Immunglobulinen) zu therapeutischen und prophylaktischen
 Zwecken bei Tumoren
 DE 3444684 vom 07 12 84 146
- 4 9 Verfahren zur Gewinnung von Toxinen, die nach Verbrennungen
 und/oder Strahleneinwirkungen bzw nach chemischen Noxen entstehen
 DE 3441764 vom 15 11 84 150
- 4 10 Herstellung von Impfstoffen und Diagnostika gegen Toxine, Onkogene
 und antideterminante Fragmente aus zytotoxischen, immunopathogenen
 oder allergischen Antikörpern
 DE 3438777 vom 23 10 84 155
- 4 11 Verfahren zur Konservierung, Stabilisierung und Resorptionsverbesserung
 von therapeutisch anzuwendenden Zell- und Organbestandteilen
 DE 3302319 0 vom 25 01 83 160
- 4 12 Energetische Anregung biologischer Arzneimittel
 DE 2842691,7 vom 30 09 78 164
- 4 13 Arzneimittel aus Thymus
 DE 2819131 3 vom 29 04 78 166
- 4 14 Verfahren zur Herstellung von Liposomen, welche Arzneistoffe enthalten
 Zusatz zu 2650502 2
 DE 2656333 vom 13 12 76 168

4 15	Herstellung von Liposomen, welche Arzneistoffe enthalten DE 2650502 vom 04 11 76	171
4 16	Verfahren zur Herstellung von Arzneipräparaten mit einem Gehalt an von im Darm resorbierbaren Protein und Peptidlösungen DE 2640707 8-41 vom 10 09 76	174
4 17	Herstellung von biologischen Arzneimitteln gegen maligne Tumoren und Blutkrankheiten aus Zell- bzw Gewebekulturen DE 2600442 vom 08 01 76	176
4 18	Gewinnung von Wirkstoffen zur Erneuerung und Steigerung des Haar- wuchses DE 2314019 vom 21 03 73	179
4 19	Verwendung chemisch aufgeschlossener Organe in Futtermitteln (zusammen mit Prof Dr Hans Buschmann, München) DE 2249697 vom 11 10 72	181
4 20	Verfahren zur Herstellung sowie zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung von Zellextrakten aus Samenzellen und Eizellen DE 2032988 vom 03 06 70	183
4 21	Verfahren zur Beeinflussung der quantitativen Antikörperbildung bei der aktiven Immunisierung und der Desensibilisierung DE 1945251 vom 06 09 69	187
4 22	Zusatzverfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus Zusatz zu DE 1617886 DE 1814134 vom 12 12 68	193
4 23	Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus gegen Krebs und bestimmte Organe DE 1617886 vom 06 03 67	196
4 24	Verfahren zur Herstellung ¹ von resorbierbaren, therapeutisch wirk- samen Fragmenten aus Proteohormonen, Insulin und Fermenten DE 1617896 vom 22 12 67	203
4 25	Verfahren zur Gewinnung von organotropen, bioaktiven Wirkstoffen, insbesondere von Arzneimitteln DE 1617880 vom 06 10 66	206
4 26	Verfahren zur Konservierung von wäßrigen Lösungen von hochmole- kularen Organextrakten DE 1617878 vom 14 09 66	209
4 27	Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln gegen Krebs DE 1617865 vom 12 03 66	211
4 28	Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln aus Plazenta DE 1617864 vom 09 03 66	213
4 29	Verfahren zur Trennung von geformten Zellelementen von Körper- flüssigkeiten (zusammen mit Prof Dr H Kolb, Stuttgart-Sillenbuch und Dr J Rienmüller, Stuttgart) DE 1617561 vom 21 07 66	215
4 30	Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Beeinflussung der Funktion spezieller Organe DE 1492190 vom 27 06 64	218
4 31	Verfahren zum gesteuerten Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben Zusatz zu Patent 1090821 DE 1209699 vom 16 11 61	220

4 32 Verfahren zur Gewinnung von Antigenen und Haptenen Zusatz zu Patent 1040748 DE 1126068 vom 15 03 58	222
4 33 Verfahren zur Gewinnung organspezifischer Fraktionen aus Organgeweben DE 1040748 vom 20 05 57	227
4 34 Verfahren zur Herstellung von Präparaten aus isolierten Plazenta- Anteilen DE 1033374 vom 02 11 55	231
4 35 Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben für therapeutische Zwecke DE 1090821 vom 16 02 56	233
4 36 Verfahren zur Herstellung von Salben und Emulsionen Zusatz zu Patent 1032889 DE 1065570 vom 12 12 57	237
Nachdruck von Veröffentlichungen	
1 5 Zirkadianer Biorhythmus in Beziehung zu anderen vegetativen Regulationen Ghrono-Biorhythmus-Therapie mit unspezifischen Methoden und gezielt wirkenden Medikamenten Med Klin (1984) Nr 3 und 4	239
Lebenslauf	253
Sachverzeichnis	255

Vorwort



Prof. Dr. K. E. Theurer

Rückschläge auf vielen Gebieten technischer Nutzenwendungen von wissenschaftlichen Erkenntnissen lassen auch in der Medizin an Dogmen der Wissenschaft zweifeln. Das Erkennen von Ungereimtheiten und das Bewußtwerden einer Anomalie, daß die Natur in irgendeiner Weise die von einem Paradigma erzeugten Erwartungen der normalen Wissenschaft nicht erfüllt, veranlaßt dazu, neue Wege zu suchen (Th. S. Kuhn).

Die symptomatische Therapie mit unphysiologischen Monosubstanzen aufgrund eines reduktionistischen einseitigen Ursachen-Wirkungsdenkens hat die Erwartungen ebenso wenig befriedigt wie der neu erwachte Vitalismus in Form der Zellulärtherapie nach P. Niehans. Die biologische Forschung zeigt, daß beim Lebendigen Wechselwirkungen und eine Vernetzung von Systemen vorliegt, also ein Pluralismus. Diesem muß auch eine molekulare Therapie Rechnung tragen. Eine Rückbesinnung auf Vorgänge der Hygiogenese, der Selbst-

heilung, Selbstregulation und Selbstorganisation und deren mögliche Beeinflussung durch eine natürliche Therapie war hier die gesuchte Alternative. Diese Begriffe entsprechen nach G. Kienle zwar nicht dem wissenschaftlichen Erklärungsarsenal, weil sie nicht aus der Notwendigkeit von Einzelteilen erklärbar sind, die durch deduktive oder reduktive Methoden isoliert werden. Trotzdem "kann und muß die Naturwissenschaft" nach Nobelpreisträger Konrad Lorenz "alles was es in der Welt gibt, zum Gegenstand ihrer Forschung machen". Die Erforschung der Wechselwirkungen von komplexen Systemen ist aufgrund des Schichtenbaus der realen Welt nach Nicolai Hartmann und der Systemtheorie von L. v. Bertalanffy bis hin zu R. Riedl nicht weniger wissenschaftlich als die Beschäftigung mit isolierten Faktoren. Nach H. Mohr tut sich unser Verstand jedoch schwer, "komplexe, nicht lineare, mehrfach verstärkte Systeme in den Griff zu bekommen, weil die Kausalität, auf die wir programmiert sind, die linearen Zusammenhänge, die den Erfolg zu bringen scheinen, überbetont und die Vernetzungen, die Nebenwirkungen und Rückkopplungen solange wie irgend möglich ignoriert.

Ausgangspunkt für die Suche nach einem eigenen Weg war die Zellulärtherapie nach Niehans und die Entwicklung und Einführung der Zystoplasmatischen Therapie (1951) sowie der Methoden der Serum-Desensibilisierung durch Modifikationen der Eigenblutbehandlung in Form der Gegenensibilisierung mit künstlich verfremdeten pathogenen Antikörpern (1955) und andererseits mit Antikörperfragmenten.

(1957) Hierüber sollen Nachdrucke von Veröffentlichungen informieren

Die Durchsetzung einer neuen Idee ist meist schwerer, als diese zu konzipieren
Wie in der Evolution der Natur treiben auch im persönlichen Leben Einschränkungen die Entwicklung voran
Das Ergebnis waren Patente und Patentanmeldungen, von denen ein Auszug rückläufig chrono-

logisch dargestellt wird
Vieles konnte leider noch nicht realisiert werden
Die Zusammenfassung kann und soll deshalb den Leser anregen, die verschiedenen Möglichkeiten dieser Ideen, Hypothesen und Theorien kennenzulernen und wenn möglich zu nutzen, um die Welt zu verbessern, ohne sie dabei zu zerstören

I Nachdruck von Veröffentlichungen

Pharmakologie

Eingliederung der Therapie mit makromolekularen Organextrakten in die moderne Pharmakologie

K Theurer

Der Kassenarzt 21, Heft 12 Therapeutische Berichte, Seite 3 - 8 (1981)

Zusammenfassung

Die Zytoplasmatische Therapie mit makromolekularen Organextrakten ist eine auf den ganzen Organismus ausgerichtete Organotherapie mit Präparaten aus Einzelorganen und Organkombinationen für bestimmte Krankheitsarten. Die Behandlungsprinzipien beruhen auf der Substitution von Wirkfaktoren aus gesunden tierischen und fötalen Geweben, dann aber auch in der Stimulierung und Induktion körpereigener Funktionen, die durch die Krankheit beeinträchtigt sind, und nicht zuletzt in der Reparatur von defekten Molekülen (DNS-Repair) und Austausch von Untereinheiten (Domänen in Proteinen). Experimentelle Ergebnisse beweisen diese Wirkungsmechanismen und fundieren die Ergebnisse von kontrollierten klinischen Studien und Doppelblindstudien sowie einer Statistik über mehr als zehntausend Behandlungsfälle aus Klinik und Praxis der Human- und Veterinärmedizin.

Die Pharmakologie ist in ständiger Weiterentwicklung (20). Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte aus der Biochemie, insbesondere der Molekularbiologie und Molekulargenetik sowie der Organ- und Transplantationsimmunologie sind bisher noch nicht in die Pharmakologie voll integriert. Ansätze in diese Richtung beste-

hen jedoch über die Rezeptorentheorie und die Lehre von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Auch erkennt das Deutsche Arzneimittelgesetz (BGB 1) Organ- und Zellbestandteile ausdrücklich als Arzneimittel an. In § 2 werden genannt: Tierkörper, auch lebender Tiere, sowie Körperteile, -bestandteile und Stoffwechselprodukte von Mensch und Tier in bearbeitetem Zustand.

Art und Herstellung der Präparate

Das Spektrum der Wirkstoffe der makromolekularen zytoplasmatischen Organotherapie* umfaßt native molekulare Zellbestandteile von lebenswichtigen heterologen (xenogenischen) und zum Teil auch homologen (allogenen) fetalen und juvenilen Organen wie Proteine, Nucleinsäuren (RNS und DNS), Lipide und Polysaccharide bis zu deren monomeren Untereinheiten und Bestandteilen, den Oligo- und Polypeptiden, Nucleotiden u. a. Diese werden

*Revitorgan-Trockensubstanzen, -Dilutionen mit und ohne Arzneimittelzusätze, -Lingual-Präparate, -Augentropfen, -Organsalben, -Liposome
Hersteller: vitOrgan Arzneimittel GmbH,
7302 Ostfildern 1

nach einem besonders schonenden Herstellungsverfahren aus lyophilisierten Organtrockenpulvern mittels Säuredampf-Flyse im Vakuum bei Raumtemperatur gewonnen (37)

Daraus werden dann physiologisch gepufferte wäßrige Lösungen (pH 7,2) als Dilutionen in verschiedenen Verdünnungsstufen (mg, Mg, ng, pg) unter Mitverwendung von Spurenelementen (Cu, Co, Mg, Zn) und oberflächenaktiven Stoffen hergestellt. Es erfolgt eine Fraktionierung auf Molekulargewichte unter 1 Million Dalton. Zusätzlich steigern Pharmaka die Wirksamkeit der Organsubstanzen. Oberflächenaktive Substanzen wirken als Adjuvans, verbessern die Permeabilität, vermeiden eine Reaggregation von molekularen Untereinheiten und wirken als Emulgatoren für Lipide. Der Herstellungsprozeß der makromolekularen Präparate verhindert unkontrollierte enzymatische und autokatalytische Abbauprozesse. Der Tropismus gewisser Organfaktoren erlaubt, organotherapeutische Wirkstoffe als Vehikel für andere Arzneimittel, z. B. Hormone und Vitamine, zu verwenden (Dilutionen "N" und Lingual-Präparate)

Bei der Zytoplasmatischen Therapie handelt es sich um ein geschlossenes System einer molekularen Organotherapie zur stufenweisen Dosierung nach immunologisch-allergologischen Grundsätzen. Durch tolerogene Dosierung mit einschleichenden Konzentrationen wird die immunologische Barriere überwunden, so daß die Organfaktoren in den Stoffwechsel geschädigter Zellen eingebaut und krankheitsbedingte Stoffwechseldefekte überbrückt werden können (10). Eine indirekte Wirkung erfolgt über Immunmechanismen und die Beeinflussung vegetativer Reaktionsabläufe.

Die Direktwirkung auf geschädigte, fehlfunktionierende Organzellen erfolgt durch Substitution von Enzymen, Nucleinsäuren sowie durch Untereinheiten und Bestandteile dieser Makromoleküle. Diese können zur Reparatur molekularer Defekte und geschädigter Regulationsmechanismen wie auch als Matrizen für ihre eigene Reproduktion dienen. Die Zufuhr neuer biologischer Informationen kann eine Neu- oder Umprogrammierung bewirken. Bei Selbstheilungsvorgängen geht diese Reparaturshilfe von gesunden Zellgeweben auf dysfunktionierende, kranke Zellen über. Bei genetischen Defekten und Molekularkrankheiten fehlen jedoch solche Faktoren; diese müssen deshalb aus gesunden Organismen zugeführt werden. Voraussetzung für eine Wirksamkeit von Biomolekülen ist die Spezifitätserhaltung ihrer molekularen Grundstrukturen. Zu kleine Bruchstücke haben keine biologischen Spezifitätsgrade mehr, beispielsweise Aminosäuren, so daß diese nur als Bausteine für Reparaturvorgänge dienen können.

Nachweis der Wirkungsmechanismen

Der Organtropismus wurde durch radioaktive Markierung der Organpräparate bewiesen (16, 31). Auch ließ sich der Organtropismus über die Synthesestimulierung analoger Organe (Pankreas, Gehirn) im Tierversuch nachweisen (3). Die Resorption von organspezifischen Faktoren durch die Schleimhäute von Zunge, Skleren und Darm ist Tracer-analytisch durch Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen (23) und mit radioaktiven Nuklidien (31) nachgewiesen.

Die Wirksamkeit einer oralen Anwendung zytoplasmatischer Faktoren konnte tierexperimentell bestätigt werden (19).

In wiederholt reproduzierten Versuchen mit makromolekularen Extrakten aus Rinder-Chorion (fötaler Anteil der Plazenta) mit Konzentrationen im ng-Bereich, konnte die semikonservative DNS-Synthese um mehr als 65 Prozent und die reinen DNS-Repairvorgänge, nach UV-Bestrahlung, um 32 Prozent gesteigert werden (2) Nach neueren Forschungsergebnissen aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen soll auch eine Korrektur von Fehlern bei der enzymatischen Synthese von Eiweißketten möglich sein (10)

Der Austausch von Untereinheiten zwischen Enzymen aus verschiedenen Organismen ist durch die Bildung von Enzymchimären bewiesen (12) Zugeführte mRNA könnte durch Reverse Transkriptase als DNS ins Genom integriert (27) oder als Untereinheit durch terminale Desoxynukleotidyl-Transferase an DNS angekoppelt werden (5) Auch ein Mechanismus der Hybridisierung defekter RNS mit Poly- oder Oligo-Ribonukleotiden, die als Informationsmatrize dienen, und eine nachfolgende Reparatur der DNS, erscheint möglich Schließlich ist auch an eine besondere Form der genetischen Rekombination durch Übertragung von genetischer Substanz aus Fremdorganismen im Sinne einer Transfektion zu denken (11) Diese könnte zu einer Ersatzprogrammierung geschädigter somatischer Zellen führen, wobei die neugewonnene Information repliziert würde In diesem Fall handelt es sich um eine Art molekularer Transplantation (31)

Verständlicherweise lassen sich aber biologisch positive, orthomolekularisierende bzw. euthetisierende Wirkungen experimentell nicht so leicht nachweisen wie schädigende Wirkungen Jedoch konnten Axmann und Chandra tierexperimentell in vivo die Eiweißsynthese im Gehirn mit Dilutionen

aus Gehirn, und die Eiweißsynthese im Pankreas mit Dilutionen aus Pankreas in ng-Konzentrationen um mehr als 50 Prozent weitgehend organspezifisch stimulieren (3)

Die klassischen Transplantationsexperimente von Spemann (3) und seiner Schule haben gezeigt, daß makromolekulare Organextrakte aus einem bestimmten Bezirk des Amphibienkeims Faktoren enthalten, die zur Differenzierung von Organanlagen führen Insbesondere konnten ein neuraler Faktor und ein mesenchymaler Faktor isoliert werden Beide Faktoren sind Proteine, durch deren Zusammenwirken es zur Bildung vollständiger Keimanlagen kommt In der späteren Entwicklung lassen sich Determinationsstoffe nachweisen, so z B ein chondrogener Faktor und ein Nervenwachstumsfaktor mit Molekulargewichten um 60 000 Solche Stoffe dürften auch eine Einwirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen für die morphologische Regeneration haben Die Induktionsstoffe wirken wahrscheinlich über den Zellkern und aktivieren bestimmte Gene, die dann den Anstoß zur Bildung zellspezifischer Stoffe geben (18)

Als Wirkfaktoren kommen auch Mediatoren des Stoffwechsels in Betracht, wie man sie besonders für das Immunsystem gefunden hat (1) Überträgerstoffe von Hormonwirkungen wie z B das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), einschließlich der auf- und abbauenden Enzyme der Adenylzyklase und Phosphodiesterase (34), dann aber auch Regulationsstoffe des Wachstums, z B Chalone (6) und Prostaglandine (26)

Immunologische Mechanismen

Wegen geringfügiger, struktureller Abweichungen in der Sequenz von Aminosäuren oder Nukleotiden wirken xenogenische oder allogene makromolekulare Organsubstanzen, je nach Dosierung, immunogen oder tolerogen oder immunsuppressiv. Die gewünschte immunologische Wirkung wird durch verschiedene Verdünnungsstufen der makromolekularen Organpräparate (36) erzielt. Hohe Verdünnungen erzeugen eine "low-zone-tolerance" in geeigneter Dosierung oder eine Immunsuppression. Mittlere Konzentrationen sensibilisieren, und ganz große Mengen lösen eine Immunparalyse aus.

Die immunologische Wirkung ist also ein wesentlicher Teil des therapeutischen Effektes von makromolekularen Organfaktoren. Dabei ist eine Beeinflussung des Immunsystems, unabhängig vom sensibilisierenden Antigen, durch Veränderung der gesamten immunologischen Reaktionslage ebenso möglich wie eine antigenspezifische Beeinflussung.

Dosierung

Bei Autoimmunkrankheiten erfolgt die Dosierung nach Gesichtspunkten der immunologischen Toleranzerzeugung durch wiederholte Injektionen von höheren Verdünnungen der Organantigene, in Art einer "low-zone-tolerance", mit 10^{-6} beginnend und ansteigend zum 10^{-1} -Bereich. Bei einer Insuffizienz des Immunsystems, z. B. in der Geriatrie, ist eine Stimulierung des Stoffwechsels durch Injektion von Dosen in 10^{-1} -Mengen möglich. Die größeren Injektionsmengen können jedoch nur in längeren Zeitintervallen oder fortlaufend in Abständen von nicht mehr als 3 Tagen wieder-

holt injiziert werden. Deshalb stehen von jedem Einzelpräparat, wie auch von jedem Kombinationspräparat, eine Reihe verschiedener Verdünnungsgrade zur Verfügung. Bei krankheitsbedingter Autosensibilisierung wird die Behandlung analog der spezifischen Hyposensibilisierung in der Allergologie mit hohen Verdünnungsgraden begonnen und die Dosierung, in sich verlängernden Abständen, individualisierend gesteigert. Die immunologischen und molekularbiologischen Wirkungen benötigen zur Effektivität eine Latenzzeit. Entscheidend ist deshalb die Zeit der Einwirkung bzw. die Zeitspanne zwischen der Wiederholung der Anwendung.

Eine Furcht vor Eiweiß- und Makromolekülen ist hier wegen des besonderen Lyseverfahrens, dem die Präparate unterzogen werden, und der Möglichkeit für eine individuelle Dosierung unbegründet. Die schonende Lyse bedeutet immunologisch eine Haptenisierung (39). Sie vermindert die Artspezifität unter Beibehaltung der Organspezifität (22). Zudem bewirkt das Lyseverfahren, wie auch die Fraktionierung auf Molekulargewichte unter 1 Million Dalton, eine Desinfektion gegen etwaige Infektionskeime und Viren (43). Trotzdem erfolgen wiederholt Sterilitätskontrollen.

Immunbiologische Mechanismen

Niedere Antikörperkonzentrationen und Untereinheiten von Antikörpern, die auch ins Zellinnere permeieren, können sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der Synthesevorgänge bewirken (42). Antideterminante Bezirke von Isoantikörpern, die sowohl gegen das Präparat als auch gegen den Empfängerorganismus gerichtet sind, können mit Rezeptoren der Zelloberfläche reagieren. Möglich erscheint

auch eine Derepression von reprimierten Genen und damit eine Syntheseaktivierung, sofern sich diese Antikörperbestandteile gegen Repressoren, das heißt Hemmstoffe der Gen-gesteuerten Synthese, richten (38). Andererseits könnte die Repression, das heißt die Hemmung der Synthesevorgänge, z. B. beim Krebs, durch antideterminante Bezirke von Antikörpern erfolgen, die gegen DNS-Anteile, insbesondere gegen die Promotoranteile von dereprimierten Tumorgenen, gerichtet sind (41). Entsprechende immunogene oder haptene Faktoren, vermutlich aber auch intrazelluläre Regulationsstoffe, werden mit Organpräparaten übertragen. Eine Einwirkung auf Synthesevorgänge erscheint auch auf Translationsebene an den Ribosomen möglich.

Molekularbiologische Mechanismen

Zur Normalisierung gestörter Stoffwechsellvorgänge werden bei der makromolekularen Organotherapie phylogenetisch ähnliche Funktions- und Regulationsstoffe aus gesunden Individuen verwendet. Nicht benötigte Faktoren unterliegen dem normalen Metabolismus und Abbau. Die körpereigenen Regulationen werden nicht beeinträchtigt. Es ist anzunehmen, daß die therapeutische Wirkung von der Konzentration und vom Ionenmilieu der Wirkstoffe abhängt und das Selektionsvermögen des Organismus, wie auch Feedback-Mechanismen, die therapeutische Wirkung steuern. Dabei spielen auch der pH, die Temperatur sowie chronobiologische und Zellteilungszyklen eine Rolle. Nicht zu befürchten sind schädliche Nebenwirkungen. Auch besteht keine Gefahr eines genetischen "engineering" durch pathogene Fehlinformationen, weil hier physiologische Stoffe und nicht Gene aus patho-

genen Mikroorganismen, Viren oder künstliche Hybridisations- und Umwandlungsprodukte verwendet werden.

An biologischen Reaktionsabläufen sind Kofaktoren und Regelmechanismen beteiligt. Isolierte Einzelfaktoren aus Zellinhaltsstoffen sind deshalb therapeutisch meist weniger wirksam als das native Stoffgemisch. Trotzdem hat die Erforschung von Einzelfaktoren aber großen Anteil an der Aufklärung der Wirkungsmechanismen. Da jedes Cystron, das heißt jedes Gen sowie auch jedes Operon, also jeweils zusammenarbeitende Genorte, einzeln reguliert werden, sind unterschiedliche DNS-Informationen für Repressoren mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz erforderlich. Deshalb sind für eine biologische Therapie Gemische solcher Faktoren vorteilhaft. Für die Ansicht, daß das Ganze wirksamer sein müsse als die einzelnen Teile, die sich in der Mischung nicht nachteilig beeinflussen, gibt es viele Beispiele, so die verschiedenen Immunglobulinklassen, die Kaskade der Blutgerinnungsfaktoren und des Komplements sowie die Enzymaktivierung in Wirkstoffgemischen. Erklärbar ist diese Tatsache durch die Fähigkeit der Großmoleküle, ihre Reaktionspartner und Rezeptoren gegenseitig zu erkennen und mit diesen zu reagieren.

Standardisierung

Der Wirkungsnachweis der makromolekularen Organextrakte erfolgt routinemäßig durch Tierversuche (14), Bioassay an Zell- und Gewebekulturen (8), an zellfreien Synthesystemen (15) sowie durch immunbiologische Methoden (24), z. B. dem Hämolyse-Gel-Test, ebenso aber auch durch den Phagozytostest. Es lassen sich auch Verfahren heranziehen, wie sie für

die Titerbestimmung' von antigenen Impfstoffen unter Verwendung von standardisierten Antikörperseren angewandt werden (2) Im Gegensatz zu Toxinen und Fremdstoffen ist zu berücksichtigen, daß die Wirkung nur an einem geschädigten oder nicht optimal wirkenden biologischen System geprüft werden kann Die Organspezifität läßt sich nicht physikalisch-chemisch, wohl aber immunologisch-serologisch bis zum ng-Bereich durch Radioimmunassay (RIA) wie auch durch Gelpräzipitation nachweisen Die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve oder einer Konzentrations-Wirkungskurve ist bei den molekularreparativen und replizierenden Wirkungsmechanismen, in gleicher Weise wie bei Immunreaktionen, die von der Reaktionslage des Patienten und einer etwaigen Vorsensibilisierung abhängen, nur bedingt möglich Gewisse Hinweise auf die Kompetenz des Organismus zur Verwertung der zugeführten Organsubstanzen lassen sich durch anamnestische Angaben über die Reaktionsbereitschaft auf Medikamente und durch Überprüfung des Immunstatus gewinnen

Indikationen

Die Auswahl der Organpräparate für Prophylaxe und Therapie erfolgt nach den pathophysiologischen Erkenntnissen unter Deutung der Anamnese, der Symptomatik und der Befunde Diese geben Hinweise über korrelative Organbeteiligungen am Krankheitsgeschehen Dabei sind Geschlecht und Alter des Patienten wegen der Disposition des Endokriniums zu berücksichtigen Aufgrund der Organspezifität der verschiedenen Gewebearten und -zollen werden Faktoren aus Einzelorganen, die bei Multimorbidität und Beteiligung verschiedener Organarten kombiniert werden können,

für bestimmte Indikationen fertige Kombinationspräparate aus verschiedenen Organarten, angewandt

Abgrenzung der Indikationen

Der Vergleich der Pharmakologie von makromolekularen Organsubstanzen mit dem heute üblichen Arzneimittelschatz erlaubt folgende Abgrenzung der Indikationen Für die symptomatisch wirkenden Pharmaka liegen die Hauptindikationen in der Behandlung von Infektionen und akut bedrohlichen Zuständen, bei denen das Biosystem nicht mehr auf biologische Reize anspricht oder zu langsam reagiert Dazu gehören Erkrankungen mit temporären, reversiblen Störungen des Stoffwechsels und der Organfunktionen, dann aber auch irreversible Krankheitszustände, bei denen keine Restitution mehr möglich ist Bedrohliche Situationen sollten damit zunächst kupiert werden, um so die Voraussetzungen für eine bessere Ansprechbarkeit auf die organotherapeutische Umstimmungstherapie zu schaffen So können bei schweren Krankheitszuständen Biomechanismen blockiert sein, z B bei chronischen Infektionskrankheiten, allergischen und rheumatischen Erkrankungen sowie immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten, ebenso aber auch bei endokrinen Störungen und chronischen Organerkrankungen Die makromolekulare Organotherapie ist also keine Notfalltherapie und im eigentlichen Sinne des Wortes keine anti-biotische Therapie

Die eigentlichen Indikationen der makromolekularen Organotherapie liegen bei jenen Erkrankungen, bei denen eine Restitution durch Selbstheilungsvorgänge nicht oder nicht mehr möglich ist, wie z B bei genetisch bedingten Erkrankungen eines

"errors of metabolism", bestimmten hereditären Krankheitsdispositionen und Entwicklungsstörungen sowie erworbenen Stoffwechseldefekten, besonders bei chronischen und rezidivierenden Leiden und in der Geriatrie. Zu den Indikationen zählen auch iatrogene und postinfektiöse Folgeschäden. Auch genetisch bedingte Regulationsstörungen des Stoffwechsels durch chromosomale Aberrationen lassen sich günstig beeinflussen. Bei zellulären Mosaiken wird vermutlich die Proliferation und Differenzierung von Normalzellen gegenüber den chromosomal aberrenten Zellen stärker stimuliert, so daß sich die Relation zugunsten der Normalzellen verbessert. Deshalb sollte beim Down-Syndrom die Behandlung möglichst früh einsetzen (9). Es ist dann auch ein Einfluß auf die Entwicklung und Reifung des Gehirns möglich.

Eine Krankheitsprophylaxe im Sinne einer Steigerung der Resistenz gegen virale Infektionen, Intoxikationen und kanzerogene Noxen gewinnt in unserem Zeitalter der vermehrten Umweltschädigungen zunehmend an Bedeutung. Präparationen aus dem maternalen Anteil der Plazenta konnten im Doppelblindversuch bei Verfütterung an Spontantumoren erkrankten, syngenen Mäusen, wie auch nach Anwendung von Methylcholanthren und anderen Karzinogenen die Überlebensrate um 40 Prozent steigern (46). Die Verfütterung der Dezi-duapräparate erfolgte über 84 Wochen. Nachteilige Wirkungen wurden nicht beobachtet. Eine Injektionstherapie, ebenso aber auch eine dreimalige Behandlung mit Präparationen aus Leber, hatten bis über 80 Prozent Schutzwirkung (46). In der Tumorthherapie ersetzen makromolekulare Organextrakte die Methoden der unspezifischen Stimulierung des Immunsystems mittels

bakterieller Infektionen, Endotoxinen und/oder chemischen Stoffen. Bei Behandlungsbeginn in einem frühen Entwicklungsstadium des Tumors konnte tierexperimentell an verschiedenen Tumorsystemen bis über 80 Prozent vollständige Regression der Tumoren erzielt werden (46). Präparate aus dem maternalen Anteil der Rinderplazenta wirken auf Tumoren katabolisierend und auf Normalgewebe anabolisierend. Der anoxibiotische Stoffwechsel der Tumoren wird auf oxidative Vorgänge umgestellt. Nach Veröffentlichungen von Medawar (25) sowie von Wacker (44) wurden mit Präparationen aus fötaler Leber oder mit fötalen Frischgeweben überwiegend prophylaktische Wirkungen bei Impftumoren erzielt, jedoch keine therapeutische Wirkung bei bestehenden Tumoren. Mit zytoplasmatischen Organlysaten lassen sich dagegen auch therapeutische Wirkungen erzielen. Dies spricht dafür, daß das Herstellungsverfahren für die Wirksamkeit der Präparate von Bedeutung ist. An kontrollierten Versuchen bei der Fütterung von Hühnern, Schweinen und Kälbern äußerte sich eine Zufuhr derartiger Präparate bis zur Schlachtung in einer signifikant verbesserten Futterverwertung wie auch der Zunahme des Körpergewichts und der Resistenz. Die Ergebnisse waren denen bei der Verfütterung von Antibiotika und anabolen Hormonen mindestens gleichwertig (7).

Besonders wichtige Indikationen sind auch atopische Erkrankungen und die Umstimmung einer hyperergisch-allergischen Reaktionslage. Dabei ist auf eine Wirkungsumkehr von Präparaten aus fötalen und jugendlichen Organen zu achten. So hemmt z. B. fötaler Thymus die Immunreaktionen im Jerne-Test, während jugendlicher Thymus immunologisch stimulierend wirkt (32).

Prüfung':

Mit modernen immunologischen Methoden durch Antigen-Antikörper-Reaktionen Tierexperimentell durch Bioassay - in vitro in Zell- und Gewebekulturen sowie an zellfreien Synthesystemen Kontrollierte klinische Versuche und statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Praxis

Einschleichende toleranzerzeugende oder immunogene Dosierung, abhängig von der Reaktionslage

Dosis-Wirkungskurve nur an Zellkulturen möglich

Keine toxischen Wirkungen

Metabolismus, Abbau und Ausscheidung wie bei körpereigenen Stoffen

Biologische Beeinflussung immunologischer Synthesysteme (Organadjuvantien)

Keine Arzneimittelschäden

Keine Gewöhnung oder Sucht

Kombinationsmöglichkeiten mit herkömmlichen Pharmaka soweit diese nicht die Wirkungsmechanismen blockieren

Wirkung:

Über ubiquitäre biologische Mechanismen durch Transfer, Integrierung und Reduplikation von genetischer Substanz in die Synthese- und Regulationsvorgänge des intrazellulären Stoffwechsels Latenzzeit bis zum Wirkungseintritt Langzeit- oder Dauerwirkung über:

a) immunologische Mechanismen,

b) molekularbiologische Mechanismen

Übertragung genetischer Informationen durch Transfektion (heterologe Gene und Genbestandteile), Transkription der übertragenen Gene, Repairmechanismen (Nukleotide und Repairenzyme) Übertragungsfehlender oder beim Patienten defekter Regulationsstoffe (Induktoren, Repressoren), Enzyme und Metabolite des Zellstoffwechsels

Regulationsmechanismen werden nicht beeinträchtigt Die Aktivierung der körpereigenen Regulationen und Normalisierung von Funktionen sind weniger dosis- als zeitabhängig, vergleichbar der Immunantwort nach Sensibilisierung

Keine Notfalltherapie

Umstimmungstherapie

Literaturhinweise

(1) Academic Press N Y , London 1974:

"The Immune System: 3 ICN-UGLA Symposium Mol Biol "

(2) Altmann, H , Wottawa, A , Theurer K :

Vorträge Jahrestagung 1974 und 1976,

Zytoplasmatische Therapie, vitOrgan;

Theurer, K : Sympos on DNA-Repair

and late effects 1975, Wien Edition Roetzler,

Eisenstadt (1976)

(3) Axmann, G : Diplomarbeit Inst f

Therapeut, Biochemie d Univ Frankfurt,

(10 2 1973)

(4) Birkmayer W : Expertise, vitOrgan-

Informationen (1/1971)

(5) Bollum, F J ; 14 Karl August Forster

Lecture, Mainz, Okt (1974)

(6) Bücher, Th , Sies, H : Inhibitor tools

in cell research, Colloquium d Ges f

Biol, Chemie, Springer Verlag (1969)

(7) Buschmann, H , Weiss, Woernle, H :

Tagungsberichte Zytoplasmatische Therapie

(1974-76); vitOrgan Arzneimittel GmbH

(8) Buschmann, H : Tagungsbericht Zyto-

plasmatische Therapie (1974); vitOrgan

Arzneimittel GmbH; Letnansky K : Exp

Path 8, 205 - 212 (1973); 9, 354 - 360

(1974) österr Zeitschr f Onkologie 2,

31 - 32 (1974); 2 - 3, 42 (1977) EHK 3,

202 (1980); Licht, W : Versuchsbericht

1964; Lipp, R : Z Tierphysiol , Tierer-

nährung u Tierfuttermittelkunde 39,

35 - 47 (1977); Paffenholz, V , Theurer, K

- Der Kassenarzt 27 (1978); 19, 1876 - 1887 (1979); 20, 1295 - 1298 (1980); Erfahrungsheilkunde 5, 390 - 392 (1980)
- (9) Geesing, II, Pollmächer, G, Theurer, K Physik Med u Rehabil 5 (1979)
- (10) v d Haar, Graeser: Selecta 20, 2024 (1976)
- (11) Harbers, E: Nucleinsäuren - Biochemie u Funktionen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Roosa, R A, Bailey, E: J Cell Physiol 75, 137 (1970); Szybalski, W: Exper Cell Res 18588 (1959); Szybalska E H, Szybalski, W: Proc Nat Acad Sci U S A 18, 2026 (1962)
- (12) Hartmann, G R: Angew Chem 88, 197 - 203 (1976)
- (13) Hofschneider, P H: "Organo- und Immunotherapie: Neue Perspektiven in der Medizin" Enke, Stuttgart (1979), ISBN 3-432-90851-2
- (14) Inaugural-Dissertationen aus der Vet Med Fakultät der Univ München: Fischer, G (1960); Ronneberger, H (1961); Berns, S (1962); Sambraus, H -H (1965); Misset, W (1966); Langhans, U (1966); Eicher, E (1967); Schachtel, E (1968); Beitzel, E (1977); Hempt, M (1977); aus der Univ des Saarlandes: Forcher, P (1979); Scherer, K (1978); aus der Univ Tübingen: Gehring, H (1971); aus der Univ Freiburg/Breisgau: Hovestadt, I (1975); Haas-Andela, II: Tagungsbericht Zytoplasmat Therapie 1975, vitOrgan Arzneimittel GmbH; Wigge, B: Kleintierpraxis 4, 131 - 136 (1975)
- (15) Jachertz, D, Jachertz, B und May, G Med Klin 18, 752 - 754 (1963); Letnansky, K: siehe Nr 8
- (16) Jachertz, D: Versuchsbericht in: 25 Jahre zytoplasmatische Therapie, Leitfaden 1979; Byrne: Medical Tribune 12a (1969)
- Jansen, W, Brückner, G W: Psycho 4/79 Neurol Psychiat 5, 214 - 220 (1979)
- (18) Karlson, P: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Biochemie, 378 - 379 (1972), Thieme-Verlag
- (19) Kraft, H EKH 6 (1972)
- (20) Kuschinsky, G, Lüllmann, H: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)
- (21) Lachnit, K S: EHK 3, 215 (1979); Fuchs, J: Klin Monatsbl f Augenheilkunde 6, 715 - 878 (1979); Lachnit, K S, Klausner, A, Proszowski, E, Rieder, L: Therapiewoche 30, 8023 - 8033 (1980)
- (22) v Mayersbach, H: Vortrag Jahrestagung Zytoplasmat Therapie (1965); vitOrgan Arzneimittel GmbH
- (23) v Mayersbach, H: Expertise, Vortrag Jahrestagung Zytoplasmat Therapie (1968)
- (24) Mayr, A, Buschmann, II: vitOrgan Informationen 1/1971; Theurer, K: Krebsgeschehen 4 (1977); VVrba, H: persönliche Mitteilung
- (25) Medawar, P B, Hunt, R: Nature Vol 271, 164 - 165 (1978)
- (26) MTP-Press: Lancaster 1976; Advances in Prostaglandin research X, XIII (1976)
- (27) Penner, P E, Cohen, L H, Loeb, L A: Nature New Biol 232, 58 - 61 (1971)
- (28) Peter, II: Tagungsbericht Zytoplasmat Therapie 1970, 19 ff; Michalek, H L, vitOrgan-Informationen (1/1970)
- (29) Rett, A: Z Kinder-Jugendpsychiatrie 1, 156 - 170 (1973); Tagungsbericht Zytoplasmat Therapie S 26 (1974), vitOrgan Arzneimittel GmbH
- (30) Schuh, E Zahnärztl Praxis 3, 63 (1974)
- (31) Seifert, J, Ganser, R, Pfeleiderer, A, Brendel, W: Monatsbl f Augenheilk 175, 795 - 798 (1979)

- (32) Sorkin, E. : Expertise 1969 - vitOrgan-
Informationen (1/1971)
- (33) Spemann, H : Arch Entwicklungsme-
chanik 43, 448 - 555 (1918)
- (34) Squibb and Sons: Cyclic ANYP (1957 -
1969); Research a Development, New Bruns-
wick, New Jersey 08903
- (35) Theurer, K Therapiewoche 5/6, 132
(1955)
- (36) Theurer, K Therapiewoche 7/8, 171
(1955)
- (37) Theurer, K : DBP 1090821; Graul, E
H , R ther, W , Steiner, B : Med Kl 17,
691 - 694 (1964)
- (38) Theurer, K Physikal Med u Re-
habil 9 (1966)
- (39) Theurer, K Physikal Med u Re-
habil 6, 127 - 130 (1971); Zeitschr f
 rztl Fortbildung, Berliner Ärzteblatt 1
(1969)
- (40) Theurer, K ZfA 5, 234 - 237 (1972)
- (41) Theurer, K : Selecta 42, 3468 (1977)
- (42) Theurer, K : Krebsgeschehen 6, 157 -
160 (1978)
- (43) Theurer, K : Verfahren zur schonen-
den Sterilisation DBP 2944278, 2 (1979)
- (44) Wacker, A : Naturwissenschaften 66,
628 (1979)
- (45) Weinmann, H : Tagungsberichte Zyto-
plasmatische Therapie (1978 u 1979)
- (46) Wrba, H : Pers nl Mitteilung:
Munder, P G : EHK 3, 201 (1980); Theu-
rer, K : Krebsgeschehen 4/80 - 85 (1980)

Modifikationen der Eigenblutbehandlung - Die Gegensensibilisierung und die Behandlung mit Antikörperfragmenten

K Theurer

Physikalische Medizin und Rehabilitation, Zeitschrift für praxisnahe Medizin, Heft 12, 15 Jahrgang, Seite 266 - 268 (Dezember 1974)

Die Behandlung mit Eigenblut gilt als althergebracht. Lassen Sie mich deshalb meinen Ausführungen über Modifikationen der Eigenbluttherapie drei aphoristisch anmutende Sätze voranstellen, die ich in einem Tagungsbericht von Pfeiffer in "reformed" gefunden habe. Sie lauten:

- 1 Die klinische Medizin besteht nicht nur aus einer Unzahl extrem aufwendiger Konzepte. Es handelt sich vielmehr um die ständige Optimierung des Bewährten.
- 2 Das Aufwendigste ist nicht immer das Beste, und schließlich
- 3 Das Neue ist meistens eher eine Frage des Verstehens, nicht so sehr des Lernens. Den wesentlichen Anstoß zur Entwicklung der Gegensensibilisierung hat mir das Buch von Herrn Ilferkamp über die Eigenblutbehandlung gegeben. Ich möchte ihm dafür an dieser Stelle herzlich danken. Dem in diesem Büchlein zusammengefaßten Wissen habe ich Überlegungen über den möglichen Wirkungsmechanismus des Bogomoletzserums aufgrund immunologischer Gesichtspunkte gegenübergestellt.

Eigenblutbehandlung als unspezifische Reizkörpertherapie

Die Eigenblutbehandlung galt bis dahin als Methode der unspezifischen Reizkörpertherapie. Alle Modifikationen beruhten auf einer partiellen Denaturierung der Blutpräparate z. B. durch Stehenlassen oder

Bestrahlen des Blutes mit UV- oder Kurzwellen bzw. Begasen mit Ozon, was die unspezifische Wirkung noch verstärken mußte. Die Ergebnisse der Immunologie zeigten aber, daß im Patientenblut krankheitsbezogene Reaktionsprodukte wie Antikörper, Autoantikörper, allergische Antikörper, Fermente und z. T. auch die sensibilisierenden Substanzen enthalten sind, die sich pathogen auswirken. Vom Organismus werden die körpereigenen Reaktionsprodukte nicht als Fremdstoffe empfunden. Deshalb unterbleiben Gegenreaktionen. Demgegenüber ist das Bogomoletzserum körperfremd und deshalb antigen. Im Gegensatz zu dem modernen Antilymphozytenserum, das ebenfalls als antimessenchymal bezeichnet werden kann, wird das Bogomoletzserum in sehr hohen Verdünnungen angewandt. Während das ALS die Lymphozyten schädigt bzw. vernichtet und damit auch die humoralen Immunreaktionen zurückdrängt, soll das Bogomoletzserum das mesenchymale Gewebe aktivieren. Dies ist aufgrund unterschiedlicher Dosierung möglich. Bis heute hat aber das Bogomoletzserum noch nicht das Placet der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft, während das Antilymphozyten-Serum mit der andersartigen, schädigenden Wirkung, volle Anerkennung genießt, obwohl es im Prinzip dasselbe ist. Schädigende Wirkungen sind jedoch leichter zu erfassen. Um prinzipiell ähnliche Reaktio-

nen wie mit dem Bogomoletzserum in höheren Verdünnungen mit dem Blut von Patienten auszulösen, mußten die krankheitsbezogenen Reaktionsprodukte zunächst so verändert werden, daß sie nach Rückführung in den Organismus nicht mehr als körpereigen erkannt werden und spezifische Gegenreaktionen auslösen, die immunologisch vom beteiligten Antigen bzw. Hapten abhängig bleiben. Denaturierende Maßnahmen konnten deshalb für diese Umwandlung zu einem Antigen nicht in Betracht kommen, ebenfalls auch nicht die Konjugation mit einem anderen Antigen, wie sie seit Landsteiner in der Immunologie bekannt sind. Auch Chelatbildungen mit Schwermetallen schienen ungeeignet, wenn man eine unerwünschte zusätzliche Sensibilisierung des Organismus gegen die Umwandlungsprodukte vermeiden wollte. Ich benutzte deshalb eine selbstentwickelte, kolloidale Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxyd und Kieselsäure mit stark adsorbierender Wirkung als Zusatz zu körpereigene Antikörper enthaltende Körperflüssigkeiten, wobei das Adsorbat durch Phenol stabilisiert und konserviert wird. Ohne Zusatz von Phenol wäre die immunologische Umwandlung reversibel. Andererseits wird durch Phenol die antigene Spezifität nicht verändert. Bei etwaiger Phenolüberempfindlichkeit wirken die hohen Verdünnungen des Phenols in Art von Nosoden desensibilisierend. Als Ausgangsstoffe können Venenblut, Serum, Plasma, Hämolyt, Liquor cerebrospinalis, Exsudate und Transsudate, Gelenkergüsse, Inhalt von Kanthariden-Blasen und auch Eiharn zum Antigen umgewandelt werden. Die so hergestellten Stammlösungen werden dann im Hunderterschritt bis 10^{-12} g/ml und höher mit physiologischer Kochsalzlösung unter sterilen Kautelen verdünnt.

Diese Verdünnungen werden in ähnlicher Weise wie die Allergenverdünnungen bei der spezifischen Hyposensibilisierung in individualisierender, ansteigender Dosierung wiederholt reinjiziert. Die Applikation kann i.e., s.c. oder auch i.m. erfolgen, aber auch nasal oder lingual.

Gegenreaktionen durch Reiztherapie

Durch die Behandlung werden Gegenreaktionen ausgelöst, die von der Konzentration des Präparates, den Zeitsabständen zwischen den Anwendungen und der jeweiligen Reaktionslage des Patienten abhängen. Zur Desensibilisierung werden Verdünnungen von 10^{-12} und höher ansteigend bis etwa 10^{-4} angewandt. Höhere Konzentrationen zwischen 10^{-4} bis 10^{-2} führen beim Menschen zur Provokation der immunologischen Vorgänge, wodurch sich infektiöse Herde erkennen und einer Sanierung zuführen lassen. Auch kann damit die Reaktionsbereitschaft des Organismus reaktiviert werden, z.B. bei Krebspatienten oder auch bei Akne vulgaris bzw. bei Immuntoleranz gegen bestimmte Bakterien, z.B. bei Dauerausscheidern und bei den sog. Dysbakterien. Während für die Gegsensensibilisierung relativ kurze Intervalle zwischen den einzelnen Applikationen zu wählen sind, z.B. 1 bis 3 Tage täglich, dann 1 bis 2 Wochen jeden 2. Tag und schließlich jeden 3. Tag, sollte die Anwendung als immunologische Provokation z.B. am 1., 5., 12. und 20. Tag von je 0,5 ml s.c. oder i.m. erfolgen. Ich möchte annehmen, daß diese Provokationsmethode für den Organismus schonender ist, als die heute oft durchgeführte unspezifische Provokation des immunologischen Systems mit Bakterienextrakten, insbesondere in der Tumorbehandlung mit der

gCG-Immunisierung

Indikationen für die Gegensensibilisierung sind exogene wie endogene allergische bzw. hyperergische Erkrankungen und die biologische Immunsuppression einschließlich von immunopathogenen Autoaggressionen. Vorteile der Gegensensibilisierung gegenüber der herkömmlichen Hyposensibilisierung mit dem Allergen sind: Keine Allergentestung ist erforderlich. Kur einmalige Blutentnahme bzw. erneute, wenn sich das Allergenspektrum ändert, wobei dann für die neuen Verdünnungen die vorangehende und die neue Stamm-lösung zusammengemischt werden können. Einfache und wirtschaftliche Herstellung der Präparate.

Bedeutung der Antikörper

Bei allen Erkrankungen, die sich immunologisch auswirken, sind die krankheitsbedingten Antikörperfraktionen erhöht gegenüber den anderen präformierten Antikörperfraktionen ohne aktuelle Bedeutung. Immunreaktionen sind konzentrationsabhängig vom Antigen. Sehr hohe Verdünnungen des Antigens bleiben unerschwerlich für die Auslösung der Antikörperbildung. Etwas weniger hohe Verdünnungen führen zur spezifischen Immuntoleranz gegenüber dem Antigen, d. h. daß auch bei höheren Konzentrationen keine Antikörperbildung mehr erfolgt. Mittlere Konzentrationen induzieren die Antikörperbildung, und sehr hohe Konzentrationen erzeugen eine allgemeine Immunparalyse. Die Dosierung richtet sich bei der Gegensensibilisierung deshalb nach der krankheitsbedingten Antikörperfraktion. Andere Blutbestandteile, die ebenfalls zum Antigen umgewandelt sein können, bleiben dann entweder unerschwerlich oder führen bei

wiederholter Behandlung zur Toleranz, so daß von ihnen keine nachhaltigen Wirkungen ausgelöst werden. Gegenreaktionen richten sich deshalb besonders gegen die aktuellen krankheitsbedingten Immunreaktionen.

1955 habe ich beim Therapiekongreß in Karlsruhe auf die Notwendigkeit einer quantitativen Steuerung von organ- und zellimmunologischen Vorgängen hingewiesen (Therapie-Woche 6, 5 - 6 132, 1955). Dortmals waren immunopathogene Autoaggressionen noch nicht als pathogenisches Prinzip anerkannt. In einer tierexperimentellen Arbeit über die Auswirkungen von Antikörperseren auf schon vorhandene gleichartige Antikörpertiter habe ich 1956 die Möglichkeit einer Beeinflussung der quantitativen Regulationen der Antikörperbildung durch entsprechende Antikörper derselben Tierspezies aufgezeigt (Ärztliche Forschung, X Jahrg., Heft 1, S 2/1 - 2, vom 10. Januar 1956). Der nächste Schritt war 1956 die Entwicklung der Gegensensibilisierung durch Modifikation der Eigenblutbehandlung zu einer neuartigen Desensibilisierungsmethode (Medizinische Nr. 44:15/69 bis 15/72, 1956). Darüber konnte ich dann beim V. Europäischen Allergiekongreß in Basel 1962 berichten (Kongreßbericht S 230 bis 233). Bei unseren seit 1954 alljährlich durchgeführten Jahrestagungen über die Zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serumdesensibilisierung in Stuttgart habe ich 1959 auf die Möglichkeit einer Prophylaxe der Erythroblastose bei blutinkompatiblen Schwangerschaften hingewiesen (Tagungsbericht S. 13). Es ist möglich, daß ich damit den Anstoß zur Entwicklung der Anti-D-Immunprophylaxe der Erythroblastose gegeben habe. Wie Sie wissen, hat sich bei nicht vorsensibi-

lisierten Müttern diese Methode sehr segensreich ausgewirkt, indem sie die Sensibilisierung gegen inkompatible Blutgruppen, insbesondere den Rh-Faktor, für die folgenden Schwangerschaften zurückdrängen bzw verhindern. Es werden hier menschliche Antikörper gegen die inkompatiblen Blutfaktoren des Kindes unmittelbar nach der Geburt in sehr hoher Dosierung der Mutter parenteral injiziert. Diese Methode läßt sich aber bei vorsensibilisierten Müttern nicht anwenden, wohl aber die Gegensensibilisierung. Diese muß dann während der ganzen inkompatiblen Schwangerschaft durchgeführt werden. Auch nach Organtransplantationen ist an eine solche fortlaufende Gegensensibilisierung zu denken.

Regulation der Immunantwort

Heute wird die Regulation der Immunantwort durch Antikörper in den Lehrbüchern der Immunologie wie z. B. v. Humphry und White im Thieme-Verlag und von Nossal als Suhrkamp-Taschenbuch beschrieben. Ich freue mich, daß durch die Grundlagenforschung die Wirkungsmechanismen und Möglichkeiten dieser Modifikation der Eigenblutbehandlung, wie auch der Anwendung hochmolekularer Organextrakte in Form hoher Verdünnungen bei der Zytoplasmatischen Therapie, anerkannt werden. Die Auswirkung solcher hoher Verdünnungen zur Toleranzerzeugung bzw. Desensibilisierung nennt man heute "low-zone-Toleranz".

Tierexperimentelle Untersuchungen von Prof. Kraft, in der Medizinischen Tierklinik der Universität München, bestätigen die Wirksamkeit der Gegensensibilisierung. In Tierärztlicher Umschau Nr. 6/1973, S. 273, berichtet dieser: "Die deutlichsten Erfolge in unserer Klinik haben wir bisher

bei hartnäckigen chronischen Hauterkrankungen verschiedener Genese, vor allem bei Pferden und Hunden und bei chronischen Affektionen der Luftwege besonders bei Pferden, gesehen. Gerade bei diesen Krankheiten sind asthmatoide Symptome häufig und die GS bringt hier noch bessere Erfolge als die Behandlung mit Corticoiden". Prof. Kraft hat aber auch tierexperimentelle Versuche durchgeführt, wobei Hunde, die gegen Pferdefleisch sensibilisiert waren, nach der GS auf den Allergenextrakt keine Reaktionen mehr zeigten. Die sensibilisierten Meerschweinchen blieben beim Zitzen-Test nach der GS ohne feststellbare Reaktionen. Bei Meerschweinchen, die i.p. mit Pferdeserum sensibilisiert waren, blieben nach der GS anaphylaktische Reaktionen bei Anaphylaxie-Versuchen aus. Letzteres hat auch Dr. Kindler, damals im Blutgruppenforschungsinstitut unter Prof. Bahr in Bensberg, tierexperimentell an vorsensibilisierten Kaninchen festgestellt.

Anwendung von Antikörper-Fragmenten

Eine zweite Modifikation der Eigenblutbehandlung beruht auf der therapeutischen Anwendung von Antikörper-Fragmenten mit erhaltenem Tropismus zum Antigen bzw. Allergen oder Hapten. Basis für diese Entwicklung waren Überlegungen über die mögliche Haptenisierung von makromolekularen Organbestandteilen durch Zerkleinerung der Molekülgröße, wie wir sie bei der Zytoplasmatischen Therapie in die Organtherapie eingeführt haben. Der Informationscharakter der molekularen Fragmente muß dabei erhalten bleiben. Erste Versuche über die Aufspaltung von Antikörperfragmenten habe ich zusammen mit Prof. Jachertz 1956 am Hygiene-Insti-

tut in Tübingen durchgeführt. Porter hat dann 1959 mit der Aufklärung der molekularen Struktur von Antikörpern begonnen, während wir diese Methode in die Therapie einführen.

Die Behandlung mit Antikörper-Fragmenten eignet sich besonders für Krankheiten, an denen zellständige Antikörper beteiligt sind (Ärztliche Forschung, zu 11 Jg., Heft 5, 1/259 - 1/263 v. 10. Mai 1957; "Ärztliche Praxis" Nr. 42 v. 19. Oktober 1957; sowie Kongreßbericht vom V. Europäischen Allergiekongreß 1962, S. 230 bis 233). Es werden dabei die molekularen Zellbestandteile bzw. Rezeptoren für Antikörper durch Antikörper-Bruchstücke (leichte und schwere Ketten oder das Fab-Fragment) gegen Reaktionen mit nativen Antikörpern und T-Lymphozyten blockiert. Im Gegensatz zu den Antikörper-Bruchstücken würden native Antikörper eine Umwandlung der Zellbestandteile zum Vollantigen bewirken und die weitere Entstehung von Autoantikörpern unterhalten. Dieser Circulus vitiosus wird durchbrochen. Andererseits ermöglicht eine Absättigung der antigenen Zellrezeptoren durch Antikörper-Fragmente ein Enhancement, d. h. eine Verstärkung bzw. einen Schutz dieser Zellen gegen zytotoxische bzw. zytolytische Wirkungen, die unter Mitbeteiligung von Komplement

stattfinden. Dieses kann sich nicht an das Konjugat dieser Antikörper-Bruchstücke anlagern. Auch T-Lymphozyten, die als Killer-Zellen wirken, können durch die Blockierung der Rezeptoren nicht mit den jeweiligen Körperzellen, gegen die sie gerichtet sind, reagieren und diese vernichten.

Diese Methode eignet sich deshalb besonders zur Behandlung der sogenannten Kollagenosen und Autoaggressionskrankheiten, dann aber möglicherweise auch zur Erhaltung von Organtransplantaten. Ungeeignet ist sie beim Krebs. Hier können aber die Antikörper-Fragmente mit Tropismus zu Krebszellen als Schlepperstoffe für zytotoxische Substanzen dienen, die sich dann an den Krebszellen anreichern und diese vernichten. Hierüber habe ich 1968 an dieser Stelle berichtet (Physikal. Med. u. Rehab., 9 Jg., Heft 2, Febr. 1968, u. Heft 11, 1968). Bei Autosensibilisierungsvorgängen werden hingegen die Antikörper-Bruchstücke an Corticoide angekoppelt, um die Auswirkungen der Antigen-Antikörper-Reaktionen durch Bildung von Ii-Substanzen in den betroffenen Zellen zu vermeiden.

Weitere Einzelheiten bitte ich aus der zur Verfügung stehenden Literatur zu entnehmen.

Zur wissenschaftlichen Bewertung der sog "Gegensensibilisierung", einer modifizierten Eigenblutbehandlung

K E Theurer

Therapiewoche 35, Heft 13, Seite 1542 - 1546 (März 1985)

Die Methode der Gegensensibilisierung (GS) wurde empirisch entwickelt und experimentell untermauert. Sie ist heute therapeutische Konsequenz der internationalen wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Regulation der Immunantwort durch Antikörper. Bei entzündlichen, chronischen, rheumatischen Erkrankungen kann die GS ein entscheidend wichtiger Faktor einer Basistherapie sein.

The method of counter-sensibilisation was empirically developed and experimentally proved.

It is the therapeutic consequence of international scientific findings concerning the antibody-induced immune response.

In case of inflammatory chronic rheumatic disease, the counter-sensibilisation can be a decisive factor of a basic therapy.

Entscheidungshilfen für die Bewertung der "Gegensensibilisierung" als therapeutische Methode

Die Gegensensibilisierung nach Theurer (Allergostop I, vitOrgan Arzneimittel GmbH, Ostfildern-Ruit) ist eine modifizierte Eigenbluttherapie. Die Eigenvollbluttherapie gilt als historische Behandlungsmethode und wird auch heute noch in Klinik und Praxis angewandt (4). Durch parenterale Anwendung werden damit gelegentlich überraschende Heilerfolge erzielt (16a). Dies gelte auch für die in ver-

schiedener Weise abgewandelte Behandlung mit Eigenserum und Eigenharn (19). Nach Hennemann können Blutübertragungen auf Empfänger mit hochaviden Kälte-Agglutininen i-eaktionslos vertragen werden. Benhamou und Mitarb. haben 1948 (zit. in 16a, S. 721) einen 40jährigen Patienten mit hämolytischer Anämie mittels wiederholten Injektionen seines eigenen Plasmaglobulins (allerdings ohne chemische Verfremdung und Zusatz von Adjuvantien) zu desensibilisieren versucht. Die Wirkung war überraschend, insofern der Patient eine Remission seiner Symptome erlebte, wobei der Kälte-Agglutinationstiter von vorher 1:512 auf 1:4 bei oberer Grenze bei 20° zurückging (Editorial in Lancet 1949 No. 6555, I, 657).

Theurer machte für die Wirkung der Therapie mit Eigenblut und Eigenharn reaktive Faktoren verantwortlich, die in den Körperflüssigkeiten enthalten sind und zum Krankheitsgeschehen in Beziehung stehen, insbesondere pathogene Antikörper, Antigene und Regulationsfaktoren. Diese können bei Rückübertragung in den Organismus Gegenreaktionen gegen die pathogenen Faktoren auslösen. Daher der Name "Gegensensibilisierung" (GS). Körper-eigene Faktoren werden vom Organismus jedoch nicht als körperfremd erkannt, auch wenn sie, wie die Antikörper, im Verlaufe einer Krankheit auftreten. Sie lösen deshalb normalerweise keine Gegenreaktionen aus. Dies geschieht aber,

wenn man sie wie bei der GS vor der Rückführung in den Organismus chemisch verfremdet, zum Beispiel durch Phenolzusatz und Anlagerung an ein geeignetes Adjuvans (Aluminiumhydroxid und Kieselsäure (20)) (vgl. (16a)) Die molekularen Bestandteile oder Faktoren, gegen die keine oder nur geringe Immuntoleranz besteht, wie zum Beispiel die variablen, antideterminanten, N-terminalen Bezirke der Antikörpermoleküle, erhalten dadurch bevorzugt immunogene Eigenschaften. Ständig vorhandene Blutbestandteile, wie zum Beispiel Albumine und die konstanten Antikörperbezirke, lösen praktisch keinerlei Gegenreaktionen aus, so daß die erwünschte Immunabwehr nicht Not leidet und keinerlei unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Es werden lediglich die Antikörperarten supprimiert, die in der Blutprobe enthalten sind. Deshalb muß die Blutabnahme auf der Höhe des Krankheitsgeschehens erfolgen. Die Methode der Gegensensibilisierung bedeutet eine Art von aktiver Immunisierung mit Grenzkonzentrationen der zum Immunogen umgewandelten Antikörper.

Nach tierexperimenteller Überprüfung (21) und Selbstversuchen hat Theurer diese Methode in die Therapie eingeführt (22 - 24). Inzwischen werden die wissenschaftlichen Grundlagen in allen Lehrbüchern der Immunologie erwähnt (Beispiele s. Tabelle 1). Die aktive Antikörperbildung kann durch passiv zugeführte Antikörper gedrosselt oder unterdrückt werden (12, 13, 27). Gegenreaktionen richten sich bevorzugt gegen die Idiotypenspezifität (2). Der Hemmeffekt wirkt sich im wesentlichen gegen die Antikörperbildung in der Primärantwort aus. Er wird als homöostatischer Mechanismus oder als Feedback-Mechanismus bezeichnet (vgl. Tabelle 1, A : S 79).

Die Immunsuppression, die man durch Anti-

körper induziert hatte, erwies sich in einigen Studien bemerkenswert spezifisch (vgl. Tabelle 1, B : S 165).

Tabelle 1: Auswahl von Lehrbüchern der Immunologie, die die wissenschaftlichen Grundlagen der GS behandeln

- A Steffen C : Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Thieme, Stuttgart 1968
- B Humphry, J H , White, R G : Kurzes Lehrbuch der Immunologie Thieme Stuttgart 1971
- C Seil, St : Immunologie, Immunpathologie und Immunität Verlag Chemie, Weinheim - New York 1977
- D Friemel, H : Immunologische Arbeitsmethoden Fischer Stuttgart 1984
- E Nossal: Immunologie, Suhrkamp-Taschenbuch

Das Wirkungsprinzip der Gegensensibilisierung wird auch durch die Netzwerktheorie der Antigen-Antikörper-Reaktionen des Immunsystems bestätigt (vgl. Tabelle 1, A : S 105). Diese Theorie geht auf Marrack, Heidelberger und Kendali Pauling, Pressmann und Campbell zurück und wurde von Niels Kay Jerne erweitert, der u a dafür mit dem Nobelpreis 1984 ausgezeichnet wurde (6).

Therapeutische Konsequenzen wurden aus diesen wissenschaftlichen Erkenntnissen außer bei der GS bei der Verhinderung der Rh-Immunisierung bei der Erythroblastosis foetalis von Freda, Corman und Pollack 1967 gezogen. Diese führten die Suppression der primären Rh-Immunantwort durch passive Anwendung eines Rh-IgG-Anti-Immunglobulins ein (vgl. Tabelle 1B : S 209f sowie C : S 126f). Die Behandlung erfolgt hier mit einem

Anti-Rh-Antikörperserum In einer klinischen Studie konnte Lehmann 1969 (9) die prophylaktische Wirkung der GS an zwölf Fällen von rh-negativen, sensibilisierten II bis VII Para-Schwangeren nachweisen Die Behandlung erfolgte hier mit dem verfremdeten Patientenblut während der gesamten Gravidität Im Gegensatz zur passiven Prophylaxe von Freda et al handelt es sich hier um eine aktive Immunisierung gegen den primären Rh-Antikörper Die Entstehung von Anti-Antikörpern wurden generell 1957 durch Milgrom et al (11) bewiesen Diese immunisierten Kaninchen mit autogenem Gamma-Globulin, das unter schonenden Bedingungen leicht denaturiert wurde Antikörper traten auf, die sowohl mit dem denaturierten autogenen Gammaglobulin als auch mit nativem Globulin reagierten und Anti-Antikörpereigenschaften zeigten Die Nachuntersuchung durch McCluskey et al (10) bestätigte diese Ergebnisse

Unter Rheumafaktoren des menschlichen Serums versteht man eine Mischung von Antikörpern gegen Gamma-Globulin, also Anti-Antikörper (vgl Tabelle IB : S 484f) Rheumafaktoren sind jedoch vermutlich wegen der krankheitsbedingten Fehlfunktion des Immunsystems keine Anti-Idiotyp-Antikörper und somit nicht spezifisch immunsuppressiv und therapeutisch wirksam Hoffmann (5, 26) konnte zeigen, daß durch die GS die Rheumafaktoren supprimiert werden und die Krankheits-symptomatik bei der PCP gebessert wird Bei atopischen Erkrankungen werden die IgE als allergische Antikörper durch die GS supprimiert Dies zeigten Ergebnisse von Schindler (16) und Kern (7) Die Suppression der primären Antikörperbildung kann nach der Hypothese von Theurer bereits innerhalb der immunkompe-

ten desensibilisierten Zellen durch Antikörper mit entsprechender Idiotypspezifität erfolgen (25)

Auch Allergien, die sich nicht durch Allergen-Testungen erfassen lassen und deshalb als "unspezifisch" bezeichnet werden, lassen sich mit der GS erfolgreich behandeln (17)

Das große Indikationsspektrum der GS findet seine Erklärung in der Anwendung von individual-spezifischen immunopathogenen Faktoren und in den Wirkungsmechanismen

Tierexperimentell konnte die GS am Modell der Transplantatüberlebenszeit bestätigt werden (14, 15)

In der Veterinärmedizin war die GS bei verschiedenen Tierarten mit unterschiedlichen chronischen Erkrankungen therapeutisch wirksam (8)

In der Humanmedizin wurden Tausende von Behandlungen durchgeführt, ohne daß nachteilige Nebenwirkungen bekannt geworden wären Selbst bei vorher klinisch und stationär therapie refraktären Patienten ließen sich Erfolge erzielen Davon zeugt eine große Anzahl von Publikationen (18 Tagungsberichte Zystoplasmat Therapie, 1954 - 1984 - vitOrgan, Stuttgart)

Die GS erfaßt alle Arten hyperergisch-allergischer Erkrankungen einschließlich immunopathogener Autoaggressionsleiden Vorteile der GS sind nach Graul (3), daß keine Allergentestung erforderlich ist und meist eine einmalige Blutentnahme ausreicht bzw eine erneute, wenn sich das Allergenspektrum ändert Es handelt sich also um eine einfache und wirtschaftliche Methode, die ambulant durchgeführt werden kann

Der Wirkungseintritt der GS hängt vom Verlauf der immunologischen Primär-

und Sekundärantwort ab (vgl. Tabelle ID : S 26) Wiederholungsbehandlungen nach 4 bis 5 Wochen sind deshalb zu empfehlen. Über die GS wurde bei internationalen Fachkongressen vorgetragen, so zum Beispiel beim V Europäischen Allergiekongreß in Basel 1962 (17a, 17b, 23), beim IV Europäischen Immunologiekongreß in Budapest 1978 (23b), beim Allergologiekongreß in Aachen 1976 (23a), beim Europäischen Rheumatologiekongreß in Wiesbaden

Fragenkatalog

- 1 Können gegen Immunglobuline (Antikörper) im autologen System Anti-Antikörper induziert werden?
- 2 Entstehen im autologen System bevorzugt Anti-Idiotyp-Antikörper?
- 3 Können Anti-Idiotyp-Antikörper die primären Antikörper funktionell blockieren und inaktivieren?
- 4 Haben gewisse Antikörper pathogenetische Eigenschaften, z B IgE, Autoantikörper?
- 5 Erscheint es theoretisch möglich, daß Anti-Idiotyp-Antikörper bei immunopathogenen Erkrankungen therapeutisch wirken?
- 6 Wird die Entstehung von Anti-Antikörpern durch chemische Verfremdung des primären Antikörpers, z B durch Phenol und durch Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid und Kieselsäure, begünstigt?
- 7 Ist der sogenannte "Serum-Aktivator" dazu geeignet, eine chemische Verfremdung und Adjuvanswirkung an einem Antikörpermolekül zu bewirken?
- 8 Werden ständig vorkommende Biomoleküle vom Organismus als körpereigen erkannt und toleriert?
- 9 Hängt die Immuntoleranz vom ständigen Vorhandensein des Antigens ab und ist deshalb möglicherweise die Toleranz gegen die

variablen Bezirke der Antikörper geringer als gegen die konstant bei allen Antikörperarten vorkommenden Bezirke, so daß sich bevorzugt gegen diese variablen Bezirke Antikörper bilden können?

- 10 Unterbleiben deshalb möglicherweise Gegenreaktionen gegen stark tolerierte, ständig vorkommende Körperbestandteile?
- 11 Hängt die Menge der für eine Krankheit spezifischen Antikörper auch bei immunopathogenen Autoaggressionen und allergischen Erkrankungen vom Krankheitsgeschehen ab?
- 12 Sind pathogene Antikörper im akuten Krankheitsgeschehen vermehrt?
- 13 Vermindert sich die Menge der nicht am Krankheitsgeschehen beteiligten Antikörper?
- 14 Sind die Angaben bezüglich des günstigsten Zeitpunktes für die Blutentnahme zur Gewinnung der Präparate für die Gegsensensibilisierung richtig?
- 15 Gibt es Beispiele für die therapeutische Wirkung von Anti-Antikörpern, insbesondere, beruht die Erythroblastoseprophylaxe auf der Wirkung von Anti-Antikörpern, und ist diese wissenschaftlich anerkannt?
- 16 Ist die Erythroblastoseprophylaxe als passive Immunisierung zu bezeichnen, und kann die Gegsensensibilisierung als aktive Methode gelten - sind Analogieschlüsse berechtigt?
- 17 Handelt es sich bei den Fragen 15 und 16 um immunologische Prinzipien mit Allgemeingültigkeit?
- 18 Kann das Prinzip der Gegsensensibilisierung für verschiedene Krankheitsarten mit immunologischem Pathomechanismus gelten?
- 19 Ist das Prinzip der Gegsensensibilisierung geeignet, pathogene Antikörper spezifisch zu blockieren und eine Immunsup-

pression zu bewirken?

20 Gibt es bei entzündlichen rheumatischen und insbesondere chronischen Gelenkerkrankungen Organantikörper mit möglicherweise immunopathogenen Eigenschaften?

21 Wäre es bei rheumatischen Erkrankungen erwünscht die Organantikörper quantitativ zurückzudrängen?

22 Ist es richtig, daß die Rheumafaktoren Anti-Antikörper sind, die sich hauptsächlich gegen die konstanten Bezirke der Antikörper richten und deshalb keine Anti-Idiotyp-Antikörper darstellen?

23 Würden Anti-Idiotyp-Antikörper die pathogenen immunologischen Wirkungen von primären Antikörpern verringern?

24 Sind der Abfall von Rheumafaktoren und auch die Blutkörperchensenkung, wie sie für die Gegensensibilisierung nachgewiesen wurden, als therapeutisch günstig zu bewerten?

25 Gibt es in der internationalen Literatur Hinweise für die Wirksamkeit der Theorie der Gegensensibilisierung?

26 Sind die immunologische Verfremdung und Verwendung von Adjuvanzen bereits vor der Gegensensibilisierung angewandt worden;

27 Bedeutet die Verlängerung der Überlebenszeit von Organtransplantaten einen experimentellen Beweis für die Wirksamkeit der Gegensensibilisierung?

28 Gibt es widersprüchliche Ergebnisse aus der praktischen Anwendung der Gegensensibilisierung bzw sind nachteilige Wirkungen bei vorschriftsgemäßer Anwendung bekannt geworden?

29 Welche Konsequenzen hat die Beantwortung der Fragen 1 bis 28 für die Beurteilung der Gegensensibilisierung und deren Anerkennung als wirksame therapeutische Methode?

Literatur

- (1) Brenn, H : Präseasonale oder Cosaisonale Desensibilisierung bei Pollinosis 5 Europ Allergiekongreß, Basel 1962
- (2) Gell, P G H , Kelus, A S : Anti-antibodies: Adv Immunol 6, 461 (1967)
- (3) Graul, E H : Gegensensibilisierung: Gegenwartslexikon, Bd 1 A - K, Klett , Stuttgart 1973
- (4) Haferkamp: Med Klin 42, 1099 (1951)
- (5) Hoffmann, Z : Therapie der chronischen Polyarthritits nach immunologischen Gesichtspunkten Rheuma 3 (1983)
- (5a) Hoffmann, Z : Neue therapeutische Wege in der Behandlung der chronischen Polyarthritits: Therapiewoche 34, 120 (1984)
- (6) Jerne, N , Nordin, A , Henry, C , Finn, H , Karos, A Nat Inst Hlth Inf Exchange Group 5, Memor 46 (1965)
Weitere Literatur in Steffen, C : Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie 3 Kapitel über Antikörperbildung, S 661, Thieme, Stuttgart
- (7) Kern, D XXX Jahrestagung Zytoplasmatische Therapie, Stuttgart 1984, Therapiewoche (in Druck)
- (8) Kraft, II : Tierärztl Umschau 6, 273 (1973)
- (9) Lehmann, H : Prophylaxe der Erythroblastose durch Gegensensibilisierung: XV Jahrestagung Zytoplasmatische Therapie vitOrgan, Stuttgart 1969
- (10) McCluskey, R , Miller, R , Benacerrat, B J exp Med 115, 253 (1962)
- (11) Milgrom, F , Dubiski, S : Nature 179, 1351 (1957)
- (11a) Milgrom, F , Witebsky, E J Am med Ass 174, 56 (1960)
- (11b) Milgrom, F : Ann N Y Acad Sei 124, 118 (1965)
- (12) Neiders, M , Rowley, D , Fitch F : J Immun 88, 718 (1962)

- (13) Rowley, D , Fitch, F : J exp Med 120, 987 (1964)
- (13a) Rowley, D , Fitch, F : Nat Inst Hlth Inf Exchange Group 5, Memor 147 (1966)
- (13b) Rowley, D , Fitch, F : J exp Med 121, 683 (1965)
- (14) Sillo-Seidl, G : First oviduct transplants Acta Europaea Fertilitatis 4, 585 (1976)
- (14a) Sillo-Seidl, G : Eierstock- und Eileiter-Transplantation mit tiefgekühltem Material unter Anwendung der Gegensensibilisierung Arch Gynaek 228 (1979)
- (15) Seifert, J : Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit durch Modifikation der Eigenblut-Behandlung Fortschr Med 36, 1576 (1979)
- (16) Schindler, I : XXI Jahrestagung Zytoplasmatische Therapie vitOrgan, Stuttgart 1975
- (16a) Schmidt, H : Fortschritte der Serologie , S 897, Steinkopf , 1955
- (17) Schnellen, B : Die "unspezifischen" Allergien Zschr Allgemeinmed 10, 481 (1972)
- (17a) Schnellen, B : Die "unspezifischen" Allergien, Zschr Allgemeinmed 10, 656 - 658 (1979)
- (17b) Schnellen, B : Gegensensibilisierung - ein alternatives Konzept zur antigenspezifischen Hyposensibilisierung Kassenarzt 48 (1982)
- (18) Schwarz, P : Modifikationen der Eigenblutbehandlung nach Theurer - Die Gegensensibilisierung Zschr Allgemeinmed 16, 769 - 772 (1968)
- (19) Theurer, K : Hippokrates 22, 584 (1951)
- (20) Theurer, K : Zum Problem der Dosierung und über die Notwendigkeit der quantitativen Steuerung immunbiologischer Vorgänge Therapiewoche 5, 132 (1955)
- Antikörperseren auf schon vorhandene gleichartige Antikörpertiter Ärztl Forsch 1 (S II/1 - II/2)(1956)
- (22) Theurer, K : Die Gegensensibilisierung als neuartige Desensibilisierungsmethode Medizinische 44, 1569 - 1572 (1956)
- (23) Theurer, K : Modifikationen der Eigenblutbehandlung und die Behandlung mit verdünnten Organantigenen zur spezifischen Desensibilisierung 5 Europäischer Allergiekongreß, Basel 1962
- (23a) Theurer, K : Die Gegensensibilisierung: Europ Immunologiekongreß, Budapest 1978
- (23b) Allergologia et Immunopathologia Vol IV, 3 Mai/Juni 1976, S 203: Desensibilisierung durch modifizierte Eigenblutbehandlung (Gegensensibilisierung und Behandlung mit Antikörperfragmenten)
- (24) Theurer, K Modifikationen der Eigenblutbehandlung - Die Gegensensibilisierung und die Behandlung mit Antikörperfragmenten Physik Med Rehab 12, 266 - 268 (1974)
- (25) Theurer, K : Eine neue Instruktionstheorie Mechanismen der Toleranzzeugung und Immunsuppression Infection 3, 178 - 181 (1975)
- (26) Theurer, K : Zur Immunotherapie des chronischen Rheumatismus Ärztl Forsch 5 (SI/259 - I/263)(1957)
- (26a) Theurer, K : Neue Wege für die Behandlung des primären und sekundär chronischen Rheumatismus: Ärztl Prax Wien, 42 (1957)
- (26b) Theurer, K : Immuno- und Organotherapie als Basistherapie beim entzündl Rheumatismus Therapiewoche 34, 3012 - 3019 (1984) - Nachdruck aus Organo- und Immunotherapie Enke, Stuttgart 1979, S 275 - 286
- (27) Uhr, J , Baumann, I J exp Med

Basistherapeutikum mit Zelltropismus zum Immunsystem und zu Zellmembranen

K E Theurer

Erfahrungsheilkunde, Zeitschrift für die ärztliche Praxis, Band 35, Heft 10, S 684 - 687 (Oktober 1986)

membranoSOME[^] sind ein unspezifisches Basistherapeutikum mit vielseitigen biologischen Wirkungen, geeignet zur Kombination mit spezifischen Arzneifaktoren. Die Präparationen enthalten Liposome, feinste Fetttröpfchen mit wäßriger Arzneimittellösung im Innern und entsprechende kompakte Membranfragmente ohne Inhalt. Beide Bestandteile sind in einer wäßrigen Arzneimittellösung emulgiert. Die Lipidmikronen bestehen aus einer Mischung von Lecithin und Cholesterin im Verhältnis 9:3, als Carriersubstanzen sind Membranbestandteile aus Thymus, Lymphknoten und Milz inkorporiert. Diese Bestandteile wirken als Schlepperstoffe zu den homologen Zellarten. Im wäßrigen Emulsionsmittel sind Chorion, Hepar und Darmschleimhaut mit Zusätzen von Spurenelementen (Zn, Mn, Mg, K und Ca) enthalten. Die Präparate werden nach homöopathischen Verfahrensweisen als Mischungen in einer Verdünnung von D9 = 10⁻⁹ bzw. Nanogramm hergestellt.

Wirkungsmöglichkeiten der membranoSOME[^], insbesondere in der Immunologie

Experimentell wird zur Verstärkung der Immunabwehr von Antigenen bei der aktiven Immunisierung das Freund'sche Adjuvans in Form von Paraffinöl verwendet. Die Anwendung in der Humanmedizin ist wegen lokaler Entzündungsreaktionen nicht möglich und stößt auch in der Veterinärmedizin auf Ablehnung. Bei flüssigen Öl-Adjuvanzen wer-

den die Unverträglichkeitsreaktionen durch die flächenhafte Ausbreitung auf der Zellmembran zu einem kontinuierlichen Überzug (Film) ausgelöst. Dieser Film beeinträchtigt den Stoffaustausch und führt zum Zelltod. membranoSOME^{1*} sind hingegen physiologische und metabolisierbare Stoffe, die bei Körpertemperatur zähflüssig sind und bei denen die einzelnen Fettmikronen nicht konfluieren und beim Zusammentreffen mit Zellmembranen keinen Überzug bilden. Sie fusionieren fokal mit der Zellmembran (vgl. elektronenoptische Abbildung). Dabei besteht ein gewisser Zelltropismus durch die eingebrachten Carrierstoffe (DP 2650502 und Zusatzverfahren DP 2656333 u. a.).

Die fokale Fusion mit der Zellmembran verschließt Membrandefekte bzw. Poren der Zellmembran. Andererseits entsteht durch die fokale Fusion ein regenerativer bzw. reparativer Reiz auf die gesamte Zelle. Dieser führt allgemein zur Stoffwechselaktivierung und zur Reparatur etwaiger anderer Defekte. Dabei begünstigen die in membranoSOME[^] enthaltenen Zellfaktoren aus xenogenen Organgeweben die Reparationsvorgänge.

Höher viskose physiologische Lipidemulsionen führen bei der empfohlenen Anwendung zu keinen nachteiligen Wirkun-

*Hersteller: vitOrgan Arzneimittel GmbH, Ostfildern 1

gen und werden sowohl lokal, wie auch bei systemischer Applikation einwandfrei übertragen Wichtig ist, daß membranosome[®] körperwarm nach vorherigem mehrfachen intensiven Durchschütteln appliziert werden

In der Immunologie bieten sich mit membranosome[®] neue Möglichkeiten zur Aktivierung der Makrophagen und Monozyten, besonders für die Immunisierung bei Virusinfektionen Die am Anfang der Immunkaskade stehenden A-Zellen verarbeiten das Antigen bzw den Impfstoff und präsentieren diese den eigentlichen Immunzellen Durch Aktivierung des Stoffwechsels und der Reparaturvorgänge werden diese Zellen zur Abgabe von Mediatorsubstanzen (Interleukine, Interferone Tumornekrose-Faktor) sowie des Major-Histokompatibilitäts-Faktors angeregt Auch die eigentlichen Immunzellen, die H- und T-Lymphozyten, Thymus, Milz und Lymphknoten werden auf diese Weise in ihren Funktionen stimuliert Zur Normalisierung der Zellfunktion des Immunsystems bieten sich Kombinationen mit geeigneten zytoplasmatischen Organfaktoren und/oder anderen Arzneimittelzusätzen an

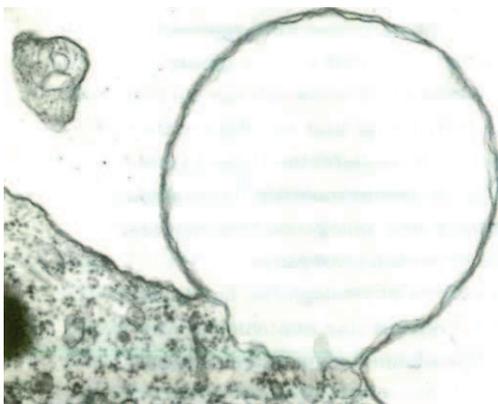


Abb. 1 Fusion eines Liposoms mit der Zellmembran

membranoSOME wirken normalisierend auf das Blut- und Gefäßsystem sowie auf Organfunktionen

Der geschilderte unspezifische Wirkungsmechanismus durch Lipidfusion beeinflusst die Endothelien der Blutgefäße und verbessert bei i v -Injektion die Durchblutungsverhältnisse erkrankter Organe Spezielle Indikationen sind deshalb Durchblutungsstörungen und Arteriosklerose Durch deren Behandlung lassen sich auch Organerkrankungen günstig beeinflussen Bei myogener Muskeldystrophie Typ Duchenne, ebenso auch bei entzündlichen Muskelerkrankungen werden beachtliche Ergebnisse berichtet Das therapeutische Prinzip ist bei rheumatischen Leiden, ebenso auch bei Erkrankungen der großen Organe Herz, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und der Drüsenorgane wirksam Die Lipidbestandteile erhöhen die Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke für sonst nicht passierbare Arzneimittel, so daß sich auch Erkrankungen des zentralen Nervensystems dadurch günstig beeinflussen lassen Es ist bei degenerativen wie auch entzündlichen Erkrankungen und Krampfleiden gegebenenfalls an Kombination mit den jeweils indizierten zytoplasmatischen Substanzen (Revitorgan -Dilutionen bzw Sol-Präparate) zu denken Bevorzugte Anwendungsgebiete sind die Altersdemenz, insbesondere Morbus Alzheimer Wenn hier auch keine Heilung möglich ist, so dürfte sich doch der Zustand verbessern und die Progredienz aufhalten lassen

D

membranoSOME für die Neurotherapie und die Akupunktur

Die Fusion der membranoSOME mit den Zellmembranen löst bei lokaler Injektion am neuralen Störungsfeld, wie auch an Schmerz- und Akupunkturpunkten einen permanenten umstimmenden Reiz aus. Dieser ist vollkommen andersartig als bisher und eröffnet neue Möglichkeiten.

Die lokale s.c.-Injektion ist auch an entzündlich gereizten Sehnenansätzen in Gelenknähe oder an gereizten Nerven und Ganglien mit Injektionsmengen von 0,5 - 1,0 ml zu empfehlen. Bei Arthrosen kann die Injektion intraartikulär erfolgen.

Kombinationsmöglichkeiten von membranoSOME^R mit Revitorgan^R-Dilutionen und Sol-Präparaten

Bei Augenerkrankungen mit NeyOptin (Revitorgan Nr. 58);

bei Blutkrankheiten mit NeySanguin (Revitorgan^R Nr. 77) und/oder NeyHaemin^K (Revitorgan Nr. 39);

bei Alters-Demenz und Morbus Alzheimer mit Revitorgan -Dilutionen Nr. 11 und/oder 36 (Stärke 0 - II. keine Trockensubstanz);

bei Depressionen mit NeyDop N (Revitorgan^R Nr. 97N);

bei erethischem Verhalten mit NeyCalm (Revitorgan^R-Dilutionen Nr. 98) und/oder jeweils zusätzlich Gehirnrinde (Revitorgan^R-Dilutionen Nr. 11) und/oder Zwischenhirn

(Revitorgan -Dilutionen Nr. 36 - Stärke 0 - II, keine Trockensubstanzen);

bei Gefäßerkrankungen mit fetalen Gefäßen (Revitorgan Nr. 59) und/oder Knochenmark NeyHaemin^R Nr. 39);

bei immunopathogenen hyperergischen Erkrankungen mit Neythymun^R f (Revitorgan^R

Nr. 29 f) und/oder NeyDesib (Revitorgan^R Nr. 78);

bei Immundefizienz mit Neythymun k (Revitorgan Nr. 29 k) und/oder Ney-Immun^R (Revitorgan^R Nr. 73);

bei sexueller Impotenz (Erektionsschwäche) mit Corpus cavernosum (Revitorgan^R Nr. 35 und Nr. 16 - Injektion evtl. in die Schwellkörper 0,5 ml);

bei Muskelerkrankungen mit NeyTroph (Revitorgan^R Nr. 96);

bei Neuraltherapie und Akupunktur mit NeyNormin^R N (Revitorgan^R Nr. 65_N) und/oder AntiFocal^R N (Revitorgan^R Nr. 69 N);

bei Organerkrankungen jeweils mit der betreffenden Organart, z.B. Leber, Herz, Niere, Lunge, Pankreas, Schilddrüse, Nebenniere, Keimdrüsen u. a./oder den entsprechenden Kombinationspräparaten für bestimmte Indikationen;

in der Onkologie mit NeyTumorin (Revitorgan Nr. 66) und/oder Decidua (Revitorgan Nr. 70);

bei rheumatischen Gelenkerkrankungen mit NeyArthros^R (Revitorgan^R Nr. 43) und/oder Decidua (Revitorgan^R Nr. 70);

bei Strahlenschäden mit NeyTumorin (Revitorgan Nr. 66);

bei Erkrankungen der Wirbelsäule (Morbus Bechterew, Morbus Forestier) mit NeyChondrin^R bei neuralen Irritationen zusätzlich Rückenmark (Revitorgan^R-Dilutionen Nr. 13 - Stärke 0 - II, keine Trockensubstanz).

Applikationsarten

Die Anwendung von sterilen, feindispersen Emulsionen der membranoSOME^K erfolgt nach den Grundsätzen der Erzeugung von Immuntoleranz, bevorzugt i.v. oder als Zusatz zu Infusionen, jedoch ist jede an-

Tabelle 1: Dosierungsbeispiel für die Kombinationstherapie

1. Mo - 1. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. (zur Vortestung)	s.c.
2. Mi - 3. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj.	s.c. oder i.m. oder i.v.
3. Fr - 5. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. +	s.c. oder i.m. oder i.v.
	1 Amp.	Revitorgan ^R -Dilution * St.I bzw. St.0	
4. Mo - 8. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. +	s.c. oder i.m. oder i.v.
	1 Amp.	Revitorgan ^R -Dilution * St.I bzw. St.0	
5. Mi - 10. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. +	s.c. oder i.m. oder i.v.
	1 Amp.	Revitorgan ^R -Dilution * St.II bzw. St.I	
6. Fr - 12. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. +	s.c. oder i.m. oder i.v.
	1 Amp.	Revitorgan ^R -Dilution * St.II bzw. St.I	
7. Mo - 15. Tag	1 Amp.	membranoSOME ^R pro inj. +	s.c. oder i.m. oder i.v.
	1 Amp.	Revitorgan ^R -Dilution * St.III bzw. St.II	bei einwandfreier Verträglichkeit
8. Mi - 17. Tag	1 Amp. 1 Vial	membranoSOME ^R pro inj. + Sol-Präparat ** oder Dil.	s.c. oder i.m. oder i.v. einwandfreie Verträglichkeit vorausgesetzt
9. Fr - 19. Tag	1 Amp. 1 Vial	membranoSOME ^R pro inj. + Sol-Präparat ** oder Dil.	s.c. oder i.m. oder i.v.
10. Mo - 21. Tag	1 Amp. 1 Vial	membranoSOME ^R pro inj. + Sol-Präparat ** oder Dil.	s.c. oder i.m. oder i.v.

Rp.: 2 OP membranoSOME^R pro inj.; 1 OP Revitorgan^R-Dilution *; 3 OP Sol-Präparat **; z.B. Dilution NeyTumorin^R,
Dilution Neythymun^R f + k; ** z.B. NeyTumorin^R-Sol, Neythymun^R f + k-Sol.

dere Applikationsform einschließlich intra-artikulär ebenso natürlich s.c. oder i.m. möglich. Vor der Injektion muß der Ampulleninhalt langsam auf Körperwärme gebracht und gut durchgeschüttelt werden. Intravenöse Injektionen dürfen nur sehr langsam erfolgen (1 ml in 1 - 2 Min.). Bei oraler Applikation und Inhalation als Aerosol wird die Resorption im Darm oder den Lungenalveolen durch die Kleinheit der Fettmikronen begünstigt. Die Herstellung der Aerosole erfolgt mittels Ultraschallzerstäuber, nicht aber durch Anwendung von Wärme, weil diese zum Konfluieren der Fetttröpfchen führen würde und nur feine Aerosole bis zu den Lungenalveolen gelangen, wo die Resorption erfolgt. Auch die perkutane Applikation ist möglich.

Zusammensetzung

membranoSOME enthält als Wirkstoff eine Mischung makromolekularer Organlysate (Molekulargewicht < 10 Dalton nach dem Proteingehalt standardisiert).

Zusammenfassung

Ein neuartiges therapeutisches Prinzip mit außerordentlich interessanten Aspekten wird in der Palette "membranoSOME[^] pro iniectione" realisiert. Das Basistherapeuticum ist durch folgende Wirkungen charakterisiert:

1 als immunbiologisches Adjuvans zur Normalisierung der Immunabwehr mit reparativer Wirkung über Zellmembranen von Blut-, Gewebe- und Tumorzellen sowie auf das Gefäßsystem.

2 Zu Permeabilitätsverbesserung im Gewebe und Überwindung der Blut-Liquor-Schranke für mitinjizierte Arzneimittel, insbesondere von biomolekularen zytoplasmatischen Organextrakten (Revitorgan[^]-"Dilutionen" -

Tabelle 2: 1 Ampulle (2 ml) membranoSOME^D pro inj. (D9) enthält:

Chorion	0,67 ng
Hepar fet	0,67 ng
Mucosa intestinalis crassi fet	0,33 ng
Mucosa intestinalis tenuis fet	0,33 ng
ZnSO ₄	2,00 ng
MnSO ₄	2,00 ng
MgCl ₂	2,00 ng
KCl	1,00 ng
CaCl ₂	1,00 ng

inkorporiert in Liposome aus

Lecithin	5,10 mg
Cholesterin	0,90 mg

emulgiert in einer wäßrigen

NaCl-Lösung aus

Thymus juv	0,66 ng
Glandula Lymphonodi	0,66 ng
Lien	0,66 ng
Procain-HCl	0,20 ng
Na-dodecylsulfat	2,00 Mg

als wäßrige Lösungen und als Lösungsmittel für Revitorgan "Sol-Präparate" - voll lösliche Trockensubstanzen)

3 als neuartiges Neural- und Akupunktur-therapeutikum zur lokalen Applikation

Summary

A novel type of therapeutic principle with remarkable interesting aspects is realized with the "membranoSOME pro iniectione". These basetherapeutics are characterized through the following effects:

1 as immunobiological adjuvant for the normalisation of the immunodefense with repairing effects from cytomembranes of blood-, tissue- and tumor cells as well as for the vascular system

2 for the improvement of the permeability in the tissue and for the overcoming of the blood-fluid-barrier for other medicaments which are injected parallel, especially of biomoleculare cytoplasmatic organextracts (Kevitorgan -"Dilutions" - in hydrous solutions and as solvens for Revitorgan^R- "SOL-preparations" - complete soluble dry substances

3 as novel neural- and acupuncture therapeutic for the local application

Literatur

Goldinger: Liposome - Arzneistoffträger der Zukunft; Arzneimitteltherapie 5, 169 - 170 (1983)

Gregoriadis, G : Pharmacy Intern 4 33 (1983)

Stricker, H , Müller, H : Pharm Ind 46, H 11, 1175 - 1183 (1984)

Theurer, K Thei'apiew 36, H 26A, 82 (1986)

Theurer, K DEP 2650502; DEP 2656 333 und EPA

2 Europäische Patentschriften

Europäische Patentanmeldung

Verfahren zur Herstellung von künstlichen biomimetischen Haptenen bzw Antigenen

EP Nr : 85102586 6

vom 07 03 1985

Priorität: 16 10 84 DE 3437757

19 01 85 DE 3501705

09 05 84 DE 3417022

15 05 84 EP 84105554

15 11 84 DE 3441764

Zusammenfassung

Zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken werden biomimetisch wirksame künstliche Haptene bzw Antigene sowie Toxine als Anti-Idiotyp-Antikörper bzw deren antideterminante, N-terminalen Bezirke entsprechend den schwer erreichbaren Idiotypen der Ausgangsstoffe, insbesondere von Toxinen, die nach Schädigung mit ionisierenden Strahlen und nach Verbrennungen entstehen, Tumormarkern oder biologisch wirksamen Proteinen, Enzymen, Hormonen oder Releasing-Eactors und Mediatoren des Zellstoffwechsels hergestellt. Dabei können Stoffe mit verschiedener Spezifität miteinander kombiniert und mindestens zwei Bestandteile des Spektrums der Anti-Idiotyp-Antikörper bezüglich des idiotypen Bezirkes eines Ausgangsstoffes, gegebenenfalls zusammen mit biologischen Trägerstoffen chemisch konvalent konjugiert und durch Tracerstoffe markiert werden.

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung von künstlichen biomimetischen Haptenen bzw Antigenen analog der Herstellung biologischer

Peptidwirkstoffe unter Verwendung eines isolierten Peptidwirkstoffes zur Gewinnung primärer Antikörper nach DP 2819110, bei welchem man gegen die antideterminante Gruppe oder Fragmente des primären Idiotyp-Antikörpers einen Anti-Idiotyp-Antikörper bzw dessen determinante reaktive Gruppe in Form leichter oder schwerer Ketten oder dessen Fab-Fragmente erzeugt, dadurch gekennzeichnet, daß schwer erreichbare natürliche Haptene oder Antigene sowie Toxine, die nach Schädigung mit ionisierenden Strahlen und nach Verbrennungen entstehen, Tumormarker, Proteide oder Proteine als Ausgangsstoffe verwendet und daß insbesondere bei Verwendung von biologisch wirksamen Proteinen, z B Enzymen, Hormonen, Releasingfactors und Mediatoren des Zellstoffwechsels mindestens zwei Bestandteile des Spektrums der verschiedenen Anti-Idiotyp-Antikörper bzw -fragmente gegebenenfalls mit biologischen Trägerstoffen chemisch konvalent konjugiert werden.

2 Verfahren nach Anspruch 1 zur Gewinnung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß die biomimetischen Anti-Idiotyp-Antikörper bzw Wirkfaktoren aus diesen, durch

Tracerstoffe markiert und Mischungen bezüglich verschiedenartiger Ausgangsstoffe, wie z B Tumormarker kombiniert werden

Beschreibung

Die Immunprophylaxe und -therapie durch aktive und passive Immunisierung ist ebenso wie die Immundiagnostik weiterhin von größter praktischer Bedeutung. Es werden dazu die jeweiligen natürlichen Antigene bzw Haptene gebraucht. Diese müssen zuerst aus einem Stoffgemisch isoliert werden und stehen oft nicht in ausreichender Menge und Qualität zur Verfügung. Nach Verbrennungen und beim akuten Strahlensyndrom treten Toxine auf, die sekundär zur zusätzlichen Schädigung des Individuums führen (vgl K Theurer: Immunologische Prophylaxe und Therapie des akuten Strahlensyndroms: Atompraxis H 9, S 327 - 330, 1958). Auch die Gewinnung von tumorassoziierten Antigenen (Tumormarkern) oder anderen Zellfaktoren, die vom normalen abweichen oder gegen die sich im Organismus eine Autosensibilisierung ausgebildet hat, stößt auf Schwierigkeiten. Für diagnostische wie therapeutische Zwecke sind größere Antigenmengen erforderlich. Die Antigene sollten dabei möglichst rein bzw isoliert zur Verfügung stehen.

Vorliegendes Verfahren ermöglicht die fortlaufende Gewinnung von biomimetischen imitierenden Stoffen, analog den natürlichen Haptenen, Antigenen oder Toxinen. Die natürlichen Stoffe werden aus Individuen gewonnen und isoliert, die vorher der Noxe ausgesetzt waren oder abweichende Zellfaktoren enthalten. Haptene werden zu Voll-Antigenen komplettiert und diese wie Antigene zur Ge-

winnung eines primären Antikörpers nach konventionellen Methoden in einem gesunden Individuum in vivo oder in vitro aus Kulturen von Hybridomzellen verwendet. Das Antikörpergemisch kann an Normalgewebe, durch Adsorptionschromatographie eingeeengt und aus den Antikörpern die antideterminanten Gruppen abgetrennt werden. Dieses Verfahren bedeutet eine spezielle Anwendung des Verfahrens zur Synthese von biologischen Peptidwirkstoffen (DP 2819110 vom 29.04.1978). Die antideterminanten Fragmente der ersten Antikörper oder auch die gesamten Antikörper werden zur Erzeugung eines zweiten Antikörpers ebenfalls in einem gesunden Individuum oder in vitro verwendet. Dabei entstehen u a Anti-Idiotyp-Antikörper mit der gleichen antigenen Spezifität wie das ursprüngliche Antigen. Da es sich bei Toxinen die nach Bestrahlungen oder Verbrennungen auftreten, um ein Gemisch von schädlichen Substanzen handelt, ist hier eine Klonierung, d h Einengung auf einen Faktor der verschiedenen Anti-Idiotyp-Antikörper nicht erforderlich. Es ist möglich, hier das gesamte Antikörperspektrum zur Gewinnung der Impfstoffe zu verwenden. Für diagnostische Zwecke können die Anti-Idiotyp-Antikörper bzw die daraus gewonnenen Faktoren einzeln oder als Konjugate mit Tracerstoffen (Radio-Nukliden), Enzymen oder Farbstoffen markiert werden, wie dies für die Markierung von Antigenen bzw von Antikörpern bekannt ist (vgl Lehrbücher der Immunbiologie).

Für Screening-Tests auf eine immunologische Sensibilisierung gegen tumorassoziierte bzw embryo-foetale Antip;ene sind Mischungen von imitierenden Antigenen der verschiedenen Tumormarker, z B Embryofeto-Protein, Ferritin, carcino-embryonales Antigen u a erwünscht.

Bezüglich der Idiotypen der natürlichen Antigene und Haptene gibt es jeweils ein Spektrum verschiedener Anti-Idiotyp-Antikörper. Durch Klonierung der in vitro aus Hybridomzellen gewonnenen Anti-Idiotyp-Antikörper lassen sich aber auch weitgehend isolierte biomimetische Antigene bzw. Haptene gewinnen. Bei Erzeugung der Antikörper im homologen System wird die Möglichkeit der Entstehung von art- oder gewebespezifisch über Kreuz reagierende Antikörper verhindert bzw. vermindert, weil im gesunden Organismus gegen die vorhandenen Körperbestandteile keine Antikörper gebildet werden, andererseits aber gegen die neu entstandenen Toxine bzw. Reaktionsprodukte, wie auch Tumorantigene und embryo-foetale Antigene, gegen die keine Immuntoleranz besteht. Die Gewinnung von Antikörpern sollte möglichst in nicht vorsensibilisierten Zellen erfolgen. Für die Erzeugung des primären Antikörpers wie auch für die Anti-Idiotyp-Antikörper können wie in DP 2829110 Adjuvantien und Verfahren zur Komplettierung durch Konjugation mit einem Carrier Verwendung finden.

Das vorliegende Verfahren führt zur Verbesserung der biomimetischen Effektivität der Anti-Idiotyp-Antikörper bzw. der daraus gewonnenen Fragmente dadurch, daß mindestens zwei Faktoren der verschiedenen Einzelkomponenten die ein natives Antigen oder Hapten imitieren, nach bekannten Verfahren der Konjugation von Haptenen bzw. Antigenen chemisch kovalent miteinander verbunden werden. Die Wirksamkeit wird noch weiter verstärkt durch die zusätzliche Einbeziehung von Trägerstoffen in das Konjugat. Diese können Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate oder Lipide wie auch deren

Bestandteile sein (vgl. DPA 3417022 7-44; Träger- und Begleitstoffe für biologische Wirk- und Regulationsverfahren aus Zellen und Geweben und deren Anwendung). Die Priorität dieses Verfahrens wird mit beansprucht. Es werden dabei hoch- und makromolekulare Oestandteile aus biologischen Zellen (Mikroorganismen und/oder tierischen oder pflanzlichen Geweben) sowie Blut, insbesondere nichtlösliche Rückstände aus Extrakten durch chemische und/oder enzymatische Spaltung in Polypeptide, Peptide und Nukleotide mit einem Molekulargewicht von 500 - 50 000 Dalton fragmentiert, und diese einzeln nach Stoffgruppen oder als Mischung, je nach Indikation mit biologischen Wirkstoffen, insbesondere Regulationsfaktoren aus Zellen und Geweben, wie auch anderen Pharmaka, einzeln oder in Kombination konjugiert.

Vorliegendes Verfahren kann also allgemein zur Gewinnung von biologischen bzw. therapeutischen biomimetischen Wirkstoffen, welche die Wirkung von natürlichen Stoffen imitieren, verwendet werden, insbesondere auch von Proteinen mit biologischer Wirkung, wie Enzymen, Hormonen, Releasingfaktoren und Mediatoren des Zellstoffwechsels.

Es lassen sich alle geeigneten und bekannten Verfahren der chemischen Konjugation von Peptiden und Proteinen, wie auch die Konjugation derselben mit Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und Lipiden sowie deren Untereinheiten bzw. Bestandteile anwenden. Dabei sollte die Stereospezifität des Konjugats dem Idiotyp-Molekül entsprechen, so daß eine Bindung mit dem jeweiligen natürlichen Rezeptor-Molekül möglich ist. Das Verfahren eignet sich deshalb für die Partialsynthese von Molekülen mit bestimmten biologischen Wirkungen und zur Synthese von Arzneimitteln und Dia-

agnostika Die biologisch aktiven Bezirke, insbesondere der Anti-Idiotyp-Antikörper und deren Fragmente müssen deshalb nach außen gerichtet sein

Die chemische Konjugation der Anti-Idiotyp-Antikörperfragmente kann nach verschiedenen, bereits bekannten Verfahren erfolgen analog der Herstellung von künstlich zusammengesetzten Antigenen, Proteinen und Proteiden, so z B durch Kupplung als Diazonium-Verbindung, die Behandlung mit Zyanaten, die Umsetzung mit Carbobenzoxy-Verbindungen, das Curtius'sche Azid-Verfahren, das Oxazolone-Verfahren, die Konjugation mit Polysacchariden nach W J T Morgan, Verbindung mit Carboxyhydraten, Pyridin-Eiweiß-Verbindungen, Verbindungen mit Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfid-Brücken u a (vgl A Schmidt: Fortschritte der Serologie, S 67 u f, Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1955; Helmut Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden, S 480 u f, Gustav Fischer Verlag, 1984) Der Nachweis der erfolgten Konjugation der Ausgangsstoffe wird durch bekannte physikalische oder immunbiologische Vergleichsuntersuchungen geführt, wie z B die Bestimmung der Molekulargewichte, chromatographische und elektrophoretische Auftrennungen, insbesondere durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, Immunelektrophorese u a Der Nachweis der Wirkung erfolgt durch Bioassay in vitro an Zell- und Gewebekulturen, an zellfreien Synthesystemen oder pharmakologisch im Tierversuch

Die Anwendung der Konjugate erfolgt für diagnostische wie auch therapeutische Zwecke in Human- und Veterinärmedizin, wie auch zur Beeinflussung von Zellkulturen, Mikroorganismen und Pflanzen

Beispiel 1

Synthese von künstlichen biomimetischen Antigenen analog den tumorassoziierten Antigenen aus Tumorgewebe Sie erfolgt in gleicher Weise wie in DEP 2819110 Beispiel 1 Es werden nach bekannten Aufbereitungsverfahren die jeweiligen Tumormarker isoliert und in konventioneller Weise zur Sensibilisierung von Antikörper-erzeugenden Tieren bzw zur Sensibilisierung von Hybridomzellen verwendet Es können auch embryo-foetale Zellmarker, die bei Tumorzellen wieder auftreten, in gleicher Weise verarbeitet werden

Die entstehenden primären Antikörper werden durch Bioassay auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der biologischen Wirkung des ursprünglichen Antigens bzw Haptens, das zum Voll-Antigen komplettiert wurde, gegebenenfalls unter Anwendung von radiologischen Tracermethoden getestet Durch Adsorption und Absättigung an Normalgewebe wird der spezifische Antikörper oder das Antikörperspektrum gereinigt und zum Antigen komplettiert, oder aber die antideterminanten Gruppen als Antikörperfragmente isoliert und ebenfalls zum Antigen komplettiert, bevor man sie zur Gewinnung von Anti-Idiotyp-Antikörpern in einem anderen, nicht vorsensibilisierten Immunsystem verwendet Auch hier kann die Antikörpersynthese in vitro über Hybridomzellen erfolgen Die gewonnenen Anti-Idiotyp-Antikörper können wie die daraus gewonnenen antideterminanten Fragmente zum diagnostischen Nachweis entsprechender primärer Antikörper aus den Körperflüssigkeiten durch Antigen-Antikörperreaktionen verwendet werden Der primäre Antikörper und die aus ihm gewonnenen antideterminanten Gruppen lassen sich therapeutisch wie auch diagnostisch

entsprechend DP 2456224 verwenden
Dabei werden diese mit Zytostatika oder
zytotoxisch wirksamen Substanzen oder
mit Radionukliden gekoppelt

Beispiel 2

Gewinnung von immunogenen, die Wirkung von toxischen Faktoren, wie sie bei Letalbestrahlung mit ionisierenden Strahlen in einem Individuum entstehen, biomimetisch imitierenden Anti-Idiotyp-Antikörpern
Die Gewinnung der "Radiotoxine" erfolgt wie in Atompraxis, H 9, S 327 - 330, 1958, angegeben Außer Blutlysate kann dazu auch Gewebehomogenat, insbesondere aus Knochenmark, Leber und Milz verwendet werden Wie in Beispiel 1 wird die Immunogenität der Faktoren zur Gewinnung von primären Antikörpern in einem nicht vorsensibilisierten Immunsystem in vivo oder in vitro verstärkt Die daraus gewonnenen Antikörper werden gegebenenfalls an Normalgewebe absorptionschromatographisch gereinigt und wie in Beispiel 1 zu Anti-Idiotyp-Antikörpern weiterverarbeitet Diese werden zum Antigen komplettiert und zur Prophylaxe bzw Therapie von Strahlenschäden als Impfvaccine oder zu Diagnostika verwendet

Beispiel 3

Gewinnung von "Verbrennungstoxinen" - ähnlichen Antigenen bzw Haptenen Ausgang dafür sind Verbrennungsgeschädigte Individuen aus deren Blut oder Körpergewebe die Verbrennungstoxine isoliert werden Nach DP 3441764 8 können diese ebenso wie die Strahlentoxine auch aus entsprechend geschädigten Gewebs- und Zellkulturen gewonnen werden Die weitere

Verarbeitung zur Anti-Idiotyp-Antikörpern bzw -fragmenten erfolgt wie in Beispiel 1 und 2 angegeben Es können Kombinationsimpfstoffe aus biomimetisch wirkenden Strahlentoxinen und Verbrennungstoxinen durch Kombination beider Faktoren gewonnen werden

Beispiel 4

Nach DEP 2819110 und DP 3437754 3 werden nach konventionellen Methoden oder aus in vitro-Zellkulturen von Lymphozyten oder Hybridom-Zellen Anti-Idiotyp-Antikörper gewonnen (vgl : Herwart Ambrosius: Antiserumgewinnung aus Tieren, S 25 und S Wichner: Antikörperbildung in der Zellkultur, S 48 - in II Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1984) Von den Anti-Idiotyp-Antikörpern werden die antideterminanten Fragmente enzymatisch abgespalten und chromatographisch isoliert Bei Verwendung eines Proteins oder Proteids als Ausgangsstoff (Idiotyp-Molekül) z B einem bestimmten Enzym wie der GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) entstehen mehr als zehn verschiedene primäre Idiotyp-Antikörper gegenüber den verschiedenen Oberflächenbezirken des Moleküls Von diesen Antikörpern werden die N-terminalen Bezirke bzw antideterminanten Gruppen als Antigen für die Erzeugung von entsprechenden Anti-Idiotyp-Antikörpern verwendet Die Gewinnung derselben erfolgt möglichst in einem autologen System bezüglich der primären Antikörper, weil dort der Toleranzbruch gegenüber den variablen Bezirken des primären Antikörpers und die Entstehung von Anti-Antikörpern mit Idiotyp-Eigenschaften gegenüber einem Toleranzbruch bezüglich der konstanten Bezirke, der nicht die funktionellen Gruppen

pcn betreffen würde, erleichtert ist Von den isolierten antideterminanten, N-terminalen Bezirken der Anti-Idiotyp-Antikörper werden nun mindestens zwei Moleküle miteinander konjugiert Wenn die Fragmentierung z B für die leichten und schweren Ketten der Antikörper durch Aufspaltung mit Mercaptoäthanol an den Disulfidbrücken erfolgt und eine Rekombination bzw Reaggregation durch bekannte Methoden verhindert wird, können die isolierten Fragmente durch Bindung der freien SH-Gruppen konjugiert werden Ohne Bindeglied lassen sich auch Konjugate aus Polysacchariden gewinnen, die mit einer begrenzten Anzahl von Fettsäureresten substituiert sind Diese adsorbieren sich direkt an den Proteinen bzw Peptiden (Hämmerling, U ; Westphal, O : Europ J Biochem 1, 46 (1967)) Besonders geeignet zur Konjugation sind auch die Fab⁺- und Fab²-Fragmente der Anti-Idiotyp-Antikörper Bei den Antikörperfragmenten kann auch die Tannin-Methode angewandt werden (Borduas, A , Grabar, P : Ann Inst Pasteur 84, 903 (1953); Stravitsky, A : J Immunol 72, 306 (1954); Roitt, I und Doniach, D : WHO-Book of immunologic techniques, S 20: World Health Organisation, Genf (1966)) Auch die Benzidin-Methode ist dazu geeignet (Gordon, J ; Rose, B , Sekon, A : J exp Med 108, 37 (1958); Roberts, I ; Doniach, D: WHO-Book of immunologic techniques, S 1; World Health Organisation, Genf (1966); Stravitsky, A , Arquilla, E: J Immunol 74, 306 (1955); Timpe, R , Furthmayr, H , Wolff, I : Int Arch Allergy 32, 318 (1967)) Von J Brock wurde die Konjugation durch Nitrobenzolsulfonat publiziert (vgl Präparation von konjugierten Antigenen, S 481

in II Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1984)) Nach Beendigung der Reaktion wird das DNP Produkt durch Gel-Chromatographie an Sephadex gereinigt

Beispiel 5

Es werden nach den benannten Methoden Konjugate aus einem Gemisch von antideterminanten Bezirken von Anti-Idiotyp-Antikörpern bezüglich dem somatotropen Hormon (Wachstumshormon) gewonnen

Beispiel 6

Es werden Konjugate aus Anti-Idiotyp-Antikörperfragmenten mit der Wirkung des Enzyms Arginase hergestellt Dazu wird als urspezifische Trägersubstanz das Kohlenhydrat Dextran mit einem Molekulargewicht kleiner als 10 000 verwendet In gleicher Weise können auch Sephadex-Ionenaustauscher für die Konjugation verwendet werden

Beispiel 7

Zur Konjugation kommen Anti-Idiotyp-Antikörperfragmente mit Nukleotiden oder Desoxynukleotiden, gegebenenfalls in Kombination mit Kohlenhydraten und/oder Lipiden

Beispiel 8

Zur Konjugation kommen Anti-Idiotyp-Antikörperfragmente mit Lipiden und Peptiden als Fragmente von Organextrakten mit einem Molekulargewicht von 3000 Dalton, die nach DPA 3417022 7-44 gewonnen wurden

Beispiel 9

Es worden mehrere Anti-Idiotyp-Antikörper bezüglich eines Idiotyp-Moleküls oder daraus gewonnene Fragmente mit antiteterminanten Bezirken oder Konjugate von diesen, gegebenenfalls unter Einbeziehung eines Trägerstoffes mit Tracermolekülen für den immunologischen Nachweis einer humoralen oder zellulären Sensibilisierung konjugiert (vgl.: Markierung von Proteinen: Hans Arthur Schulze in H. Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

(1984); Rodbard, D., , Weiß, G H :
Mathematical theory of immunoradiometric (labeled antibody) assay; Anal Biochem 52, 10 (1973))

Beispiel 10

Als Antigen zum Nachweis einer immunologischen Sensibilisierung gegenüber Tumormarkern werden unterschiedliche biomimetrisch imitierende Faktoren für verschiedenartige Tumormarker, z B CEA, Ferritin, α -Fetoprotein u α aa gemischt

Europäische Patentanmeldung**Verfahren zur schonenden Sterilisation von biologischen Wirkstoffen, insbesondere von Organgeweben für therapeutische Zwecke gegenüber Mikroorganismen und Viren.**

EP Nr : 84112944 8
vom 07 10 80

Priorität: 02 11 79 DE 2944278

Zusammenfassung

Das Verfahren dient zur schonenden Sterilisation von biologischen Wirkstoffen gegenüber Mikroorganismen und Viren. Die Substrate werden dabei im Vakuum Dämpfen von Persäuren oder von Mischungen von Persäuren und den entsprechenden konzentrierten Säuren ausgesetzt.

Patentansprüche

1 Verfahren zur schonenden Sterilisation von biologischen Wirkstoffen, insbesondere von Organgeweben für therapeutische Zwecke gegenüber Mikroorganismen und Viren, die einem gesteuerten chemischen Aufschluß unter Verwendung von Dämpfen und chemischen Reagenzien unterworfen werden, bei welchen man die pulverförmigen Substrate mit dem den Aufschluß bewirkenden Reagenz, dessen Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, insbesondere konz Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin in einem abgeschlossenen System zusammen, aber getrennt voneinander, einem solchen Vakuum aussetzt, welches die Überführung des aufschließenden Mittels in die dampfförmige Phase ermöglicht, und, nachdem der gewünschte Aufschluß des Substrates erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagenz wieder entfernt, wobei

man insbesondere von tiefgekühlten und pulverisierten Geweben ausgeht und man das dampfförmige chemische Reagenz aus einer vorbestimmten Menge durch Absenken des Vakuums zunächst auf dem Substrat niederschlägt, und nach der gewünschten Einwirkung das überschüssige Reagenz durch Erhöhung des Vakuums wieder entfernt, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, daß man die Substrate im Vakuum Dämpfen von Persäuren oder von Mischungen von Persäuren und den entsprechenden konzentrierten Säuren aussetzt.

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Säuredämpfe ein Mischungsverhältnis von 1 Teil Persäure zu 1 - 4 Teilen des entsprechenden Säureanhydrids aufweisen.

Der Anmeldungsgegenstand betrifft ein Verfahren zur schonenden Sterilisation von biologischen Wirkstoffen, insbesondere Organgeweben für therapeutische Zwecke gegen Mikroorganismen und gegen Viren, die einem gesteuerten chemischen Aufschluß unter Verwendung von Dämpfen und chemischen Reagenzien unterworfen werden. Der Anmeldungsgegenstand ist durch das Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet. Der Anspruch 2 hat eine weitere Ausgestaltung des Verfahrens nach Anspruch 1 zum Gegen-

stand

Die Gewinnung steriler Arzneimittel aus biologischen Geweben, insbesondere aus Organgeweben, stößt auf Schwierigkeiten, weil mit den üblichen Desinfektionsmitteln nicht ohne starke Denaturierung und therapeutische Wirkungseinbuße absolute Sterilität erreicht werden kann. Deshalb wurden von der Gesundheitsbehörde für die Herstellung solcher Arzneimittel besonders erschwerende Auflagen gemacht, wie z. B. Haltung isolierter Tierherden und Aufzucht unter Sterilbedingungen. Diese Auflagen führen zu einer kaum tragbaren Verteuerung der Produkte, ohne daß damit eine absolute Gewähr für Sterilität, insbesondere gegen Viren, erreicht werden könnte. Die Mitverwendung von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika, die imstande sind, Viren zu inaktivieren, ist hingegen mit dem Risiko der Allergenisierung des Patienten behaftet.

Es konnte nun in Versuchen mit Organpulvern aus virusinfizierten Hühnerembryonen nachgewiesen werden, daß mit einem modifizierten Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von Organen für therapeutische Zwecke, das im Patentanspruch definiert ist, Sterilität erreicht wird. Das Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben für therapeutische Zwecke ist Gegenstand der DE-PS 1090821 und betrifft, daß man die pulverförmigen Substrate mit dem den Aufschluß bewirkenden Reagenz, dessen Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, insbesondere konz. Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin in einem abgeschlossenen System zusammen, oder getrennt voneinander, einem solchen Vakuum aussetzt, welches die Überführung des aufschließenden Mittels in

die dampfförmige Phase ermöglicht, und, nachdem der gewünschte Aufschluß des Substrates erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagenz wieder entfernt, wobei man insbesondere von tiefgekühlten und pulverisierten organischen Geweben ausgeht, und man das dampfförmige chemische Reagenz aus einer vorbestimmten Menge durch Absenken des Vakuums zunächst auf dem Substrat niederschlägt, und nach der gewünschten Einwirkung das überschüssige Reagenz durch Erhöhung des Vakuums wieder entfernt. Das Verfahren wurde vorzugsweise dadurch modifiziert, daß die Substrate bei einem Restwassergehalt von 5 bis 30% gegenüber einem Normalwassergehalt von 60 bis 87% von Frischgeweben, der Einwirkung von Säuredämpfen im Vakuum ausgesetzt werden, denen die entsprechenden Persäuren, besonders Ameisensäure, Essigsäure oder Schwefelsäure, in einem Mischungsverhältnis von 1 Teil Persäure zu 1 bis 4 Teilen des entsprechenden Säureanhydrids zugesetzt sind. Auch können Dämpfe von Säuren verwendet werden, denen bei der Herstellung eine geringere Menge von Wasserstoffperoxyd zugesetzt wird, als zur Herstellung der Persäure erforderlich wäre, z. B. zu 10 Teilen einer 96%igen Ameisensäure, 0,1 bis 0,8% von 30%igem Wasserstoffperoxyd zusammen mit 0,5% konz. Schwefelsäure, anstatt 10 Teilen konz. Ameisensäure nur 1 Teil Wasserstoffperoxyd, und zu 10 Teilen Essigsäureanhydrid nur 0,5 bis 4 Teile frisches 30%iges Wasserstoffperoxyd anstatt 5 Teile desselben. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die "partiellen" Persäuren weniger aggressiv und besser manipulierbar, d. h. weniger explosiv sind.

Bei der Bedampfung des Substrates soll

die Menge der Säure, die auf dem Substrat kondensiert, der Einwirkung einer 0,5 bis 2%igen Persäure entsprechen. Der Kondensationsvorgang kann, wenn erforderlich, mehrmals wiederholt werden, indem man das Vakuum kurz absenkt, bevor man erneut die Säuredämpfe einströmen und auf dem Substrat kondensieren läßt. Die Einwirkung kann bei nicht begrenzten Säuremengen einige Minuten, und bei Säuremengen, die auf die Substratmenge abgestimmt sind, bis zu mehreren Stunden betragen.

Der Nachweis der Sterilität des Substrates erfolgt durch die bekannten Methoden der Mikrobiologie und Virologie über die Züchtung der Viren in Hühnereiern oder in Zellkulturen. Der Nachweis der noch erhaltenen biologischen Wirkung der Präparate erfolgt durch Bioassay an Zellkulturen (V. Paffenholz und K. Theurer: Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro: *Der Kassenarzt*, H 27, September 1978 und H 19, Mai 1979, S. 876 - 877) sowie durch Tierversuche.

Das Verfahren führt zu keinen toxisch wirkenden Produkten, wie z. B. Heterozyklen, weil die erhaltenen Bruchstücke wegen des fehlenden Wassers nicht miteinander reagrieren oder konjugieren. Die in geringem Ausmaße entstehenden Peroxyde bewirken in den Substraten bei der therapeutischen Anwendung eine erwünschte Reizwirkung, ähnlich wie bei der therapeutischen Anwendung von Ozon. Auch läßt sich bei diesem Verfahren die nicht zur Reaktion gekommene Säure durch Erhöhung des Vakuums absaugen. Sonst kann aber auch eine Neutralisierung durch Einblasen von Alkalidämpfen, z. B. von Merkaptoäthanol und erneutes Absaugen erfolgen. Durch die gleichzeitige Reduktionswirkung läßt sich die Oxydationswirkung zum Teil wieder rückgängig machen. Anm. von Dämpfen von Persäuren

erfordert säureresistente Kunststoffschläuche und -dichtungen. Der Rezipient für die Persäure kann zweckmäßigerweise durch einen Dreivegehahn mit der Vakuumpumpe und andererseits dem Rezipienten für das Substrat verbunden werden, so daß man nach Erzeugung des Vakuums im Substrat-Rezipienten die Vakuumpumpen absperren und die Säuredämpfe einströmen lassen kann. Es ist auch möglich, gefrorenes, nicht getrocknetes Gewebepulver, zunächst bis zum Erreichen der gewünschten Restfeuchtigkeit durch Gefriertrocknung oder in Anwesenheit hygroskopischer Stoffe bzw. von konzentrierter Schwefelsäure vorzutrocknen, bevor man den Sterilisationsvorgang einleitet. Trockengewebe mit einer zu geringen Restfeuchtigkeit können durch Einleiten von Wasserdampf oder Anfeuchten vorbehandelt werden.

über die Peressigsäure als Möglichkeit der "Kaltsterilisation" bei der Aufbereitung thermosensibler Instrumente haben K. Bansemir, H. Bellinger, K. Disch und W. Kästner in *"Hygiene und Medizin"* 4 (1979), 311 - 316 publiziert. Dabei wurde der sterilisierende Effekt einer 1- bis 2%igen Lösung auf Papova-Viren, Enteroviren, Poliomyelitis Typ I, als auch Coxsackie-Viren Typ B III und Hepatitis-B-Viren, nachgewiesen. Auch wurde über toxikologische Untersuchungen berichtet. Die Anwendung von Säurelösungen ist jedoch nicht mit dem beanspruchten Verfahren identisch, weil hier die Anwendung bei Raumtemperatur in Form von Säuredämpfen erfolgt, und beim Trocknungsvorgang die nicht zur Reaktion gekommene Säure wieder durch Absaugen beseitigt wird. Desgleichen werden nach "Weyls: Handbuch der Hygiene, Band VIII:

Die Desinfektion", Barth, Leipzig 1922, S 983 - 987, Persäuren nur in flüssiger Phase eingesetzt

Beispiel 1

Das Beispiel zeigt die Inaktivierung von New Castle Disease Virus (NDV) in Hühnerfoeten und Eihäuten. Diese werden nach der Entnahme aus infizierten bebrüteten Hühnereiern in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und pulverisiert. Das tiefgefrorene Pulver wird in dünner Schicht auf einer Petrischale verteilt und in einem Exsikkator über eine Schale mit konzentrierter Schwefelsäure gebracht. Der Exsikkator steht über einem Dreiwegehahn mit der Hochvakuumpumpe und einem Druckgefäß, in dem sich 10 ml einer Mischung von 1 Teil Peressigsäure mit 2 Teilen Essigsäure befindet, in Verbindung. Es wird nun zunächst das Exsikkatorgefäß 2 Stunden lang evakuiert, bis das gefrorene Pulver zu etwa 1/2 bis 1/4 getrocknet ist. Dann wird die Vakuumpumpe durch das Ventil abgekoppelt und der Rezipient mit Persäuremischung zum Exsikkator geöffnet, so daß die Säure verdampft und in den Exsikkator gelangt. Es hängt vom Volumen des Exsikkators ab, wieviel Säure verdampft. Gegebenenfalls muß wiederholt das Vakuum im Exsikkatorgefäß erneuert werden, damit die gesamte

Säure verdampft. Die Einwirkungszeit beträgt 30 Minuten. Danach wird bis zur Volltrockenheit das Pulver abgesaugt. Es kann aber auch nach der Säureeinwirkung der Rezipient für Säure durch einen solchen mit Merkaptoäthanol ersetzt werden und dieses in gleicher Weise, wie vorher die Säure, auf das Gewebepulver zur Einwirkung gebracht werden, bevor man den Trocknungsvorgang durch erneutes Absaugen beendet. Auch kann anstelle der Trocknung über der hygroskopischen konz. Schwefelsäure die Gefriertrocknung mittels einer Kühlfalle erfolgen. Das gewonnene Trockenpulver erweist sich dann bei der virologischen Überprüfung als steril.

Beispiel 2

Es soll virusinfiziertes Trockenpulver sterilisiert werden. Dazu bringt man das Trockenpulver in einer Schichtdicke von 0,5 bis 1 cm auf Petrischalen, die in einen Exsikkator gebracht werden. Dieser wird nun evakuiert und dann Wasserdampf eingeleitet, der sich auf dem Substrat kondensiert und dieses befeuchtet. Es wird nun erneut evakuiert und dann die Dämpfe einer Säuremischung aus 1 Teil Perameisensäure mit 2 Teilen 98%iger Ameisensäure eingeleitet. Im weiteren verfährt man wie Beispiel 1.

Europäische Patentanmeldung**Herstellung von Arznei- und Diätmittel aus Milch, Sahne oder Butterfett und deren Verwendung**

EP Nr : 84111391 3
vom 25 09 1984

Priorität: 11 04 84 DE 3413541
13 09 84 DE 3433609

Zusammenfassung

Ettmikronen aus Milch oder Sahne, wie auch Butter unter Einbeziehung von bekannten Faktoren von künstlichen und bzw oder Zellmembranen und bzw oder Tracer-Molekülen zu Target-Zellen und bzw oder lipidlösliche Pharmaka werden zur Herstellung von Liposomen oder Membranfragmenten mit inkorporierten Pharmaka als Diät- oder Arzneimittel verwendet, wobei in der äußeren, wäßrigen Phase der Doppemulsion andersartiger Arzneimittel als in den Liposomen bzw Liposomenmembranen enthalten sein können und die Milchproteine bzw -saccharide durch Arzneimittellösungen ergänzt oder ersetzt werden

Patentansprüche

1 Herstellung von Arznei- und Diätmittel aus Milch Sahne oder Butterfett durch Homogenisieren bzw Behandlung mit Ultraschall, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Homogenisieren biologisch wirksame Faktoren aus Mikroorganismen, Pflanzen oder xenogenen Organgewebe in Form von Proteinen und bzw oder Nukleinsäuren und bzw oder deren Untereinheiten und Bestandteile (Peptide, Nukleotide, Nucleo-
annh andersartige, wasserlösliche

Pharmaka, einzeln oder in Mischung als Ergänzung oder Ersatz der Milcheiweiße und bzw oder -saccharide der wäßrigen Phase zugesetzt und in Liposome aus Ettmikronen inkorporiert werden, wobei die äußere wäßrige Phase durch andersartige Arzneimittellösungen als im Inneren der Liposomen ersetzt und der Liposomenmembran Tracer-Substanzen mit Zelltropismus zu Target-Zellen oder lipidlösliche Pharmaka konvalent oder adsorptiv angehängelt oder eingelagert sein können und solche Liposomenmembranen auch zu einer Lipid-in-Wasser-Emulsion mit zusätzlichen Arzneimitteln in der wäßrigen Phase verwendet werden

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Milch- oder Butterfett zusammen mit bekannten Membranfaktoren, insbesondere Phospholipiden und Cholesterin zu Liposomen oder Membranfragmenten verarbeitet werden

3 Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der äußeren wäßrigen Phase Antibiotika oder antimikrobielle bzw -virale Chemotherapeutika und in den Liposomen zellreparative und -membranstabilisierende Pharmaka verwendet werden

4 Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß lösliche Allergene einzeln oder als Mischung in

die Liposome inkorporiert werden

Beschreibung

Das Verfahren betrifft die Herstellung von Arznei- und Diätmitteln aus Milch, Sahne oder Butterfett mit biologischen Wirkfaktoren aus Mikroorganismen, Pflanzen oder xenogenen Organgeweben in Form von Proteinen und bzw oder deren Untereinheiten und Bestandteile wie Peptide, Nukleotide, Nucleoside, wie auch andersartigen, wasserlöslichen Pharmaka, einzeln oder in Mischung zur Ergänzung oder zum Ersatz der Milcheiweiße bzw -saccharide Die biologischen Wirkfaktoren und bzw oder Arzneimittel werden durch Homogenisieren oder Einwirkung von Ultraschall in Liposomen aus Milch- oder Butterfett inkorporiert

Speziell für die Gewinnung von Arzneimitteln wird das Verfahren weiter ausgestaltet durch die Verwendung von Lipiden aus Milch, Sahne oder Butter, zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden bzw Faktoren von Zellmembranen wie sie bisher zur Gewinnung von Liposomen und künstlichen Membranen verwendet werden Dabei können zusätzliche Faktoren mit einem Tropismus zu Target-Zellen als Tracer-Moleküle (vgl Theurer: DP 2650502 und DP 3339907 7) sowie lipidlösliche Arzneimittel in die Liposomenmembran eingebaut oder an diese kovalent oder adsorptiv gebunden werden Kohlenhydrate und Proteine der Milch oder Sahne können mit bekannten Methoden beseitigt und einer andersartigen Verwendung zugeführt werden

Liposomen sind kleinste Fettbläschen mit wäßrigem Inhalt im Zentrum Diese entstehen durch Homogenisierung oder Ultraschalleinwirkung aus Fettmikronen Die Herstellungsverfahren sind bekannt, z B Heydon und Taylor: J Theoret Biol 4

281 (1963): Müller, Fudin, Titien, Westcott: Nature 194, 979 (1962); Gregoriades: Feds Letters 36, 3 (1973); Bangham: Progr Biophys Mol Biol 18, 19 (1968) und Rahmann, Rosenthal und Cerny; Science 180, 300 (1973); J Lab Klin Med 83, 640 (1974); Proceedings of Society for experimental Biology and Medicine 146, 1173 - 1176 (1974)

Bei Theurer, K E : DP 2650502 vom 04 11 1976 und Zusatzpatent DP 3339907 7 werden Enzyme, zellspezifische Immunglobuline oder spezifische Faktoren, die den Target-Zellen entsprechen aus Zell- und Gewebeextrakten bzw daraus isolierten Membranen an die Liposomenmembran bzw an Membranbestandteile chemisch kovalent oder adsorptiv gebunden, um einen Zelltropismus mit verbesserter Adsorption zu erreichen

Liposome wurden als Träger für die verschiedensten Arzneimittel, Enzyme, Eiweißlösungen, wie auch zum Transport von Nukleinsäuren und deren Untereinheiten gebraucht (vgl Tibs, Sept 1976, S 203 ff und Feds Letters, Febr 1976) Die Verwendung von Milch und Sahne mit z B 30 - 50% Fettanteil, in Verbindung mit zugesetztem löslichen Eiweiß, und bzw oder Nukleinsäuren und bzw oder deren Untereinheiten und wäßrige Bestandteile in wäßrigen Lösungen ist bisher nicht erfolgt, obwohl Milch zum Zwecke der Haltbarmachung und Konservierung ohne Zusätze seit langem homogenisiert wird (H-Milch als Vollmilch oder Magermilch) Auch die erfindungsgemäßen Produkte sind bei Verwendung steriler Ausgangsmaterialien gut haltbar Es werden frische oder konservierte biologische Wirkfaktoren inkorporiert Aus Mikroorganismen können Vaccine oder sterile Autolysate aus Kulturen aus phy-

siologischen Bakterienarten, wie z B Escherichia Coli, Streptococcus faecalis, Lactobacterium bifidum u a verwendet werden, ebenso Stoffwechselprodukte von Milchsäurebildnern Auch aus Viren können nicht infektiöse Bestandteile, wie z B isolierte Eiweißanteile oder Nukleotide verwendet werden Als pflanzliche Wirkfaktoren können solche aus Pflanzenpreßsäften und allgemein lösliche und haltbare Phytotherapeutika verwendet werden

Faktoren aus Organgeweben mit Zelltropismus ermöglichen eine Vehikelfunktion zu korrespondierenden Geweben, wenn sie in die Lipidmembran eingebaut werden Sonst können aber die beanspruchten Wirkfaktoren aus unterschiedlichen Organarten einzeln oder als Mischungen über die Liposome zur Wirkung gebracht werden Es handelt sich bei den Wirkfaktoren um Biological Response Modifiers (vgl Porcher II : Med Klin 77, Nr 6, 10 - 12 (1982) sowie Theurer, K E : Pharmakologie: Eingliederung der Therapie mit makromolekularen Organextrakten in die moderne Pharmakologie: Der Kassenarzt 21, 12 (1981), sowie Aktivierung von Selbstheilungsvorgängen - Hygiogenese durch Organo- und Immunotherapie: Der prakt Tierarzt, II 6 und 7 (1982)) Es besteht die Möglichkeit der verschiedenartigsten Kombination von Faktoren, auch als Mischung von Mikroorganismen und pflanzlichen Bestandteilen und Organfaktoren

Die Zusatzstoffe können als wäßrige Lösungen zur Milch oder Sahne zugesetzt werden Auch ist es möglich, Trockenprodukte zu verwenden Die Lösungen derselben erfolgt zweckmäßig mit Milch, wie z B die Sol-Präparate von Revitorgan Die Konzentrationen der Zusätze liegen im mg- bis pg-Bereich Normalerweise werden Mengen zugesetzt, die T<<->n7ontitini im Fertigprodukt von Mg

bis ng ermöglichen

Es können alle Arten von wasserlöslichen und nicht lipidlöslichen Pharmaka in die Liposome inkorporiert werden, insbesondere Hormone, Vitamine, Spurenelemente wie auch chemische Pharmaka der verschiedensten Art Lipidlösliche Pharmaka lassen sich zusätzlich zu Tracer-Substanzen der Lipid-Kombination für die Liposomenmembran verwenden Der Anteil von Milch- oder Butterfett beträgt bis zu 40%; die Menge der Arzneimittel bis zu 10% der Lipidmischung Die jeweils optimale Methode ist sowohl von der Art der Liposomenmembran, wie auch von der jeweils in die Membran zu inkorporierenden oder anzukoppelnden Substanz abhängig Fragmente von Liposomenmembranen werden in wäßrigen Arzneimittelösungen emulgiert Die Applikation kann sowohl lokal als auch systemisch erfolgen Die wäßrige Phase der Milch, Sahne oder Butter kann durch wäßrige Arzneimittelösungen ergänzt oder ausgetauscht werden Auch lassen sich in der äußeren, wäßrigen Phase andersartige Arzneimittel verwenden, als diejenigen, die in den Liposomen inkorporiert sind Es muß dann nach Herstellung der Liposomen die Arzneimittelösung, die bei der Herstellung der Liposomen verwendet wurde, gegen eine andere ausgetauscht werden In den Liposomen und Membranfragmenten selbst können dann zusätzlich noch andere Pharmaka neben den Tracerstoffen Verwendung finden Es gibt deshalb verschiedenartige Kombinationsmöglichkeiten Bei chronischen Erkrankungen des Darmkanals (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) sowie dem intestinalen Strahlensyndrom werden bei Präparaten für die orale Applikation in der äußeren wäßrigen Phase nicht oder schlecht resorbierbare, lös-

liehe antiinfektiöse Stoffe wie z B Salazopyrin und in der inneren Phase der Liposomen Peptide aus Darmschleimhaut, Leber und Thymus gegebenenfalls zusammen mit Glukokortikoiden und in den Liposomenmembranen zytotrope Faktoren aus Darmschleimhaut oder Antikörper bzw Antikörperfragmente auch aus geklonten Antikörpern, die organspezifisch gegen Darmschleimhaut gerichtet sind, verwendet Als therapeutischer Faktor lassen sich in der Liposomenmembran zusätzlich Lipide aus Zellmembranen analog der geschädigten Gewebeart wie auch lipidlösliche Pharmaka einsetzen Zur Stabilisierung der Emulsion besonders aus Lipidmembranen, sind, wie auch von Liposomen-Suspensionen allgemein bekannte Emulgatoren geeignet

Beispiel 1

Es soll ein Diät-Präparat für Magen-Darm-Störungen aus Vollmilch hergestellt werden Dazu wird eine Organkombination, entsprechend den zytoplasmatischen Organ-Präparaten der Firma vitOrgan Arzneimittel GmbH, D-7302 Ostfildern-Ruit, verwendet Dieses Präparat ist auf 15 mg voll-löslicher Trokensksubstanz eingestellt und enthält Faktoren mit Molekulargewicht zwischen 1000 und 1 Million einer Mischung von Proteinen und Nukleinsäuren sowie deren Untereinheiten Es werden davon 10 mg in 10 l Milch gelöst, so daß die Endkonzentration $1 \mu\text{g pro ml}$ (10^{-6}) beträgt Anschließend wird die Milch mit einer Schall-Leistung von 120 - 240 W bei einer Betriebsfrequenz von 35 kHz während einer halben Stunde beschallt und danach in üblicher Weise für den Verbrauch in geeigneten Mengen abgefüllt

Beispiel 2

Herstellung von Präparaten aus Mikroorganismen Hier werden nicht infektiöse Extrakte aus Bakterien und bzw oder Viren, in gleicher Weise wie in Beispiel 1, verarbeitet Auch ist eine Kombination mit Organextrakten möglich Die Endkonzentration der Extrakte aus Mikroorganismen liegt im pg-Bereich pro ml Es müssen deshalb zu 10 l Milch 10 ng Wirkstoff zugesetzt werden

Beispiel 3

Phytotherapeutische Faktoren werden in gleicher Art wie in Beispiel 1 und 2 - aufgrund pharmakologischer Erkenntnisse - einzeln oder in Kombination mit Mikroorganismen oder Organfaktoren verwendet

Beispiel 4

Es soll ein roborierendes Diät-Präparat aus Sahne hergestellt werden Dazu wird eine Organmischung wie in Revitorgan[^] NeyGeront[^], in gleicher Weise wie in Beispiel 1, verwendet

Beispiel 5

Es soll ein Präparat zur Stimulierung des Sympathikotonus mit katabolisierender Wirkung aus Vollmilch hergestellt werden Hierzu wird eine Organkombination, wie in NeyDop^R (Revitorgan[^] Nr 97), in ⁻⁹ einer Endkonzentration von 10^{-9} verwendet Zusätzlich können Einzelorganextrakte, wie z B Thyreoglobulin aus Schilddrüse, mitverwendet werden

Beispiel 6

Es soll ein Arzneimittel zur Prophylaxe der Pollenallergie unter Verwendung von Butter hergestellt werden. Dazu wird frische oder gefrorene Butter zusammen mit Ei- oder Sojalecithin und Cholesterin im Verhältnis 3:5:2 Teile als Mischung durch Erwärmen beim Schmelzpunkt, möglichst unter Ausschluß von Sauerstoff, gegebenenfalls durch Abdecken der Schmelze mit chemisch inerten Gasen und unter Druck von über 1 Atmosphäre durch eine Düse in eine wäßrige Arzneimittellösung versprüht, so daß sich eine Emulsion aus Fetttröpfchen und Liposomen bildet. Dem Lipidgemisch kann ein Extrakt aus Proteinen, Peptiden, Nukleotiden oder Lipiden aus Schleimhautzellen und bzw. oder aus lymphatischen Zellen und Makrophagen in der Endkonzentration bis zu 1% der Lipidbestandteile zugesetzt werden. Als Arzneilösung wird die wäßrige Lösung eines Gemisches verschiedener Pollenantigene, die zur Allergie führen können, gegebenenfalls mit Zusatz von Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) in einer Konzentration bis zu 0,2 g/ml Lösungsmittel und bzw. oder Diphenylmethylpiperazin (1-(3-(4-Diphenylmethyl)-1-Piperazinyl)-propyl)-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on) in einer Konzentration bis zu 30 mg/ml Lösungsmittel, benutzt. Zur weiteren Ausbildung von Liposomen wird die Emulsion bzw. Suspension der Einwirkung von Ultraschall bei einer Leistung von 100 - 200 W und einer Betriebsfrequenz von 35 kHz während 15 Minuten ausgesetzt. Die äußere wäßrige Phase der Allergen- bzw. Arzneimittellösung wird durch bekannte Methoden der Molekularfiltration bzw. -zentrifugation bei Spülen der Liposomenfraktion mit isotoner physiologischer Lösung entfernt und

gegebenenfalls erneut verwendet. Dem Suspensionsmittel der Liposome wird eine Mischung aus wasserlöslichen Organextrakten aus Nebenniere, foetalem Thymus und foetaler Plazenta vom Rind in einer Endkonzentration von ng/ml Lösungsmittel zugesetzt. Die Applikation des Präparates kann in Form eines Aerosols durch Inhalation oder oral erfolgen.

Beispiel 7

Frischmilch wird von Eiweiß und Sacchariden durch bekannte Methoden (Elektrophorese, Dialyse, Flüssigkeitschromatographische Verfahren, Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Ausfällen mit Trichloressigsäure oder Abrahmen) befreit und die wäßrige Lösung durch eine Arzneilösung, in welcher die Fettbestandteile resuspendiert oder -emulgiert werden, ersetzt. Durch Homogenisieren oder Ultraschalleinwirkung werden aus den Fettmikronen Liposome hergestellt, in denen die Arzneilösung inkorporiert ist. Durch Filtration bei Überströmtechnik wird das Suspensionsmittel gegen eine andere Art von wäßriger Arzneimittellösung ausgetauscht, zum Beispiel durch die Lösung einer nicht resorbierbaren bakteriostatisch oder bakteriozid wirkenden Substanz.

Beispiel 8

Es werden Frischmilch oder -sahne eine Arzneimittellösung, z. B. von Insulin, von Wachstumshormonen, von Somatotropin, von Cortison, von einem Herzglykosid oder von irgendeinem anderen Arzneimittel in geeigneter Menge und Konzentration zugesetzt, bevor Liposome durch Homogenisieren hergestellt werden. Die wäßrige Lösung der äußeren Phase kann durch

physiologische Lösungen verdünnt oder aber zu erneuter Verwendung wie in Beispiel 2 gegen eine andersartige Arzneimittellösung bzw. physiologische Lösung ausgetauscht werden. Nach Inkorporierung in Liposome können die Arzneimittelzusätze auch durch Gegenstoffe inaktiviert sowie ausgefällt oder beseitigt werden.

Beispiel 9

Die in DP 3413541 3 angeführten Beispiele 1-5 dienen bei Anwendung von mehr als 10fach höheren Konzentrationen und Dosierungen der zugesetzten Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln.

Europäische Patentanmeldung**Träger- und Begleitstoffe für biologische Wirk- und Regulationsfaktoren aus Zellen und Geweben und deren Anwendung.**

EP Nr : 84105554 4
vom 16 05 1984

Priorität: 09 05 84 DE 3417022

Zusammenfassung

Die Effektivität der Anwendung von pflanzlichen und tierischen Wirkstoffen - insbesondere Hormonen, Regulationsfaktoren, Überträgerstoffen, Enzymen, ebenso von Vitaminen und Spurenelementen - wird verbessert, indem diese an Polypeptide, Peptide und bzw oder Nukleotide als Träger- und Begleitstoffe gebunden werden, die man aus mikrobiellen, pflanzlichen und bzw oder tierischen Makromolekülen durch chemische Hydrolyse oder enzymatischen Abbau gewinnt. Die Alkalisierung der beladenen Träger- und Begleitstoffe - unter Mitverwendung von Spurenelementen und möglicherweise von oberflächenaktiven Substanzen - wirkt Umweltsehädigungen der Flora entgegen. Dabei können auch energieübertragende Systeme mitverwendet werden. Das "Waldsterben" infolge Adaptationsschwierigkeiten an Umweltsveränderungen ist ein bevorzugtes Anwendungsgebiet, ebenso aber auch die Verbesserung der Ausnutzung und Verwertung von Futtermitteln und der Resistenz gegen Infektionen und Stress in der Aufzucht von Nutztieren und die Prophylaxe und Therapie von Schäden durch ionisierende Strahlen und zytotoxische Substanzen. Die Wirksamkeit von Arzneimitteln der Human- und Veterinärmedizin wird verbessert und protrahiert. In der Bakteriologie werden die Präparate

zur Stimulierung des Wachstums von Mikroorganismen und in der Gewebezüchtung zur Verbesserung des Angehens von Zellkulturen sowie zur Erhaltung der Spezifität und der Zellteilungskapazität den Nährmedien zugesetzt.

Patentansprüche

1 Träger- und Begleitstoffe für biologische Regulationsfaktoren und Pharmaka, dadurch gekennzeichnet, daß hoch- und makromolekulare Bestandteile aus biologischen Zellen (Mikroorganismen und bzw oder tierischen oder pflanzlichen Geweben) sowie Blut, insbesondere nicht lösliche Rückstände aus Extrakten durch chemische und bzw oder enzymatische Spaltung und Beseitigung von Lipiden, Zellulose und Polysacchariden in Polypeptide, Peptide und Nukleotide mit einem Molekulargewicht von 500 bis 50 000 Dalton fragmentiert und diese einzeln nach Stoffgruppen oder als Mischung, je nach Indikation, mit biologischen Wirkstoffen, insbesondere Regulationsfaktoren aus Zellen und Geweben, wie auch anderen Pharmaka, einzeln oder in Kombination konjugiert und das pH durch Puffersubstanzen oder alkalisierenden Salzen auf 7,1 bis 7,8 eingestellt werden.

2 Verwendung von Polypeptiden und Peptiden nach Anspruch 1, dadurch gekenn-

zeichnet, daß diese folgende Aminosäuren enthalten: Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Thyrosin, Tryptophan, Ornithin, Lysin, Cystein, Cystin, Methionin

3 Bevorzugte biologische Wirk- und Regulationsfaktoren sowie Pharmaka zur Konjugation an die Träger- und Begleitstoffe, gekennzeichnet durch die Verwendung von Organ- und Pflanzenextrakten, pflanzlichen und tierischen Hormonen, insbesondere Wachstums-, Stoffwechsel- und Gewebehormonen, Antihormonen, Überträgerstoffen, z B Neurotransmitter, Biological Response Modifiers, Abwehrstimulatoren, Paramunitätsinducern, Redox- und Energieüberträgersystemen, z B NAD, NADP und ATP, Enzymen, Antienzymen, Vitaminen, Chemotherapeutika einschließlich zytostatischen und zytotoxischen Substanzen, oberflächenaktiven Substanzen, Puffersubstanzen und gegebenenfalls Bikarbonate, -Phosphate oder -Zitrate von Natrium, Kalium, Magnesium, Mangan, Aluminium, Spurenelemente u a

4 Verwendung der Präparationen nach Anspruch 1 - 3 gegen Umweltschäden von Bäumen und Pflanzen in Form von Trockenpulvern oder wäßrigen Lösungen

5 Verwendung der Präparationen zur Verbesserung der Futtermittelverwertung und der Gewichtszunahme von Nutztieren

6 Verwendung der Präparationen zur Prophylaxe und Therapie von Schäden durch ionisierende Strahlen und zytotoxische Substanzen

7 Verwendung der Präparationen im Nährmedium von Bakterien-, Zell- und Gewebekulturen

Beschreibung

Aufgrund des Vorurteils, daß Begleitstoffe

sich nachteilig auswirken könnten, besteht in der Pharmakologie die Tendenz zur Monotherapie mit isolierten Wirkfaktoren. Die experimentelle Empirie zeigt jedoch eine höhere Effektivität von natürlichen multifaktoriellen Wirkstoffgemischen als von isolierten Einzelfaktoren (vgl K E Theurer: Pharmakologie: Eingliederung der Therapie mit makromolekularen Organextrakten in die moderne Pharmakologie: Der Kassenarzt 21, 12 (1981)) Unveränderte Naturstoffe müssen dabei vom Empfängerorganismus zum großen Teil in Untereinheiten und -Bestandteile zerlegt werden, bevor sie zur Wirkung gelangen. Nicht unmittelbar wirksame Bestandteile werden verstoffwechselt und weiter abgebaut. Sie dienen z T auch als Reparaturmaterial für defekte Strukturen, wie auch als Transportvehikel und Depotstoffe.

Durch vorliegendes Verfahren werden die biologischen Träger- und Begleitstoffe in eine direkt wirksame Form vor ihrer Anwendung zusammengefügt. Es handelt sich dabei um künstliche Abbauprodukte von Eiweiß und Nukleinsäuren aus biologischen Zellen und Geweben, insbesondere aus nicht löslichen, korpuskulären und Struktur-Bestandteilen, aus apathogenen Mikroorganismen und bzw oder tierischen und bzw oder pflanzlichen Geweben. Als Ausgangsmaterial kann der nicht wasserlösliche Rückstand von einer primären Aufschließung und Extraktion der Naturstoffe dienen. Rückstände aus der Zentrifugation oder Filtration werden üblicherweise verworfen. Die erfindungsgemäße Weiterverwendung bedeutet deshalb auch einen wirtschaftlichen Nutzen, jedoch können auch direkt native Zellen und Gewebe verwendet werden. Isolierung und Abbau von hochmolekularem, nicht lös-

lichem Eiweiß und Nucleinsäuren entsprechen dem Stand der Technik (vgl. Biochem Taschenbuch: H M Hauen; Springer Verlag) Isolierung und Abbau erfolgen in verschiedenen Stufen, gegebenenfalls nach Fettextraktion durch nicht denaturierende Fettlösungsmittel, chemische Hydrolyse, wie auch enzymatisch bis zu Polypeptiden, Peptiden und Nucleotiden mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 50 000 Dalton Kleinere Bruchstücke können mitverwendet oder aber durch Dialyse, Gelfiltration oder chromatographische Verfahren ohne Erhitzung separiert werden Zunächst werden die Polysaccharide, dann die Eiweiße und schließlich die Nucleinsäuren zur gewünschten Größenordnung abgebaut Zum enzymatischen Abbau werden trägergebundene Enzyme (Proteasen, z B Pepsin, Papain, Bromelin u a ; Restriktionsenzyme, DNasen, RNasen) bei ihrem jeweiligen pH-Wirkstoffoptimum verwendet und nach getaner Wirkung durch Zentrifugation oder Filtration für eine erneute Verwendung zurückgewonnen Beim stufenweisen Abbau muß jeweils das optimale pH für die verwendeten Enzyme durch Pufferzusätze eingestellt werden Als Trägersubstanz für Enzyme eignen sich Kolloide und Partikel aus Zellulose (Sephadex), Kolloidum und anderen Kunststoffen Die Peptidmischung sollte die Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Gystein, Cystin, Glutaminsäure, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin und Tryptophan enthalten Nach der Fragmentierung können Peptide und Nucleotide getrennt voneinander oder aber auch gemischt als Träger- und Begleitstoffe verwendet werden Der amphotere Charakter der Peptide und Nucleotide erlaubt kovalente, wie auch adsorptive Bindungen mit den zu konjugierenden biologischen Wirkstoffen, jedoch sind auch besondere che-

mische Konjugationsverfahren, wie sie insbesondere zur Gewinnung von konjugierten Antigenen verwendet werden (vgl. H Schmidt: Fortschritte der Serologie, Verlag Dietrich Steinkopff) möglich

Die Träger- und Begleitstoffe können für alle Arten von Arzneimitteln, insbesondere für biologische Arzneimittel, Pflanzen- und Organextrakte, Hormone, Überträgerstoffe, Biological Response Modifiers, Redox- und Energie-übertragende Systeme und bzw oder Enzyme verwendet werden

Zur Beeinflussung der Flora, von Bäumen und Pflanzen, werden Pflanzenhormone bzw Wuchsstoffe (Auxine), die auch synthetisch gewonnen sein können, einzeln oder in Kombination verwendet Phytokine werden besonders in Verbindung mit Nucleotiden eingesetzt Die Indolelessigsäure-Derivate, Gibberelline und Abscisinsäure werden bevorzugt mit Peptiden konjugiert Es kann jedoch auch eine Kombination mit Peptiden und sogenannten Gewebeshormonen, wie auch aller anderen menschlichen und tierischen Hormone verwendet werden Durch die Konjugation wird die direkte Verfügbarkeit der Hormone bei der Anwendung verringert und die Ansprechbarkeit erhöht Dabei kommt eine protrahierte Depotwirkung zustande Für die Konjugation mit Träger- und Begleitstoffen eignen sich auch Wirkfaktoren aus Zellen und Geweben, die in einem speziellen vorausgehenden Extraktionsvorgang gewonnen werden, wie z B von sogenannten "Biological Response Modifiers", Abwehrstimulatoren, Paramunitätsinducern, Überträgerstoffen, z B Neurotransmitter, Endorphinen, Encephalinen, Interferone, Prostaglandine und anderer Regulationsfaktoren sowie Redox- und Ener-

Erfindungsgemäß war die Verwendung von Träger- bzw. Begleitstoffen für biologische Wirkfaktoren, in Verbindung mit pH-Einstellung und Mitverwendung oberflächenaktiver Substanzen, bisher unbekannt. In der deutschen Patentschrift 2249697 vom 11.10.1972 werden als Bestandteil sonst üblicher Futtermittel Stoffe verwendet, die bei einem Verfahren zur gesteuerten chemischen Aufschließung von Organen für therapeutische Zwecke, unter Verwendung von Dämpfen chemischer Reagenzien, erhalten worden sind. Dieses Verfahren kann auch zur Gewinnung der beanspruchten Träger- und Begleitstoffe, wie auch zur Gewinnung der biologischen Wirkstoffe verwendet werden. Die Trägerstoffe werden durch weitere Verarbeitung der Rückstände nach Extraktion gewonnen. Dies bedeutet eine verbesserte Ausnützung der Ausgangssubstanzen und birgt nicht zuletzt auch ökonomische Vorteile in sich. Der grundsätzliche Unterschied besteht aber darin, daß bei vorliegendem Verfahren Träger- und Begleitsubstanzen separat gewonnen und dann sekundär mit Wirkfaktoren konjugiert werden.

Die DPA 2110683 vom 5.3.1981 ist ein Anwendungsverfahren zur Resistenzsteigerung, Beschleunigung des Wachstums, Verkürzung der Reifungszeit, Ertragssteigerung, Erleichterung von Mutationen und Kreuzungsbereitschaft sowie Kräftigung von Teilen der Flora und Aktivierung von Nutz- und Heilpflanzen-Säften. Auch dort werden keine entsprechenden Träger- bzw. Begleitsubstanzen für Wirkstoffe verwendet. Saatgut oder Pflanzenteile werden mit Extrakten aus gesunden und bzw. oder Mikroorganismen und bzw. oder aus Pflanzen behandelt. Die verwendeten Extrakte werden nach bekannten Verfahren aus den genannten biologischen

Geweben hergestellt, desgleichen auch Fraktionen, die man aus den Extrakten gewinnt, insbesondere Lipide, Polysaccharide, Proteide, Proteine und die verschiedenen Nucleinsäuren. Demnach bestehen die Extrakte nicht aus Polypeptiden, Nucleotiden, die als Träger- bzw. Begleitstoffe verwendet werden können. Es wäre dazu auch ein zweiter Arbeitsgang der Konjugation erforderlich. Auch wird keine Abpufferung beansprucht. Die Konjugation von zusätzlichen Wirkstoffen erfolgt an hochmolekulare Stoffe, die bei vorliegendem Verfahren nicht zur Anwendung kommen. Auch hier bedeutet das Verfahren einen ökonomischen Vorteil, weil die Ausgangsstoffe besser genutzt und die Bestandteile und Untereinheiten von Makromolekülen biologisch unmittelbar verwertet werden, was zu einer besseren Effektivität führt.

Beispiel 1

Zur Vorbeugung und Behandlung von Schäden an Bäumen und Pflanzen durch Milieu- und Umwelteinflüsse (Waldsterben) werden als Träger- und Begleitstoffe Polypeptide und Nucleotide verwendet, für die als Ausgangsmaterial Pflanzen und/oder tierische Gewebe bzw. Blut dienen. Die Aufschließung von Zellen bzw. Degradierung von Makromolekülen erfolgt nach bekannten schonenden biochemischen Methoden (vgl. Biochemisches Taschenbuch: U. M. Rauen: Springer Verlag), bei denen die Spezifität der Untereinheiten und Bestandteile erhalten bleibt. Die Gewebe werden möglichst in tiefgekühltem Zustand gemahlen oder auch frisch bei Temperaturen unter 56° C in nahezu isotoner physiologischer Lösung homogenisiert, wobei das Mischungsver-

hältnis von Ausgangsmaterial und Lösungsmittel festgelegt ist. Zur Entfernung von Lipiden kann diese Homogenisierung auch in Fettlösungsmitteln, z. B. Petroläther erfolgen, aus dem nach Dekantierung die Lipidfraktion gewonnen wird, während die Rückstände in wässrige Lösungsmittel zur Weiterbehandlung aufgenommen werden. Die gesamte Aufarbeitung von pflanzlichen und tierischen Ausgangsstoffen kann getrennt oder aber auch bei Mischungen erfolgen. Die löslichen Faktoren des Homogenats werden zur weiteren Aufarbeitung auf Wirkfaktoren durch Zentrifugieren und bzw. oder Filtrieren entfernt und der Rückstand mit Säure bzw. Alkalilösungen aufgeschlossen. Nach erfolgter Säure-Hydrolyse, insbesondere von Polysacchariden und Zellulose, wie auch von Proteiden und Proteinen, werden Enzyme eingesetzt. Bei stark saurem pH wird zunächst Pepsin zum Abbau von Proteinen verwendet, bei Alkalisierung Trypsin. Es können jedoch auch andere proteolytische Enzyme eingesetzt werden, wobei das pH-Optimum für die Enzymwirkung durch Alkalisierung bzw. Ansäuerung eingestellt wird. Zusätzlich können Harnstoff und bzw. oder oberflächenaktive Substanzen, insbesondere Natriumlaurylsulfat, mitverwendet werden. Danach wird erneut zentrifugiert bzw. filtriert und die Polypeptid- bzw. Peptidfraktion gewonnen. Der Rückstand wird mit RNasen bzw. DNasen oder Restriktionsenzymen zu Polynukleotiden und Nukleotiden abgebaut. Auch hier können bei optimalem pH oberflächenaktive Substanzen oder Harnstoff mitverwendet werden. Zum enzymatischen Abbau werden die Enzyme an kolloidale oder korpuskulare Trägerstoffe, z. B. aus Zellulose (Sephadex), Kollodium oder andere geeignete Kunststoffe gebunden, die es erlauben, die En-

zyme durch Zentrifugation rückzugewinnen und erneut wieder zu verwenden. Auch können für die enzymatische Auftrennung chromatographische Verfahren verwendet werden, die eine Wiederbenützung der Enzyme ermöglichen. Die erhaltenen Polypeptide und Peptide und andererseits die Nukleotide werden nun getrennt für sich oder als Mischung erfindungsgemäß verwendet oder zur späteren Verwendung in Lösungen oder als Trockenpulver konserviert.

Zur Bekämpfung des Waldsterbens und Stärkung der Widerstandskräfte der Flora durch Substitution von biologischen Faktoren und Pharmaka wird eine Mischung von Abscisinsäure (1 Teil) mit β -Indolessigsäure oder α -Naphthylelessigsäure (1000 Teile), Gibberilinsäure (100 Teile) und Cytokinine (10 Teile) sowie Nicotinamid-adenin-dinucleotid und bzw. oder das entsprechende Phosphat (100 Teile), möglicherweise auch Adenosintri-phosphat (je 10 - 100 Teile) an 10^4 - bis 10^6 -Teile der Nukleotid-Polypeptidmischung gebunden. Aufgrund der amphotären Eigenschaften der Träger- bzw. Begleitstoffe ist eine Salzbildung möglich, sonst können auch bekannte chemische Konjugationsmethoden, wie Diazotierung, das Oxazol-Verfahren in Verbindung über Isozyanate, Carbobenzoxy-Verbindungen und andere verwendet werden. Bei Übersäuerung der Umwelt bzw. der Böden werden zur Neutralisierung den Präparationen geeignete chemische Puffersysteme zugesetzt, die das pH zwischen 7,2 und 7,8 einstellen oder entsprechende Bikarbonate, -Phosphate oder Citrat von Kalium, Natrium oder Aluminium sowie geeignete Spurenelemente von Mn, Mg, Zn, Cu bzw. Eisen zugesetzt. Ebenso können auch oberflächenaktive Substanzen

mitverwendet werden. Die Mischung der Trockenpulver kann direkt zur Einmischung in Torf oder Kompost oder zum Bestreuen des Bodens als Düngermittel verwendet werden. Zum Besprühen des Laubs oder der Nadeln der Pflanzen bzw. Bäume werden Lösungen hergestellt, mit einem Gehalt von mg bis Mg der Mischung in wäßriger Lösung mit pH zwischen 7,1 und 7,8.

Beispiel 2

Zur Anregung des Wachstums und der Gewichtszunahme von Nutztieren werden Polypeptide, Peptide und Nukleotide, die analog dem Beispiel 1 gewonnen wurden, als Trägerstoffe für biologische Wirkstoffe verwendet, die nach DP 2249697 gewonnen werden. Diese dienen als Zusatz zu den sonst üblichen Futtermitteln oder können auch über die Wasseraufnahme zugeführt werden. Das Gewichtsverhältnis von Wirkstoffen und Trägerstoffen beträgt 10^{-3} bis 10^{-4} . Bei einer Dosierung des Fertigproduktes im Mikrogrammbereich pro Gramm Futtermittel bzw. Milliliter Wasser der Präparation können anabole Hormone, Vitamine, Elektrolyte und Spurenelemente sowie auch oberflächenaktive Substanzen zugesetzt werden. Die Verwendung der Trägerstoffe ermöglicht eine Einsparung der zugesetzten biologischen Wirkstoffe und bedeutet eine wesentliche Verbesserung des DP 2249697.

Beispiel 3

Verwendung der Trägersubstanz nach Beispiel 1 zur Prophylaxe und Therapie von Schäden durch ionisierende Strahlen oder zytotoxische Einwirkungen. Hier werden die Träger- bzw. Begleitsubstanzen für zytoplasmatische Organextrakte, insbesondere aus dem maternem Anteil der Plazenta,

Thymus, Leber, Knochenmark - eventuell als Einzelorganextrakte, oder als Kombinationen -, insbesondere wie sie in dem Präparat NeyTumorin vorliegen, verwendet. Das Gewichtsverhältnis der Träger- bzw. Begleitsubstanzen zu den zytoplasmatischen Organextrakten beträgt 10^2 bis 10^3 /g, die Anwendungskonzentration mit der Präparation 10^{-6} bis 10^{-9} g/ml bei i.m. - oder i.v. -Injektionen z.B. nach dem Strahlenschaden 4 Stunden, 8 Stunden, 2 Tage, 6 Tage, 11 Tage und 14 Tage. Die Behandlung wirkt sich auf eine raschere Wiederherstellung der Leukozytenzahl und eine signifikante Steigerung der Überlebensrate aus.

Beispiel 4

Verwendung der Träger- und Begleitsubstanz nach Beispielen 1 bis 3 in der Human- und Veterinärmedizin, in Verbindung mit speziellen organotherapeutischen Wirkstoffen (vgl. Zytoplasmatische Organotherapie nach Theurer) und zytotoxischen bzw. zytostatischen Pharmaka in der Onkologie. Hier beträgt das Mischungsverhältnis der Wirkstoffe zu den Trägerstoffen 1:100 bis 1:10000. Die Verwendung der Trägerstoffe und zytoplasmatischen Organfaktoren verbessert die Verträglichkeit zytotoxischer bzw. zytostatischer Substanzen und erlaubt eine vielfach höhere Dosierung. Die Resistenz gegen Infektionen wird gesteigert und die Lebensqualität erhalten bzw. verbessert.

Beispiel 5

Verwendung der Träger- und Begleitsubstanzen nach Beispielen 1-3, für die Konjugation mit Wirkstoffen aus Organex-

trakten, Vitaminen, Hormonen, Spurenelementen und Elektrolyten als Zusatz zum Nährmedium von Zell- und Gewebekulturen, bei mindestens gleichem Effekt auf die Verbesserung des Angehens der Zellen und Gewebe bei der Anzucht, auf den Synthesestoffwechsel und auf die Stabilisierung gegenüber Entdifferenzierung bzw. der Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit ermöglicht die konjugierte Anwendung der Wirkstoffe mit Trägerstoffen eine Einsparung an Wirkstoffen

Beispiel 6

Verwendung der Träger- und Begleitstoffe nach Beispielen 1, 2 und 5. Es werden dabei jedoch Bakterienwuchsstoffe und Wirkfaktoren aus Bakterienextrakten mit den Trägerstoffen konjugiert. Die Trägerstoffe selbst können aus Massenzüchtungen und Mikroorganismen gewonnen werden. Als Nährmedien für die Gewinnung der Bakterienmassen zur Herstellung der Trägerstoffe können dabei Rückstände der Extraktion von Pflanzen und Tiergewebe bzw. -Zellen dienen. Die konjugierten Träger- und Begleitstoffe werden zur Stimulierung des Wachstums in Bakterienkulturen in Konzentrationen von Mg bis μg zugesetzt.

Europäische Patentanmeldung**Erzeugnisse zur intravasalen Applikation von wasserlöslichen bzw. emulgierbaren antigenen Organextrakten**

EP Nr : 82100130 2
vom 06 01 1982

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Erzeugnisse zur intravasalen Applikation von wasserlöslichen bzw emulgierbaren antigenen Organextrakten aus Einzelorganen oder Organkombinationen mit nativen molekularen und haptenen Bestandteilen bzw Untereinheiten fetalen und/oder juvenilen, xenogenen oder allogenen Ursprungs im Konzentrationsbereich von pg bis g/ml Injektionslösung zur Intervall- oder Dauerbehandlung bei Malignomen, genetisch oder chromosomal bedingten Erkrankungen, zur spezifischen Immunsuppression bei krankheitsbedingten oder durch Vorbehandlung z B durch Zelltherapie entstandene immunopathogene Autosensibilisierungen, zur Erzeugung und Erhaltung einer Toleranz gegen Organtransplantate und die Folgen von Organinfarkten, Verbrennungen und chirurgischen Eingriffen Es werden dabei die Erzeugnisse in verdünnten wäßrigen Lösungen im Konzentrationsbereich pg bis lig/ml Injektionslösung und die entsprechenden Trockensubstanzen mit Lösungsmittel, die zur Herstellung von Injektionslösungen im Konzentrationsbereich von mg bis g/ml Injektionslösung erforderlich sind, hergestellt und die toleranzerzeugenden Eigenschaften, ggfs durch Adjuvantien und chemische Veränderungen der Ausgangsstoffe, verbessert

Patentansprüche

- 1 Pharmazeutische Erzeugnisse zur intravasalen Applikation von wasserlöslichen bzw emulgierbaren antigenen Organextrakten aus Einzelorganen oder Organkombinationen mit nativen molekularen und haptenen Bestandteilen bzw Untereinheiten fetalen und/oder juvenilen, xenogenen oder allogenen Ursprungs im Konzentrationsbereich von mg bis g/ml Injektionslösung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder mehrere verdünnte wäßrige Lösungen dieser Organsubstanzen im Konzentrationsbereich pg bis Mg/ml Injektionslösung und die entsprechenden Trockensubstanzen mit Lösungsmittel, die zur Herstellung von Injektionslösungen im Konzentrationsbereich von mg bis g/ml Injektionslösung erforderlich sind, enthalten
- 2 Erzeugnisse nach Anspruch 1 gekennzeichnet durch die Mitverwendung von immunbiologischen Adjuvantien
- 3 Erzeugnisse nach Anspruch 1-2 mit verbesserter Löslichkeit und verringerter Immunogenität durch Sulfatierung, Phosphorylierung, Halogenisierung, Nitrierung, Carboxylierung, Äthylierung, Hydrierung oder Substitution von aromatischen oder alkylierenden Substanzen
- 4 Erzeugnisse nach Anspruch 1-3, gekennzeichnet durch die zusätzliche Verwendung von Extrakten aus fetalem Thymus, Nebenniere, fetaler Milz, feta-

lem Anteil der Plazenta (Chorion), Trophoblast, fetalen Lymphknoten, einzeln oder als Mischung

Beschreibung

Bei der tierexperimentellen und therapeutischen Anwendung von xenogenen, d h von artverschiedenen Individuen stammenden Totalextrakten aus verschiedenen Organarten wurde festgestellt, daß die therapeutische Wirkung dosis- und zeitabhängig ist. Insbesondere zeigt sich dies bei der Regression von Malignomen und Tumormetastasen. Es sind dazu wiederholte Behandlungen mit Dosierungen im mg- bis g-Bereich erforderlich. Diese Dosierung führt zur immunologischen Sensibilisierung, zu allergischen Reaktionen und zu einer Wirkungseinschränkung, insbesondere bei späteren Wiederholungsbehandlungen. Andererseits hat die Anwendung an Zellkulturen gezeigt, daß die Wirkung dort auch bei Wiederholungsbehandlungen reproduzierbar war und daß diese Wirkung durch Inhibition der Organextrakte mit den entsprechenden Antikörpern verhindert wird. Es war deshalb anzunehmen, daß auch in vivo die Blockierung der therapeutischen Wirkung der Organpräparate auf einer Antikörperbildung gegen dieselbe beruht. Die Erzeugung einer spezifischen Immuntoleranz gegen die therapeutisch wirksamen Organfaktoren war bei den relativ hohen erforderlichen Konzentrationen bisher nicht möglich. Es wurde nun gefunden, daß durch intravasale Applikation von wasserlöslichen und emulgierbaren Organtrockenpulvern in ansteigender Dosierung und sich verlängernden Zeitabständen eine ausreichend stabile Toleranz für die wiederholte Anwendung der therapeutisch erforderlichen

höheren Konzentration im mg- bis g-Bereich pro ml Lösungsmittel erreicht wurden. Solche Lösungen sind jedoch nicht haltbar und fallen rasch aus, so daß sie unmittelbar vor der Anwendung aus volllöslichen bzw emulgierbaren Organtrockenpulvern hergestellt werden müssen. Erfindungsgemäß werden nun pharmazeutische Erzeugnisse bereitgestellt, die eine oder mehrere verdünnte wäßrige Lösungen dieser Organsubstanzen im Konzentrationsbereich pg bis wg/ml Injektionslösung und die entsprechenden Trokensubstanzen mit Lösungsmittel, die zur Herstellung von Injektionslösungen im Konzentrationsbereich von mg bis g/ml Injektionslösung, enthalten.

Die immunologische Toleranz bedeutet im Gegensatz zum Begriff der Arzneimitteltoleranz (vgl A Schrey: Toleranz bei Nitratpräparaten: Med Klinik, A 25 S 24/699 (1981)) nicht eine Verringerung der pharmakologischen Wirksamkeit der angewandten Präparate, vielmehr wird gerade diese durch die immunologische Toleranz gegen das Arzneimittel erhalten. Es erscheint möglich, daß an der Entstehung von Arzneimittel-Toleranz im pharmakologischen Sinne ebenfalls immunologische Reaktionen gegen das Arzneimittel beteiligt sind. Diese werden durch Erzeugung einer immunologischen Toleranz, d h durch Unterdrückung der Antikörperbildung gegen das Arzneimittel verhindert. Die Toleranzerzeugung gegen xenogene Antikörperseren, wie sie aus der Serumtherapie von Infektionskrankheiten bekannt ist, betrifft vollkommen andere Indikationen und keine Inhaltsstoffe von Zellgeweben. Im Prinzip sollen dadurch allergisch-anaphylaktische Reaktionen verhindert werden. Sie dient also nicht der Erhaltung der therapeutischen Wirksam-

keil der angewandten Antikörperseren (vgl. W. Gronemeyer, H. Schmidt in K. Hansen: Lehrbuch der Allergie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1957)

Auch die Desensibilisierung mit sogenannten Organ-Dilutionen im Rahmen der Zytoplasmatischen Therapie (vgl. Leitfaden der Zytoplasmatischen Therapie: vitOrgan Arzneimittel GmbH, 7302 Ostfildern 1 b Stuttgart) besitzt unterschiedliche Indikationen und Anwendungsformen. Es handelt sich dabei um keine echten Lösungen und Emulsionen der Organsubstanzen, vielmehr enthalten diese noch korpuskuläre Bestandteile. Deshalb können die Konzentrationen im ng- und µg-Bereich nicht *i.v.* angewandt werden. Desgleichen auch nicht die Suspensionen aus den Trockensubstanzen. Suspensionen von diesen können nur intramuskulär appliziert werden. Die mitverwendeten korpuskulären Zellbestandteile wirken als Adjuvans der gelösten Faktoren immunogen und verhindern eine Toleranzerzeugung gegen das Präparat.

Auch werden zusätzlich immunologische Adjuvantien zur Verstärkung der Antikörperbildung mitverwendet, um besonders bei degenerativen Erkrankungen und geriatrischen Indikationen einen organspezifischen Reiz durch die entstehenden Antikörper zu erzeugen. Bei der erfindungsgemäßen Anwendung der volllöslichen und emulgierbaren Organtrockenpulver wird jedoch diese Antikörperbildung vermieden. Deshalb unterscheiden sich auch die Indikationen. Der Zustand der induzierten immunologischen Toleranz bleibt so lange erhalten, als das Antigen in ausreichender Konzentration im Organismus vorhanden ist. Deshalb muß zur Erzeugung einer stabilen immunologischen Toleranz und deren Aufrechterhaltung das Antigen in mg- bis g-Konzentrationen fortlaufend injiziert

werden. Bei Kombinationsbehandlungen mit Antigenmischungen aus verschiedenen Organen müssen deshalb die Organfaktoren gegen die die Toleranz erwünscht ist, fortlaufend verabfolgt werden, während man andere Faktoren, gegen die eine Toleranz nicht mehr benötigt wird, nicht weiter anzuwenden braucht. Nach Aussetzen der tolerogenen Applikation von mehr als 5 Tagen ist mit einem Toleranzverfall zu rechnen. Eine Wiederholungsbehandlung macht es deshalb notwendig, erneut die Toleranz durch einschleichende Dosierungen wieder aufzubauen. Zur Prüfung der Toleranz bzw. einer möglichen Sensibilisierung gegen die verwendeten Präparate können diese als Antigen für Antigen-Antikörper-Reaktionen *in vivo* oder *in vitro* benutzt werden. Bei vorliegender Sensibilisierung muß die Behandlung mit umso höheren Verdünnungen wieder begonnen werden, je ausgeprägter die Sensibilisierung ist. Umso kürzer müssen dann auch die Applikationsabstände gewählt werden. Normalerweise wird die Konzentration über µg, ng, µg auf mg und eventuell g/ml Organlösung gesteigert, nachdem man vor der *i.v.*-Applikation einen Sensibilitäts-test durch konjunktivale Anwendung oder *i.e.*-Injektion durchführt. Bei positivem Testergebnis sollte eine Desensibilisierung bei *i.e.*-, *s.c.*- oder oraler Applikation nach den Gesichtspunkten der Allergologie durchgeführt werden. Bei reaktionsfreier Verträglichkeit der Konzentration lag kann dann die Applikation der ansteigenden Konzentrationen, beginnend von µg, *i.v.* erfolgen. Es ist möglich, Faktoren gegen die eine Antikörperbildung unterbunden werden soll, zunächst tolerogen zu dosieren und nach eingetretener Toleranz dann andersartige Faktoren

die indirekt über Antikörper zur Wirkung gelangen, wie z B Faktoren, die durch das Verfahren zur Isolierung von wirksamen Faktoren aus biologischen Geweben (EPA 29893) gewonnen wurden, immunogen zu dosieren Dabei bleibt dann die vorher induzierte Toleranz gegen die zuerst angewandten andersartigen Faktoren erhalten, so daß sich die Antikörperbildung ausschließlich gegen die immunogen dosierten Faktoren richtet

Die Zelltherapie nach Niehans unterscheidet sich von vorliegender Anwendung durch die Verwendung von Zellsuspensionen, während hier voll lösliche und emulgierbare Organpräparate verwendet werden Zellpräparate können nicht i v appliziert werden

Die wiederholte Injektionsimplantation größerer Mengen kann zur pathogenen Allergisierung oder aber zur Immunparalyse führen Letztere bedeutet eine Blockierung des Immunsystems, so daß auch erwünschte Antikörper ausbleiben Wiederholungsbehandlungen sind erst nach Monaten möglich, wenn sich die Sensibilisierung spontan verloren hat

Die voll wasserlöslichen Organtrockenpulver enthalten kristallisierte Proteide, Proteine, Nukleinsäuren (Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren), Peptide, Enzyme, Polysaccharide und Lipide, sowie deren Untereinheiten und Bestandteile Es hat sich gezeigt, daß Mischungen von nativen Makromolekülen mit ihren Untereinheiten die Erzeugung von Toleranz gegen die angewandten Präparate erleichtern Ebenso wirken sich chemische Veränderungen wie z B schonende Hydrolyse und Sulfatierung, Phosphorylierung, Halogenisierung Nitrierung, Carboxylierung, Äthylierung, Alkylsubstitution, aromatische Substitution

Alkylierung, Arylierung, günstig aus und verbessern die Wirksamkeit gegenüber nativen wäßrigen Frischhomogenaten oder -lyophilisaten um bis zu 60% Die Wasserstoffionenkonzentration und die Temperatur während der Aufarbeitung sind für die Wirksamkeit des Endproduktes ebenfalls entscheidend (vgl EP-A-29893) Wie erwähnt können auch isolierte Teilfaktoren aus einer Organart, wie auch Organkombinationen angewandt werden Es ist auch möglich, das Molekulargewicht durch Filtration einzustellen und die Präparate z B nach dem Eiweißgehalt oder anderen Wirkfaktoren zu standardisieren Optimale Wirkungen wurden mit voll wasserlöslichen Organtrockenpulvern erzielt, die durch Lyophilisaten eingestellter Lösungen erhalten wurden, die durch hochoberflächige Zentrifugation und Filtration aus Suspensionen von sulfatierten Trockenpulvern (EP-A-29893) gewonnen werden In analoger Weise können aber auch Suspensionen von lyophilisierten Trockenpulvern wie auch Frischhomogenate aus Organgeweben aufgearbeitet werden Das Verhältnis von Proteinen bzw Proteiden zu Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden untereinander kann festgelegt werden Durch Mitverwendung von Emulgatoren bzw Detergentien, z B Natriumdodecylsulfat in höheren Verdünnungen, die nicht denaturieren, werden Lipide emulgierbar Auch ist eine partielle Extraktion der Organvolleextrakte durch Lipidlösungsmittel wie auch ein enzymatischer Abbau unerwünschter Faktoren möglich Prinzipiell sind alle intravasalen Applikationsformen zur Anwendung geeignet Grundvoraussetzung ist die Induktion und Erhaltung von immunologischer Toleranz über eine sogenannte Low-Zone-Toleranz (vgl J H Humphrey und R White:

Kurzes Lehrbuch der Immunologie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart), die jedoch bis zu höheren Konzentrationen im mg- bis g-Bereich erweitert wird. Die alleinige Low-Zone-Toleranz wird sonst aufgrund von Verdünnungen von pg bis µg durch die therapeutisch erforderlichen Konzentrationen der Organextrakte durchbrochen. Ebenso wichtig sind auch die sich verlängernden Applikationsabstände von Stunden bis höchstens 3-5 Tagen bei gleichzeitig ansteigender Dosierung und die i.v.-Injektion bzw. -Infusion. Dieses Vorgehen besitzt gegenüber der Erzeugung von High-Zone-Toleranz den Vorteil, daß die erwünschten Reaktionen des Immunsystems gegen andere Antigene, z.B. Tumor- oder Infektions-spezifische Antigene nicht beeinträchtigt werden, also keine allgemeine Immunparalyse eintritt. Trotzdem erfolgt durch ansteigende Dosierung auf Konzentrationen von mg bis g/ml Lösungsmittel eine Erweiterung der Toleranz auf phylogenetisch verwandte Antigene. Es entsteht dabei eine Art Überkreuz-Toleranz bezüglich der xenogenen Antigene und allogener bzw. individueller Antigenqualitäten wie sie in den körpereigenen, entsprechenden Organarten vorkommen. Dies eröffnet weitere wichtige Indikationsgebiete dieser immunologisch tolerogenen Anwendung von voll wasserlöslichen bzw. emulgierbaren Organtrockenpulvern aus unterschiedlichen Organarten, einzeln und in Mischungen.

Die Indikationen der beanspruchten Erzeugnisse sind krankheitsbedingte oder durch Vorbehandlung mit Zelltherapie entstandene immunopathogene Autosensibilisierungen und Autoaggressionen. Es erfolgt dort eine Desensibilisierung und Toleranzerzeugung mit analogen Organarten, gegen die eine Antikörperbildung besteht.

Die wiederholte systemische Applikation größerer Organmengen im mg-Bereich führt gegenüber der bisher nur einmaligen Anwendung der höheren Konzentrationen zur Verbesserung der therapeutischen Wirkung und zur Ausheilung. Genetisch oder chromosomal bedingte Erkrankungen bedürfen einer ständigen Substitution von Faktoren aus Stoffwechselfunktionellen Zellen und Geweben in einer Dosierung, die sonst die Gefahr einer Antikörperbildung gegen die wirksamen Faktoren einschließt. Bei der Zelltherapie nach Niehans sind deshalb Wiederholungsbehandlungen beim Down-Syndrom nur in Abständen von frühestens 1/2 Jahr bis 1 Jahr möglich. Die immunologisch tolerogene Anwendung erlaubt nun eine Dauerbehandlung.

Bei Organtransplantaten kann durch vorherige Erzeugung und fortlaufende Unterhaltung einer stabilen Überkreuz-Toleranz gegen allogene und individuelle Organantigene, die bisher bestehende Immunbarriere durchbrochen werden. Die Aufrechterhaltung der gegen xenogene und allogene Organfaktoren induzierten Toleranz macht die Organtransplantation zeitlich unabhängig. Es muß aber mindestens 5 Tage vor der Organverpflanzung eine intensive Vorbehandlung in Form der Schnellerzeugung von Toleranz durch sehr kurze Applikationsintervalle der Anstieg zur Volldosierung durchgeführt werden. Bei längerem Abstand bis zur Organtransplantation muß die Toleranz durch weiter ansteigende Dosierung verstärkt und aufrechterhalten werden. Ebenso auch nach erfolgter Organtransplantation. Die erreichte Organtoleranz kann durch Verwendung der applizierten Organpräparate oder von Blut- bzw. Gewebezellen des Spenders als Antigen vor und

nach der Organtransplantation durch Antigen-Antikörper-Reaktion überprüft werden

Bei Organinfarkten, z B vom Herzmuskel und parenchymatösen Organen sowie Apoplexien bieten sich ebenfalls vollkommen neue Möglichkeiten durch die präventive, möglichst frühzeitige Toleranzerzeugung in der Zeit bis zum nekrotischen Zerfall des infarzierten Gewebes. Die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe, die zur Autosensibilisierung führt, erfolgt erst nach einigen Tagen. Die entstehenden Autoantikörper werden für Komplikationen des Heilungsverlaufs und für das Auftreten von Reinfarkten verantwortlich gemacht. Die möglichst frühzeitige Induktion von Überkreuz-Toleranz verhindert die Entstehung von Autoantikörpern und damit diese Komplikationen. Die tolerogene Behandlung muß deshalb gleich nach dem Infarktereignis einsetzen und bis zur Abheilung durchgeführt werden. Einer Kombinationsbehandlung mit anderen intensiv-therapeutischen Methoden steht nichts im Wege. Zur Prävention von Operationsfolgen, die ebenfalls auf der Basis einer Autosensibilisierung beruhen, kann ähnlich wie bei der Organtransplantation mit Präparaten analog denen, die bei dem chirurgischen Eingriff geschädigt werden, mindestens 5 Tage vor Operation eine Überkreuz-Toleranz erzeugt werden.

Bei Verbrennungen steht kein längeres Intervall bis zur Bildung von Autoantikörpern zur Verfügung. Trotzdem kann auch hier gleich eine entsprechende Behandlung mit Präparaten analog den verbrannten Geweben stattfinden. Bei Verbrennungen wie auch bei Operationsfolgen geht es aber auch darum, die Intensität der Sensibilisierungsvorgänge durch Organpräparate, insbesondere aus foetalem

Thymus, foetaler Milz, foetalem Anteil der Plazenta, Nebenniere und Lymphknoten in Form von Einzel- oder Kombinationspräparaten zu verringern. Die tolerogene Dosierung ist hier auf die eingesetzten Präparate bezogen und nicht auf die eigentlich geschädigten Organe. Diese allgemeine biologische Immunsuppression kommt bei allen Erkrankungen in Betracht, die auf Autoantikörperbildung beruhen, insbesondere auch bei Erkrankungen der Gelenke und des Zentralnervensystems. Sie kann als Kombinationsbehandlung zusammen mit der gezielten Toleranzerzeugung gegen bestimmte Organe oder Organkombinationen durchgeführt werden.

Es erscheint möglich, daß es im Gegensatz zu Adjuvantien die die Immunogenität verstärken, auch solche gibt, die die Toleranzbildung verstärken können. Zu denken ist dabei an Nukleotide oder Nukleoside oder permeabilitätsverändernde Stoffe wie z B Dinatriumehromoglycat. Solche toleranzbegünstigende Adjuvantien können bei den angegebenen Indikationen zusätzlich mitverwendet werden. Für die Behandlung für Krebskrankheiten erscheint jedoch eine allgemeine Immunsuppression oder die zusätzliche Anwendung solcher toleranzbegünstigender Medikamente nicht geeignet, weil dadurch die phylakogene Immunabwehr beeinträchtigt werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die praktische Anwendung

Beispiel 1

Die Behandlung von malignen Tumoren (z B des Mammakarzinoms mit Knochenmetastasen) erfolgt mit Einzel- oder Kombinationspräparaten aus maternem Anteil der Plazenta, jungem Thymus, Leber,

Milz, Pankreas, Gehirnteilen, Nabelstrang oder Epiphyse zusammen mit dem Organ des Primärtumors oder dem Sitz der Metastasen, in diesem Falle Brustdrüse und Knochenmark, zusammen mit jugendlichem Testes ohne Spermatogenese wegen der Hormonabhängigkeit des Tumors oder mit Mischungen aus mindestens 2 der eingangs genannten Komponenten zu gleichen Teilen bei immunologisch tolerogener Dosierung der wäßrigen Lösungen in Verdünnungen pg, ng, ng und mg aus den voll wasserlöslichen und emulgierbaren Organ-trockensubstanzen bzw -pulvern Durch langsame i v -Injektion oder Tropfinfusion mit üblichen Infusionslösungen, denen die Präparate zugesetzt sind, werden am 1 Tag der Behandlung 4 - 6 ml, am 2 Tag 6 ml der Verdünnung pg, am 3 und 4 Tag je 6 ml der Konzentration ng, am 5 Tag 6 ml der Konzentration Mg und am 8 Tag 2 ml, am 11, 15 und 19 Tag je 4 ml und danach 2 mal wöchentlich (Montag und Donnerstag) je 2 ml der Konzentration mg/ml, ansteigend bis zu einer Gesamtmenge pro Applikation von 1 g appliziert Bei stationärer Behandlung kann die Anwendung intensiviert werden Am 1 Tag 10 - 20 ml der Konzentration pg verteilt auf 2 - 3 Gaben, am 2 Tag 10 - 20 ml der Konzentration ng, verteilt auf 2 Gaben und am 3 Tag 10 - 20 ml der Konzentration pg, sodann am 4 Tag 2-4 ml, am 7 Tag 4 - 10 ml, am 9 Tag 10 - 20 ml der Konzentration mg/ml Danach dann 2mal wöchentlich (Montag, Donnerstag) je 2 - 6 ml der Konzentration mg, gegebenenfalls ansteigend auf eine tägliche Gesamtmenge von 1 g Zusätzlich werden Präparate der gleichen Organzusammensetzung in Konzentration mg/ml in Kapseln oder in Liposomen, Suspensionen, oral 3mal täglich 8-10 Tropfen verabreicht

Die Behandlung kann als Intervallbehandlung bis zum Verschwinden der Symptome oder als 3-Wochen-Kur durchgeführt werden Eine Wiederholung ist bei erneuter Verschlechterung des Krankheitszustandes jederzeit möglich, sonst aber in sich verlängernden Abständen von 2, 3, 4 und 6 Monaten Zur Tumorprävention bei Risikopatienten werden Wiederholungskuren in Abständen von 1/2 bis 1 Jahr durchgeführt

Vor der ersten i v -Applikation empfiehlt es sich auch bei Wiederholungsbehandlungen eine Vortestung der Reaktionslage durch i c -/s c -Injektionen von 2 ml der Konzentration pg vorzunehmen Bei ausbleibender Reaktion kann dann 1 - 4 Stunden danach mit der i v -Applikation begonnen werden Bei der Daueranwendung kann nach der 3wöchigen Behandlung auf i m oder s c -Injektionen eventuell mit Retard- oder Depot-Präparaten übergegangen werden Diese sollen pro Tag Wirkstoffmengen von Mg bis g freisetzen Bei Androgen-hormonabhängigem Prostatakarzinom werden neben Prostata-Präparaten, die dem Mutterboden der Metastasen entsprechenden und solche aus Ovar verwendet In ähnlicher Weise verfährt man auch bei anderen Tumorarten In Tierversuchen an Mäusen, Ratten und Hamstern wurde festgestellt, daß die tolerogen dosierten löslichen Organextrakte zu einer signifikanten Verbesserung der therapeutischen Wirkung bezüglich der Regression der Tumormenge, dem Ausbleiben von Metastasen und der Allgemeinwirkung führen gegenüber der Anwendung von Organpräparaten mit korpuskulären, nicht löslichen Bestandteilen Nach anfänglicher Tumorregression beginnt dort 4 - 6 Wochen nach Behandlungsbeginn ein erneutes Tumorwachstum Dieses wird

durch die tolerogene Anwendung von voll löslichen Organextrakten verhindert

Beispiel 2

Erzeugung von Toleranz durch Erzeugnisse mit voll wasserlöslichen Organextrakten, die unspezifisch eine überschießende immunologische Reaktionslage mit der Tendenz zur verstärkten Antikörperbildung normalisieren und die bei exogenen Allergien wie auch bei immunopathogenen Autoimmunerkrankungen, bei Verbrennungen, Organtransplantaten und gegen Operationsfolgen angewandt werden, ohne daß eine spezifische Toleranz gegen die pathogenen Antigene oder Allergene erzeugt wird. Es werden dazu voll lösliche Organtrockensubstanzen, bzw. -pulver aus foetalem Thymus, foetaler Milz, foetalem Anteil der Plazenta, Nebenniere und Lymphknoten, einzeln oder in beliebiger Mischung angewandt. Diese Präparate können auch gleichzeitig mit der spezifischen Desensibilisierung und Toleranzerzeugung gegen exogene wie endogene pathogene Antigene oder aber mit der sogenannten Gegensenibilisierung unter Verwendung von zum Antigen umgewandelten Antikörpern bzw. Reaginen angewandt werden.

Das Behandlungsschema unterscheidet sich vom Beispiel 1 durch die Anwendung von jeweils nur 2 - 4 ml der verschiedenen Verdünnungsstufen. Die Behandlung wird nach dem Verschwinden der Symptome 1 - 2 Wochen weitergeführt.

Die Wirkung dieser Therapie konnte am Absinken der Immunglobuline E und dem Ansteigen der Reaktionsschwelle für die Auslösung allergischer Reaktionen festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich, daß der Therapieerfolg auch bei allergisch disponierten Patienten dauerhafter ist, als bei

der reinen Desensibilisierung und der Verwendung von nicht wasserlöslichen Organpräparaten, bei nicht tolerogener Dosierung.

Beispiel 3

Zur Desensibilisierung und Erzeugung von Überkreuz-Toleranz bei immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten wie z. B. der chronischen Nephritis oder den Kollagenosen werden voll lösliche Präparate analog den Organarten verwendet, gegen die sich die Autoantikörper richten. Die Behandlung erfolgt zunächst s.c. oder i.m. mit ansteigender Dosierung von μg über mg zu pg . Bei starker Symptomatik am 1. Tag evtl. 3- und am 2. Tag 2mal täglich in Abständen von 2 - 3 Stunden, sodann einmal täglich jeweils 1 - 4 ml. Bei guter Verträglichkeit wird zur nächst höheren Konzentration übergegangen. Nach Erreichen der Mg -Konzentration wird die i.v.-Applikation, beginnend mit der höchsten Ausgangsverdünnung von jeweils 2 - 4 ml der ansteigenden Konzentration bis mg/ml , als Injektion oder als Infusion eingesetzt. Eine gleichzeitig kombinierte Anwendung von Präparaten entsprechend Beispiel 2 beschleunigt den Therapieerfolg. Dieser konnte objektiviert werden durch Absinken der bestehenden Eosinophilie, der Lymphozytose und der Autoantikörper.

Beispiel 4

Zur Erzeugung von Überkreuz-Toleranz vor einer allogenen Nierentransplantation wird mindestens 5 Tage vor der Transplantation, möglichst aber 2 - 3 Wochen vorher, mit Präparaten aus foetaler und jugendlicher Schweineiere in ähnlicher

Weise wie in Beispiel 1 behandelt. Es können dabei Mischpräparate entsprechend Beispiel 2 zusätzlich mitverwendet werden. Zur Aufrechterhaltung einer stabilen Toleranz werden alle 3 - 4 Tage bis zu geringen Mengen in Konzentrationen mg/ml zunächst i.v. appliziert.

Tierexperimentell konnte bei der Überpflanzung von Rattenhaut auf Mäuse eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Transplantate durch die Vorbehandlung der Mäuse mit wasserlöslichen Extrakten aus Rattenhaut, gegenüber nicht-behandelten Tieren nachgewiesen werden.

Beispiel 5

Zur Erzeugung von Überkreuz-Toleranz bei Organinfarkten und Apoplexien werden Präparate analog der betroffenen Organart mög-

lichst frühzeitig nach dem Infarktereignis bei rascher Konzentrationssteigerung wie in Beispiel 1 appliziert. Gleichzeitig können Mischpräparate entsprechend Beispiel 2 angewandt werden. Die Behandlung wird bis zur klinischen Ausheilung und Normalisierung der Laborparameter fortgesetzt. Bei Apoplexien erfolgt ab dem 3. Tag zusätzlich die intrathekale Anwendung von jeweils 1 - 2 ml der Verdünnungen 10^{-6} und 10^{-7} . Die Behandlung kann zusätzlich zu der üblichen Intensivtherapie durchgeführt werden. Die Konzentrationen und Applikationsmengen dürfen nur bei einwandfreier Verträglichkeit gesteigert werden, sonst muß die Konzentration und die Applikationsmenge mindestens um 1 - 2 Stufen, d.h. Dezimalen gesenkt werden. Dies gilt für alle Indikationen.

Europäische Patentschrift**Verfahren zur Vorbereitung von alloplastischen Implantationen und Organtransplantationen**

EP Nr : 81106054 0
vom 01 08 1981

Zusammen mit Theurer, Karl Georg, Dr med , Brunnwiesenstraße 23,
D-7302 Ostfildern 1 (DE)

Priorität: 21 07 81 EP 81105731
07 10 80 EP 80106066

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Beschichtung der Oberfläche von alloplastischen oder von devitalisierten biologischen Materialien und von Organtransplantaten, die mit Zellgeweben des Empfängerorganismus in direkten Kontakt kommen, durch Auf- oder Einwachsen eines Zellrasens von in Kultur gezüchteten Zellen eines Spenders. Während der Kultivierung werden Zellen allogenen oder xenogenen Ursprungs durch Zusatz von Extrakten aus Zellgeweben oder Blutbestandteilen des Empfängerorganismus zum Nährmedium, an den Empfängerorganismus adaptiert. Andererseits wird im Empfängerorganismus durch wiederholte Vorbehandlung in ansteigender Dosierung mit Geweben des Spenders bzw. den zu übertragenden Zellkulturen bzw. oder dekantierten Nährmedien Immuntoleranz erzeugt. Bei Verwendung von autologen Zellgeweben ist diese gegenseitige Adaption nicht erforderlich.

Die Einpflanzung erfolgt unter Verwendung von Bioklebern, die für Körperflüssigkeiten diffusibel sind und denen gezüchtete Zellen oder daraus gewonnene Extrakte bzw. Extrakte aus dem Implantationsbett

oder von anderen Organen, insbesondere foetalen Geweben sowie andere wachstumsstimulierende Stoffe zugesetzt werden. Die Gewebeexplantation und Zellzüchtung erfolgt nach bekannten Methoden der Zell- und Gewebezüchtung.

Patentansprüche

1 Verfahren zur Vorbereitung von Implantationen, wobei alloplastische oder devitalisierte biologische Materialien für die Rekonstruktion von Gewebedefekten an Knochen, an Sehnen, an Blutgefäßen, an Haut und an serösen Häuten sowie für den Ersatz von Zähnen, Gelenken (Endoprothesen) und Sehnen, insbesondere aus devitalisierten Knochen, Knochenstäben und -splittern, Sehnen, aus Kunststoffen, Keramik, Biogläsern und anderen geeigneten Materialien und aus Kombinationen verschiedener biologisch-chemisch inerte, zur Implantation geeigneter Materialien benutzt werden, sowie Verfahren zur Vorbereitung von Transplantationen, wobei allogene oder xenogene, lebende Gewebe benutzt werden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oberfläche der alloplastischen Materialien

bzw der allogenen oder xenogenen Gewebe beschichtet durch An- bzw Einwachsen eines Zellrasens von in Kultur gezüchteten, einem Spender entnommenen lebenden Gewebezellen, daß man aus den Zellen des Spenders oder daraus hergestellten Zell-extrakten und bzw oder dekantierten Nährmedien, in denen die Zellen gezüchtet werden, Präparate zur tolerogenen Vorbehandlung des Empfängers herstellt, wobei man bei der Züchtung der Spender-Zellen, Histokompatibilitätsfaktoren aus dem späteren Empfänger, sowie Gewebe-stimulierende Faktoren, insbesondere aus foetalen und jugendlichen Organgeweben, den Zellkulturen zusetzt und daß man Biokleber für die Transplantation bzw Implantation bereitstellt, die für Körperflüssigkeiten diffusibel sind und die entsprechende Spender-Zellen oder daraus gewonnene Zellextrakte und andere Wachstums-fördernde Faktoren enthalten können

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man sterile, alloplastische Materialien mit netz- oder schwammartig durchbrochener Struktur oder aufgerauhter bzw feinporöser Oberfläche zur Aufzüchtung des Zellrasens verwendet

3 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man extrahierte Zähne oder Biopsiematerial aus der vorgesehenen Implantationsstelle des Empfängers zur Herstellung der Gewebezellen bzw Gewebekulturi'en verwendet

4 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die aus dem Spender in vitro gezüchteten Zellen, insbesondere Osteoblasten, Odontoblasten, Chondroblasten, Myoblasten, Fibroblasten oder epitheliale Zellen sind und auf dem vorgesehenen Implantat an verschiedenen Stellen angeimpft und dauernd oder rhythmisch mit

geeignetem Nährmedium nach bewährten Methoden der Zellzüchtung befeuchtet werden, gegebenenfalls unter Verwendung besonderer mechanischer Einrichtungen für das kontinuierliche Drehen des späteren Implantates im Nährmedium

5 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vitalkonservierung des hergestellten Implantates bzw Transplantates in einem geeigneten Nährmedium bei Temperaturen zwischen +5° und + 35°C oder in tiefgefrorenem Zustand nach den bekannten schonenden Methoden der Gewebezüchtung und Gewebekonservierung, gegebenenfalls unter Zusatz von Vitrikationsflüssigkeiten erfolgt

6 Verfahren nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß als Spenderorgan foetale Gewebe, Haut, Eihäute, Nabelstrang, Plazenta, Thymus, Blutadern, Knorpel, Gelenkkapsel, Knochenmark oder Zahnleiste verwendet werden

7 Verfahren nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Adaption der Spenderzellen an den Empfänger den Nährmedien wachstumsstimulierende Stoffe oder Differenzierungstoffe oder allogene oder xenogene Organextrakte bzw -hydrolysate, insbesondere Gewebeextrakte aus Körper- oder Blutzellen bzw -serum des späteren Empfängers, zugesetzt werden

8 Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Stimulationsfaktoren, die nach dem Verfahren zur Gewinnung von biologischen Wirkstoffen nach EPA Nr 80 160 066 6 gewonnen sind, zur Zellzüchtung und bei der Implantation verwendet werden

9 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß dem Biokleber für die Implantation bzw Transplantation Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

aus Gewebezellen oder Suspensionen der gezüchteten Zellen zu der flüssigen Phase eines Gels oder zu einem Fibrinogenkonzentrat, zu einer Thrombinlösung oder zu möglichen anderen Bioklebern, die auch zur Imprägnation des Implantates bzw. des Implantationsbettes verwendet werden, zugegeben werden

10 Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur Erzeugung von Immuntoleranz gegenüber histoinkompatiblen Gewebebestandteilen des zugehörigen Spenders in einem Empfänger eines Organtransplantates, dadurch gekennzeichnet, daß diese Präparate aus dem Spender des Organtransplantates gewonnen werden

Claims

1 Method for the preparation of grafts, in that alloplastic or devitalized biological material is used for the reconstruction of tissue defects on bones, tendons, blood vessels, skin and on serous skins as well as for the replacement of teeth, joints (endoprosthesis) and tendons, in particular from devitalized bones, bone chips and splinters, tendons, from plastic, ceramic, biological glass and other suitable materials and from combinations of various biologically inert materials, suitable for implantation (grafting), as well as method for the preparation of transplantations (grafts), in that allogeneous or xenogeneous, living tissue is used, characterized in that, the alloplastic material surface or the allogeneous or xenogeneous tissue respectively are coated by surface growth or growing in of a cell substrate cultivated from living tissue cells taken from a donor, preparations for the tolerogeneious pretreatment of the recipient are produced from the donor's cells or from cell extracts made of the latter

cells or from decanted nutritive substance, by adding to the cell cultures, when culturing donor cells, histocompatibility factors of the intended recipient, as well as tissue stimulating factors, originating in particular from foetal and juvenile organ tissues, bioadhesive for the transplantation or implantation is made available with the body fluids are unable to diffuse and which can contain the corresponding donor cells or the cell extracts of same and other growth causing factors

2 Method in accordance with claim 1, characterized in that sterile alloplastic materials with lattice or sponge type perforated structures or roughened or fine porous surfaces are used for culturing the cell substrate

3 Method in accordance with claim 1, characterized in that extracted teeth or biopsy material from the recipient's planned implant (graft) position is used for the production of tissue cells or tissue cultures

4 Method in accordance with claim 1, characterized in that the cells grown from the donor in vitro, in particular are osteoblasts, odontoblasts, chondroblasts, myoblasts, fibroblasts or epithelial cells vaccinated at various points on the intended implant (graft) and moistened continuously or rhythmically with a suitable nutritive medium in accordance with the proven methods of cell cultivating, if necessary by using special mechanical devices assuring continuous rotation of the later implant (graft) in the nutritive medium

5 Method in accordance with claim 1, characterized in that the vital conservation of the produced implant (graft) or transplant is made in a suitable nutritive medium at a temperature between + 5°

and + 35°C or in a deep frozen condition in accordance with the known gentle and careful method of tissue culture and tissue conservation, if necessary by adding vitrification fluids

6 Method in accordance with **Claims** 1-4, characterized in that foetal tissue, skin, egg skin, umbilical cord, placenta, thymus gland, blood vessels, cartilage, joint capsule, bone marrow or dental ridge are employed

7 Method in accordance with **Claims** 1-6, characterized in that, for the adaption of the donor cell to the recipient growth stimulating material or differentiation material or allogenuous or xenogenous organ extracts or hydrolysates, in particular tissue extract from body or blood cells or serum of the later recipient are added to the nutritive media

8 Method in accordance with Claim 7, characterized in that the stimulating factors obtained in accordance with the method for obtaining biologically active principles as being stipulated in EPA No 80 106 066 6, are used for cell cultivation and grafting

9 Method in accordance with claim 1, characterized in that for implantation or transplantation the bioadhesive is added growth and differentiation factors from tissue cells or suspensions of the cultivated cells to the liquid phase of a gel or to a fibrinogen concentrâte, to a thrombin **Solution** or to permit other bioadhesives, which are also used for implants or grafting substrate impregnation

Revendications

1 Procède pour la preparation d'implantations dans lequel sont utilisees des matieres alloplastiques ou des matieres devitalisees

biologiques pour la reconstruction de defauts tissulaires aux os, tendons, vaisseaux sanguins à la peau et aux peaux sereuses, ainsi que pour le remplacement de dents, articulations (endoprotheses) et tendons, provenant en particulier d'os devitalises, copeaux d'os et esquilles, tendons, de matieres plastiques, ceramique, bioeristaux et autres matieres appropriees et de combinaisons de plusieurs matieres inertes du point de vue biologico-chimique et appropriees pour des implantations, ainsi que des procedes pour la preparation de transplantations pour lesquels sont utilises des tissus vivant allogenes ou xenogenes, caracterise par le fait que l'on revet la surface des matieres alloplastiques resp dos tissus allogenes ou xenogenes d'une pelouse greffee de cellules tissulaires vivantes preleves sur un donneur et mises dans une culture; que l'on obtient des cellules du donneur ou des extraits de celles-ci et/ou des bouillons de culture decantes, dans lesquels les cellules sont cultivees, des preparations pour le pretraitement tolerogene du receveur tout en ajoutant aux cultures des cellules du donneur des facteurs histocompatibles venant du receveur, ainsi que des facteurs stimulant les tissus provenant en particulier de tissus organique foetaux ou juveniles; et que l'on tient à disposition pour la transplantation resp L'implantation des colles biologiques diffusible pour les liqueurs corporelies et pouvant contenir les cellules du donneur ou les extraits faits de celles-ci ou d'autres facteurs favorisant la croissance

2 Procède selon specification 1, caracterise par le fait que l'on utilise des matieres steriles alloplastiques d'une structure à pereees reticulees ou spongeuses ou avec une surface rugueuse resp aux micro-

porcs pour cultiver la pelouse cellulaire
 3 Procède selon spécification 1, caracté-
 rise par le fait que l'on utilise pour ob-
 tenir des cellules tissulaires resp des cul-
 tures tissulaires, des dents arrachées ou
 des matières biopsiques du receveur

4 Procède selon spécification 1, caracté-
 rise par le fait que les cellules du donneur
 cultivées in vitro, sont en particulier
 d'ostéoblastes, odontoblastes, chondro-
 blastes, myoblastes, fibroblastes ou des
 cellules épithéliales, qui sont greffées à
 divers points sur l'implant prévu et qui
 sont en permanence ou de manière ryth-
 mique humidifiées avec un bouillon de
 culture approprié d'après des méthodes
 éprouvées de la culture cellulaire; le cas
 échéant en utilisant des installations méca-
 niques particulières pour retourner de façon
 continue l'implant prévu dans le bouillon
 de culture

5 Procède selon la spécification 1, caracté-
 rise par le fait que la conservation vitale
 de l'implant resp du greffon obtenu se fait
 dans un bouillon de culture approprié à
 une température entre + 5 et + ou
 congèle d'après des méthodes connues de
 la culture et de la conservation tissulaire,
 le cas échéant en y ajoutant des liquides
 vitrifiants

6 Procède selon les spécifications 1-4,
 caractérise par le fait que sont utilisés
 comme organe du donneur des tissus; peau,
 membranes ovulaires, cordon ombilical,
 placenta, thymus, veines, cartilage,
 capsules articulaires, moelle osseuse ou
 lame dentaire

7 Procède selon les spécifications 1-6,
 caractérise par le fait que pour adapter les
 cellules du donneur au receveur sont
 ajoutées aux bouillon de culture des sub-
 stances stimulant la croissance ou des
 substances de différenciation ou des extraits

resp d'hydrolysats d'organes allogènes
 ou xénogènes, en particulier des extraits
 tissulaires des cellules du corps ou du sang,
 resp du sérum sanguin du futur receveur

8 Procède selon la spécification 7, caracté-
 rise par le fait que sont utilisés des fac-
 teurs stimulants, lesquels sont obtenus
 d'après le procédé pour l'obtention de bio-
 catalyseurs d'après EPA No 80 106 066 6
 pour la culture des cellules et l'implanta-
 tion

9 Procède selon la spécification 1, caracté-
 rise par le fait que sont ajoutées à la colle
 biologique pour l'implantations resp trans-
 plantation des facteurs de croissance ou
 de différenciation provenant de cellules
 tissulaires ou de suspensions de cellules
 cultivées mélangées à la phase liquide d'un
 gel ou un concentré fibrinogène, une **Solu-**
 tion de thrombine ou d'autres colles bio-
 logiques possibles, qui sont utilisées pour
 imprégner l'implant ou le lit de l'implant

10 Procède pour l'obtention de prépara-
 tions engendrant la tolérance immunitaire
 contre les substances tissulaires histo-
 compatibles du donneur dans le receveur
 d'un transplant d'organe, caractérise par
 le fait que ces préparations sont obtenues
 du donneur du transplant

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Vorbereitung
 von Implantationen von alloplastischen
 oder devitalisierten biologischen Materia-
 lien, wie auch von allogenen und möglicher-
 weise xénogenen Organtransplantaten vor
 der Implantation bzw Transplantation
 Es wird dabei auf der Oberfläche des
 Implantates bzw Transplantates, die mit
 Zellgewebe oder Knochen des Empfänger-
 organismus in Kontakt kommen soll, ein
 Zellrasen von in Kultur gezüchteten leben-

den Gewebezellen nach den bekannten Methoden der Zellkultur aufgezüchtet und zum Auf- bzw. Einwachsen, auch in Krypten oder Poren des alloplastischen Materials gebracht. Dabei können Zellen verwendet werden, die aus autologen Explantaten vom späteren Empfänger oder von allogenen, xenogenen bzw. foetalen Spendern kultiviert werden. Zur Erzielung der Gewebeverträglichkeit mit dem späteren Empfängerorganismus müssen allogene und xenogene Gewebe während der Kultivierung an den Empfängerorganismus adaptiert werden. Foetale Zellen benötigen diese Konditionierung nicht. Andererseits muß im Empfängerorganismus durch wiederholte Vorbehandlung mit den entsprechenden Zellen oder daraus hergestellten Zellextrakten bzw. dem Medium der Zell- bzw. Gewebekulturen eine immunologische Toleranz erzeugt werden.

Aufgezüchtete Zellen auf alloplastischen Materialien und Gewebetransplantaten beschleunigen das Einheilen und verbessern die Verankerung im Wundbett durch Neubildung von Zellen, insbesondere von Bindegewebsfibrillen und Interzellularsubstanz. Dadurch kommt eine weitgehend physiologische Verankerung des Implantates zustande. Die Beschichtung mit lebenden Zellen ist aber auch für Organtransplantate ein Vorteil, weil die aufgezüchteten Zellen eine höhere Zellteilungsrate besitzen als diejenigen der Organoberfläche und bei Verwendung von allogenen oder xenogenen Spendern durch eine konditionierte Vorbehandlung des Empfängers mit den Histokompatibilitätsfaktoren der aufgezüchteten Zellen und möglichst auch des Organtransplantates eine immunologische Abstoßungsreaktion vermieden wird. Bei Implantationen und Transplantationen, die

ohne vorherige Aufzüchtung von Zellrasen erfolgen, ist in vivo das Aufwachsen von Zellen erschwert, weil im Wundbett die Zellen im Gewebe gebunden sind und nicht frei vorkommen. Die Aufzüchtung eines Geweberasens in vitro durch Beimpfung mit Zellsuspensionen wird durch die größere Oberfläche der isolierten Zellen begünstigt. Die Kultivierung der Zellen kann schon längere Zeit vor der Organverpflanzung auch aus Gewebeexplantaten oder aus leukozytären Blutzellen des Organspenders erfolgen. Bei Verwendung allogener oder xenogener Zellen ist eine wechselseitige Konditionierung vom Empfänger auf den zu übertragenden Spenderzellen und -geweben möglich. Die übertragenen Zellen übernehmen eine Vermittlerfunktion zum Empfängerorganismus.

Als alloplastische Materialien werden vorwiegend Kunststoffe, Keramik, Biogläser und Metallegierungen, auch in Kombination verwendet. Als Implantate dienen auch devitalisierte biologische Materialien z. B. aus Knochen, Knochenspänen und -splittern sowie Zähnen, Sehnen, Hornhäuten, Eihäuten und Nabelschnur. Diese werden zur Rekonstruktion von Gewebedefekten an Knochen, Sehnen, Blutgefäßen, Haut, serösen Häuten sowie zum Ersatz von Gelenken als Endoprothesen wie auch von Sehnen verwendet.

Bei der Implantation von Zähnen und Zahnersatz ist der Faserverbund zwischen Implantat und Knochen nicht nur zur Fixierung, sondern auch wegen des epithelialen Abschlusses nach außen zur Mundhöhle, zur Vermeidung von Infektionen und der Bildung von infektiösen Herden im Gebiet des Zahnersatzes wichtig.

Die Erfindung beinhaltet auch die Verwendung von Bioklebern, die für Körper-

flüssigkeiten diffusibel sind, wie z B Fibrin, das aus einer Mischung von Fibrinogen und Thrombin entsteht oder verflüssigtes Kollagen oder Elastin mit einem Verfestiger. Es werden dabei Gewebe- oder Zellextrakte aus den kultivierten Zellen oder anderen wachstumsstimulierenden Faktoren, wie sie insbesondere nach EPA Nr 80 106 066 6 gewonnen werden, dem wäßrigen Lösungsmittel des Bioklebers zugesetzt. Es können auch isolierte Zellen aus der Kultur in den Kleber eingebracht werden. Diese werden dann bei der Retraction des Fibrins zusammengepreßt und daraus Zellinhaltsstoffe in Freiheit gesetzt, welche die bindegewebige Organisation des Bioklebers durch Ersatz mit körpereigenen Geweben beschleunigt. Für die Einpflanzung alloplastischer Materialien bietet eine Mikroporosität oder netz- bzw schwammartig durchbrochene Struktur der Oberfläche für die feste Verankerung des Implantates Vorteile. Metalle, auf denen Zellen nicht spontan anwachsen, werden mit dafür geeigneten Materialien, z B aus inertem Kunststoff, Biogläsern, Porzellan oder aber mit Fibrin, Kollagen oder Elastin vor der Beimpfung mit Zellen beschichtet. Die Implantation von solchen Endoprothesen erfordert einen Kunststoff-"Zement". Die Erfindung betrifft jedoch die Aufzucht eines festgewachsenen Zellrasens und nicht die dazu verwendeten Materialien.

Die Zellkulturen werden aus Gewebeproben, die chirurgisch oder durch Biopsie von einem Spender gewonnen werden, nach bekannten Methoden der Zell- und Gewebezüchtung angelegt (vgl Brigitte Mauersberger: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung: Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1971; Karl Friedrich Bauer: Methodik der Zell- und Gewebezüchtung: S Hirzel Ver-

lag Stuttgart, 1974). Bei Zähnen können Stanzzyylinder aus der vorgesehenen Implantationsstelle oder extrahierte Zähne für die Anzucht der Zellkulturen verwendet werden. Durch Klonen können verschiedene Zellarten gezüchtet werden, wie z B Osteoblasten, Odontoblasten, Ghondroblasten, Myoblasten, Fibroblasten, epitheliale Zellen und andere. Die gewonnenen Zelllinien können dann in Massenzüchtung weiter kultiviert werden. Es ist zweckmäßig zur Beschichtung von Implantaten bzw Transplantaten die Zellarten zu verwenden, die zum Anwachsen im Wundbett besonders geeignet sind, also vorzugsweise Fibroblasten. Diese lassen sich auch besonders leicht züchten, weil sie eine große Zellteilungspotenz besitzen. Es können auch heteroploide Zellen ohne onkogene Potenz Verwendung finden. Die explantierten Zellen werden gegebenenfalls in wiederholten Passagen gezüchtet und dabei mit Wirkfaktoren aus Organextrakten stimuliert, z B aus Leber, Plazenta, Thymus, foetalem Bindegewebe aus Nabelschnur oder anderen foetalen Geweben (vgl EPA 80 106 066 6; Paffenholz, V und Theurer, K Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro: Der Kasenarzt 27, Sept 1978).

Zur Beimpfung des sterilen Implantates werden durch enzymatische Ablösung der Zellen vor der Unterlage Zellsuspensionen gewonnen. Diese werden auf das Implantat oder Transplantat an verschiedenen Stellen aufgeimpft und dann dauernd oder rhythmisch mit geeigneten Nährmedien nach bewährten Methoden der Zell **Züchtung** befeuchtet. Jede mechanische Alteration der Zellen muß dabei vermieden werden. Zur Adaption an den späteren Empfänger werden allogene oder xenogene Gewebe mit

entsprechenden Extrakten aus organgewe-
ben oder aus Blutzellen bzw -serum des
späteren Empfängers in einem Minimal-
nährmedium mindestens während 4 Stun-
den behandelt Dies kann unmittelbar vor
der Implantation geschehen Die Protein-
oder Peptidkonzentration der verwendeten
Organextrakte liegt zwischen mg und ng/ml
Nährmedium

Zur Vorbehandlung des Empfängers von mit
allog^{enen} oder xenogenen Zellen besetzten
Implantaten oder Organtransplantaten wird
dieser mindestens 2 Tage vor der Implan-
tation mit steigenden Zellzahlen oder Kon-
zentrationen des eiweißhaltigen Extraktes
und bzw oder den dekantierten Kultur-
medien der entsprechenden Zellkulturen
behandelt. Diese Vorbehandlung entspricht
der Erzeugung einer Low-Zone Toleranz
Die Toleranzerzeugung wird gefördert
durch die Anwendung einer Mischung
von nativen Molekülen und ihren Unterein-
heiten bzw Bestandteilen Es können dazu
auch sulfatierte und phosphatierte Trocken-
extrakte der Gewebe bzw der gezüchteten
Gewebezellen parenteral wiederholt inji-
ziert wie auch in steigenden Konzentratio-
nen oral bzw enteral gegebenenfalls in
Liposomen oder in der wäßrigen Phase
einer Wasser-in-öl-Emulsion in dünndarm-
löslichen Kapseln angewandt werden Bei
der parenteralen Injektion werden anstei-
gende Konzentrationen vom pg- bis mg-Ber-
reich in sich verlängernden Intervallen
von Stunden bis 2 - 3 Tagen angewandt
Es können gezüchtete Zellen aus Eihaut und
Nabelstrang wie auch aus anderen Körper-
bereichen, insbesondere aus Haut, Plazen-
ta Thymus, Blutadern oder Zahnleiste
verwendet werden Zur immunologisch
tolerogenen Vorbehandlung des Empfängers
lassen sich auch gezüchtete Zellen, wie
auch vom Spender gewonnene Zellen oder

Gewebeextrakte verwenden Nichtkom-
patible Faktoren können auch aus dekan-
tierten Kulturmedien, in denen die Vital-
konservierung stattfindet, gewonnen
werden Zur Vorbereitung von allogenen
bzw xenogenen Organtransplantaten wer-
den nichtkompatible Faktoren aus dem
Spenderorganismus des Transplantates,
auch in Form von gezüchteten Zellen oder
eiweiß- bzw peptidhaltigen Organextrak-
ten zur Vorbehandlung des Empfängers
verwendet

Das Verfahren von O'Connor, N et al
(Dr H Green)(Lancet 1, 75, 1981) über
die Abdeckung von Verbrennungen mit in
Kultur gezüchtetem Epithel unterscheidet
sich grundsätzlich von vorliegendem Ver-
fahren durch die Aufgabenstellung und die
Art der Anwendung Die in Kultur gezüch-
teten Zellgewebe werden auf die äußere
Körperoberfläche als Hautersatz aufge-
bracht Bei vorliegendem Verfahren wer-
den jedoch die gezüchteten Zellen in-vitro
auf alloplastischen oder devitalisierten
biologischen Materialien, wie auch auf Or-
gantransplantaten als Zellrasen aufgezüch-
tet und andererseits für die Konditionie-
rung des Empfängerorganismus verwendet
Die Implantate bzw Transplantate werden
bevorzugt ins Körperinnere implantiert,
und es werden allogene oder xenogene
Spenderzellen verwendet, die bei der Zell-
züchtung durch Inkompatibilitätsfaktoren
aus dem Empfängerorganismus konditioniert
werden Bei der erwähnten Literaturstelle
werden zur Abdeckung von Verbrennungen
ausschließlich autologe Gewebe verwendet,
so daß diese konditionierende Vorberei-
tung der Zellen und des Empfängerorganis-
mus nicht bekannt war
Die Verwendung von vorbereiteten Implan-
taten mit aufgezüchteten allogenen, xeno-
genen oder foetalen Geweben und Zellen,

bietet trotz der erforderlichen Vorbereitung des Empfängers den Vorteil, einer kürzeren Vorbereitungszeit als bei der Anzüchtung von autologem Gewebe Auch wurde in der angeführten Literaturstelle ausschließlich Hautepithel verwendet, das sich von den im vorliegenden Verfahren verwendeten Zellarten grundsätzlich unterscheidet

Die alloplastischen Implantate mit aufgezüchtetem Zellrasen werden in Art der Vitalkonservierung bei der Gewebezüchtung in einem Nährmedium bei Temperaturen zwischen + 5° und + 35°C gehalten, wobei eine Benetzung der aufgezüchteten Zellen und der Schutz vor mechanischer Alteration gewährleistet sein muß Ein stufenweises Einfrieren ist bei Verwendung von Vitrikationsflüssigkeiten z B Dimethylsulfoxyd oder Glycerin möglich Das Auftauen erfolgt wie bei der Gewebe- und Zellkultivierung und erfordert eine anschließende Konditionierung in Nährmedien mit den genannten wachstumsfördernden Stoffen Organtransplantate können jedoch nicht kältekonserviert werden Weitere Merkmale und Vorteile von bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachfolgenden Beispielen

Beispiel 1

Es sollen nach länger zurückliegendem Zahnverlust Zähne aus alloplastischen Materialien implantiert werden unter Mitverwendung von autologen Zellgeweben, die vorher auf dem Implantat aufgezüchtet werden

Als Implantat werden vorgefertigte, sterile Materialien aus Biokeramik oder Biogläsern verwendet, die in Größe und Form mit dem vorgesehenen Implantatbett über-

einstimmen Mindestens 1 Woche vor der Implantation wird chirurgisch oder durch Nadelbiopsie Gewebe aus der späteren Implantationsstelle gewonnen, unter sterilen Kautelen mit physiologischen Salzlösungen (Tyrode-Lösung, Hanks-, Locke- oder Kingerlösung) gespült und in einem der bekannten natürlichen Nährmedien, z B nach Baker oder Lewis oder aber in einem künstlichen Nährmedium bekannter chemischer Zusammensetzung, z B nach Eagle, Earl, Evens, Nagel, Parker, White u a mit Zusatz einer geeigneten Antibiotikamischung, z B aus Aureomycin, Bacitracin, Chloramphenicol, Neomycin, Penicillin, Polymycin, Streptomycin, Terramycin bei Temperaturen zwischen + 5° und + 30°C zum Zelllaboratorium gebracht Dort wird nach bekannten Zellzüchtungsmethoden, die zu möglichst intensiver Zellproliferation führen, aus dem Explantat die Zellkultivierung durchgeführt Es ist dabei möglich, durch wiederholtes Umsetzen der Kulturen, bestimmte Zellarten durch Klonen isoliert zu züchten und auch eine Massenzüchtung der Zellen durchzuführen Zur Stimulierung des Zellwachstums werden zytoplasmatische Organextrakte, wahlweise einzeln oder in Mischungen, aus foetaler Zahnleiste, Leber, foetaler Plazenta und Thymus, wie auch gegebenenfalls von anderen heterologen Organarten, z B vom Rind, in einer Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-6} g Protein/ml Nährmedium bei den einzelnen Passagen zugesetzt Es können dazu auch Stimulationsfaktoren verwendet werden, die nach EPA 80 106 066 6 aus denselben Organarten gewonnen wurden oder andere bekannte, wachstumsfördernde und entzündungshemmende Extrakte wie z B Carnosin (vgl K Nagai: Entzündungshemmung durch die Förderung der spontanen Heilung mittels L-Carnosin:

Langenbecks Arch Chir 351, 39 ff (1980)), Epidermis-Wuchsfaktor (D Gospodarowicz et al: Anm Ev Biochem 45 (1976) 531 - 558), Somatotropin u a Eine adaptive Anpassung der kultivierten Zellen an den späteren Empfänger bzw die Toleranzerzeugung im Empfänger, ist bei Verwendung autologer Gewebe nicht erforderlich

Aus einer Monolayer-Kultur wird mindestens 2 - 3 Tage vor der vorgesehenen Implantation der Zellrasen durch Trypsin-Versenkung abgelöst oder durch Enzymwirkung eine Zellsuspension gewonnen, die von Enzymen freigespült, auf das vorgesehene Implantat an verschiedenen Stellen, die später mit dem Implantationsbett in Berührung kommen, aufgeimpft wird Um das Aufwachsen des Zellrasens zu erleichtern, kann nach bekannten Methoden (vgl B Mauerberger: Zell- und Gewebezüchtung: G Fischer Verlag, Stuttgart, 1977) die alloplastische Materialunterlage vor der Beimpfung der Zellsuspension oder dem Aufbringen eines bereits gezüchteten Zellrasens, mit Fibrin, Kollagen oder Elastin beschichtet werden Die beimpften Stellen des Implantates werden unter Kulturbedingungen entweder fortlaufend oder rhythmisch intermittierend mit Nährlösung befeuchtet Zur rhythmischen Befeuchtung werden die Zahnexplantate z B an den Längsenden drehbar fixiert und in einer Wanne mit Medium eingetaucht Die Umdrehung besorgt eine spezielle Apparatur Nachdem der Zellrasen fest auf dem Implantat angewachsen ist, wird dieser in ein Transportgefäß übergeführt In dem Transportgefäß muß die Befeuchtung der Zellen mit sauerstoffhaltigem Nährmedium zur Implantation gewährleistet sein Es wird dazu Tyrode-Lösung mit Zusatz von 50 - 100 Einheiten Penicillin und Streptomycin

pro ccm verwendet Die Temperatur während des Transportes wird zwischen + 5°C und + 20°C gehalten Gleichzeitig wird separat ein Teil der verwendeten Zellsuspension im Nährmedium mitgeliefert Von dieser werden bei der Vorbereitung des Bioklebers aus Fibrin 1×10^3 Zellen/ccm in die Thrombinlösung eingemischt, die ihrerseits mit dem Fibrinogenkonzentrat zusammengemischt wird Bei Erreichen des geeigneten Polymerisationsgrades des sich ausbildenden Fibrins, wird der Biokleber unmittelbar vor dem Implantat in das eröffnete Wundbett eingebracht Zuvor kann man das Wundbett und das Implantat mit der Zellsuspension präparieren Anstatt der Einbringung von suspendierten Zellen in den Biokleber oder zur vorherigen Benetzung des Implantates können auch wachstumsstimulierende Organextrakte oder Extrakte aus den kultivierten Zellen wie bei den Zellkulturen verwendet werden Der implantierte Zahn soll im Kieferknochen möglichst festsitzen Bei der Implantation wird jede Bewegung des Implantates vermieden, die zu einer Abschiebung des Zellrasens führen könnte Die Ränder des Wundbettes werden nach der Einpflanzung möglichst dicht am Implantat durch Nähte adaptiert und der aus der Wunde herausragende Teil des Implantates durch Schienenverband bis zum Festwerden des Implantates fixiert

Beispiel 2

Für den Sofortersatz von Einzelzähnen werden Implantate mit aufgezüchteten, vital-konservierten Zellen vorrätig gehalten Es werden dabei Zellen aus foetaler, menschlicher Zahnleiste und/oder aus Amnion, Nabelschnur und/oder Plazenta aufgezüchtet Zur Verbesserung des Einwach-

sens wird mindestens 1/2 Stunde vor der Implantation Blutserum vom Empfänger, gegebenenfalls in Mischung mit dem wäßrigen Extrakt aus Homogenaten der weißen Blutzellen, der Nährlösung für die Aufzucht von Zellen auf dem Implantat zugesetzt. Das Wundbett, das Implantat sowie auch der Biokleber wird, wie in Beispiel 1, mit wachstumsstimulierenden und entzündungshemmenden Faktoren vorbereitet.

Beispiel 3

Die Verwendung von allogenen und xenogenen Zellkulturen erfordert eine konditionierende Vorbereitung der Zellen und möglichst auch des Empfängerorganismus. Gleichzeitig mit den in Beispiel 1 beschriebenen wachstumsstimulierenden Faktoren, werden Blutserum, Extrakte aus Zellhomogenaten von weißen Blutzellen und bzw. oder von Biopsiematerial vom späteren Empfängerorganismus einem Minimalnährmedium während 8 Stunden oder wenn möglich, während 1 oder 2 Passagen vor der Implantation zugesetzt. Danach wird das optimale Nährmedium mit wachstumsstimulierenden Faktoren ebenfalls mit diesen Zusätzen verwendet. Der vorgesehene Empfängerorganismus wird mit Histokompatibilitätsfaktoren aus dem Spenderorganismus oder aus den zur Transplantation vorgesehenen Zellkulturen, in Form von Einzelzellen oder Zellextrakten, während mindestens 3 Tagen vor der Implantation, in steigender Dosierung, wiederholt vorbehandelt. Es werden dazu besondere Zell- bzw. Gewebspreßsäfte aus den kultivierten Zellen und bzw. oder das dekantierte Kulturmedium parenteral oder oral, in sich verlängernden zeitlichen Abständen zunächst halbstündlich, dann 3- bis 2mal täglich, sodann in täglichen Abständen vor der Implantation verabreicht.

Auch können Suspensionen der gezüchteten Zellkulturen in ansteigender Zellzahl, z. B. beginnend mit 10^2 , dann 10^4 bis 10^6 Zellen/ccm zusammen mit Verdünnungen der Kulturflüssigkeit in ng, Mg, mg Protein/ccm in physiologischer Lösung appliziert werden.

Beispiel 4

Konditionierung von Transplantat und Empfängerorganismus für die Organtransplantation einer allogenen, nicht vollkompatiblen Niere:

Vom lebenden Organspender werden mindestens 8 Tage vor der Nierenspende, wie in Beispiel 3, Histokompatibilitätsantigene aus Zellgeweben gewonnen. Insbesondere werden aus leukozytären Blutzellen bzw. aus Biopsiematerial Zellkulturen angelegt. Zur Erzeugung von Immuntoleranz des Empfängers gegenüber dem Transplantat, werden Blutserum des Spenders, Zellextrakte aus den gezüchteten Zellen oder lebende Zellsuspensionen in ansteigender Dosierung während mindestens 3 Tagen vor der Transplantation wiederholt in ansteigender Dosierung und sich verlängernden Intervallen dem Empfänger appliziert. Diese tolerogene Vorbehandlung des Empfängers gegen das Transplantat kann gleichzeitig kombiniert mit der Vorbehandlung gegen die darauf aufgezüchteten Zellen, falls diese nicht vom selben Spender wie das Transplantat stammen, vorgenommen werden.

Bei Verwendung von Leichenorganen wird das Organ nach bekannten Verfahren der Organtransplantation durch vitale Konservierung am Leben erhalten (vgl. K. F. Bauer: Methodik der Zell- und Gewebezüchtung - über die Organexplantation). Gleichzeitig werden Zellexplantate kulti-

viert und daraus Zellextrakte mit Histokompatibilitätsfaktoren gewonnen. Es können dazu Blutpräparate (Serum, Blutzellen) vom Spenderorganismus mitverwendet werden. Der Empfängerorganismus wird während mindestens 4-8 Tagen vor der Organtransplantation damit vorbehandelt. Andererseits wird während dieser Zeit dem Nährmedium für das Organexplantat von außen, wie auch von innen durch Anschluß an das Gefäßsystem des Explantates, Nährlösung mit Zusatz dieser Histokompatibilitätsfaktoren vom späteren Empfänger in ansteigenden Konzentrationen über ng, ng, mg Eiweißgehalt/ml Medium, in sich verlängernden Abständen von 1/2 Stunde bis 6-8 Stunden, mehrmals zugesetzt. Gleichzeitig werden auch hier wachstumsstimulierende Faktoren, wie in Beispiel 1 mitverwendet. Für die Verwendung von allogenen und insbesondere xenogenen Eihäuten oder Nabelschnur in der Chirurgie, ist eine immunologisch-tolerogene Vorbehandlung des Empfängerorganismus, mit Zellen oder Zellextrakten aus den zu überpflanzenden Geweben zweckmäßig. Die serösen Häute werden entsprechend dem vorhergehenden Beispiel, während der Kultivierung an den Empfänger oder an allogene Histokompatibilitätsfaktoren aus dem Empfängerorganismus, adaptiert.

Das Aufzüchten von autologen oder an den Empfänger adaptierten Zellen auf das Organtransplantat erfolgt, wie bei alloplastischen Implantaten. Es werden dazu möglichst foetale Zellen, nach wenigen Zellteilungen, verwendet. Eine Konditionierung dieser Kulturen wird sowohl mit Gewebefaktoren vom späteren Empfängerorganismus, wie auch mit solchen aus dem Spenderorganismus der Organtransplantate oder den daraus kultivierten Zellen, durchgeführt. Auch die Transplantation erfolgt in ähnlicher Weise

unter Berücksichtigung spezieller chirurgischer Techniken. Das Wundbett wird nach vollkommener Blutstillung ebenfalls mit wachstumsstimulierenden Extrakten und Faktoren vor der Organüberpflanzung präpariert. Auch können Biokleber mit wachstumsfördernden und synthesesestimulierenden Eigenschaften verwendet werden.

Beispiel 5

Die Vorbereitung einer Gelenks-Endoprothese, z. B. des Knie- oder Hüftgelenks, erfolgt grundsätzlich in gleicher Weise wie die Implantation von Zähnen. Es werden hier bevorzugt kultivierte Osteoblasten und Fibroblasten, möglichst aus Gewebeexplantaten vom Empfängerorganismus oder aber allogenen Ursprungs an den Stellen aufgezüchtet, die im Knochen fixiert werden sollen. Es werden dazu auch foetale, allogene Zellen aus Gelenken, Gelenkkapsel und Knochen verwendet, die an den späteren Empfängerorganismus durch Vorbehandlung mit Histokompatibilitätsfaktoren vom Empfänger, in Form von Zellextrakten aus Blutzellen oder Biopsiematerial, adaptiert sind. Bei Verwendung von allogenen oder xenogenem Zellmaterial wird der Empfänger entsprechend den vorherigen Beispielen immunologisch tolerogen vorbehandelt.

Beispiel 6

Die Transplantation von devitalen Geweben erfolgt in gleicher Weise wie in Beispiel 1, durch Aufwachsen eines vom Empfängerorganismus tolerierten Zellrasens, der gleichzeitig wie im Beispiel 5 an das Transplantat adaptiert ist.

Beispiel 7

Kältekonservierung des mit Zellen beschichteten Implantates:

Unter Zusatz von Kälteschutzmitteln, z.B. 36% Ammoniumacetat, 39% Dimethylsulfoxyd oder 40% Glyzerin zur Nährlösung, erfolgt ein stufenweises Einfrieren durch Abkühlung von -1 bis - 2 C pro Minute bis mindestens - 90 C, möglichst bis -196 C.

Bei dieser Temperatur bleiben die Zellge-

webe für fast unbegrenzte Zeit revitalisierbar. Die Auftauung erfolgt ebenfalls nach bekannten Methoden der Gewebe- und Zellzüchtung (vgl. K.F. Bauer) entweder durch schlagartiges Erwärmen auf 37 C oder, je nach Thermoschockbelastbarkeit des Implantatmaterials durch stufenweises Erwärmen von 0,3 bis 3 C pro Minute. Nach Auftauung ist wie bei der Routinezüchtung der Zell- und Gewebekulturen weiter zu verfahren.

EPA Nr : 81105245 2

vom 07 07 81

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die therapeutische Verwendung von Fc-Fragmenten bzw deren c-terminalen Anteil aus Immunglobulinen zur Behandlung von allergischen, atopischen und immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten, insbesondere des rheumatischen Formenkreises. Die Arzneimittel werden aus isolierten, nativen Immunglobulinen, aus geklonten Zellkulturen oder auch durch partielle oder totale biologische und bzw oder chemische Synthese gewonnen. Die Anwendung erfolgt vorzugsweise parenteral systemisch oder auch durch Inhalation eines Aerosols oder oral, möglicherweise von Wasser-in-Öl-Emulsionen oder inkorporiert in Liposomen.

Patentansprüche

- 1 Verwendung von Fc-Fragmenten aus Immunglobulinen und bzw oder den daraus gewonnenen Halbfragmenten oder dem C-terminalen Anteil, die nach bekannten Verfahren gewonnen werden, zur Behandlung von allergischen, atopischen und immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten, insbesondere des rheumatischen Formenkreises und von sogenannten Kollagenosen
- 2 Verwendung der Präparate nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Gewinnung der Fc-Fragmente bzw ihrer Anteile aus Immunglobulinen, die aus Zellkulturen erhalten werden
- 3 Verwendung von Präparaten nach An-

- spruch 1, gekennzeichnet durch die partielle oder totale Synthese nach biogenetischen oder chemischen Methoden
- 4 Verwendung der Präparate nach Anspruch 1-3, gekennzeichnet durch deren Inkorporierung in Liposomen
- 5 Verwendung der Präparate nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Aerosol-Inhalation und von wäßrigen Lösungen oder von Liposomensuspensionen
- 6 Verwendung der Präparate nach Anspruch 1-3, gekennzeichnet durch die Einbringung in die wäßrige Phase einer Wasser-in-Öl-Emulsion
- 7 Verwendung der Präparate nach Anspruch 1-3, gekennzeichnet durch Lösungen in üblichen Infusionsmitteln oder Plasmaexpandern

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die therapeutische Verwendung von Fc-Fragmenten bzw dem C-terminalen Anteil aus Immunglobulinen, die aus dem Blut von Spendern oder durch biologische oder chemische Synthese erhalten werden, zur Behandlung von allergischen, atopischen und immunopathogenen Autoaggressionskrankheiten, insbesondere des rheumatischen Formenkreises.

Seit 1957 werden Antikörper-Fragmente im natürlichen Mischungsverhältnis der in Bruchstücke gespaltenen Immunglobuline aus Patientenblut, insbesondere leichte und schwere Ketten, wie auch das Fab-

Fragment und Fc-Fragment besonders zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen und anderer immunopathogener Autoaggressionskrankheiten, z B Lupus erythematoses visceralis und anderer sogenannter Kollagenosen verwendet (K Theurer: Arztl Forschung 11 Jg , H 5 1-259 - 1-263, Mai 1957 - ders : Arztl Praxis Nr 42, Okt 1957 - ders : Kongreßbericht vom V Europäischen Allergiekongreß Basel, 1962, S 230 - 233 - ders : Modifikationen der Eigenblutbehandlung - die Gegensensibilisierung und die Behandlung mit Antikörperfragmenten: Physikalische Medizin und Rehabilitation 15 Jg H 12, S 266 - 268, 1974)

Die therapeutische Anwendung von isolierten Fraktionen, insbesondere des Fc-Fragmentes bzw dessen C-terminalen Anteils ist bisher nicht erfolgt, obwohl bekannt war, daß der Fc-Anteil des Immunglobulins Beziehung zur Komplement-Aktivierung und -Fixation besitzt (Kurzes Lehrbuch der Immunologie von John H Humphrey und Robert G White - Herausgeber E Mycher, 1971, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S 99) Andererseits ist bekannt, daß der Fc-Anteil der Immunglobuline insbesondere von IgE an der Auslösung von allergischen Reaktionen durch Freisetzung von H-Substanzen aus Markophagen beteiligt ist Die Behandlung allergischer Erkrankungen erfolgt jedoch mit dem nativen, humanen Immunglobulin G (R Golsong: Immunglobulin G hilft auch bei Pollinosen; Arztl Praxis 41, S 1638 - 1640, 1981 - H S Bernton: The Use of Gamma Globuline in Allergy; South Md Journal J 50, 934, 1957) Andererseits werden autologe Immunglobuline aus dem Patientenblut durch ein Adjuvans zum Antigen umgewandelt und in steigender Konzentration und Dosis wiederholt injiziert (K Theurer: Medizinische

44: 1569 - 1572, 1976)

Erfindungsgemäß wurde nun festgestellt, daß isolierte Fc-Fragmente, wie auch deren C-terminaler Anteil, von Immunglobulinen bei parenteraler Anwendung ohne nachteilige Nebenwirkungen eine beschleunigte therapeutische Wirkung entfalten, und daß auch heterologe Präparationen vom Rind, Pferd oder Hammel gut vertragen werden Daß diese isolierte Anwendung erst so viele Jahre nach Entdeckung der Zusammensetzung der Immunglobuline aus molekularen Untereinheiten und der Funktionsaufklärung, besonders auch des Fc-Fragments, bei den genannten Indikationen erfolgt, deutet auf bisher bestehende Vorurteile hin, die erfindungsgemäß überwunden werden

Das Fc-Fragment setzt sich aus den abgespaltenen Resten der beiden H-Ketten der Immunglobuline zusammen und enthält das C-terminale Ende der Polypeptid-Kette Beim menschlichen IgG ist das Fc-Fragment, zumindest im C-terminalen Abschnitt, sehr gleichmäßig aufgebaut, wobei die andere Hälfte des Fragments, an der die Trennung zum Fd-Fragment erfolgt ist, variabler sein dürfte (Fragione, B , Franklin, E : J exp Med 122, 1, 1965) Vom C-terminalen Ende der H-Kette der Kaninchen IgG konnte die Aminosäuresequenz bereits aufgeklärt werden (Givol, D , Porter, R : Biochem J 97, 320, 1965) Es besteht aus 19 Aminosäuren und ist für die Fc-abhängigen Funktionen der Immunglobuline verantwortlich

Obwohl zahlreiche allotypische Determinanten auf dem Fc-Fragment des menschlichen IgG lokalisiert sind, zeigen Aminosäure- und Peptidanalysen, daß bei allen IgG-Molekülen dieser Teil der H-Kette eine besonders konstante Zusammensetzung hat Eine auffallende Ähnlichkeit besteht zwi-

sehen der Aminosäuresequenz der Fc-Fragmente von Kaninchen-, Menschen- und Pferde-IgG

Das durch Spaltung von IgG aus Normalse- rum hergestellte Fc-Fragment kann leicht kristallisiert werden (Landsteiner, K : The specificity of serological reactions: Neuaufl Dover Publ N Y , 1962) Das kristallisierte Fc-Fragment des Kaninchen-IgG dissoziiert bei 0,05 in NaCl und pH 2,7 in Halbfragmente Diese vereinigen sich bei neutralem pH spontan (Niseonoff, A , Wissler, F , Lipmann, L, Woernly, D : Arch Biochem 89, 230,1960)

Die Halbfragmente des Fc-Fragmentes haben ein Molekulargewicht von ungefähr 10 000 Demgegenüber beträgt das Molekulargewicht der H-Ketten etwa 50 000, das der L-Ketten 20 000, des gesamten IgG-Moleküls 140 000 bis 150 000 Molekulargewicht Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte ist bei Dissoziation der Fc-Fragmente durch Ansäuern eine Isolierung derselben durch die bekannten Verfahren der Ultrafiltration, Gradientenzentrifugation sowie durch Gelfiltration und andere chromatographische Verfahren möglich Die C-terminale Gruppe läßt sich durch weitere Aufspaltung vor der nach der Fraktionierung gewinnen (vgl Givol, D , Porter, R) Die Aufspaltung der Immunglobuline erfolgt enzymatisch durch Papain oder Pepsin bzw durch milde chemische Hydrolyse Die Isolierung der Fc-Fragmente bzw der Gewinnung der Halbfragmente und der C-terminalen Anteile aus diesen ist also allgemein bekannt

Als Ausgangsstoffe können dabei Immunglobuline aus Blutseren autologer, allogener, wie auch xenogener Herkunft, ebenso wie auch Immunglobuline, die aus dem Kulturmedium von Zellkulturen aus antikörperbildenden, geklonten Zellen verwen-

det werden Wegen des relativ niederen Molekulargewichtes der Fc-Fragmente und ihrer Anteile, die erfindungsgemäß ebenfalls zur Therapie verwendet werden ist auch eine chemische partielle oder totale Synthese, wie auch eine Biosynthese durch genetic engineering aus Bakterien oder in Kultur gehaltenen Zellen möglich Auch solche, künstlich gewonnenen Moleküle, können erfindungsgemäß verwendet werden

Die gewünschte biologische Wirkung der Fc-Fragmente und ihrer Anteile beruht auf der Blockierung von Rezeptoren für native Immunglobuline auf Zellmembranen, die sonst mit nativem IgE besetzt werden würden und andererseits an der Blockierung von Antigen-Antikörperprodukten für die Komplementanlagerung Diese Funktionen können, wie gesagt, auch durch Fc-Halbmoleküle und deren C-terminalen Anteilen ausgelöst werden

Die allo- und xenogenen Fragmente sind trotz ihren Unterschieden in dem Anteil nahe der Bruchstelle zum Fd-Fragment wegen der Verkleinerung der Molekülgröße weniger immunogen als native, nicht fragmentierte Immunglobuline Sie führen deshalb weniger zur Sensibilisierung Eine weitere Abspaltung der allo- und xenogenen Anteile kann bei Erhalten der Wirkung die Verträglichkeit weiter verbessern Die Verträglichkeit besonders von xenogenen Fc-Fragmenten kann aber auch durch tolerogene Dosierung in ansteigenden Konzentrationen, bei wiederholten Applikationen, in kurzen, sich verlängernden Zeitabständen von Stunden bis zu 3 - 5 Tagen erreicht werden Dabei tritt die eigentliche therapeutische Wirkung dann erst bei Erreichung der erforderlichen Konzentration nach der zweiten bis vierten Behandlung ein Man beginnt

dann zweckmäßig mit Konzentrationen, die für die erwünschte Wirkung unterschwellig sind und steigt bis zur wirksamen Konzentration an. Für diese können Lösungen der Fc-Fragmente bzw. Anteile von diesen verwendet werden, die ein Vielfaches (10 - 30fache) der im Serum enthaltenen Menge an Fc-Bestandteilen beträgt. Das Normalserum enthält rund 1/7 des Gewichtes der Immunglobuline pro ml, also etwa 20 Gramm pro Liter. Bei der Anwendung allogener Fc-Fragmente, Halbfragmente und C-terminalen Gruppen xenogener Herkunft ist keine toleranzserzeugende, einleitende Behandlung notwendig. Die therapeutische Anwendung erfolgt in isotoner, schwachsaurer (pH 4,8 - 6,8) bzw. neutraler Lösung, gegebenenfalls auch in Mischungen mit Blutersatzlösungen, z. B. aus Dextran-, Stärke- und Aminopectinderivaten. Die Behandlung erfolgt systemisch, parenteral oder durch Inhalation von Aerosol, besonders bei Allergien der Bronchialschleimhäute und auch oral. Dabei können die Wirkstoffe in Form einer Wasser-in-öl-Emulsion in der wäßrigen Phase (DBP 2640707 - Verfahren zur Herstellung von Arzneipräparaten mit einem Gehalt von im Darm resorbierbaren Protein- und Peptidlösungen) oder inkorporiert in Liposomen entsprechend DBP 2650502 (Herstellung von Liposomen, welche Arzneistoffe enthalten) angewandt werden. Weitere Merkmale und Vorteile von bevorzugten Anwendungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachfolgenden Beispielen.

Beispiel 1

Es werden Fc-Fragmente nach den in der Beschreibung erwähnten Verfahren (vgl. auch Carl Steffen: Allgemeine und experi-

mentelle Immunologie und Immunpathologie: Georg Thieme-Verlag, 1968, S. 171 und die darin angegebene Literatur) aus isolierten, gepoolten, humanen Immunglobulinen gewonnen und in Konzentrationen von 0,5 g, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung bei pH 6,8, i. m., oder i. v. injiziert.

Beispiel 2

Es werden die C-terminalen Anteile von Fc-Fragmenten aus gepoolten, xenogenen Immunglobulinen nach dem Verfahren von Givol und Porter (Bio Chem J 97, 320, 1965) gewonnen und diese wie im Beispiel 1 angewandt.

Beispiel 3

Es werden xenogene Fc-Fragmente in tolerogener Dosierung angewandt, wobei am ersten Tag in der 1. Stunde 10 ng und 3 - 4 Stunden später 10 µg, dann am zweiten Tag 10 mg und ab dem dritten Tag jeweils 0,5 g und in weiteren Abständen von zunächst 2 - 3 Tagen 1 g, bis zum Verschwinden der Beschwerden injiziert werden.

Beispiel 4

Es werden entsprechend den Angaben in der Beschreibung die Fc-Fragmente oder C-terminalen Anteile aus diesen, entsprechend den DBP 2640707 und 2650502 zu Emulsionen bzw. Liposomen verarbeitet und diese als Aerosol inhaliert, bzw. oral und inkapsuliert in dünndarmlösliche Kapseln, appliziert.

Beispiel 5

Es werden Fc-Fragmente, die aus Immunglobulinen, die in Zellkulturen synthetisiert wurden, verwendet

Beispiel 6

Es werden Fc-Fragmente oder deren C-terminaler Anteil entsprechend den Methoden der genetischen Synthese von Insulin synthetisiert und therapeutisch verwendet

Beispiel 7

Es werden Fc-Fragmente oder deren C-terminaler Anteil nach chemischen Methoden der Peptidsynthese gewonnen und therapeutisch verwendet

Beispiel 8

Es werden Fc-Fragmente oder deren C-terminaler Anteil durch eine Kombination der

Syntheseverfahren von Beispiel 6 und 7 gewonnen, wobei im Anschluß an die Biosynthese die Syntheseprodukte chemisch modifiziert werden

Beispiel 9

Es werden Fc-Fragmente in einer Infusionslösung aus Dextran appliziert

Beispiel 10

Es werden Fc-Fragmente nach DBP 2650502 in Liposomen inkorporiert, als Aerosol versprüht und inhaliert oder oral eingenommen

Beispiel 11

Es werden Fc-Fragmente in die wäßrige Phase einer Wasser-in-öl-Emulsion nach DBP 2640707 eingebracht und diese in einer dünn darm löslichen Kapsel eingenommen

Europäische Patentschrift

Verfahren zur Anreicherung von tumorhemmenden Wirkfaktoren

EPA Nr : 80106066 6

vom 07 10 1986

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von sterilen, biologischen Wirkfaktoren aus einem Substrat aus Zellhomogenisaten von Organgeweben oder von Körperflüssigkeiten, insbesondere die Gewinnung von sterilen Wirkfaktoren, die zur Inhibition von Stoffwechselfvorgängen in Tumorzellen verwendbar sind, durch Affinitätschromatographie der wäßrigen Substratlösungen an trägergebundener DNS aus fetalen Geweben und/oder aus Tumorgewebe und/oder in vitro kultivierten Tumorzellen sowie die Elution von der trägergebundenen DNS

Patentansprüche

1 Verfahren zur Anreicherung von Wirkfaktoren zur Inhibition von Stoffwechselfvorgängen in Tumorzellen aus Zellhomogenisaten von normalen fetalen oder juvenilen Organgeweben oder von Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet durch

- a) die schonende Sterilisation von pulverisierten Ausgangsstoffen, bevorzugt durch Aufkondensieren flüchtiger Säuren oder Basen,
- b) die Abtrennung von Zellkern- und Membranbestandteilen ,
- c) den enzymatischen Abbau von Lipiden und Kohlenhydraten,
- d) die Entfernung aller Bestandteile mit einem Molekulargewicht von weniger als 600 und mehr als 1 Mio Dalton aus dem

erhaltenen Reaktionsgemisch,

- e) die Affinitätschromatographie der so erhaltenen wäßrigen Substratlösung an trägergebundener DNS aus fetalen Geweben und/oder aus Tumorgewebe und/oder in vitro kultivierten Tumorzellen und
- f) die Elution des von der trägergebundenen DNS zurückgehaltenen Anteils dieser Substratlösung, insbesondere durch Anlegen eines elektrischen oder elektromagnetischen Feldes

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verfahrensschritt a) in der Weise ausführt, daß man die Substrate im Vakuum Dämpfen von Persäuren oder von Mischungen von Persäuren und den entsprechenden konzentrierten Säuren aussetzt

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von tumorhemmenden Wirkfaktoren aus einem Substrat aus Zellhomogenisaten von Organgewebe und/oder von Körperflüssigkeiten, insbesondere die Gewinnung von sterilen Wirkfaktoren, die zur Inhibition von Stoffwechselfvorgängen in Tumorzellen verwendbar sind

Aufgrund eigener Versuchsergebnisse über die Beeinflussung des Wachstums und des Stoffwechsels von menschlichen Gewebezellen in Zellkulturen durch Behandlung mit makromolekularen Organextrakten (V Paffenholz und K Theurer: Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf

menschliche Zellen in vitro: I Diploide Kulturen, II Tumorzellkulturen: Der Kassenarzt, H 27, S 5218 - 5226, 1978; H 19, S 1876 - 1887, 1979) wurde festgestellt, daß eine Hemmwirkung auf Tumorzellen und heteroploide Zellen durch höhere Verdünnungen in einer Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-9} g/ml Kulturmedium und eine Stimulierung von gesunden Normalzellen durch höhere Konzentrationen zwischen 10^0 bis 10^4 g/ml Kulturmedium zu erzielen war Die Wirkfaktoren wurden als Proteine bzw Peptide identifiziert Aufgrund dieser Unterschiede war zu vermuten, daß es sich um unterschiedliche Faktoren zur Hemmung und Stimulierung mit unterschiedlichen Angriffspunkten handeln würde (K Theurer: Prophylaxe und Therapie von Präkanzerosen und Malignomen mit makromolekularen Organextrakten: Krebsgeschehen 4, 80 - 86, 1980) Dies führte zur Entwicklung des vorliegenden Verfahrens zur Trennung der hemmenden und stimulierenden Faktoren aus Zellhomogenaten Ergebnisse von S R Burzynsky, K Stolzmann, B Szopa, E Stolzmann und O P, Kaltenberg: Antineoplaston A in Cancer Therapy: Physiological Chemistry and Physics 9, 485 - 500 (1977) zeigen, daß solche tumorhemmenden Faktoren im menschlichen Harn von gesunden Individuen enthalten sind und aus diesen gewonnen werden können Ebenso ist auch bereits bekannt, daß in dem Blut von gesunden Individuen tumorhemmende Faktoren enthalten sind

Ziel der Erfindung ist es, die tumorhemmenden Wirkfaktoren aus den oben genannten Organextrakten oder Körperflüssigkeiten selektiv anzureichern und von unerwünschten Begleitsubstanzen zu befreien, um sie der wissenschaftlichen, therapeutischen und industriellen Verwertung zugänglich zu

machen

Gemäß der Erfindung wird das in wäßriger Form vorliegende Substrat, das von partikulären Begleitstoffen frei ist bzw befreit ist, mit Hilfe eines biologischen Trennmittels, bei dem mindestens eine Nukleinsäure an eine Trägersubstanz gekoppelt ist, selektiv aufgetrennt, wobei zunächst nicht affine Komponenten und anschließend die die affinen Wirkstoffe enthaltenden Fraktionen eluiert werden Zur Gewinnung des die affinen Wirkstoffe enthaltenden Eluats werden besondere Hilfsmittel eingesetzt, die die Wirkstoffe vom Trennmittel ablösen Das so erhaltene Eluat kann einer weiteren Fraktionierung unterworfen werden, wobei physikalisch-chemische Fraktionierungen bevorzugt sind Die Auftrennung des Substrates erfolgt somit erfindungsgemäß durch Affinitätschromatographie bzw durch eine Kombination von Affinitätschromatographie und Elektrophorese Dabei kann die Elektrophorese nach Art der "Free-flow-Elektrophoresis" durchgeführt werden Die Affinitätschromatographie erlaubt eine selektive Abtrennung der gewünschten Wirkfaktoren, wenn die Nukleinsäuren, die mit der Trägersubstanz unter Bildung des Trennmittels gekoppelt werden, in Abhängigkeit von den gewünschten Eigenschaften des bzw der zu gewinnenden Wirkfaktoren ausgesucht werden Die Nukleinsäuren, die zur Herstellung des Trennmittels eingesetzt werden, werden ihrerseits aus einem Substrat der eingangs genannten Art isoliert Hierbei ist es zweckmäßig, das Substrat vor der Abtrennung dieser Stoffe von unerwünschten oder unwirksamen Begleitstoffen zu befreien Die unerwünschten bzw unwirksamen Begleitstoffe können enzymatisch abgebaut werden, wonach die Abbauprodukte durch Dialyse von Bruch-

oder durch Ultrafiltration entfernt werden. Hierbei werden in der Regel Produkte mit einem Molekulargewicht unter 600 Dalton beseitigt.

Die Herstellung des Trennmittels kann unter Verwendung von hochgereinigten Nukleinsäurefraktionen durch Bindung derselben an inertes Trägermaterial für die Affinitätschromatographie nach an sich bekannten Verfahren erfolgen. Es wurde gefunden, daß bestimmte trägergebundene Nukleinsäurefraktionen eine besondere Affinität zu tumorhemmenden Wirkstoffen besitzen. Im einzelnen gliedert sich das erfindungsgemäße Verfahren in folgende Schritte:

- a) die schonende Sterilisation der als Ausgangsstoffe dienenden fetalen oder juvenilen Organgewebe in pulverisierter Form durch Aufkondensieren flüchtiger Säuren oder Basen zur Inaktivierung etwaiger viraler Bestandteile bei gleichzeitiger Verbesserung der hydrophilen Eigenschaften durch partielle Lyse in molekulare Untereinheiten und die Addition von Resten der verwendeten Säuren und Basen,
- b) die Abtrennung von Zellkern- und Membran-Bestandteilen aus dem Substrat,
- c) den enzymatischen Abbau von Lipiden und Kohlenhydraten,
- d) die Entfernung aller Bestandteile mit einem Molekulargewicht von weniger als 600 und mehr als 1 Mio Dalton aus dem erhaltenen Reaktionsgemisch,
- e) die Chromatographie der so erhaltenen wäßrigen Substratlösung an trägergebundener DNS aus fetalen Geweben und/oder aus Tumorgeweben und/oder aus in vitro kultivierten Tumorzellen und
- f) die Elution des von der trägergebundenen DNS zurückerhaltenen Anteils der Substratlösung, ggfs durch Anlegung eines

elektrischen Feldes entsprechend dem Stand der Technik

Voraussetzung für die therapeutische Anwendung von Wirkstoffen aus biologischen Geweben ist die Sterilität bezüglich Viren. Das Verbot der Behandlung mit ionisierenden Strahlen bei Arzneimitteln und die Denaturierung durch chemische Behandlung macht ein besonders schonendes Sterilisationsverfahren a) bedeutungsvoll. Dieses Verfahren ist auch für die Durchführung der weiteren Verfahrensschritte günstig, weil dabei gleichzeitig eine Verbesserung der hydrophilen Eigenschaften und die partielle Aufspaltung in molekulare Untereinheiten erreicht wird. Die acide bzw. alkalische Wirkung durch die Addition von Säuren und Laugen ist durch eine geeignete Pufferung leicht neutralisierbar, so daß während des Trennungsvorgangs ein optimaler pH-Wert gewährleistet wird. An Zellkulturen und Tierversuchen konnte im Vergleich der nach dem Verfahrensschritt a) gewonnenen Präparate mit Präparationen, die nur der Gefriertrocknung unterworfen wurden, eine signifikant bessere Hemmwirkung auf Tumoren erzielt werden. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Verfahrensschritt a) die Wirksamkeit des Endproduktes günstig beeinflusst. Bei dem Verfahrensschritt a) werden Dämpfe von konzentrierten Säuren bzw. Basen, vorzugsweise von konzentrierter Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin und/oder Mischungen von Persäuren mit den entsprechenden konzentrierten Säuren verwendet, wobei man die pulverisierten Substrate bzw. Konzentrate mit der zur Beeinflussung verwendeten Substanz im Vakuum bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Erwärmung bedampft und den Dampf auf dem Substrat kondensiert. In der deutschen Patentschrift

ist die Verfahrensweise im Hinblick auf einen partiellen Aufschluß des Ausgangsmaterials beschrieben. Es wurde nun gefunden, daß sich dieses Verfahren bei Verwendung von Stoffen mit sterilisierenden Eigenschaften hervorragend für Sterilisierung eignet. Perverbindungen sind besonders bevorzugt.

Es konnte nun in Versuchen mit Organpulvern aus virusinfizierten Hühnerembryonen nachgewiesen werden, daß mit einer Modifizierung des Verfahrens zum gesteuerten chemischen Aufschluß von Organen für therapeutische Zwecke (Deutsche Patentschrift 1090821) Sterilität erreicht wird. Das Verfahren wurde dadurch modifiziert, daß die Substrate bei einem Restwassergehalt von 5 bis 30% gegenüber einem Normalwassergehalt von 60 bis 87% von Frischgeweben, der Einwirkung von Säuredämpfen im Vakuum ausgesetzt werden, denen die entsprechenden Persäuren, besonders von Ameisensäure, Essigsäure oder Schwefelsäure, in einem Mischverhältnis von 1 Teil Persäure zu 1 bis 4 Teilen des entsprechenden Säureanhydrids zugesetzt sind. Auch können Dämpfe von Säuren verwendet werden, denen bei der Herstellung eine geringere Menge von Wasserstoffperoxid zugesetzt wird, als zur Herstellung der Persäure erforderlich wäre, z. B. zu 10 Teilen einer 98%igen Ameisensäure, 0,1 bis 0,8% von 30%igem Wasserstoffsuperoxid zusammen mit 0,5% konzentrierter Schwefelsäure, anstatt 10 Teilen konzentrierter Ameisensäure mit 1 Teil Wasserstoffsuperoxid und zu 10 Teilen Essigsäureanhydrid nur 0,5 bis 4 Teile frisches 30%iges Wasserstoffperoxid anstatt 5 Teile desselben. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die "partiellen" Persäuren weniger aggressiv und besser manipulierbar,

dh. weniger explosiv sind.

Bei der Bedampfung des Substrates wird die Menge der Säure, die auf dem Substrat kondensiert, zweckmäßigerweise so gehalten, daß sie der Einwirkung einer 0,5 bis 2%igen Persäure entspricht. Der Kondensationsvorgang kann, wenn erforderlich mehrmals wiederholt werden, indem man das Vakuum kurz absenkt, bevor man erneut die Säuredämpfe einströmen und auf dem Substrat kondensieren läßt. Die Einwirkung kann bei nicht begrenzten Säuremengen einige Minuten, und bei Säuremengen, die auf die Substratmenge abgestimmt sind, bis zu mehreren Stunden betragen.

Der Nachweis der Sterilität des Substrates erfolgt durch die bekannten Methoden der Mikrobiologie und Virologie über die Züchtung der Viren in Hühnereiern oder in Zellkulturen. Der Nachweis der noch erhaltenen biologischen Wirkung der Präparate erfolgt durch Bioassay an Zellkulturen (vgl. V. Paffenholz und K. Theurer: Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro - s. o.) sowie durch Tierversuche.

Das Verfahren führt zu keinen toxisch wirkenden Produkten, wie z. B. Heterozyklen, weil die erhaltenen Bruchstücke wegen des fehlenden Wassers nicht miteinander reagregieren oder konjugieren. Die in geringem Ausmaße entstehenden Peroxide bewirken in den Substraten bei der therapeutischen Anwendung eine erwünschte Reizwirkung, ähnlich wie bei der therapeutischen Anwendung von Ozon. Auch läßt sich bei diesem Verfahren die nicht zur Reaktion gekommene Säure durch Erhöhung des Vakuums absaugen. Sonst kann auch eine Neutralisierung durch Einblasen von Alkalidämpfen oder von Merkaptoäthanol, und erneutes Absaugen erfolgen. Durch die

dadurch ausgelöste Reduktionswirkung läßt sich die vorausgegangene Oxidationswirkung zum Teil wieder aufheben. Es ist auch möglich, gefrorenes, nicht getrocknetes Gewebepulver zunächst bis zum Erreichen der gewünschten Restfeuchtigkeit durch Gefriertrocknung oder in Anwesenheit hygroskopischer Stoffe bzw. von konzentrierter Schwefelsäure vorzutrocknen, bevor man den Sterilisationsvorgang einleitet. Trockengewebe mit einer zu geringen Restfeuchtigkeit können durch Einleiten von Wasserdampf oder Anfeuchten vorbehandelt werden.

Über die Peressigsäure als Möglichkeit der "Kaltsterilisation" bei der Aufbereitung thermosensibler Instrumente haben K. Bansemir, H. Bellinger, K. Disch und W. Kästner in "Hygiene und Medizin" 4 (1979) 311 - 316, publiziert. Dabei wurde der sterilisierende Effekt einer 1 bis 2%igen Lösung auf Papova-Viren, Entero-Viren, Poliomyelitis Typ I, als auch Coxsackieviren Typ B III und Hepatitis-B-Viren nachgewiesen. Auch wurde über toxikologische Untersuchungen berichtet. Die Anwendung von Säurelösungen ist jedoch nicht mit dem vorliegenden Verfahren identisch, weil hier die Anwendung bei Raumtemperatur in Form von Säuredämpfen erfolgt und beim Trocknungsvorgang die nicht zur Reaktion gekommene Säure wieder durch Absaugen beseitigt wird. Die Verfahrensschritte b) bis d) dienen zur vorbereitenden Abtrennung wirksamer Bestandteile aus dem aufzuarbeitenden Substrat und zur Vorbereitung des aufzutrennenden Substrates. Für die Vorbereitung der Affinitätschromatographischen Apparatur (Verfahrensschritt e)) werden die DNS-Bestandteile von foetalen Zellen oder Tumorzellen benötigt. Zu deren Gewinnung wird z. B. die fraktionierte Schwer-

krafttrennung von Zell- bzw. Gewebematerialien bzw. Suspensionen von entsprechenden Trockenpulvern bis zum 100000 g Überstand verwendet (vgl. V. Allfrey: Isolation of subcellular components: The cell: Vol. I; I. Brächet und A. E. Mirsky, Editors, Academic Press, London, 1959 - National Cancer Institute Monograph 21: Development of Zonal Centrifuges and Auxiliary Systems for Tissue Fractionation and Analysis: National Cancer Institute Bethesda, Maryland, USA, 1966). Zur weiteren Isolierung werden die einzelnen Fraktionen aus Zellkernen mit Enzymen behandelt z. B. mit Ptyalin und Maltase sowie mit Beta- oder Gamma-Amylase zum Abbau von Eiweißkörpern (Literatur über Isolierung von DNA aus Zellen: W. Meinke, D. A. Goldstein, M. R. Hall: Anal. Biochem. 58, 82 (1974); G. G. Markov, I. G. Ivanov: Anal. Biochem. 59, 555 (1974); I. G. Ivanov, P. Venkov, G. G. Markov: Preparative Biochem. 5, 219 (1975)). Die Abbauprodukte der enzymatischen Reinigung können durch Dialyse bzw. Ultrafiltration (600 Mol. Gew.) beseitigt werden (B. L. Williams und K. Wilson: Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken, S. 106; Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)). Bei der Isolierung darf das Ionenmilieu und pH des Substrates nur soweit verändert werden, als keine Denaturierung der Wirkstoffe eintritt. Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographischen Trennung (Arbeitsschritt e)) wird die entsprechende DNS-Fraktion an inertes Trägermaterial, möglichst durch kovalente Bindung, an funktionelle, chemische Gruppen gekoppelt, ohne daß dabei reaktive, wirkungsspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Als Trägermaterial kommen in Betracht z. B. Zellulose, Sephadex, Hydroxylapatit, Polyacrylamid-

Gel, Polyäthylengranulat, Agarose, Glasperlen, Silikonpartikel, Kieselgel, Zinkoxid, Aluminiumhydroxid u a Die Verfahren sind auch hier im einzelnen bekannt (vgl E Paoletti et al : J Biol Chem 249, 3273 (1974); N Sigal et al : Proc Nat Acad Sei , USA 69, 3537 (1972); R L Tsai, H Green: J Mol Biol , 73, 307 (1973); Sutton, D und Kemp, J D : Biochemistry 15, S 3153 (1976); Smith, I et al : Anal Biochem 48, S 27 (1972); I A Lautenberger, S Linn: J Biol Chem 247, 6176 (1972)) Die trägergebundene Nukleinsäurefraktion wird nun als Säulenfüllung für die Affinitätschromatographie verwendet (vgl P Cuatrecasas: Affinity Chromatography of Macromolecules: Advances in Enzymology, Ed by A Meister, 36, 29 (1972), Interscience, New York; F Friedberg: Chromatography Reviews 14: 121 (1971)) Dabei wird eine Apparatur als Kombination von Chromatographie und Elektrophorese in Art der "Free-Flow-Electrophoresis" verwendet (N Seiler, I Thobe, G Werner: Elektrophorese im trägerfreien Pufferstrom; Z Physiol Chem 351, 865 (1970); K Hannig: Z Anal Chem 338, 211 (1964))

Die Gewinnung von stimulierenden Fraktionen aus dem Substrat erfolgt aus dem primären Eluat, diejenigen von Hemmfaktoren aus dem sekundären Eluat Sobald die Packung der trägergebundenen Fraktion durch Absorption des zu trennenden Substrats gesättigt ist, wird die Apparatur mit Pufferlösung geringerer Ionenstärke durchgespült Danach erfolgt die sekundäre Elution der absorbierten Fraktion Diese Elution kann durch Erhöhung der Ionenstärke und Veränderung des pH des verwendeten Puffers erfolgen Besonders schonend und vorteilhaft ist eine

neuartige Methode durch Anlegung eines elektrischen Gleichstromfeldes oder eines Wechselfeldes geeigneter Frequenz Diese Art der Elution hat den Vorteil, daß die Apparatur nach erneuter Durchspülung mit der primär zur Trennung verwendeten Pufferlösung erneut verwendet werden kann Auch die Einwirkung eines elektromagnetischen Feldes senkrecht zur Durchflußrichtung der Pufferlösung, ggfs in Kombination mit der Elektrophorese dient diesem Zweck Die Auftrennung des Substrates in der nach c) wie vorstehend beschriebenen vorbereiteten Trennapparatur erfolgt zweckmäßigerweise durch getaktete Proteinaufgabe und Elutionsschritte Dabei werden in einem ersten Schritt die nicht-affinen Komponenten gewonnen und nach einer anschließenden Reinigungsspülung der Apparatur sekundär die Elution des absorbierten Wirkfaktors, wie beschrieben, durchgeführt Das sekundäre Eluat enthält die gewünschten Wirkkomponenten Zur Gewinnung von tumorhemmenden Faktoren wird die Trennapparatur mit trägergebundener DNS aus foetalen Geweben und/oder aus verschiedenen Tumorgeweben konditioniert Der absorbierende Faktor kann dabei aus einer einzelnen Ausgangssubstanz oder aus einer Kombination verschiedener Substanzen, wie z B aus verschiedenen Tumorarten und Metastasen, wie z B aus soliden Tumoren und aus leukämischen Zellen, die auch in Zellkultur gewonnen werden, ggfs kombiniert mit foetalen Geweben bestehen

Die so gewonnenen angereicherten Faktoren können in wäßrigen Lösungen oder inkorporiert in Liposomen bzw in einer Wasser-in-Öl Emulsion (vgl deutsche Patentschriften 2650502, 2656333 sowie 2640707) in der wäßrigen Phase angewandt werden Weitere Merkmale und Vorteile von bevorzugten Aus-

führungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachfolgenden Heispielen

Beispiel 1

Aufschluß und Sterilisation von Trockenpulver aus Leber durch Schwefelsäure im Vakuum

100 g feinpulverisiertes Trockenpulver aus Leber werden verteilt auf einer Petri¹schale in einer Schichtdicke von 0,5 cm in einen Exsikkator gebracht, der wahlweise mit einem Kältekondensator über ein Pumpensystem für Hochvakuum, gleichzeitig aber auch mit einem kommunizierenden Vakuumgefäß in Verbindung steht, das sich durch ein Ventil vom Hauptexsikkator absperrern läßt

Es wird nun zunächst in das kommunizierende Vakuumgefäß konzentrierte Schwefelsäure bei Zimmertemperatur eingefüllt und das Verbindungsventil zum Exsikkator abgesperrt Um eine etwaige Restfeuchtigkeit durch hygroskopische Wirkung des Trockenpulvers zu beseitigen, wird nun zunächst mit Hilfe des Kältekondensators, der mit Accton-Kohlensäure-Schnee unterkühlt wird, Wasser aus dem Gewebepulver sublimiert und anschließend unter Abschaltung dieses Kondensators mit Hilfe eines Hochvakuumaggregates so lange abgesaugt, bis der Druck im Exsikkator 10^{-4} Torr erreicht Danach wird das Ventil zu dem kommunizierenden Gefäß geöffnet, so daß nun Schwefelsäure in dampfförmigem Zustand in den Exsikkator eindringen kann

Das Vakuum fällt jetzt auf den Dampfdruck der Schwefelsäure ab Nun wird die Verbindung zum Rezipienten der Säure unterbrochen, vorher aber die kommunizierenden Rezipienten von dem Pumpen-

aggregat getrennt Durch Einblasen von Stickstoff in den Exsikkator wird das Vakuum über dem Leberpulver nur geringgradig weiter verschlechtert Dadurch kondensiert der Schwefelsäuredampf auf dem Leberpulver Nach einer gewissen Einwirkungszeit wird die Verbindung zum Pumpensystem und zum Rezipienten für die Säure wieder geöffnet und nach Erreichen des Dampfdruckes der Schwefelsäure der Vorgang zweimal wiederholt Zum Schluß wird dann die Verbindung zwischen den beiden kommunizierenden Gefäßen nicht wiederhergestellt, sondern lediglich zwischen Exsikkator und dem Pumpensystem Es wird nun so lange abgepumpt, bis alle Schwefelsäure aus dem Exsikkator entfernt ist, die nicht chemisch zur Reaktion gekommen ist Auf diese Weise kann auch die Wasserstoffionenkonzentration des Trockenpulvers aus Leber auf der sauren Seite beliebig verändert werden Je intensiver und länger die Absaugung erfolgt, um so mehr wird der pH-Wert neutral

Beispiel 2

Abtrennung unwirksamer Bestandteile

1 g der nach Beispiel 1 gewonnenen feinpulverisierten Trockensubstanz aus Leber wird in 100 ml phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung (pH 7,4) durch Turbomixer bei 6 - 10°C homogenisiert und bei 200 g 10 Minuten zentrifugiert Der überstand enthält die zytoplasmatischen Zellbestandteile: das Sediment die Zellkern- und Membranfraktion Sediment und überstand werden getrennt weiter aufgearbeitet,

a) Der überstand wird mit 40 ml 5 mM Tris (-Hydroxymethyl)-Aminomethan in 40 mM NaCl mit 10 ml Natriumtaurocholatlösung (80 mg/ml) versetzt und auf pH 9,2 einge-

stellt Nach Zugabe von 2,5 ml Enzymsuspension (Lipase) wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dadurch werden die Lipasen abgebaut.

Zum Abbau der Polysaccharide zu Glukose wird eine Konzentration von 10 mg Substrat/ml mit Na-Acetat auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt. Nach Zugabe von Amyloglukosidase wird bei 40°C zwei Stunden inkubiert. Anschließend wird gegen phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung (pH 7,4) 24 Stunden dialysiert oder das Substrat ultrafiltriert mit einer Trenngrenze Mol Gew 600.

b) Zur Isolierung der DNS aus dem Sediment wird dieses in 20 ml 0,24 M $\text{Na}_3\text{PC}_{>4}$ (pH 6,8) mit 1% SDS (Natriumdodecylsulfat), 8 M Harnstoff und 10^{-3} M ADTA (Äthylendiamintetraessigsäure) suspendiert und dieser Rohextrakt auf eine 30 x 2,5 cm-Säule mit Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) gegeben. RNS (Ribonukleinsäuren), Proteine und Polysaccharide werden mit 0,24 M $\text{Na}_3\text{PC}_{>4}$ (8 M Harnstoff) eluiert, während DNS selektiv in einem zweiten Eluat mit 0,48 M Na_2HPO_4 -Puffer gewonnen wird.

Beispiel 3

Kopplung von DNS an Trägermaterial

Die Ankopplung der DNS an Zellulose als Trägersubstanz für die Affinitätschromatographie:

Eine DNS-Lösung (1-2 mg/ml in 0,01 M Tris-(Hydroxymethylaminomethan-HCl) (pH 7,4) mit 0,001 M ÄDTA wird mit trockener Zellulose im Verhältnis 1 g Zellulose zu 3 ml DNS-Lösung gemischt. Nach Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur wird das verbleibende Wasser durch Gefriertrocknung entfernt, der dabei ent-

stehende Puder in 20 Volumenteilen Tris-HCl suspendiert und bei 4°C einen Tag inkubiert. Die überschüssige DNS wird durch Waschen mit Pufferlösung entfernt und die DNS-Zellulose 1:20 mit Puffer verdünnt in eine 5 mm-Säule gefüllt.

Beispiel 4

Selektive Adsorption und Desorption des Wirkfaktors

Aus einer Proteinlösung von juveniler Rinderleber, die in Analogie zu den vorhergehenden Beispielen sterilisiert und von unwirksamen Bestandteilen befreit wurde, sollen die hemmenden Faktoren angereichert werden. Man benutzt dazu eine rechteckige Flachgel-Apparatur für Affinitätschromatographie mit Elektroden an den äußeren Längsseiten. Die Apparatur wird mit der nach Beispiel 3 gewonnenen DNS-Zellulose beschickt, wobei die DNS aus foetaler Rinderleber gewonnen wurde.

Die Trennsäule wird äquilibriert mit 0,001 M ÄDTA, 0,01 M Na_3PO_4 (pH 7,4) bei 37°C. Die zu trennende Probe wird dialysiert gegen dieselbe Pufferlösung. Sie wird dann in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml der Trennapparatur zugeführt. Das primäre Eluat enthält die stimulierende Fraktion. Nach einer Trennzeit von 8 Stunden wird die Apparatur mit Pufferlösung durchgespült. Zur sekundären Elution der von der gebundenen DNS absorbierten Faktoren wird bei weiterer Zugabe des Puffers ein elektrisches Wechselfeld von 50 kHz und 1000 V, 5 mA angelegt. Gleichzeitig wird die Ionenstärke des Puffers durch Zugabe von NaCl bis 1 M kontinuierlich erhöht.

Wird ein Gleichstromfeld angelegt (2000 V, 10 mA) kann gleichzeitig eine Auftrennung nach der elektrophoretischen Beweglichkeit

erreicht werden durch örtlich getrennte Entnahmestellen

Die gewonnenen Fraktionen werden an Tumorzellkulturen nach den in "Der Kasernenarzt" Heft 19, Mai 1979, S 1816 - 1887 angegebenen Methoden auf ihre Wirksamkeit geprüft. Damit wird die Fraktion der höchstspezifischen Aktivität ermittelt, wonach die Charge standardisiert wird.

Beispiel 5

Gewinnung von tumorhemmenden Faktoren

Zur Gewinnung von tumorhemmenden Faktoren aus Leber wird die DNS-Fraktion aus einer Mischung von verschiedenen soliden Tumoren (z B Melanom, verschiedene Arten von Karzinom (Mamma, Prostata, Lunge, Magen, Darm, Hirn) und ggfs

Sarkomen aus mesenchymalen Geweben zusammen mit den entsprechenden Metastasen und mit in Kultur gezüchteten Leukämiezellen (lymphatischen Zellen und myeloischen Zellen)) isoliert und entsprechend Beispiel 3 an Zellulose gekoppelt und dann wie in Beispiel 4 zur Auftrennung einer Eiweißlösung aus Leber verwendet. Der Hemmfaktor wird durch sekundäre Elution gewonnen und an Tumorzellkulturen auf seine spezifische Hemmwirkung geprüft. Auf analoge Weise kann auch DNS aus Einzeltumoren, ebenso aus foetalen Geweben, insbesondere foetaler Plazenta und Leber, eingesetzt werden. Auch können Körperflüssigkeiten entsprechend aufgetrennt werden. Tumorhemmende Fraktionen lassen sich besonders auch aus dem maternalen Anteil der Plazenta (Dezidua) gewinnen.

3 US-Patent

Process for Producing Biologically Active Factors

United States Patent

Number: 4,621,055

Date of Patent: Nov 4, 1986

Abstract

A process for producing biologically active factors from a substrate, in the form of cell homogenates of organ tissues, of microorganisms, plant components and/or body fluids. To this end, the substrate, in an aqueous form and freed of accompanying particulate substances, is selectively separated by affinity chromatography using a biological sorbent, in the case of which at least one nucleic acid (desoxyribonucleic and/or ribonucleic acid) or at least one protein or peptide is coupled to a carrier substance; in the primary eluate components having no affinity are present, while the active factors (which have an affinity) are secondarily eluted. By binding nucleic acids or proteins from a given origin to a carrier, active factors with special properties such as tumor inhibiting substances, or stimulating substances may be positively produced.

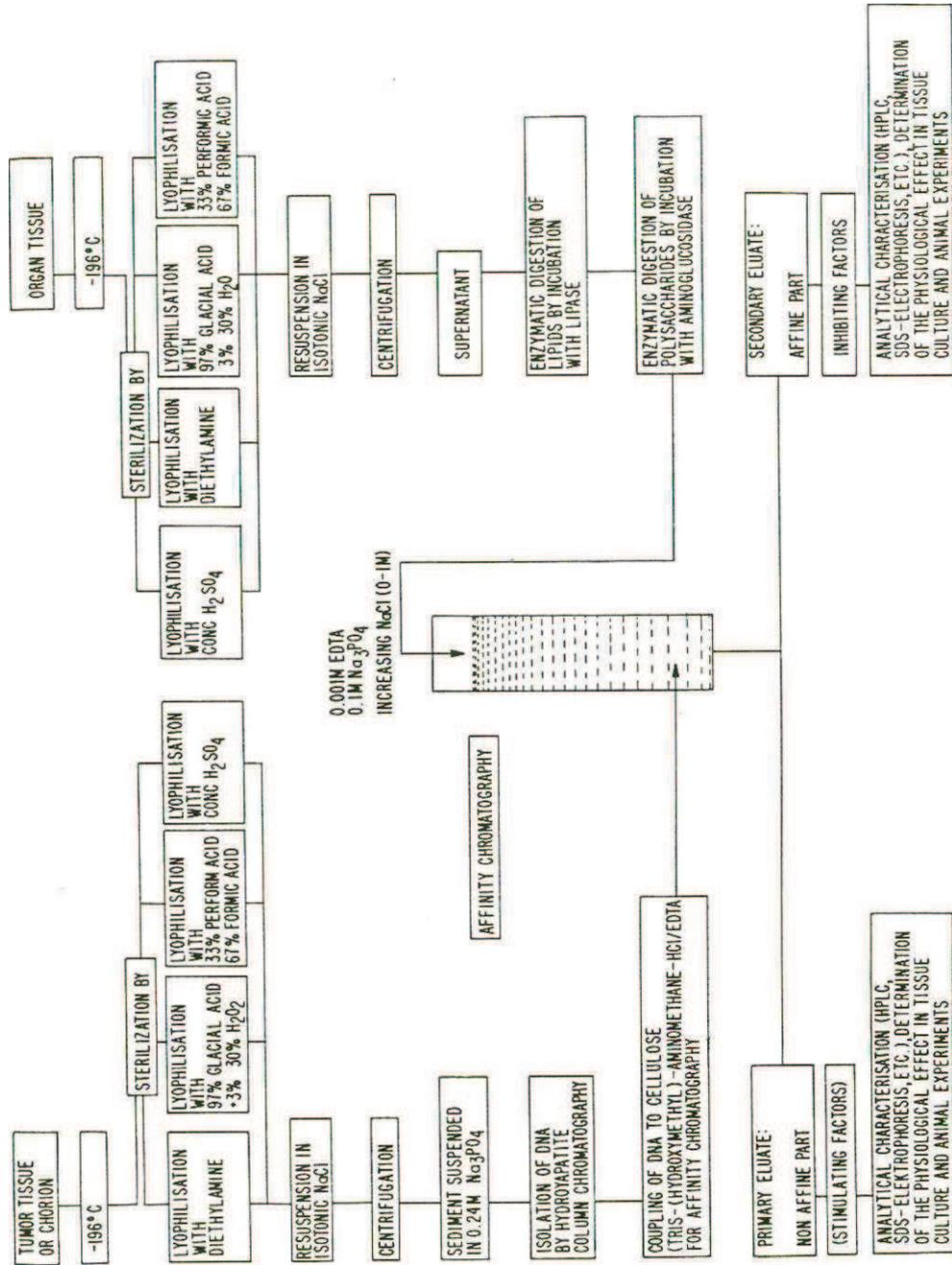
Cross-References to Related Applications

This application is a continuation-in-part of application Ser. No. 415,989, filed Sept. 8, 1982, now abandoned. Application Ser. No. 415,898 filed Sept. 8, 1982 is a continuation of application Ser. No. 202,799, filed Jan. 3, 1980, now abandoned.

Background of the Invention

The present invention relates to a process for producing biologically active factors from a substrate in the form of cell homogenates of organ tissues, of microorganisms, of plant material and/or of body liquids. More specifically, the invention is directed to obtaining sterile, biologically active factors which may be used for the stimulation and, on the other hand, for the inhibition of processes of growth, metabolism, and of synthesis in eukaryotic and prokaryotic cells and tissues.

On the basis of data from my own experiments with respect to effects on growth and metabolism of human tissue cells in cell cultures by treatment with macromolecular organ extracts (V. Paffenholz und K. Theurer: Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro, I. Diploide Kulturen, II. Tumorzellkulturen (the effects of macromolecular organ substances on human cells in vitro, I. diploid cultures, II. tumor cell cultures): *Der Kasernenarzt*, no. 27, pages 5218 to 5226, 1978, no. 19, pages 1876 to 1887, 1979), it has been seen that an inhibitory effect on tumor cells and heteroploid cells was produced at high dilutions in a concentration of 10^{-6} to 10^{-9} g/ml of culture medium, and **Stimulation** of healthy normal cells was produced using high concentrations be-



—3 —6

tween 10⁻¹ to 10⁻⁶ g/ml of culture medium. The active factors were identified as proteins and peptides.

In view of these differences, it seemed likely that different factors were effective for inhibition and **Stimulation** with different sites of action (K. Theurer: Prophylaxe und Therapie von Präkanzerösen und Malignomen mit makromolekularen Organextrakten (prophylaxis and therapy of precanceroses and malignant tumors with macromolecular organ extracts): Krebsgeschehen 4, pages 80 to 86, 1980). This was responsible for the development of the present process for separating inhibiting and stimulating factors from cell homogenisates. Studies of S. R. Burzynsky, Z. Stolzmann, B. Szopa, F. Stolzmann and O. P. Kaltenberg (Antineoplaston A in Cancer Therapy: Physiological Chemistry and Physics, 9, pages 485 to 500 (1977)), make it clear that such tumor inhibiting factors are present in the urine of healthy individuals and may be produced therefrom. It is furthermore known that tumor inhibiting factors are present in the blood of healthy individuals.

One purpose of the invention is that of producing active factors from biological substrates selectively and freeing them of undesired accompanying substances so that they may be used for scientific and therapeutic purposes and in industry. In the present invention the substrate, in an aqueous form, and free or freed of accompanying particulate substances is selectively separated using a biological affinity sorbent, in which at least one nucleic acid, or at least one protein or peptide, is coupled with a carrier substance. Non-binding components are contained in the primary eluate and the active factors, having an affinity, are secondarily

eluated. In this respect, the **wording** "primary eluate" is used in the sense of an eluate which is **provided** by **simple** rinsing of the sorbent, while on the other hand, for **producing** or obtaining the eluate with the **binding** active substances in it, special adjuvants are used having the effect of **desorbing** the active substances or factors from the affinity sorbent. In this respect not only the primary, but **futhermore** the secondary eluate may **undergo further fractionation**, in which respect, in the case of the secondary eluate, **physico-chemical fractionating Operations** are preferred.

With the selective biological separating process of the invention for active substances or factors it becomes possible for biologically active substances or factors having given properties to be separated positively on a substrate made up of a great number of different materials. Separation of the substrate into components is preferably undertaken by affinity chromatography or by a combination of affinity chromatography and electrophoresis. The electrophoresis may be undertaken in the form of "Free-flow-Electrophoresis". The affinity chromatography makes possible selective **Separation** into or of desired active factors, in which respect the nucleic acids or the Proteins, which are coupled with the carrier substance for forming the affinity sorbent, are selected in a way dependent on the desired properties of the desired active factor or factors. The nucleic acids, or, in the other case, the proteins or peptides, used for producing the affinity sorbent, are, for their part, preferably isolated from a substrate of the sort noted at the **Start**. More specifically, if the nucleic acids, or in the other case, the proteins or peptides for the affinity sorbent

are to be isolated from such a substrate, it is best for the substrate to be freed, before separating of these substances, of undesired or ineffective accompanying substances. The undesired or ineffective accompanying substances may be enzymatically degraded, whereafter the products of degradation may be removed by dialysis of fragments or by **Ultrafiltration**. In this respect, as a general rule, products with a molecular weight under 600 will be removed, because it has turned out that the biologically interesting active factors have a higher molecular weight, and, more specially one of the order of 600 to 1,000,000. The enzymatic degradation is preferably undertaken positively in a way dependent on the sort of desired active substances. Carbohydrates and lipids may, generally speaking, be removed, while on the other hand, proteins or nucleic acids will only be removed if they are undesired as active substances. If only Polypeptides or proteins are desired as the active substances, this generally being the case, the nucleic acids may be degraded as well. If, the other way round, the desired active substances are nucleic acids, for example for further use as affinity sorbents, it is then possible for the Polypeptides or proteins to be degraded. Desoxyribonucleic acid will most often be the preferred nucleic acid because, from the biological point of view, it is more interesting. For special purpose, however, ribonucleic acid may be used. Before separating, and more specifically, before the removal of any undesired accompanying substances, the substrate is best sterilized. If a material change in the biological substances is not of key importance, conventional ways of sterilizing, as for example chemical sterilization or sterilization with ionizing radiation may be

utilized. More importantly, however, sterilization by condensing volatile substances with sterilizing properties onto the substrate, in the form of a powder, is to be preferred, as the preferred starting material is also in the form of a powder, the substances for this purpose which are more specially preferred are those in the case of which any excess may be removed by evaporation or Sublimation. Sterilization is best undertaken in vacuo using pressure variations.

The affinity sorbent may be produced by coupling highly purified nucleic acid fractions to inert carrier substance for affinity chromatography of the substrate. The discovery has been made that carrier-bound protein or peptide fractions have a specially high degree of avidity for stimulating acting substances and carrier-bound nucleic acid fractions have such an avidity for inhibitory active substances, for which reason they are preferred for use on these lines for producing the active substances in question in the secondary eluate. In this respect, it is furthermore important from which biological material the protein or peptide fractions on the one hand, and the nucleic acid fractions on the other hand, are produced, which are used for producing the affinity sorbent, as explained in more detail hereinafter. By making the right selection, it is, for this reason, possible to make certain that given active factors, present in the substrate and having given properties, may be positively separated out. The invention is directed not only to the process for producing or obtaining the active factors, but is furthermore directed to the active factors per se, which may be obtained with the process of the invention, and furthermore to the use of such sub-

stances Detailed working examples will be given herein of the invention In this respect, it is to be noted that the substrate may be produced from any sort of biological material containing active factors

The most important of such starting materials seem to be body fluids such as blood, cerebrospinal fluid, amnion-exudates, transsudates, and fluids expressed from tissues and urine

In a preferred form, the process of the invention may be divided into a number of preferred steps, which may be combined together in any suitable way, namely:

- a) non-destructively sterilizing the starting materials to eliminate any viral components while, at the same time, increasing the quality of the hydrophilic properties, that is, the water solubility by partial lysis of the molecular sub-units and the addition of radicals of the acids and alkalis used
- b) separating (first-stage) ineffective or otherwise undesired components of the substrate,
- c) coupling of highly purified desoxyribonucleic acid and/or RNA fractions, more specially, ribosomal RNA and, on the other hand, of protein and peptide fractions to activated inert carrier substance for forming the affinity sorbent for affinity chromatography of the substrate to be separated into its components,
- d) separating (second-stage) the substrate, produced in step b), on the affinity sorbent, prepared in step c), by sample inlet and elution steps,
- e) obtaining tumor-inhibiting factors by affinity chromatography of substrates produced from fetal and/or juvenile normal tissue and/or body liquids of healthy individuals on carrier-bound DNA,
- f) producing stimulating factors,
- g) producing organ-specific fractions, and

h) producing fractions from micro-organism and plant cells

The intermediates of process steps a) may be used per se The sort of use and further processing of the products made in this process will be given in further detail hereinafter On the other hand, steps a) and b) are not necessary for processing the substrate A particularly interesting aspect of the invention is, however, the sort of sterilization and first-stage treatment of the substrate to be separated and electrophoretic elution of the proteins, adsorbed on the carrier-bound substances, by changing the voltage or current level and furthermore the use of special starting materials and their application Scientific details and the sort of the application and further processing are in line with the present stage of development of the art A condition for therapeutic use of active substances from biological tissues in sterility with respect to viruses Government **Prohibition** of processing medicaments with ionizing radiation and of denaturizing by chemical processing makes a specially non-destructive sterilization step a) of key importance This process step is furthermore beneficial with respect to undertaking further process steps later because, at the same time, there are better hydrophilic properties and the partial cleavage into molecular sub-units is effected The acidic or alkaline effect produced by addition of acids and alkalis may readily be neutralized by the right form of buffering so as to make certain of the best pH-value in the separating operation

In the case of cell cultures and animal experiments a significantly better inhibitory effect on tumors and a stimulating effect in the case of normal tissue was produced by preparations obtained using pro-

cess Step a) than is the case with preparations which only underwent freeze-drying. For this reason, it seems clear that process step a) has a favorable effect on the efficacy of the end-product.

In process step a) use is preferably made of vapors of concentrated acids or alkalis, and, more specially, concentrated sulfuric acid, acetic acid, formic acid or diethylamine and/or mixture or peracids with the corresponding concentrated acids, the pulverized substrates or concentrates being acted upon by the vapor of the substance which is to have an effect on them, in vacuo at room temperature without any further heating, the vapor condensing on the substrate. In German Pat. No. 1,090,821, whose process details may be used in the present invention, the workings of such a process are noted in connection with a partial breaking up of the starting material. The discovery has now been made that on using materials with sterilizing properties, this process gives very high-level effects, per-compounds being more specially preferred in this connection. Obtaining or producing sterile medicaments from biological tissues, more specially organ tissues, is frequently hard to undertake because, using conventional disinfectants, full sterility may not be produced without great denaturation and loss of the therapeutic efficacy. For this reason, public health authorities have enacted specially tight rules for producing such medicaments, as for example the keeping of isolated groups of animals and breeding them under sterile conditions. Because of such rules or conditions, there has been an overly great increase in price of the products without, however, producing any full and complete warranty for sterility, more specially with respect to viruses. On the other

hand, the use as well of antibiotics and/or chemotherapeutic agents having the property of inactivating viruses, is linked with the risk of making the patient allergic.

In experiments with organ powders produced from virus-infected chicken embryos, it has been possible to make clear that sterility may be produced by a modification of the process for the controlled chemical breaking up of organs for therapeutic purposes (see German Pat. No. 1,090,821). The process is modified in that the substrates, with 5% to 30% of residual water (in comparison with a normal level of 60% to 87% of water in fresh tissues) are acted upon by the vapors of acids in vacuo, there being the addition, to these acid vapors, of the corresponding peracids, more specially of formic acid, acetic acid or sulfuric acid, in a mixing ratio of 1 part of peracid to 1 to 4 parts of the corresponding acid anhydride. Furthermore, vapors of acids may be used, to which on producing them, a smaller amount of hydrogen peroxide is added than will be necessary for producing the peracid itself. For example there would be the addition to 10 parts of 98% formic acid of 0.1% to 0.8% of 30% hydrogen peroxide together with 0.5% of concentrated sulfuric acid in place of 10 parts of concentrated formic acid with 1 part of hydrogen peroxide, and in the case of 10 parts of acetic anhydride there would be the addition of only 0.5 to 4 parts of fresh 30% hydrogen peroxide (in place of 5 parts of the same). The useful effect of this process is that the "partial" peracids are less aggressive and may be more readily handled, that is to say with less danger of explosion.

On causing the substrate to be acted upon by vapor, the amount of acid, which becomes

Condensed on the substrate, is best so controlled that in effect it is equal to a 0.5% to 2% peracid. The condensation **Operation** may, if necessary, be undertaken a number of times by stepping down the vacuum level for a short time before the acid vapors are run into the apparatus again for condensing on the substrate. If the amount of acid is not metered, the sterilization operation may be undertaken for some minutes, whereas if the amounts of acid are limited or measured out for a given amount of substrate, the operation may be undertaken for a number of hours. The test for sterility of the substrate may be undertaken by ways which are conventional in microbiology and virology by culturing the viruses in hen's eggs or in cell cultures. The testing or assaying of the biological activity of the preparations still in existence is undertaken by bioassay using cell cultures (see V. Paffenholz and K. Theurer: Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro (The effects of macromolecular organ substances on human cells in vitro), see page 94) and by animal experiments. The process is not responsible for any products with a toxic effect, as for example heterocyclic **Compounds**, because the fragments produced do not (because of the absence of water) undergo reaction or conjugation with each other. The peroxides produced at a low level are responsible, on therapeutic applications, for a desired stimulating effect in the substrates like that of ozone when therapeutically used. Furthermore, in the case of this process, the acid which has so far not undergone reaction, may be drawn off by stepping up the vacuum.

In other respects, however, it is furthermore possible for neutralization to be caused

by blowing in alkali vapors as for example of mercaptoethanol and then drawing off again. By the simultaneous reducing effect, the oxidation effect may, in part, be cancelled out again.

The use of peracid vapors makes necessary the use of acid resistant plastic piping and glands. The vessel for the peracids may best be connected by means of a threeway cock with the vacuum pump and, on the other hand, with the recipient for the substrate so that, after producing the vacuum in the substrate recipient, the vacuum pump may be cut off and the acid vapors run into the apparatus.

It is furthermore possible for frozen, undried tissue powder to undergo drying before hand (by freeze-drying to get down to the desired residual moisture level, or by drying in the presence of hygroscopic materials such as concentrated sulfuric acid) before the sterilization operation is started. If the residual moisture level in the dried tissues is overly low, they may be processed in a first stage by running water vapor into the apparatus, or by moistening directly.

Details in connection with peracetic acid for "cold sterilization" for thermosensitive instruments have been given in a paper by K. Bansemir, H. Bellinger, K. Disch and W. Kastner in "Hygiene und Medizin" 4 (1979), pages 311 to 316, from which it will be seen that sterilizing effects are produced with a 1% to 2% **Solution** in the case of papova-viruses, Entero-viruses, Poliomyelitis type I and furthermore in the case of Coxsackie viruses type B III and Hepatitis-B viruses. An account was furthermore given on toxicological testing. The use of acid solutions as such is, however, not the same as the process of the present invention, because in it the opera-

tion takes place at room temperature and with the application in the form of acid vapors, and furthermore on the drying operation the acid which has not undergone reaction, is drawn off again. The acid vapor lysis process in vacuo is used as such furthermore for controlled chemical digestion of organs for therapeutic purposes and more specially of fetal, embryonic juvenile tissues, of fetal bovine liver, thymus, spleen, cardiac muscle and brain for producing special preparations for the treatment of neoplasms and diseases of the immune system.

The sort of digestion and degradation of biological tissues is of key importance for their therapeutic effect, as has been seen to be the case for fetal and embryonic organ preparations produced by the process for controlled chemical digestion of organs and for therapeutic purposes (German Pat No. 1,090,821). The use of such preparations, more specially, of fetal liver, spleen, thymus, cardiac muscle and brain has not been responsible for any incompatibility in the case of animal experiments or in the case of use on humans. The effect of preparations made from fetal and young bovine liver has been surprising in oncology. Although the relation between the carcino-embryonic antigen (CEA) and tumor antigen is known, no report has been come across in the literature to the effect that good prophylactic and therapeutic effects may be produced in the case of experimental tumors by using liver preparations. This has, however, turned out to be the case with preparations produced by the present process in testing on a methylcholanthrene induced tumor (which was induced some years back in the Sloan Kettering Institute of Cancer Research in New York) on transfer by inoculation to

Furthermore, in animal experiments, it was possible for antibody formation to be forced down to a lower level on using preparations of fetal bovine thymus and fetal spleen. This biological immune suppression is important for the treatment of allergic diseases and has furthermore been seen to take place in the case of man on the therapeutic application of such preparations.

On the other hand, in animal experiments using the hemolysis plaque test, as illustrated in Examples 6 and 7, it was possible to determine that such preparations from fetal cardiac muscle, fetal liver and brain make possible an even more intense stimulation of antibody synthesis than is the case with conventional immune stimulants.

The hemolysis plaque technique makes it possible to get readings for the level of immunological defense from the number of influenced antibody-forming cells in the spleen. If there is a greater plaque formation than in the untreated control, this is a sign for a stepping up of immune defense while, on the other hand, a lower figure for plaque formation indicates a drop in immune response. To this end, mice were sensitized with respect to washed ovine erythrocytes and additionally pretreated with preparations (produced by the claimed process) from fetal organs, used in an aqueous, diluted form, and then, at different times later on after the injection, the mice were splenectomized. Then a spleen cell suspension was made up, which together with the ovine erythrocytes and agarose were poured into petri dishes as a thin layer. After incubation for one hour, the development of the plaque-forming cells took place with diluted guinea pig complement which is necessary for the lysis of the cells in addition. The control group was made up

of mice which had not had any organ preparations

The dry organ powders produced by the present process from fetal and juvenile tissues were taken up directly in physiological sodium chloride and suspended or dilutions in water thereof were prepared. Not only the suspensions, but furthermore the diluted solutions may be injected parenterally.

The process step b) for the preliminary separating off of ineffective components from the substrate which is to be processed is, on the one hand, for conditioning the affinity sorbent and, on the other hand, for pre-processing the substrate which is to be separated. For this reason these two preliminary separating operations may be undertaken separately. On the other hand, for separating operation d) it is possible to make use as well of substrates which have not undergone the part-processes a) and b), or have only undergone them in part and which are of different origins. Furthermore, mixtures of different starting materials may be used, although, however, it is best for the ineffective components of the substrate as for example Polysaccharides, glycogen, lipids and possible ribonucleic acid (RNA) to be removed conventionally, this furthermore being true for the DNA from the substrate to be separated, if such DNA is not the desired active factor.

The separation off of ineffective or undesired components is not necessary in the case of the substrate to be separated, because the desired active factor is, as we have seen, selectively bound by the affinity sorbent. Only the nucleic acid components (DNA and/or RNA) of the starting substrate or only the protein or peptide fractions of the same are needed for

readying the apparatus used for affinity chromatography. For separating, fractional centrifugation of the cell and tissue homogenisates (or suspensions from the dry powder) is used giving a 100,000 g supernatant top layer (see V. Allfrey: Isolation of subcellular components: The Cell: Vol. 1. I. Brächet and A. E. Mirsky, Editors, Academic Press, London 1959; National Cancer Institute Monograph 21: Development of Zonal Centrifuges and Auxiliary Systems for Tissue Fractionation and Analysis: National Cancer Institute Bethesda, Md., USA, 1966).

For further isolation, the **Single** fractions of cell nucleic mitochondria, ribosomes and the supernatant top layer are processed with enzymes: for example with ptyalin and maltase and with beta or gamma amylase for the degradation of saccharides, with amyloglucosidase for the degradation of glycogen, with lipase for the degradation of lipids, with RNases for the degradation of ribonucleic acids, with DNase for the degradation of DNA and with proteinases or peptidases (as for example pepsin, papain, trypsin) for the degradation of proteins and peptides. As will be clear, in the preliminary **Separation of** the peptide fractions, no proteinases or peptidases are used and, on producing the nucleic acid fractions, no nucleases are used. (For papers on the isolation of DNA from cells, see: W. Meinke, D. A. Goldstein, M. R. Hall; Anal. Biochem. 58, 82 (1974); G. G. Markov, I. G. Ivanov; Anal. Biochem. 59, 555 (1974); I. G. Ivanov, P. Venkov, G. G. Markov; Preparative Biochem., 5, 219 (1975)).

The degradation products produced by the enzymatic cleaning step may furthermore be removed by dialysis or **Ultrafiltration to** less than 600 molecular weight (see B. L.

Williams and K Wilson: *Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken*, page 106; publisher: Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1978)) On isolation the ionic environment and the pH of the substrate may only be changed to such a degree that no denaturing of the active substances takes place

For getting ready for the Separation by affinity chromatography in working step c), the nucleic acid fraction (mostly DNA) or, however, the protein or peptide fraction is coupled to inert carrier material, as far as possible by covalent bonds, to functional chemical groups, without this being responsible for the blocking of reactive bonding sites having a specific effect. A carrier material may, for example, be cellulose, Sephadex hydroxylapatite, polyacrylamide gel, granulated Polyethylene, agarose, glass beads, silicone particles, silica gel, zinc oxide, aluminium hydroxide etc. Furthermore, detailed forms of the processes are known in the art (see: E Paoletti et al: *J Biol Chem* 249, 3273 (1974); N Signal et al: *Proc Nat Acad Sci USA* 69, 3537 (1972); R L Tsai, H Green: *J Mol Biol*, 73, 307 (1973); Sutton, D and Kemp, J D: *Biochemistry* 15, page 3153 (1976); Smith, I et al: *Anal Biochem*, 48, page 27 (1972); I A Lautenberger, S Linn: *J Biol Chem* 247, 6176, (1972); and on the question of binding of proteins or peptides to carrier substances see: G F B Schumacher and W B Schill: *Anal Biochem*, 48, 9 (1972); E D Sevier: *Anal Biochem* 74, 592 (1976))

The carrier-bound nucleic acid or protein fraction is now used as a column filling for affinity chromatography (see P Cuatrecasas: *Affinity Chromatography of Macromolecules: Advances in Enzymology*, Ed by A Meister: 36, 29, 1972 Interscience,

New York; F Friedberg, *Chromatography Reviews* 14; 121, 1971)

In **this** respect, a preparative **Chromatographic** column or a combined apparatus for chromatography and electrophoresis on the lines of Free-Flow-Electrophoresis may be used (see N Seiler, I Thobe, G Wetner: *Elektrophorese im trägerfreien Pufferstrom* (electrophoresis in a carrier-free buffer current): *Z Physiol Chem* 351, 865 (1970); K Hannig: *Z Anal Chem* 338, 211 (1964)) The use of carrier-bound filier in the case of this free-flow electrophoresis has so far not been noted in the literature

The recovery of stimulating fractions from the substrate is undertaken in a separating apparatus with a carrier-bound protein fraction, while the Separation of the inhibiting factors takes place in an apparatus with DNA fractions, in the secondary eluate. As soon as the packing of carrier-bound fraction is saturated by absorption of substrate to be separated, the apparatus is rinsed thoroughly with a buffer Solution of low ionic strength. This secondary elution takes place of the absorbed fraction. This elution may be undertaken by increasing the ionic strength and changing the pH value of the buffer used. A new process which is specially useful and is very free of undesired effects, makes use of an AC field at a suitable frequency. This sort of elution has so far not been noted in the literature. The useful effect is that the apparatus may be used again, after thorough rinsing with the buffer Solution used for primary desorbing. Furthermore, this purpose is furthered by the effect of an electromagnetic field which is normal to the direction of motion of the buffer Solution, possibly in combination with electrophoresis. The sepa-

ration of the substrate in the separating apparatus, readied in process step c), is best undertaken by sequential or on-off inlet of sample and elution steps. In this respect in a first step, the components without affinity are produced and then, after cleaning the apparatus by rinsing as a secondary step, elution of the absorbed active factor takes place as detailed earlier. The primary eluate and the secondary eluate have the opposite effective components in them.

For producing tumor-inhibiting factors e), the separating apparatus is best conditioned with carrier-bound DNA from fetal tissues and/or from different tumor tissues.

The absorbing factor may, for this reason, be made up of a single starting substance or of a combination of different substances as for example different sorts of tumors and metastases, such as solid tumors and leukemic cells, which are produced in cell cultures, possibly combined with fetal tissues.

The genus or organ specific factors of the substrates to be separated may be produced or obtained by using carrier-bound factors, which are different for the substrate to be separated. The separating operation takes place using the proteins in question with special degrees of specificity as absorption materials. For this reason, for example, factors, which are contained in the liver, may be isolated from kidney tissue or from another tissue: on the same lines it is furthermore possible for feto-embryonic and carcino-embryonic antigens and components to be produced from body fluids. This process is furthermore used for producing inhibiting and stimulating substances with respect to microorganisms. In this respect, carrier-bound DNA from

micro-organisms is used for separating the substrate of the parallel extracts from like or different micro-organisms. In this way it is possible for natural biological antibiotics to be produced while on the other hand stimulating factors take effect on the reproduction and effect of micro-organisms with special functions, as for example of micro-organisms, modified by gene transfer for the synthesis of biological factors as for example insulin and interferon. On these lines, the desired effect of olcophagic micro-organisms may be activated. In the same sort of way, plant factors may be separated, possibly for producing biological plant protection substances or growth factors. On the other hand, the process may furthermore be used for isolating certain gene sections. In this respect the protein fraction, which has been isolated and identified beforehand, is used in a carrier-bound form for separating off the DNA fraction in question. The DNA gene sections to be isolated will then be in the secondary eluate. Taking a general view it may be seen that the present invention is more particularly directed to producing, that is to say obtaining, sterile biological active factors for stimulating, and on the other hand for inhibiting, events in connection with growth, metabolism, synthesis in eukaryotic and furthermore prokaryotic cells and tissues, from cell homogenisates produced from organ tissues, micro-organisms, plant components and/or body fluids (blood, cerebrospinal fluid, amnion-exudates, transudates, fluids expressed from tissues and urine). A list and further detail will now be given to preferred forms of the working steps detailed so far:

a) the sterilization, with as little undesired effect as possible, of biologically active

substances, more specially with respect to viral components and producing better hydrophilic properties, the partial cleavage into molecular sub-units and the addition of radicals from acids and alkalis or bases (used in vapor form), and more specially of concentrated sulfuric acid, acetic acid, formic acid or diethylamine and/or mixtures of peracids with the parallel concentrated acids, in which respect the pulverized substrates or concentrates with the agent for producing the desired effect (and whose boiling point at atmospheric pressure is greater than room temperature) put together in a shut-off or sealed system, but without mixing, are acted upon by such a vacuum as makes possible a change of the agent (for producing the desired effect) into the vapor phase; and, after the desired effect has been produced on the substrate, the unreacted agent is removed again, the starting materials more specially being frozen and pulverized organic tissues, and the chemical agent in vapor form from a present amount is Condensed firstly onto the substrate by lowering the vacuum, and, after the desired effect has been produced, the excess agent is removed again by increasing the vacuum and the products so processed are used per se or in the further process steps;

b) the preliminary removal of ineffective components from the substrate (containing, for example, polysaccharides, lipids, ribonucleic acids and desoxyribonucleic acids (DNA) or, however, protein or peptide fractions) takes place by centrifuging off the cell nuclei and cytoplasmatic components and/or enzymatic degradation, for example using ptyalin and maltase, lipases, RNases, DNases, proteinases or peptidases, dialysis of fragments under a molecular weight of 600 or Ultrafiltration:

e) the coupling of highly purified desoxyribonucleic acid fractions or, on the other hand, of protein or peptide fractions to activated inert carrier material for affinity chromatography of substrates as produced in step b), in which respect for producing stimulating factors, carrier bound protein or peptide fractions (or in the case of producing inhibiting factors, carrier-bound DNA fractions) are used for getting ready a preparative Chromatographic column or a combined Chromatographic and electrophoresis apparatus on the lines of free-flow electrophoresis, if desired, with electrophoretic elution by changing the voltage or current level;

d) separating the substrate produced in step b) in the separating apparatus as made ready in step c) by sample input and elution steps, in which respect, in a first working step the component having no affinity is produced and in a further cleaning rinsing operation undertaken on the apparatus, the elution of the absorbing active factor is undertaken by using an electric DC field or an AC field of the necessary frequency and/or of an electromagnetic-field or by changing the buffer Solution;

e) producing tumor-inhibiting factors by affinity chromatography of substrates, from fetal and juvenile normal tissues and/or body fluids from healthy individuals, or carrier-bound desoxyribonucleic acid from fetal tissues and/or from different tumor tissues or from tumor cell lines cultivated in vitro by themselves or in combination by secondary elution of carrier-bound fractions (whereas the stimulating factors are produced by undergoing primary elution);

f) producing stimulating factors as well from substrates produced from normal

tissues and/or body fluids of healthy individuals by affinity chromatography on carrier-bound protein or peptide fractions from healthy tissues by a second elution operation while the inhibiting fractions are in the first eluate;

g) producing organ specific and/or fetal components using on the same general lines, the DNA, RNA or protein (or peptide) fractions of the parallel organ tissue more specially from fetal, embryonic and/or juvenile tissues of healthy individuals, as for example liver, thymus, spleen, cardiac muscle, brain etc ; and

h) producing inhibiting or stimulating substances for micro-organisms or plants from the parallel extracts making use of carrier-bound nucleic acids

The isolated factors may be used in aqueous solutions or incorporated in liposomes or in a water-in-oil emulsion (see German Pat Nos 2,650,502, 2,656,333 and 2,640,707) in an aqueous phase and, on the other hand, after further separating and cleaning their structures may be elucidated and partly or completely synthesized, this being a further part of the present invention. The isolated, inhibiting proteins or peptides may furthermore be effective for the isolation of certain desoxyribonucleic acids (which may be used as gene sections) in a carrier-bound form for affinity-chromatographic separation of such DNA mixtures or solutions, the DNA sections, which are to be enriched or isolated, being present in the secondary eluate. An account will now be given of further measures and useful effects of the invention using preferred working examples

Example 1

Breaking up and sterilization of dry

powder produced from liver, using sulfuric acid in vacuo

One hundred (100) g of finely pulverized dry liver powder are spread out on to a petri dish in the form of a 0,5 cm high layer and placed in a desiccator, which may be joined up as desired with a cold trap by way of a high-vacuum pump system or, at the same time, with a communicating vacuum vessel as well, which may be shut off from the main desiccator by a valve

Firstly, concentrated sulfuric acid at room temperature is placed in the communicating vacuum vessel and the connection with the desiccator is shut off. For clearing of any residual moisture caused by the hygroscopic effect of the dry powder, firstly, with the help of the cold trap (which is supercooled with acetone and carbon dioxide snow), water is sublimed from the tissue powder and then, shutting off this condenser, with the help of the high-vacuum system exhaustion is taken down to a pressure in the desiccator of

-4

10 torr. Thereupon the valve to the communication vessel is opened so that it is now possible for the sulfuric acid in the form of vapor, to go into the desiccator. The vacuum will now go down to vapor pressure of the sulfuric acid. The connection to the acid vessel is now shut off, but not, however, before separating the communication vessel from the pump system. By blowing nitrogen into the desiccator the vacuum over the liver powder is only decreased further to a very small degree. For this reason, sulfuric acid vapor will be condensed onto the liver powder. After a certain time for it to take effect, the connection with the pump system and with the communication vessel is opened again for the acid and after getting to the vapor pressure of the sulfuric acid, the operation is performed

two further times. Lastly, the connection between the two communicating vessels is not opened again and in fact only the connection between the desiccator and the pump system is opened. Pumping is now undertaken for exhaustion until all the sulfuric acid has been cleared from the desiccator which has not chemically reacted. In this way, it is possible, furthermore, for the hydrogen ion concentration in the dry powder produced from liver to be put at any desired acid level. The longer and stronger the exhaustion operation, the more neutral will be the pH value.

Example 2

Preliminary processing of kidney with diethylamine

Fifty (50)g of deep frozen, finely-divided grains of fresh calf kidney are to undergo chemical digestion (in the absence of oxygen and under the control of diethylamine) and are then to be dried.

The temperature of the frozen kidney substrate is -180°C . The powder is placed in a thin layer on a petri dish and placed in a desiccator, in which a second vessel with 10 cc of diethylamine, and which is open, is placed.

The diethylamine has a temperature of 0°C . On charging the apparatus the temperature of the kidney powder will go up to -100°C . Using a powerful pump system a vacuum is produced in the desiccator as far as a value of 70 torr, because the vapor pressure of the diethylamine at 0°C is 70 torr. Thereupon the connection with the pump system is shut off. By increasing the temperature of the diethylamine, this will undergo further evaporation. The gas undergoes reaction with the frozen kidney grains and is used

up here. After the full amount of diethylamine has been evaporated on these lines, the connection with the vacuum pump is opened again and then using a cold trap, the substrate is dehydrated and the rest of the diethylamine is removed by exhaustion. Lastly, by connecting a diffusion pump directly to the apparatus, and not using (i.e. by-passing) the cold trap the rest of the drying operation is undertaken.

Example 3

Sterilization of infected chicken fetuses and egg membranes

This example is with respect to the inactivation of Newcastle disease virus (NDV) in chicken fetuses and egg membranes. The material is taken from infected incubated hen's eggs and frozen in liquid nitrogen and pulverized. The frozen powder is placed in a thin layer on a petri dish and placed in a desiccator over a dish of concentrated sulfuric acid. The desiccator is joined up by way of a three-way valve with a high-vacuum pump and a pressure vessel in which there is 10 ml of a mixture of 97 parts of glacial acetic acid and 3 parts of 30% H_2O_2 .

Firstly, the desiccator vessel is exhausted for 2 hours until the frozen powder has been dried to about one half to one quarter. Then, using the valve, the vacuum pump is shut off from the vessel and the further vessel with peracid mixture is connected to the desiccator so that the acid is evaporated and goes into the desiccator. The amount of acid evaporated will depend on the volume of the desiccator. In some cases, the vacuum in the desiccator vessel will have to be produced again and again to make certain that all the acid is evaporated. The time for

taking effect is 30 minutes and thereafter exhaustion takes place until the powder is completely dry. However, even after the effect of the acid, the vessel with the acid may have its place taken by a vessel with mercaptoethanol, which is then caused to take effect on the tissue powder in the same way as was earlier the case with the acid, before the drying operation is stopped by undertaking exhaustion once again. Furthermore, in place of drying over hygroscopic concentrated sulfuric acid, freeze-drying using a cold trap may be used. The dried powder so produced will then be seen to be sterile on virological assay.

Example 4

Sterilization of virus-infected dry powder
Virus-infected dry powder is placed in a 0,5 to 1 cm high layer in petri dishes, which are put in a desiccator. The desiccator is then evacuated. Water vapor is let into it and is **Condensed** on the substrate so that the substrate is moistened. Evacuation is undertaken again. The vapors of an acid mixture made up of 1 part of performic acid and 2 parts of 98% of formic acid are let in. The further operation in this example are as those in Example 3.

Example 5

Testing on animals

This example is with respect to the results of animal experiments, in which ⁵inbred mice, before transfer inoculation of 10⁵ tumor cells, were given three administrations of a suspension of 1 mg of dry powder of fetal bovine liver (which has been sterilized according to the procedure of Example 4). in physiological sodium Chloride Solution with 4 days between administration. The

survival rate of the animals to which the dried powder was administered was 70%, while that of the control animals was 0%. The tests were undertaken with 10 inbred animals in each group, the reproducibility being made out to be less than or equal to + 5% using five test series.

In the therapeutic test, on the fifth, seventh and ninth days after administration of tumor material an additional 1 mg of dry powder of fetal bovine liver was injected as a suspension. In this case, survival rate was 80% of the animals and 0% in the case of the control animals.

Example 6

Hemolysis plaque test

In the hemolysis plaque test, after pre-treatment with fetal bovine thymus preparations and in another case with fetal spleen, antibody synthesis was decreased below that in untreated animals in the test. Nine hundred thirty (930) antibody-forming spleen cells were found in the control animals in comparison with 875 in the case of the pre-treated animals.

Example 7

Hemolysis plaque test

Using the hemolysis plaque technique, fetal cardiac muscle and furthermore brain was examined after two pre-treatments on the fourth and second days before administration of the antigen. In this respect, in the case of the untreated animals 378,000 plaque-forming cells were to be seen. while in the case of the treated animals the figure was 930,225 for each spleen. The highest value, which was produced with a bacterial toxin BA-1, was 690,000. In this case, 150 mg/kg bodyweight were administered

once before antigen administration, while fetal heart at a dilution of 1 to 100, that is to say 10 mg, was injected on the fourth and second days before antigen administration.

Example 8

Separation of ineffective components

One (1) g of the finely pulverized dry substance as produced in Example 1 from liver was homogenized in 100 ml of phosphate-buffered isotonic NaCl Solution (pH 7,4) using a turbomixer at 6 to 10 C and centrifuged at 200 g for 10 minutes. The supernatant top layer had the cytoplasmatic cell components, while the cell nucleus and membrane fraction was in the Sediment. The sediment and the supernatant layers were separated and further processed.

a) The supernatant layer was mixed with 40 ml of 5 mM tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in 40 mM NaCl with 10 ml of sodium taurocholate Solution (80 mg/ml) and pH adjustment to 9,2 undertaken. After the addition of 2,5 ml of enzyme suspension (lipase) incubation was undertaken for two hours at 37 C, so that the lipids were degraded. For degradation of the Polysaccharides to glucose, at a concentration of 10 mg of substrate/ml, pH value adjustment was undertaken with sodium acetate to 4,8. After the addition of amyloglucosidase, incubation was carried out for two hours at 40 C. The dialysis was undertaken against phosphate-buffered physiological NaCl Solution (pH 7,4) for 24 hours or the substrate was ultrafiltered with a 600 molecular weight **Separation** limit.

b) For isolation of the DNA from the sediment, the last-named is suspended in 20 ml of 0,24 M Na_3P_0_4 (pH 6,8) with 1% SDS (sodium dodecylsulfate) 8M of urea and 10^{-3} M EDTA (ethylenediaminetetraacetic

acid) and this raw extract run into a 30 by 2,5 cm hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) column. RNA (ribonucleic acids), proteins and Polysaccharides are eluated with 0,24M Na_3P_0_4 (8M Urea), while DNA is selectively produced in a second eluation step with 0,48M $\text{Na}_3\text{PC}_{>4}$ buffer. cl

Example 9

a) Coupling of DNA to the carrier material

An account will now be given of the coupling of DNA to cellulose used as the carrier substance for affinity-chromatography:

A DNA **Solution** (1-2 mg/ml in 0,01 M tris-(hydroxymethyl)-aminomethane-HCl, pH 7,4) with 0.001 M EDTA is mixed with dry cellulose at a rate of 1 g of cellulose to 3 ml DNA Solution. After overnight drying at room temperature the residual water is removed by freeze-drying, the powder so produced is suspended in 20 parts by **volume** of tris-HCl and incubated for one day at 4 C. The excess DNA is removed by washing with buffer **Solution** and the DNA-cellulose is diluted at a rate of 1 to 20 with buffer and placed in a 5 mm column.

b) Coupling of proteins to carrier material

The coupling of the proteins to agarose gel as the carrier material is undertaken after pre-treatment of the gel as will now be made clear:

Ten (10) g of the 2% gel are suspended in 5 ml of cold 5M K_3P_0_4 buffer and the suspension diluted with distilled water to get an overall volume of 20 ml. BrCN (cyanogen bromide Solution, 1g/ml) is added in small amounts. The reaction time is 10 minutes. The product is washed until neutral on a glass sintered or fritted plate with H_2O . The proteins to be coupled (10 - 35 mg) in 0.25M $\text{NaHCC}_{>3}$ Solution at pH 9 with 2 g of the gel are placed in a reaction

vessel. The coupling reaction comes to an end after 24 hours of rotation at room temperature. The products are placed in a small column and cleaned for 6 hours with 0.5M NaHCO₃ for 24 hours with 0.1M borate - 0.1M NaCl (pH 8.5), for 12 hours with 0.1M Na acetate - 1M NaCl (pH 4.1) and for 6 hours with double distilled water at a flow-through rate of 10 ml/hour. After this operation, it is possible for 120 micromole of glycine-leucine and 1.7 micromole/g of chymotrypsin to be coupled.

Example 10

Selective adsorption and desorption of the active factor

The purpose of this example is to get the inhibiting and stimulating factor from the protein **Solution** of juvenile bovine liver, which has been sterilized on the lines of the earlier examples and freed of ineffective components. For this purpose use is made of a rectangular gel apparatus for affinity-chromatography with electrodes at the outer long sides. The apparatus is filled with a DNA cellulose as produced in Example 9, the DNA having been produced from fetal bovine liver. The separating column is equilibrated with 0.001M EDTA, 0.01M Na₃PO₄ (pH 7.4) at 37°C. The sample to be separated is dialyzed against the same buffer **Solution**. It is then run into the separating apparatus at a concentration of 1mg/ml, the primary eluate having the **Stimulation** fraction in it. After a separating time of 8 hours, the apparatus was washed out with a buffer **Solution**. For secondary elution of the factors absorbed by the bound DNA, a further addition of buffer is made and the apparatus acted upon by an electric alternating field of 50 KHz at 1000 V,

5 mA. At the same time, the ionic strength of the buffer is continuously increased by the addition of NaCl up to 1M.

On using a direct current field (2000 V 10 mA) separation in a way dependent on electrophoretic mobility may be produced at the same time, the substances being taken off from separate points.

On using lower voltages and direct current a different distribution dependent on the current etc. of the primary eluate may be produced.

The fractions produced are assayed on cell cultures of diploid and heteroploid lines for measuring their efficacy. On doing this, the fraction with the most highly specific activity is made out, the **Charge** then being standardized on this basis.

Example 11

Producing tumor-inhibiting factors from a second eluate

For producing tumor-inhibiting factors from liver, the DNA fraction is isolated from a mixture of different solid tumors (for example melanoma, different sorts of Carcinoma (breast, prostate, lung, stomach intestine, brain) and possibly sarcomas from mesenchymal tissues together with the parallel metastases and leukemia cells, which have been bred in cultures (lymphatic cells and myeloid cells). Then the factors are coupled as in Example 9 to cellulose and then as in Example 10 are used for separating or extracting a protein **Solution** from liver. The inhibiting factor is produced by secondary elution and its specific inhibiting effect is tested on tumor cell cultures. On the same lines it is furthermore possible for DNA from single tumors and furthermore from fetal tissues, more specially, fetal placenta and liver, to be

used. Furthermore, it is possible for body fluids to be separated on the same lines. Tumor-inhibiting fractions may be more specially produced from the maternal part of the placenta (decidua).

Example 12

Producing stimulating active factors
Stimulating factors may be produced from liver or from the fetal part of the placenta (chorion) as a primary eluate by chromatography of the substrate on carrier-bound DNA from healthy tissues. The stimulating factors are produced or freed from the secondary eluate on using carrier-bound protein or peptide fractions for chromatography or other separating Operations.

Example 13

Producing organ-specific active factors
Organ-specific factors, for example from brain, may be produced using carrier-bound DNA or proteins from the organ in question, that is to say from the brain, on the same lines as the operation noted in Example 10. In the same sort of way age-specific, for example fetal stimulating factors may be produced on analogous carrier-bound DNA or protein fraction.

Example 14

Inhibiting substances and stimulating factors taking effect on micro-organisms or plants, may be produced using carrier-bound DNA or proteins of the species in question.

Example 15

Producing DNA fractions

The isolation of certain DKA's, which are effective as gene sections, may be undertaken from mixtures of DNA on protein fractions, isolated using the process of the present invention. Such substances will be seen to have a special effect on bio-assay testing. Such fractions may be used, when carrier-bound, for the affinity-chromatography of the parallel DNA mixtures or solutions, the DNA section to be enriched or isolated being present in the secondary eluate.

Example 16

Producing tumor-inhibiting factors
a) For producing tumor-inhibiting factors from fetal and juvenile calf liver, DNA from 100 g of meth-A-sarcoma tissue which was sterilized according to the present process was isolated on a Chromatographic column according to the invention, which had been produced in animal experiments by implantation of tumor cells in inbred mice (see Example 26), the DNA being isolated using the process given in Example 22. Ten (10) mg of this tumor DNA were coupled to cellulose as in Example 23 and the DNA-cellulose, suspended in tris-EDTA-buffer, was placed in a 0.5 x 20 cm column. The column was used for separating 1 ml of the protein Solution (purified as in Example 22) from juvenile or, in the other case, fetal calf liver with a protein or peptide level of 5 mg/ml. For this purpose, the column was eluted with a flow rate of 2 ml/hour using a tris-EDTA-buffer with an NaCl gradient of 0.1 m to 2.0m. The fractions in the range running from 1.8 m to 2.0 m NaCl were collected and tested with respect to protein level and DNA level. The DNA Polymerase-free fractions were dialysed against physiological saline or dia-

filtered using an ultracentrifuge (with a molecular weight of 600 for the limit of Separation) Next, in animal experiments as in Example 26 the greatest tumor inhibition in the meth-A-sarcoma system was measured In the case of three injections of 1 mg protein/animal on the + 5th + 7th and + 9th day after implantation of the tumor, the most strongly tumor-inhibiting fraction put up the survival rate to 80% - 100% and the tumor regression to 60% - 100% over the control The unseparated raw extracts from calf liver were responsible, in the same test system, for survival rates of 40% to 70% and tumor regressions between 10% and 50% The fraction giving the greatest inhibiting effect was tested in a number of different testing systems By centrifuging at 300,000 g and by processing with **Proteinase** the material was inactivated Testing using PAA-electrophoresis gave at least 5 bands while SDS-electrophoresis, used as well, made it clear that there was a molecular weight scatter between about 600 and 1,000,000 More detailed identification of the active factors was not possible, even using the gel-chromatography, ion exchange chromatography, isoelectric focussing, preparative isotachophoresis and disk electrophoresis All the non-biological ways of separating were responsible for decreased activity For this reason, the active principle may be seen to be caused by a number of factors working together and which may only be enriched by DNA cellulose chromatography or other DNA affinity Chromatographic processes Furthermore, the purifying of these active factors may only be undertaken with these processes The yield after purifying two times over was 10% (of the protein or peptide level of the raw extract) on using cellulose chromatography The purif-

ied inhibiting fractions are buffer-soluble undergo marked decomposition in a freeze-dried form at 50°C, upwards and are not degraded by DNA-ases and RNA-ases

b) For producing tumor-inhibiting factors from fetal or juvenile calf liver, the DNA from 3×10^5 human melanoma cells was isolated, which had been roller-cultured The tumor DNA was coupled to cellulose as noted in part a), the purified peptide or protein **Solution** used in a) being separated on the substrate The DNA-polymerase-free fractions of the 1.8 to 2.0 m NaCl eluate were tested as in Example 12 in the human cell culture on melanoma cells The fraction with the greatest inhibiting effect reduced the DNA synthesis of melanoma cells within 8 hours in a concentration of 10^{-5} g/ml of culture medium to a level equal to only 10% of the control, whereas the unseparated raw extract gave, with the same peptide and protein concentration, an inhibition of the DNA biosynthesis to a level of 40% to 60% of the control

c) In place of the juvenile and fetal liver tissue preparations of decidua and thymus were prepared as noted in parts a) and b) and tested, the inhibition rates isolated as in a) and b) being of the same order

Example 17

Producing stimulating active factors

For producing stimulating active factors, the primary eluates of Example 1 (0.1 m NaCl to 1.6 m NaCl) were collected, the proteins and peptides being purified by diafiltration (with a 600 molecular weight separating limit) and coupled to agarose in the same way as detailed in Example 24 The protein-agarose conjugate was placed in an 1 x 60 cm column and a chorion

extract, purified as in Example 22, was separated in the column using tris-HCl with a pH value of 7.4 (0.02 M) as an elution buffer, the NaCl gradient being 0.01 M to 4 M. The fractions produced in the range 0.1 M to 4 M NaCl were tested with respect to their Stimulation effect in human cell culture (see Example 27). The test cells being diploid fibroblasts which by the addition of 10^{-7} g of protein/ml of culture medium of the strongest **Stimulation** fraction, were stimulated by 160% to 210% (with respect to the control) in their DNA.

Example 18

pre-processing and sterilization with sulfuric acid in vacuo

One hundred (100) g of finely divided, virus-infected dry liver powder underwent distribution on a petri dish in a layer thickness of 0.5 cm and placed in a desiccator, the desiccator being connected, as desired, with a cryosorption condenser by way of a high vacuum pump system, and at the same time, however, with a vacuum vessel, which might be shut off from the main desiccator by a valve.

Firstly, concentrated sulfuric acid at room temperature was placed in the vacuum vessel and the valve (connecting to the desiccator) was turned off. To eliminate any moisture still present and caused by the hygroscopic effect of the dry powder, firstly, using the refrigerating condenser (which was supercooled with acetone-carbon dioxide snow) water was sublimed from the tissue powder and then, after turning off the condenser, evacuation was undertaken using a high vacuum plant until the pressure in the desiccator reached

-4
10 torr, whereupon the valve to the vacuum vessel was opened so that sulfuric

acid vapor was able to make its way into the desiccator.

The vacuum level now became equal to the vapor pressure of sulfuric acid. Next, the connection with the acid vessel was shut off, but only after the vessel had been cut off from the pump plant. By blowing nitrogen into the desiccator, the vacuum over the liver powder was only decreased to a small degree further. For this reason, the sulfuric acid vapor was condensed onto the liver powder. After a certain time for it to take effect, the connection between the pump system and the vessel for the acid was opened up again and, after getting to the vapor pressure of sulfuric acid, the operation was undertaken two further times. At the end, the connection between the desiccator and the pump system was opened up again, but not between the two vessels. Pumping then took place until all sulfuric acid had been cleared from the desiccator which had not taken part in a chemical reaction. In this way, the hydrogen ion concentration in the dry liver powder may be made more or less acid as desired. The longer and the stronger the evacuation the more neutral the pH value.

On using preparations infected with New Castle disease virus (NDV) it was possible to see that the virus had been completely inactivated. Furthermore, test microorganisms (E. coli) were completely inactivated by this processing.

Example 19

Pre-processing and sterilization with diethylamine

Fifty (50) g of deep-frozen, finely divided particles of fresh calf kidney were to be digested chemically in the absence of oxygen and with control by diethylamine,

and then dried. The temperature of the deep-frozen kidney substrate was -180°C . After distribution of the powder in a thin layer on a petri dish, the dish was placed in a desiccator together with a second vessel with 10 cc of diethylamine, the two vessels being kept open. The diethylamine had a temperature of 0°C . By the time the kidney powder has been placed in the desiccator its temperature had increased to -100°C . The desiccator was then evacuated by a powerful pump system to achieve a vacuum of 70 torr, this being the vapor pressure of diethylamine at 0°C . Then the desiccator was shut off from the pump system and by increasing the temperature of the diethylamine, the same was further evaporated, the gas undergoing reaction with the frozen kidney particles and being used up by them. After all the diethylamine has been evaporated in this way, the connection with the vacuum pump was opened again and firstly using a cryosorption unit, the substrate was dehydrated, the rest of the diethylamine being taken off by evacuation. At the end, by connection to a diffusion pump and by-passing the cryosorption unit, the rest of the drying operation was undertaken.

Example 20

Pre-processing and sterilization with peracids

This example is with respect to the inactivation of New Castle disease virus (NDV) in hen egg fetuses and oval membranes, which after being taken from infected, brooded hen's eggs were deep-frozen in liquid nitrogen and finely divided. After distribution of the deep-frozen powder in a thin layer on a petri dish, it was placed in a desiccator over a dish full of concentrated sulfuric acid, the desiccator

being connected by means of a three-way cock with a high vacuum pump and a pressure vessel having in it 10 ml of a mixture of 97 parts of glacial acetic acid and 3 parts of 30% H_2O_2 .

Firstly, evacuation of the desiccator vessel took place for two hours until the frozen powder had dried to about 1/2 to 1/4 and then the vacuum pump was shut off from the vessel by way of the valve and the vessel or receptacle with the peracid mixture was opened so that the receptacle was connected to with the desiccator and the acid evaporated, the acid making its way into the desiccator. The amount of acid evaporating was dependent on the volume of the desiccator. If necessary, the vacuum in the desiccator vessel had to be produced twice over so that all the acid was evaporated, the time for taking effect amounting to 30 minutes. After this, evacuation took place until the powder was completely dry. However, it was furthermore possible, after the acid had taken effect, for the receptacle for the acid to have its place taken by a receptacle with mercaptoethanol which was then, on the same lines as was the case with the acid earlier, caused to have its effect on the tissue powder before the drying operation was ended by evacuating again. Furthermore, in place of drying over the hygroscopic, concentrated acid, freeze-drying using a cryosorption trap was possible. The dried powder produced was seen to be sterile on virological examination.

Example 21

Pre-processing and sterilization with peracids

Virus (NDV)-infected dry powder was placed in a layer with a thickness of 0,5 cm to 1 cm

on petri dishes which were placed in a desiccator which was then evacuated and then water vapor was let into it, the vapor condensing on the substrate and moistening it. Then evacuation was undertaken again, the vapors being forced into an acid mixture made up of 1 part of performic acid and 2 parts of 98% formic acid. In other respects, the operation was as in Example 20.

Example 22

Clearing inactive components according to step b)

One (1) g of the finely divided dry liver substance produced in Example 18 was homogenized in 100 ml of phosphate-buffered isotonic NaCl (pH 7.4) by a turbomixer at 6°C to 10°C and centrifugated at 200 g for 10 minutes, the cytoplasmatic cell components being in the supernatant liquid whereas the cell nucleus and membrane fraction were in the sediment, the sediment and supernatant liquid being separated for further processing.

a) The supernatant liquid was mixed with 40 ml of 5 mM of tris(hydroxymethyl)-aminoethane in 40 mM NaCl with 10 ml sodium taurocholate Solution (80 mg/ml) and pH adjustment to 9.2 undertaken and after the addition of 2.5 ml of enzyme suspension (lipase) incubation was undertaken for two hours at 37°C for degrading the lipids. For degrading the Polysaccharides to glucose, a concentration of 1^o mg of substrate/ml was used, pH adjustment to 4.8 being undertaken with sodium acetate. After the addition of amyloglucosidase, incubation took place for two hours at 40°C, whereafter the material was dialysed for 24 hours against phosphate-buffered physiological NaCl (pH 7.4) or the substrate was ultra-filtered with a separating limit at a mole-

cular weight of 600.

b) For isolating the DNA, the same was taken up in 20 ml of 0.24 M Na₃PO₄ (pH 6.8) with 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 8 M urea and 10⁻³ M EDTA (ethylene-diaminetetraacetic acid) as a suspension, whereupon this raw extract was put in a 30 x 2.5 cm hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) column. RNA (ribonucleic acids), proteins and Polysaccharides were eluted with 0.24 M Na₃PO₄ (8 M urea), while DNA was obtained selectively in a second eluate with 0.48 M Na₃PO₄ buffer.

Example 23

Coupling of DNA to cellulose as a carrier substance for affinity chromatography according to step c)

A DNA **Solution** (1-2 mg/ml 0.01 M tris-(hydroxymethyl)-aminoethane-HCl (pH 7.4) with 0.001 M EDTA) was mixed with dry cellulose at a rate of 1 g of cellulose to 3 ml of DNA **Solution**. After drying overnight at room temperature, the rest of the water was taken off by freeze-drying and the powder so produced was taken up on 20 parts by volume of tris HCl and incubated for one day at 4°C. Uncoupled DNA was cleared by washing with buffer **Solution** and the DNA cellulose was diluted with buffer at a rate of 1:20 and filled into a 5 mm column.

Example 24

Coupling of proteins to agarose gel as a carrier substance after pre-processing of the gel.

Ten (10) g of the 2% gel were taken up in 5 ml of cold 5 M K₃PÜ₄ buffer and the suspension produced diluted with distilled water to an overall volume of 20 ml. BrCN (cyanogen

bromide **Solution**) 1 g/ml was added in small amounts. After a reaction time of 10 minutes, the product was washed until neutral on a glass frit using H_2O . The proteins (10 mg to 35 mg) to be coupled in 0.25 M $NaHCO_3$ Solution at pH 9 were placed with 2 g of the gel in a reaction vessel, the coupling reaction coming to an end after 24 hours of turning the vessel at room temperature. The products were purified in a small column for 6 hours using 0.5 M $NaHCO_3$, for 24 hours using 0.1 M borate-0.1 M borate-0.1 M NaCl (pH 8.5) for 12 hours with 0.1 M sodium acetate-1 M NaCl (pH 4.1) and 6 hours with doubly distilled water with a current or flow rate of 10 ml/hour. After this part of the process it was possible for 120 micromoles of glycine-leucine and 1.7 micromoles/g of chymotrypsin to be coupled.

Example 25

Selective adsorption and desorption of the active factors according to step d) The inhibiting and stimulating factors were separated from a protein solution from juvenile bovine liver, which as in the earlier examples, was sterilized and freed from undesired components. Use was made, for this purpose, of a rectangular flat gel apparatus for affinity chromatography with electrodes on the outer long sides. The apparatus was charged with DNA-cellulose produced as in Example 9, the DNA having been produced from fetal bovine liver. The separating column was equilibrated with 0.001 M EDTA, 0.01 M Na_3PCO_4 (pH 7.4) at 37 C. The sample to be separated was dialysed against the same buffer solution. It was then placed in a concentration of 1 mg of protein/ml into the separating apparatus. The primary eluate had within it the stimulating

fraction. After a separating time of 8 hours, the apparatus was washed through with buffer solution. For secondary elution of the factors absorbed by the coupled DNA, on making a further addition of the buffer, an electric alternating current field of 50 KHz and 1000 V, 5 mA was caused to take effect. At the same time the ionic strength of the buffer was steplessly increased by the addition of NaCl up to 1 M.

On using a direct current field (2000 V, 10 mA) it is possible for separation to take place in a way dependent on the electrophoretic mobility for output at separate points. By using lower voltages and direct current, a representative distribution of the primary eluate may be caused. The fractions produced were tested on cell cultures of diploid and heteroploid cell lines for activity assay to make out the fraction with the highest specific activity, this then being used for standardizing the charge.

Example 26

Activity assay of active factors obtained according to the present invention in animal experiments The experimental animals were (Balb/c-x C57/b16) F¹ mice (from Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine, USA). The tumor system used was meth-A-sarcoma. The tumor cells were passaged weekly by the parenteral injection of 1×10^6 cells. On the 7th to 12th days after the parenteral injection the cells were used for the experiments.

5

For the tests 1×10^6 tumor cells were injected intracutaneously onto the skin of the belly. Exponential tumor growth then took place which, after about 4 to 5 weeks,

was responsible for the death of the animals. The experiments were undertaken with 10 animals in each group. The treatment of the serum groups took place by one to three intramuscular or intravenous injections each 1 mg (measured as protein) of the test fractions.

Example 27

Activity assay of active factors obtained according to the present invention in human cell culture.

Human tumor cells (melanoma, Wish) and diploid fibroblasts (F II 2, MRC-5) were used as test cells, all cell cultures going through a test cycle which was made up of two growth phases and a minimum phase, addition of the test substances taking place in the minimum phase.

Growth phase 1: The cells, which had been stored under liquid nitrogen, were suddenly thawed and incubated together with MEM-II-medium (Instamed, Seromed, Munich) with additions of penicillin, streptomycin, neomycin and 10% of fetal calf serum at 37°C. After two days the cells were optically counted after trypsinizing, the cells then being sown again (2 x 10⁶ cells in each bottle).

Growth phase 2: After daily change of medium on the 4th day the cells were counted again and groups of 0.5 x 10⁶ cells were each sown in small culture bottles, together with nutrient medium and serum addition.

Minimum phase: After 24 hours the medium was cleared off by aspiration and a minimum medium with a decreased serum addition (diploid cells: 1%, heteroploid cells: 0.25%) was put in.

Test phase: After 48 hours addition of the preparation took place, 50 microliters of

preparation being put in each bottle in the present tests. For each sort of preparation and concentration 3 parallel samples were made up. In the case of short time tests action was limited to 8 hours. Four hours before the end of this time in each case 50 microliters of methyl-³H-thymidine Solution (0.5 micro Ci) were put in with a pipette. At the end of the action time, the thymidine which had not been built in, was cleared by washing four times with 4 separate amounts of 5 ml of 2% perchloric acid and the cells were hydrolysed for one hour using 1 N HCL at 70°C. The hydrolysate was placed in scintillation flasks and mixed with cocktail (aquasol 2, NEN). Activity was measured in a Beckman LS-100 Liquid Scintillation Counter. As **Statistical** quality numbers, relative standard deviations of the overall test system of s_r + 10% were achieved.

Example 28

Active factors obtained in according to the present invention for plants. For producing syntheses-stimulating and, on the other hand, growth-inhibiting materials taking effect on grasses and cereals, 10 kg of roots and leaves of a mixture of different sorts of plants was processed with a 0.1% NaOCl or O³ disinfectant Solution for taking effect on micro-organisms, the **Solution** taking effect on the outer faces of the plant material being put in by dipping or spraying. After this, the disinfectant Solution was completely cleared by washing and the pieces of plant material were externally dried generally completely, cut up in a rasp mill and then, once this had been done, pressed at + 5°C to 10°C in a plant press at up to 200 atmospheres gage. The fresh expressed juice was freed by centrifuging at 800 rpm.

to 1000 rpm for 3 minutes, or in a continuous flow centrifuge, of corpuscular components and then filtered sterile, whereupon adjustment of the molecular weight to a value greater than 1 million took place. The filtrate was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried in a high vacuum at room temperature. The dried material was finely divided and sulphatized by being acted upon by vapor or concentrated sulfuric acid or phosphatized by being acted upon by vapors of concentrated phosphoric acid (85%). The dry powder was now dissolved in isotonic aqueous NaCl mixed with carbohydrate-(or starch)-degrading, or furthermore, lipid-degrading enzymes coupled to a carrier substance. Such carrier coupled enzymes may be cleared by centrifuging, after degrading the substrates, and used again. The low molecular weight substances produced on degrading up to a molecular weight of 600 were cleared by filtering. Proteins and nucleic acids were cleared from fractions with a higher molecular weight using known methods. One part of the expressed juice processed on these lines was used for producing nucleic acids by degrading the protein components using proteolytic enzymes (papain or trypsin) and the nucleic acids (DNA and RNA) chemically coupled with a carrier substance was then placed in a **Chromatographie** column and the other part of the expressed juice separated thereon. In the primary eluate (0.1 M NaCl) growth-stimulating factors were present. By using an increasing ionic strength (2 M NaCl) proteins absorbed thereon or peptides, were eluated, these being the growth-inhibiting active factors.

The isolated active factors were tested on cultured (see Example 12) protoblasts or plant embryos to see their effect on the synthesis metabolism of DNA, RNA or protein by using radioactive base **Compounds**

as for example ^3H thymidine or ^3H -uridine or, with respect to the cell proliferation by optical counting. Inhibition produced by the isolated factors was greater than 5% of the controls while **Stimulation** was greater than 10% in a minimum medium.

Example 29

Active Factors for micro-organisms obtained in accordance with the present invention. In races of yeast, which had good alcohol fermentation properties, the fermentation property was further activated and the resistance to alcohol increased so that on fermentation higher alcohol concentration might be produced. For this purpose, nucleic acids and proteins were separated from the yeast races in question, mixed with other sorts of yeasts as in Example 22. Separation was undertaken on the same lines as in the case of organic substances (Example 18) by sudden freeze-drying of the washed yeasts, finely dividing and drying in a frozen condition and suspending or dissolving in isotonic physiological solvent. After this, the separating material was produced from isolated nucleic acids, which were covalently coupled to a carrier substance, which was then charged into the separating apparatus (on the same lines as in Example 23). It was then possible for nucleic acids, carbohydrates and lipids to be enzymatically degraded by carrier-coupled enzymes from the protein **Solution** to be separated, the enzymes being separated at the end of the reactions, by centrifuging.

It was, however, possible for the raw extract as well to be separated in a separating apparatus. In the primary eluate the stimulating factors were present while the secondary eluate coming from the separating material had the inhibiting factors. The stimulat-

ing factors were added to the yeast suspension, to be used for producing aleohol, in a concentration of milligrams to nanograms/g or ml. In this respect the yeasts were suspended in a physiological **Solution** without nutrients or a minimum nutrient Solution. After causing the stimulating factor to take effect on **the** yeast suspension for one hour at 20 C, addition to the malt to be fermented was undertaken.

On the same general lines, other active factors may be produced for the use against other micro-organisms as for example oil-degrading microbes. The inhibiting biological active factors may furthermore be used therapeutically as biological antibiotics.

Example 30

Active factors obtained in accordance with the present invention for use against viruses Inhibiting factors for use against viruses were produced by separating nucleic acids (DNA or RNA) and proteins or peptides from isolated viruses or virusinfected tissues, as for example egg membranes, the nucleic acids being used as separating materials (see furthermore Examples 16 to 27). These inhibiting factors were produced from the protein **Solution**, produced at the same time, or furthermore from tissuc extracts produced from healthy and, as far as possible, virusresistant cells from individuals or cell cultures. The virus-inhibiting factors were present in the secondary eluate (1.8 M to 2 M NaCl).

I claim:

1. A process for the concentration of biologically active factors having an inhibiting effect on the growth of neoplastie cells from cell homogenates of fetal or juvenile tissues or body fluids which contain said biologically active factors, which comprises

the steps of:

- a) non-destructively sterilizing said cell homogenates with an acid or diethylamine ;
 - b) separating the components of cell nucleus and cytoplasmic components from the sterilized starting material;
 - c) enzymatically decomposing lipids and carbohydrates which are obtained from step b) with an enzyme selected from the group consisting of lipase, Proteinase and peptidase;
 - d) separating the cell substrate and recovering a factor having a molecular weight from about 600 to about 1,000.000;
 - e) forming a conjugate with DNA isolated from a cell homogenate with an inert carrier and forming a biologically active affinity sorbent means responsive to selective **Separation** with said conjugate;
 - f) selectively separating said biologically active factors by elution on said affinity sorbent, and then
 - g) separating said biologically active factors from said affinity sorbent by electrophoresis or by a buffer Solution,
- whereby an enriched amount of said biologically active factors is reecovered.
2. The process of Claim I whcrein the cell substrate to be separated and the biological-ly active affinity sorbent are each prepared from like organs, species or agespecific tissue.
 3. The process of claim I whercin said cell substrates is fetal thymus or fetal pancreas tissue.
 4. The process of claim I wherein said cell substrate is finely divided and sterilized by a vacuo condensation of vapors of a member selected from the groups consisting of concentrated sulfuric acid, acetic acid, formic acid, diethylamine and peracids.

4 Deutsche Patentschriften

Verwendung von Anti-Idiotyp-Antikörpern als Zusatz zu P 3501 705 8-41

DE Nr : 36 13 848 7

vom 24 04 1986

Zusammenfassung

Als Zusatz zu P 3501705 8-41 werden Onkogene (Tumorgene) bzw pathogene DNS oder RNS oder daraus gewonnene Abschnitte mit pathogener Syntheseinformation aus Viren, Mikroorganismen oder aus Zellgeweben zur Gewinnung von Idiotyp- sowie Anti-Idiotyp-Antikörpern bzw deren antideterminanten reaktiven Bezirken verwendet und gegebenenfalls mindestens zwei Bestandteile des Spektrums der verschiedenen Antikörperfragmente zusammen mit biologischen Trägerstoffen konjugiert zur Prophylaxe und Therapie von durch die entsprechende DNA oder RNA induzierten Malignomen oder Infektionskrankheiten eingesetzt

Patentansprüche

1 Verwendung von Anti-Idiotyp-Antikörpern als Zusatz zu P 3501705 8-41, wobei Haptene und Antigene als Ausgangsstoffe für die Gewinnung von Anti-Idiotyp-Antikörpern dienen, von denen man die antideterminanten, reaktiven Bezirke durch Fragmentierung gewinnt und ggfs mindestens zwei Bestandteile des Spektrums der verschiedenen Anti-Idiotyp-Antikörperfragmente, ggfs zusammen mit Trägerstoffen, chemisch kovalent konjugiert dadurch gekennzeichnet, daß Onkogene (Tumorgene), pathogene DNS oder RNS bzw daraus gewonnene pathogene Abschnitte aus Viren, Mikroorganismen oder aus

Zellgeweben in nativer oder chemisch modifizierter Form, ggfs unter Zusatz von Carrierstoffen und Adjuvantien als Ausgangsstoffe für die Herstellung entsprechender Idiotyp- oder Anti-Idiotyp-Antikörper dienen, die zur Prophylaxe oder Therapie von Tumoren bzw Infektionskrankheiten verwendet werden

2 Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß Mischungen aus Idiotyp- und Anti-Idiotyp-Antikörpern bzw deren Bestandteilen oder Konjugaten verwendet werden

3 Verwendung von antideterminanten Fragmenten aus Idiotyp-Antikörpern nach Anspruch 1 als Carrier bzw Trägerstoffe für mutagene chemische Reagentien bzw Radionuklide

In P 3501705 8-41 werden Haptene und Antigene als Ausgangsstoffe für die Gewinnung von Anti-Idiotyp-Antikörpern verwendet, von denen man die antideterminanten, reaktiven Bezirke durch Fragmentierung gewinnt und ggfs mindestens zwei Bestandteile des Spektrums der verschiedenen Anti-Idiotyp-Antikörperfragmente, welche die biologischen Wirkungen eines Ausgangsstoffes imitieren ggfs mit biologischen Trägerstoffen chemisch kovalent konjugiert, um sie dann zur Prophylaxe oder Therapie, insbesondere von Strahlen- und Verbrennungsschäden zu verwenden Vorliegendes Verfahren bezieht sich auf die Gewinnung und Anwendung von Idiotyp- und Anti-Idiotyp-Antikörpern bzw deren Fragmente, ggfs ebenfalls in konjugierter

Form gegen Onkogene (Tumorgene) bzw pathogene DNS oder RNS aus Viren, Mikroorganismen oder Zellgeweben zur Prophylaxe und Therapie von Malignomen oder Infektionskrankheiten, die durch die entsprechenden Ausgangsstoffe verursacht werden. Üblicherweise werden DNA oder RNA sowie daraus gewonnene Abschnitte nicht als Antigene bezeichnet, obwohl die Bildung von Antikörpern gegen Zellkernantigene bekannt ist (vgl.: Hans Peter Seelig: Antikörper gegen Zellkernantigene: Labormedizin und Klinik I: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1983). Die Isolierung von DNS und RNS sowie die Gewinnung von einzelnen Abschnitten durch Inzisionsenzyme gehört heute zum Stand der Technik, ebenso wie die Gewinnung von Antikörpern aus solchen Ausgangsstoffen. Die Gewinnung von Antikörpern gegen DNS und RNS bzw daraus gewonnenen Abschnitten ist in der Literatur bekannt: Antikörper gegen DNS: Robbins et al.: Proc Soc Exp Biol Med 96, 575 (1957); Seligmann, M.: C R Acad Sei Paris 245, 243 (1957); Miescher u Sträßle: Vox Sang 2, 283 (1957); Ceppellini et al.: Proc Soc Exp Biol Med 96, 572 (1957). RNS-Antikörper können mit natürlichen und synthetisierten Ribonukleotiden erhalten werden (Seaman et al.: Biochemistry 4, 1312 (1965); Karol und Tanenbaum: Proc Natl Acad Sei USA 57, 713 (1967); Nahon et al.: Biochem Biophys Acta 149, 127 (1967)), Die Antikörper erkennen jeweils unterschiedliche Epitope aus DNS- und RNS-Molekülen wie Basen, Basensequenzen, Desoxyribosephosphatgerüst sowie Helixkonformationen. Für eine bivalente Bindung der Antikörper genügen Segmente von 40 - 50 Basenpaaren (vgl. Stollar: Eur J Biochem 82, 339 (1978)). Solche Antikörper können die DNS-Synthese blockieren

(vgl. Alarcon-Segovia et al.: Clin Exp Immunol 52, 365 (1983)). Eine chemische Modulation oder Konjugation, z B mit Ilydralazine verstärkt die Immunogenität (vgl. Hahn et al.: Ann Intern Med 76, 365, (1972); Frcese et al.: Mutat Res 5343 (1968)). Nach amerikanischen Arbeiten (1983) genügt der Austausch oder die Veränderung eines einzigen Bausteins eines Gens, z B mit der Bauanweisung für das Glycoprotein des Tollwutvirus, um den Erreger avirulent zu machen (vgl. Münch, Med Wochenschr 128, Nr 16, S 32 (1986)). DNS-Pathogenitätsfaktoren sind auch in Mikroorganismen z B bestimmten Kolibakterien enthalten, die besonders zu Harnwegsinfekten und Encephalitis führen. Die Idiotyp-Antikörper und deren antideterminante Bestandteile können auch gentechnologisch gewonnene DNS oder RNS blockieren. Bei Zellen, die durch Retroviren infiziert sind, liegen sowohl die pathogenen RNS wie die revers-transkribierte C-DNS der Virusinformation vor, so daß prophylaktisch wie therapeutisch beide Faktoren durch Antikörper oder Antikörperfragmente blockiert werden sollten. Fragmente der Idiotyp-Antikörper eignen sich auch als Schlepperstoffe für mutagene Radionuklide und chemische Substanzen zur Beseitigung der Pathogenität (vgl. DP 3119110). Die Anwendung infektiöser DNS oder RNS zur Gewinnung von Antikörpern ist jedoch prophylaktisch wie auch therapeutisch nicht möglich. Die Anti-Idiotyp-Antikörper können jedoch als Ersatz des Antigens das Antigen imitieren und wirken selbst nicht pathogen. Hierauf beruht vorliegendes Anwendungsverfahren. Es entstehen Idiotyp-Antikörper. Diese lassen sich auch aus Zellkulturen monoklonal oder polyklonal gewinnen und unmittelbar

oder modifiziert zur Therapie verwenden Die Anti-Idiotyp-Antikörper und ihre Modifikationen sind jedoch zur aktiven Immunisierung und zur Prophylaxe geeignet Zur Verbesserung der Penetration in infizierten Zellen können die Antikörper bzw Antikörperfragmente in Liposome, ggfs mit Zelltropismus inkorporiert werden

Beispiel 1

Es sollen Impfstoffe gegen Onkogene in Form von Idiotyp- bzw Anti-Idiotyp-Antikörper gewonnen werden Als Ausgangsstoffe werden kommerziell hergestellte Onkogene (DNS-Abschnitte) verwendet und deren Immunogenität durch bekannte immunologische Methoden (Konjugation, Adjuvantien, Immunstimulantien) verstärkt Die Gewinnung der Idiotyp-Antikörper erfolgt ebenfalls nach bekannten Methoden der aktiven Immunisierung in vivo oder aus Zellkulturen Die Idiotyp-Antikörper werden unmittelbar therapeutisch verwendet Es können dazu die antideterminanten Bestandteile isoliert und ggfs mindestens zwei Fragmente, ggfs durch ein Carriermolekül, konjugiert werden Solche Präparate lassen sich dann bevorzugt zur Gewinnung von Anti-Idiotyp-Antikörpern in vivo oder in vitro verwenden Aus diesen können ebenfalls die antideterminanten Bestandteile isoliert und ggfs konjugiert werden für die aktive Immunisierung in vivo oder in vitro Präparationen aus

Idiotyp- bzw Anti-Idiotyp-Antikörpern werden in Liposomen inkorporiert appliziert (vgl DP '2650502 und 2656333)

Beispiel 2

Es sollen Impfstoffe gegen Retroviren hergestellt werden Aus den in vitro in Zell- oder Gewebekulturen gezüchteten Viren werden die Nukleinsäuren und ggfs daraus die für die Pathogenität verantwortlichen Abschnitte z B das Transaktivator-Gen "tat III" aus dem HTLV III/LAV isoliert und die Immunogenität durch bekannte Verfahren verstärkt für die Gewinnung von einem Spektrum von Idiotyp-Antikörpern, die danach unverändert oder aber wie oben abgewandelt, zur Therapie verwendet werden Unabhängig davon wird eine Copy-DNS aus der RNS oder den daraus gewonnenen Abschnitten oder aber aus der revers-transkribierten DNS aus Gewebezellen gewonnen und in gleicher Weise als Ausgangsstoff für native oder abgewandelte Idiotyp und Anti-Idiotyp-Antikörper verwendet Zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung können Mischungen der Antikörper bezüglich RNS und DNS bzw deren Abschnitte verwendet werden Idiotyp-Antikörperfragmente können auch als Vehikel für Radionuklide oder chemische Reagentien zur Veränderung der genetischen Information verwendet werden (vgl P 2456224)

Verfahren zur Synthese von biologischen Peptidwirkstoffen

DE Nr : 2819110 8

vom 29 04 1978

Zusammen mit Porcher, Harald, Dr rer nat , 7000 Stuttgart

Patentanspruch

Verfahren zur Synthese von biologischen Peptidwirkstoffen, gekennzeichnet durch die Gewinnung von informativer Ribonukleinsäure (iRNS) mit der Syntheseinformation für Anti-Idiotyp-Antikörper gegen die biologisch aktive Gruppe des entsprechenden Oligo- oder Polypeptid-Moleküls sowie von Anti-Idiotyp-Antikörpern und Gewinnung von Antikörperfragmenten der anti-determinanten Gruppe durch enzymatische und bzw oder chemische Fragmentierung

Vorliegendes Verfahren dient der Synthese von Peptidwirkstoffen, wie z B niedermolekularen Regulationsstoffen des Synthesestoffwechsels in Form von Inhibitoren, Repressoren oder Stimulatoren, wie auch von hormonähnlichen Stoffen Dabei ist eine Aufklärung der chemischen Struktur des Moleküls nicht erforderlich Vielmehr werden nach bekannten Verfahren isolierte Moleküle als Muster für die Gewinnung von Stoffen mit ähnlichen biologischen Eigenschaften verwendet, vergleichsweise wie bei den Isoenzymen, bei denen die Wirkgruppe, weniger aber die Gesamtstruktur des Moleküls für die bestimmte Wirkung verantwortlich ist Der Nachweis der biologischen Wirkung erfolgt durch Bioassay, die Erzeugung dieser funktionell ähnlichen Stoffe durch bekannte immunbiologische Methoden, die hier in besonderer Verfahrensweise und Reihenfolge verwendet werden Es werden dabei die isolierten

Peptidwirkstoffe als Antigen verwendet zur Gewinnung eines primären Antikörpers in einem antikörpererzeugenden Organismus (vgl Hans Schmidt: Die Grundlagen der spezifischen Therapie: Immunisierung der Tiere, Bruno Schulz Verlag, Berlin 1940) oder aber in einem in vitro System zur Erzeugung von Antikörpern in Lymphozyten oder Hybridzellen-Kulturen (vgl A Bussard: Cellular hybridisation in immunology: Vortrag beim 4 Europäischen Immunologie-Meeting, Budapest 12 - 14 4 1978) Die in vitro Gewinnung von Antikörpern hat den Vorteil, daß hier nur sehr geringe Antigenmengen erforderlich sind und das Antikörperspektrum durch klonale Antikörpersynthese eingeschränkt wird Falls die Peptidwirkstoffe nicht ausreichend immunogen sind, kann ihre Immunogenität durch bekannte Verfahren der Komplettierung durch Konjugation mit einem Carrier oder durch Verwendung von Adjuvanten verstärkt werden (vgl C Steffen: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie: Georg Thieme Verlag: Herstellung konjugierter Antigene 5 560) Zur Reinigung und Isolierung der so gewonnenen Immunglobuline können die Verfahren, die ebenfalls in C Steffen S 562 u f angegeben sind, verwendet werden Auch lassen sich daraus Antikörperfragmente, wie leichte und schwere Ketten und das Fab-Fragment, wie auch monovalente Antikörper gewinnen (vgl C Steffen: S 571 u f), die den Ausgangs-

stoff spezifisch blockieren und für solche Zwecke unmittelbar eingesetzt werden können, d h also die Aufhebung einer Inhibition oder Repression wie auch andererseits des stimulierenden Effekts

Die Isolierung des ursprünglichen Peptidwirkstoffes zur Gewinnung solcher Immunglobuline kann nach bekannten Methoden erfolgen, wie sie K Letnansky verwendet hat (Charakterisierung eines tumorspezifischen Inhibitors aus dem mütterlichen Anteil der Rinderplazenta: österreichische Zeitschrift f Onkologie Vol 4, Nr 2 - 3, S 42 - 45, 1977; vgl auch Einheitsprüfung für Antigene bei C Steffen S 594) Die antideterminanten Gruppen bzw die Antikörperfragmente werden nun selbst als Immunogen zur Bildung eines zweiten Antikörpers entweder in vivo oder auch in vitro nach entsprechenden Verfahren wie bei der Gewinnung des ersten Antikörpers verwendet Dieser Anti-Idiotyp-Antikörper und besonders seine determinante reaktive Gruppe in Form von leichten und schweren Ketten oder dem Fab-Fragment haben dieselbe biologische Wirkung, wie der primär als Antigen verwendete Peptidwirkstoff Dies läßt sich ebenfalls durch Bioassay testen Die Synthese dieses Anti-Idiotyp-Antikörpers kann in vitro kontinuierlich in Hybridzellen aus einem Plasmazytom und Lymphozyten erfolgen, wobei die Immunglobuline aus dem Medium der Zellkultur abgeschöpft werden und dieses Medium erneuert wird Die Isolierung dieses zweiten Antikörpers und die Gewinnung der antideterminanten Gruppe erfolgt nach den oben beschriebenen, bei Steffen angegebenen Verfahren Es ist auch möglich, die Syntheseinformation für diesen Anti-Idiotyp-Antikörper in vitro analog dem Verfahren von D Jachertz (Flow of **Informa-**

tion and gene activation during antibody synthesis Ann N Y Acad Sei 207 (1973) 122 - 144) als informative RNS zu gewinnen und diese zur spezifischen Sensibilisierung von Antikörper-produzierenden Individuen zu verwenden Der Vorteil dieser Methode liegt in der Wirksamkeit geringster Mengen dieser informativen RNA Auch kann diese informative RNA direkt therapeutisch verwendet werden zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Insuffizienz in der Synthese der biologischen Peptidwirkstoffe besteht Es besteht die Möglichkeit, daß bei genetischen Defekten über eine reverse Transkriptase diese Syntheseinformation auch in somatische Zellen aufgenommen werden kann, so daß dadurch der Defekt überbrückt wird

Beispiel 1

Synthese von Tumorhemmstoffen, die aus dem maternen Anteil der Rinderplazenta durch Fraktionierung gewonnen wurden (vgl K Letnansky: österreichische Zeitschrift f Onkologie (1977) S 42 - 45) und die nur in sehr geringen Mengen aus dem Gewebe isoliert werden können, so daß die Aufklärung der chemischen Struktur und deren Synthese auf Schwierigkeiten stößt Es wird dabei die durch Bioassay getestete biologische Fraktion mit dem niedrigsten Molekulargewicht als Immunogen zur Sensibilisierung Antikörper-erzeugender Tiere, z B Kaninchen, Schafe, Hühner u a verwendet und falls das Antigen nicht in ausreichender Menge zur aktiven Immunisierung mit Boosterung zur Verfügung steht, als Immunogen zur Sensibilisierung von Lymphozyten-Zellkulturen bzw Hybrid-Zellkulturen Der entstehende Antikörper wird durch

Bioassay auf seine Fähigkeit zur Blockierung der biologischen Wirkung des ursprünglichen Antigens bzw des Peptid-Haptens, das zum Vollantigen komplettiert wurde, getestet Durch Adsorption und Absättigungsmethoden wird der spezifische Antikörper rein gewonnen und seine antideterminante Gruppe in Form von Antikörperfragmenten isoliert und als Antigen verwendet In vitro können mRNA mit der Syntheseinformation gegen diese Idiotyp-Gruppe gewonnen werden Diese lassen sich direkt therapeutisch verwenden, ebenso aber auch zur Sensibilisierung von Antikörper-spendenden Individuen zur Erzeugung eines Anti-Idiotyp-Antikörpers Die Antikörpersynthese kann ebenfalls in vitro erfolgen, insbesondere auch in Hybridzellen, z B aus Plasmazytom-Zellen und Lymphozyten Der gebildete Anti-Idiotyp-Antikörper wird durch Adsorption bzw

Absättigung nach bekannten Verfahren isoliert und seine antideterminante Gruppe bzw die entsprechenden Antikörperfragmente, die diese enthalten, gewonnen Die biologische Wirkung des zweiten Antikörpers bzw der daraus gewonnenen Antikörperbruchstücke werden durch Bioassay in gleicher Weise wie ursprünglich der Peptidwirkstoff getestet Die biologischen Wirkungen müssen mit diesem übereinstimmen, jedoch nicht die chemische Struktur

Beispiel 2

Es sollen biologische Regulationsstoffe mit analoger Wirkung wie Interferon, Chalone, Wachstumsfaktoren, Wuchsstoffe wie auch Releasing und andere Peptidhormone gewonnen werden Das praktische Vorgehen entspricht jeweils dem Beispiel 1

Verfahren zur Herstellung von suspendierbaren korpuskulären Partikeln aus klebrigen, molekular langfaserig vernetzten Materialien

DE Nr : 35 18 150 8-41
vom 21 05 1985

Zusammenfassung

Aus klebrigen, molekular langfaserigen vernetzten Materialien, wie z B Fibrin, Kollagen, Elastin oder Kunststoffen werden durch Mahlen in Kälte-gehärtetem Zustand suspendierbare Partikel gewonnen. Diese können während des Herstellungsprozesses, insbesondere gegen Viren, nach DP 2944278 bzw EPA 841 12944 8 sterilisiert und lyophilisiert werden. Bei Verwendung von retrahiertem Fibrin als Ausgangsstoff wird eine Strangulation von lebenden Zellen in einer Mischsuspension vermieden.

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung von suspendierbaren, korpuskulären Partikeln aus stabilen, retrahiertem Fibrin, Kollagen oder Elastin als Trägerstoff für lebende Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Materialien auf Temperaturen unter -70°C abkühlt, in einer tiefgekühlten Mühle oder Homogenisator mahlt und gewünschtenfalls lyophilisiert.

2 Verwendung der nach Anspruch 1 gewonnenen Produkte zusammen mit lebenden Zellen zu therapeutischen Zwecken oder zur Zell- und Gewebezüchtung in vitro.

Die Erfindung ist durch die Patentansprüche 1 und 2 definiert.

Klebrige, molekular langfaserig vernetzte Materialien sind stabiles, retrahiertes Fibrin, Kollagen oder Elastin. Sie konnten bisher nicht als suspendierbare, korpus-

kulare Partikel hergestellt werden. Solche Partikel können als Trägersubstanzen für lebende Zellen therapeutisch für die Ausfüllung von Gewebedefekten bei der Wundheilung oder Einpflanzung von Implantaten wie auch für die Gewebezüchtung verwendet werden. Bei der Umwandlung von instabilem in stabiles Fibrin durch den Blutgerinnungsfaktor XIII (Fibrin stabilisierender Faktor-FSF) werden die im instabilen Fibrin enthaltenen lebenden Zellen stranguliert und abgetötet. Erfindungsgemäß wird deshalb für solche Zwecke als Ausgangsstoff stabiles, retrahiertes Fibrin verwendet. Bei der Suspension der daraus gewonnenen Partikel zusammen mit lebenden Zellen kann zur Vernetzung Fibrinogen und Thrombin, möglichst ohne den Fibrin stabilisierenden Faktor (FSF), zugesetzt werden. Die Gewinnung von retrahiertem Fibrin oder der anderen Ausgangsstoffe erfolgt nach bekannten Methoden. Fibrin wird aus Blutplasma bzw Fibrinogen gewonnen und von Begleitstoffen freigespült, auf tiefer als -70°C tiefgefroren und in kältegehärtetem Zustand in einer tiefgekühlten Mühle oder einem Homogenisator pulverisiert. Das erhaltene Pulver kann therapeutisch unmittelbar verwendet werden oder es wird nach bekannten Verfahren lyophilisiert.

Die gewonnenen Produkte werden vor der Benutzung in einem Suspensionsmittel, das lebende Zellen, Fibrinogen und Thrombin, möglichst ohne den Fibrin stabilisierenden Faktor (FSF), enthält, gemischt und suspendiert. Die Konsistenz

kann je nach Bedarf von flüssig bis pastenartig sein. Die suspendierbaren Partikel des Ausgangsmaterials können auch in vitro für die Zell- und Gewebezüchtung Verwendung finden. In gleicher Weise wie Fibrin werden auch die anderen klebrigen Materialien aufgearbeitet.

Beispiel

Fibrin wird aus Blut, das mit gerinnungshemmenden Substanzen, wie z.B. Natrium citricum oder Heparin, versetzt ist, nach Abzentrifugieren der Blutzellen aus dem Blutplasma und nach Retraktion unter sterilen Bedingungen gewonnen und wiederholt von Begleitstoffen freigespült. Es wird dann in flüssigem Stickstoff in kleineren Portionen eingefroren und in einer tiefgekühlten Mahlvorrichtung (Mühle, Kugelmühle oder Homogenisator) pulverisiert. Das gewonnene Produkt kann un-

mittelbar nach dem Auftauen verwendet werden oder es wird nach bekannten Methoden lyophilisiert. Während der Lyophilisierung kann es selbstverständlich einer Sterilisation gegen Mikroorganismen und Viren, insbesondere gegen AIDS, unterzogen werden. Dabei wird das Substrat im Vakuum Dämpfen von Persäuren oder von Mischungen von Persäuren und den entsprechenden konzentrierten Säuren ausgesetzt. Die Sterilisation kann jedoch auch mit den anderen bekannten Methoden, wie z.B. Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen oder durch Antibiotikazusätze, durchgeführt werden. Für die Anwendung der Produkte in Form von Suspensionen zusammen mit lebenden Zellen werden als Suspensionsmittel geeignete Nährmedien und Zellen benützt. Diesen können Fibrinogen und Thrombin, möglichst jedoch ohne den Fibrin stabilisierenden Faktor, für eine Gel-Bildung zugesetzt werden.

Herstellung von Präparaten zur spezifischen Beeinflussung der humoralen und zellulären Immunreaktion

DE Nr : P 35 13 572 7
vom 16 04 1985

Zusammenfassung

Es werden lösliche Antigene oder Allergene oder die nach DPA 3437757 3 und Zusatzanmeldung DPA 3501705 8 sowie EPA 85102586 6 gewonnenen biomimetisch analog wirkenden Anti-Idiotyp-Antikörper bzw die daraus gewonnenen separaten oder konjugierten antideterminanten Fragmente als Carrier mit Tropismus zu Immunzellen verwendet:

a) für die spezifische Immunsuppression oder zur Erzeugung von Immuntoleranz durch wahlweise Anlagerung oder Bindung an zytotoxische, zytostatische, antimetabole, alkylierende Substanzen, dimere Alkaloide, Folsäure-Antagonisten, Radionuklide, Antihistaminika sowie Anti-Menkin-Substanzen und bzw oder Extrakte aus allogenen oder xenogenem foetalen Thymus, Chorion bzw Trophoblasten;

b) für die spezifische Stimulation der immunologischen Abwehr

durch Anlagerung oder Bindung von Extrakten aus jugendlichen Lymphknoten, Thymus, Milz, Knochenmark, Transferfaktor und bzw oder Mitogenen

Die Verwendung bestimmter Allergene bzw Antigene und der analogen biomimetischen Stoffe einzeln oder in Kombination ermöglicht gezielte Indikationen für Prophylaxe und Therapie, insbesondere bei atopischen Erkrankungen, bei den verschiedenen Immunpathogenen Organerkrankungen einschließlich der multiplen Sklerose, der Myasthenia gravis, den Kollagenosen, bei nicht voll kompatibler Organ-

transplantation, zur Verhinderung von Arzneimittelresistenz durch induzierte immunologische Blockierung und andererseits bei der Stimulierung des Impfschutzes gegen

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur spezifischen Beeinflussung des Immunsystems der humoralen und zellulären Abwehr, dadurch gekennzeichnet, daß natürliche lösliche Antigene oder zum Immunogen komplettierte Haptene bzw Allergene oder die nach DPA 3437757 3 und DPA 3501705 8 (EPA 85102586 6) gewonnenen entsprechenden biomimetisch wirkenden Anti-Idiotyp-Antikörper oder die daraus gewonnenen separaten oder konjugierten anti determinanten Fragmente als Carrier zu Immunzellen verwendet werden:

a) Zur Immunsuppression oder zur Erzeugung von Immuntoleranz durch wahlweise Anlagerung oder Bindung an zytotoxische, zytostatische, antimetabole, alkylierende Substanzen, dimere Alkaloide, Folsäure-Antagonisten Radionuklide, Antihistaminika bzw Anti-Menkin-Substanzen, Diäthylcarbazin Dinatrium-Cromyglycat bzw Natriumchromolyn Extrakte aus foetalem Thymus, Chorion bzw Trophoblast, Methylxantine und bzw oder blockierende Substanzen der α -Rezeptoren bzw stimulierende Substanzen der β -Rezeptoren;

b) zur spezifischen Stimulation des Immunsystems durch wahlweise Anlagerung oder

Bindung an Extrakte aus jugendlichen Lymphknoten, Thymus, Milz, Knochenmark, Immunmediatoren, Transferfaktor, informative Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren für die jeweiligen Antikörpersynthesen und bzw oder Mitogenen

2 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Prophylaxe oder Behandlung von atopischen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die jeweils sensibilisierenden Allergene oder die biomimetischen Analoga einzeln oder kombiniert als Carrier verwendet werden

3 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Behandlung der multiplen Sklerose, dadurch gekennzeichnet, daß die natürlichen oder biomimetischen immunopathogenen Organantigene des ZNS, insbesondere enzephalogenes Protein und bzw oder Myelin des peripheren Nervensystems als Carrier verwendet werden

4 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Behandlung von Myasthenia gravis, dadurch gekennzeichnet, daß Acetylcholin-Rezeptoren der neuro-muskulären Endplatten oder entsprechende biomimetische Antigene als Carrier verwendet werden

5 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Behandlung von immunopathogenen Organerkrankungen z B von Schilddrüse, Leber, Niere, Pankreas, Lunge, Thymus, Nebenniere, Blutgefäßen, Gelenken, Kollagenosen und Sensibilisierungen gegen Hormone und Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß die sensibilisierenden Antigene oder ihre biomimetischen Analoga als Carrier verwendet werden

6 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen, dadurch gekennzeichnet,

daß die nicht-kompatiblen Histokompatibilitätsantigene bzw Organantigene gegen die krankheitsbedingt eine Sensibilisierung besteht, als Carrier verwendet werden

7 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1a) zur Verhinderung einer immunologischen Blockierung der Wirksamkeit von immunogenen Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß die antigenen Faktoren oder die entsprechenden biomimetischen Analoga als Carrier verwendet werden

8 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1b) zur Stimulierung der Abwehrfunktionen gegen Infektionserreger (Bakterien, Viren), Endo- und Exotoxinen, dadurch gekennzeichnet, daß die jeweiligen Impfvaccine oder die analogen biomimetischen Impfstoffe gleichzeitig oder zeitlich getrennt zur Immunisierung als Carrier benützt werden

9 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1b) zur Stimulierung der Abwehrfunktionen gegen Malignome, dadurch gekennzeichnet, daß die tumorassoziierten Antigene oder embryo-foetalen Antigene oder entsprechenden biomimetischen Analoga als Carrier benützt werden

10 Herstellung von Präparaten nach Anspruch 1b) zur allgemeinen Immunstimulierung, dadurch gekennzeichnet, daß Zellmembran-Antigene aus B- und T-Lymphozyten oder die entsprechenden biomimetischen Analoga als Carrier benützt werden

Beschreibung

Die spezifische Beeinflussung der humoralen und zellulären Abwehrvorgänge des Immunsystems war bisher unbefriedigend. Für Prophylaxe und Therapie bietet je-

doch eine antigenspezifische Suppression andererseits eine Simulierung des Immunsystems viele spezielle Anwendungsmöglichkeiten

Bei vorliegendem Verfahren wird die Fähigkeit zur Erkennung des Antigens bzw. Allergens durch Immunzellen für die selektive Beeinflussung derselben benutzt, indem spezifische Antigene oder Allergene bzw. biomimetisch entsprechend wirkende Anti-Idiotyp-Antikörper, deren antideterminante Fragmente, die einzeln oder miteinander zu Vollantigenen konjugiert angewandt werden als Trägerstoffe (Carrier) einerseits, für Stoffe, die die Immunfunktion solcher Zellen hemmen oder diese Zellen selektiv vernichten, so daß weitere Immunreaktionen ausbleiben und andererseits diese Immunzellen in ihrer Funktion stimulieren und zur Proliferation anregen, so daß die Immunantwort gegen die verwendeten Carrier selektiv verstärkt wird. Als Carrier werden jeweils die Antigene oder Allergene bzw. die zum Vollantigen komplettierten Haptene verwendet, gegen die die Immunreaktion verändert werden soll. Es können jedoch auch entsprechende biomimetisch wirksame Stoffe verwendet werden, die nach DPA 3437757/3 und DPA 3501705/8 sowie EPA 85102586/6 gewonnen werden. Es handelt sich dabei um Anti-Idiotyp-Antikörper oder die daraus gewonnenen separaten oder konjugierten antideterminanten Fragmente. Dadurch können besonders schwer erreichbare natürliche Haptene oder Antigene sowie Toxine, die nach Schädigung mit ionisierenden Strahlen und nach Verbrennungen entstehen, ebenso Tumormarker, DNS und RNS, Proteide oder Proteine, immunologisch imitiert werden. Die verschiedenen Anti-Idiotyp-Antikörper bzw. -Fragmente werden ggf. mit biologischen Trägerstof-

fen chemisch kovalent konjugiert. Auch lassen sich native Allergene bzw. Allergen-Analoga einzeln oder in Mischungen, z. B. aus Blüten- oder Gräser-Pollen, Hausstaub u. a., wie sie z. T. kommerziell hergestellt werden, verwenden. Als Allergene und deren Analoga können alle möglichen Arten dienen, insbesondere Antigene von Mikroorganismen (Bakterien und Viren), Pflanzen sowie Gewebeantigene und Faktoren, die zu immunpathogenen Erkrankungen führen. Auch Arzneimittel, gegen die sich Immunreaktionen ausbilden, können zur Desensibilisierung oder zur Erzeugung von Immuntoleranz verwendet werden. Es lassen sich auch immunologisch bedingte Resistenzen gegen Arzneimittel aufgrund der Blockierung derselben durch Antikörper verhindern, oder beseitigen, ohne daß der biologische Wirkungsmechanismus des Arzneimittels, z. B. auf den Stoffwechsel oder auf genetische Regulationen beeinträchtigt wird. Zur spezifischen Verhinderung einer Immunisierung gegen bestimmte Antigene oder Allergene, zur Immunsuppression oder Erzeugung von Immuntoleranz werden die sensibilisierenden Faktoren als Carrier wahlweise von zytotoxischen und zytostatischen Substanzen, insbesondere Antimetabolite wie 6-Mercaptopurin und Thioguanin, Azaserin, Duazomyzin A und Mitomycin, Fluorurazil, Thiourazil, den Folsäure-Antagonisten Methothrexat, Amethopterin, Aminopterin, Actinomycine sowie Stoffen, die die Proteinsynthese hemmen, z. B. Puromycin, Streptomycin, Erythromycin, Chloramphenicol, Ricin und Diphtherietoxin, ebenso Diaminoacredine, z. B. Acriflavin und dimäre Alkaloide wie Vinblastin und Vincristin, dann aber auch Radionuklide, Antihistaminika bzw. Anti-Menkin-Substanzen, Diäthylcarbazin, Dinatrium-

Cromyglycat bzw Natriumchromolyn, Cyclosporin, Extrakte aus foetalem Thymus, Chorion bzw Trophoblast, Methylxantine und bzw oder blockierende Substanzen der α -Rezeptoren bzw stimulierende Substanzen der β -Rezeptoren verwendet Sie sind geeignet, einzeln oder in Kombination ange lagert, oder an die Carrier-Moleküle kovalent gebunden zu werden Zur spezifischen Stimulation der Immunreaktionen werden wahlweise Extrakte aus jugendlichen Lymphknoten, Thymus, Milz, Knochenmark, ebenso Immunmediatoren, (Interleukine, Interferon u a) Transferfaktor, informative Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren für die jeweilige Antikörpersynthese und bzw oder Mitogene, z B Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweedmitogen sowie Produkte von Bakterien, Metallionen und Polynukleotide, ebenso stimulierende Substanzen der α -Rezeptoren wie auch β -Rezeptoren-Blocker, einzeln oder in Kombination verwendet

Die Anlagerung der modifizierenden Faktoren für die Immunreaktion an die Carrier erfolgt durch die Inkubation der als Lösung vorliegenden Komponenten oder Lösung der Bestandteile, die in Trockenform vorliegen, durch die andere flüssige Komponente Es lassen sich aber auch alle möglichen Methoden zur chemischen Konjugation der Faktoren verwenden, so z B die Kupplung als Diazonium-Verbindung, die Behandlung mit Zyanaten, die Umsetzung mit Carbobenzoxo-Verbindungen, das Curtius'sche Azid-Verfahren, das Oxazolol-Verfahren, die Konjugation mit Polysacchariden nach W J T Morgan, Verbindung mit Carboxyhydraten, Pyridin-Eiweiß-Verbindungen, Verbindungen mit Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfid-Brücken u a (vgl A Schmidt: Fortschritte der Serologie,

S 67 u f , Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1955; Helmut Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden, S 480 u f , Gustav Fischer Verlag, 1984)

Zur Immunsuppression und Erzeugung von Immuntoleranz sollen die Hemmstoffe mindestens in äquivalenten Molekül-Mengen mit den Carrier-Molekülen verwendet werden Sie können jedoch auch ein mehrfaches betragen Die Dosierung erfolgt nach den Erkenntnissen über die Induktion einer Immunantwort bzw die Erzeugung von Low- oder High-Zone-Toleranz Bei bestehender Sensibilisierung und vorhandenen humoralen Antikörpern oder Immunzellen für die verzögerte Immunreaktion bzw einer Granulomentstehung ist es zweckmäßig Konzentrationen im ng/ml Antigen über längere Zeitspannen wiederholt zu applizieren Bei Auslösung einer Immuntoleranz bei einer nicht aktuellen Sensibilisierung ohne erkennbare Immunreaktion z B präseasonal bei atopischen Erkrankungen, zur Vorbehandlung einer Organtransplantation oder zur Verhinderung einer immunologischen Blockierung von Arzneimitteln können hohe Konzentrationen des Antigens von μ g - mg bei gleichzeitiger Applikation des Hemmstoffes erfolgen Bei allergischen Erkrankungen ist die gleichzeitige Kombination mit Antihistaminika bzw Anti-Menkin-Stoffen und einem oder mehreren anderen immunsuppressiven Faktoren ebenso wie die wiederholte Anwendung höherer Verdünnungen in ansteigenden Konzentrationen wichtig Im krankheitsfreien Intervall können jedoch höhere Konzentrationen in größeren Abständen angewandt werden Sobald Immuntoleranz gegen ein Arzneimittel vorliegt, kann dieses auch ohne zusätzliche Immunmodulatoren angewandt werden Absolute Angaben über die Art der Kombination

der Carrier sowie der als Immunmodulatoren verwendeten Substanzen, wie auch der Mengenrelationen und Dosierung, sind wegen den Unterschieden der Substanzen und den individuellen Verschiedenheiten nicht möglich. Die einschleichende Dosierung in Art der Erzeugung einer Low-Zone-Toleranz ermöglicht es jedoch, nachteilige Reaktionen zu vermeiden.

Zur spezifischen Stimulation der immunologischen Abwehr werden die Antigene zusammen mit den Stimulationsfaktoren in gleicher Weise appliziert und dosiert wie bei der Induktion der Antikörperbildung bzw. der Boosterung. Durch die Kombination kann die Dosierung jedoch bis auf die Hälfte der sonst üblichen Dosierung des Antigens ohne Zusatzstoffe reduziert werden. Im Gegensatz zur Anwendung von Adjuvantien werden die Stimulationsfaktoren spezifisch an den zu sensibilisierenden Immunzellen wirksam.

Beispiel 1

Zur präseasonalen Prophylaxe, wie auch der Therapie einer Atopie gegen ein oder mehrere exogene Allergene, werden diese nach vorheriger Allergentestung als kommerzielle Präparate einzeln oder als Allergenmischung oder aber die entsprechenden biomimetischen Anti-Idiotyp-Antikörperpräparationen (vgl. DPA 3437757/3, DPA 3501705/8 sowie EPA 85102586/6) als Carrier für funktions- und zellschädigende Stoffe verwendet. Es werden hier ein Alkaloid sowie ein Hemmstoff der Antikörperbildung eingesetzt und die beiden unterschiedlichen Bestandteile getrennt an den Carrier gebunden. Die beiden kombinierten Bestandteile werden dann im Verhältnis 1:1 zusammengemischt. Es werden dabei verwendet:

1 Eine Kombination von Allergen bzw. dem biomimetischen Analogon zusammen mit dem Alkaloid Vincristin im molekularen Verhältnis 1:2 Anteilen

2 Eine Kombination von Allergen bzw. dem biomimetischen Analogon mit Natriumcromolyn im Verhältnis 1:1

Zur Vermeidung von anaphylaktischen Reaktionen besonders bei der saisonalen Anwendung wird ein Antihistaminpräparat und/oder Anti-Menkin-Stoffe sowie α -Rezeptoren-Blocker (z. B. Phenoxybenzamin) und β -Rezeptoren-Stimulantien (z. B. Isoproterenol) und bzw. oder Methylxantine (z. B. Theophyllin) in unterschwelligen therapeutischen Konzentrationen zugesetzt.

Die Faktoren der Lösungen 1 und 2 können chemisch kovalent gebunden werden, durch alkylierende Reagentien z. B. Tetramin, Busulfan oder durch Brückenbildung durch Diazotierung (vgl. Beschreibung). Auch können die Faktoren durch vorherige Inkubation nicht kovalent adsorptiv gebunden werden. Auch andere Mischungsverhältnisse sind möglich. Zur Umstimmung des Immunsystems können auch Gewebeextrakte aus foetalem Thymus und dem foetalen Anteil der Plazenta (Trophoblast oder Chorion) mitverwendet werden.

Beispiel 2

Es sollen Präparate zur spezifischen Immunsuppression der humoralen und zellulären Autosensibilisierung bei Multipler Sklerose hergestellt werden. Als Carrier wird dazu encephalitogenes Protein (vgl. Kibler, R. F., Shapira, R. "Isolation and properties of an encephalitogenic protein from bovine, rabbit and human central nervous system tissue" J. Biol. Chem. 243

281 (1968)), sowie Myelin des peripheren Nervensystems (vgl. Paterson P Y "The demyelinating diseases: clinical and experimental correlates" in Immunological Diseases Sampter, M (ed) 2nd ed Little, Brown Boston 1971) verwendet

Es können auch die immunologisch imitierenden Anti-Idiotyp-Antikörper oder deren zum Antigen konjugierten antideterminanten Fragmente verwendet werden. Beide Gewebestandteile oder die biomimetischen Analoga werden getrennt voneinander mit Protein-synthese-hemmenden Stoffen, z B Erythromycin oder Chloramphenicol im molekularen Verhältnis von 3:1 Teilen adsorptiv oder kovalent an die Carrier gebunden. Es können dazu auch Folsäure-Antagonisten, wie Methotrexat oder Aminopterin verwendet werden. Auch können die beiden Antigene als Träger für unterschiedlich immunsuppressive Chemotherapeutika dienen. Die getrennt konjugierten Anteile werden miteinander vereinigt. Eine etwaige kovalente Bindung mit den Trägerstoffen erfolgt entsprechend der Beschreibung. Es können auch Mischungen der immunsuppressiven Substanzen mit Mischungen der Antigene inkubiert oder chemisch konjugiert werden.

Beispiel 3

Es sollen Präparate zur Behandlung der Myasthenia gravis hergestellt werden. Dazu wird der aus dem Torpedofisch isolierte Acetyl-Cholin-Rezeptor als Carrier verwendet (vgl. Patrick, J, Lindstrom, J: "Autoimmune response to acetylcholine rezeptor" Science 180, 821 (1973)). Es können auch andersartige Organantigene (vgl. Vettors, J M, Simpson, J A, Folkard, A, "Experimental myasthenia gravis" Lancet 2, 29 (1969)) einzeln oder

als Mischung mit den Acetyl-Cholin-Rezeptoren verwendet werden oder aber die entsprechenden analogen Anti-Idiotyp-Antikörper bzw deren antideterminante Gruppen, die zum Immunogen konjugiert sind. An die als Carrier verwendeten Organantigene oder an deren biomimetische Analoga werden zellmembranlyisierende Stoffe wie Phospholipide, Lysolecithin, Ricin oder Diphtherietoxin zur Schädigung oder Vernichtung der auto-sensibilisierten Immunzellen adsorptiv oder kovalent gebunden.

Beispiel 4

Zur Behandlung von immunopathogenen Organerkrankungen werden die jeweiligen Organantigene, gegen die eine Auto-sensibilisierung besteht, nach bekannten Verfahren, z B durch Affinitätschromatographie an den gebundenen pathogenen Antikörper (vgl. auch EPA 80106066) isoliert. Ober die Organ-Auto-Antigene können Idiotyp-Antikörper gewonnen werden und aus diesen wie auch aus den primären Auto-Antikörpern die imitierenden Anti-Idiotyp-Antikörper als biomimetische Analoga der Organantigene. Sowohl die isolierten Organantigene, wie auch deren biomimetische Analoga werden als Carrier für die immunsuppressiven oder zellschädigenden Substanzen verwendet.

Als Ausgangsstoffe für die Gewinnung der Organ-Antigene dienen Schilddrüse, Leber, Niere, Pankreas, Lunge, Thymus, Nebenniere, Blutgefäße, Gelenke, Muskulatur ebenso wie auch Hormone, z B Proteohormone, insbesondere der Hypophyse sowie Thyreoglobulin und Insulin, sowie Enzyme gegen die im Organismus eine Auto-sensibilisierung besteht. Als immunologisch hemmende oder die jeweiligen Klone

der sensibilisierten Immunzellen (Plasmazellen, B- und T-Lymphozyten) schädigende oder vernichtende Stoffe werden z B Mitomycin oder Fluorurazil, Actinomycin, Puromycin, Vincristin, Chloramphenicol, einzeln oder wie in den vorhergehenden Beispielen in Kombinationen adsorptiv oder kovalent gebunden Insbesondere können Kombinationen von Zytostatika verwendet werden, wie sie in der modernen Krebstherapie üblich sind z B Mitomycin C, Methyl-CCNU und Cyclophosphamid bzw 5 FU, Methyl-CCNU, Vincristin oder 5 FU, BCNU, Vincristin und DTIC Auch sind die neueren immunsuppressiven Substanzen, wie Cyclosporin A, Levamisol und Dapson zur Konjugation mit den sensibilisierenden Stoffen geeignet Als zytotrope Carrier können z B bei Lupus erythematodes auch Nukleinsäuren (DNA und RNA) und Bestandteile von Mitochondrien bzw die entsprechenden Anti-Idiotyp-Antikörper und deren anti-detewninanten Bestandteile verwendet werden

Beispiel 5

Zur Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organ- bzw Gewebetransplantationen werden als Carrier die jeweiligen Histokompatibilitäts-Antigene, durch die sich der Spender- vom Empfängerorganismus unterscheidet sowie bei krankheitsbedingter Autosensibilisierung die entsprechenden Organantigene oder aber die jeweiligen biomimetischen Analoga in Form der Anti-Idiotyp-Antikörper verwendet Die Isolierung dieser Faktoren erfolgt durch immunologische Methoden (vgl Billingham R E : "Tissue transplantation: Scope and prospect" Science 153, 266 (1966); Merville, J P "Human tissue

transplantation" Adv Immunol 7, 276 (1967))

Als zellschädigende Substanzen werden wahlweise einzeln oder in Kombination Cyclosporin A oder Azathioprin, Vinblastin und bzw oder Radionuklide wie J-131, P-32, Au-198, Y-90, Co-60, Co-137 adsorptiv oder kovalent an die Carrier gebunden

Beispiel 6

Zur Vermeidung von nachteiligen Immunreaktionen oder der immunologischen Blockierung der Wirksamkeit von immunogenen Arzneimitteln, die für eine Dauersubstitution erforderlich sind, wie z B Proteohormone, Enzyme oder makromolekulare Organextrakte oder deren biomimetische Analoga, insbesondere zur Behandlung von genetisch bedingten Enzymopathien, chromosomalen Aberrationen, Malignomen u a wird zur Einleitung der Therapie eine immunologische Toleranz gegen die Arzneimittel dadurch erzeugt, daß diese als Carrier für zytotoxische, zytolytische oder zytostatische Stoffe verwendet werden, wie man sie in der Chemotherapie von Tumoren oder zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen unabhängig vom Antigen anwendet Durch Verwendung der zytotropen Carrier wird das übrige Immunsystem weitgehend für erwünschte Immunreaktionen geschont Sobald durch hohe Dosierung der Konjugate die Immuntoleranz gegen den Carrier hergestellt ist, kann das Arzneimittel allein unter toleranzerhaltenden Bedingungen weiter verabfolgt werden Bei malignen Erkrankungen kann jedoch die Kombinationsbehandlung mit hohen Dosierungen der primär immunogenen Arzneimittel, z B Biological response modifiers (Organpeptiden

- und Proteinen) unabhängig von der Chemotherapie weitergeführt werden.

Beispiel 7

Zur spezifischen Stimulierung der Abwehrfunktionen gegen Infektionserreger (Bakterien oder Viren) wie auch gegen Endo- und Exotoxine werden die jeweiligen Antigene oder analogen biomimetischen Stoffe als Carrier für Protein- oder Peptid-Fractionen von Extrakten aus jugendlichen Lymphknoten, Thymus, Milz und bzw. oder Knochenmark verwendet. Die Organpräparate werden nach bekannten Verfahren hergestellt (vgl. EPA 80106066 u.a.) Es werden β -Rezeptoren-Blocker und Immunmediatoren (Interferon, Interleukine) sowie Mitogene, z.B. Phytohämagglutinin, Pockweedextrakte und bzw. oder Concanavalin A zusätzlich adsorptiv an die Antigene angelagert oder kovalent an diese entsprechend der Beschreibung gebunden.

Beispiel

10

Es werden tumorassoziierte Antigene und bzw. oder embryofetale Antigene oder deren biomimetische Analoga in Form der Anti-Idiotyp-Antikörper bzw. deren anti-determinante Bestandteile als Carrier für immunstimulierende Stoffe in Form von Transferfaktor bzw. Immun-(informative) RNA oder DNA aus Zellen des Immunsystems, die *in vitro* enzymatisch vermehrt worden sind von an gleichartigen Tumoren Erkrankten verwendet sowie Mediatoren aus Lymphozyten und Peptidextrakten aus jugendlichem Thymus bzw. die entsprechenden Thymushormone wie z.B. Thymosin 1.

Beispiel 9

Zur allgemeinen Immunstimulation des Organismus werden Zellmembran-Antigene aus Plasmazellen, B-Lymphozyten und T-Helferzellen oder die entsprechenden biomimetischen Analoga als Carrier für Phytohämagglutinin und Dinitrochlorbenzol (DNCB) verwendet.

Verfahren zur immunologischen Sensibilisierung von Teilen einer permanent gezüchteten, nicht sensibilisierten Zelllinie von malignen Zellen des Immunsystems oder von Hybridomzellen

DE Nr : 35 09 153 3-41
vom 14 03 1985

Zusammenfassung

Es werden transformierte oder maligne Zellen des Immunsystems sowie Hybridomzellen aus Immunzellen und malignen Zellen, die keine immunologische Sensibilisierung oder Antikörperbildung erkennen lassen, in Kultur gezüchtet und Teile davon in vitro sensibilisiert. Insbesondere werden dazu fusionierte Zellen humanen Ursprungs verwendet. Die Sensibilisierung erfolgt durch Zusatz von iRNA oder iDNA mit der Syntheseinformation für bestimmte Antikörper und/oder mit dem entsprechenden Antigen zum Nährmedium. Gegebenenfalls werden die Hybridomzellen in Mischkultur mit Immunzellen aus Lymphknoten, Thymus und/oder Milz gezüchtet. Auch können Extrakte aus solchen Zellen bzw. Geweben oder daraus isolierten oder entsprechend künstlich synthetisierten immunologischen Mediatoren und Mitogene der Hybridomzellkultur zugesetzt werden. Die Selektion, Züchtung und Antikörpergewinnung aus den sensibilisierten Hybridomzellen erfolgt nach bekannten Methoden.

Patentansprüche

1 Verfahren zur immunologischen Sensibilisierung von Teilen einer permanent gezüchteten, nicht sensibilisierten Zelllinie von malignen Zellen des Immunsystems oder von Hybridomzellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sensibilisierung in vitro durch Zusatz von informativer RNA

oder informativer DNA als Syntheseinformation für die gewünschten Antikörper in Konzentrationen zwischen 10^{-6} bis 10^{-10} g pro ml des Zellkulturmediums vornimmt, wobei die Gewinnung der informativen RNA oder der informativen DNA aus Makrophagen, die mit dem Antigen kontaktiert wurden, oder aus sensibilisierten Lymphozyten und die Vermehrung der informativen RNA oder der informativen DNA in zellfreien Synthesystemen enzymatisch unter Verwendung von Replikasen vorgenommen wird.

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sensibilisierung in zusätzlicher Anwesenheit von

- a) Makrophagen und Immunzellen aus Lymphknoten, Thymus und/oder Milz oder
- b) Extrakten solcher Zellen bzw. Gewebe oder
- c) daraus isolierten immunologischen Mediatoren und Mitogenen bzw. analogen Syntheseprodukten

vornimmt.

Die Gewinnung von klonalen Antikörpern aus animalischen Hybridomzellen, die durch Fusionierung von sensibilisierten B-Lymphozyten und Myelomzellen gewonnen werden, stößt auf verschiedene Schwierigkeiten, besonders bei der Gewinnung der sensibilisierten Lymphozyten und der nicht sensibilisierten Myelomzellen wie auch der Selektion des Antigens und der Antikörperbildenden Zellen. Humane klonale Antikörper lassen sich wegen der bisher erforderlichen Sensibilisierung lebender

Individuen, aus deren Milz die Lymphozyten gewonnen werden, wie auch die Gewinnung von Myelomzellen zur Fusionierung, nur über Freiwillige, die sich zur Sensibilisierung zur Verfügung stellen, gewinnen

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diese Nachteile zu beseitigen. Diese Aufgabe wird mit den Maßnahmen des Patentanspruchs 1 gelöst. Dabei stellt es eine Selbstverständlichkeit dar, daß man mit den so sensibilisierten Zellen die entsprechenden Antikörper gewinnen kann. Der Patentanspruch 2 nennt eine Ausgestaltung der Erfindung.

Die Gewinnung von animalischen wie auch von humanen klonalen Antikörpern durch eine Sensibilisierung in vitro bedeutet technisch eine beträchtliche Vereinfachung gegenüber der bisherigen Sensibilisierung in vivo. Es können sowohl isolierte Zelllinien der Myelomzellen oder anderen malignen Zellen des Immunsystems, wie z. B. den Plasmazytomen, Lymphozytomen, Thymomen wie auch Hybridomzellen, welche die potentielle Fähigkeit zur Antikörpersynthese besitzen, über unbeschränkte Zeitspannen hinweg gezüchtet werden. Die Zelllinien stehen für die Gewinnung unterschiedlich sensibilisierter Zellklone unbegrenzte Zeit zur Verfügung. Die verwendeten Zellen dürfen keine andersartige Sensibilisierung aufweisen, d. h. sie dürfen keine andere Art von Antikörpern synthetisieren, weil solche Zellen für eine zusätzliche Sensibilisierung ungeeignet sind. Der Nachweis fehlender Antikörperbildung läßt sich durch bekannte immunologische Methoden mit Hilfe eines Immunglobulins führen, das gegen Antikörper der Spezies gerichtet ist, von der die Zelllinie abstammt, z. B. durch Gel-Präzipitation mit markierten Anti-Antikörpern, Elek-

trophorese oder Radioimmunassay.

Die immunologische Sensibilisierung von Teilen einer permanent gezüchteten, nicht sensibilisierten Zelllinie erfolgt in abgezweigten Zellkulturen über das Nährmedium. Diesem werden informative RNA (iRNA) oder informative DNA (iDNA) als Syntheseinformation für die gewünschten Antikörper in Konzentrationen zwischen 10^{-6} bis 10^{-8} pg/ml Nährmedium zugesetzt. Die Gewinnung der iRNA oder iDNA erfolgt aus Makrophagen, die mit dem Antigen kontaktiert wurden oder aus sensibilisierten Lymphozyten. Die Syntheseinformation wird in zellfreien Synthesystemen enzymatisch unter Verwendung von Replikasen vermehrt (vgl.: Fishman, M.: *J. exp. Med.* 114, 837 (1961); Fishman, M., Adler, F.: *J. exp. Med.* 117, 595 (1963); Askonas, B., Rhodes, J.: *Nature (Lond.)* 205, 470 (1965); Friedmann, H., Stawitsky, A., Solomon, J.: *Science* 149, 1106 (1965); Jachertz, D.: *Z. med. Mikrobiol. Immunol.* 152, 112 (1966); *Flow of information and gene activation during antibody synthesis: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 207, 122 - 144 (1973)). Die Kulturen von malignen Zellen des Immunsystems oder Hybridomzellen, die immunologisch in vitro sensibilisiert werden sollen, können als Mischkulturen mit Makrophagen und Immunzellen aus Lymphknoten, Thymus und/oder Milz gezüchtet oder mit Zusatz von Extrakten solcher Zellen bzw. Gewebe oder daraus isolierten immunologischen Mediatoren sowie Mitogenen, die auch künstlich synthetisch gewonnen sein können, inkubiert werden. Die Sensibilisierung durch iRNA oder iDNA benötigt jedoch nicht absolut eine Mischkultur mit Immunzellen.

Nach vollzogener Sensibilisierung gehen die zugesetzten Lymphozyten und Makrophagen schon nach kurzer Zeit spontan

zugrunde. Ks überleben die malignen Zellen oder Hybridomzellen. Bei Verwendung von Hybridomzellen können die nicht fusionierten malignen Zellen mit einem Selektionsmedium, das Aminopterin enthält, zum Absterben gebracht werden. Die Selektion der sensibilisierten Antikörper-synthetisierenden, unbegrenzt lebensfähigen Zellklone, deren Weiterzucht und die Gewinnung der Antikörper erfolgt nach bekannten Methoden (vgl.: Köhler, G. und C. Milstein: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (London) Vol. 256, 495 - 497 (1975); Milstein, C.: Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. *Proceedings of the Royal Society (London) Ser. B.* Vol. 211, 393 - 412 (1981); Wichner, S.: Antikörperbildung in der Zellkultur S. 48 in H. Friemel: *Immunologische Arbeitsmethoden*: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1984)

Beispiel 10

Iis sollen geklonte humane Antikörper gegen Herpes-A-Virus erzeugt werden. Dazu werden informative RNA oder DNA nach dem Verfahren von Jachertz (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 207, 122 - 144 (1973)) in Konzentrationen von Mg bis pg pro ml dem Nährmedium von humanen Hybridomzellen, die durch Fusion von humanen Lymphozyten und Myelomzellen, die keine Antikörperbildung erkennen lassen, zugesetzt. Weiter wird dem Nährmedium ein Rohextrakt aus nicht sensibilisierten Lymphknoten des Darmes (Payr'schen Plaques) in Konzentrationen von ng pro ml zugesetzt. Die Selektion der Antikörper-produzierenden Zellen, deren isolierte Weiterzucht und fortlaufende Gewinnung von Antikörpern gegen Herpes-Virus erfolgt nach der Methode von Köhler und Milstein (vgl. *Nature* Vol. 256, 495 - 497 (1975)). Während der Sensibilisierungsphase der Hybridomzellen können der Zellkultur allogene Makrophagen und/oder Lymphozyten zugesetzt werden. Diese sterben nach getaner Helferfunktion nach kurzer Zeit ab. Ihr Detritus wird bei der Umsetzung der sensibilisierten Hybridomzellen während der Passagen beseitigt.

Herstellung von konjugierten Antigenen und dagegen gerichteten Antikörpern (Immunglobulinen) zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken bei Tumoren

DE Nr : 34 44 684 2
vom 07 12 1984

Zusammenfassung

Es werden konjugierte Antigene nach bekannten Methoden der kovalenten chemischen oder adsorptiven Bindung aus tumorassoziierten Antigenen und bzw oder embryo-foetalem Antigen, insbesondere aus Trophoblast oder Chorion der Plazenta mit pflanzlichen, mikrobiellen oder chemisch synthetisierten Antigenen oder Haptenen bzw tierischen Giften und gegen diese spezifische Antikörper in vivo oder in vitro zur Prophylaxe oder Therapie von Tumoren hergestellt Die Anwendung erfolgt nach den Prinzipien der Erzeugung einer klassischen Arthus-Reaktion durch lokale aktive oder passive Anaphylaxie in Art der Prausnitz-Küstner'schen Reaktion nach aktiver oder passiver Sensibilisierung

Patentansprüche

1 Herstellung von konjugierten Antigenen und dagegen spezifisch gerichteten Antikörpern bzw Antikörperseren zur Prophylaxe und Therapie von Tumoren, dadurch gekennzeichnet, daß tumorassoziierte Antigene oder Haptene und bzw oder embryo-foetale Antigene oder Haptene, insbesondere aus dem Trophoblast oder Chorion der Plazenta kovalent oder adsorptiv an pflanzliche, mikrobielle oder chemisch synthetisierte Antigene oder Haptene bzw tierische Gifte gebunden und gegen die Konjugate in vivo oder in vitro Antikörper erzeugt werden

2 Anwendung nach Anspruch 1 zur Erzeugung bzw Auslösung einer aktiven oder passiven topischen Anaphylaxie am Tumorgewebe unter Durchbrechung der Immuntoleranz gegenüber Tumorantigenen

Beschreibung

Das Verfahren der Patentansprüche dient zur Herstellung von Präparaten zur Immuntherapie von benignen und malignen Tumoren durch Auslösung einer modifizierten Prausnitz-Küstner'schen Reaktion in Form einer aktiven oder passiven Arthus-Reaktion in oder am Tumorgewebe und Durchbrechung einer etwa bestehenden Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Tumorantigenen Dadurch wird nach Auslösung der Arthus-Reaktion die natürliche körpereigene Immunabwehr gegen den Tumor ermöglicht Es werden dazu konjugierte Antigene aus tumorassoziierten Antigenen oder Haptenen und bzw oder embryo-foetale Antigene, insbesondere aus Trophoblast und Chorion der Plazenta spezifisch gegen diese gerichtete Antikörper bzw Antikörperseren benötigt Die Arthus-Reaktion ist eine entzündliche, lokale, topische Reaktion, die durch die Reaktion präzipitierender Antikörper mit den lokal deponierten Antigenen hervorgerufen wird Physiologisch beobachtet man außer Ödemen und Blutungen, vaskuläre Fibrinoidnekrose und eine massive Einwanderung der neutrophilen und eosinophilen Leukozyten Die Reaktion aus pflanzlichen, mikrobiellen und bzw oder

chemischen Produkten bzw. tierischen Giften konjugiert, d. h. an diese kovalent oder adsorptiv gebunden. Die Gewinnung von tumorassozierten Antigenen wie auch embryo-foetalen Antigenen erfolgt nach bekannten Verfahren (vgl. EPA 80106066 6) insbesondere durch Affinitätschromatographische oder immunologische Absättigungsverfahren. Künstlich zusammengesetzte Antigene können nach verschiedenen Verfahren gewonnen werden; so zum Beispiel durch Kupplung an Eiweiß als Diazonium-Verbindung, die Behandlung mit Zyanaten, die Umsetzung mit Carbobenzoxy-Verbindungen, das Curtius'sche Azid-Verfahren, das Oxazolon-Verfahren, die Konjugation von Polysacchariden mit bakteriellen konjugierten Proteinen nach VVJT Morgan, Verbindung von Aminosäuren mit Carbohydraten, Pyridin-Eiweißverbindungen und u. a. (vgl. A. Schmidt: Fortschritte der Serologie, S. 67 u. f.; Verlag: Dietrich Steinkopf, Darmstadt, 1955; Helmut Friemel: Immunologische Arbeitsmethoden, S. 480 u. f.; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1984). Auch die Verwendung von Adjuvantien ist möglich. Zur Auslösung des invers passiven Arthusphänomens werden zur i. v.-Injektion die dem Antigen entsprechenden spezifischen Antikörper bzw. Antikörperseren benötigt. Diese können aus allogenen oder xenogenen immunisierten Individuen gewonnen werden. Bei gesunden Normalindividuen führt die Immunisierung mit konjugierten Tumorantigenen bzw. embryo-foetalen Antigenen zu keinen nachteiligen Nebenreaktionen, weil im Organismus keine Vorsensibilisierung gegen die entsprechenden Antigene besteht. Die Sensibilisierung bewirkt vielmehr einen prophylaktischen Immunschutz gegen die Ent-

stehung von Tumoren mit gleichen Antigenqualitäten und verhindert die Ausbildung von Immuntoleranz gegen solche Tumorzellen. Die Antikörper können aber auch in vitro aus Hybridom-Zellen gegebenenfalls kloniert, erhalten werden. Zweckmäßig ist jedoch ein umfassendes Antikörperspektrum gegenüber den konjugierten Antigenen. Zur Auslösung der Prausnitz-Küstner'schen invers passiven Reaktion sind präzipitierende Antikörper erforderlich. Die zur i. v.-Injektion benötigten Antikörpermengen liegen je nach Art der Spezies und der Antigenqualität im mg-Bereich des AK-Stickstoffs/kg Körpergewicht (vgl. B. Steffen: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968). Um einen generalisierten anaphylaktischen Schock zu vermeiden, sollte der auslösenden topischen Antigen-Injektion an oder in den Tumor Adrenalin oder Epinephrin zugesetzt und auch zusätzlich systemisch verabreicht werden. Das Behandlungsprinzip ist die Auslösung einer topischen allergischen Reaktion gegen den Tumor. Die Latenzzeit bei passiver Sensibilisierung zwischen der intravenösen Antikörperinjektion und der lokalen Auslösung durch Infiltration des Tumorgewebes oder des Tumorbettes mit dem konjugierten Antigen reicht bei der Verwendung von nicht-reagierenden Antikörpern, die sich nicht im Gewebe fixieren, von Minuten bis wenigen Stunden. Die Auslösungsinjektion kann deshalb unmittelbar vor oder nach der chirurgischen Entfernung des Tumors bei offenem Situs erfolgen. Auch ist die Injektion durch die Haut möglich. Ebenso ist eine topische Anwendung und Sensibilisierung und Auslösung möglich. Für die Durchbrechung einer Immuntoleranz gegen die Tumoranti-

gene ist die primäre Antigen-Sensibilisierung vor der auslösenden Injektion mit Antikörpern zweckmäßig. Auch hier ist auf das relativ kurze Intervall zwischen Sensibilisierung und Auslösungsinjektion zu achten, weil auch die Antigene wegdiffundieren können.

Die Anwendung bivalenter präzipitierender Antikörper verursacht kein Tumor-Enhancement, wie dies bei aktiver Immunisierung mit den Tumorantigenen möglich ist. Während der Ausbildung des Arthusphänomens, insbesondere bei nekrotischer Entzündung, ist eine chemotherapeutische oder antibiotische Zusatztherapie gegen etwaige Infektionen einzuleiten und bei Operationen der Gefahr von Nachblutungen oder Perforationen zu begegnen.

Beispiel 1

Es werden embryo-foetale Antigene aus Zellmembranen von isoliertem bovinen oder humanen Trophoblast oder Chorion der Plazenta nach bekannten biochemischen Verfahren, insbesondere durch fraktionierte Schwerkrafttrennung von chemisch aufgeschlossenen Homogenaten und unter Beseitigung von adulten Gewebefaktoren durch adsorptionschromatographische Absättigung an Säulen gebundenen Antikörpern gegen adultes Gewebe, wie z. B. der Dezidua gewonnen. Die Zellfaktoren lassen sich auch aus in Massenkulturen gezüchteten Chorionzellen isolieren. Zur nachfolgenden Konjugation können Einzel-faktoren wie auch Gemische von embryo-foetalen Antigenen Verwendung finden. Diese werden an pflanzliche Polysaccharide, die mit einer begrenzten Anzahl von Fettsäureresten substituiert wurden, konjugiert. Diese adsorbieren sich ohne Binde-

glied direkt an die Proteine (Hämmerling, U., Westphal, O.: *Europ. J. Biochem.* 1, 46 (1967)). Bei Proteinantigenen kann auch die Tannin-Methode angewandt werden (Borduas, A., Grabar, P.: *Ann. Inst. Pasteur* 84, 903 (1953); Stavitsky, A.: *J. Immunol.* 72, 360 (1954); Roitt, I., Doniach, D.: *WHO-Book of immunologic techniques* S. 20: World Health Organisation, Genf (1966)).

Auch die Benzidin-Methode ist dazu geeignet (Gordon, J., Rose, B., Sekon, A.: *J. exp. Med.* 108, 37 (1958); Roberts, I., Doniach, D.: *WHO-Book of immunologic techniques* S. 1: World Health Organisation Genf (1966); Stavitsky, A., Arquilla, E.: *J. Immunol.* 74, 306 (1955); Timpe, R., Furthmayr, H., Wolff, I.: *Int. Arch. Allergy* 32, 318 (1967)).

Die konjugierten Antigene werden nun nach bekannten Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern durch konventionelle Methoden der Immunisierung von xenogenen oder allogenen Antikörperbildnern oder aber *in vitro* zur Antikörperbildung in Lymphozyten oder Hybridomzellen verwendet (Herwart, Ambrosius: *Antiserumgewinnung aus Tieren*, S. 25; Fiebig, K.: *Herstellung monoklonaler Antikörper durch Zellfusion*, S. 36 und Wichner, S.: *Antikörperbildung in der Zellkultur*, S. 48 - in H. Friemel: *Immunologische Arbeitsmethoden*: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1984)).

Die konjugierten Antigene und die Antikörperpräparate werden zur Erzeugung eines passiven Arthus-Phänomens verwendet (C. Steffen: *Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie*, S. 530, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Eine aktive toxisch-anaphylaktische Reaktion kann mit dem konjugierten Antigen nach Vorsensibilisierung mit diesem ausge-

Beispiel

10

Es werden Antigene aus Einzelorganen oder Organmischungen von Tierfoeten entsprechend Beispiel 1 gewonnen. Auch können die Ausgangsstoffe aus humanen foetalen Zellen oder Gewebekulturen entnommen werden. Die Konjugation erfolgt mit Dinitrobenzolsulfonat (vgl. J. Brock: Präparation von konjugierten Antigenen, S.481, in H. Eriemel: Immunologische Arbeitsmethoden: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1984)). Nach Beendigung der Reaktion wird das DNP-Produkt durch Gelchromatographie an Sephadex gereinigt. Die Herstellung der entsprechenden Antikörper und die Anwendung der Präparationen erfolgt wie in Beispiel 1.

Beispiel 3

Die Gewinnung von tumorassoziierten Antigenen erfolgt aus Tumorgewebe, das vom lebenden Organismus gewonnen wird oder aus kulturgezüchteten Tumorzellen oder Tumorgeweben analog der Gewinnung von embryo-foetalen Antigenen nach den Methoden der Präparation von Gewebsextrakten, (H. Werner: Präparation von Gewebsextrakten, S. 490, in H. Eriemel: Immunologische Arbeitsmethoden: Gustav Fischer

Verlag, Stuttgart (1984)). Die Konjugation kann mit mikrobiellen oder viralen Antigenen, möglichst unter Ausschluß von Nukleinsäurebestandteilen durch enzymatischen Abbau derselben, mit den beschriebenen Konjugationsverfahren erfolgen. Es sind dazu insbesondere Endo- und Exotoxine, wie auch tierische Gifte geeignet (vgl. H. Schmidt: Fortschritte der Serologie: D. Steinkopf Verlag, Darmstadt (1955)). Die Kupplung erfolgt als Diazoniumverbindung, die Gewinnung von Antikörpern oder Antikörperseren sowie auch die Anwendung nach Beispiel 1.

Beispiel 4

Es wird ein Gemisch von embryo-foetalen Antigenen und Tumorantigenen gewonnen und weiterverarbeitet entsprechend den Beispielen 1-3.

Beispiel 5

Die Erzeugung bzw. Auslösung einer aktiven oder passiven topischen Anaphylaxie (Arthus-Reaktion) am Tumor erfolgt nach den allgemeinen immunologischen bzw. allergologischen Grundsätzen, desgleichen die Durchbrechung einer Immuntoleranz gegen Tumorantigene.

Verfahren zur Gewinnung von Toxinen, die nach Verbrennungen und bzw. oder Strahleneinwirkungen bzw. nach chemischen Noxen entstehen

DE Nr : 34 41 764 8
vom 15 11 1984

Zusammenfassung

Es werden Toxine, die im Gesamtorganismus nach Schädigungen durch ionisierende Strahlen, Verbrennungen und/oder chemische Noxen entstehen, *in vitro* durch entsprechende Schädigungen von möglichst für den Empfängerorganismus immunologisch histo- bzw molekular-kompatiblen Zellen und Gewebe, die insbesondere in Kulturen gezüchtet werden, wie auch von Blut oder Körperflüssigkeiten gewonnen und nach bekannten Methoden angereichert, isoliert bzw weiterverarbeitet

Patentansprüche

1 Verfahren zur Gewinnung von Toxinen, die nach Schädigungen durch ionisierende Strahlen, Verbrennungen und bzw oder chemische Noxen entstehen, dadurch gekennzeichnet, daß foetale bzw für den Empfängerorganismus möglichst immunologisch histo- bzw molekular-kompatible Zellen oder Gewebe, die insbesondere in Kulturen gezüchtet werden, wie auch Blut bzw Körperflüssigkeiten in vitro der entsprechenden Noxe ausgesetzt werden und gegebenenfalls Toxine, die mit den nativen Ausgangsmolekülen immunologisch über Kreuz reagieren durch Affinitätschromatographie an trägergebundenen Antikörpern abgetrennt werden

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß immunologisch für den Empfängerorganismus histo- bzw molekular-inkompatible Faktoren abgetrennt

werden

3 Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Proben mit unterschiedlicher Dosierung der Noxe behandelt und danach gepoolt werden

Beschreibung

[REDACTED]

Von der Dosis bzw der Intensität und zeitlichen Einwirkung einer Schädigung hängt Art und Menge der entstehenden Toxine ab Diese können in gesunden Organismen

zur prophylaktischen Immunisierung gegen eine etwaige später einwirkende entsprechende Schädigung verwendet werden (vgl. K. Theurer: Immunbiologische Prophylaxe und Therapie des akuten Strahlensyndroms: Atompraxis A 9 S. 327 - 330, 1958)

Es ist zweckmäßig, dazu ein möglichst weites Spektrum von Toxinen anzuwenden. Die Wirkung besteht in der Neutralisation und Inaktivierung von biologisch aktiven Toxinen, die nach der Einwirkung entsprechender Schädigungen entstehen, analog der Wirkung einer Toxin-Antitoxin-Bindung aufgrund einer aktiven Immunisierung wie zum Beispiel beim Diphtherie-Toxin (vgl.: H. Schmidt: Fortschritte der Serologie: E. Steinkopf Verlag, Darmstadt; Stewart Seil: Immunologie, Immunpathologie und Immunität: Verlag Chemie Weinheim, New York, 1977)

Als Toxine wirken denaturierte und heterozyklisch veränderte körpereigene Moleküle, insbesondere aus Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden und deren Kombinationen, sowie neue Kombinationen von molekularen Fragmenten, die durch die Noxen entstehen. Der Grad der Schädigung ist wohl für die Qualität als auch für die Quantität maßgeblich. Eine genaue Begrenzung ist deshalb nicht möglich. Sie kann von einer geringgradigen Noxe, die das Weiterleben der Zellen und Gewebe zuläßt, bis zum Zelltod reichen, der innerhalb einer gewissen Zeitspanne von einigen Tagen eintritt. Eine vollständige Zerstörung der Gewebe und molekularen Bestandteile ist jedoch nicht beabsichtigt. Bei überlebenden Zellen und Gewebekulturen kann das Kulturmedium zur Gewinnung der Toxine verwendet werden. Es können aber auch die Zellen und Gewebe homogenisiert und Homogenate

nach bekannten Trennungsv erfahren aufgearbeitet werden. Die Entnahme der Zellen und Gewebe und ihre Züchtung erfolgt nach bekannten Methoden (vgl. D. Mauersberger: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1971). Blutzellen können als Sediment, das in physiologischen Lösungen aufgenommen ist, als Vollblut oder als Hämolysat der Noxe ausgesetzt werden. Zellfreie Körperflüssigkeiten wie Blutserum-Plasma, Exsudate oder Transsudate, Liquor können direkt oder auch Bestandteile aus ihnen, der jeweiligen Noxe ausgesetzt werden. Bei Vorhandensein von Blutgruppen-Antigenen muß die jeweilige Blutgruppe dem späteren Empfänger entsprechen oder Blutgruppe 0 als Ausgangsmaterial verwendet werden. Auch Histokompatibilitäts-Antigene von Zellen und Geweben spielen deshalb eine entsprechende Rolle. Überkreuz-Immunisierungen durch Iso-Antigene müssen vermieden werden. Bei Vorhandensein von Iso-Antigenen würde der Empfänger gegen seine eigenen Körperbestandteile sensibilisiert werden. Dies könnte sich pathogen in Form einer Iso- bzw. Auto-sensibilisierung auswirken und den Impfschutz gegen die Toxine beeinträchtigen. Die im Empfängerorganismus bestehende Immuntoleranz gegen körpereigene Bestandteile darf nicht durchbrochen werden. Die Toxine werden hingegen als körperfremd empfunden und wirken immunogen. Die Beseitigung von Iso-Antigenen kann bei löslichem Ausgangsmaterial, wie auch nach der Einwirkung der Noxe durch immunologische Methoden der Affinitätschromatographie an Antikörpern erfolgen, die gegen die Iso-Antigene gerichtet sind. Bei einer entsprechenden Behandlung der Toxine lassen sich dadurch auch Überkreuz-Reaktionen mit nativen Körperbestandteilen

vermeiden. Bei Verwendung von Ausgangsstoffen vor der Einwirkung von Noxen, die immunologisch histo- bzw. molekularkompatibel sind, können die Rohprodukte ohne weitere Isolierung der Toxine als Impfvaccine verwendet werden. Diese lassen sich aber auch durch bekannte Methoden anreichern, isolieren und insbesondere nach den Verfahren der DPA 3437357 3 und DPA 3438777 3 weiterverarbeiten. Als Ausgangsprodukte eignen sich foetale Gewebe und Flüssigkeiten besonders allo-genen Ursprungs, weil in diesen noch weniger immunologisch inkompatible Faktoren enthalten sind als in adulten Geweben. Ideal wäre die Verwendung von autologen Geweben und Körperflüssigkeiten. In allogenen Geweben können jedoch während der Züchtung in Kulturen die inkompatiblen Faktoren verringert werden. Auch ist es möglich, beim Empfänger gegen die immunhisto- und molekularinkompatiblen Faktoren durch entsprechende Vorbehandlung vor der eigentlichen Vaccination mit den Toxinen eine Toleranz gegen inkompatible Faktoren des späteren Impfstoffes zu erzeugen (vgl. DPA 82100130 2). Es müssen dazu die Präparationen aus nicht geschädigten Geweben und Körperflüssigkeiten zur Verfügung stehen. Die Toleranz gegen die inkompatiblen Faktoren sollte als Low-Zone-Toleranz induziert werden. Ideal für die Gewinnung von Toxinen sind Gewebe und Körperflüssigkeiten autologen Ursprungs, auch aus isogenen Organismen. Diese sind weitgehend immunologisch kompatibel. Bei Verwendung von xenogenen Geweben und Körperflüssigkeiten müssen jedoch die immunologisch inkompatiblen Faktoren durch Absättigung an entsprechenden Antikörpern aus der Toxinpräparation beseitigt werden. Auch kann die Verträglichkeit durch eine Vorbehandlung

des Empfängers mit diesen Faktoren vor der eigentlichen Vaccination mit den Toxinen gewährleistet werden. Die Schädigung der Gewebe oder Körperflüssigkeiten durch ionisierende Strahlen kann mit verschiedenen Strahlenqualitäten, so zum Beispiel durch Alpha-, Beta- oder Gamma-, wie auch durch Neutronenstrahlen aus unterschiedlichen Strahlenquellen erfolgen. Auch ist eine Kombination verschiedener Strahlenarten möglich. Die Schädigung durch Hitze kann durch direkte Erwärmung wie auch durch Wärmestrahlung mit unterschiedlichen Wellenlängen erfolgen. Sie darf nicht zur Verkohlung der Gewebe führen. Die Schädigung durch chemische Einwirkungen erfolgt durch Zusatz der chemischen Substanzen zu den biologischen Geweben und Körperflüssigkeiten; insbesondere werden dazu die gängigen chemischen Kampfstoffe (Gelbkreuz, Grünkreuz, Blaukreuz) verwendet, dann aber auch Industriegifte, denen Arbeiter ausgesetzt sein können. Die verwendeten chemischen Substanzen können gegebenenfalls nach einer gewissen Einwirkungszeit vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden. Die Dosisfindung erfolgt durch Vorversuche zwischen einer LD 10 bis ED 100 in einer zeitlichen Begrenzung gegenüber Kontrollen. Der Nachweis der Wirksamkeit der Toxine, die nach Schädigungen in biologischen Geweben entstehen, erfolgt durch Bioassay in lebenden Individuen und bzw. oder in vitro an Zellkulturen.

Beispiel 1

Es sollen Toxine durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlen gewonnen werden, es wird dazu allogenes menschliches Blut der Blutgruppe 0 oder der Blutgruppe entsprechend

dem späteren Empfänger der Präparationen gegebenenfalls von verschiedenen Individuen gepoolt oder autologes Blut auf vier verschiedene Proben unterteilt. Diese werden mit letalen Strahlendosen von einer Kobaltquelle zum Beispiel 800 r, 1000 r, 1200 r und 1500 r kurzzeitbestrahlt, danach werden die Proben in verschiedenen Zeitabständen von 30 Minuten bis zu 5 Tagen homogenisiert bzw. hämolysiert. Es kann auch bis zur spontanen Hämolysierung abgewartet werden. Ein Zusatz von Konservierungsmitteln, zum Beispiel von Kresol, Phenol oder Quecksilbersalzen ist möglich. Danach werden die Proben zusammengemischt und daraus die entstehenden Toxine isoliert oder bei vorhandener immunologischer Kompatibilität mit dem Empfängerorganismus das Homogenisat unmittelbar zur prophylaktischen Vaccination verwendet. Entsprechend können auch andere Strahlenqualitäten, wie zum Beispiel Alpha-, Gamma-, Beta- oder Neutronen-Strahlen zur Erzeugung der Toxine verwendet werden.

Beispiel 2

Es sollen Toxine aus in Kultur gezüchteten menschlichen Fibroblasten gewonnen werden. Die in Zellrasen in Monolayer-Kulturen wachsenden Zellverbände werden entsprechend Beispiel 1 bestrahlt. Auch hier können die Proben unterteilt werden. Bis zum Absterben der Zellen wird das Nährmedium wiederholt durch neues ersetzt und auf Toxine aufgearbeitet. Es können auch die Zellrasen vor oder nach der Strahlenschädigung enzymatisch von der Unterlage abgelöst, mit physiologischer Lösung gewaschen oder auch ungewaschen homogenisiert werden. Aus dem Homogenisat oder auch aus dem

Nährmedium können affinitätschromatographisch durch an Träger gebundene Antikörper, die gegen histo- bzw. molekulare Kompatibilitätsantigene des Spenders gerichtet sind, die unerwünschten inkompatiblen Bestandteile entfernt werden.

Beispiel 3

Es werden Toxine nach Bestrahlung aus explantierten Überlebenskulturen von Organgeweben zum Beispiel aus Skelettmuskulatur, Leber, Drüsenorganen oder Gehirngeweben entsprechend den beiden Methoden des Beispiels 2 aus dem Nährmedium oder als Homogenisat gewonnen.

Beispiel 4

Es sollen Toxine nach Erhitzen von biologischen Geweben oder Flüssigkeiten gewonnen werden. Anstatt der Bestrahlung werden die Proben gegebenenfalls unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt, die über der tolerierten Temperaturgrenze von etwa 52°C liegen und andererseits nicht zu einer Verbrennung oder Verkohlungs- oder Strahlungswärme erfolgen. Der Grad der Schädigung wird an der Überlebensrate der Zellen bestimmt. Die Gewinnung der Toxine erfolgt in analoger Weise in Beispiel 1-3.

Beispiel 5

Es sollen Toxine nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen und Verbrennungen gewonnen werden. Man kann dabei die Proben wie in den Beispielen 1-4 getrennt schädigen und danach die Toxine poolen oder man kann die Schädigung der einzelnen Proben kombiniert durchführen.

Beispiel 6

Ks sollen Toxine aus Zellgeweben nach der Exposition mit chemischen Kampfstoffen (Gelb-, Grün-, Blau-Kreuz-Kampfstoffen) oder mit Zytostatika, wie sie in der Onkologie verwendet werden, bzw. mit Industriegiften gewonnen werden. Dabei muß für jede chemische Substanz die Letaldosis der in Kultur gezüchteten Gewebezellen ermittelt werden. Diese sollte zwischen einer LD 10 bis LD 100 innerhalb von 10 Tagen betra-

gen. Die Gewinnung der Toxine kann wie in Beispiel 4 sowohl aus dem Kulturmedium wie auch aus dem Zellhomogenat erfolgen. Eine Kombination von Toxinen, die nach Bestrahlung oder Verbrennung entstehen, ist möglich. Die zur Schädigung verwendeten chemischen Substanzen können nach bekannten Trennungsmethoden vor der Anwendung entfernt werden, ebenso inkompatible immunologisch überkreuz mit dem Empfängerorganismus reagierende Faktoren.

Herstellung von Impfstoffen und Diagnostika gegen Toxine, Onkogene und antideterminante Fragmente aus zytotoxischen, immunopathogenen oder allergischen Antikörpern

DK Nr : 34 38 777 3
vom 23 10 1984

Zusammenfassung

Es wird die Syntheseinformation in Form von DNA oder informativer RNA für die Induktion von Antikörpern und Immunzellen gewonnen und vervielfältigt, die sich gegen Toxine und Faktoren richtet, die in einem Organismus nach einer Schädigung durch ionisierende Strahlen, Verbrennungen, Verletzungen oder Intoxikationen ebenso auch gegen Onkogene aus Tumorzellen sowie gegen antideterminante Gruppen aus zytotoxischen bzw immunopathogenen oder allergischen Antikörpern entstehen

Patentanspruch

Herstellung von Impfstoffen zur Prophylaxe und Therapie sowie von Diagnostika nach einem Verfahren, bei dem man die genetische Syntheseinformation zur Bildung spezifischer Antikörper und Immunzellen in Form von DNA oder informativer RNA aus spezifischen sensibilisierten Immunzellen oder Hybridomzellen isoliert und in einem zellfreien Synthesystem enzymatisch vermehrt, dadurch gekennzeichnet, daß zur Sensibilisierung von Immun- und Hybridomzellen Toxine, Antigene oder Haptene aus Individuen verwendet werden, die nach Schädigung durch ionisierende Strahlen, Verbrennungen oder andere Noxen, wie Traumen oder Intoxikationen entstehen, ebenso onkogene DNA sowie assoziierte Antigene aus Tumorzellen, und antideterminante

Gruppen von zytotoxischen und immunopathogenen Antikörpern, die nach der Transplantation von inkompatiblen Organen, insbesondere auch Knochen und Haut oder in Kultur gezüchteten Zellen und Geweben wie auch nach immunopathogenen Sensibilisierungen gegen körpereigene Gewebe und Moleküle bei chronischen Organerkrankungen, insbesondere rheumatischen Erkrankungen, Diabetes oder bei Allergien entstehen, wobei die Immunogenität der zur Sensibilisierung verwendeten Agentien durch immunologische Adjuvantien, durch Konjugation mit Carrier-Stoffen oder chemische Modifikation verstärkt werden und die Impfstoffe in vivo oder in vitro auch zur Gewinnung von Antikörpergemischen bzw geklonten Antikörpern verwendet werden können

Beschreibung

Die Herstellung ausreichend großer Mengen von Toxinen, Antigenen oder Haptenen zur aktiven Immunisierung bzw von Immuntoleranz-vermittelnden Faktoren stößt auf verschiedenartige Schwierigkeiten Das bekannte Verfahren der aktiven Immunisierung ist zudem bei eingetretener Schädigung therapeutisch ungeeignet, weil der Impfschutz zu spät eintritt oder das Immunsystem durch die Noxe inkompetent geworden ist, bzw sich eine partielle Immuntoleranz gegen die Antigene entwickelt hat
Zur Herstellung von Impfstoffen zur Prophylaxe und Therapie wie auch von Diagno-

stika gegen Toxine, Onkogene und anti-determinante Fragmente aus zytotoxischen, immunopathogenen oder allergischen Antikörpern, wird erfindungsgemäß ein Verfahren verwendet, bei dem man die genetische Syntheseinformation zur Bildung der spezifischen Antikörper und Immunzellen, in Form von DNA oder informativer RNA aus spezifischen sensibilisierten Immunzellen oder Hybridomzellen *in vivo* oder *in vitro* isoliert und in einem zellfreien Synthesystem enzymatisch vermehrt (vgl. D. Jaehertz: *Z. Med. Mikrobiol. Immunol.* 152 (1966), 112, u. a.; Fishman, M.: *J. exp. Med.* 114 (1961) 857).

Dieses Verfahren wurde bisher zur Gewinnung von Impfstoffen, insbesondere gegen Viren und Mikroorganismen verwendet und wird nun auf nicht unmittelbar erreichbare Krankheitsfaktoren angewandt. Auch werden DNA-Gen-Abschnitte mit der Syntheseinformation für die Abwehrstoffe verwendet. Die Isolierung solcher DNA ist nach bekannten Gen-technischen Verfahren, insbesondere das "Blotting" von DNA bzw. auch von RNA mit dem Hilfsmittel von DNA-Proben und komplementären Fragmenten möglich (vgl. Southern, E. M. (1975), *J. Mol. Biol.* 98, 503 - 517; Alwine, J. C. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350 - 5354; Burnett, W. N. (1981) *Anal. Biochem.* 112, 195 - 203; Reinhart, M. P. & Malamud, D. (1982) *Fed. Proc.* 41, 873 (3550); Preferoen, M. et al. (1982) *Febs Lett.* 145, 369 - 372). Die Gewinnung von informativer RNA aus sensibilisierten Zellen ist in Veröffentlichungen von J. Jaehertz beschrieben. Vorliegendes Verfahren unterscheidet sich durch die Verwendung besonderer

Ausgangsstoffe und durch die Indikationen der gewonnenen Impfstoffe und Diagnostika.

Für die Gewinnung der jeweiligen DNA oder RNA aus Antikörper-bildenden Zellen müssen diese zunächst durch ein besonderes Immunogen sensibilisiert werden. Dazu ist es möglicherweise erforderlich, die Immunogenität der zur Sensibilisierung verwendeten Agentien durch immunologische Adjuvantien, durch Konjugation mit Carrier-Stoffen oder chemische Modifikation zu verstärken. Bei Verwendung von Nucleinsäuren können diese gegebenenfalls chemisch in ihrer immunogenen Potenz, z. B. durch Methylierung oder andere Methoden modifiziert werden. Die jeweils verabreichten Gen-Abschnitte der DNA können auch durch Isolierung der Puffs von Chromosomen isoliert werden. Aus geklonten Zellkulturen lassen sich diese Bestandteile poolen. Auch die RNA können einzeln oder als Mischungen zum Antigen umgewandelt für die Sensibilisierung von Antikörper-bildenden Zellen verwendet werden. Auch Antikörper oder die determinanten Bezirke von Anti-Idiotyp-Antikörpern wie sie nach P. 3437757.3 in einem Verfahren zur Herstellung von künstlichen biomimetischen Haptenen bzw. Antigenen, insbesondere von Toxinen sowie von Tumormarkern gewonnen werden, lassen sich einzeln, wie auch in Mischungen, als Antigen zur Sensibilisierung von Immunzellen verwenden, aus denen dann die gewünschte DNA bzw. informative RNA isoliert und durch bekannte Methoden in einem zellfreien Synthesystem enzymatisch vermehrt wird. Die Sensibilisierung der Immunzellen kann in einem ersten Schritt *in vivo* durch aktive Immunisierung des Individuums erfolgen und anschließender Weiterzüchtung der Zellen und Fusionierung zu Hybridomzellen.

sowie Klonierung dieser Zellen. Aus diesen Zellkulturen lassen sich Antikörper abschöpfen, die diagnostisch zum Nachweis des Antigens wie auch zur passiven Immunisierung verwendet werden können. Auch lassen sich die DNA-Abschnitte und iRNA zur Sensibilisierung von in vitro-Systemen benutzen, aus denen dann die entsprechenden Antikörper gewonnen werden. Zur Verbesserung der Endozytose der gewonnenen DNA-Abschnitte bzw. iRNA können diese in Liposomen, insbesondere nach DP 2650502 sowie EPA 84111391 3 appliziert werden.

Die Gewinnung von Toxinen, die in Individuen nach Schädigung durch ionisierende Strahlen oder nach Verbrennungen entstehen, erfolgt nach bekannten Methoden (vgl. K. Theurer: Atompraxis H. 9 S. 327 - 330, 1958). In gleicher Weise lassen sich Syntheseinformationen für Antikörper und Immunzellen gegen Faktoren gewinnen, die nach Traumen oder Intoxikationen entstehen. Die Syntheseinformation zur Antikörperbildung und Sensibilisierung von Immunzellen gegen onkogene DNA sowie tumor-assoziierte und karzino-embryonale Antigene werden aus den entsprechenden Zellen gewonnen. Die Gewinnung von zytotoxischen und immunopathogenen Antikörpern und deren antideterminante Gruppen werden nach der Transplantation von inkompatiblen Organen, insbesondere auch von Knochen und Haut oder in Kultur gezüchteten Zellen und Geweben gewonnen und zur Sensibilisierung von Immunzellen verwendet, aus denen dann die Syntheseinformation isoliert und vermehrt wird. In gleicher Weise können auch immunopathogene Antikörper, wie sie bei verschiedenen chronischen Er-

krankungen entstehen, insbesondere bei den rheumatischen Erkrankungen, dann aber auch allergische Antikörper verwendet werden. Hier beruht der therapeutische Effekt auf der Induktion von Anti-Antikörpern im Patienten durch Übertragung der Syntheseinformation für den Gegen-Antikörper. Dieses Verfahren ermöglicht auch eine bestehende Toleranz bezüglich eines Antigens, insbesondere bei Tumoren zu durchbrechen, und andererseits in einem sensibilisierten Organismus Immuntoleranz zu erzeugen. Der Vorteil der nach vorliegendem Verfahren hergestellten Präparate liegt in der raschen Wirksamkeit, der hohen Reinheit und der geringen Dosierung, durch die Nebenwirkungen vermieden werden.

Beispiel 1

[REDACTED]

[REDACTED] Zur Verstärkung ihrer Immunogenität können sie an Carrier konjugiert, chemisch modifiziert und bzw. oder mit einem immunologischen

können dann nach den bekannten biochemischen Verfahren der Chromatographie, Gelfiltration, an Ionenaustauschern oder durch Elektrophorese fraktioniert werden. Auch sind Mischungen aus Präparaten aus den Plazentaanteilen und bzw. oder Stroma aus verschiedenen Tumorarten möglich. Die durch Gewebezüchtung gewonnenen isolierten Tumorzellen können auf Tumorigene aufgearbeitet werden.

Beispiel 1

Züchtung von Rinderdezidua in der Gewebekultur nach präparativer Isolierung vom embryonalen bzw. foetalen Anteil durch mechanische Trennung der beiden Plazentaanteile.

Beispiel 2

Züchtung von menschlicher Dezidua nach präparativer Isolierung von Chorion- bzw. Trophoblastengewebe unter dem Operationsmikroskop ggfs. nach geeigneter vitaler Färbung zur Differenzierung des mütterlichen und foetalen Gewebes. Anlegen und Plattenkulturen. Beim Umsetzen Selektionierung der Deziduazellen und Weiterzüchtung der reinlinigen Zellrasse in großen Mengen im Belco-Modular-Roller-System für Zellproduktion oder als trypsinierte Suspensionskultur im Durchströmungssystem, ggfs. in Konfrontation mit den entsprechend isolierten Geweben aus Chorion-Zellen.

Beispiel

Isolierte Züchtung von Stroma aus menschlichem Basaliom der Haut. Nach chirurgischer Entfernung wird das Tumorgewebe in 0,5 mm breite Tranchen geschnitten und diese unter dem Operationsmikroskop oder einer Lupe auf Stroma und Tumorgewebe präpariert. Beide werden entsprechend dem Beispiel 2, ggfs. in Konfrontation zueinander, gezüchtet, wobei die Nährlösung von der Tumorkultur auf die Kultur des Stromagewebes übergeht.

Beispiel 4

Züchtung von Stroma aus einem szirrhösen Magen-Karzinom. Hier wird zunächst vom Gesamttumor eine Mischkultur angelegt. Diese wird mit ionisierenden Strahlen und bzw. oder geeigneten zytotoxischen Substanzen, oder mit spezifisch gegen die Tumorzellen gerichteten Antikörperseren zusammen mit Komplement behandelt. Nach Vernichtung der Tumorzellen wird das Stroma isoliert weitergezüchtet und Zellklone von etwa noch vorhandenen Tumorzellen entweder präparativ oder durch entsprechende Maßnahmen beseitigt bzw. vernichtet. Bei Vorliegen reiner Zelllinien aus dem Stroma kann dann mit der Massenzüchtung desselben begonnen werden.

Gewinnung von Wirkstoffen zur Erneuerung und Steigerung des Haarwuchses

DE Nr. : 23 14 019
vom 21.3.1973

Patentansprüche

1. Gewinnung von Wirkstoffen zur Erneuerung und Steigerung des Haarwuchses, gekennzeichnet durch die Verwendung von regenerierenden Haarwurzeln nach Epilation mit ionisierenden Strahlen und bzw. oder chemisch medikamentöser Einwirkung von Epilationsmitteln, gegebenenfalls zur Zeit der Entstehung des Winterpelzes von Tieren.

2. Nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Kombination dieser Extrakte mit Hormonen, Vitaminen, Spurenelementen und bzw. oder Organextrakten aus Plazenta, Ovar, Nebennierenrinde, Thymus und foetalen Blutgefäßen einzeln oder in Mischungen.

Beschreibung

Bei den verschiedensten Organerkrankungen werden Organextrakte therapeutisch verwendet. Bei Erkrankungen des Haarwachstums und der Alopezie wurden Extrakte aus Haut mit Haarwurzeln mit unterschiedlichem Erfolg angewandt. Es ist bekannt, daß beim menschlichen Haarwachstum Zyklen zwischen einer mehrjährigen Wachstumsphase (Anagenphase), einer kurzen Umwandlungsperiode und einer etwa dreimonatigen Ruhepause (Telogenphase) bestehen. Am Ende dieser Ruhepause wird das Haar abgestoßen und durch neues ersetzt, das dann den gleichen Zyklus durchläuft. Die Zyklen der einzelnen Haare sind nicht synchronisiert, so daß alle Stadien des Haarwachstums nebeneinander zu finden sind. Nur in der Wachstumsphase

sind aber Wachstums- und Erneuerungsstoffe vorhanden. In der Umwandlungsperiode ist es hingegen möglich, daß Hemmstoffe auftreten, die in einem Organextrakt aus Haarfollikeln die gewünschte anregende Wirkung auf den Haarwuchs beeinträchtigen. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungen der bisherigen Extrakte aus Haarfollikeln sein.

Vorliegende Erfindung ermöglicht nun die Synchronisation des Haarwachstum und die Anreicherung von Wuchsstoffen bzw. die Beseitigung von Hemmstoffen in Extrakten aus Haarfollikeln. Die Synchronisation des Haarwuchses bei den verschiedenen Organ Spendern, vorwiegend Tieren mit langen Haaren z.B. Affen, Hunden, Katzen, Kaninchen, wird erreicht durch Enthaarung (Epilation) z.B. mit ionisierenden Strahlen oder chemisch medikamentös z.B. durch die Anwendung von Thallium, Zytostaticis oder auch durch Hormone wie z.B. orale Kontrazeptiva und Östrogene. Die abgestoßenen Haare sollen dabei nach einer gewissen Zeitspanne nachwachsen. In der Medizin sind die Methoden und die Dosierungen für eine solche temporäre Epilation bekannt. Beim Wiedereinsetzen des allgemeinen Haarwachstums werden dann die Organspender geopfert und die Haarfollikel in üblicher Weise zu Organhomogenaten oder -extrakten verarbeitet.

Die Epilation läßt sich zeitlich bei verschiedenen Tierarten so durchführen, daß das Wiedereinsetzen des Haarwachstums mit der natürlichen Steigerung des Haarwachstums bei der Bildung des Winterpelzes zusammenfällt. Dadurch werden die Voraussetzungen für Präparate mit besonders wachstumsför-

dernden Eigenschaften geschaffen. Auch ist es möglich, Präparate während der Zeit der Bildung des Winterpelzes zu gewinnen. Auch können verschiedene Epilationsmethoden z.B. durch Bestrahlung und gleichzeitige chemisch-medikamentöse Behandlung kombiniert werden.

Die kosmetische bzw. therapeutische Anwendung solcher Extrakte kann dann kombiniert mit Hormonen z.B. Östrogenen und Nebennierenrindenhormonen wie auch mit Vitaminen und Spurenelementen sowie geeigneten anderen Medikamenten, z.B. Thallium in homöopathischer Dosierung, erfolgen. Auch Organextrakte z.B. aus Plazenta, Ovar, Nebenniere, Thymus und foetalen Blutgefäßen, können einzeln oder in Kombination mitverwendet werden.

Beispiel 1

Gewinnung von Extrakten aus regenerierenden Haarfollikeln beim Kaninchen. Diese werden nach bekannten Methoden durch gefilterte, weiche Röntgenstrahlen in einer oder wiederholten Sitzungen auf mehreren Feldern breitflächig epiliert. Nach Ausfallen der Haare und Wiederauftreten des Haarwachstums werden die Tiere getötet und die Hautschicht mit den regenerierenden Haarfollikeln nach bekannten Methoden präpariert und verarbeitet.

Beispiel

10

Epilation von Hunden durch dosierte Thalliumvergiftung. Bei Wiedereinsetzen des Haarwachstums Weiterverarbeitung der regenerierenden Haarfollikeln wie in Beispiel 1.

Beispiel 3

Epilation von Affen (Pavianen) durch Zytostatica bzw. Antimetabolite z.B. durch Vincristinsulfat. Weiteres Vorgehen wie in Beispiel 1.

Beispiel 4

Epilation von Katzen durch plötzliches Absetzen einer Behandlung mit Östrogenen, wobei die verschiedenen Stadien der Wachstumsphase der Haare gleichzeitig in die Ruhepause übergeführt und nach einiger Zeit wie beim natürlichen Haarwuchs abgestoßen werden. Dabei wird das Haarkleid diffus gelichtet. Diese Epilationsmethode kann terminmäßig mit dem natürlichen Haarwechsel der Tiere korreliert werden. Weitere Verarbeitung erfolgt nach Beispiel 1.

Beispiel 5

Gewinnung von Extrakten aus regenerierenden Haarfollikeln in der Zeit der Entstehung des Winterfells, gegebenenfalls unter zeitlich korrelierter Anwendung der Epilationsmethoden der Beispiele 1-4, wobei auch verschiedene Epilationsmethoden kombiniert werden können.

Verwendung chemisch aufgeschlossener Organe in Futtermitteln

zusammen mit Buschmann, Hans, Prof Dr med vet , 8000 München

DE Nr : 22 49 697 5-41

vom 11 10 1972

Patentanspruch

Verwendung der Stoffe, die bei einem Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von Organen für therapeutische Zwecke unter Verwendung von Dämpfen chemischer Reagenzien erhalten worden sind, bei welchem man die pulverförmigen Substrate mit dem den Aufschluß bewirkenden Reagenz, dessen Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, vorzugsweise konz Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin, in einem geschlossenen System zusammen, aber getrennt voneinander einem solchen Vakuum aussetzt, welches die Überführung des aufschließenden Mittels in die dampfförmige Phase ermöglicht, und, nachdem der gewünschte Aufschluß des Substrates erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagenz wieder entfernt, wobei man vorzugsweise von tiefgekühlten pulverisierten organischen Geweben ausgeht, und man das dampfförmige chemische Reagenz aus einer vorbestimmten Menge durch Absenken des Vakuums zunächst auf dem Substrat niederschlägt und nach der gewünschten Einwirkung das überschüssige Reagenz durch Erhöhung des Vakuums wieder entfernt, als Bestandteil sonst üblicher Futtermittel, insbesondere Schweinemast- und Hühnermastfutter, in einer Endverdünnung im Mikro- bis Picogrammbereich pro Gramm Futtermittel, gegebenenfalls unter weiterem Zusatz oberflächenaktiver Substanzen im Mikrogrammbereich pro

Gramm Futtermittel

In der Aufzucht von Schweinen und Hühnern wurden zur Anregung des Wachstums und der Gewichtszunahme Antibiotika und Hormone verwendet. Diese gehen beim Genuß des Fleisches der so vorbehandelten Tiere auf den Menschen über und führen dort zu verschiedenartigen gesundheitsschädigenden Wirkungen.

Im Doppelblindversuch wurde nun in Fütterungsversuchen festgestellt, daß die bei der Aufzucht dieser Tiere erwünschten Wirkungen auch durch die Verwendung von bestimmten Präparaten aus hochmolekularen Organextrakten zu erzielen sind, wie sie in der Humanmedizin seit vielen Jahren Verwendung finden. Diese Präparate besitzen keine nachteiligen Nebenwirkungen auf den Menschen, auch wenn sie vorher über den Organismus der als Nahrungsmittel dienenden Tiere verstoffwechselt wurden. Die Anwendung dieser Präparate kann über die verwendeten Futtermittel oder über die Wasseraufnahme erfolgen. Es wurde festgestellt, daß selbst Tiere, die mit Anabolika- und Antibiotika-Zusätzen gefüttert wurden, eine weitere Wirkungssteigerung bei zusätzlicher Anwendung solcher hochmolekularer Organextrakte zeigten. In der Schweinezucht waren z B tägliche Gewichtszunahmen von durchschnittlich 708 g gegenüber 554 bis 671 g ohne Organextrakte festzustellen. Die mit den Organextrakt-Zusätzen gefütterten Tiergruppen blieben überdies gesund und zeigten keine nachteiligen Verhaltensweisen. Demgegen-

über kam es bei den Kontrollgruppen zu Ausfällen durch Grippe, Husten, Fellbeissen und bei Hühnern durch Federpicken. Auch traten keine Herz- und Kreislauf-todesfälle mehr auf, für die Schweine besonders empfindlich sind.

Die Erfindung ist im Patentanspruch definiert. Für die menschliche Ernährung bedeuten Zusätze von hochmolekularen Organextrakten zum Tierfutter keinerlei Gefährdung.

Der Zusatz zum Tierfutter kann unmittelbar vor der Fütterung in Form von wäßrigen Dilutionen erfolgen. Von diesen Dilutionen werden dann jeweils einige ml auf das Trockenpulver des Tierfutters mit einer Spritze zerstäubt, bevor dieses mit zusätzlichem Wasser versetzt wird. Technisch einfacher ist die Verwendung fertigen Tierfutters mit Zusätzen der hochmolekularen Organextrakte als Trockenpulver. Die Verdünnungen der Organtrockenpulver werden dabei durch Mischung dieser Pulver im Futtermittel oder in einem geeigneten Verdünnungsmittel wie z. B. Weizenkleie, Haferschrot oder dgl. vorgenommen. Dabei wird z. B. der Organtrockenextrakt mit dem Futtermittel gut vermischt, dann in einer zweiten Ver-

dünnungsstufe mit einer weiteren Menge des Futtermittels. Unmittelbar vor der Fütterung kann die endgültige Verdünnung hergestellt werden. Es kann aber auch der endgültige Verdünnungsgrad gleich eingestellt werden.

Es hat sich bewährt, gleichzeitig einen oberflächenaktiven Stoff beizumischen, z. B. Natriumlaurylsulfat in einer Endkonzentration von 10 µg. Dadurch wird die Resorption im Magen-Darm-Kanal erleichtert. Dasselbe gilt auch für die Verwendung von wäßrigen Dilutionen.

Beispiel

Das Beispiel zeigt die Ergebnisse von Tierversuchen, die mit 3 Gruppen zu je 151 Küei durchgeführt worden sind. Die 3 Gruppen wurden mit dem gleichen Grundfutter gefüttert, wobei Gruppe I keine Zusätze er-

hielt, Gruppe II zusätzlich mit 10^{-9} g des erfindungsgemäß zu verwendenden hochmolekularen Organextraktes pro g Futtermittel und Gruppe III zusätzlich mit 20 mg Virginiamycin pro kg Grundfutter versetzt war. Unter Futtermittelverwertung ist dabei der Futtermittelverbrauch pro kg Gewichtszuwachs zu verstehen.

Gruppe	Stückzahl	Verluste	Durchschnittliche	Gesamtzunahme	Futtermittelverwertung
			insgesamt	pro Tag	
I					
Ohne Zusätze	151	4	209,205	4,649	2,012
II					
Mit hochmolekularem Organextrakt 10^{-9} g pro g Futter	151	3	219,395	4,875	2,000
III					
Mit 20 mg Virginiamycin pro kg Futter	151	4	210,135	4,687	2,006

Die Verwertung der Erfindung kann durch gesetzliche Bestimmungen, insbesondere durch

Verfahren zur Herstellung sowie zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung von Zellextrakten aus Samenzellen und Eizellen

DE Nr : 20 32 988 8
vom 03 06 1970

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung sowie diagnostischen und therapeutischen Anwendung von Zellextrakten aus Samenzellen und Eizellen mit haploidem Chromosomensatz, gekennzeichnet durch die Verwendung von korpuskulären und hochmolekularen Fraktionen (Nukleinsäuren, Proteinen, Proteiden, Lipiden und Polysacchariden) sowie deren Abbauprodukten, die nach bekannten Verfahren der Gewebeextraktion und der Antigenisolierung gewonnen werden

2 Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Konjugation oder kombinierte Anwendung mit andersartigen Gewebeextrakten, zytotropen Schlepperstoffen, nativen und künstlichen Hormonen und bzw oder Spurenelementen

3 Verfahren nach Anspruch 1, zur Isolierung von Spermien mit Y- bzw mit X-Chromosomen, gekennzeichnet durch die Herstellung eines Antikörperserums mit Immunglobulinen gegen Zellkerne aus Ovarien oder Eizellen mit dem X-Chromosom als Antigen nach bekannten immunologischen Verfahren Agglutination von Spermien mit diesem Serum und Trennung des agglutinierten vom nicht agglutinierten Sperma

4 Verfahren nach Anspruch 3, zur Herstellung eines Immuserums gegen Zellkerne mit Y-Chromosomen, gekennzeichnet durch die Verwendung der isolierten Zellkerne aus Spermien mit Y-Chromosomen zur aktiven Immunisierung eines Antikör-

perbildners

5 Verfahren nach Anspruch 3 und 4, gekennzeichnet durch die Verwendung von Antikörperseren mit Immunglobulinen gegen X- bzw Y-Chromosome zur Isolierung der gegensätzlichen Spermien

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren dient zur Herstellung sowie diagnostischen und therapeutischen Anwendung besonderer Zellextrakte aus Samenzellen und Eizellen Es ist gekennzeichnet durch die Verwendung korpuskularer Zellbestandteile (-Organellen) und von hochmolekularen Fraktionen solcher Zellen bzw den aus ihnen gewonnenen Abbauprodukten Die Herstellung solcher Präparate geschieht nach bekannten Verfahren der Organaufarbeitung und -extraktgewinnung Das Verfahren bezieht sich demnach auf die Verwendung besonderer Ausgangsstoffe Unter korpuskulären Zellbestandteilen bzw -Organellen sind insbesondere zu verstehen, der Zellkern und seine Bestandteile, ebenso zytoplasmatische Zellbestandteile in Art der Mitochondrien, Ribosomen, Golgiapparat und ihre Membranen Diese korpuskulären Zellbestandteile bestehen aus Konglomeraten von Molekülen; jedoch sind unter den hochmolekularen Fraktionen auch freie lösliche Moleküle zu verstehen, insbesondere die verschiedenartigen Ribonukleinsäuren, dann aber auch DNS, Proteine, Proteide, Fermentie, Lipide und Polysaccharide Abbauprodukte können als Metabolite in den Zellextrakten enthalten sein oder aus den genannten hoch-

molekularen Stoffen nach bekannten chemischen oder fermentchemischen Verfahren gewonnen werden

Als Ausgangsgewebe können sowohl Spermien von Säugetieren, als auch von Fischen Verwendung finden und als Eizellen in besonderem Maße Rogen von Fischen, z B von Forellen und Karpfen Zur Beseitigung von Begleitstoffen werden die bekannten Methoden einschließlich der Trypsinbehandlung eingesetzt Die Aufschließung der Zellen erfolgt nach dem bekannten Homogenisierungs- und Mahlverfahren, ggfs auch in tiefgefrorenem Zustand Die Trennung der Zellorganellen geschieht durch Zentrifugation ggfs unter Verwendung eines Gradienten, z B aus Fruktose Danach erfolgt ggfs die weitere chemische Aufschließung nach den bekannten Methoden der Herstellung für Organ- und Zellantigene, bzw -extrakte Die Auftrennung von Molekülen kann durch Gelfiltration, chromatographisch und elektrophoretisch erfolgen (vgl C Steffen: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie: Georg-Thieme Verlag, Stuttgart; H M Rauen: Biologisches Taschenbuch, Springer-Verlag sowie einschlägige Einzelveröffentlichungen in Fachzeitschriften)

Es hat sich gezeigt, daß die beanspruchten Wirkstoffe aus Zellen mit haploidem Chromosomensatz als Mischung wie auch zum Teil isoliert, den Stoffwechsel von normalen Gewebezellen unspezifisch in besonderem Maße aktivieren und Synthese und Proliferationsvorgänge auslösen Diese Wirkung ist nicht organspezifisch und übertrifft die Wirkung von Gewebeextrakten aus anderen Organarten Die therapeutische Anwendung kann nach allen üblichen Anwendungsarten der Organo-Therapie erfolgen Eine Kombination oder chemische bzw adhäsive Konjugation mit andersartigen Organ-

extrakten oder zytotropen Zellfraktionen ist ebenso möglich wie die Kombination bzw Konjugation mit den verschiedensten natürlichen und synthetischen Hormonen, insbesondere aus Schilddrüse, Nebenniere, den Keimdrüsen und deren Derivaten, dann auch mit Spurenelementen, von z B mit Salzen von Zink, Mangan, Magnesium, Eisen, Kalzium

Eine besondere Art der weiteren Verwendung, insbesondere der Antigenbestandteile des X- bzw Y-Chromosoms aus haploiden Zellen, liegt in der aktiven Immunisierung von antikörperbildenden Individuen Auch diese erfolgt nach den bekannten immunologischen Methoden, ggfs unter Mitverwendung von Adjuvantien z B dem Freund'schen Adjuvans oder einer kolloidalen Komplexverbindung aus Aluminium-Hydroxid und Kieselsäure Die Gewinnung von Antikörperseren mit Immunglobulinen gegen das Y-Chromosom muß über die Herstellung eines Antikörperserums gegen das X-Chromosom erfolgen Man kann dabei von Säugetierzellen mit zwei X-Chromosomen z B aus Ovar, ausgehen und die Zellkerne bzw während der Mitose auch X-Chromosome isolieren und als Antigen verwenden oder aber Antigene aus den haploiden Zellkernen von Fischrogen verwenden Dieser muß von Begleitstoffen befreit werden, bevor die Zellkerne isoliert werden, die dann als Antigen wiederholt parenteral einem antikörperbildenden Individuum eingespritzt werden Das davon erhaltene Antikörperserum mit Immunglobulinen gegen X-Chromosome wird nun bei optimalen Bedingungen Samenzellen von Säugern oder auch Vögeln bzw Fischen zugesetzt, wobei die Samenzellen ebenfalls von Begleitstoffen der Sexualdrüsen vorher befreit werden müssen Nach eingetretener Agglutination der Samenzellen mit X-Chromosom werden die nicht agglutinierten Zellen mit Y-Chromosom isoliert und er-

neut dieser Isolierungsprozedur unterworfen. Die daraus gewonnenen Zellkerne werden nun in analoger Weise der aktiven Immunisierung und Herstellung eines Antiserums mit Immunglobulinen gegen Y-Chromosom verwendet. Mit diesem Serum kann man dann in entsprechender Weise ein Antikörperserum gegen artgleiche homologe X-Chromosom gewinnen.

Die Trennung der mit Immunglobulin beladenen Zellen kann durch Zell-Elektrophorese, wie auch durch Schwerkrafttrennung ggf. unter Mitverwendung eines Gradienten erfolgen.

Die Antikörperseren gegen Zellkernfraktionen mit X-Chromosom bzw. Y-Chromosom können zur Geschlechtsbestimmung benutzt werden. Dabei kann das Spermium vor der Insemination bei erwünschter Knabengeburt mit dem Immunglobulin gegen das X-Chromosom und erwünschter Mädchengeburt mit dem Antikörperserum gegen Y-Chromosom behandelt werden. Bekanntlich hängt das genetische Geschlecht vom Besitz des Y-Chromosoms ab. Ein Chromosom stammt jeweils von der Mutter, das andere vom Vater. Die Mutter hat nur X-Chromosom, der Vater X- sowie Y-Chromosom. Zwei X-Chromosome bedeuten deshalb weiblich, X- und Y-Chromosom männlich. Die Ausschaltung des Y-Chromosoms im Spermium führt also zu weiblichen Individuen, während die Ausschaltung des X-Chromosoms zu männlichen führen muß. Vor der Behandlung des Spermiums muß dieses von den Begleitsekreten der Geschlechtsdrüsen befreit werden. Diese Sekrete müssen dann nachträglich aber wieder zugesetzt werden. Auch die Mutter kann mit Antikörperserum, insbesondere gegen Y-Chromosom behandelt werden. Dosisabhängig wird hier mit Verdünnungen des Serums gegen Y-Chromosom die Aufnahme von Y-chromosomhaltigen Sper-

mien erleichtert und bei höheren Konzentrationen dieses Serums die Konzeption mit dem Y-chromosomenhaltigen Spermium verhindert. Die Antikörperseren gegen das X- bzw. Y-Chromosom können diagnostisch für die Bestimmung des Kerngeschlechts ggf. unter Mitverwendung von Immunfluoreszenz- und Tracermethoden angewandt werden. Präparate aus korpuskulären Bestandteilen oder hochmolekularen Extrakten aus haploiden Zellen finden besonders Anwendung bei Organerkrankungen zur Förderung von Regeneration und Zellproliferation, zur Förderung des Haarwuchses und der Behandlung von Fertilität und Sterilität.

Bislang wurden keine korpuskulären oder hochmolekularen Zellbestandteile aus Zellen mit haploidem Chromosomensatz prophylaktisch, therapeutisch oder diagnostisch verwendet. Es wurde lediglich versucht, aus den Sexualsekreten hormonähnliche Stoffe zu extrahieren. Diese haben jedoch keine Beziehung zu dem vorliegenden Verfahren.

Beispiel 1

Herstellung eines Antikörperserums mit Immunglobulinen gegen Y-Chromosom des Rindes

Nicht denaturierter Roggen von Forellen wird in gepufferter Tyrode-Salzlösung bei pH 7,4 durch vorsichtiges Zentrifugieren wiederholt gewaschen. Danach werden die Eizellen mit einer isotonen Trypsinlösung angedaut und anschließend von der Lösung freigespült, mit flüssigem Stickstoff tiefgekühlt, in diesem Zustand gemahlen, wieder aufgetaut und die Zellkerne durch vorsichtiges Zentrifugieren in einem Saccharosegradienten gewonnen. Die Homogenisierung kann aber auch im frischen Zustand erfolgen. Die gewonnenen Zellkerne werden nun gefriergetrocknet und können durch Bedampfung mit Säuredämp-

fen im Vakuum chemisch nach DBP Nr 1090 821 aufgeschlossen werden. Es werden nun Kaninchen im Abstand von 8 Tagen, 3 x abwechselnd s c , i m und i p aktiv immunisiert mit einer Suspension von 10⁸ Partikel pro ml Lösungsmittel. 8 Tage nach der letzten Boosterung wird das Tier entblutet und der Agglutinationstiter des Serums gegenüber dem Antigen getestet.

Es wird nun frisches Stiersperma von Begleitsekreten aus Prostata und den Sexualdrüsen befreit und mit dem Antikörperserum inkubiert. Nach eingetretener Agglutination werden die nicht agglutinierten Spermazellen isoliert durch Gradientenzentrifugation oder Zellelektrophorese. Diese Prozedur wird 1 - 2mal wiederholt, um die mit Immunglobulin beladenen Spermien mit X-Chromosomen zu beseitigen. Die isolierten Spermien mit Y-Chromosomen werden nun in ähnlicher Weise wie die Eizellen aufgearbeitet und die daraus gewonnenen Zellkerne zur aktiven Immunisierung eines Kaninchens oder Hammels verwendet. Auf diese Weise werden Immunglobuline gegen die Y-Chromosome gewonnen.

Vor der künstlichen Besamung werden die Samenzellen zunächst aus der Spermaflüssigkeit isoliert und wiederholt gewaschen.

Danach wird das Anti-Y-Serum zugesetzt und die nicht agglutinierenden Zellen isoliert und wieder mit der Samenflüssigkeit aufgenommen. Diese Samenzellen enthalten das X-Chromosom und werden nun zur Besamung verwendet, um ein weibliches Tier als Nachkommen zu erhalten.

Beispiel 2

Gewinnung von aufgeschlossenen Total-extrakten aus Rindersperma mit Y-Chromosomen.

Hier agglutiniert man die gewaschenen Samenzellen des Rindes mit dem Antikörperserum, das nach Beispiel 1 gegen Y-Chromosome gewonnen wurde. Nach erfolgter Agglutination isoliert man nun die nicht agglutinierten Samenzellen. Diese enthalten das X-Chromosom. Damit kann ggf. ein Antiserum gegen die gleiche Spezies gewonnen werden.

Beispiele für die Herstellung der korpuskularen Zellbestandteile mit hochmolekularen Extrakten, bzw. daraus gewonnenen Abbauprodukten, dürften sich erübrigen, weil die Herstellungsmethoden denen entsprechen, wie sie für die Herstellung von Gewebeextrakten und -antigenen aus anderen Organen verwendet werden.

Verfahren zur Beeinflussung der quantitativen Antikörperbildung bei der aktiven Immunisierung und der Desensibilisierung

DE Nr. : 19 45 251. 8

vom 06.09.1969

Patentansprüche

1. Verfahren zur Beeinflussung der quantitativen Antikörperbildung bei der aktiven **Immunisierung** und der Desensibilisierung sowie zur Durchbrechung und andererseits zur Erzeugung von spezifischer Immuntoleranz, dadurch gekennzeichnet, daß embryonale und bzw. oder foetale, hochmolekulare Zellextrakte aus verschiedenen Organarten und bzw. oder Extrakte aus infolge Krankheit oder nach vorheriger Sensibilisierung hyperergisch reagierenden juvenilen oder adulten lymphatischen Geweben als Adjuvans mit dem jeweiligen Antigen konjugiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Antigene aus Mikroorganismen und Viren sowie Auto- und Mischvaccine sowie Auto- und Eremdnosen hergestellt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Allergene verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Tumorantigene mit Extrakten aus lymphatischen Organen und Lymphozyten, die aus Operationspräparaten oder aus Blut oder Lymphe von an Sarkoidose (Morbus Boeck) oder an anderen hyperergischen Krankheiten leidenden Patienten gewonnen wurden, inkubiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Tumorantigene zur aktiven Immunisierung von Freiwilligen verwendet werden, von denen man danach

aus den Lymphozyten, aus exzidierten Lymphknoten und evtl. Thymus oder der Milz ein Adjuvans für Tumorantigene gewinnt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß homologe und bzw. oder heterologe Immunglobuline, z.B. Rh-Antikörper als Antigene verwendet werden.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Extrakte aus den isolierten materalen oder den foetalen Anteilen der Plazenta als Adjuvans verwendet werden.

8. Verfahren nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß als Adjuvans zusätzlich eine kolloidale Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure mit Phenolzusatz verwendet wird.

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren ermöglicht es, die Antikörpersynthese nach der aktiven Immunisierung quantitativ zu beeinflussen und insbesondere die Bildung zirkulierender und zellulärer Antikörper zu aktivieren, sowie bei etwa bestehender Immuntoleranz diese zu durchbrechen. Andererseits kann dieses Verfahren immunologische Toleranz spezifisch für ein bestimmtes Antigen erzeugen oder bei bestehender Sensibilisierung eine Desensibilisierung bewirken, deren Effekt besser ist als bei den bisherigen Methoden der Desensibilisierung. Das Verfahren beruht auf der Verwendung besonderer Adjuvantien für die jeweiligen Antigenpräpa-

rate, die zur aktiven Immunisierung oder Desensibilisierung verwendet werden Als Adjuvantien werden embryonale und bzw oder foetale hochmolekulare Zellextrakte aus verschiedenen Organarten verwendet, ebenso auch Extrakte aus juvenilen oder adulten lymphatischen Geweben, so z B aus Milz, Thymus, Lymphknoten und Lymphozyten, die infolge von Krankheit oder nach Sensibilisierung des Spenders mit einem Antigen bzw Antigengemisch, hyperergisch reagieren Zur Aktivierung der Antikörperbildung müssen dabei höhere Konzentrationen des Antigens und dieser Adjuvantien verwendet werden, d h bis zu einer Verdünnung von

—6

10 g Trockensubstanz (vom Antigen und dem Adjuvans), während zur Desensibilisierung darüberliegende Verdünnungen bis

-18

über 10 g Trockensubstanz pro ml Lösungsmittel verwendet werden

Es hat sich gezeigt, daß in embryonalen und foetalen hochmolekularen Zellextrakten, die nach besonders schonenden Verfahren möglichst ohne Denaturierung gewonnen werden, Faktoren enthalten sind, die, wenn sie dem Antigen oder Antigengemisch zugesetzt werden, die Antikörperproduktion bei der aktiven Immunisierung weit höher steigern, als dies bisher durch andere Adjuvantien und Immunisierungsmethoden möglich war Es werden dabei Organvollextrakte, insbesondere aus embryonaler und bzw oder foetaler Leber, Lunge, Herzmuskel, Milz, Thymus, Bauchspeicheldrüse, Schilddrüse, mesenchymalem Bindegewebe, Eihäuten und Gehirn verwendet, die nach dem Verfahren des DBP 1090 821 chemisch aufgeschlossen sein können Dabei werden pulverförmige Substrate, die durch Einfrierung, Pulverisierung und Lyophilisation von Frischgeweben gewonnen wurden, bei Normaltemperaturen den Dämpfen geeigneter Reagenzien

wie z B Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Mercaptoäthanol oder Diätylamin ausgesetzt, deren Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, so daß im Vakuum die Überführung des aufschließenden Mittels in die dampfförmige Phase ermöglicht wird und nachdem der gewünschte Aufschluß des Substrats erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagenz wieder entfernt werden kann

Organextrakte aus juvenilen oder adulten Geweben werden besonders aus Operationspräparaten von Patienten gewonnen, die an hyperergisch-allergischen Erkrankungen wie z B an Sarkoidose leiden Man verwendet dazu besonders Milz, Lymphknoten, Lunge sowie Lymphozyten, die man aus dem Blut oder der Lymphe gewinnt Es können jedoch auch Gewebeextrakte dieser Organe und Zellen von gesunden Individuen verwendet werden, die vorher mit Antigenen sensibilisiert wurden, für die das besondere Adjuvans, das man hier vorwiegend aus den Lymphozyten und evtl aus Lymphknoten gewinnt, verwendet werden soll In Krankheitsfällen, bei denen sich z B gegen bestimmte Mikroorganismen oder auch gegen Krebsantigene eine Immuntoleranz entwickelt hat, die bei Bakterien zur Dauerausscheidung führt und bei der Krebskrankheit zum Fortschreiten des Tumorwachstums und der Metastasierung, sind solche Gewebeextrakte als Adjuvantien für die Antigene bei der aktiven Immunisierung besonders wichtig Man gewinnt diese Präparate nach aktiver Immunisierung von freiwilligen Spendern mit den entsprechenden Mikroorganismen bzw Tumorantigenen

Durch Verwendung der beschriebenen Adjuvantien kann man auch Antikörperbildung gegen homologe und heterologe Immunglobuline auslösen und verstärken Besondere

Indikationen sind hierfür die Blutinkompatibilitäten zwischen Mutter und Kind, die auf einer ABO-Unverträglichkeit und besonders auf dem Rh-Faktor beruhen

Die Adjuvantien aus Organextrakten können in gleicher Weise wie andere Adjuvantien und insbesondere das Freund'sche Adjuvans bei allen Arten von Antigenen und Allergenen verwendet werden, so z B bei mikrobiellen Antigenen, Viren, Gewebeantigenen, Pollen- und Stauballergenen usw Die Wirkung dieser Adjuvantien ist zum Teil dosisabhängig, d h daß zwischen hohen Konzentrationen und hohen Verdünnungen ein Ukehrreffekt der Wirkung zustande kommt und daß z B, mit sehr hohen Verdünnungen von einem Extrakt aus dem foetalen Anteil der Plazenta

-18

in der Konzentration von 10 g pro ml Lösungsmittel ein Hemmeffekt auf die Antikörperbildung erzielt wird, während höhere Konzentrationen um 10^{-3} bis 10^{-9} die Antikörperbildung verstärken Bei den Extrakten aus dem materalen Anteil der Plazenta ist die Dosisabhängigkeit umgekehrt Hier aktivieren höhere Verdünnungen während höhere Konzentrationen eine Hemmwirkung auslösen Diese Präparate können deshalb bei geeigneter Dosierung mithelfen eine spezifische immunologische Toleranz gegen ein bestimmtes Antigen bzw Antigengemisch wie z B bei Transplantationsantigenen zu erzeugen Vor einer Organtransplantation können dabei Spender und Empfänger wechselseitig mit Antigenen aus Haut, Lymphgewebe oder Organgewebe vorbehandelt werden, denen als Adjuvans ein Extrakt aus dem foetalen Anteil der Plazenta in Ver-

-16

dünnung von 10 g Trockensubstanz pro ml Lösungsmittel zugesetzt ist

Bei allergischen Erkrankungen werden die durch Testung ermittelten Antigene in einer für die Krankheitsauslösung unter-

schwelligen Verdünnung zusammen mit dem Organadjuvans, in üblicher Weise wie bei der Hyposensibilisierung wiederholt injiziert

Bei der Anwendung von Auto- und Mischvaccinen oder Auto- und Fremdnosoden muß das Adjuvans ebenfalls entsprechend der gewünschten Wirkung dosiert werden

Die Herstellung der Antigene in Form von Impfstoffen gegen Pilze, Bakterien oder Viren sowie von Mischvaccinen, Autovaccinen, Nosoden und Autonosoden, ebenso auch von Organ- und Gewebeantigenen sowie Immunglobulinen und Allergenen ist bekannt, desgleichen auch die Herstellung der beschriebenen embryonalen und foetalen Organextrakte; jedoch ist die kombinierte Verwendung von Antigenen und Adjuvantien aus embryonalen und foetalen Organextrakten sowie die Verwendung von lymphatischen Geweben aus hyperergischen natürlich erkrankten Patienten oder spezifisch vorsensibilisierten Spendern bisher nicht erfolgt Hierbei handelt es sich um keine einfache Zusammensetzung, weil die hochmolekularen Bestandteile beider Komponenten chemische bzw adsorptive Bindungen eingehen Diese Reaktionen werden verstärkt durch vorherige Aktivierung der Bestandteile durch Erwärmung bzw Schütteln oder Ultraschalleinwirkung und anschließende Inkubation bei Temperaturen um 4° Celsius

Die Mitverwendung einer kolloidalen Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure mit Zusatz von Phenol, wie sie in dem Präparat "Serum-Activator" der vitOrgan Arzneimittelfabrik, Ruit, vorliegt, verstärkt die adsorptive Bindung mit dem Antigen und aktiviert zusätzlich die Antikörperbildung Tierexperimentell ließ sich zeigen, daß diese Komplexverbindung im Gegensatz zum Freund'schen Adjuvans besonders die Antikörperbildung gegen Globuline verstärkt Diese Komplexverbindung kann jedoch allein,

dem Antigen zugesetzt, die Antikörperbildung nicht in gleicher Weise steigern oder beeinflussen, wie die beschriebenen Adjuvantien aus Organextrakten. Mit diesen zusammen sind kolloidale Komplexverbindungen aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure jedoch in der Lage, den Effekt der Organextrakte noch weiter zu steigern. Körper-eigene Immunglobuline werden durch die kolloidale Komplexverbindung in vitro zum Antigen umgewandelt, dessen antigene Wirkung dann durch den Zusatz des Adjuvans aus Organextrakten noch verstärkt werden kann.

Beispiel 1

Es soll die Wirkung von Organextrakten aus foetalem Herzmuskel, foetaler Leber und foetaler Plazenta in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Antikörperproduktion, bei Verwendung von Schaferythrozyten als Antigen untersucht werden. Dabei werden 0,1 ml einer 20%igen Suspension der Schaferythrozyten mit 0,5 ml einer Zubereitung der genannten Organpräparate versetzt und am Tage 0 intraperitoneal an ingezüchtete Mäuse (Charles River) injiziert. 5 Tage danach wird die Antikörperproduktion der Milzzellen dieser Tiere in vitro im Hämolyse-Gel-Test bestimmt. Die Ergebnisse werden mit einer positiven Kontrolle mit Antigen allein und einer Kontrolle ohne Antigen verglichen. Die Präparationen der Organ-Trockensubstanzen bestehen in einer Suspension von 15 mg der jeweiligen Trockensubstanzen in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Dilution Stärke III besteht in einer Verdünnung von 10^{-9} g der Trockensubstanzen in physiologischer Kochsalzlösung, die der Dilution Stärke II in einer Verdünnung von 10^{-9} physiologischer Kochsalzlösung

Ergebnisse Plaques-10 ® Milzzellen

1 Kontrolle:	
kein Antigen	1
2 Lösungsmittel	1
3 Pos Kontrolle:	
Antigen allein	368
4 Antigen + Cor-juv Trockensubstanz + Lösungsmittel	2895
5 Antigen + Cor-juv Dilution St III	412
6 Antigen + Hepar-juv Trockensubstanz + Lösungsmittel	3215
7 Antigen + Plazenta foetalis-Dilution St III	1194
8 Antigen + Plazenta foetalis-Dilution St II	198

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Antikörperbildung durch Adjuvantien aus juvenilen Organtrockensubstanzen am stärksten stimuliert werden und bei den Dilutionen durch Stärke III mehr als durch Stärke II. Foetale Plazenta hemmt hingegen bei Dilution St II die Antikörperbildung, während sie in Stärke III die Antikörperbildung noch über 100% stimuliert.

Beispiel 2

Herstellung eines kombinierten Impfstoffes gegen Typhus und Paratyphus. Es werden dabei 1 000 Millionen abgetötete Typhus- und 500 Millionen abgetötete Paratyphus A-, B- und C-Bakterien in 1 ml einer Verdünnung 10^{-9} g eines hochmolekularen Organextraktes aus foetalem Rinderdarm aufgenommen.

Beispiel

Herstellung eines Impfstoffes gegen Poliomyelitis. Dazu wird ein **käuflicher, abgetöteter** Poliomyelitis Impfstoff 1:1 mit einem **Organextrakt** aus dem **maternen Anteil der Plazenta** in einer Verdünnung 10^{-4} g Trockensubstanz pro **ml** physiologischer Kochsalzlösung inkubiert.

Beispiel 1

Herstellung von Autovaccinen bzw. von Mischvaccinen. Die nach bekannten Verfahren hergestellten Vaccinen werden im Verhältnis 1:1 mit einer Mischung foetaler Organextrakte aus foetaler Lunge, foetaler Haut, foetalen Schleimhäuten, jeweils in Verdünnung 10^{-9}

10 pro ml NaCl-Lösung inkubiert.

Beispiel 5

Herstellung einer Autonosode. Die fertigerbereitete Autonosode wird im Verhältnis 1:1 mit einem Organextrakt aus foetaler Leber in einer Verdünnung von 10^{-12} g pro ml Kochsalzlösung gemischt.

Beispiel 6

Herstellung einer Allergenmischung zur Hyposensibilisierung bei Allergie. Zur Behandlung des Asthma bronchiale wird aus den getesteten Allergenen bzw. Bakterienantigenen in üblicher Weise der Impfstoff gewonnen, z.B. aus Pneumokokken, Streptokokken, Staphylokokken unter Zusatz von Tuberkulin, und daraus eine Mischung von 10^{-5} g der Trockensubstanzen pro ml Lösungsmittel hergestellt. Diese Verdünnung wird im Verhältnis 1:1 mit einem Organextrakt aus dem foetalen Anteil der Plazenta in der Verdünnung 10^{-12} inkubiert

10 und in üblicher Weise wie bei der Hyposensibilisierung therapeutisch verwendet.

Beispiel 7

Herstellung von Impfstoffen aus Operationspräparat von Malignomen: Das Tumorge-webe wird isoliert, tiefgefroren, pulverisiert und lyophilisiert, sodann nach Patent Nr. 1090821 im Vakuum bei Normaltemperatur durch Schwefelsäuredämpfe aufgeschlossen. Von dem erhaltenen Trockenpulver werden 30 mg + 15 mg eines in entsprechender Weise gewonnenen Trockenpulvers aus dem Operationspräparat einer Sarkoidmilz (Morbus Hoeck) zusammengebracht und 4 ml des käuflichen Präparates "Serum-Activator" (vitOrgan Arzneimittelfabrik GmbH, Ruit bei Stuttgart) zugesetzt. Es wird nun in einem hochoptimierten Homogenisator 10 Sekunden homogenisiert, dann werden 16 ml einer 0,5%igen Phenollösung in physiologischer Kochsalzlösung zugemischt und erneut 10 Sekunden homogenisiert. Anschließend wird die Mischung 1 Minute lang mit Ultraschall behandelt.

Beispiel 8

Herstellung von Impfstoffen aus Operationspräparaten von Malignomen: Das nach Beispiel 7 hergestellte Tumorpräparat wird ohne Zusatz des Präparates aus Sarkoidmilz in entsprechender Weise weiterbehandelt bei alleiniger Verwendung der kolloidalen Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure mit Phenolzusatz als Adjuvans. Dieses Präparat wird einem Freiwilligen wiederholt s.c. und i.m. im Abstand von 3, 5 und 8 Tagen sowie nach 4 Wochen injiziert. 8 Tage nach der letzten Injektion wird dem Freiwilligen 200 ml Venenblut entnommen. Aus diesem wird das Serum

isoliert und andererseits werden die Lymphozyten nach bekannten Methoden abgetrennt und nach der Methode des Beispiels 7 zu pulverisierten Dauerpräparaten verarbeitet. Zur Immunisierung des Patienten wird nun anstatt des im Beispiel 7 verwendeten Extraktes aus Sarkoidmilz, der Extrakt aus den Lymphozyten als Adjuvans verwendet. Das Präparat wird in gleicher Weise wie im Beispiel 7 hergestellt.

Beispiel 9

Herstellung von Transplantations-Antigenen für prophylaktische Erzeugung einer spezifischen Immuntoleranz: Durch Probeexzision entnommene Haut und Lymphknoten werden zusammen mit Lymphozyten des Blutes sowohl vom Spender als auch vom späteren Empfänger eines Organtransplantates wie im Beispiel 7 zu Dauerpräparaten verarbeitet. Aus den Trockenpräparaten werden Homogenate in physiologischer Kochsalz-
-6
lösung in einer Verdünnung von 10^{-6} g Trockensubstanz pro ml Lösungsmittel hergestellt und diese jeweils im Verhältnis 1:1 mit Organextrakten aus dem foetalen Anteil der Plazenta in einer Verdünnung 10^{-6} g Trockensubstanz pro ml Lösungsmittel zusammengebracht und durchgeschüttelt. Diese Präparate werden dann mit physiologischer Kochsalzlösung stufenweise im Hunderterschnitt, bezogen auf die Antigenmischungen, über 10^{-2} , 10^{-4} auf 10^{-6} und ggf. noch höher weiterverdünnt. Diese Präparate werden nun in Art einer prophylaktischen Hyposensibilisierung wechselseitig, in ansteigender Dosierung wiederholt injiziert, d.h. der Spender erhält die vom Empfänger gewonnenen Präparate und der Empfänger die vom Spender gewonnenen Präparate injiziert.

Beispiel 10

Herstellung von Präparaten gegen Rh-Sensibilisierung von werdenden Müttern. Man gewinnt und reinigt nach bekannten immunologischen Methoden Rh-Antikörper von sensibilisierten Rh-negativen Frauen oder Männern, möglichst der Blutgruppe 0. Dieses Serum wird im Verhältnis 1:1 mit einem Extrakt aus foetaler Leber in einer Konzentration von 10^{-6} g Trockensubstanz pro ml physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Dann wird entsprechend Beispiel 7 von der kolloidalen Komplex-**Verbindung** aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure mit Phenolzusatz je 1 ml zu 4 ml des Kombinationspräparates aus Serum und Organ-Adjuvans zugesetzt. Dadurch erfolgt eine weitere Verstärkung der Antigenität der Serumglobuline. Danach werden ebenfalls im Hunderterschnitt stufenweise Verdünnungen über 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} bis 10^{-12} und evtl. höher hergestellt. Wie im Beispiel 8 erfolgt auch hier die Anwendung in Art einer Hyposensibilisierung in ansteigender, jedoch unterschwelliger Dosierung. Diese Behandlung kann vor oder auch während einer Gravidität bei Rh-negativen Frauen, die bereits gegen das Rh-Antigen sensibilisiert sind, durchgeführt werden. Frauen, die noch nicht gegen Rh-Antigene sensibilisiert sind, können mit höheren Konzentrationen behandelt werden, als bereits vorsensibilisierte Frauen. Während einer inkompatiblen Gravidität kann in Art einer Hyposensibilisierung eine Dauerbehandlung erfolgen.

Zusatzverfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus

Zusatz zu PK 1 617 886

DE Nr : 18 14 134 9
vom 12 12 1968

Patentanspruch

Zusätzliches Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus gegen Krebs und/bzw bestimmte Organe nach Patent (-Anmeldung T 33 356 IV a/ 30 h), bei welchem an die nach bekannten immunologischen, chemischen oder fermentchemischen Verfahren gewonnenen Antikörperfragmente mit erhaltenem Tropismus zu den jeweiligen Gewebs- bzw Zellantigenen nach ebenfalls bekannten Verfahren pharmakologisch oder als radioaktive Markierungs-substanzen wirkende Moleküle chemisch und/oder adsorptiv angekoppelt werden, dadurch gekennzeichnet, daß zytotrope, gegen mobile Zellen, deren molekulare Bestandteile aus Geweben oder Körperflüssigkeiten oder gegen interstitielle oder humorale physiologische oder pathologische Körperbestandteile oder Fremdkörper gerichtete Antikörperfragmente verwendet werden

Beschreibung

Das vorliegende Verfahren ist eine Erweiterung des Verfahrens nach Patent (-Anmeldung T 33 356/IV a/30 h), das zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus gegen Krebszellen und/oder bestimmte Organe dient, wobei an die nach bekannten immunologischen, chemischen bzw fermentchemischen Verfahren gewonnenen Antikörperfragmente mit erhaltenem Tropismus zu den jeweiligen Gewebs- bzw Zellantigenen nach ebenfalls bekannten Ver-

fahren pharmakologisch oder als radioaktive Markierung wirkende Moleküle chemisch und/oder adsorptiv angekoppelt werden Die Erweiterung besteht darin, daß zytotrope, gegen mobile Zellen und deren molekulare Bestandteile aus Geweben oder Körperflüssigkeiten oder auch gegen interstitielle oder humorale physiologische oder pathologische Körperbestandteile oder körperfremde Stoffe, insbesondere Infektionserreger, gerichtete Antikörperfragmente als Schlepperstoffe verwendet werden

Unter mobilen Zellen aus Geweben sind dabei z B zu verstehen leukozytäre oder lymphozytäre Zellen, Makrophagen, Fibrozyten, Histiozyten u a , unter denen aus Körperflüssigkeit die lymphozytären Zellen, wie z B Lymphozyten, Plasmazellen, dann die verschiedenen leukozytären Zellen, Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Erythrozyten u a , die im Blut, im Lymphsystem, im Liquor cerebro-spinalis, der Augenflüssigkeit, in Exsudaten und Transsudaten sowie in Blasen der Haut, in Wundsekret oder im Urin enthalten sind

Unter physiologischen, interstitiellen Körperbestandteilen ist z B zu verstehen Kollagen- und andere Intrazellulärs-substanzen, unter pathologischen Körperbestandteilen beispielsweise Fibrin, Hyalin, Fibrinoid, Amyloid, nekrotisches bzw verkäsendes Gewebe, Granulationsgewebe u a Unter Infektionserregern und körperfremden Stoffen sind beispielsweise Mikroorganismen, Viren, Parasiten, Allergene und andere Fremdkörper zu verstehen Unter physiologischen humoralen Körperbe-

standteilen sind zu verstehen z.B. Fibrinogen, Albumin, die verschiedenen Arten von Globulinen, Komplemente, Fermente u.a. Unter pathologischen humoralen Bestandteilen der Körperflüssigkeiten sind abwägig gebildete oder pathologisch auftretende molekulare Bestandteile zu verstehen.

Es hat sich gezeigt, daß das Verfahren, Antikörper als Vehikel für Pharmaka oder für Tracersubstanzen zu verwenden, auf vielen Gebieten der Therapie und Diagnostik verwendbar ist und dabei gegenüber der Verwendung von nativen Antikörpermolekülen große Vorteile bestehen. Diese beruhen größtenteils auf der kleineren Molekülgröße, die eine geringere Antigenität bedingt und die Permeabilität durch das interstitielle Gewebe sowie die Penetration in Zellen begünstigt.

Die Methoden zur Gewinnung der jeweiligen Antikörper und der daraus herzustellenden Fragmente mit erhaltenem Tropismus zum Antigen sind bekannt, ebenso die Methoden für die chemische Ankopplung der Wirkstoffe. Letztere entsprechen den Methoden zur Herstellung konjugierter Antigene (vgl. H. Schmidt: Fortschritte der Serologie: Dietr. Steinkopf Verlag, Oarmstadt; Kobat und Mayer (1948) Experimental Immunochemistry: S. 142, Springfield/Illinois; Wolf und Vasquez: The Lancet No. 7522, S. 905 -909, Vol. II) sowie den Methoden zur Markierung nativer Antikörper (vgl. H. von Mayersbach: Immunfluoreszenz: Das ärztliche Laboratorium, 13: 317 - 331 (1967)).

Die Isolierung bzw. Reinigung der Kopplungsprodukte ist ebenfalls allgemein bekannt. Es wurden jedoch bisher die Körperbruchstücke nicht in der beschriebenen Weise verwendet.

Beispiel 10

Es soll ein Präparat zur Immunsuppression auf der Basis des Antilymphozytenserums hergestellt werden. Dazu werden gereinigte Antilymphozyten-Antikörper nach der Mercaptoethanol-Methode in L- und H-Ketten gespalten und über Jodacetamid. 6-Methylprednisolon angekoppelt. Nach ausgiebiger Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung erfolgt ein erneuter Zusatz von 6-Methylprednisolon zur Stabilisierung des Konjugates. Es ist möglich, vor oder nach der Konjugation der Antikörperbruchstücke mit 6-Methylprednisolon durch Säulenchromatographie, Gelfiltration oder Elektrophorese die L- und H-Ketten zu trennen und separat weiter aufzuarbeiten bzw. zu verwenden. Die Ankopplung kann auch durch Bisdiazobenzidin erfolgen. Anstatt des Kortikoides kann Puryl-6-Histamin oder auch eine geeignete zytotoxische oder -lytische Substanz angekoppelt werden.

Die Aufspaltung in trope Antikörperfragmente kann auch fermentativ z.B. durch Papain erfolgen, wonach zunächst die FAB-Fragmente durch Säulenchromatographie getrennt und an diese dann der Wirkstoff angekoppelt wird.

Beispiel 2

Es soll ein Präparat zur szintigraphischen Diagnostik von Fibrinablagerungen in Tumoren hergestellt werden. Nach dem Verfahren von Dudley, Tee und Watkins (zit. nach Med. Tribune No. 6/9 vom Febr. 1968, S. 2) wird gegen menschliches Fibrin von der Ratte ein Antikörperserum gewonnen und im Gegensatz zu diesem Verfahren nicht die Immunglobuline, sondern die daraus gewonnenen FAB-Fragmente mit dem radioaktiven Isotop J-125 markiert.

Beispiel

Es **soll** ein Präparat zur I-fibrinolyse hergestellt werden. Dabei geht man von gereinigten Antifibrinimmunglobulinen aus. Diese **werden** nach bekannten immunologischen **Methoden** gewonnen und isoliert, dann durch papain in EAB- und EC-Fragmente aufgespalten. Der Grad der Fragmentierung **wird** durch immunologische Methoden unter **Verwendung** eines Anti-FAB- oder FC-Antikörperserums verfolgt und bei Erreichen des optimalen Grades der Aufspaltung das **FAB-Fragment** isoliert. Gleichzeitig wird Papain an Bidiazobenzidin gekoppelt und dieses Konjugat überschüssig mit der Lösung der FAB-Fragmente inkubiert. Die Diazotierung kann aber auch durch Zusatz von Bisdiazobenzidin zu dem Gemisch aus Papain und den beiden Antikörperfragmenten erfolgen, wobei dann das zur proteolytischen Aufspaltung der Antikörper verwendete Papain an die Antikörperbruchstücke gebunden wird. Die Isolierung der konjugierten FAB-Fragmente erfolgt durch Chromatographie oder Elektrophorese. Die fibrinolytische Wirkung des Präparates kann in vitro getestet werden.

Beispiel 4

Gegen den Rheumafaktor (Antiglobulin) soll ein proteolytisches Präparat gewonnen wer-

10

den. Zunächst wird gegen den Rheumafaktor ein heterologes Antikörperglobulin hergestellt und dieses adsorptiv gereinigt. Danach erfolgt wie im Beispiel 3 die fermentative Aufspaltung in FAB- und FC-Fragmente mittels Papain. Durch Diazotierung wird nun Trypsin an das FAB-Fragment angekoppelt und durch Gelfiltration das konjugierte FAB-Fragment angereichert.

Beispiel 5

Ein bestimmtes, fehlendes Ferment soll in einer bestimmten Zellart substituiert werden. Dazu werden gereinigte zytotrope Antikörper reaktiv chemisch fragmentiert und an die Bruchstücke das gewünschte Ferment durch Isothiozyanat angekoppelt. Die Ankopplung des Enzyms kann auch nach reversibler Fermenthemmung durch einen Inhibitor erfolgen. Desgleichen kann auch das Konjugat des FAB-Fragmentes mit dem aktiven Ferment inhibiert werden. Bei Verwendung von heterologen Antikörperfragmenten als Schlepper kann dann gegen die verwendeten FAB-Fragmente des Schleppers ein anderes heterologes Antiglobulin ggf. von der zu behandelnden Spezies gewonnen werden, wobei man daraus die tropen Fragmente als Vehikel für die geeignete Aktivierungssubstanz des Enzyms benützt. Die Behandlung erfolgt hier zweizeitig. Zunächst wird mit dem inaktivierten tropen Fermentpräparat behandelt, das dann in einem nachfolgendem zweiten Behandlungsschritt aktiviert wird.

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln mit selektivem Tropismus gegen Krebs und bestimmte Organe

DE Nr : 16 17 886 2
vom 06 03 1967

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung organspezifischer und gegen Krebs spezifischer Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) die in bekannter Weise aus Blutkonserven oder frischem menschlichen oder tierischem Blut isolierten Leukozyten, insbesondere Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen mit Tumor-Antigenen inkubiert und durch bekannte physikalische und bzw oder chemische Methoden in praemorbiden Zustand versetzt, konserviert oder aus den Zellen nach bekannten Methoden die Ribonukleinsäuren isoliert und konserviert,

b) diese Präparate nach bekannten Methoden über Mitteltiere oder in Kulturen von antikörperbildenden Zellen bzw den daraus hergestellten oder auch künstlich erzeugten zellfreien Systemen, zur Gewinnung von Antikörperglobulinen benutzt und bzw oder

c) entsprechende Antikörper aus Blut oder Körperflüssigkeiten des entsprechenden Krebs-Patienten nach Vorbehandlung mit den nach Arbeitsgang A hergestellten Präparaten gewinnt, dann

d) diese nach Arbeitsgang b und c gewonnenen Antikörperglobuline nach bekannten Methoden einzeln oder als Mischung an Organextrakten aus den Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst absättigt und

e) die sich nicht bindenden Antikörperglobuline mit Tumorextrakten präzipitiert, dieses Präzipitat nach bekannten Methoden isoliert und in ihre beiden Bestandteile dissoziiert, die Antikörper und Anti-

gene bzw Haptene, chemisch oder fermentativ in Fragmente mit erhaltenem Tropismus aufspaltet und

f) an diese Fragmente durch bekannte chemische Verfahren krebswirksame bzw zytolytische Medikamente ankoppelt, wobei die Verfahrensschritte a; a und b; a und c; d und e, sowie d, e, und f, und e und f für sich allein ausgeführt werden können

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle der Tumor-Extrakte, Organ-Extrakte oder Organ-Antigene als Ausgangsstoffe benutzt werden und im Arbeitsschritt d) andere Organarten, als diejenigen des Ausgangsproduktes verwendet werden

3 Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl gesundheitsfördernde, wie -schädigende, als auch unmittelbar und mittelbar pharmakologisch wirkende chemische Moleküle an die organotropen bzw tumortropen Schleppersubstanzen angekoppelt werden

4 Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Moleküle verwendet werden, die durch elektromagnetische Strahlen oder durch andere Stoffe biologisch inaktiviert werden

Beschreibung

Bei Spontan-Tumoren reicht die körpereigene immunologische Tumorabwehr durch Antikörperglobuline mengenmäßig nicht aus. Die Antikörper können einen selektiven Tropismus zu den Tumorzellen besitzen, ohne daß sie diese schädigen. Die immunologische Krebs-

therapie muß deshalb sowohl die tumorspezifische Antikörperbildung, als auch die zellschädigende Wirkung der Antikörper auf Tumorzellen verstärken

Die aktive Immunisierung des Tumor-Patienten mit Tumor-Antigenen, insbesondere aus dem körpereigenen Tumor, kann die Antikörperbildung nur wenig beeinflussen, weil sich im Verlauf der Tumorkrankheit eine immunologische Toleranz gegen diese Tumor-Antigene ausbildet. Sofern organspezifische Antigene mitverwendet werden, besteht bei dieser Art der Behandlung dann die Gefahr für eine Autosensibilisierung gegen das Organewebe des Mutterbodens der Geschwulst.

Erfindungsgemäß kann nun die Antikörperbildung gegen Tumore eingeleitet oder aktiviert werden, wenn man Messenger-Ribonukleinsäuren aus sensibilisierten lymphatischen Zellelementen des Blutes und der Körperflüssigkeiten, wie Makrophagen, monozytoide Elemente, kleine Lymphozyten und spindelförmige Zellen (Histiozyten) anstatt des Antigens auf den Patienten überträgt. Nach dieser Methode ist auch die Einleitung einer Antikörperbildung in Mittler-Tieren sowie in Gewebekulturen von lymphatischen Geweben und in den aus solchen Geweben hergestellten zellfreien Synthesystemen *in vitro* möglich. Dieses Verfahren der Induktion der Antikörperbildung durch Messenger-RNS und der Gewinnung von Antikörpern *in vitro* wurde von Jacherts beschrieben in *Z med Mikrobiol u Immunol* 152, 112 - 133 (1966), sowie in den dort unter Nr. 5, 11, 12 und 13 angegebenen diesbezüglichen weiteren Veröffentlichungen. Dieses Verfahren wurde jedoch bisher nicht in der vorliegenden Weise zur Erzeugung von informativem iRNS und Antikörpern gegen Tumoren und normale Organe verwendet.

Das Verfahren läßt sich nämlich auch auf Organ-Extrakte bzw. Organ-Antigene als Ausgangsstoffe übertragen.

Bei vorliegendem Verfahren ist die besondere Methode der aktiven Immunisierung durch iRNS und der Antikörpergewinnung ein Bestandteil der als Verfahrensschritt A bezeichnet wird.

A) Die Gewinnung von Tumorantigenen und geeigneten Tumor-Extrakten wie auch von Organ-Antigenen und Organ-Extrakten erfolgt nach bekannten Verfahren, z. B. nach DBP-Anmeldung T 33 036 IVa/3ah; dem DBP 1 090 821; nach Potter, Appella und Geisser: *J Mol Biol* (1965) u. a. Zur Erzeugung der iRNS in Zellen werden bei vorliegendem Verfahren auf bekannte Weise, z. B. durch Schwerkrafttrennung, spontane Sedimentation, Elektrophorese und Siebung aus Blutkonserven die leukozytären Blutzellen, insbesondere die antikörperbildenden Zellen isoliert und im natürlichen Milieu des Blutplasmas, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika oder aber in einem geeigneten Gewebekulturmedium, z. B. Hanck's Lösung + 10% Kälberserum sowie Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika (vgl. D. Jacherts: *Z Med Mikrobiol u Immunol* 152, 1 - 19 (1966)), gegebenenfalls unter mechanischer Bewegung und Durchlüftung gezüchtet. Der Tumor-Extrakt bzw. die Tumor-Antigene werden entsprechend diesem Verfahren in Verdünnungen zugesetzt, z. B. von 10^{-4} bis 10^{-12} g der Tumor- bzw. Organ-Trockensubstanzen oder den entsprechenden höheren Konzentrationen von Frischextrakten pro ml des Gewebekulturmediums. Nach einer Bebrütungszeit von mehreren Stunden bis Tagen werden die Leukozyten mit UV-Licht bestrahlt (vgl. Jacherts: *Z med Mikrobiol u Immunol* 152, 262 - 272 (1966)) oder aber durch andere physikali-

sehe Methoden, z B durch kurze Erwärmung auf 40°C, Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen oder durch chemische Einwirkung von radiomimetisch wirkenden Substanzen, geschädigt Nach Eintreten des prämorbid Stadiums, das am beginnenden Absterben von Zellen der Kultur zu erkennen ist, werden die Zellen durch vorsichtiges Abschleudern isoliert und mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und gefriergetrocknet Es ist auch möglich, nach Kirby: Progress in nucleic acid research and molecular biology, ed by Davidson and Cohn New York and London: "Academic Press", die RNS zu präparieren und anschließend durch Gefriertrocknung zu konservieren

Die so gewonnenen lymphatischen Zellen bzw iRNS werden nun in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^9 g Trockensubstanz pro ml physiologischer Kochsalzlösung als Suspension bzw Lösung gegebenfalls wiederholt im Arbeitsgang B Mittler-Tieren injiziert oder in Gewebekulturen unter Verwendung anderer lymphatischer Zellen oder geeigneter künstlich zusammengesetzter zellfreier Synthesysteme zur Erzeugung von Antikörpern verwendet

C) die Anregung der Antikörperbildung und Gewinnung von Antikörpern von Krebs-Patienten entspricht dem Arbeitsgang C des vorliegenden Verfahrens Auch hier erfolgen die Injektionen in Abständen von Stunden bis einigen Tagen D) Die nach Arbeitsgang B) und C) gewonnenen Antikörperglobuline können nun im Arbeitsgang D) einzeln oder als Mischung nach ebenfalls bekannten Verfahren an Organ-Extrakten aus den Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst oder den entsprechenden homologen oder heterologen Organ-Extrakten oder Homogenaten abgesättigt werden Es

eignet sich dazu das Verfahren der Adsorption mittels Säulenchromatographie, wie auch bekannte immunologische Verfahren der Präzipitation Dieser Arbeitsschritt ist besonders wichtig, wenn zur Gewinnung der Antikörper bzw der iRNS keine isolierten Tumor-Antigene, sondern Tumor-Totalextrakte verwendet wurden, die noch organspezifische Faktoren des normalen Gewebes enthalten Der nicht präzipitierte Teil des Antikörpers ist vorwiegend tumorspezifisch

E) Eine weitere Einengung kann im Arbeitsgang E) durch Absättigung an dem entsprechenden Tumor-Extrakt erfolgen Das durch Antigen-Antikörperbildung zustandekommende Präzipitat wird nach bekannten Methoden isoliert und gewaschen und in seine beiden Bestandteile dissoziiert wobei die Antikörper und Antigene bzw Haptene zurückgewonnen werden können, (vgl z B Grämlich: Naturwissenschaften 49 (1962), 451) Die Antikörper-Globuline können z B aber auch nach Dissoziation vom Antigen durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt von der überstehenden Antigenlösung getrennt und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden Aus der überstehenden Antigenlösung werden, z B gegebenfalls nach bekannten Verfahren, durch Gel-Filtration oder Dialyse die Antigene und Haptene isoliert Die isolierten Antigene können dann beim Verfahrensschritt A) und B) oder aber auch direkt zur aktiven Immunisierung und erneuten Antikörpergewinnung verwendet werden

F) Die isolierten tumorspezifischen Antikörper werden nun im Arbeitsschritt F) nach bekannten Verfahren durch milde Reduktion, z B mit β -Merkaptoöthanol, durch Sprengung der Disulfidbrücken in Bruchstücke gespalten (vgl Potter, Appella und Geisser, J Mol Biol (1965), 14, 361 bis 372, Drees-

man: Proc nat Acad Sei 54 (1965) 822 bis 830) Eine Fragmentierung ist auch durch andere chemische Methoden, z H durch Anwendung von Salzlösungen und Erwärmung, wie auch durch chemische Hydrolyse (vgl DBP 1 090 821) und durch fermentative Spaltung, z B mit Papain (vgl Kronvall: Vos Sang 10; 303 - 313 (1965)) möglich Der Tropismus zum Antigen muß dabei für einen Teil der Bruchstücke erhalten sein Nach bekannten chemischen Methoden werden nun an diese Bruchstücke krebswirksame Arzneimittel gebunden Diese müssen gegebenenfalls vor der Ankopplung chemisch aktiviert werden So werden z H an die freien Sulphydrilgruppen der Antikörperbruchstücke Schwefel-Lost-Derivate, die vorher am Schwefelatom reduziert worden sind, durch milde Oxidationsmittel angekoppelt Es können jedoch auch andere bekannte chemische Methoden der Ankopplung, je nach Verwendung eines bestimmten Arzneimittels verwendet werden, wie z B die Diazotierung, Alkylierung, das Oxazol-Verfahren, u a Gegebenenfalls werden nun die nicht zur Reaktion gekommenen Antikörper-Globuline erneut durch Aussalzung gefällt und die im überstand vorhandenen angekoppelten konjugierten Moleküle z B durch Dialyse oder Gel-Filtration isoliert und nach bekannten Verfahren konserviert Auch die isolierten Tumor-Antigene können einen Tropismus zum gleichartigen Tumor besitzen Sie eignen sich dann ebenfalls als Vehikel für Arzneimittel, mit denen sie nach bekannten chemischen Methoden zusammengekoppelt werden können Eine vorherige Abtrennung und Isolierung der chemisch reaktiven Gruppe des Moleküls, die für den Tropismus verantwortlich ist, kann auch hier erfolgen, bevor die chemische Verbindung mit dem tumorwirksamen Arz-

Die Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten tumorspezifischer Arzneimittel liegen in der selektiven Anreicherung der Arzneimittel am gewünschten Ort der Wirkung Gegen Krebs werden z B die bekannten zytotoxischen bzw -statischen Substanzen oder aber auch zytolytische Substanzen, wie z B Histaminabkömmlinge, das Puryl-Histamin, das Epsilon-Puryl-Lysin, oder auch das Dipuryl-Aethylendiamin verwendet, ebenso ist eine Übertragung von Nukleinsäuren oder internen Repressoren, sowie von Eiweißkörpern möglich Durch den gezielten Transport wird eine vorzeitige Inaktivierung der wirksamen Substanzen vermieden Die Vergrößerung des Arzneimoleküls durch Ankopplung an ein Antikörper- oder Antigen-Fragment verringert die Möglichkeit der Resorption durch andere Körperzellen, die keine Rezeptoren für das Antikörpervehikel besitzen Gefährliche Nebenwirkungen entfallen

Wegen der Individual- und Tumorspezifität und der Vielzahl der möglichen Arzneimittel und chemischen Ankopplungsmethoden bieten sich für vorliegendes Verfahren umfangreiche Anwendungsmöglichkeiten Auch ist eine getrennte Anwendung einzelner Verfahrensschritte möglich, so z B von Verfahrensschritt A; A und B; A und C; D und E; D, E und F, sowie auch E und F Als Ausgangsprodukt bzw Antigen für die Herstellung von Präparaten kann jede Art von Neoplasma dienen, einschließlich der sogenannten Blutkrebs

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auf die Herstellung von organotropen Arzneimitteln übertragen Dort werden anstatt der Tumor-Extrakte bzw -Antigene Organextrakte, oder isolierte Organ-Antigene verwendet Im Verfahrensschritt D) erfolgt die Absättigung der Antikörper-Globuline an einem Extrakt aus einer anderen Organart, z B

Großhirn am Extrakt aus Kleinhirn, Zwischenhirn oder Rückenmark; bei solchen gegen Zwischenhirn an Rückenmark oder Großhirn; bei Antikörpern gegen Niere an Leber oder Herz; bei solchen gegen Herz an Nieren, Leber oder Milz; bei solchen aus Lymphdrüsen an Thymus; bei denen gegen Thymus, an Milz usw. Die Gewinnung von Organ-Antikörpern nach dem erfindungsgemäßen Verfahren des Arbeitsschrittes A) ist, ebenso wie die Kombination der weiteren Verarbeitung zu organotropen Arzneimitteln, neuartig. Hier bestehen besonders viele Anwendungsmöglichkeiten durch die Ankopplung der verschiedenartigsten Arzneimittel und chemischer Moleküle. Diese können biologisch sowohl unmittelbar, als auch indirekt wirken, indem sie z. B. durch elektromagnetische Strahlen, die von einem besonderen Sender abgestrahlt werden, angeregt werden. Auf diese Weise ist die drahtlose Übermittlung von elektrischen Impulsen, z. B. auf das Herz oder bestimmte Gehirnteile möglich, desgleichen auch die Verstärkung von lokalen bioelektrischen Vorgängen und ihre spezifische Ableitung. Am Ort der Wirkung können nicht unmittelbar biologisch aktive Moleküle durch andere Moleküle aktiviert werden.

Beispiel 1

Es sollen tumorspezifische S-Löste zur Behandlung eines Bronchialkarzinoms hergestellt werden. Die Herstellung gliedert sich in 6 Arbeitsgänge.

A) In Arbeitsgang A) werden die Tumor-Antigene sowie großmolekulare iRNS zur Antikörpererzeugung gewonnen. Dazu wird der Tumor nach der chirurgischen Entnahme in kleinere Partikel zerschnitten. Diese werden in physiologischer Kochsalzlösung gespült,

dann in verflüssigtem Stickstoff schlagartig gefroren und in tiefgekühlten Mühlen pulverisiert, dann lyophilisiert, anschließend durch die wasserfreie Säuredampf-Hydrolyse im Vakuum nach DBP 1 090 821 aufgeschlossen und als haltbares Dauerpräparat steril unter Luftabschluß aufbewahrt. Nun werden aus frischen Blutkonserven von menschlichem Blut oder auch aus frischem tierischen Blut durch Sedimentation und bzw. oder andere bekannte Verfahren die Leukozyten von den roten Blutzellen und den Thrombozyten abgetrennt und im entsprechenden Blutserum nach bekannten Verfahren, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika und bzw. oder Chemotherapeutika, in Art einer Gewebekultur gezüchtet. Es können hierzu auch andere geeignete Nährmedien verwendet werden, wie z. B. Hanck's-Lösung mit Zusatz von 10% Kälberserum und eine Kombination von Antibiotika. Innerhalb einer Stunde nach Anlegung der Leukozytenkultur wird dieser ein wäßriger verdünnter Extrakt aus dem Dauerpräparat des Tumors

⁻⁶
in einer Konzentration von 10⁻⁶ g Trockensubstanz pro ml des Nährmediums zugesetzt. Um die Lipide des Tumor-Totalextraktes in Lösung zu bringen, werden 0,01 mg Lauryl-Natriumsulfat pro ml mitverwendet. Es können auch frische Tumor-Extrakte oder Homogenate benutzt werden.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen bei 37°C werden die Zellen der Kultur 10 Sekunden lang mit UV-Licht aus einer Quecksilber-Niederdrucklampe mit 8 Watt und UG-Filter im Abstand von 13 cm bestrahlt. Nach etwa 15 Min. werden die Zellen aus der Kultur genommen, dann mehrmals in PBS-Lösung gewaschen und gefrieretrocknet.

B) Im Arbeitsgang B) werden nun Antikörper-Globuline gewonnen über Mitteltiere oder aus in-vitro-Kulturen von antikörperbildenden Zellen bzw. von geeigneten zell-

freien Systemen Die Methode entspricht einer aktiven Immunisierung, bei der anstatt des Antigens die nach Arbeitsgang A) erhaltenen Präparate in einer Verdünnung von 10⁻⁶ g Trockensubstanz pro ml physiologischer Kochsalzlösung verwendet werden Beim Makroorganismus erfolgt die Injektion parenteral, dreimal in Abständen von 1, 2 und 3 Tagen Die Antikörperproduktion kann dabei unter Verwendung des Tumor-Antigens nach bekannten Methoden der Gel-Präzipitation überwacht werden, so daß nach Erreichen einer ausreichenden Konzentration die Antikörper-Globuline nach bekannten Verfahren aus dem Blut oder den Körperflüssigkeiten bzw den Nährmedien gewonnen und z B durch Gel-Filtration an Sephadex G 200 bzw durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat angereichert werden Das Fällungsprodukt der Ammoniumsulfatlösung wird zentrifugiert und, nachdem der Überstand beseitigt ist, mit physiologischer NaCl gewaschen

C) Im Arbeitsgang C) wird im Tumor-Patienten die Antikörperbildung angeregt und verstärkt Dabei werden in gleicher Weise, wie bei Mittlertieren, die aus Arbeitsgang A) gewonnenen Präparate parenteral injiziert Die Gewinnung der Antikörper-Globuline erfolgt wie im Arbeitsgang B)

D) Im Arbeitsgang D) werden nun die nach Arbeitsgang B) und C) gewonnenen Antikörper-Globuline im Verhältnis 1:1 zusammen gemischt und an Organ-Extrakten aus gesunden Geweben des normalen Mutterbodens der Geschwulst abgesättigt Sofern es nicht möglich ist, aus dem Operations-Präparat gesunde Gewebe zu konservieren, können zur Absättigung auch tierische Organextrakte verwendet werden Das nach bekannten Methoden gewonnene Präzipitat enthält die organ- und gegebenenfalls art- und individualspezifischen Faktoren der

Antikörper-Globuline

E) Die nicht zur Reaktion gekommenen Antikörper sind sowohl gegen die Tumor-Antigene, als auch gegen exogene Antigene gerichtet Um letztere zu beseitigen, erfolgt im Arbeitsgang E) die Präzipitation der bisher nicht abgesättigten und sich in Lösung befindlichen Antikörper an dem nach Arbeitsgang A) gewonnenen Tumor-Extrakt Auch hier werden die fettlöslichen Bestandteile dieses Extraktes mitverwendet, indem diese durch Zusatz von Lauryl-Natriumsulfat der o a Konzentration emulgiert werden Das Präzipitat wird nun in üblicher Weise isoliert, gewaschen und in seine Bestandteile dissoziiert Die Antikörper-Globuline werden durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und abzentrifugiert Das übrigbleibende Tumor-Antigen kann dann gegebenenfalls später bei einer Wiederholung des Arbeitsganges A) verwendet oder aber zur aktiven Immunisierung von Mittlertieren, bzw zur Herstellung von organotropen Arzneimitteln benutzt werden

F) Im Arbeitsgang F) werden nun die isolierten Antikörper in β -Mercaptoethanol vorsichtig reduziert Dazu wird eine Lösung von 0,3 β -Mercaptoethanol, 7 M Guanidin-HCl-, 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,2) verwendet, bei einem Gehalt von 1 bis 2% der Antikörper Globuline Nach einer Einwirkungszeit von 1/2 Stunde bei 37°C werden nun 1 M S-Lost der Lösung zugesetzt und diese eine weitere Stunde bei 30°C gehalten Nun wird auf 10°C abgekühlt und 0,7 M-Methylenblau als schwaches Oxidationsmittel zugesetzt Nach einer Einwirkungszeit von 1/2 Stunde wird die Lösung für 24 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und dann lyophilisiert Vorher können die nicht gespaltenen Antikörper-Globuline durch Absättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt, abzentrifugiert und beseitigt werden Der

überstand wird dann erneut gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Das fertige Präparat kann in frischem Zustand therapeutisch verwendet werden oder es wird lyophilisiert und vor der Anwendung in einem Lösungsmittel aufgelöst.

Beispiel 2

Es sollen selektive Arzneimittel gegen ein Muskel-Sarkom hergestellt werden. Die Arbeitsschritte A und C entsprechen dem Beispiel 1. Der Arbeitsschritt B entfällt. Im Arbeitsschritt D erfolgt die Präzipitation der vom Patienten gewonnenen Antikörper mit einem frischen zellfreien Extrakt aus Muskelgewebe vom Rind, der unmittelbar nach der Schlachtung hergestellt wurde. Das Präzipitat wird zentrifugiert und der Überstand mit dem Tumor-Extrakt inkubiert. Das sich bildende Präzipitat wird gewaschen und bei 37 °C für 16 Stunden im Verhältnis 100:1 mit Mercuripapain als Enzym in einer Lösung von 0,01 M Cystein, 0,002 M EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 inkubiert. Das verdaute Präzipitat wird an Sephadex-G-100 in einer Säule von 4,4 x 38 cm nach Equilibrierung der Säulen mit 0,005 M Phosphatpuffer von pH 8,0 in einer Rate von 20 ml pro Stunde vom verwendeten Papain getrennt. Die Bruchstücke aus Antikörpern und Antigenen bzw. Haptenen, werden nun durch Diazotierung an Triäthylmelamin (TEM) gekuppelt. Das nicht gebundene TEM wird durch Gel-Filtration entfernt.

Beispiel 3

Es soll ein selektiv auf das Großhirn einwirkendes Arzneimittel hergestellt werden. Dazu wird im Arbeitsgang A aus einem chirurgischen Operationsmaterial menschliches Gehirn gewonnen und zur Erzeugung von antikörperbildender iRNS verwendet. Im Arbeitsgang B werden damit Antikörper vom Pferd gewonnen. Diese werden im Arbeitsgang D an einem Extrakt aus Rückenmark vom Rind abgesättigt. Im Arbeitsgang E erfolgt die Präzipitation der nicht zur Reaktion gekommenen organspezifischen Antikörper mit dem Extrakt aus menschlichem Gehirn. Das Präzipitat wird durch 2%ige Glykollösung nach Olitzki und Frankel dissoziiert (vgl. *Nature*: 126, 723 (1930) und *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 28, 492 (1931)) und die Globuline durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert. Aus dem Überstand werden die Antigene gewonnen und zur Diagnostik des Tropismus der später erhaltenen Präparate sowie des Sensibilisierungsgrades des Patienten gegen Gehirn verwendet. Die Antikörper werden fermentativ in Bruchstücke gespalten und durch Ionenaustauscherchromatographie in DEAE-Zellulose (vgl. *Franklin J. Clin. Invest.* 39: 1933 (1960)) getrennt. Durch Gel-Präzipitation mit dem Organ-Antigen wird der organotrope Anteil festgestellt und dieser durch Diazotierung an das Arzneimittel gekoppelt.

Verfahren zur Herstellung von resorbierbaren, therapeutisch wirksamen Fragmenten aus Proteohormonen, Insulin und Fermenten

DE Nr : 16 17 896 4 (T 35573)
vom 22 12 1967

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung von resorbierbaren, therapeutisch wirksamen Fragmenten aus Proteohormonen, Insulin und Fermenten, dadurch gekennzeichnet, daß das üblicherweise für die Fragmentierung benützte chemische Agens zusammen mit dem verwendeten Lösungsmittel im Vakuum verdampft und abgesaugt bzw die erhaltenen Fragmente getrocknet oder aus der Lösung heraus lyophilisiert werden oder daß die nativen Hormone bzw Fermente als Trockenpulver mit einem Restwassergehalt bis zu 15% nach dem Verfahren des DBP 1090 821 im Vakuum mit einem bei niederen Drucken flüchtigen Reagenz, vorzugsweise mit konzentrierter Schwefelsäure, Essigsäure und bzw oder β -Mercaptoethanol, bei Temperaturen unter 100 Grad bedampft werden, wobei durch Absenkung des Vakuums und bzw der Temperatur das Reagenz auf dem Substrat kondensiert und nach der gewünschten Fragmentierung des zu beeinflussenden Substrates der nicht zur Wirkung gekommene Überschuß durch Erhöhung des Vakuums in Dampfform abgesaugt wird

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltenen Fragmente als Trockensubstanz zusammen mit einer geeigneten permeabilitätssteigernden Substanz und ggf mit einer neutral reagierenden Füllsubstanz sowie einem Schutzkolloid tablettiert werden

Beschreibung

Bislang war es nicht möglich, Proteohormone, Insulin und Fermente durch die Haut oder Schleimhäute hindurch zur Resorption zu bringen In wissenschaftlichen Versuchen wurde gefunden, daß solche Wirkstoffe chemisch aufgespalten und die erhaltenen Fragmente zum biologisch aktiven Molekül rekombiniert werden können Um eine spontane Rekombination der Bruchstücke zu vermeiden wurden die chemischen Radikale der Bruchstücke abgesättigt Bisher wurden solche Fragmente nicht auf ihre Permeabilität und Rekombinationsfähigkeit in vivo geprüft und auch nicht therapeutisch verwendet Es wurde nun gefunden, daß bei Mitverwendung einer oberflächenaktiven und permeabilitätssteigernden Substanz, wie z B den Fettalkoholsulfonaten oder anderen nichtionogenen Emulgatoren sowie von Dimethylsulfoxyl (DMSO), die Fragmente Haut und Schleimhäute durchdringen können Eine Rekombination ist im Organismus aber nur möglich, wenn die Fragmente als freie Radikale zur Resorption gelangen

Das vorliegende Verfahren ermöglicht nun, die Fragmente in einer resorbier- und rekombinierbaren Form anzuwenden Es beruht darauf, die freien Radikale der nach bekannten chemischen Verfahren gewonnenen Hormone oder Fermente durch Einfrieren der Lösung bzw durch Trocknung zu konservieren und dadurch eine spontane Rekombination zu verhindern Das gleiche Ergebnis wird durch ein anderes Verfahren erzielt, indem die nativen Hormone und Fermente als Trok-

kenpulver mit einem Restwassergehalt bis zu 15%, mit einem geeigneten chemischen Agens, das die Fragmentierung bewirkt, im Vakuum bedampft wird. Durch Absenken des Vakuums und bzw. oder der Temperatur wird das Reagens auf dem zu fragmentierenden Substrat kondensiert und nach der gewünschten Fragmentierung der Überschub, der nicht zur Reaktion gekommen ist, wieder in Dampfform nach Erhöhung des Vakuums, abgesaugt.

Dieses Verfahren hat Ähnlichkeit mit dem DBP 1090 821; dieses dient besonders der schonenden Aufschließung von Organ-Trockensubstanzen. Dabei werden ganze Zellen oder korpuskulare Zellbestandteile durch Dämpfe von chemischen Reagenzien im Vakuum oberflächlich mazeriert und dadurch die Inhaltsstoffe in eine optimal wasserlösliche Form gebracht.

Vorliegendes Verfahren deutet als eine neue Anwendungsart auf besondere, isolierte Ausgangsstoffe, den Hormonen und Fermenten. Als zusätzliche Wirkung dieses Verfahrens läßt sich die Artspezifität solcher Stoffe verringern. Dies bedeutet eine Verbesserung der therapeutischen Verträglichkeit und ermöglicht bei somatotropen Hormonen, die von Tieren gewonnen werden, eine therapeutische Wirkung beim Menschen, insbesondere auch bei parenteraler Applikation.

Die therapeutische Anwendung durch Haut oder Schleimhäute setzt voraus, daß die in Trockenform konservierten, chemisch aktiven Fragmente protrahiert in Lösung gebracht werden, so daß keine spontane Rekombination erfolgt. Dies geschieht durch Tablettierung, zusammen mit einer geeigneten permeabilitätssteigernden Substanz und ggf. zusätzlich mit einem Schutzkolloid, z. B. Kieselsäure oder Polysaccharide, aus denen sich bei Benetzung ein Gel bil-

det, das die chemisch aktiven Fragmente bis zur Resorption einschließt.

Bei buccaler oder sublingualer Anwendung werden solche Tabletten durch den Speichel benetzt und nach und nach, während einer längeren Zeitspanne aufgelöst. Die Anwendung kann auch in Form von Lutschbonbons erfolgen, sofern die darin inkorporierten rekombinationsfähigen Fragmente durch das Herstellungsverfahren nicht denaturiert werden.

Beispiel 1

Es soll ein bei buccaler Anwendung resorbierbares Insulin gewonnen werden. Dazu wird eine wäßrige Reduktionslösung hergestellt, die 0,3 M β -Mercaptoäthanol, 7 M Guanidin-HCl und 0,5 M Tris-HCl mit pH 8,2 enthält. Anstelle von Guanidin-HCl kann 6 M Harnstoff verwendet werden. In dieser Lösung werden 2% gereinigtes Insulin vom Rind oder Schwein gelöst. Nach einer Einwirkungszeit von 1 Stunde bei 40°C wird die Lösung gegen eine Lösung von 0,1 bis 0,5 M β -Mercaptoäthanol bei pH 8,2 für 12 Stunden dialysiert und dabei mehrmals die Dialysierflüssigkeit gewechselt. Das Dialysat wird dabei auf die Hälfte der Ausgangsmenge eingeeengt, dann gefriergetrocknet und pulverisiert. Das so erhaltene Trockenpulver wird im Gewichtsverhältnis 1:1000 mit Maltose gemischt, der 0,8% Aerosil, 0,001 Natriumlaurylsulfat und 10 g Zinksulfat zugesetzt sind. Diese Ausgangsmischung wird im Tierversuch standardisiert und ggf. durch weitere Zumischung des Maltosegemisches so eingestellt, daß 5 Einheiten Insulin aus einer Gewichtsmenge von 0,3 g erst nach der Resorption durch die Schleimhäute wirksam werden. Diese Mischung wird nun zu Tabletten verarbeitet.

Beispiel 2

Es sollen resorbierbare Präparate aus follikelstimulierendem Hormon (FSH) der Hypophyse gewonnen werden. Dazu wird das reine Hormon als Trockenpulver mit einem Restfeuchtigkeitsgehalt von 10%, entsprechend dem Patent 1090 821 in einem Rezipienten bei Normaltemperatur im Vakuum den Dämpfen von konzentrierter Essigsäure ausgesetzt. Das Vakuum wird in Abständen von 20 Minuten 2mal durch Einblasen von Stickstoff abgesenkt und nach 2-3 Minuten jeweils wieder neu erzeugt. Nach einer Einwirkung von 12 Stunden wird der noch vorhandene Essig beseitigt bzw. das in Verbindung mit dem Rezipienten stehende Gefäß, in dem sich die Essigsäure befindet, von dem Rezipienten abgeschlossen und dann über 12 Stunden mit einem Pumpenaggregat für Hochvakuum der Rezipient abgesaugt. Das Pulver wird dann im Verhältnis 1:100 mit Milchzucker gemischt, dem 1% Aerosil, 10% Thylose und 1% Texapon zugemischt sind. Im Tierversuch wird auch hier die Mischung standardisiert und daraus ein Streupulver hergestellt, das als Zusatz zum Futter von Nutztieren verwendet werden kann.

Beispiel 3

Bei somatotropem Hypophysenhormon (STH) vom Schwein soll die Artsspezifität verringert werden, so daß das Hormon auch beim Menschen bei parenteraler Applikation wirksam wird. Gleichzeitig soll es in eine resorbierbare Form gebracht werden. Dazu wird, entsprechend dem Beispiel 2, das reine, kristallisierte Hormon mit Dämpfen von Essigsäure behandelt. Nach einer Einwirkungszeit von 4 Stunden und einer Zeitspanne von 6 Stunden, während der die noch verbliebene Essigsäure verdampft und abgesaugt wird, erfolgt in analoger Weise während 3 Stunden eine Bedampfung mit β -Mercaptoaethanol im Vakuum. Auch dabei wird mehrmals das Vakuum durch Einblasen von Stickstoff abgesenkt und jeweils nach 2-3 Minuten wieder erneuert. Zum Abschluß wird etwa 2 Stunden lang intensiv abgesaugt und dann das Trockenpulver weiterverarbeitet.

Beispiel 4

Es soll die Resorbierbarkeit von Flavin-Enzym verbessert werden. Man geht hier von pulverisiertem kristallinen Flavin-Enzym aus und verfährt wie im Beispiel 2 beschrieben.

Verfahren zur Gewinnung von organotropen, bioaktiven Wirkstoffen, insbesondere von Arzneimitteln

DE Nr : 16 17 880 6
vom 06 10 1966

Patentanspruch

Verfahren zur Gewinnung von organotropen, bioaktiven Wirkstoffen, insbesondere von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß die nach bekanntem Verfahren gewonnenen rezeptiven, organotropen Wirkgruppen von Zellmembranen, von Antikörpern und bzw oder von Fermenten nach bekannten Verfahren mit biologisch aktiven Stoffen konjugiert werden

Beschreibung

Die biologische Wirkung, sowohl eines Pharmakons, einer Nukleinsäure, wie auch eines Giftes, läßt sich durch Selektion des Wirkungsortes an Organen, Zellen oder Zellbestandteilen verstärken. Dadurch wird die Belastung des Gesamtorganismus, auch bezüglich von etwaigen Nebenwirkungen, verringert und es läßt sich andererseits eine beträchtlich höhere lokale Konzentration des Wirkstoffes erreichen. Dadurch werden z T ganz neuartige pharmakodynamische Wirkungen ermöglicht. Die meisten biologischen Wirkstoffe besitzen keinen solchen selektiven Organotropismus. Dieser kann jedoch durch Ankopplung an bestimmte Schlepperstoffe, die einen selektiven Tropismus besitzen, erreicht werden. So ist z B bekannt, daß zytotrope bzw organotrope Antikörper als Schlepper für Fluoreszin benützt werden, das chemisch an die entsprechenden Antikörper gebunden wird. In ähnlicher Weise können auch andere biologische Stoffe, wie z B Zellmembranen, Vi-

ruseiweiß und Fermente als Schlepper zu bestimmten Zellen bzw Gewebebestandteilen verwendet werden.

Auch ist es möglich, andere Wirkstoffe als das Fluoreszin mit den Schleppern zu konjugieren und auf diese Weise biologische Wirkungen zu lokalisieren.

Durch die Konjugation von einem Wirkstoff mit einem körperfremden oder auch körpereigenen Schleppermolekül entsteht gewöhnlich ein konjugiertes Antigen, das im Organismus Antikörperbildung auslöst. Diese Antikörper führen dann zu einer Antigen-Antikörperreaktion mit dem Konjugat und blockieren dieses funktionell bzw führen zu dessen Abbau und Beseitigung aus dem Organismus (vgl Science 129, Seite 564/1959). Andererseits wird ein Konjugat aus einem hochmolekularen Trägerstoff und einem niedermolekularen Wirkstoff durch Haut- oder Schleimhäute nicht, bzw schlecht resorbiert und dann entkoppelt oder denaturiert.

Das vorliegende Verfahren überwindet diese Nachteile, die durch Verwendung biologischer, nativer, hochmolekularer Schlepperstoffe entstehen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß für den Tropismus an Organzellen nicht der gesamte hochmolekulare Schlepperstoff verantwortlich ist, sondern gewisse Teile der Moleküle. Diese reaktiven Gruppen, die sich an die Rezeptoren von Zellen binden können, lassen sich durch bekannte Verfahren physikalisch, z B mit Ultraschall (DBP 940 316) wie auch chemisch (DBP 1029 984) durch Hydrolyse oder auch fermentativ in Bruchstücke spalten, deren Tropismus er-

halten bleibt. Solehe relativ niedermolekulare reaktiven Gruppen können nun in gleicher Weise als Schlepper von biologischen Wirkstoffen verwendet werden. Auch können sie selbst nach bekannten Verfahren radioaktiv markiert werden (Patent Nr. 1 209 699), so daß auf diese Weise die Radioaktivität lokal an Zellen angereichert werden kann.

Als Verfahren zur Konjugation mit biologischen Wirkstoffen eignen sich alle Methoden, die auch zur Konjugation von biologisch nativen, nicht frakturierten, organotropen Schlepperstoffen verwendet werden, ebenso auch solche Verfahren, die zur Herstellung von konjugierten Antigenen verwendet werden (vgl. II Schmidt - Fortschritte der Serologie), z. B. die Diazotierung, Behandlung mit Isocyanaten, Umsetzung mit Karbobenzoxy-Verbindungen, das Azid- oder Oxazolon-Verfahren, wie auch die Adsorption an Kolloide.

Die Überprüfung des Organotropismus der Schlepper kann *in vitro* mit den entsprechenden Organbestandteilen erfolgen, an denen dann die Konjugate gebunden werden. Dies ist auch histochemisch durch bekannte Markierungsmethoden mit der Autoradiographie bzw. durch Markierung mit Farbstoffen möglich.

Ausgangsstoffe zur Herstellung der Schleppermoleküle können alle nativen Moleküle mit einem entsprechenden Tropismus dienen, also auch gewisse hochmolekulare Zellbestandteile. Unter biologischen Wirkstoffen sind sowohl Pharmaka, wie auch bioaktive Gewebeextrakte, insbesondere Nucleinsäuren und deren Abbauprodukte, ebenso aber auch Gifte und Toxine zu verstehen. Da das Verfahren eine allgemeine Anwendungsmöglichkeit erschließt, wird in den Beispielen auf detaillierte Angaben verzichtet, zumal die Methoden der Frakturie-

rung von organotropen Molekülen, wie auch der Ankopplung an andere Stoffe bekannt sind.

Beispiel 1

Es soll ein Vitaminpräparat aus Vitamin A (Axerophtholpalmitat) mit selektiver Wirkung auf die Schilddrüse gewonnen werden. Dazu wird dieses Vitamin mit organotropen Fragmenten von Schilddrüsenzellen durch Umsetzung mit Karbobenzoxy-Verbindungen konjugiert. Diese Konjugate können direkt zur Anwendung gelangen oder aber zur Trocknung gebracht werden und unmittelbar vor der Anwendung in einem lipidlöslichen Mittel aufgeschwemmt und gelöst werden. Es ist auch möglich, ein Emulgiermittel, wie z. B. Natrium-Laurylsulfat, zu verwenden und das Konjugat in wäßriger Lösung zu emulgieren.

Beispiel 2

Es sollen für Ganglienzellen des Großhirns vom Menschen spezifische Arzneimittel aus einem Psychopharmakon, einem Lysergsäure-Derivat hergestellt werden. Dazu werden Abwehrfermente nach Abderhalden gegen menschliches Großhirn gewonnen und diese durch tryptische Fermente in organotrope niedermolekulare Fraktionen gespalten. Diese werden nun mit dem Psychopharmakon durch Behandlung mit Isocyanaten konjugiert.

Beispiel 3

Es soll ein gegen Zwischenhirn selektiv gerichtetes Psychopharmakon hergestellt werden. Dazu werden gegen die graue Hirnsubstanz von Zwischenhirnzentren Antikörper gewonnen und nach dem Verfahren des DBP 1029 984 zu organotropen Fragmenten

hydrolysiert. Es wird nun das Psychopharmakon, zusammen mit Nukleotiden aus menschlichem Zwischenhirn, durch Diazotierung mit den Antikörperfragmenten verbunden und nach bekannten Verfahren weiterverarbeitet.

Verfahren zur Konservierung von wäßrigen Lösungen von hochmolekularen Organextrakten

DE Nr : 16 17 878 2
vom 14 09 1966

Patentanspruch

Verfahren zur Konservierung von wäßrigen Lösungen von hochmolekularen Organ-Extrakten, dadurch gekennzeichnet, daß den Lösungen Glycerin oder dieses zusammen mit einer oberflächenaktiven Substanz, wie z B Natrium-Laurylsulfat, zugesetzt wird

Beschreibung

Die Herstellung haltbarer, therapeutisch uneingeschränkt wirksamer wäßriger Lösungen von hochmolekularen Organextrakten zur oralen Anwendung, erfordert den Zusatz eines Konservierungsmittels, weil bei der wiederholten Entnahme aus dem Vorratsgefäß, z B einer Tropfflasche, eine Infektion des Arzneimittels mit Mikroorganismen möglich ist

Die üblichen Konservierungsmittel sind bei den hochverdünnten, homöopathischen Lösungen von hochmolekularen Organextrakten, wie sie z B die Revitorgan-Dilutionen darstellen, nicht brauchbar, da diese im besonderen Enzyme und Eiweißstoffe enthalten, die bezüglich einer Denaturierung äußerst empfindlich sind. Viele herkömmliche Konservierungsmittel beeinflussen auch den Geschmack nachteilig.

Umfangreiche Versuche haben nun gezeigt, daß der Zusatz von Glycerin oder einer Mischung von Glycerin und einer oberflächenaktiven Substanz wie z B Natrium-Laurylsulfat, in der Lage ist, solche wäßrigen Dilutionen ausreichend zu konservieren und das Wachstum von Mikroorganismen zu

verhindern. Bei Verwendung von Glycerin allein muß die Konzentration 10 bis 20% des wäßrigen Lösungsmittels betragen, bei Mitverwendung von Natrium-Laurylsulfat nur 3 bis 10%. Die Konzentrationen von Natrium-Laurylsulfat betragen hier 0,002 bis 0,05%. Es ist zweckmäßig bei der etwaigen Vorverdünnung der Organextrakte in einzelnen Verdünnungsstufen 0,003% Natrium-Laurylsulfat oder geeignete Mengen einer anderen oberflächenaktiven Substanz zuzusetzen, damit die Moleküle nicht an der Wand des Gefäßes adsorbiert werden und zur weiteren Verdünnung zur Verfügung stehen.

Beispiel 1

Es soll eine haltbare wäßrige Lösung aus einem hochmolekularen Leberextrakt hergestellt werden, mit einem Gehalt der Leber von -9

10 g pro ml des Lösungsmittels. Dabei werden Organtrockensubstanzen aus Leber verwendet, die nach dem Verfahren des Patents 1 090 821 mittels der wasserfreien Vakuum-Säuredampf-Hydrolyse aus gefriergetrocknetem Leberpulver hergestellt sind. Die Verdünnung erfolgt in bekannter Weise mit physiologischer Kochsalzlösung unter Zuhilfenahme eines mechanischen Homogenisators über die Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} denen jeweils 0,003% Natrium-Laurylsulfat zugesetzt sind -9

Zur Herstellung der Verdünnungsstufe 10^{-2} wird als wäßrige Phase physiologische Kochsalzlösung verwendet. Der auf die gesamte Flüssigkeitsmenge des fertigen Präparates berechneten Menge werden 0,01% Natrium-Laurylsulfat zugesetzt und nach gutem Um-

schütteln wird der vorverdünnte Organextrakt und nach erneutem Umschütteln 5% der endgültigen Flüssigkeitsmenge des Präparates an Glycerin zugesetzt. Diese Organ-Dilution wird nun in vorher sterilisierte Tropfgläser abgefüllt.

Beispiel 2

Dieses entspricht dem Beispiel 1. Es wird dabei jedoch keine oberflächenaktive Substanz verwendet und nach dem Zusatz des vorverdünnten Organ-Extraktes 15% der Gesamtflüssigkeitsmenge an Glycerin zugesetzt. Um diese Menge wurde vorher die verwendete wäßrige Phase der Lösung verringert.

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln gegen Krebs

DE Nr : 16 17 865 7
vom 12 03 1966

Patentansprüche

1 Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln gegen Krebs, dadurch gekennzeichnet, daß aus der individuellen Krebsgeschwulst eines Patienten und bzw oder deren Metastasen nach bekannten Verfahren der chirurgischen Entnahme, Konservierung und chemischen Aufschließung, Extraktion bzw Isolierung von Antigenen oder über Mittlertiere Antikörperseren zur Behandlung des entsprechenden Patienten gewonnen werden

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die chemische Aufschließung nach dem Verfahren des DBP 1 090 821 mit Hilfe von Dämpfen chemischer Reagenzien im Vakuum erfolgt und Adjuvantien, insbesondere eine kolloidale Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure, zugesetzt werden

Beschreibung

Die experimentelle Krebsforschung beweist die Übertragbarkeit vieler Tumoren durch Überimpfung von einem Individuum auf ein anderes Auch bei Autotransplantation können neue Tumoren entstehen Hierauf beruht ein Vorurteil gegen die therapeutische Anwendung von Tumormaterial Es hat sich aber nun gezeigt, daß am Wachstum und der Ausbreitung eines Tumors eine sich entwickelnde immunologische Toleranz mit Schuld trägt Diese Immuntoleranz kann man durchbrechen, wenn man zunächst lymphatisches Gewebe auf den Krebspatienten überträgt und dann in Art einer

aktiven Immunisierung die körpereigene Geschwulst unter Zusatz eines Adjuvans in geeigneter Dosierung wiederholt reinjiziert Die Verwendung der körpereigenen Geschwulst ist wegen der geschwulst- und damit individualspezifischen Geschwulstantigene erforderlich Diese Behandlung muß über längere Zeitspannen hinweg erfolgen Deshalb ist es notwendig, Geschwülste, die durch chirurgische Eingriffe entfernt oder reseziert werden, zu Dauerpräparaten zu verarbeiten Zur Vermeidung autokatalytischer Vorgänge muß die Konservierung unmittelbar nach der Entnahme erfolgen Es soll möglichst die Ausgangsgeschwulst und ihre Metastasen erfaßt werden, weil in Metastasen zusätzliche Antigenarten auftreten können Bei der Verarbeitung ist es zweckmäßig, durch sehr schonende Hydrolyse die Gewebezellen chemisch aufzuschließen Dadurch wird die Übertragbarkeit der Geschwulst beseitigt und ihre unmittelbare Antigenität verstärkt Hierzu hat sich das Verfahren des Patents 1 090 821 bewährt Bei diesem erfolgt die Aufschließung der aus der Geschwulst hergestellten Trockenpulver mit Hilfe von Dämpfen chemischer Reagenzien im Vakuum bei Normaltemperatur Solche Hydrolysate sind jahrelang haltbar und lassen sich dann in einer Adjuvanslösung jederzeit zur aktiven Immunisierung des Patienten oder über Mittlertiere zur Herstellung eines Antikörperserums verwenden Verständlicherweise übersteigt die Herstellung solcher individueller Präparate den Rahmen der klinischen ärztlichen Tätigkeit und kann nur in Speziallaboratorien erfolgen

Beispiel

Von dem Geschwulstpräparat eines bestimmten Patienten, das durch chirurgische Eingriffe entnommen wurde, wird der nicht zur histologischen Diagnose verwendete Anteil möglichst kurz nach der Entnahme unter sterilen Kautelen in kirschkernegroße Stücke zerschnitten. Diese werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann in Trockeneis (Kohlensäureschnee), das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt ist, zum Versand gebracht. In einem Speziallaboratorium wird das Material erneut in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt, in einer ebenfalls tiefgekühlten Mühle fein pulverisiert, dann gefriergetrocknet und anschließend

im Vakuum bei Zimmertemperatur dem Dampf von konzentrierter Schwefelsäure ausgesetzt. Dieser Schwefelsäuredampf wird auf dem Substrat mehrmals niedergeschlagen durch Verringerung des Vakuums. Zuletzt wird das Vakuum so weit erhöht, daß die nicht zur Reaktion gekommene Schwefelsäure verdampft und abgesaugt werden kann. Das Pulver wird dann unter Luftabschluß in Stickstoffatmosphäre bis zur Benutzung aufbewahrt. Unmittelbar vor der Applikation wird es in einer wäßrigen Adjuvanslösung, einer kolloidalen Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure in geeigneter Konzentration aufgeschwemmt

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln aus Plazenta

DE Nr : 16 17 804 6
vom 09 03 1966

Patentanspruch

Verfahren zur Herstellung von besonderen Arzneimitteln aus dem isolierten maternen und foetalen Anteil von Plazenten, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Plazentaanteile nach bekannten Methoden auf interne Repressoren und Ribonukleinsäuren insbesondere auf stabile Messenger-Ribonukleinsäuren aufgearbeitet werden

Beschreibung

Das Verfahren dient zur Herstellung von besonderen Präparaten aus dem isolierten maternen und foetalen Anteil von menschlichen und tierischen Plazenten. Es beruht auf der Trennung bzw. der Isolierung von internen Repressoren und Ribonukleinsäuren insbesondere den stabilen Messenger-Ribonukleinsäuren der Zellen.

Durch das Patent 1 033 374 ist es bekannt, Präparate aus den isolierten Plazentaanteilen herzustellen, wobei von tierischen Plazenten der maternale und der foetale Anteil und von menschlichen Plazenten der maternale Anteil jeweils für sich nach bekannten Verfahren aufgearbeitet werden, der foetale Anteil der menschlichen Plazenta jedoch mit einer nicht denaturierend wirkenden Lösung von bakterio- und antifoliativ wirkenden Stoffen in unterkühlten verflüssigten Gasen tiefgefroren, vermahlen und dann der Einwirkung von Ultraschall ausgesetzt und gefriergetrocknet wird. Es soll damit der natürliche Antagonismus zwischen den beiden Gewebearten getrennt

nutzbar gemacht werden in Form der sog. Zellular- oder Gewebetherapie bzw. der zytoplasmatischen Therapie. Dies sind jedoch Präparate, die keine eigentlichen Extrakte darstellen.

Es wurde nun gefunden, daß in den Zellen der isolierten Plazentagewebe selbst ein gewisser Antagonismus zwischen zwei Zellbestandteilen besteht, nämlich den internen Repressoren und den stabilen Messenger-Ribonukleinsäuren. Zur weiteren Verbesserung der im Patent 1 033 374 angestrebten biologischen Wirkungen ist die Trennung und weitere isolierte Aufarbeitung dieser beiden Faktoren notwendig. Die Repressoren blockieren die Synthesevorgänge in den Zellen über die Operator-Gene, während die stabilen Messenger-RNS sich dieser Regulationen entziehen und die Synthesevorgänge in Gang halten. Solange also stabile Messenger-RNS in einem Präparat vorhanden sind, können die entsprechenden Synthesevorgänge durch die im gleichen Präparat enthaltenen internen Repressoren nicht unmittelbar gehemmt werden. Erst nach Abbau oder Inaktivierung der stabilen Messenger-RNS gelangen die Repressoren sonst zur Wirkung. Dann unterdrücken sie von sich aus die Bildung neuer Messenger-RNS und damit die Synthesevorgänge. Um eine unmittelbare direkte Wirkung dieser beiden biologischen Wirkstoffe zu erzielen, ist es also notwendig, diese voneinander zu trennen und isoliert aufzuarbeiten, um sie dann getrennt für sich therapeutisch anwenden zu können. Dies ist besonders bei Präparaten aus dem maternalen bzw. dem foetalen Anteil der Plazenta wichtig, weil dort als einzigem Gewebe der Antagonis-

mus in besonderem Maße ausgebildet ist und es bei der therapeutischen Anwendung darauf ankommt, unmittelbar und direkt die gewünschte Wirkung einer Aktivierung oder aber einer Hemmung des Stoffwechsels zu erzielen

Nach der USA-Patentschrift 2 151 697 ist die isolierte Verarbeitung der foetalen Seite menschlicher Plazenten zu einem Extrakt bekannt. Dieser soll aber als Schwangerschaftsdiagnostikum Verwendung finden und hat deshalb wohl ausgesprochen antigene Eigenschaften, die insbesondere den Ribonukleinsäuren nicht zukommen. Es wurden jedenfalls bisher niemals aus den isolierten Plazentaanteilen interne Repressoren und Ribonukleinsäuren isoliert und getrennt für sich weiterverarbeitet.

Die Vorveröffentlichung des Anmelders in "Medizinische Klinik" Nr. 47 vom 19. November 1965, S. 1909 - 1911 über "Krebstherapie mit Decidua-Extrakten auf der Basis neuerer Erkenntnisse der experimentellen Genetik" erfolgte innerhalb der Schutzfrist und befaßt sich mit der Wirkung von internen Repressoren aus Zellen des isolierten maternalen Anteils der Plazenta zur Dauer-Substitution bei Krebskranken. Die isolierten stabilen Messenger-Ribonukleinsäuren insbesondere aus dem foetalen Anteil der Plazenta dienen hingegen der Aktivierung von Proliferationsvorgängen, z. B. bei der Wundheilung nach Verbrennungen und bei schlecht heilenden Gewebsdefekten. Kennzeichnend für das vorliegende Verfahren sind die Ausgangsstoffe, d. h. der getrennte materne und foetale Anteil der Plazenta, aus denen die Trennung von internen Repressoren und Ribonukleinsäuren erfolgt. Als Ausgangsstoffe können dazu sowohl Frischgewebe als auch Trockenextrakte dienen. Die weitere Verarbeitung der internen Repressoren bzw. der Ribonuklein-

säuren aus dem maternalen Anteil der Plazenta und andererseits aus dem foetalen Anteil können ebenfalls nach bekannten Verfahren erfolgen.

Beispiel 1

Es sollen interne Repressoren aus dem maternalen Anteil der Rinder-Plazenta gewonnen werden. Dabei wird der foetale Anteil vom maternalen Anteil getrennt und der materne Anteil mit flüssigem Stickstoff eingefroren, vermahlen und gefriergetrocknet. Das Trockenpulver wird dann später in pH-gepufferter wäßriger Salzlösung unter Zusatz von Laurylnatriumsulfat suspendiert und homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand nach bekannten Methoden der Aussalzung fraktioniert, dann dialysiert. Die internen Repressoren werden als relativ niedermolekulare Histone gewonnen und gefriergetrocknet. Die Isolierung kann auch durch chromatographische Verfahren oder Durchlaufelektrophorese erfolgen.

Beispiel 2

Es sollen Messenger-Ribonukleinsäuren aus dem foetalen Anteil der Plazenta gewonnen werden. Dazu wird der eingefrorene Anteil der Frischplazenta in hypotoner NaCl-Lösung aufgetaut und homogenisiert, dann nach bekannten Methoden hydrolysiert und gradienten-zentrifugiert. Die Ribonukleinsäuren sind nach dem Zentrifugieren bei 100 000 G im Überstand enthalten und werden durch Dialyse, chromatographische Methoden oder Elektrophorese isoliert. Methoden der Isolierung von RNS sind im Biochemischen Taschenbuch von U. M. Rauen im Springer-Verlag beschrieben.

Verfahren zur Trennung von geformten Zellelementen von Körperflüssigkeiten

zusammen mit Kolb, Herbert, Prof Dr med 7000 Stuttgart-Sillenbuch:
Dr Rienmüller Josef, 7000 Stuttgart

DE Nr : 16 17 561 4
vom 21 07 1966

Patentanspruch

Ein Verfahren zur Trennung von geformten Zellelementen von Körperflüssigkeiten nach vorheriger Anreicherung mittels Sedimentation bzw Schwerkrafttrennung und Verwendung der Elektrophorese dadurch gekennzeichnet, daß ein Sieben bzw eine Filtration der Zellen im elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden erfolgt, gegebenenfalls in einem osmotischen Gefälle zwischen der zu trennenden Zellaufschwemmung und der zunächst zellfreien Zellflüssigkeit

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren dient zur Verbesserung der Trennung von geformten Zellelementen von Körperflüssigkeiten insbesondere von Blut, Lymphe, Liquor, Aszites und Transsudaten Bisher war diese Trennung nur unvollkommen möglich Zur Verbesserung der Diagnostik auch von Tumorzellen sowie der Verträglichkeit von Transfusionen von Zellelementen ist jedoch eine möglichst weitgehende Isolierung dieser Zellelemente, z B auch von Erythrozyten, Thrombozyten bzw von Leukozyten erforderlich Bisher erfolgte die Trennung durch mechanische Anreicherung dieser Zellelemente mittels Schwerkraft sowie durch kolloidalosmotische Maßnahmen Das vorliegende Verfahren besteht darin,

daß man aufbauend auf den bisher üblichen Trennungsmethoden eine weitere Auftrennung durch Sieben bzw Filtration innerhalb von Flüssigkeiten im elektrischen Feld durchführt Die benützten Filter sind dabei selektiv durchlässig für die gewünschte Zellart bzw halten diese zurück Die Porengröße dieser Filter liegen für Thrombozyten zwischen 4 und 5 μ und für Leukozyten zwischen 6 und 7 μ

Es war bisher bekannt, daß die Zellelemente im defibrinierten Blut im Plasma oder in Blutersatzlösungen durch den elektrischen Gleichstrom in Richtung der Anode bei unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit bewegt werden Eine vollkommene Trennung der verschiedenen Zellen und Partikel war dadurch jedoch nicht möglich Die Zellelemente sind gegen mechanische und osmotische Einwirkungen sehr empfindlich und lösen sich leicht auf, so daß ein Sieben oder Filtrieren in üblicher Weise unter Anwendung von Druck oder Vakuum von der flüssigen Suspension ins gasförmige Medium nicht möglich ist Zur Filtration oder zum Sieben innerhalb eines flüssigen Mediums reichte das Eigengewicht der Zellelemente nicht aus Eine Trennung durch Zentrifugation unter Einfügung eines Filters oder Sieben führt nicht zum gewünschten Effekt Deshalb wird beim vorliegenden Verfahren durch Einwirkung des elektrischen Feldes durch zellelektrophoretische Wirkung eine Beschleunigung des Siebvorganges und der Selektion erreicht Viskosität und osmotischer Druck der ver-

wendeten Medien können in gewissen Grenzen variiert werden entsprechend dem osmotischen Druck einer 0,5 bis 3%igen NaCl-Lösung. Dabei treten keine Schädigungen der zu isolierenden Zellen auf. Es ist möglich, zusätzlich auch osmotische Druckunterschiede zur Beschleunigung des Filtrationsvorganges mit zu verwenden, indem die Filtration vom höheren zum niedrigeren osmotischen Druck hin erfolgt. Es ist notwendig die Suspension der Zellelemente in geeigneten Medien zu verdünnen. Die angelegte elektrische Spannung und Stromstärke darf nicht zur Lyse der Zellen führen. Weiterhin ist es notwendig, die durch den Stromdurchfluß entstandene Erwärmung durch Kühlung abzuleiten. Die Trennung hat in der optimalen Konservierungstemperatur außerhalb des Körpers von +4 bis +10°C zu erfolgen. Die Durchgängigkeit des Filters muß durch geeignete Vibrations- und Schüttelvorgänge erhalten werden. Das zu verwendende Gefäß besteht aus zwei Kammern, die durch ein Filter voneinander getrennt sind. Beide Kammern enthalten eigene verschließbare Ein- und Ausflußöffnungen und je eine breitflächige Elektrode. Diese liegt parallel zum Sieb bzw. zum Filter. Als Elektroden können alle geeigneten sterilisierbaren Materialien verwendet werden. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, geeignete Halbleiter des Sammelgefäßes etwa 1 - 2 cm unterhalb des Filters und die Elektrode im Aufnahmegefäß für die zu trennenden Zellen an der dem Filter gegenüberliegenden Wand anzubringen. Bei Trennung von Zellelementen und anschließender Transfusion auf den Menschen muß der ganze Vorgang im geschlossenen System durchgeführt werden. Die Ein- und Ausflußöffnungen in jeder Kammer gestatten, einen eigen-

nen Durchfluß der einzelnen Kammer zu ermöglichen.

Der Trennungsvorgang kann so lange kontinuierlich durchgeführt werden, bis eine ausreichende Anzahl von Zellen in einem Eluat durch den Filtrationsvorgang gewonnen wurde. Die Weiterverarbeitung der gewonnenen Zellen erfolgt nach besonderen Methoden.

Beispiel 1

Es sollen Thrombozyten aus Vollblut gewonnen werden. Das nach bekannten Methoden ungerinnbar gemachte Vollblut wird zunächst nach ebenfalls bekannten Methoden vorsichtig zentrifugiert und die Thrombozytenschicht entweder über eine Plasmakonzentration oder über eine Thrombozyten-Mischkonzentration angereichert.

Vor der gewonnenen Thrombozytenanreicherung muß eine Verdünnung mit Serum, physiologischer Kochsalzlösung bzw. isotoner Blutersatzlösung so geschaffen werden, daß pro emm 300 000 Thrombozyten in der Trennungskammer vorhanden sind. In die Aufnahme-kammer wird Blutplasmaserum oder Ringerlösung bzw. isotonische Blutersatzlösung gefüllt. Die Trennungskammer wird mit der angereicherten Thrombozytenlösung gefüllt. Die Porengröße des trennenden Filters aus Kunststoff oder Glas beträgt 5µ. Während des Füllvorganges steht die Trennapparatur senkrecht. Im Depotgefäß erfolgt ein fortlaufender Zufluß; dieser wird durch das elektrische Feld geleitet und auf der gegenüberliegenden Seite der Trennapparatur im geschlossenen System herausgeführt. Es wird nun ein Gleichstrom von 20 V bei 1 mA zwischen den beiden Elektroden gelegt, wobei die Elektrode in der Kammer der zunächst zellfreien Flüssigkeit als Anode dient. Gleichzeitig kann das Trenngefäß im oben

beschriebenen Kühlsystem vorsichtig geschüttelt werden

Nach Erreichen der erwünschten Zellkonzentration im Eluat wird der Strom ausgeschaltet und die gewonnenen Thrombozyten der weiteren Verwendung zugeführt

Beispiel 2

Es sollen angereicherte Leukozyten aus der restlichen Mischung von den Erythrozyten abgetrennt werden. Dabei wird eine entsprechende Apparatur wie in Beispiel 1 verwendet, jedoch mit einem Filter mit einer Porengröße von 7 μ

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Beeinflussung der Funktion spezieller Organe

DE Nr : 14 92 190 5
vom 27 06 1964

Patentanspruch

Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Beeinflussung der Funktion spezieller Organe, wobei nicht antigen wirkende Hormone mit nativen Extrakten oder Homogenisaten aus den die Hormone bildenden Organen zu Antigenen komplettiert werden nach Patent 1 040 748 dadurch gekennzeichnet, daß makromolekulare, organspezifische, organotrope Zellbestandteile aus Organgeweben als organotrope Schleppersubstanzen für nicht organspezifisch wirksame Arzneimittel benutzt werden

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren dient zur Herstellung von Arzneimitteln zur selektiven Beeinflussung spezieller Organe. Es ist eine weitere Ausgestaltung des obigen Patents wobei nicht antigen wirkende Hormone in nativen Extrakten oder Homogenisaten aus den die Hormone bildenden Organen zu Antigenen komplettiert werden. Dabei wurde die Organspezifität bestimmter makromolekularer Zellbestandteile dazu benutzt, Hormonen eine organspezifische Wirkung auf die entsprechenden Drüsenorgane aufzuprägen.

Es hat sich nun gezeigt, daß es möglich ist, den Organotropismus makromolekularer Organ-Extrakte auch aus Nichtdrüsenorganen für organspezifische Schlepperfunktionen bei anderen Arzneimitteln auszunützen um Medikamente an und in bestimmte Organ-

zellen zu bringen. Auch dabei wird zwischen den organspezifischen Makromolekülen und dem bzw. den nicht antigenen Arzneimitteln eine kovalente Verbindung geschaffen. Durch die adsorptive Fähigkeit von Eiweißkörpern ist diese Komplexbildung, die einer Haptenaktivierung der Arzneimittel gleichkommt, schon durch einfache Anlagerung möglich. Sonst können hierzu auch alle bekannten Verfahren angewandt werden, die zu einer festeren Bindung der einzelnen Komponente führen, wie z. B. Diazotierung, Behandlung mit Isozyanaten, Umsetzung mit Karbobenzoxo-Verbindungen, das Azid- oder Oxazolony-Verfahren, ebenso gemeinsame Anlagerung an adsorptiv wirkende Kolloide. Als Arzneimittel kommen alle Stoffe in Betracht, die es erlauben, in den Zellstoffwechsel einzugreifen, z. B. Hormone, Hormonabkömmlinge und hormonähnliche Substanzen, Vitamine, Fermente, Nukleinsäuren und deren Abbauprodukte, Glykoside, Antibiotika, Zytostatika und andere chemische Wirkstoffe. Diese können einzeln oder auch in Kombinationen mit den organotropen Substanzen von einem oder mehreren Organen vereint werden. Auch bei diesem Verfahren handelt es sich um kein einfaches Zusammenmischen verschiedener Stoffe, vielmehr entsteht durch die Verbindung der genannten Stoffe ein Produkt, dessen Wirkung über diejenige der Teilkomponenten hinausgeht und eine neue biologische Wirkung ermöglicht. Am besten verständlich wird dies bei der Anwendung von Zytostatika oder Chemotherapeutika, die aufgrund ihrer Nebenwirkungen oft nicht entsprechend wirksam dosiert werden können.

und nun durch dieses Verfahren am Ort der gewünschten Wirkung sich konzentrieren lassen. Die Belastung für den Gesamtorganismus wird dabei wesentlich geringer bei gleichzeitiger Steigerung des lokalen Effekts.

Beispiel 1

Es sollen Arzneimittel zur Verbesserung der Entwicklung und Funktion des Gehirns gewonnen werden. Hierzu verwendet man je 10 mg makromolekularer Trockenextrakte in Form von Trockenpulvern aus Großhirn und Zwischenhirn des Menschen sowie aus dem mütterlichen Anteil der Hinderplazenta, die nach dem Verfahren des Patents 1 090 821 aufgeschlossen sind. Man suspendiert und homogenisiert diese in einer Mischung von 0,01 g Ribonukleinsäure aus menschlichen Gehirnen, 0,2 g Ephedrin-Hydrochlorid in 2 ccm Lösungsmittel, 0,2 g Vitamin E emulgiert in 2 ml, 0,4 g des Acetats von L-Methylandrostenolon in 2 ml Lösungsmittel und 0,2 g Trijodthyronin-Hydrochlorid in 2 ml Lösungsmittel. Zur Komplexbildung läßt man das Homogenat 3-4 Stunden bei Zimmertemperatur ruhen und gibt dann 2 ml einer 0,0005%igen Laurylnatriumsulfatlösung zu. Nun werden zu je 1 l Ringerlösung 2 ml dieses Präparates zugesetzt und ggf. daraus weitere Verdünnungen hergestellt.

Beispiel 2

Es sollen herzwirksame Präparate hergestellt werden, die gleichzeitig die Stoffwechselleistungen von Leber und Nieren verbessern. Hierzu benutzt man makromolekulare Extrakte aus Herz, Leber, Nieren von Schweineorganen in derselben Weise wie in Beispiel 1, homogenisiert und in-

kubiert diese mit einer Mischung von 0,0025 g Digitoxin, 20 mg Prednisolon-21-acetat und 0,4 g des Acetats von 1-Methyl-Androstenolon in 10 ml Ringerlösung. Danach werden daraus Verdünnungen hergestellt und diese vor der Abfüllung in Ampullen mittels einer Glasfritte filtriert.

Beispiel 3

Es sollen Präparate gegen Erkrankungen von Muskeln und Gelenken hergestellt werden. Dabei geht man von einem Homogenat aus schlachtfrischen Gelenken und der Wirbelsäule von jungen Rinderfoeten aus, inkubiert davon 20 ccm mit 0,8 g des Acetats von 1-Methyl-A¹-androstenolon, 0,2 g Prednisolon-21-acetat, 1,0 Novocain. Auch daraus stellt man Verdünnungen her, die man vor dem Abfüllen in Ampullen von etwaigen korpuskulären Beimengungen filtriert.

Beispiel 4

Es sollen Präparate zur Behandlung eines Magenkarzinoms hergestellt werden. Dabei benutzt man je 5,0 g makromolekulare Extrakte aus dem mütterlichen Anteil von Rinderplazenta, sowie aus einer Mischung von Magenschleimhaut vom Menschen und Schwein, homogenisiert und inkubiert diese mit 20 g Cyclophosphamid in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung und setzt davon 50 ml zu je 1 ml Ringerlösung unter Verwendung eines Schüttlers zu.

Beispiel 5

Es sollen Präparate gegen Lungentuberkulose hergestellt werden. Dazu werden makromolekulare, organotrope Substanzen aus foetaler Rinderlunge mit Isonicotinsäure-hydrasid inkubiert und entsprechend den anderen Bei-

Verfahren zum gesteuerten Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben

Zusatz zum Patent: 1 090 821

Dli Nr : 1 209 699
vom 16 11 1961

Patentanspruch

Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben mit Hilfe von Dämpfen chemischer Reagenzien im Vakuum, nach Patent 1 090 821, dadurch gekennzeichnet, daß man Reagenzien verwendet, die radioaktive Isotope enthalten

In Betracht gezogene Druckschriften:
Deutsche Auslegeschrift Nr 1 090 821

Beschreibung

Bei dem Verfahren nach Patent 1 090 821 bewirkt man den chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben für therapeutische Zwecke unter Verwendung chemischer Reagenzien dadurch, daß man die pulverförmigen Substrate mit dem den Aufschluß bewirkenden Reagens, dessen Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, vorzugsweise konzentrierte Schwefelsäure, Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin, in einem abgeschlossenen System zusammen oder getrennt voneinander einem solchen Vakuum aussetzt, welches die Überführung des aufschließenden Mittels in die dampfförmige Phase ermöglicht und, nachdem die gewünschte Beeinflussung des Substrates erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagens wieder entfernt. Dieses Verfahren bewirkt eine Kondensation und Salzbildung des verwendeten Reagens mit den Molekülen

des Substrates. Gleichzeitig erfolgen aber auch andere chemische Reaktionen zwischen dem verwendeten Reagens und dem Substrat, z B bei Verwendung von konzentrierter Schwefelsäure der Einbau von SO^{H} -Gruppen in die Moleküle des Substrates. Dies konnte nachgewiesen werden, indem man konzentrierte Schwefelsäure mit radioaktivem S-Isotop als Reagens verwendete. Man erhielt Verfahrensprodukte, aus denen mit Wasser keine Schwefelsäure mehr auswaschbar war. Die Versuche wurden mit *Salmonella typhi*, deren Antigenen und Antikörpern durchgeführt. Nach 3tägiger Bedampfung der gefriergetrockneten Substrate im Vakuum mit gasförmiger H_2SO_4 - 35g war in Agglutinationstests praktisch keine Veränderung der Antigene oder Antikörper nachweisbar. Das Verfahren nach dem Hauptpatent eignet sich also zur radioaktiven Markierung von organischen Stoffen und biologischen Geweben, wenn man Reagenzien verwendet, die nach bekannten Verfahren radioaktive Atome enthalten, z B radioaktive S-Isotope in konzentrierter Schwefelsäure. Das bedeutet eine beträchtliche Verbesserung und Vereinfachung gegenüber den bisherigen Methoden der Radioaktivierung von organischen Stoffen und biologischen Geweben, zumal hier auch beträchtlich höhere Strahlungsintensitäten übertragen werden können. Die so gewonnenen radioaktiv markierten organischen Stoffe und biologischen Gewebe können in der Medizin diagnostisch und therapeutisch verwendet werden.

Beispiel

Gefriergetrocknete Antikörperglobuline sollen radioaktiv markiert werden. Das Trockenpulver wird verteilt auf einer Petrischale in einer Schichtdicke von 0,1 cm und in einen Exsikkator gebracht, der wahlweise mit einem Kältekondensator über ein Pumpensystem für Hochvakuum, gleichzeitig aber auch mit einem kommunizierenden Vakuumgefäß in Verbindung steht, das durch ein Ventil sich von dem Hauptexsikkator absperrbar läßt.

Es wird nun zunächst in das kommunizierende Vakuumgefäß konzentrierte Schwefelsäure, die radioaktiv am S-Atom markiert ist, bei Zimmertemperatur eingefüllt und das Verbindungsventil zum Exsikkator abgesperrt. Um eine etwaige Restfeuchtigkeit durch hygroskopische Wirkung des Trockenpulvers zu beseitigen, wird man zunächst mit Hilfe des Kältekondensators, der mit Aceton-Kohlensäure-Schnee unterkühlt wird, Wasser aus dem Gewebepulver sublimiert und anschließend unter Abschaltung dieses Kondensators mit Hilfe eines Hochvakuumaggregates so lange abgesaugt,

-4

bis der Druck im Exsikkator 10 Torr erreicht. Danach wird das Ventil zu dem kommunizierenden Gefäß geöffnet, so daß

nun Schwefelsäure in dampfförmigem Zustand in den Exsikkator eindringen kann. Das Vakuum fällt jetzt auf den Dampfdruck der Schwefelsäure ab. Nun wird die Verbindung zum Rezipienten der Säure unterbrochen, vorher aber die kommunizierenden Rezipienten von dem Pumpenaggregat getrennt. Durch Einblasen von Stickstoff in den Exsikkator wird das Vakuum über dem Leberpulver nun geringgradig weiterverschlechtert. Dadurch kondensiert der Schwefelsäuredampf der Leber. Nach einer gewissen Einwirkungszeit wird die Verbindung zum Pumpensystem und zum Rezipienten für die Säure wieder geöffnet und nach Erreichen des Dampfdruckes der Schwefelsäure der Vorgang zweimal wiederholt. Zum Schluß wird dann die Verbindung zwischen den beiden kommunizierenden Gefäßen nicht wiederhergestellt, sondern lediglich zwischen Exsikkator und dem Pumpensystem. Es wird nun so lange abgepumpt, bis alle Schwefelsäure aus dem Exsikkator entfernt ist, die nicht chemisch zur Reaktion gekommen ist. Auf diese Weise kann auch die Wasserstoffionenkonzentration des Trockenpulvers aus Leber auf der sauren Seite beliebig verändert werden. Je intensiver und länger die Absaugung erfolgt, um so mehr wird das pH neutral.

Verfahren zur Gewinnung von Antigenen und Haptenen

Zusatz zum Patent 1 040 748

DE Nr : 1 126 068

vom 15 03 1958

Patentansprüche

1 Verfahren zur Gewinnung von Antigenen oder Haptenen nach Patent 1040 748, dadurch gekennzeichnet, daß man von anderen biologischen Substraten, auch von Mikroorganismen oder Viren oder von Extrakten ausgeht und diese mit Antikörperseren versetzt, welche gegen die zu eliminierenden Bestandteile des biologischen Substrates gerichtet sind

2 Verfahren zur Gewinnung von Antigenen oder Haptenen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man mit den gewonnenen Antigenen wiederum Antikörper gewinnt unter Verwendung von Lebewesen, die mit denen artgleich sind, aus welchen die ersten Antikörperseren gewonnen waren, und mit diesen Antikörperseren in an sich bekannter Weise die Antigene von ihren Beimischungen abtrennt

3 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die im Agglutinat bzw Präzipitat enthaltenen Antigene in an sich bekannter Weise isoliert und damit gewonnene Antikörper zur Gewinnung von Antigenen mittels des Verfahrens nach dem Hauptanspruch einsetzt

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren bringt eine weitere Ausbildung des Verfahrens nach Patent 1 040 748, bei dem man schonend homogenisiertes Organgewebe im wäßrigen Milieu mit in bekannter Weise gewonnenem antimesen-

chymalem und bzw oder antineuralem Antikörperserum versetzt, das entstehende Agglutinat bzw Präzipitat durch Zentrifugieren entfernt, die überstehende Flüssigkeit -im Hauptpatent nicht ganz treffend als Emulsion bezeichnet - gegebenenfalls nach Zusatz der entsprechenden Abwehrfermente bei 37°C bebrütet, anschließend durch Dialyse von niedermolekularen Beimengungen befreit und gefriergetrocknet

Das Verfahren nach dem Hauptpatent zielt darauf ab, aus dem Gemisch von organspezifischen und unspezifischen Antigenen und Haptenen, welches in einem Organ- gewebe vorliegt, die organspezifischen Fraktionen zu isolieren Dabei werden die unspezifischen Antigene mit Hilfe entsprechender Antikörper agglutiniert bzw präzipitiert und abzentrifugiert, während die organspezifischen Fraktionen in Lösung bleiben

Es wurde nun gefunden, daß das Prinzip der Hauptanmeldung ganz allgemein angewendet werden kann, um aus biologischen Substraten aller Art die darin enthaltenen spezifischen Antigene bzw Haptene von unspezifischen Antigenen zu trennen Unter biologischen Substraten werden dabei neben allgemein vom Normalen abweichenden Zellstrukturen insbesondere auch Mikroorganismen, Viren sowie Stoffe aus dem Pflanzenreich oder Homogenisate oder Extrakte verstanden Stets handelt es sich um Substrate, die neben anderwärts vorkommenden Antigenen für das betreffende

Substrat spezifische Antigene bzw Hap-
tene enthalten, und stets werden die Sub-
strate mit Antikörperseren versetzt, welche
gegen die unspezifischen, anderwärts auch
vorkommenden Antigene des in Rede ste-
henden Substrates gerichtet sind

Diese Antikörperseren agglutinieren bzw
präzipitieren die unspezifischen Antigene
des behandelten Substrates, und in der
nach dem Zentrifugieren überstehenden
Flüssigkeit verbleiben die spezifischen An-
tigene Diese sind noch vergesellschaftet
mit Serumbestandteilen, welche bei aktiver
Immunisierung der für die Gewinnung der
anfänglich eingesetzten Antikörperseren
benutzten Tierart keine Antikörper bilden
In weiterer Ausbildung des Verfahrens
nach der Erfindung werden nun durch Im-
munisierung der gleichen Tierart gegen
die spezifischen Antigene gerichtete Anti-
körperseren gewonnen und diese dem in
Rede stehenden biologischen Substrat
zugemischt Aus dem jetzt entstehenden
Agglutinat bzw Präzipitat werden dann
die spezifischen Antigene in üblicher Weise
in reiner Form isoliert

Wie schließlich weiter gefunden wurde, kann
man zur Isolierung solcher spezifischer An-
tigene auch zunächst das abzentrifugierte
Agglutinat bzw Präzipitat der unspezi-
fischen Antigene, wie es in der ersten Ge-
winnungsphase anfällt, in an sich bekann-
ter Weise spalten, mit dem freien Gemisch
unspezifischer Antigene über die gleiche
Tierart erneut ein Antikörperserum gewin-
nen und dieses reinere, nur unspezifische
Antikörper enthaltende Serum mit neuen
Anteilen des biologischen Ausgangssubstra-
tes versetzen

Die Antikörper können auch zunächst an
geeignete Adsorbenzien angelagert und
dann mit dem Stoffgemisch, aus dem un-
spezifische Substanzen eliminiert werden,

in Kontakt gebracht werden

Nach Anlagerung der Antikörper können
dann zunächst die im Serum enthaltenen
Hegleitstoffe, wie z H Albumin u a ,
ausgewaschen und beseitigt und erst dann
das aufzuarbeitende Stoffgemisch zugesetzt
werden Für diese Art der Isolierung
eignen sich insbesondere auch Verfahren,
wie sie in der Chromatographie und bei
der Elektrophorese bekannt sind Als Ad-
sorbenzien können alle dafür geeigneten
Stoffe, wie z B Aluminiumhydroxid Kaolin,
Silicagel, Kohle, Zellstoff u dgl benutzt
werden Die Aufspaltung des Stoffgemisches
kann auch in der Art eines Durchlaufver-
fahrens erfolgen, wobei Teile der Extrakte
von den jeweiligen Antikörpern abgefangen
und zurückgehalten werden Eine Elution
der an die Adsorbenzien gebundenen Antigen-
Hapten-Antikörper-Komplexe ist nach be-
kannten Verfahren möglich, ebenso die wei-
tere Aufspaltung und Isolierung sowohl
der Antikörper als auch der antigenen und
haptischen Bestandteile

Die optimalen Verhältnisse sind bekanntlich
für die verschiedenen Antigen-Antikörper-
reaktionen unterschiedlich, so daß diese für
jedes System durch Vorversuche speziell
bestimmt werden müssen Insbesondere sind
Temperatur, pH, Ionenmilieu und Bebrütungs-
zeit durch Vorversuche zu bestimmen Unter
Umständen vergrößert Alkoholzusatz nach
eingetretener Antigen-Antikörper-Reaktion
die Menge des als Sediment zu erfassenden
Antigen-Antikörper-Komplexes Trotzdem
sollte eine mengenmäßige Abstimmung der
Antikörperkonzentration und des Antigen-
gemisches erfolgen Bei einer im Verhältnis
zur Menge der Antikörper zu großen Menge
von Antigen besteht die Gefahr, daß sich
kein oder zu wenig Sediment bildet
Unspezifische Agglutinations- und Präzipi-
tationsreaktionen sind ebenso wie auch die

Konglutination durch Berücksichtigung der diesbezüglichen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu vermeiden. Es eignet sich dazu z. B. der Zusatz von 5%iger Glukosaminlösung, von 2%iger Bernsteinsäure, von Lecithin oder von oberflächenaktiven Substanzen. Diesbezüglich ist auch die Konzentration von Salzen und das Ionenmilieu von Bedeutung. Bei verschiedenen Systemen ist die Flockungsgeschwindigkeit um 45 bis 50°C bei einem NaCl-Gehalt von 0,1 n optimal. Andere Reaktionen sind dann wiederum bei Temperaturen wenig über 0 oder bei 30°C durchzuführen. Auch bei vorliegendem Verfahren können Abwehrfermente zur weiteren Reinigung der Antigene verwendet werden. Zum Herauslösen der so gewonnenen Fraktion aus dem aufzuarbeitendem Substrat lassen sich dann alle bekannten Verfahren zusätzlich anwenden, wie z. B. Dialyse, Fällungsmethoden, Elektrophorese, Chromatographie, Adsorptionsmethoden im Ionenaustauschern. Die erfindungsgemäß gewonnenen Antigene bzw. Haptene werden zur serologischen Bestimmung von Antikörpern bei Krankheiten für diagnostische Zwecke verwendet. Sie können auch therapeutisch angewendet werden.

Beispiel 1

Zur Isolierung von ubiquitären Bestandteilen aus Organzellen, die in allen Zellarten des Menschen vorkommen, und zur Isolierung der für mesenchymale Gewebe spezifischen Antigene und Haptene wird nach bekannten Methoden zunächst durch aktive Immunisierung von Kaninchen ein hochtitriges Antikörperserum gegen Leberparenchymzellen sowie Abwehrfermente gegen diese Zellen gewonnen. Mit diesem Antikörperserum wird ein verdünntes Homoge-

nat oder ein Extrakt aus mesenchymalen Geweben der Milz des Menschen zusammengebracht und das entstehende Präzipitat bzw. Agglutinat durch Zentrifugieren abgetrennt. In dem Antigen-Antikörper-Komplex sind die ubiquitären, in allen Körperzellen enthaltenen Antigene enthalten. Diese können dann nach bekannten Verfahren gewonnen und weiterverarbeitet werden, ebenso lassen sich durch Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes die Antikörper zurückgewinnen und erneut verwenden. Die aus der Zentrifuge kommende überstehende Flüssigkeit wird fermentativ durch Zusatz von entsprechenden Abwehrfermenten gereinigt und danach durch Dialyse und Elektrophorese von unerwünschten Bestandteilen getrennt. In ihm sind die spezifisch mesenchymalen Gewebsbestandteile enthalten sowie die Antikörperfraktionen, die gegen die spezifischen parenchymatösen Gewebestandteile gerichtet waren. Letztere können durch spezifische Antigene von Leberzellen entfernt werden, ebenfalls aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit den spezifischen Mesenchymbestandteilen werden nun durch aktive Immunisierung von Kaninchen spezifische Antikörper und Abwehrfermente gewonnen. Diese können dann bei erneuten Herstellungsvorgängen Verwendung finden. Die für mesenchymales Gewebe spezifische Fraktion läßt sich aus dem Antigen-Antikörper-Komplex in gleicher Weise eluieren. Im Rückstand ist hier dann keine fremde Antikörperfraktion enthalten. Die isolierten Zellbestandteile werden nach bekannten Verfahren konserviert bzw. gefriergetrocknet, ebenso die zurückgewonnenen Antikörperfraktionen.

Beispiel 2

Aus pathologischen Geweben eines Leberkrebses sollen die Bestandteile isoliert wer-

die spezifisch für diese Krebsart sind. Hierzu wird ein hochkonzentriertes Serum sowie Abwehrfermente gegen gesunde Leberzellen gewonnen und das Antikörperserum mit einem verdünnten Homogenat oder einem Extrakt der Geschwulstzellen zusammengebracht. Das sich bildende Sediment enthält die Gewebebestandteile, die auch beim gesunden Gewebe vorkommen. Im Rückstand sind hingegen die für die Krebsgeschwulst spezifischen Bestandteile enthalten. Sowohl das Sediment als auch die überstehende Flüssigkeit werden von Begleitstoffen gereinigt und die antigenen Bestandteile daraus isoliert. Mit den aus der Flüssigkeit gewonnenen Antigenen lassen sich dann spezifische Antikörperseren und Abwehrfermente herstellen, die es wiederum erlauben, in umgekehrter Richtung die krebspezifischen Fraktionen mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion zu gewinnen. Andererseits kann aus diesen krebspezifischen Seren und Abwehrfermenten ein ubiquitär bei allen Krebsarten einer bestimmten Spezies vorhandenes krebspezifisches Agens isoliert werden. Zum Beispiel wird ein Homogenat bzw. Extrakt aus den für den Leberkrebs spezifischen Zellbestandteilen mit einem Antikörperserum sowie mit Abwehrfermenten behandelt, die gegen Magenkrebs spezifisch gerichtet sind. Sofern eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet, sind in dem Antigen-Antikörper-Komplex dann die Gewebeelemente enthalten, die sowohl im Leberkrebs wie im Magenkrebs vorkommen.

Beispiel 3

In ähnlicher Weise können allgemein die vom Normalen abweichenden Zellstrukturen isoliert und mit ihrer Hilfe spezifische Antikörperseren und Abwehrfermente hergestellt werden, so z. B. die nach überstan-

dener Virusinfektion in den Zellen verbliebenen Virusteilchen oder in den Zellen abgelagerten Stoffwechselschlacken. Auch hier hat man von Homogenaten oder Extrakten der anormalen Zellen und spezifischen Antikörperseren und Abwehrfermenten auszugehen, die gegen gleichartige, jedoch gesunde bzw. normale Zellen gerichtet sind.

Beispiel 4

Durch ein analoges Vorgehen können auch gruppenspezifische und für einzelne Stämme kennzeichnende Bestandteile von Miki'oorganismen getrennt werden. Zum Beispiel werden die für Salmonellen spezifischen Antigene und Haptene aus einem Homogenat oder Extrakt von Salmonellen durch spezifische Antikörperseren und Abwehrfermente, die gegen Kolibazillen, Pneumokokkenstämme und/oder Pseudotuberkulosebazillen gerichtet sind, gewonnen. Späterhin wird ein spezifisch gegen Salmonellen-Antigene gerichtetes Serum bzw. entsprechende Abwehrfermente hergestellt, die es erlauben, die für Salmonellen spezifischen Partialantigene aus dem Produkt der Antigen-Antikörper-Reaktion zu isolieren.

In analoger Weise können unter Verwendung von isolierten Antigenen spezielle Seren hergestellt werden, die eine Differenzierung von Bakterienstämmen erlauben. Ebenso lassen sich nach diesem Verfahren auch Virusstämme und Virusarten unterscheiden. Bei der Herstellung der Seren und der spezifischen Abwehrfermente werden zweckmäßigerweise Adjuvantien bzw. Stoffe zum Antigen zugesetzt, die es erlauben, haptene Bestandteile zum Vollantigen zu komplettieren, wie z. B. eine kolloidale Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure oder das Freund'sche Adjuvans u. a. Auch ist OK mwtltoVi Ho/n "W

anzuwenden, wie z B die vorherige Diazo-
tierung durch die Diazoniumverbindungen
hergestellt werden, die Behandlung mit
Isozyanaten, die Umsetzung mit Karbo-
benzoxyVerbindungen, das Curtiusche

Azidverfahren, das Oxazonverfahren
von Lettre u dgl Auf diese Weise lassen
sich dann bezüglich der Gewebeart homo-
loge als auch heterologe Seren nach bekann-
ten Methoden gewinnen

Verfahren zur Gewinnung organspezifischer Fraktionen aus Organgeweben

DE Nr : 1 040 748
vom 20 05 1957

Patentansprüche

1 Verfahren zur Gewinnung organspezifischer Fraktionen aus Organgeweben, dadurch gekennzeichnet, daß man schonend homogenisiertes Organgewebe im wäßrigen Milieu mit in bekannter Weise gewonnenen antimesenchymalem und bzw oder anti-neuralem Antikörperserum versetzt, das entstehende Agglutinat bzw Präzipitat durch Zentrifugieren entfernt, die entstehende Emulsion, gegebenenfalls nach Zusatz der entsprechenden Abwehrfermente, bei 37°C bebrütet, anschließend dialysiert und gefriertrocknet

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß den Organhomogenaten dialysierbare Schutzkolloide bzw Emulgatoren zugesetzt werden

Beschreibung

Das Verfahren dient zur Gewinnung organspezifischer Fraktionen aus Organgeweben Als Ausgangsstoff kann jedes Organgewebe, insbesondere auch pathologisches Gewebe, Verwendung finden Die daraus isolierten Stoffe lassen sich zur gezielten Organbehandlung verwenden, ebenso auch als Antigen oder Substrat zu diagnostischen Zwecken, insbesondere zu serologischen Reaktionen auf zytotoxische Antikörper oder zur Abwehrfermentreaktion Aus der Literatur geht hervor, daß die Spezifität einer diagnostischen Reaktion von der Spezifität des verwendeten Antigens bzw Substrats abhängt Eine Methode, die es erlaubt, diese Spezifität

zu erhöhen, muß deshalb die damit angestellten Reaktionen verbessern Diese allgemeingültige These trifft auch für die Abwehrfermentreaktion zu In jeder Organart sind nicht nur Zellen enthalten, die die besondere Funktion des Organs ermöglichen, sondern ebenso Zellarten, die in jedem Gewebe und in jedem Organ vorkommen können, wie z B bindegewebiges Stütz- und Füllgewebe, Lymph- und Blutgefäße, Nerven und dgl Bei der Gewinnung von Organsubstraten für die Abwehrfermentreaktion nach Abderhalten werden diese Zellbestandteile soweit wie möglich aus den vorzerkleinerten und gekochten Gewebepartikeln mit der Pinzette ausgezupft, doch gelingt dies niemals so vollkommen, wie es wünschenswert wäre Aber auch die organspezifischen Zellen enthalten ubiquitäre Zellbestandteile, die in allen Zellarten ebenfalls vorkommen und den vegetativen Aufgaben zur Erhaltung des Lebens und der Vermehrung, wie z B der Energiegewinnung, der Atmung und dem intrazellulären Stoffwechsel, dienen Diese funktionsunspezifischen Zellbestandteile konnten bisher nicht von den spezifischen abgetrennt werden Dies ist jedoch wichtig, weil nur ein kleiner Teil der Zellbestandteile für die organspezifischen Funktionen verantwortlich ist

Das Verfahren, mit dem diese Abtrennung möglich wird, hat gewisse Ähnlichkeiten mit demjenigen, das zur Isolierung von bestimmten Antikörperfraktionen aus Antikörperseren verwendet wird

Zum Beispiel wird dort aus einem Antikörperserum, das gegen verschiedene Mikroorganismen gerichtet sein kann, aufgrund

einer Überkreuzreaktion eine Digerierung erreicht. Auf diese Weise kann man ein spezifisch gegen Streptokokken-Antigene gerichtetes Serum zunächst mit Staphylokokken zusammenbringen. Dabei reagieren aufgrund einer Antigen-Antikörperreaktion alle Antikörper, die auch in Staphylokokken enthalten sind, mit diesen Bakterien und bilden ein Agglutinat oder Präzipitat, das abgeschleudert und beseitigt werden kann. Im Überstand des Serums sind dann nur die spezifisch gegen Streptokokken gerichteten Antikörperfraktionen enthalten, nicht aber solche, die sich auch gegen Staphylokokken richten.

Bei dem Verfahren handelt es sich jedoch darum, die unspezifischen Faktoren aus einer Organsubstanz zu beseitigen. Dies geschieht hier in umgekehrter Weise mit einem spezifisch auf die unerwünschten Fraktionen des Organhomogenates gerichteten Serum, das also sowohl gegen die unerwünschten Zellarten als auch gegen die ubiquitären Zellbestandteile gerichtet ist. Da diese ubiquitären Zellbestandteile auch in den unerwünschten Begleitzellen enthalten sind, genügt es also, ein Serum zu verwenden, das spezifisch auf diese Zellarten gerichtet ist. Man benutzt also ein Serum gegen Gefäß- und Bindegewebe sowie Nervengewebe, wenn man organspezifische Stoffe isolieren will. Will man jedoch die für das Nervengewebe spezifischen Stoffe isolieren, darf man diese selbstverständlich nicht zur Gewinnung des Serums mitverwenden. Man bringt also hier eine möglichst feine Aufschwemmung bzw. Lösung des zu bearbeitenden Organhomogenates mit einem antimesenchymalen Serum zusammen und beseitigt das sich bildende Agglutinat bzw. Präzipitat durch Schwerkrafttrennung. Voraussetzung dazu ist eine möglichst feine Homogenisierung des Gewebes, die so weit

gehen sollte, daß auch die Bestandteile des strukturierten Protoplasmas (Zellkerne, Mitochondrien) mechanisch aufgeschlossen sind. Zum Schutz gegen eine spontane Sedimentation ist dem Organhomogenat ein Schutzkolloid oder ein Kmulgator zuzusetzen (Agar-Agar, Zelluloseester, Fructose u. dgl.), die selbst nicht an der Reaktion teilnehmen und später möglichst wieder durch Dialyse gegen Aqua dest. beseitigt werden können. In dem verwendeten antimesenchymalen Serum sind aber auch Abwehrfermente enthalten, die in der Lage sind, selektiv die organunspezifischen Fraktionen des Homogenates abzubauen. Man kann diese Methode deshalb zusätzlich oder allein benutzen und sie beträchtlich verstärken durch Zusatz des Acetonharnniederschlags der Antikörperbildner, von denen man durch wiederholte Immunisierung das antimesenchymale Serum gewonnen hat. Durch Ausschütteln des Harnes in Aceton sind die Abwehrfermente in diesem angereichert enthalten. Die Einheitlichkeit des Verfahrens an der Digerierung mit Antikörpern und einer solchen durch fermentativen Abbau mit Abwehrfermenten ist gewährleistet, weil es sich bei den verwendeten Antikörpern und Abwehrfermenten um Stoffe aus denselben Körperflüssigkeiten von besonders vorbehandelten Individuen handelt und weil eine gleichzeitige Einwirkung dieser Stoffe, ganz abgesehen von einer kombinierten Anwendung, möglich ist.

Man kann aber auch allein durch Abwehrfermente die unerwünschten unspezifischen Organbestandteile beseitigen, indem man sie durch die Fermentwirkung bis zu dialysablen Stoffen abbaut und dann durch Dialyse beseitigt. Das Gemisch aus Antikörperserum und Organhomogenat kann aber nur nach einer zeitlich ausreichenden Einwirkung der Abwehrfermente von solchen Abbauprodukten dialysiert werden. Für die Digerie-

rung durch Antikörper darf jedoch nicht so lange zugewartet werden, weil bei dem Homogenat trotz zugesetzter Emulgatoren die Gefahr der spontanen Sedimentierung besteht. Man muß also schon nach relativ kurzer Einwirkungszeit des Serums, wo noch kein wesentlicher fermentiver Abbau stattgefunden hat, das Agglutinat bzw. Präzipitat durch besonders vorsichtige Schwerkrafttrennung bei niedriger Tourenzahl in der Zentrifuge trennen und beseitigen. Danach kann man aber im Brutschrank das Serum weiter einwirken lassen und zusätzlich Abwehrfermente, die aus dem Acetonharnniederschlag der Serumspender gewonnen werden, hinzufügen. Es können dadurch etwaige Reste der unerwünschten Organbestandteile, die durch die Agglutination oder Präzipitation nicht erfaßt wurden, noch fermentativ gespalten werden. Auf diese Weise ist eine kombinierte Reinigung bzw. Einengung des Organhomogenates auf die organspezifische Fraktion möglich, nach der durch Dialyse sowohl die Abbauprodukte als auch das Schutzkolloid bzw. das Emulgiermittel beseitigt wird und durch Gefriertrocknung sich eine Konservierung ohne fremde Zusätze erreichen läßt.

Beispiel

Von Schweineleber sollen aus einem Homogenat die organspezifischen Fraktionen isoliert werden. Dazu ist vorher die Gewinnung eines antimensesenchymalen antinervalen Serums bzw. des Acetonharnniederschlages aus dem Harn des Serumlieferanten erforderlich. Das Serum wird nach bekannten Methoden der Gewinnung zytotoxischer Seren durch wiederholte Injektion von Milz, subkutanem Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen (Aorta, Ductus thoracicus) und Nervengewebe (N. brachialis oder N. femoralis), alle vom

Schwein, die zusammen als Homogenat mit dem Freundschenschen Adjuvans vermischt sind, hergestellt, indem man diese Kombination einem Hammel viermal im Abstand von etwa einer Woche injiziert. Nach 6 Wochen wird dann aus dem Blut des Tieres das erforderliche Antikörperserum gewonnen und durch fraktioniertes Aussalzen auf die Antikörperfraktion eingeengt.

Während der aktiven Immunisierung wird von dem Hammel jeweils 1 bis 2 Tage nach der Impfung mittels Dauerkatheter der Harn gesammelt und dieser in gleicher Weise wie bei der Abderhaldenschen Reaktion in Aceton ausgeschüttelt. Der Acetonharnniederschlag wird danach getrocknet und vor der Verwendung im Verhältnis 1:10 in Kochsalzlösung gelöst.

Es werden nun 100 g schlachtfrisch entnommene Schweineleber mit dem Messer zunächst vorzerkleinert, dann in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und in einer ebenfalls tiefgekühlten Mühle fein gemahlen, dann in 50 ccm einer 40%igen Fructoselösung auf 0°C erwärmt und zusammen mit der gleichen Volumenmenge Glassplitter in einer Mörsermühle weiterzerkleinert. Nun werden weitere 50 ccm der Fructoselösung zugegeben und die zur Mahlung verwendeten Glassplitter, nachdem sich diese abgesetzt haben, beseitigt und mit der Fructoselösung, die für die weiteren Aufarbeitungen derselben Organart benötigt wird, von den noch etwa darin enthaltenen Organbestandteilen freigespült.

Je 10 g der überstehenden Organemulsion bzw. Lösung werden nun mit der zur Ausspülung der Glassplitter verwendeten Fructoselösung auf 100 ccm verdünnt und 5 ccm des Anti-Schweinemeseenchym-Serums dazugegeben. Nach einer halben Stunde bei Temperaturen um 37°C wird nun das entstehende Agglutinat bzw. Präzipitat vor-

sichtig zentrifugiert bei 500 bis 1000 Umdrehungen und danach beseitigt. Der Überstand wird nun erneut, eventuell unter Zugabe einer weiteren Serummengende, auf 1 Stunde bei 37°C belassen und danach in gleicher Weise erneut zentrifugiert

und das Serum beseitigt. Danach werden 10 ccm der Lösung des Acetonharnniederschlages zu dem Überstand zugesetzt und auf weitere 12 Stunden wieder bei 37°C bebrütet, danach gegen Aqua dest. ausgiebig dialysiert und gefriergetrocknet

Verfahren zur Herstellung von Präparaten aus isolierten Plazenta-Anteilen

DE Nr : 1 033 374
vom 02 11 1955

Patentanspruch

Verfahren zur Herstellung von Präparaten aus isolierten Anteilen von Plazenta, dadurch gekennzeichnet, daß von den tierischen Plazenten der mütterliche und der foetale Anteil und von menschlicher Plazenta der mütterliche Anteil jeweils für sich nach bekannten Verfahren aufgearbeitet werden, der foetale Anteil der menschlichen Plazenta jedoch mit einer nicht denaturierend wirkenden Lösung von bakteriostatisch wirkenden Stoffen in unterkühlten verflüssigten Gasen tiefgefroren, vermahlen und dann der Einwirkung von Ultraschall ausgesetzt und gefriergetrocknet wird

In Betracht gezogene Druckschriften:
USA-Patentschrift Nr 2 151 697

Beschreibung

Das Verfahren dient zur Herstellung von Präparaten aus den isolierten mütterlichen und foetalen Anteilen der Plazenta. Bisher zog man keine therapeutischen Konsequenzen aus der Tatsache, daß die Plazenta kein einheitliches Organ ist und sowohl aus mütterlichen als auch aus foetalen Geweben besteht, die ganz entgegengesetzte Funktionen besitzen. Der mütterliche Anteil ist der Schutzwall gegenüber dem Eindringen foetaler Stoffwechselprodukte und der Aggression von Chorionzellen, die, wenn sie besonders bösartig sind, zum Chorionepitheliom, einer krebsartigen Geschwulst, ausarten. Nach neueren Untersuchungen hat der mütterliche Anteil der Plazenta keine endo-

krinen Aufgaben. Diese sind jedoch beim foetalen Anteil besonders vielseitig (Theurer: "Therapiewoche", 7, 11, S 340 (1957))

Da der mütterliche Anteil der Plazenta besonders aus mesenchymalen Geweben besteht, wird durch ihn, aufgrund einer isotherapeutischen Wirkung, bei Tumoren die Abwehrzone des Organismus und die mesenchymale Matrix aktiviert, ohne daß eine Mitoseförderung zustande kommt, wie sie durch foetale Gewebe ausgelöst werden könnte. Auch unterbleibt eine vermehrte Produktion von somatotropen Wachstums- und Östrogenen Hormonen. Wo es jedoch darauf ankommt, die anatomische Regeneration durch Zellvermehrung in Gang zu bringen und eine Wirkung auf das Drüsensystem auszuüben, ist der getrennte foetale Anteil gegenüber einem Präparat aus totaler Plazenta überlegen.

Die getrennte Anwendung sowohl des mütterlichen als auch des foetalen Anteils erlaubt also nicht nur eine klarere Indikationsstellung, sondern führt auch zu einer Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten, weil der natürliche Antagonismus zwischen den beiden Gewebearten getrennt nutzbar gemacht wird.

Durch die USA-Patentschrift 2 151 697 ist die isolierte Verarbeitung der foetalen Seite menschlicher Plazenten zu einem Extrakt bekannt, der als Schwangerschaftsdiagnostikum Verwendung findet. Es wurden jedoch bisher keine isolierten Anteile aus tierischen Plazenten und auch nicht der mütterliche Anteil der menschlichen Plazenta in entsprechender Weise verarbeitet. Ebenso neu ist es, aus dem foetalen Anteil der menschlichen Plazenta sterile, genuine, suspendier- und emul-

gierbare Gewebepulver herzustellen. Es wird dabei der isolierte foetale Anteil der menschlichen Plazenta mit einer nicht denaturierend wirkenden Lösung von bakteriostatisch wirkenden Stoffen in unterkühlten, verflüssigten Gasen, wie z. B. Propan bei -150°C , tiefgefroren, vermahlen, der Einwirkung von Ultraschall ausgesetzt und gefriergetrocknet. Die Verarbeitung der Anteile aus tierischen Plazenten sowie diejenige des maternen Anteils menschlicher Plazenta kann hingegen nach allen bisher bekannten Verfahren erfolgen. Bei der besonderen Verarbeitung des foetalen Anteils der menschlichen Plazenta kommt es aber darauf an, die makromolekularen Bestandteile der Zellen möglichst natürlich zu erhalten, um sie in Form der sogenannten Zellular- oder Gewebetherapie bzw. zytoplasmatischen Therapie zu verwenden. Es sind dies Präparate, die keine Extrakte darstellen.

Bei Semiplazenten von Wiederkäuern läßt sich die Trennung des maternen und foeta-

len Anteils leicht an Hand des natürlichen Farbunterschiedes der Gewebearten durchführen, während bei Euplazenten jedoch eine selektive Einfärbung des foetalen Gewebes zweckmäßig ist. Dies geschieht durch Injektion von Farblösungen, wie z. B. Methylenblau, Gentianaviolett u. a., in das foetale Gefäßsystem des Chorionkreislaufes über die Gefäße des Nabelstranges.

Beispiel

Unmittelbar nach der Geburt der menschlichen Plazenta wird in das foetale Gefäßsystem durch den Nabelstrang eine mit Methylenblau angefärbte sterile Kochsalzlösung infundiert und danach die ungefärbten Teile mit Pinzette und Schere freipräpariert. Es erfolgt hierauf eine Weiterverarbeitung zu haltbaren Präparaten nach bekannten Methoden. Der foetale Anteil der Plazenta ist blaugefärbt und wird in der oben angegebenen Weise zu sterilem Organpulver weiterverarbeitet.

Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Geweben für therapeutische Zwecke

DE Nr : 1 090 821
vom 16 02 1956

Patentansprüche

1 Verfahren zum gesteuerten chemischen Aufschluß von organischen Stoffen und biologischen Gewebe für therapeutische Zwecke unter Verwendung von Dämpfen chemischer Reagenzien, dadurch gekennzeichnet, daß man die pulverförmigen Substrate mit dem den Aufschluß bewirkenden Reagenz, dessen Siedepunkt bei atmosphärischem Druck über der Normaltemperatur liegt, vorzugsweise konz Schwefelsäure Essigsäure, Ameisensäure oder Diäthylamin, in einem abgeschlossenen System zusammen, aber getrennt voneinander einem solchen Vakuum aussetzt, welches die Überführung des aufschließenden Mittels in die dampfförmige Phase ermöglicht, und, nachdem der gewünschte Aufschluß des Substrates erreicht ist, das nicht verbrauchte Reagenz wieder entfernt

2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man von tiefgekühlten pulverisierten organischen Geweben ausgeht

3 Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das dampfförmige chemische Reagenz aus einer vorbestimmten Menge durch Absenken des Vakuums zunächst auf dem Substrat niederschlägt und nach der gewünschten Einwirkung das überschüssige Reagenz durch Erhöhung des Vakuums wieder entfernt

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren wurde entwickelt für eine besonders schonende Aufschließung

von Organtrockensubstanzen Es werden dabei ganze Zellen und korpuskulare Zellbestandteile (Kerne, Mitochondrien, Mikro-somen) durch Dämpfe von chemischen Reagenzien im Vakuum oberflächlich mazeriert und dadurch die Inhaltsstoffe in eine optimal wasserlösliche Form gebracht

Bei Anwendung der sonst üblichen Hydrolyseverfahren in feuchtem Milieu ist eine so schonende Behandlung der Substrate nicht möglich, da hierbei auch autolytische Vorgänge gleichzeitig mit ablaufen; es sei denn, daß man zusätzlich Fermentgifte anwendet Diese beeinträchtigen aber die biologische und therapeutische Wirkung Auch ist es bei den bisherigen Hydrolyseverfahren nicht zu vermeiden, daß die gewonnenen Bruchstücke des Substrates untereinander in ungewollter Weise reagieren

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei welchem die Substrate in getrocknetem wie auch in noch nicht trockenem, jedoch eingefrorenem und pulverisiertem Zustand eingesetzt werden, ist aber die Gefahr für solche ungewollte Reaktionen beseitigt, und es brauchen deshalb auch keine Fermentgifte zugesetzt werden

Es wurde festgestellt, daß die nach dem beanspruchten Verfahren behandelten Organ-substanzen, bezogen auf die Gewichtsmenge der Trockensubstanz, 24% wasserlösliches Protein enthalten, während nach einer Veröffentlichung von H Schmidt (Med Klinik, 1/1958, S 20) in Frischgeweben, ebenfalls bezogen auf deren Trockengewicht, nur 6,2% und bei sogenannten "Trockenzellen" 3,1% lösliches Protein enthalten sind Die

beträchtliche Erhöhung der Löslichkeit der Proteine kann vielleicht dadurch erklärt werden, daß die vorher unlöslichen makromolekularen Komplexe aus den korpuskularen Zellbestandteilen aufgespalten werden unter Reibehaltung ihrer Eiweißnatur und wasserunlösliche Proteine durch Salzbildung mit dem verwendeten chemischen Reagenz in wasserlösliche Form gebracht werden. Es ist jedenfalls nunmehr möglich, die vorher unlöslichen Zellbestandteile unmittelbar zur Resorption und biologischen Wirkung innerhalb der Zellen zu bringen.

Die bisherigen bekannten Methoden der Hydrolyse durch Einwirkung von Flüssigkeiten besitzen darüber hinaus aber auch noch den Nachteil, daß die Reagenzien nach getaner Wirkung durch andere chemische Stoffe neutralisiert und die entstandenen Salze dann durch Dialyse und andere eingreifende Verfahren beseitigt werden müssen, wodurch ebenfalls unübersehbare Möglichkeiten einer ungewollten chemischen Beeinflussung des Substrates gegeben sind. Auch lassen sich die gewünschten Vorgänge der Hydrolyse oder chemischen Beeinflussung des Substrates nicht in dem Maße quantitativ steuern wie bei vorliegendem Verfahren. Dies gilt insbesondere auch dann, wenn man für die Hydrolyse die Reagenzien bei Normaldruck erhitzt, da dann die heißen Dämpfe eine unkontrollierbare thermische Veränderung des Substrates hervorrufen.

Vorliegendes Verfahren ist auch nicht zu vergleichen mit der Begasung von Casein, mit Ammoniak, wie es in Hager, Hdb d pharm Praxis, unter "Casein" beschrieben ist, weil dieses Reagenz einen bei atmosphärischem Druck unter der Normaltemperatur liegenden Siedepunkt besitzt, so daß eine Kondensation des Reagenzes auf dem Substrat für die Hydrolyse nur

durch eine extreme Absenkung der Temperatur und Erhöhung des Druckes möglich wird. Im übrigen handelt es sich dort auch nicht um eine Aufschließung von korpuskularen makromolekularen Agglomeraten verschiedenartiger Stoffe, sondern um die Beeinflussung einer einheitlichen chemischen Substanz. Zudem ist hier auch noch zu berücksichtigen, daß Ammoniak und in gleicher Weise z. B. Chlorwasserstoffgas unter Normalbedingungen schon gasförmig sind, wodurch nur eine oberflächliche Hydrolyse des Substrates bei ausreichender Einwirkungszeit möglich ist. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren tritt jedoch, wie bereits oben erwähnt, eine umfassende Hydrolyse ein, weil das hohe Vakuum die Durchdringung des Substrates mit den Reagenzien ermöglicht. Bei Reagenzien, die normalerweise schon gasförmig sind, würde aber das Anlegen eines hohen Vakuums die Hydrolyse verhindern.

Auch die Imprägnierungsverfahren, wie sie z. B. in der Histologie und der Elektronenmikroskopie angewandt werden, lassen sich mit vorliegendem Verfahren nicht vergleichen. Dort erfolgt nämlich nach einer Vakuumtrocknung die Imprägnierung ebenfalls durch Einwirkung heißer Dämpfe.

Vorliegendes Verfahren hat aber auch keine Beziehungen zu den Vakuumtrocknungsmethoden, denn bei diesen kommt es darauf an, ein möglichst gutes Vakuum zu erzeugen, während bei vorliegendem Verfahren dessen Höhe auf den Dampfdruck des jeweils verwendeten chemischen Reagenzes abgestimmt wird. Die Anpassung der Höhe des Vakuums an den Ablauf des chemischen Prozesses ist hier also kennzeichnend.

Für die Anwendung des beanspruchten Verfahrens ist die Differenz des Dampfdruckes zwischen dem chemischen Reagenz und dem damit zu beeinflussenden Substrat entschei-

dend Der Dampfdruck des Reagenzes sollte dabei größer sein als derjenige des Substrates. Dadurch findet das Verfahren seine Begrenzung, da hierfür Reagenzien nicht in Betracht kommen, die keinen ausreichend hohen Dampf- oder Sättigungsdruck besitzen. NaOH oder KOH beispielsweise sind dafür also ungeeignet. Ist der Dampfdruck erreicht, so verdampft so lange Substanz, als der Druck aus der Umgebung entfernt werden kann oder sich auf dem Substrat niederschlägt bzw. dort durch chemische Reaktion gebunden wird. Auch der Dampfdruck des Reaktionsproduktes z. B. bei einer Salz- bildung von dem entstehenden Wasser muß hier berücksichtigt werden. Im Vergleich zum Wasser beträgt z. B. der Dampfdruck des Diäthylamin bei $-12,4^{\circ}\text{C}$ 35 mm Hg, bei 0°C 70 Torr, bei $11,6^{\circ}\text{C}$ 127,3 Torr und bei $20,7^{\circ}\text{C}$ 194,4 Torr. Man kann damit also auch nicht entwässerte gefrorene Substrate beeinflussen. Das gleiche gilt auch für wasserfreie Ameisensäure, die bei 0°C einen Dampfdruck von 10,6 Torr und bei 10°C von 19,7 Torr besitzt. Hingegen kann ein wasserhaltiges Substrat auch in gefrorenem Zustand von konz. Schwefelsäure bei wenigen Kältegraden nicht beeinflußt werden, weil diese als 90%ige Säure bei 20°C nur einen Dampfdruck von 0,005 Torr besitzt. Um einen Aufschluß des Substrates mit Schwefelsäure zu erzielen, muß der Dampfdruck des Substrates also unter dem der Schwefelsäure liegen. Eine Beeinflussung eines auf -100°C gefrorenen Substrates, das nicht entwässert ist und bei dem der Dampfdruck 10^{-5} Torr beträgt, durch den Dampf einer 90%igen Schwefelsäure mit 20°C wäre indessen möglich. Durch Veränderung des Vakuums wie auch der Temperaturen von Substrat und chemischem Reagenz lassen sich also das Verdampfen und Kondensieren beliebig steuern.

Wird das Vakuum erniedrigt, dann kondensieren die Dämpfe aus und lagern sich auch auf dem Substrat ab. Das Substrat läßt sich also sowohl durch Dämpfe als auch durch Kondensate beeinflussen. Wird nun das Vakuum wieder erhöht, so verdampft erneut das Hydrolysemittel. Auf diese Weise können die nicht verbrauchten Reagenzien aus dem Substrat wieder entfernt und abgesaugt werden. Eine Neutralisierung ist hier also nicht erforderlich. Zur vollkommenen Beseitigung ist es jedoch notwendig, daß aus dem ursprünglichen Reservoir der Reagenzien keine weitere Verdampfung erfolgt. Dies läßt sich verhindern, indem man nur eine bestimmte Menge der chemischen Reagenzien benutzt, die während der chemischen Beeinflussung des Substrates vollkommen verdampft wird, bzw. die Reagenzien abkühlt, so daß ihre Dampfdichte absinkt, wobei das Vakuum dann diesen Druck nicht mehr erreichen darf, oder aber, indem man die chemischen Reagenzien in einem kommunizierenden Vakuumgefäß deponiert, das von dem Gefäß, in welchem sich das zu verändernde Substrat befindet, abgeschlossen wird.

Beispiel 1

100 g feinpulverisiertes Trockenpulver aus Leber soll durch Schwefelsäure im Vakuum aufgeschlossen werden. Das Trockenpulver wird verteilt auf einer Petrischale in einer Schichtdicke von 0,5 cm in einen Exsikkator gebracht, der wahlweise mit einem Kältekondensator über ein Pumpensystem für Hochvakuum, gleichzeitig aber auch mit einem kommunizierenden Vakuumgefäß in Verbindung steht, das durch ein Ventil sich von dem Hauptexsikkator absperren läßt. Es wird nun zunächst in das kommunizieren-

de Vakuumgefäß konz Schwefelsäure bei Zimmertemperatur eingefüllt und das Verbindungsventil zum Exsikkator abgesperrt. Um eine etwaige Restfeuchtigkeit durch hygroskopische Wirkung des Trockenpulvers zu beseitigen, wird nun zunächst mit Hilfe des Kältekondensators, der mit Aceton-Kohlensäure-Schnee unterkühlt wird, Wasser aus dem Gewebepulver sublimiert und anschließend unter Abschaltung dieses Kondensators mit Hilfe eines Hochvakuumaggregates so lange abgesaugt,

-4

bis der Druck im Exsikkator 10 Torr erreicht. Danach wird das Ventil zu dem kommunizierenden Gefäß geöffnet, so daß nun Schwefelsäure in dampfförmigem Zustand in den Exsikkator eindringen kann. Das Vakuum fällt jetzt auf den Dampfdruck der Schwefelsäure ab. Nun wird die Verbindung zum Rezipienten der Säure unterbrochen, vorher aber die kommunizierenden Rezipienten von dem Pumpenaggregat getrennt. Durch Einblasen von Stickstoff in den Exsikkator wird das Vakuum über dem Leberpulver nun geringgradig weiter verschlechtert. Dadurch kondensiert der Schwefelsäuredampf der Leber. Nach einer gewissen Einwirkungszeit wird die Verbindung zum Pumpensystem und zum Rezipienten für die Säure wieder geöffnet und nach Erreichen des Dampfdruckes der Schwefelsäure der Vorgang zweimal wiederholt. Zum Schluß wird dann die Verbindung zwischen den beiden kommunizierenden Gefäßen nicht wiederhergestellt, sondern lediglich zwischen Exsikkator und dem Pumpensystem. Es wird nun so lange abgepumpt, bis alle Schwefelsäure aus dem Exsikkator entfernt ist, die nicht chemisch zur Reaktion gekommen ist. Auf diese Weise kann auch die Wasserstoffionenkonzentration des Trockenpulvers aus Leber auf der sauren Seite beliebig verändert werden. Je

intensiver und länger die Absaugung erfolgt, um so mehr wird das pH neutral.

Beispiel 2

50 g tiefgefrorene, feinerkleinerte Partikeln von frischer Kalbsniere sollen unter Ausschluß von Sauerstoff durch Diäthylamin gesteuert, chemisch aufgeschlossen und dann getrocknet werden.

Die Temperatur des tiefgefrorenen Nierensubstrates beträgt - 180°C. Das Pulver wird in dünner Schicht auf einer Petrischale verteilt und in einen Exsikkator gebracht, in welchem ein zweites Gefäß mit 10 ccm Diäthylamin ebenfalls offen eingebracht wird. Das Diäthylamin hat eine Temperatur von 0°C. Während des Vorganges der Beschickung steigt die Temperatur des Nierenpulvers auf - 100°C.

Es wird nun durch ein leistungsfähiges Pumpensystem in dem Exsikkator ein Vakuum erzeugt. Dieses erreicht 70 Torr, weil der Dampfdruck des Diäthylamins bei 0°C 70 Torr beträgt. Nun wird die Verbindung zum Pumpensystem getrennt. Durch Erhöhung der Temperatur des Diäthylamins verdampft dieses weiter. Das Gas kommt zur Reaktion mit den gefrorenen Partikeln der Niere und wird dort verbraucht. Nachdem nun die gesamte Menge des Diäthylamins auf diese Weise verdampft ist, wird die Verbindung mit der Vakuumpumpe wiederhergestellt und zunächst über eine Kühlfalle das Substrat entwässert und das restliche Diäthylamin abgesaugt. Zum Schluß wird durch Vorschaltung einer Diffusionspumpe unter Umgehung der Kühlfalle die Resttrocknung durchgeführt.

Verfahren zur Herstellung von Salben und Emulsionen

Zusatz zum Patent 1 032 880

DE Nr : 1 065 570
vom 12 12 1957

Patentanspruch

Verfahren zur Herstellung von Salben und Emulsionen von biologischen Geweben, bei dem aus den Geweben gewonnene Trockenpulver zunächst mit einer Lösung eines nicht denaturierend wirkenden Konservierungsmittels imprägniert und erst dann nach bekannten Methoden zu Emulsionen oder Salben verarbeitet werden, nach Patent 1 032 889, dadurch gekennzeichnet, daß man das Konservierungsmittel in Fruchtwasser löst

Beschreibung

Vorliegendes Verfahren dient zur Verbesserung der Wirksamkeit von Salben aus korpularen Bestandteilen von biologischen Geweben (Organgewebe und Mikroorganismen), die nach dem Verfahren des deutschen Patent 1 032 889 hergestellt sind. Bei diesem Verfahren wird das Trockenpulver solcher Gewebe zunächst mit einer Lösung eines nicht denaturierend wirkenden Konservierungsmittels, dessen Konzentration höher ist, als es zur Konservierung des Lösungsmittels bzw der Salbengrundlage erforderlich wäre, imprägniert und dann erst dieses Produkt nach bekannten Methoden zu Emulsionen oder Salben weiterverarbeitet. An sich können bei diesem Verfahren alle geeignet erscheinenden Lösungsmittel für die konservierende Verarbeitung Verwendung finden, wie z B physiologische

Kochsalzlösung, Meerwasser. Es hat sich nun gezeigt, daß es möglich ist, mit beträchtlich geringeren Mengen an chemischen Konservierungsmitteln den gleichen Grad der chemischen Haltbarkeit zu erreichen, wenn man die trockenen Gewebepulver mit Fruchtwasser (liquor amnii) imprägniert, dem diese Konservierungsmittel zugesetzt sind. Es genügt dabei die normale Menge an Konservierungsmitteln, wie sie zur Konservierung z B der Salbengrundlage verwendet wird.

Da tierisches Fruchtwasser bisher bei Schlachtungen als Abfall verworfen wurde und demgegenüber die chemischen Konservierungsmittel teuer sind, lassen sich die Herstellungskosten mit diesem Verfahren senken, wobei gleichzeitig die Qualität der Produkte bezüglich einer besseren Verträglichkeit und der therapeutischen Wirkung beträchtlich gesteigert werden. Chemische Konservierungsmittel führen, wie dies auch bei der Konservierung von Seren bekannt ist, in höheren Konzentrationen zu einer Verringerung der biologischen Wirkung, ebenso aber zu Unverträglichkeitserscheinungen. Die Verringerung der Konzentration solcher chemischen Konservierungsmittel wirkt sich also in verschiedener Richtung günstig aus. Davon abgesehen konnten aber bei der Verwendung von Fruchtwasser bisher unerreichte therapeutische Wirkungen erzielt werden. Im Fruchtwasser sind in idealer physiologischer Zusammensetzung Eiweißkörper, Hormone, Fermente, Vitamine, Elektrolyte, Spu-

renemente und Stoffwechselprodukte enthalten, die schon für sich allein eine therapeutische Wirkung besitzen. Trotzdem wurde bisher das Fruchtwasser nicht zur Herstellung von speziellen Präparaten verwendet. Auch konnte keine Druckschrift ermittelt werden, aus der die antimikrobielle Wirkung des Fruchtwassers hervorgeht.

Beispiel

Es sollen 5 l einer haltbaren Salbe mit einem Gehalt von **1%** Trockenhefe unter Verwendung von Fruchtwasser im Verhältnis von 1 Teil Fruchtwasser zu 4 Teilen Salbengrundlage hergestellt werden. Dazu werden 50 g des Trockenpulvers aus Hefe in 1 l vorkonserviertem Fruchtwasser mit dem Gehalt von 0,85% eines Phenolesters homogenisiert und dieses Produkt dann in 4 l der vorbereiteten Salbengrundlage eingearbeitet. Die gesamte Bearbeitung darf nur bei Temperaturen erfolgen, bei denen keine Denaturierung von Eiweißstoffen zustandekommt.

Nachdruck von Veröffentlichungen

Zirkadianer Biorhythmus in Beziehung zu anderen vegetativen Regulationen

Chrono Biorhythmus-Therapie mit unspezifischen Methoden und gezielt wirkenden Medikamenten

Med Klin 79, Nr 3 und 4 (1984)

Zirkadianer Biorhythmus in Beziehung zu anderen vegetativen Regulationen

Manche Erkenntnisse der Medizin sind für Klinik und Praxis noch ungenutzt, weil sie ein Umdenken erfordern oder ihre Anwendung aufwendig und unbequem erscheint. Die Synopsis von verwandten Mechanismen sollte etwaige Hemmungen, sie in das ärztliche Denken zu integrieren, überwinden helfen.

Jede spezifische Therapie hat unspezifische Wirkkomponenten (Tabelle 1)

Unspezifische Effekte auf den Gesamtorganismus können sowohl Krankheiten auslösen als auch heilen. Diesen Dualismus hat man bislang auf unterschiedliche Intensitäten der Belastung bzw. des Reizes (Streß) zurückgeführt. Neben der Dosis ist auch der Ort der Applikation von Bedeutung. Ein weniger beachteter Faktor für die unterschiedlichen Wirkungen ist die Tageszeit. Schon die alte chinesische

Tabelle 1 Synopsis der Grundlagen vegetativer Regulationen

- 1 Zirkadianrhythmus von biologischen Systemen
- 2 Vegetative Gesamtumschaltung
- 3 Streß- und Adaptationssyndrom
- 4 Kybernetik
- 5 Unspezifische Umstimmung durch Reize
(physikalisch, chemisch, medikamentös) auf
Haut
Muskulatur und Gelenke
aktives Mesenchym (physikalische Therapie, Chirotherapie, Massagen u a)
Blut (Ozontherapie, O²-Mehrschritttherapie)
Nerven (Neural- und Segmenttherapie, Akupunktur)
Stoffwechsel (Diät, Gewichtsreduktion, körperliche Bewegung, Sport, Klima)
- 6 Fokallehre
- 7 Psychische Konditionierung, autogenes Training
- 8 Gleichzeitig unspezifische Wirkung von spezifisch wirksamen Medikamenten
- 9 Systemveränderungen des Stoffwechsels und der hormonalen Regulation
durch minimale Reize mit Stoffwechselgemischen und/oder Elektrolytlösungen

Medizin wußte in der Yin Yang Lehre und der "Organuhr" für Maximalzeiten der Organfunktionen von dieser Abhängigkeit (1)

Tagesperiodik von Reaktionslage, Stoffwechsel und hormonaler Regulation

Forschungsergebnisse über die Chrono-Biorhythmik zeigen eine zirkadiane, das heißt tageszeitliche Veränderung der Homöostase der verschiedensten Parameter im Organismus (5) Zum großen Teil werden diese Veränderungen durch einen Wechsel der vegetativen Regulation zwischen sympathikotoner und parasympathikotoner Reaktion ausgelöst Zudem gibt es noch gewisse Abweichungen, die durch äußere Faktoren wie Ernährung, Streßbelastung und dergleichen bedingt sein können Die humoralen Veränderungen der verschiedenen Faktoren bei sympathikotoner und parasympathikotoner Reaktionslage sind in Tabelle 2 ohne Anspruch auf Vollständigkeit zusammengestellt Intrazelluläre Veränderungen sind größtenteils gegenläufig Humorale Veränderungen im Mineralhaushalt lassen sich aus dem Quotienten für die neuromuskuläre Erregbarkeit nach György (2)

$K \times \text{Phosphate} \times \text{HCO}_3^-$,

$\frac{Ca \times Mg \times H}{\dots}$

ersehen Der Zähler enthält in dieser Formel Faktoren, die beim Überwiegen des Parasympathikus, der Nenner solche, die bei Vorherrschen des Sympathikus ansteigen Jede Änderung des individuellen Zirkadianrhythmus (Desynchronisation) zum Beispiel durch zeitzoneüberschreitende transkontinentale Flüge oder asynchrone Reize, Medikation oder Tätigkeit (Nachtarbeit), wird als unangenehm empfunden und kann zu Krankheitserscheinungen führen Ebenso

bedeutet auch eine Intensivierung der Reaktionsveränderungen durch Substitution bestimmter Faktoren oder eine Verlängerung oder eine Verkürzung einzelner Phasen je nachdem einen krank machenden oder auch therapeutischen Reiz (4)

Phasenablauf vegetativer Gesamtschaltung

Der Zirkadianrhythmus ist individuell verschieden Es gibt Frühaufsteher (Lerchen) und Nachtschwärmer (Eulen) Dies ist arbeitsphysiologisch wie auch für die Therapie zu berücksichtigen

Die Darstellung der Tagesperiodik der Leistungsbereitschaft im Organismus, bezogen auf die Ortszeit (Abbildung 1), zeigt den Wechsel von sympathikotoner und parasympathikotoner Reaktionslage Die höchste Leistungsbereitschaft besteht beim Wechsel von der sympathikotonen in die parasympathikotone Phase und umgekehrt Der Umschlag von sympathikotoner in parasympathikotone Reaktionslage findet normalerweise gegen 9 00 bis 10 00 Uhr und zwischen 20 00 und 21 00 Uhr und von der parasympathikotonen in die sympathikotone gegen 3 00 und 15 00 Uhr statt

Die Amplitude der sympathischen Reaktion kann durch Nahrungsaufnahme, Traubenzuckergabe, körperliche Bewegung, Lichtreize, Streßeinwirkungen, O_2 -Beatmung, physikalische und andere unspezifische wie auch durch spezifische Maßnahmen erhöht werden, so daß dann der Umsehlag in die parasympathische Reaktionsphase gegenüber dem spontanen Ablauf auf höherem Niveau erfolgt und eine Intensivierung der Stoffwechselveränderungen stattfindet Die Antithese von Sympathikotonie und Parasympathikotonie wurde von Hoff (2) in einem Schema der vegetativen Regula-

Tabelle 2. Gegenüberstellung von zirkadianen Schwankungen physiologischer Parameter

Parameter	Bei sympathischer Reaktionslage	Bei parasympathischer Reaktionslage
Anabolismus	-	+
Katabolismus	+	-
Blut-Zucker	+	-
-Calcium	+	-
-Kalium	-	+
-Magnesium	+	-
-Natrium	+	-
-Phosphate	-	+
-Lipide	-	+
-Proteine	+	-
-Acidose	+	-
-Alkalose	-	+
-O ₂ -Partialdruck	+	-
myeloische Tendenz	+	-
lymphatische Tendenz	-	+
-Eosinophilie	-	+
-Immunglobuline	-	+
BKS	+	-
Körpertemperatur	+	-
Elektrische Leitfähigkeit der Haut	+	-
Grundumsatz	+	-
Blutdruck	+	-
Pulsfrequenz	+	-
Hormone von		
Hypophyse	+	-
Nebenniere	+	-
Schilddrüse	+	-
Östrogene	+	-
Androgene	-	+
Parathyreoidea	+	-
Epiphyse	-	+
Pankreas	-	+
Thymus	-	+
Plazenta Dezidua	-	+
Chorion	+	-

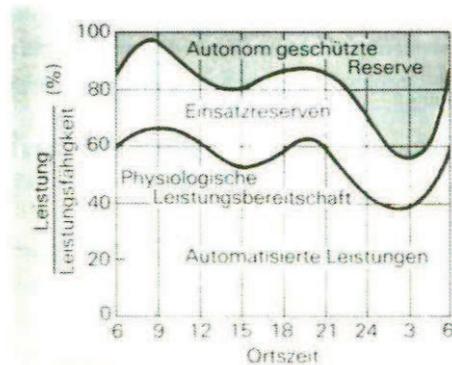


Abb 1 Zirkadianer Rhythmus:
Tagesperiodik der Leistungsbereitschaft
(nach (15), Graf)

tionen mit zwei Phasen der vegetativen Gesamtumschaltung dargestellt (Abbildung 2) Es werden davon Mineralstoffe, Säure-Basen-Haushalt, chemische, physikalisch-chemische und Stoffwechselfvorgänge ebenso wie das Endokriniem betroffen

Ein unspezifischer Reiz verstärkt den Reaktionsablauf der biologischen Systeme gleichsinnig und verlängert ihn möglicherweise zeitlich, wenn er am Beginn einer Reaktionsphase appliziert wird Wird der Reiz am Ende der sympathikotonen Periode gesetzt, wird die parasympathikotone Phase verstärkt und verlängert Die konträre Beeinflussung des Reaktionsablaufs in Richtung des gesetzten Reizes ist ebenfalls möglich, zum Beispiel die Veränderungen einer parasympathischen Reaktionslage bei Behandlung mit Sympathikomimetika, Toxinen oder durch Streßreize

Abhängigkeit der Reaktion auf Reize von der zirkadianen Phase

Der von Selye (10) geprägte Begriff "Streß" gilt für ein generelles Reaktionsmuster bei Tieren und Menschen als Antwort auf er-

höhte Beanspruchung, Stressoren können zum Beispiel physikalisch (Licht, Kälte, Hitze, Lärm), chemisch (Schadstoffe, Drogen), unspezifische Einwirkungen durch Medikamente wie auch psychischer Art (Isolation, Prüfungen, Belastungen in der Familie) sein Die initiale Alarmphase in Form einer parasympathikotonen Schockreaktion führt zu der Adaptations- oder Gegenschockphase mit einer Erhöhung des Tonus des sympathischen Nervensystems und Überfunktion der Nebennieren, sowohl des Markes als auch der Rinde, und Schrumpfung von Thymus und Lymphknoten

Ein gewisses Maß an Streß ist ungefährlich und lebensnotwendig (Eu-Streß) Langdauernd starker Streß (Dys-Streß) kann jedoch gesundheitliche Schäden vielfältiger Art verursachen Häufig entstehen Magengeschwüre, Bluthochdruck und Herzinfarkt Durch das Training wiederholter unterschwelliger Reize erfolgt eine Anpassung (Adaptation) des Organismus, so daß auch stärkere Reize sich nicht pathogen auswirken (Eu-Streß) Die Fähigkeit zur Anpassung ist individuell verschieden (12) und unterliegt zirkadianen Rhythmen Die Auswirkung von Reizen ist, wenn sie bei sympathikotoner Reaktionslage erfolgen, heftiger als bei parasympathikotoner F Hoff war mit seinen Arbeiten über die vegetative Gesamtumschaltung mit ein Wegbereiter für die biologische Kybernetik über Regelkreise (11, 16) Die Regelung zur Erhaltung der Homöostase ist ein Urprinzip der Lebensvorgänge Jeder Parameter wird einzeln geregelt Die verschiedenen Regelkreise sind jedoch miteinander, zum Teil mehrfach, gekoppelt und vernetzt, stehen also in gegenseitiger Abhängigkeit, so daß Änderungen eines Parameters sich auf andere übertragen,

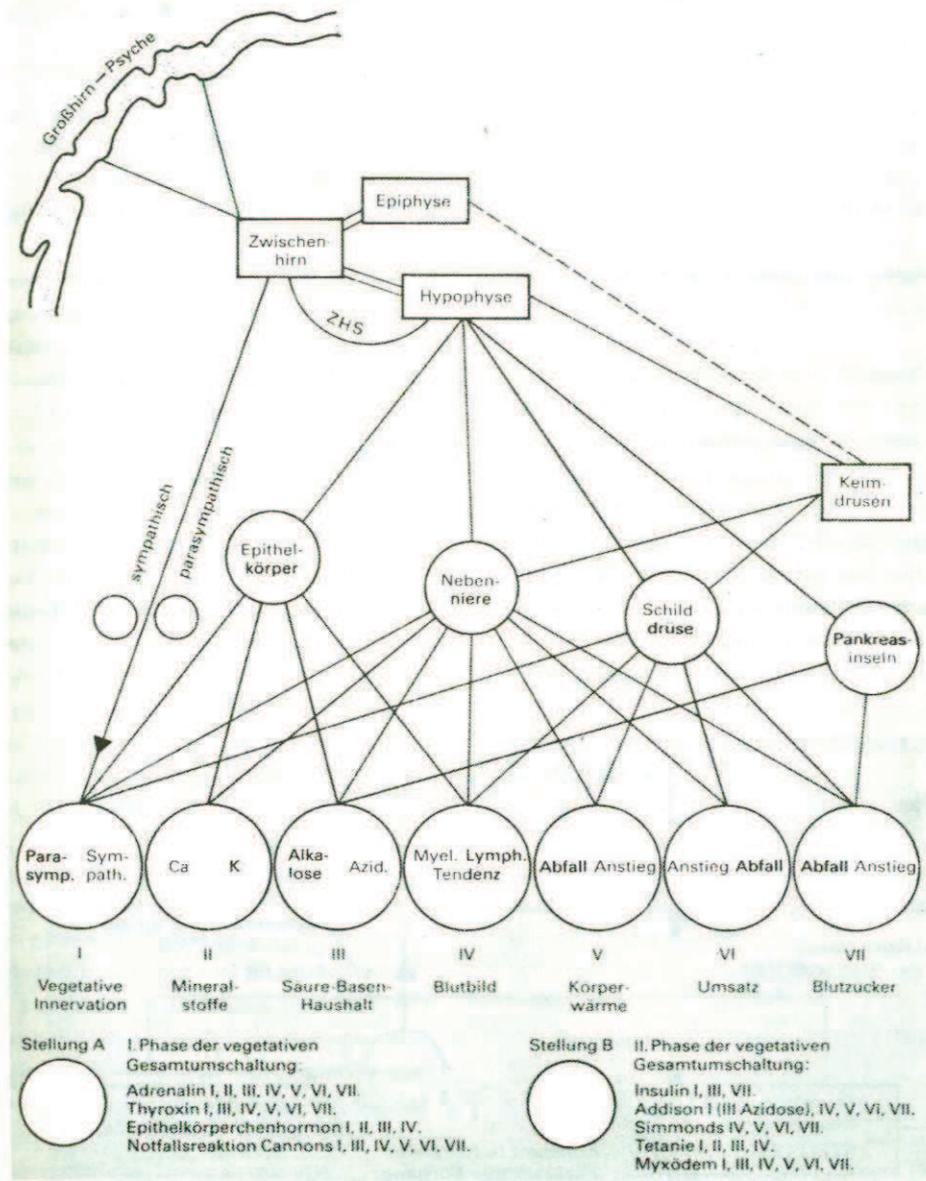


Abb 2 Schema der vegetativen Regulationen (nach (2))

wie dies aus der Darstellung des Iloffschen Räderwerks (Abbildung 2) ersichtlich ist Die Stellgröße hat funktionell meist das umgekehrte Vorzeichen wie die Regelabweichung das heißt beim Absinken eines Parameters wird seine Verstärkung ausgelöst und umgekehrt (negative Rückkopplung) (Abbildung 3)

Vegetative Umstimmung durch unspezifische Reize

Die Fähigkeit, auf Reize zu reagieren, ist eine Grundeigenschaft lebender Systeme Eine Umstimmung der Reaktionslage im Organismus kann durch jede Veränderung außerhalb (Außenreize) oder innerhalb (Organreiz), die eine Erregung oder eine Reaktion bewirkt, erfolgen Für eine Zelle ist demnach jede Einwirkung ein Reiz, der ihre Stoffwechsellage verändert und Gegenreaktionen auslöst Entweder kommt

es dann zu einer Stoffwechselaktivierung bzw. *Restitutio ad integrum*, oder es resultieren, falls keine Anpassung erfolgt, pathologische Reaktionen So sind in der physikalischen Therapie und in der Homöopathie Erstverschlimmerungen und Spätreaktionen zu erklären Selbst Placebowirkungen unterliegen diesen Gesetzmäßigkeiten

Große Dosen von Arzneimitteln scheinen die Ansprechbarkeit der Zellen zu lähmen Abrupte Veränderungen der vegetativen Reaktionslage erfordern eine Adaptation Man hat dies auch als "Stoß ins System" bezeichnet Von der Art, Intensität und Dauer der Veränderungen des Milieus, das heißt der Umwelt, hängt es also ab, wie die betroffenen Zellen und Gewebe reagieren Dabei spielen verständlicherweise auch die genetisch vorgegebene und die lokale Disposition eine Rolle Bei Medikamenten konnten fast 100%ige Wirkungsunterschiede gefunden

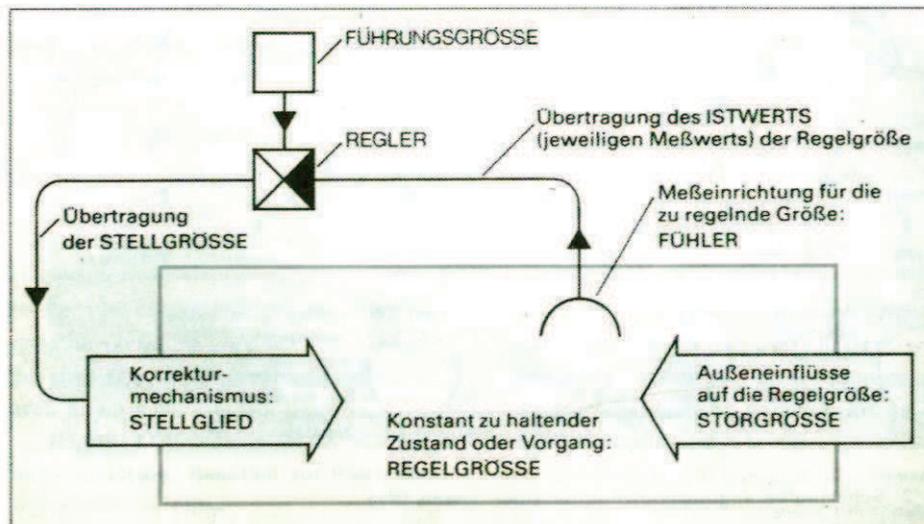


Abb 3 Regelkreis in einer für die biologische Kybernetik geeigneten Darstellung Die regeltechnischen Fachausdrücke sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet (nach (9), Hassenstein)

werden, wenn sie während den entgegengesetzten Reaktionsabläufen verabfolgt wurden (3, 4)

Das Reaktionsvermögen des Organismus ist auch abhängig vom relativen Körpergewicht. Eine langsame Gewichtsreduktion bei Adipositas verbessert jegliche therapeutische Maßnahme und macht diese möglicherweise sogar überflüssig.

Lokalisierte Entzündungsherde bedeuten für den Organismus persistente Reize. Neben einer Auswirkung auf das Immunsystem und einer Belastung der Regulationen über das aktive Mesenchym irritieren sie die komplexen Mechanismen der vegetativen Gesamtschaltung und des Zirkadianrhythmus. Deshalb ist die Fokussierung oder -inaktivierung oft eine Voraussetzung für die Heilung.

Unspezifische Wirkung auch bei spezifisch wirksamen Medikamenten

Psychosomatische Krankheiten mit Organmanifestationen entstehen oft durch Irritation der vegetativen Regulationen und des Zirkadianrhythmus. Dies gilt auch für Psychosen und Suchtleiden. Reize, die den normalen Zirkadianrhythmus fördern und unterstützen, können ebenso wie gezielte Entspannungsübungen durch autogenes Training und eine Gewöhnung an psychische Belastungen therapeutisch wertvoll sein (3, 6, 8). Bei überspannter sympathikomimetischer Reaktionslage wirken dämpfende Einwirkungen und bei der parasympathikomimetischen Reaktionsphase aktivierende Maßnahmen günstig.

Unspezifische Maßnahmen und Placebos haben über psychische und physische Mechanismen in relativ hohem Prozentsatz einen Effekt. Es versteht sich deshalb, daß spezifisch wirksame therapeutische Maßnahmen, wie organspezifisch wirkende

Medikamente chemotherapeutischer, pflanzlicher und organotroper Art, besonders auch biologische Mediatoren und Überträgerstoffe sowie Immunfaktoren und Hormone, eine zusätzliche unspezifische Wirkungskomponente besitzen. Diese kann den biologischen oder therapeutischen Effekt wesentlich mitbestimmen, indem sie zur Wiedergewinnung der vegetativen Regulationsfähigkeit und zur Synchronisierung mit natürlichen Rhythmen beiträgt.

Literatur

- (1) Busse, E: Akupunkturfibeln. Pflaume, München 1975
- (2) Hoff, F: In: Heilmeyer, L: Lehrbuch der speziellen pathologischen Physiologie. G. Fischer, Jena 1945
- (3) Kunkel, H: Einflüsse der Biorhythmik - Streß und Nervensystem. Ärztl. Prax. 28 (1975), 1803
- (4) Lemmer, B: Chronopharmakologie. Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart 1983
- (5) Mayersbach, H v: Zirkadiane Biorhythmik. Tagungsbericht XXIII. Jahrestagung über die Zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serum-Desensibilisierung, Stuttgart 1977
- (6) Payk, Th R: Neurol. Psychiat. 7 (1980), 363
- (7) Pischinger, A: Krebsarzt 21 (1968), 297
- (8) Pohl, H: Fortschr. Med. 85 (1967), 7
- (9) Pschyrembel, W: Klinisches Wörterbuch. De Gruyter, Berlin-New York 1972, S. 1031
- (10) Selye, H: Streß beherrscht unser Leben. Econ, Düsseldorf 1957
- (11) Shannon: The mathematical theory of communication. Urbana, 1959

- (12) Theurer, K Med Klin 60 (1965),
1909
- (13) Theurer K Ärztl Prax 33 (1981),
1709
- (14) Theurer, K : Therapiewoche 33 (1983),
17
- (15) Thiele, G : Handlexikon der Medizin
Urban & Schwarzenberg, München - Wien -
Baltimore 1980, S 2734
- (16) Wiener, N : Cybernetics New York
1961

Chrono-Biorhythmus-Therapie mit unspezifischen Methoden und gezielt wirkenden Medikamenten

Zu den Grundlagen jeder Therapie mit gezielt wirkenden Medikamenten wie auch mit unspezifischen Methoden gehören Kenntnisse über die vegetativen Regulationen des Stoffwechsels, den Streßmechanismus, die zirkadiane Biorhythmik und über Systemveränderungen des Stoffwechsels durch minimale Reize (6)

Die Bedeutung des Blutchemismus für Tumorbildung und Tumorabbau

Nach E. Leupold (3), ehemals Ordinarius für Pathologie an der Universität Köln, kann eine Geschwulstbildung vom Stoffwechsel der Gewebe und dem Gesamtstoffwechsel abhängen. Durch parenterale Applikation von kleinsten Mengen physiologisch vorkommender Eiweißabbauprodukte, Lipide, Kohlenhydrate sowie Ionen wurde die Proliferation von entzündlichen Zellneubildungen bis zu bösartig wachsenden Geschwülsten hemmend oder fördernd beeinflusst. Die Umwelt der Zellen des Organismus, Flüssigkeiten, die sie umspülen, enthalten die verschiedensten Regulationsfaktoren. Ebenso hat auch das vegetative Nervensystem und die alles durchziehende vegetative Grundformation des aktiven Mesenchyms (4) Einfluß auf die Zellproliferation.

Dieses "Zelle-Milieu-System" unterliegt trotz weitgehender Homöostase gewissen Veränderungen. Vom zeitlichen Ablauf und dem Ausmaß der Bewegungen des Systems Cholesterin x Phospholipide

Zucker

soll maßgeblich die Reaktionstendenz abhängen. Bei Senkung des Quotienten kam es tierexperimentell zu entzündlich chronischen

Proliferationen Adenomen, Sarkomen oder Karzinomen - besonders der Niere, Lunge und des Darmes, der Brust, des Uterus u. a. - innerhalb einer Zeitspanne von zum Teil mehr als zwei Jahren. Bei Bewegungen des Systems in die entgegengesetzte Richtung von derjenigen, die zu Tumoren führt, das heißt beim Ansteigen des Quotienten durch Erhöhung von Cholesterin und Phospholipiden und Abfall von Zucker, wurden Tumoren durch Nekrose abgebaut. Auch gutartige Tumoren der Mamma, Prostatahypertrophie und Zellproliferationen bei Psoriasis, Fibrosierungen, Infiltrate und Fisteln sprachen auf eine entsprechende Änderung des Quotienten an.

Die Systembewegungen wurden von Leupold durch subkutane Injektionen von physiologischen Stoffgemischen in einer Menge von 0,05 ml erreicht. Größere Injektionsmengen zeigten weniger bis keine Wirkung. Bei Tieren war die Injektion in die Ohrlöcher wirksamer als am Rücken (mögliche Zusammenhänge mit Ohr-Akupunktur). Die Behandlung wurde über längere Zeit in unterschiedlichen Abständen durchgeführt. Zusätzlich zur Injektion wurden die Stoffgemische, besonders eine Lipidlösung, oral verabreicht. Das Trauma von interkurrenten chirurgischen Eingriffen wie auch von Bestrahlungen wirkte sich auf den Blutchemismus zum Teil wie im Tierexperiment mit Tumorentstehung und Rezidivbildung aus.

Sympathikotonus fördert Tumorentstehung

Grundsätzlich besteht die Leupoldsche Therapiemethode einerseits in der Sub-

stitution von Stoffwechselfaktoren, deren höchste Konzentration bei sympathikotoner Reaktionslage erreicht wird (Glucose), und andererseits in einem auslösenden Reiz für die erwünschte Systembewegung. Diese entspricht für den Tumorabbau der parasymphatikotonen Reaktionsphase und für die Tumorentstehung der sympathikotonen Reaktionsphase. Leupold hat jedoch diese Zusammenhänge noch nicht berücksichtigen können.

Die zum Tumorabbau empfehlende Systembewegung läßt sich durch alle parasymphatikomimetisch wirkenden Methoden und Medikamente verstärken. Günstige Therapiebedingungen können auch geschaffen werden durch vorherige Anhebung von Faktoren am Ende der sympathikotonen Reaktionsphase, die dann während des Parasymphatikotonus absinken.

Die Arbeitsgemeinschaft für Krebsbekämpfung Nordrhein-Westfalen hat in einem Forschungsauftrag 1957 die experimentellen Grundlagen der Lehre von Leupold untersuchen lassen (1). Die Ergebnisse waren jedoch nicht überzeugend. Wohl konnten die Kurvenverläufe der Stoffwechselparameter, die zur Tumorentstehung führen sollten, reproduziert werden, nicht aber ihre Auswirkung auf die experimentelle Tumorentstehung. Die Systembewegung war Ausdruck einer unspezifischen Streßreaktion, wie sie auch allein durch die Blutentnahme ausgelöst werden kann. Die Befunde über die therapeutischen Auswirkungen in der Humanmedizin waren widersprüchlich. Von verschiedenen Kliniken wurden jedoch "objektiv nicht zu be-
anstandende Reaktionen an Tumoren und Kranken" beschrieben, die "höchst bemerkenswert" waren und "zu weiterer Beschäftigung mit dem Problem Tumorabbau und Stoffwechselbeeinflussung geben" bzw.

"zu einer stärkeren Bearbeitung dieses Weges ermutigen sollten" (1).

Es soll hier nicht auf die methodischen Unterschiede bei der Nachuntersuchung gegenüber der von Leupold angewandten Methode eingegangen werden. Möglicherweise wurde der Stoffwechselreiz nicht beim Beginn der parasymphatikotonen vegetativen Regulationsumstellung gesetzt, auch wurden keine syngenen oder genetisch zur Tumorentstehung disponierten Tiere mit hoher Tumorzinzidenz verwendet. Die heute favorisierte "genetische Krebs-theorie" (7) läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß Streßsituationen bei genetischer Krebsdisposition die Karzinomentstehung aufgrund einer verminderten Anpassungsfähigkeit durch Labilität der genetischen Regulationen begünstigen. Diese Labilität könnte sich dann auch auf die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegen therapeutische Systembewegungen auswirken.

Therapeutische Konsequenz: zirkadian angepaßte parasymphatische Stimulation.

Obwohl die experimentelle Tumorentstehung nach Leupold nicht bestätigt werden konnte und möglicherweise von genetischen Faktoren entscheidend abhängt, erscheint die Stimulation der parasymphatischen Reaktionsphase als eine sinnvolle Maßnahme bei Malignompatienten, aber auch bei entzündlich-infektiösen Erkrankungen mit verminderter Immunabwehr - die bei Parasymphatikotonus gesteigert ist - wie auch bei allen Krankheiten mit überwiegend sympathikotoner Reaktionstendenz. Beispielsweise Überfunktion von Thyreoidea, Parathyreoidea und Nebennieren.

Bestimmung der in<lhddudJen__ve<^atjven Rgaktionskurve —

Eine zirkadian angepaßte Stoffwechseltherapie ist auch bei anderen Indikationen ohne Proliferationstendenz von Geweben, mit parasympathikotoner Reaktionslage berechtigt. Dazu gehören sowohl degenerative Erkrankungen mit Ablagerungen, besonders von Kalk, Cholesterin, Lipiden, Harnsäure, Pigmenten^und anderen Stoffwechselmetaboliten, als auch neurologische -- und psychiatrische Krankheiten, besonders Morbus Parkinson, Krampfleiden und Migräne, Depressionen und Denkhemmungen, und auch allergische und immunopathogene Autoaggressionen des rheumatischen Formenkreises ^(K-Typen nach Curry bzw A-Typen nach Lampert (5)). Der therapeutische Reiz -sollte hier am Beginn der sympathikotonen Reaktionslage also zwischen 3 00 und 7 00 Uhr bzw 15 00 und 18 00 Uhr gesetzt werden. Die zirkadianen vegetativen Reaktionen lassen sich also sowohl agonistisch als auch antagonistisch, synchron und auch asynchron beeinflussen. Ein Aufschaukeln der vegetativen Rhythmen scheint auch ein erfolgversprechender Weg für die Entwöhnungsbehandlung von Suchtkranken zu sein.

Für eine rhythmusgerechte Behandlung ist es notwendig, den individuellen Zirkadianen Rhythmus zu erfassen. Die von Leopold empfohlenen Stoffwechseluntersuchungen sind hierfür zu aufwendig. Es genügt meist die Registrierung von zeitlichen Veränderungen der Leistungsfähigkeit, der Befindlichkeit, der Reizbeantwortung, der Körpertemperatur, des Appetits, des Schlafbedürfnisses und der Aktivität im Tagesverlauf, um vereinfachend auf eine sympathikotone Reaktionslage zu schließen. Ein-

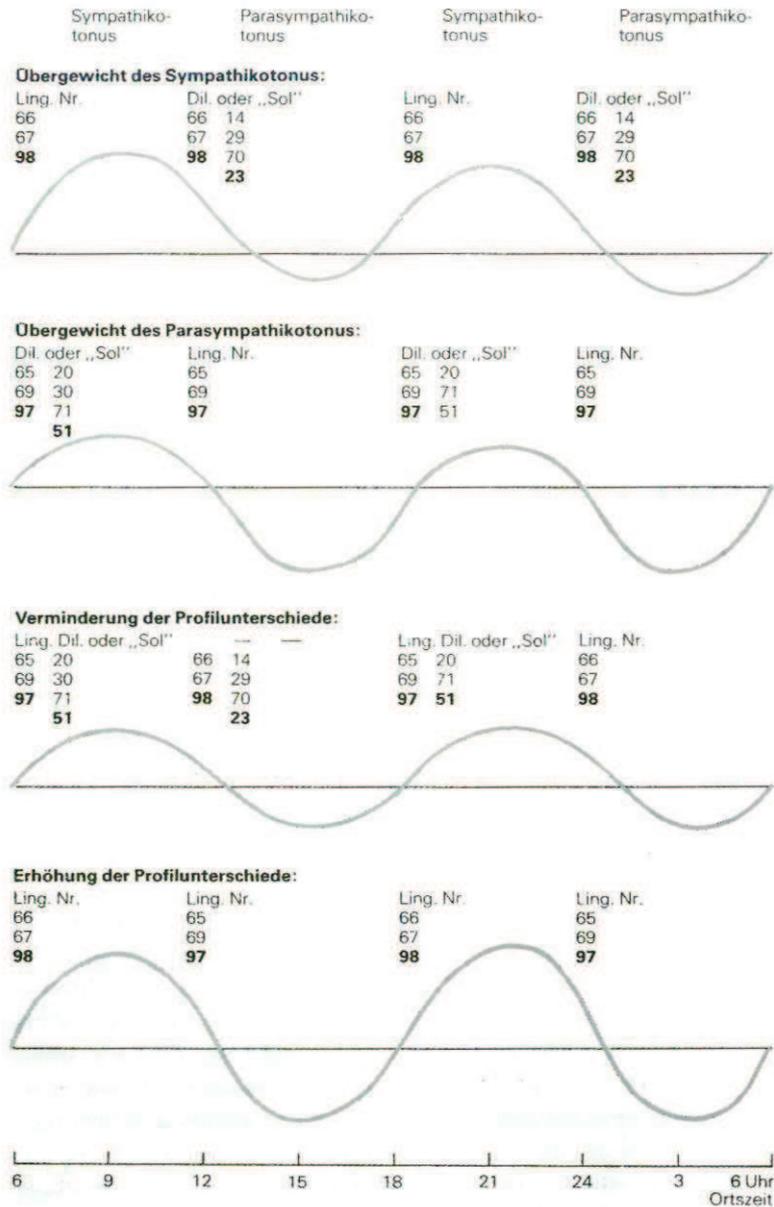
fache Meßmethoden der "aktuellen vegetativen Reaktionslage" zur Festlegung einer "vegetativen Reaktionskurve" (5) bestehen auch in Widerstandsmessungen der Haut (R-C-Messungen nach Hauswirth und Kracmar (2)).

Zur Stimulierung der sympathikotonen Reaktionslage eignen sich alle Faktoren, die während dieser Phase üblicherweise vermehrt sind, und zur Hemmung alle Faktoren, die bei Überwiegen des Parasympathikotonus erhöht sind. Zeitgebende Reiz__ durch Licht, Musik, Wärmeanwendungen und zeitgerechte Nahrungsaufnahme können einen gestörten zirkadianen Rhythmus mit der Umwelt synchronisieren oder einzelne Phasen verstärken oder hemmen.

Beziehungen bestimmter Organe zur parasympathikotonen Phase

Aus der Gegenüberstellung der zirkadianen Schwankungen physiologischer Parameter (6) lassen sich verschiedene Organe zu den antagonistischen Reaktionsmöglichkeiten zuordnen. Eine verringerte sympathikotone Reaktionslage findet sich bei Insuffizienz von Hypophyse, Nebenniere, Schilddrüse, östrogenen Hormonproduktion, Parathyreoidea, eine Verringerung der parasympathischen Tendenzen bei Insuffizienz der androgenen und gestagenen Hormonproduktion sowie von Epiphyse, Pankreas und Thymus. Geeignete Organpräparate können unter Beachtung immunologischer Grundsätze, rhythmusgerecht wiederholt, als Einzelpräparate wie auch in Organkombinationen appliziert werden. Es stehen dafür spezielle Medikamente zur Verfügung (Abbildung).

Eine direkte Beeinflussung durch Sympathikomimetika bzw Parasympathikomimetika in Form von Medikamenten oder Hör-



R

Phasengerechte Applikation bestimmter Org'anpräparate (Revitorgan) bei Störungen der zirkadianen vegetativen Regulation Die Zahlen entsprechen Verdünnungen verschiedener Organkombinationen (Ling = Lingualpräparat zur oralen Applikation, Dil = Dilution, Sol = volllösliche Organtrockensubstanz)

monen wie auch jede blockierende Monotherapie stört, wenn sie übergreifend auf die antagonistische Reaktion wirkt, die Regulationen der natürlichen Biorhythmen und kann zu nachteiligen Nebenwirkungen führen (6) Demgegenüber wirken zyttoplasmatische Extrakte aus Organen (7), die eine besondere Reaktionslage begünstigen, umstimmend und normalisierend

Literatur

- (1) Arbeitsgemeinschaft für Krebsbekämpfung Nordrhein-Westfalen: Überprüfung der wissenschaftl Grundlagen der Lehre von E Leupold: Kampf dem Krebs, Heft 3 (1962)
- (2) Hauswirth, O , Kracmar, F : Arch phys Ther 11 (1959), 6
- (3) Leupold, E : Der Zell- und Gewebestoffwechsel als innere Krankheitsbedingungen (1945); Die Bedeutung des Blutchemismus besonders in Beziehung zu Tumorbildung und Tumorabbau (1954) Thieme, Stuttgart
- (4) Pischinger A : Krebsarzt 21 (1968), 297
- (5) Rilling, S Erfahrungsheilk 17 (1960), 352
- (6) Theurer, K E ; Med Klin 4 (1984)
- (7) Theurer, K E : Med Klin 60 (1965), 1909
- (8) Theurer, K E : Ärztl Praxis 23 (1981), 1709
- (9) Theurer K E : Therapiewoche 33 (1983), 17

Prof Dr med Karl Eugen Theurer

geboren am 17.08.1919 in Stuttgart

Abitur 1938, anschließend Arbeits-, Militär- und Kriegsdienst, Studium der Medizin in Freiburg und Tübingen,

1945 Promotion und Approbation als Arzt,

1948 - 1954 Arztpraxis **mit klinisch-wissenschaftlichem** Laboratorium **und Heilbehandlungsinstitut in** Stuttgart, Entwicklung **der Zytoplasmatischen Therapie und verschiedener serologischer** Methoden,

1954 Gründung der vitOrgan Arzneimittel GmbH in Stuttgart zur Produktion von selbstentwickelten Arzneimitteln, Leiter der wissenschaftlichen Forschungslaboretorien für Organo- und Immunotherapie

1979 Ernennung zum Professor visitante

1984 zum Professor extraordinario für Immunbiologie und

1985 Emeritierung an der UFM (Universidad Francisco Marroquin) Guatemala

1980 Profesor visitante der Faculdades Franciscanas, Faculdade Bandeirante de Medicina, Braganca Paulista, Brasilien

1982 Gastprofessur an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

1985 Profesor extraordinario für Genetik und Immunologia der Universidad Nacional Autonoma de Mexico

1966 Gründungs- und Vorstandsmitglied der Gesellschaft für makromolekulare Organo- und Immunotherapie

1980 "Socio Benemerito do Dart" der Universität Braganca Paulista, Brasilien

1985 Fellow of the Royal Society of Health

1985 Active Member of the New York Academy of Sciences

1985 Socio activo de la Tour A C Sociedad Internacional de Gerontologia, Mexico

1986 Active Member of the Military Surgeons of the United States

Sachverzeichnis

- Abbau, enzymatisch 67, 68
 - **Prozesse** 12
Abderhalden Reaktion 229
Abhängigkeit von
 - Dosis 65
 - Zeit 65
Absättigungsverfahren
 147, 196
Abschnitte (Syntheseinformation) 127
Abscisinsäure 58
Absorbenzien 223
Absorptions-Spektrum 164
Abstoßreaktion 78, 136
Abtrennung 91, 93
Abwehrfermente 224, 227
 - Reaktion 136
 - Stimulatoren 57
Accompanying substances
 103
 Acetyl-Cholin- Rezeptoren
 140
 Acid vapor lysis process
108
 Active factors for
 - micro-organisms 125
 - plants 124
 Activity assay 123
 Adaptation 73, 82
 Adenosinmonophosphat 13
 Adenylzyklase 13
 Adjuvanzien 12, 28, 64, 66
 130, 184, 188, 211
 Adsorbat 23
 Adsorptive Bindungen 58
 Aerosole 37, 54, 86
 Affinitätselektrophorese
 91
 Agglutinationstiter 186
 Agglutinine 27
 Aktivierung von
 - A-Zellen 34
 - Makrophagen 34
 - Monozyten 34
 Akupunktur 35
 Alkalidämpfe 94
 Alkaloide 135
 Alkylierung 64, 67 135, 139
 Allergen 50
 - spektrum 24
 - testung 24
 - **Verdünnung** 23
 Allergie **diseases** 108
 Allergien 32
 Allergisch-anaphylaktische
 Reaktion 65
 Allergologische Grundsätze
12
 Allogene Gewebe 152
 Allotypische Determinante
 87
- Alopezie 179
 Altersdemenz 33
 Aminosäuren 57
 Amphoterer Charakter 58
 Anabolika 59
 Anabolismus 17
 Analogieschlüsse 30
 Anämie 27
 Anaphylaktischer Schock
 147
 Anaphylaxie 25, 146
 Animalische Organe 160
 Ankopplung der DNS 98
 Anoxibiotischer Stoffwechsel
 17
 Anregung, energetische 164
 Antibiotika 47, 50
 Antibody-forming cells 108
 Antideterminante Fragmente
 und Gruppen 28, 39, 127,
 131, 132, 155
 Anti-D-Immunprophylaxe 24
 Antienzyme 57
 Antigene 27, 42, 45, 146,
 206
 Antigen-spezifische Suppres-
 sion 137
 Anti-Idiotyp-Antikörper 29,
 39, 40, 44, 127
 Antikörper-
 - Fragmente 25
 - fragmentär 9, 193
 - Fraktionen 24
 - IgE 29
 - isoale 14
 - pathogene 27
 - primäre 40
 - quantitativ 187
 - spektrum 40, 147
 - synthese 132
 - zellständige 26
 Anti-Menkin-Stoffe 138
 Antimetabolite 135
 Anzüchtung 59
 Apoplexie 69
 Applikation 23, 37 66, 68
 72
 Arteriosklerose 33
 Arthrosen 35
 Arthus-Reaktion 146
 Artspezialität 14
 Arylierung 67
 Arznei-
 - kapseln 174
 - mittel 11, 47, 56
 - mittellösung 50
 - mitteltoleranz 65
 Assaying of biological acti-
 vity 107
 Asthmatische Symptome 25
- Atopische Erkrankungen 17,
 136
 ATP 57
 Aufschließung 211, 220
 Aufschluß 46
 Auftauung 85
 Ausfälle durch
 - Fellbeißen 59
 - Grippe 59
 - Herz-Kreislauf 59
 - Husten 59
 Ausgangsstoffe 23
 Auslösungsreaktion 147
 Autoaggressionskrankheiten
 26
 - allergisch, atopisch 86
 Autoantikörper 69
 Autologe Gewebe 152
 Autologes System 43
 Autosensibilisierung 40, 64,
 68, 139
 Autosonode 191
 Auxine 58
 Avirulenz 128
- Bakterienwuchsstoffe 63
 Bakteriologie 52, 56
 Basistherapeutikum 33
 BCG-Immunisierung 27
 Befeuchtung, rhythmisch 82
 Begleitstoffe 56, 57
 Behandlung, routinemäßig 18
 Benzidin-Methode 44
 Besamung, künstliche 186
 Bestandteile 50
 Bicarbonate 57
 Bioassay 15, 42, 131, 152
 - Systeme, geschädigte 16
 Biochemie 11
 - Mechanismen 16
 Biokleber 73, 78, 82
 Biologically active factors 101
 Biological Response Modifiers
 52, 56, 141
 Biological Sorbent 101
 Biomimetische Analogie 140
 Biomimetische Haptene/Anti-
 gene 39
 - imitierende Stoffe 40
 Biopsiematerial 74
 Blockierung von Rezeptoren
 88
 Blut 60
 Blutgruppen-Antigene 151
 - krankheiten 176
 Blutsysteme 33
 - Liquor-Schranke 33
 Butterfett 50
- Carbohydrate 104

- Carcino-embryonic antigens 111
 Carrier 33, 129, 135
 Certain gene sections 111
 Chalone 13, 132
 Chelatbildung 23
 Chemical digestion 114
 Chemisch
 - inert 73
 - kovalente Bindung 137
 - verfremdet 28
 Chemische Synthese 88
 Chemischer Aufschluß 165
 Chemotherapeutika 47, 57, 218
 Cholesterin 51
 Chorion vom Rind 13
 Chromatographie 58
 Chromosomale Aberration 17, 141
 Chronobiologische Zyklen 15
 Clearing inactive components 122
 Cold **Sterilisation** 106
 Column filling 110
 Combination 103
 Communicating vacuum vessel 113
 Concentration of histologically active factors 126
 Condense 113
 Condensing volatile substances 104
 Conditioning the affinity sorbent 109
 Corticoide 26, 54
 Coupling 105
 - of DNA 116
 - of highly purified DNA **112, 120**
 - of proteins 122
 C-terminaler Anteil 86, 88
 Cystron 15

 Dämpfe von
 - Alkali 94
 - Reagenzien 47, 233
 - Säuren/Persäuren 91, 94
 Darmresorption 174
 Dauerausscheider 23
 Degradation products 109
 Dehydrate 114
 Dekantierung 61
 Denaturierung 22
 Depot **Stoffe** 57
 Depression 15
 Desinfektion 14
 Detergentien 67, 169
 Determinationsstoffe 13
 - chondrogener Faktor 13
 - Nervenwachstumsfaktor 13
 Dextran 44
 Dezidua 148
 Dialyse 58, 95, 228
 Diätpräparate 53, 59
 Diazoniumverbindungen 149
 Diazotierung 61
 Differenzierung
 - neutraler Faktor 13
 - mesenchymaler Faktor 13
 Differenzierungsstoffe 74
 - von Mikroorganismen 225
 Dilutionen 66, 182, 209
 Dinatriumchromoglycat 69
 Dinitrobenzolsulfat 149
 Diphenilmethylpiperazin 54
 Disposition, Geschlecht, Alter 16
 - Endokrinium 16
 - hereditäre 17
 Dissoziation 88, 198
 Disulfidbrücken 44
 Divitalisierte Materialien 73, 84
 DNA-Genabschnitte 156
 DNasen 61
 DNS repair 11
 - semikonservative Synthese 13
 DNS-Zellulose 98, 104
 Doppel emulsion 50
 Dosierung 14
 - Wirkungskurve 16
 Down-Syndrom 17
 Durchblutungsstörungen 33
 Durchlaufverfahren 223
 Durchströmungsverfahren 177
 Dynamisierung 164
 Dysbakterie 23

 Eigenblutbehandlung, Wirkungsoptimum 22
 Eigenbluttherapie 9, 27
 Eigenschaften, pathogenetische 30
 Eihäute 84
 Einfärbung 232
 Einheiten 78
 Einwirkungszeit 49
 Einzelfaktoren 15
 Einzelorganextrakte 62
 Eizellen 183
 Elastin 79, 133
 Elektrophorese 92
 - magnetisches Feld 96
 - phoretic elution 105, 112
 Elektrolyte 57
 Elution 110
 Embryo-fetale Antigene 146
 Emissionsspektrum 164
 Empirie, experimentelle 57
 Emulgator 12, 67, 203
 Emulsion 50, 54, 89, 237
 Encephaline 58
 Endogene Allergien 71
 Endoprothese 79, 84
 Endorphine 58
 Endothelien 34
 Endotoxin 149
 Endozytose 157
 Energieübertragungssysteme 57
 Entdifferenzierung 63
 Enzephalitogenes Protein 139
 Enzymatically decomposing 126
 Enzymatische Vermehrung 155
 Enzymatischer Abbau 93, 98
 Enzymatopathie 141
 Enzymchimäre 13
 Enzyme 41, 56, 58
 Eosinophilie 71
 Epithelialer Abschluß 78
 Epitope 128
 Erkrankungen
 - allergisch 29
 - atopisch 29
 - autoaggressiv 71
 - chromosomal 43
 - Gelenke 69
 - genetisch bedingt 43
 - Magen-Darm-Kanal 52
 - ZNS 69
 Errors of metabolism 17
 Erschöpfte Kulturen 59
 Erythroblastose 24, 28
 Euthetisierung 13
 Exogene Allergien 71
 Exotoxine 149
 Extrakte 52

 Fab-Fragmente 39, 44, 130, 194
 Faktoren, körpereigene 27
 Faserverbund 78
 Fe-Fragment 86, 195
 Feedback-Mechanismen 15, 28
 Fermente 161, 203
 Fetal components 113
 Fetaler Plazentaanteil 176
 Fcto-embryonic antigen 111
 Fett-Extraktion 58
 - Lösungsmittel 60
 Fettmikronen 50
 Fibrin 79
 Filtration 67, 215
 Flavin 205
 Follikelstimulierendes Hormon FSH 205
 Folsäure-Antagonisten 140
 Fragmentierung 199, 203
 Fraktionierungsverfahren 167
 Free-Flow-Elektrophoresis 96
 Freund'sches Adjuvans 33
 Fusion 33
 Futtermittel 56, 181
 - Verwertung 57, 182

- Gärungsfermente 162
 Gefäßsystem 34
 Gefriertrocknung 49, 161
 Gegenaktivierung 14
 - derepressiv 15
 - repressiv 15
 Gegenreaktionen 23
 Gegensensibilisierung 9, 27, 71
 Gehirnfunktion 219
 Geklonte Antikörper 145
 Gelfiltration 58
 Gelpräzipitation 16, 144
 - Chromatographie 44
 Generalisierter Schock 147
 Genetic engineering 15
 Genetische Syntheseinformation 155
 Genetischer Effekt 131
 Gewebeexplantation 73
 Gewebekompatibilität 151
 Gewebzüchtung 56
 Gibberelline 58
 Gifte 146
 Glukokortikoide 53
 Glycerin 209
 Gradienten-Zentrifugation 162
 Granulom 138
 Haarwuchs 179
 - epilation 179
 - follikel 180
 - wurzeln 179
 Halbfragmente 86
 Hämolyse 153
 Haploider Chromosomensatz 184
 Haptensierung 14, 25
 Harnanteile 92
 Harnstoff 61
 Hauterkrankungen
 Helixkonformation 128
 Hemolysis plaque test 108, 115
 Hereditäre Krankheiten 17
 Herzglykoside 54
 Herzwirksame Präparate 219
 Heterozyklen 48, 94
 Heterozyklische Moleküle 151
 High-Zone-Tolerance 68
 Histoin-Kompatibilität 75, 83
 Histokompatibilitäts-Antigene 151
 Hitzeinwirkung 150
 Homogenate 101, 219, 222, 228
 Homogenisierung 61, 167, 168, 193
 Homöopathische Verfahrenswesen 33, 162
 Homöostase 28
 Honig 160
 Hormone 41, 52, 56, 57
 Hühner-Embryonen 47
 Hybridisierung 13
 Hybridomzellen 42
 Hybridzellen 131, 143, 155
 Hydralazine 128
 Hydrolyse 56, 61, 67, 234
 Hygiene 9
 Hyposensibilisierung 14, 192
 Idiotypenspezifität 28, 127
 IgE-Antikörper 28
 IgG (Kaninchen) 87
 Immun-
 - abwehr 69
 - diagnostik 40
 - globuline 51
 - modulatoren 138
 - oge 66
 - opathogene Antikörper 157
 - opathogene Organerkrankungen 136
 - paralyse 68
 - prophylaxe 40
 - stimulatoren 167
 - therapie 40
 - toleranz 187
 Immuntoleranz-
 - durchbrechung 187, 197
 - erzeugung 187, 197
 Impfvaccine 136
 Implantation 73, 82
 - allogene 73
 - alloplastisch 73
 - xenogene 73
 Imprägnierung 234
 Inaktivierung 153
 Indikationsspektrum 29, 68
 Indoleessigsäure 58
 Induktion 11, 197
 Industriegifte 152
 Inert carrier 110
 Infarkt 64, 69
 Informationscharakter 25
 Informativ
 - iRNS 130
 - RNA 156
 - RNS 131
 Inhibition 91
 Injektions-Intervalle 23
 Inkompatible Faktoren 150, 153
 Instruktionstheorie 32
 Insulin 54, 203
 Interferone 34, 58, 132
 Interleukine 34
 Intestinales Strahlensyndrom 52
 Invers passives Arthusphänomen 147
 Invertzucker 160
 Inzisionsenzyme 128
 Ionenaustauscherchromatographie 202
 Ionenmilieu 15
 Ionisierende Strahlen 39
 Isoenzyme 130
 Isolierung der DNS 98
 Isosensibilisierung 151
 Juvenile Gewebeextrakte 188
 Kältekondensator 236
 - konservierung 88
 Kaltsterilisation 48
 Kampfstoffe 152
 Kapseln 70
 Katabolisierung 17, 53
 Killerzellen 26
 Klonen 81
 Klonierung 40
 Kofaktoren 15
 Kollagen 79, 133
 - oren 26, 86, 135
 Kolloidale Komplexverbindung 189
 Kolloide
 - Kolloidum 58
 - Kunststoff 58
 - Zellulose 58
 Kombinations-
 - möglichkeiten 34, 52, 71
 - **präparate** 16, 33
 - **Zytostatika** 141
 Kommunizierende Gefäße 235
 Kompetenz d. Organismus 16
 Komplement-Aktivierung 87
 Komplex-
 - bildung 23
 - **Verbindung** 212, 219
 Kondensation 94
 Kondensierung 48, 203, 204, 220, 235
 Konditionierung 80
 Konglutination 224
 Konjugation 23, 39, 40, 57
 Konjugierte
 - Antigene 130, 146, 147
 - Antikörper 146
 Konservierung 153, 160, 204, 229, 237
 Kontamination 160
 Kontinuierliche Züchtung 177
 Kontrollierte Versuche 17
 Konvalenz 39
 Kopplungsprodukt 194
 Korpuskuläre
 - Partikel 133
 - Zellbestandteile 183
 Kovalente Bindung 95
 Krankheiten 17
 - atopische 17
 - hereditäre 17
 - erworbene 17

- iatrogene 17
- Kulturen von
- Bakterien 57
- Geweben 57
- Zellen 57
- Kulturmedium 151, 197
- Kunsthonig 162
- Kunststoffe 79, 133
- Kupplung 42

- Laserstrahlung 164
- Latenzzeit 14
- Lebensqualität 62
- Lecithin 54
- Leichenorgane 83
- Leukozytenzahl 62
- Lipide 104
- Lipidemulsionen 33
- mikronen 33
- Lipophile Moleküle 171
- Liposomen 50, 80, 86, 89, 129, 157, 168, 171
- Low-Zone-Toleranz 25, 139
- Lungentuberkulose 219
- Lutschbonbon 204
- Lympho-
- zytose 71
- zytin-T 26
- Lyophilisierung 133, 166
- Lyse 14
- Lysierende Stoffe 140

- Major- Histokompatibilitätsfaktor 33
- Makromoleküle 52
- Makrophagen 33
- Maligne Tumoren 176
- Malignom 64, 127
- Markierung
- Antikörper 194
- Methoden 207
- Massenzüchtung 79
- Materialien 74, 78
- Materialunterlage 82
- Materner Plazentaanteil 176
- Mechanische Hinrichtungen 74
- Mediator 43, 142
- substanzen 34, 41
- Membran 171
- defekte 33
- fragmente 33, 50, 51
- pharmaka 30
- MembranoSOME 33
- Messenger-RNS 213
- Metabolisierbare Stoffe 33
- Methylierung 156
- Microorganisms 111, 113
- Mikrobiologie 94
- Mikroorganismen 51, 56, 160, 225
- Mikroporosität 79
- Milchfett 50
- proteine 50

- saccharide 50
- Minimalnährmedium 80
- Mischungen 47, 66
- Mitogene 138
- Mittlerindividuen 158
- Molekular-
- biologie 11
- filtration 54
- genetik 11
- Monolayer-Kultur 82, 153
- Monosubstanzen 9
- therapie 57
- Morbus Alzheimer 34
- Multiple Sklerose 135
- Muskelerkrankungen 34
- sarkom 202
- Mutogene 127
- Myasthenia gravis 135
- Myelomzellen 143
- Myogene Muskeldystrophie 34
- Nabelschnur 84
- Nachblutung 148
- NADP 57
- Nährmedium 57, 74, 144
- Natriumcromolyn 139
- Natural biological antibiotics 111
- Nervensystem 33
- Netzwerk-Theorie 28
- Neuraitherapie 35
- Neuraminidase 172
- Neurotransmitter 58
- Neutralisation 151
- Nitrobenzolsulfonat 44
- Non-destructively sterilizing 126
- Nosoden 23, 189
- Noxe 40
- N-terminale Bezirke 43
- Nucleotide 44, 56

- Oberflächenaktive Stoffe 182
- substanz 59, 209
- Öl-Adjuvanzen 33
- Oleophagic micro-organisms 111
- Onkogene 127, 155
- Onkologie 59
- Operon 15
- Organotherapie 11
- Organ specific active factors 118
- Organ specific components 113
- Organspezifität 14
- Organsubstanzen 14
- transplantation 25, 135
- tropismus 12, 206
- Orthomolekularisierung 13
- Oxidationswirkung 48

- Ozon 94

- Paramunitätsinducer 58
- Partialsynthese 41
- Passagen 79
- Pathogene DNS/RNS 127
- Pathogenitätsfaktor 128
- pc Polyarthrititis 159
- Pepsin 61
- Peptide 56
- Wirkstoffe 39, 104, 130, 132
- Permeabilität 12, 33, 168, 203
- Peroxide 46
- Persäuren 46, 91
- Pflanzen-Antigene 137
- pH 58
- Phagen 171
- Pharmakologie 11
- Phenolüberempfindlichkeit 23, 28
- Phospholipide 51
- Phylogenetik 15
- Physico-chemical fractionating 103
- Pyhtokine 58
- Phytotherapeutische Präparate 53
- Plants inhibiting 113
- stimulating 113
- Plasmide 171
- Plazenta 62, 213
- Pluralismus 9
- Pollenallergie 34
- Polypeptide 56
- Spaltung 56
- Polysaccharide 148
- Porengröße 169
- Prämorbidies Stadium 198
- Präparate-Retard/Depot 70
- Präseasonale Prophylaxe 139
- Prausnitz-Küstner'sche Reaktion 146
- Prävention 69
- Prinzip
- makromolekulare Organotherapie 18
- pathogenetisches 24
- Pharmakologie 18
- Programmierung 12
- Proliferation 13, 214
- Promotor 15
- Prophylaxe 17
- Prostaglandine 13, 58
- Prostatakarzinom 70
- Proteohormone 174, 203
- Protoplasmatische Extrakte 163
- Provokation 23
- Psychopharmaka 207
- Puffer, chromosomal 156
- Puffersubstanzen 56, 57

- Radikale, frei 203
- Radio-immun assay (RIA)

- Radionuklide** 127
Reaggregation 12
Reaktions-
 - Partner 15
 - Produkte 22
 Redoxsysteme 57
 Reduktionistisches Denken 9
Reduktionswirkung 48
Regression 70
Regulation 15, 25, 27, 56, 130
 Reifung des Gehirns 17
 Reiz 18, 32, 33
 Rekombination 13, 203
 Rekonstruktion 78
 Releasing factors 41
 - Hormone 132
Removal of components 112
Reparatur 11
 - material 57
 Replikasen 143, 144
 Repression 15
 Repressoren 130, 213
 Resistenz 17, 56, 62
 Resorbierbares Insulin 204
 Restfeuchtigkeit 221
 Restitution 16
 Restriktionsenzyme 61
 Restwasser 47, 94
 Retrahiertes Fibrin 133
 Retroviren 129
 Rezeptive Wirkgruppen 206
 Rezeptor 41, 138, 206
 - theorie 11, 13
 Rheumafaktoren 29, 195
 Rh-IgG-Anti-Immunglobulin 28
 Rh-Immunsierung 28
 Rinderplazenta 131
 Rogen 184
 Rückkopplung 9
 Rückstände 57

 Saccharide 160
 Salazopyrin 53
 Salben 237
 Salzbildung 220
 Samenzellen 183
 Sarkoidmilz 191
 Säulenfüllung 96
 Säuredampflyse 176
 Schäden durch
 - Strahlen 56, 57
 - zytotoxische Substanzen 56, 57
 Schichtenbau 9
 Schleppermolekül 206
 - **Stoffe** 26, 32
 - Substanzen 196, 218
 Schmerzpunkte 35
 Schutzüberzug 174
 Schwangerschaft 24
 - diagnostikum 231

 Schwefelsäuredampf 212
 Screening-Spektrum 41
 - Test 40
 Sehnenansätze 35
 Selbstheilungsvorgänge 52
 Selective adsorption 117, 123
 Selektionsmedium 145
 Semiplazenten 176
 Sensibilität 66, 69, 136, 143
 Separating 105, 109
 Separation 110, 116
 SH-Gruppen 44
 Sirup 163
 Somatotrope Hormone 44, 205
 Somatotropin 54
 Spermien 183
 Spezifische Immuntoleranz 65
 Spezifität 12, 39
 Sprühtrocknung 161
 Spurenelemente 33, 52, 56, 57, 184
 Stabilisierung 160
 Stammlösung 23
 - zellen 13
 Stanzzylinder 79
 Statistik 17
 Stepping up of immun defen-
 fense 108
 Stereospezifität 41, 172
 Sterilfiltration 163
 Sterilisation 46, 91, 93, 104, 105, 111
 Steuerung 24
 Stimulating fractions 110
 - substances 101
 Stimulatoren 130, 135
 Stimulierung 11, 17, 56, 81
 Stoffmischungen 166
 Stoffwechselmediatoren 13
 Störungsfeld, neural 35
 Strahlenschaden 127
 - Syndrom 40
 - toxine 43, 150, 158
 Stroma 176, 178
 Substanzen, oberflächen-
 aktiv 56, 57
 Substitution 11
 Sulfatierung 67
 Suppression 28
 Suspension 66, 70
 Sympathikotonus 53
 Symptome, asthmatoide 25
 Synchronisation 179
 Synthese, enzymatisch 13
 - information 159
 - **Stimulierung** 12
 System, **energieübertra-**
gend 56
 - komplex 9

 Tannin-Methode 148, 172

 Testing animals 115
 Theophyllin 54
 Therapie d. Atopie 139
 Thrombozyten 216
 Toleranz 15, 64, 211
 - verfall 66
 Totalextrakt 65
 Toxic effects 107
 Toxin-Antitoxinbindung 151
 Trägermaterial 91, 95, 206
 - **Stoffe** 127, 137
 Transaktivator-Gen 129
 Transferfaktor 142
 Transformierte Zellen 143
 Transplantations-Antigene 192
 Transportgefäß 82
 Trennmittel 92
 Trennung von Faktoren 92
 Tropfinfusion 69
 Tropismus 206
 Tumorassoziierte
 - Antigene 146, 178
 - Zellen 143
 Tumor-Enhancement 148
 Turbomischer 168

 Überkreuzreaktion 68, 71,
 151, 228
 - toleranz 68, 71, 151, 228
 Überlebenskulturen 153
 - rate 62
 - zeit 31
 Überpflanzung 72
 Überströmtechnik 54
 Überträgerstoffe 52, 56
 Ultraschall 50, 51, 54
 Umweltschäden 57
 Umwandlung, immunologisch 23
 Undesired accompanying
 substances 104
 Unfallopfer 157
 Untereinheiten 50, 59
 Untersuchungen, tierexperi-
 mentell 25

 Vakuum-Säuredampflyse 209
 Vapor phase 112
 Vapors of acids 106
 - alkalis 106
 Vehikel 12, 52, 171, 194
 Verankerung 78
 Verbrennungen 39, 69, 8Q,
 127, 158
 Verbrennungstoxine 43, 150
 Verfremdung 29
 Verfütterung 17
 Verhaltensweisen 181
 Vernetzungen 9
 Verstoffwechslung 59
 Versuche, anaphylaktisch 25
 Viral components 112
 Viren 46, 48, 49, 94, 171

Kombinationspräparate aus fötalen und jugendlichen Anteilen normalisieren die Funktionen nach beiden Richtungen

Die makromolekulare Organotherapie wird seit fast drei Jahrzehnten in Praxis und Klinik angewandt Ihre Wirkung ist statistisch an Tausenden von Behandlungsfällen in der Praxis mit einer Erfolgsquote von über 80 Prozent (28) sowie in kontrollierten klinischen Doppelblindstudien (4, 17, 21, 29, 30, 45) nachgewiesen Die Behandlung kann heute weitgehend routinemäßig durchgeführt werden, ohne Therapieschäden befürchten zu müssen

Die experimentellen Beweise für die makromolekulare Organotherapie stammen bisher hauptsächlich aus den theoretischen Fächern und der Grundlagenforschung Die Pharmakologie ist aber in besonderem Maße der Klinik und Praxis verpflichtet Sie hat die Aufgabe, diese Forschungen weiterzuführen und die Ergebnisse zum Nutzen der Kranken in ihre Lehre einzugliedern

Gegenüberstellung

Prinzipien der Pharmakologie

Art der Pharmaka:

Körperfremde, z T biologisch nicht vorkommende und nicht in den Zellstoffwechsel integrierbare bzw replizierbare Stoffe Endprodukte der Synthesevorgänge wie Hormone, Funktionsstoffe, Enzyme Einzelstoffe, möglichst keine Substanzmischungen

Prüfung:

Toxikologisch meist am gesunden Tier
Chemische Prüfungsmethoden für Pharmakokinetik
Kontrollierte klinische Untersuchungen auf Haupt- und Nebenwirkungen, therapeuti-

scher Index, therapeutische Breite

Dosis Wirkungskurve

Konzentrations-Wirkungskurve

Effektivdosis

Therapeutischer Index, therapeutische Breite

Biotransformation, Entgiftung, Abbau, Enzyminduktion, Elimination

Chemische Immunsuppression durch zytotoxische oder Hemmwirkung auf Zellen oder Gewebe des Immunsystems Möglichkeit von iatrogenen Schäden Arzneimittelmißbrauch durch Gewöhnung Sucht

Wirkung:

Aufgrund von Struktur-Wirkungs-Beziehungen über Rezeptoren-Änderung der lokalen biologischen Eigenschaften am Reaktionsort durch Reiz, der den Effekt auslöst Unmittelbarer Wirkungseintritt, zeitlich beschränkte symptomatische Wirkung, Durchbrechung von körpereigenen cybernetischen Regulationsvorgängen, keine Übertragung von genetischen Informationen oder spezifischen Untereinheiten für intrazelluläre Synthesevorgänge

Notfall- und überbrückungstherapie

Prinzipien der makromolekularen Organotherapie

Art der Pharmaka:

Zellinhaltsstoffe und daraus gewonnene spezifische Untereinheiten aus phylogenetisch nahestehenden Individuen mit analoger biologischer Funktion, insbesondere aus Syntheseketten und Regulationsmechanismen

Natürliche Substanzgeniisse aus gesunden Individuen im natürlichen Mengenverhältnis

- Virus infected dry powder 115
- Viruses inhibiting factors 126
- Viskositätsgrad 161
- Vitalismus 9
- Vitalkonservierung 74 80 83
- Vitrikationsflüssigkeit 74
- Voll-Antigen 40
- Vorbehandlung 80
- Vorläuferzellen 13
- Vorsensibilisierte Immun-systeme 43
- Zellen 40
- Vortestung 70
- Wachstumshormone 54, 132
- **Stoffe** 74, 82
- Waldsterben 56, 61
- Wasser-in-öl-Emulsion 174
- **Stoffkonzentration** 221
- Wäßrige Lösung 64
- Wiederbelebungsbehandlung 30
- holungskurven 70
- Wirkfaktoren 56
- Wirkung, direkt 12
- indirekt 12
- Mechanismus 22
- prophylaktisch 17
- therapeutisch
- Umkehr 17
- Wuchsstoffe 58, 91, 132
- X-Chromosom 183
- Xenogene Organgewebe 33, 65, 152
- Y-Chromosom 183
- Zahnverlust 81
- Zeitpunkt, günstiger 30
- Zellelektrophorese 215
- extrakt 51
- fraktionen 169
- homogenate 92
- kerne 183
- kulturen 65, 128
- marker 42
- membran-Antigen 136
- membranporen 33
- rasen 74
- rassen 178
- reparative Pharmaka 50
- **Spaltung** 56
- teilungskapazität 56
- teilungsrate 78
- teilungszyklen 15
- therapie (Neuhaus) 66
- tropismus 32, 168
- uläre Abwehr 166
- uläre Antikörper 187
- ulartherapie 9
- und Gewebezüchtung 134, 176, 177
- Zellen, mobile 193
- Zentrifugatoren 67
- Zielorgan 171
- Zirkulierende Antikörper 187
- Zitzentest 25
- Zuckernukleotide 162
- Zusatztierfutter 182
- Zytopharmatische Therapie 9, 12, 39, 66, 232
- Zytostatika 43, 218
- Zytostatische Antikörper 159
- Stoffe 135, 137
- toxische Stoffe 135, 137
- toxische Substanzen 26, 43, 57
- trope Substanzen 53