



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 657 989 A5

⑤ Int. Cl.: C 07 K 15/14
A 61 K 37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteiner Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 1161/82

㉒ Anmeldungsdatum: 25.02.1982

③① Priorität(en): 27.02.1981 JP 56-28554
27.02.1981 JP 56-28553

㉔ Patent erteilt: 15.10.1986

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.10.1986

⑦③ Inhaber:
Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.,
Naruto-shi/Tokushima-ken (JP)

⑦② Erfinder:
Suzuki, Naoyoshi, Nakano-ku/Tokyo (JP)
Hirose, Tsuneo, Obihiro-shi/Hokkaido (JP)
Osaki, Humio, Tokushima-shi/Tokushima (JP)

⑦④ Vertreter:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤④ **Biologisch aktive Substanz, Verfahren zur Herstellung der Substanz, sowie die Substanz enthaltende, immunoaktive Zusammensetzung.**

⑤⑦ Die neue, biologische Substanz ist ein Glycoprotein und weist eine Molmasse von 2'000 bis 5'000 auf bei Bestimmung mittels Gelfiltrationsmethode.

Die neue Substanz inhibiert die Vermehrung von unter anderem Toxoplasmen in homologen und heterologen Zellen.

Ihre chemischen Eigenschaften sind im Patentanspruch 1 charakterisiert.

Zur Herstellung der neuen biologisch aktiven Substanz wird ein Substrat aus Blutplasma oder überliegender Kulturflüssigkeit von Milzzellen von Tieren verwendet, welche vorgängig hyperimmunisiert worden sind. Auf das Substrat wird nun ein proteolytisches Enzym einwirken gelassen. Aus diesem Gemisch wird nach Erwärmen zur Inaktivierung des Enzyms sowie nach eventueller Hydrolyse die genannte neue Substanz gewonnen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Biologisch aktive Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz ein Glycoprotein ist, das eine Molmasse von 3000 bis 5000, bestimmt mittels einer Gelfiltrationsmethode, hat und Aktivität zur Inhibierung der Toxoplasma-vermehrung in homologen und heterologen Zellen zeigt und die folgenden physikalischen und chemischen Eigenschaften aufweist:

a) Löslichkeit: frei löslich in Wasser und praktisch unlöslich in Methanol, Äthanol, Äther, Benzol, Chloroform und Aceton;

b) Verhältnis von Zucker- und Proteingehalte: Protein 85 bis 90%, Hexosamin 9 bis 13% und Hexose als Glucose berechnet 1 bis 2%;

c) konstituierende Aminosäuren des Proteinanteils: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Tryptophan, Histidin, Arginin und Prolin;

d) Gehalte an Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin in der Summe aller Aminosäuren: 45 bis 65 Gew.-%;

e) pH einer 1 G/V %-igen, wässrigen Lösung: 7,0 bis 7,2;

f) thermische Stabilität: wenn eine 1 G/V %-ige wässrige Lösung der Substanz während 30 Minuten auf $60 \pm 0,1$ °C gehalten wird, behält die Lösung die Immunoaktivität zur Inhibierung von Toxoplasma-vermehrung in homologen und heterologen Zellen bei;

g) IR-Absorption: charakteristische Absorption erfolgt bei den folgenden Wellenzahlen (cm^{-1}): 3600 bis 2900 (stark), 1700 bis 1500 (stark), 1440 bis 1380 (mittel), 1160 bis 1080 (mittel), und 550 (mittel);

h) UV-Absorption: maximale Absorption wurde gefunden bei 274 bis 276 nm für eine 0,1 G/V %-ige wässrige Lösung;

i) Farbreaktionen: positiver Lowry-Folin Prozess, Ninhydrinreaktion, Phenol-Schwefelsäure-Reaktion und Elson-Morgan's Reaktion;

j) Farbe und Aussehen: weiss und amorph.

2. Verfahren zur Herstellung der biologisch aktiven Substanz gemäss Patentanspruch 1, gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte des Einwirkenlassens eines proteolytischen Enzyms auf mindestens eines der Substrate aus der folgenden Gruppe:

(A) Blutplasma oder Serum eines mit Protozoen hyperimmunisierten Säugers,

(B) Kulturflüssigkeit über Milzzellen eines mit Protozoen hyperimmunisierten Säugers und

(C) Kulturflüssigkeit über Milzzellen eines Säugers im Normalzustand, die in Gegenwart von einer Kulturflüssigkeit gemäss (B) und/oder von einem spezifischen Antigen inkubiert ist, und

der Erhitzung der erhaltenen Mischung zur Inaktivierung des Enzyms und Abtrennung der gesuchten Substanz.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, in dem nach der Einwirkung des Enzyms auf das Substrat eine Hydrolyse der erhaltenen Mischung erfolgt.

4. Verfahren gemäss Patentanspruch 3, in dem das Protozoon aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Toxoplasma, Plasmodium und Babesia und in dem das proteolytische Enzym aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Pronase, Papain, Chymotrypsin, Trypsin, Aminopeptidase und Carboxypeptidase.

5. Verfahren gemäss Patentanspruch 4, in dem das Protozoon Toxoplasma ist.

6. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, in dem das Ausgangsmaterial (A) ist, d. h. Blutplasma oder Serum eines mit Protozoon hyperimmunisierten Säugers ist.

7. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, in dem das Ausgangsmaterial (B) ist, d. h. die Kulturflüssigkeit über Milzzellen eines mit Protozoon hyperimmunisierten Säugers ist.

8. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, in dem das Ausgangsmaterial (C) ist, d. h. die Kulturflüssigkeit über Milzzellen eines Säugers im Normalzustand, die in Gegenwart von einer Kulturflüssigkeit (B) und/oder von einem spezifischen Antigen inkubiert ist.

9. Biologisch aktive Substanz, hergestellt nach dem Verfahren gemäss einem der Patentansprüche 2 bis 8.

10. Immunoaktive Zusammensetzung, umfassend als eine aktive Komponente die biologisch aktive Substanz gemäss Patentanspruch 1, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren, nicht toxischen Träger.

15

20 Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue, biologisch aktive Substanz, ein Verfahren zur Herstellung der genannten Substanz sowie immunoaktive Zusammensetzungen, welche die genannte Substanz enthalten.

Es ist kürzlich festgestellt worden, dass im umlaufenden Blut von toxoplasma-hyperimmunen Tieren ein Mediator vorliegt, welcher die Vermehrung von Toxoplasma in Normalzellen desselben Tieres inhibiert. Es ist ebenso festgestellt worden, dass wenn Milzzellen von toxoplasma-hyperimmunen Tieren in Gegenwart eines spezifischen Antigens wie beispielsweise Toxoplasma-antigenen (im folgenden «TLA» genannt) oder in Gegenwart eines nicht spezifischen Mitogens, wie beispielsweise Concanavalin A (im folgenden «Con A» genannt) oder Phytohemagglutinin (im folgenden «PHA» genannt) kultiviert wird, die überliegende Flüssigkeit der erhaltenen Kultur Faktoren enthält, welche die Vermehrung von Toxoplasma in homologen Zellen inhibiert (Igarashi I., Zbl. Bakt. Hyg., J. Abt. Orig. A244, 374–382, 1979; Shirahata T., et al., Z. Parasit., 53, 31–40, 1977; und Nagasawa et al., Immunobiology, 157, 307–319, 1980).

Der die Toxoplasma-vermehrung inhibierende Faktor ist ein Protein, welches eine Substanz zu sein scheint, die ein T-Lymphocyt produziert und welche eine Molmasse von etwa 30 000 bis etwa 40 000 hat. Der Faktor, welcher mit «Toxogif» bezeichnet wird, inhibiert nur die Toxoplasma-vermehrung in homologen Zellen. Der Faktor ist nicht imstande, wesentliche Inhibierungsaktivität in heterologen Zellen zu entwickeln. Er zeigt daher Spezifität hinsichtlich der Species. Demgemäss kann der Faktor nicht verwendet werden, um Toxoplasmosis in Menschen oder anderen Tieren als dem angesteckten Tier zu verhüten oder zu heilen.

Ein Ziel dieser Erfindung ist es, eine neue, biologisch aktive Substanz bereitzustellen, die unspezifisch ist hinsichtlich der Species, die aber Immunoaktivität zeigt hinsichtlich der Inhibierung von Toxoplasma-vermehrung und zwar auch in heterologen Zellen.

Ein weiteres Ziel dieser Erfindung ist es, eine biologisch aktive Substanz bereitzustellen, welche die Immunoaktivität zur Inhibierung der Vermehrung von nicht nur Toxoplasma, aber auch anderer Protozoen, Virus, Bakterien und ähnlicher Mikroorganismen wie auch von Tumorzellen, zeigt.

Ein weiteres Ziel dieser Erfindung ist es, ein Verfahren anzugeben, um die neue, biologisch aktive Substanz zu erhalten.

Ein weiteres Ziel dieser Erfindung ist es, immunoaktive Zusammensetzungen bereitzustellen, die protozoocidal, baktericidal, virucidal und antitumoral wirken, wobei die genannten Zusammensetzungen die oben erwähnte biologisch aktive Substanz enthalten.

Diese und weitere Ziele dieser Erfindung werden in der nun folgenden Beschreibung erläutert.

Die erfindungsgemässe, biologisch aktive Substanz ist im vorangehenden Patentanspruch 1 charakterisiert; das Verfahren zur Herstellung der genannten Substanz im ebenfalls vorangehenden Patentanspruch 2. Vorteilhafte Weiterbildungen des Verfahrens, dessen Ergebnis und eine Verwendung der erfindungsgemässen Substanz ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 10.

Die biologisch aktive Substanz gemäss dieser Erfindung zeigt unter anderen die folgenden physikalischen und chemischen Eigenschaften und strukturellen Eigenheiten:

1) Molmasse

Die Substanz gemäss dieser Erfindung zeigt eine Molmasse von 3000 bis 5000, bestimmt mittels der Gelfiltrationsmethode. Die genannte Methode wird ausgeführt an Sephadex G-100 (vernetztes Dextrangel, Produkt der Pharmacia Co., Uppsala, Schweden), an Toyopearl HW-40 oder HW-50 (Polyvinyl-Typgel, Produkt der Toyo Soda So., Ltd. Japan) und an Sephacryl S-200 (vernetztes Allyl-Dextrangel; Produkt der Pharmacia Co., Uppsala, Schweden). Die Molmasse wird bestimmt anhand des Eluierungsdiagrammes, wobei dieses mit demjenigen von bekannten Substanzen verglichen wird. Die Molmasse, die mittels einer anderen Gelfiltrationsmethode an Sephacryl S-200 und Sephadex G-15 (vernetzte Dextrangele, Produkt der Pharmacia Co., Uppsala, Schweden), erhalten werden, liegen ebenfalls zwischen 3000 und 5000.

2) Löslichkeit in Wasser

Die Substanz ist frei in Wasser löslich (gemäss Jap. Pharmacopoeia, 10. Auflage, Regel 22).

3) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln

Ebenfalls gemäss Jap. Pharmacopoeia, 10. Auflage, Regel 22, ist die Substanz praktisch unlöslich in Methanol, Äthanol, Äther, Benzol, Chloroform und Aceton.

4) Verhältnis von Kohlehydrate- und Protein-Gehalten

Die Substanz umfasst Glycide, die hauptsächlich Hexose und Hexosamin enthält. Der Hexosegehalt wird bestimmt durch die Phenol-Schwefelsäurereaktion, der Hexosamingehalt mittels der Elson-Morgan-Methode. Der Proteingehalt wird bestimmt mittels einer Gesamtstickstoffmessung und zwar mittels der Messanlage Modell MCI TN-02 (Produkt der Mitsubishi Kasei Co., Ltd., Japan). Die derart erhaltenen Resultate in Gewichtsprozenten sind die folgenden:

Protein	85 bis 90 Gew.-%
Hexosamin	9 bis 13 Gew.-%
Hexose (als Glucose berechnet)	1 bis 2 Gew.-%

5) pH-Wert

Eine wässrige Lösung der erfindungsgemässen, biologisch aktiven Substanz mit der Konzentration von 1 Gew./Vol.-% weist einen pH-Wert von 7,0 bis 7,2 auf.

6) Thermische Stabilität

Eine 1 G/V-%-ige wässrige Lösung der erfindungsgemässen Substanz zeigt, auch wenn sie 30 Minuten lang auf eine Temperatur von $60 \pm 0,1$ °C erwärmt wird, die Immunoaktivität und die Aktivität, Toxoplasmavermehrung in homologen Zellen und heterologen Zellen zu inhibieren.

7) IR-Absorptionsspektroskopie

Die beigelegte Figur 1 zeigt ein IR-Analysendiagramm unter Verwendung von KBr. Das Diagramm zeigt die folgenden charakteristischen Absorptionswerte (in cm^{-1}):

3600 bis 2900 (stark), 1700 bis 1500 (stark), 1440 bis 1380 (mittel), 1160 bis 1080 (mittel), 550 (mittel).

8) UV-Absorptionsspektroskopie

Die beigelegte Figur 2 stellt ein UV-Analysendiagramm dar, welches in einer 1 cm Cuvette für eine 0,1 G/V-%-ige wässrige Lösung der erfindungsgemässen Substanz erhalten wird. Das Diagramm zeigt eine maximale Absorption bei 274 bis 276 nm.

9) Farbreaktionen

Eine 0,1 G/V-%-ige wässrige Lösung der erfindungsgemässen Substanz wird auf Farbreaktionen untersucht und zwar mit den folgenden Resultaten:

Lowry-Folin Prozess (Peptid-Bindung):	positiv
Ninhydrin-Reaktion (Aminosäure):	positiv
Phenol-Schwefelsäurereaktion (Saccharide):	positiv
Elson-Morgan's Reaktion (Amino-Zucker):	positiv

10) Farbe und Aussehen

Weiss und amorph.

11) Konstituierende Aminosäuren

Der Proteinanteil der erfindungsgemässen Substanz umfasst: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Tryptophan, Histidin, Arginin und Prolin. Diese Aminosäuren werden analytisch bestimmt mittels eines handelsüblichen Aminosäure-Analysators. Zur Bestimmung von Tryptophan wird die Neubauer-Rhode-Reaktionsmethode (Jap. Pharmacopoeia, 10. Ausgabe, C-1108 (1981)) verwendet.

Unter den genannten konstituierenden Aminosäuren liegen vor allem vor: Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin. Die Analyse mittels des obengenannten Aminosäureanalytators hat gezeigt, dass die Gehalte dieser drei Komponenten 45 bis 65% des Gesamt-Aminosäureanteils ausmachen.

Die erfindungsgemässe Substanz weist unter anderen eine einzigartige Aktivität zur Inhibierung von Toxoplasmavermehrung sowohl in heterologen wie auch in homologen Zellen auf. Die Aktivität zur Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in heterologen Zellen bedeutet die Aktivität, Toxoplasmavermehrung auch in Zellen zu inhibieren, welche nicht vom gleichen Säuger stammen, wie die Ausgangsmaterie zur Herstellung der genannten aktiven Substanz. Diese Aktivität wird weiter unten anhand von Untersuchungen erläutert werden.

Proteine, welche die Toxoplasmavermehrung in homologen Zellen inhibieren, sind schon bekannt; ein Beispiel dafür ist das Toxo-GIF. Diese bekannten Inhibitoren zeigen also, definitionsgemäss, Spezifität in der Species. Sie sind also nicht imstande, Toxoplasmavermehrung in heterologen Zellen zu inhibieren. Zudem zeigen die genannten bekannten Proteine Molmassen zwischen 30 000 und 40 000. Die bekannten Substanzen unterscheiden sich daher ganz klar von denjenigen gemäss dieser Erfindung. Tatsächlich ist die Anwesenheit irgendeiner Substanz, die die Toxoplasmavermehrung in heterologen Zellen inhibiert, nicht bekannt. Das genannte, neue Glycoprotein mit der oben definierten Aktivität und einer Molmasse zwischen 3000 und 5000 ist in dieser Erfindung zum ersten Mal dargestellt und beschrieben worden.

Die Substanz gemäss der vorliegenden Erfindung hat die obengenannten physikalisch-chemischen Eigenschaften, die ebenfalls obengenannten strukturellen Eigenheiten und als biologische Eigenschaft die Aktivität, Toxoplasmavermehrungen auch in heterologen Zellen zu inhibieren. Die Sub-

stanz ist daher nützlich als toxoplasmacidale Wirksubstanz zur Anwendung bei Menschen und anderen Säugern. Die zu dieser Erfindung gehörenden Untersuchungen haben ferner gezeigt, dass die erfindungsgemässe Substanz nicht nur gegenüber Toxoplasma aktiv ist, sondern auch noch die Vermehrung anderer Protozoen, sowie verschiedener Bakterien, Bazillen, Virus und anderer Mikroorganismen inhibiert. Beispiele solcher Bakterien sind gram-positive Bakterien der Species *Micrococcus*, *Bacillus*, usw., gram-negative Bakterien der Species *Escherichia*, *Proteus*, usw. Die erfindungsgemässe Substanz zeigt weiter auch Immunoaktivität zur Inhibierung der Vermehrung von Tumorzellen. Daher ist die erfindungsgemässe Substanz auch nützlich als Wirkstoff für die Verhinderung und Heilung von Infektionen von gesunden Säugern mit den obengenannten Mikroorganismen; d. h. sie zeigt toxoplasmacidale, baktericide und virucidale Aktivität. Die Substanz ist auch nützlich als Antitumor-Wirkstoff.

Das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen aktiven Substanz wird im folgenden detailliert beschrieben.

Die Substanz wird erhalten durch Einwirkung eines Enzyms auf Substrate, die vom Blut oder von den Zellen von verschiedenen Säugern erhalten werden, nämlich durch Einwirkung eines proteolytischen Enzyms auf mindestens eines der folgenden Substrate:

(A) Blutplasma oder Serum von einem Säuger, welcher mittels Protozoa wie beispielsweise Toxoplasma, hyperimmunisiert ist.

(B) Kulturlösung über eine Kultur von Milzzellen eines Säugers, der mit Protozoa wie Toxoplasma hyperimmunisiert ist und

(C) Kulturlösung über eine Kultur von Milzzellen eines gesunden Säugers, welche Zellen in Anwesenheit von einer Kulturlösung (B) und/oder von einem spezifischen Antigen inkubiert sind.

Das so erhaltene Gemisch wird erwärmt zur Inaktivierung des Enzyms, worauf die biologische aktive Substanz aus dem Gemisch gewonnen werden kann. Bevorzugterweise wird das Zwischenprodukt nach der Proteolyse vor der Erhitzung hydrolysiert.

Das Blutplasma oder Serum (A) als Substrat wird mittels bekannter Methoden erhalten. Beispielsweise durch das Auffangen des Bluts eines Säugers, der zuvor gemäss einer in der weiter oben angegebenen Literatur beschriebenen Methode mit Protozoa hyperimmunisiert worden ist. Beispiele für Säuger, die dafür verwendet werden können, sind: Mäuse, Hunde, Ochsen oder Kühe, Pferde, Ziegen, Schafe, Kaninchen, Schweine und verschiedene andere Säuger. Unter den genannten Säugern sind Mäuse, Hunde und Rinder die bevorzugten Tiere. Die einzusetzenden Protozoen sind nicht speziell kritisch. Es werden aber bevorzugt Sporozoen verwendet, speziell Toxoplasma wie Toxoplasma *Gondii*, Haemosporidien wie Plasmodium *Berghei* (NK-Gattung) und Piroplasma wie Babesia *Gibsoni*, Babesia *Rhodhaini*, Babesia *Ovata* und Babesia *Sergenti*.

Wenn nun einer der obengenannten Species von Säugern irgendein Protozoon inokuliert wird, bildet sich die erfindungsgemässe Substanz, die später, nach deren Isolierung, die Vermehrung von anderen Protozoen und zugleich noch bei anderen Species, inhibiert. Beispielsweise wird eine Substanz, welche gemäss dieser Erfindung durch Inokulierung von Toxoplasma *Gondii* in Mäusen gewonnen wird, immunoaktiv sein und die Toxoplasmavermehrung, die Vermehrung von Plasmodium und anderen Protozoen in Zellen von Mäusen, Hunde, Rinder und verschiedenen anderen Säugern, inhibieren.

Der Säuger kann mit dem Protozoon hyperimmunisiert werden einfach durch Inokulierung des Säugers mit dem

Protozoon. Die Inokulierung kann intraperitoneal, intravenös oder oral geschehen. Die Menge der Protozoen für die Inokulierung ist nicht speziell kritisch und variiert mit der Art des Säugers. Sie hängt auch ab von Protozoon und von der Inokulationsmethode. Es ist normalerweise günstig, zwischen 10^2 bis etwa 10^8 Protozoen pro Säuger zu inokulieren. Die Inokulation kann in verschiedenen Etappen, beispielsweise zwei oder drei Impfungen, geschehen. Bevorzugterweise kann der Säuger wie folgt inokuliert werden: Etwa 10^2 bis etwa 10^8 Protozoen zum ersten mal und etwa 10^4 bis etwa 10^8 Protozoen eine gewisse Zeit später, normalerweise 3 bis 10 Wochen nach der ersten Impfung.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird der Säuger vorerst mittels Inokulierung mit Protozoen hyperimmunisiert und anschliessend mit einem spezifischen Antigen und/oder mit einem nicht spezifischen Mitogen inokuliert. Der Ausdruck «spezifisches Antigen» bezieht sich auf ein Antigen, das gegenüber dem eingesetzten Protozoon Spezifität aufweist.

Spezifische Antigene, die im erfindungsgemässen Verfahren eingesetzt werden können, sind verschieden, je nach eingesetztem Protozoon. Beispielsweise wird für Toxoplasma als Protozoon TLA als spezifisches Antigen verwendet. Im Falle von Plasmodium und Babesia sind nützliche, spezifische Antigene Plasmodium Lysat-Antigen (im folgenden «MLA» genannt) und Babesia Lysat-Antigen (im folgenden «BLA» genannt.) Diese spezifischen Antigene sind bekannt und beispielsweise wie folgt erhältlich: Das Protozoon wird mit Ultraschall-Energie behandelt und die so erhaltene Mischung so wird zentrifugiert, um so wässrige Fragmente davon abzutrennen (siehe dazu Jacobs, L. und M.N. Lunde, J. Parasitol., 43, 308—314 (1957), und Ishimine, T., et al., Jap. J. vet. Sci., 41, 487—493 (1979)). Der Ausdruck «nicht spezifisches Mitogen» wird hier verwendet zur Bezeichnung eines Lectin, welches die Blastoid-Transformation von Lymphocyten bewirkt. Typische solche nicht spezifische Mitogene sind: Con A, PHA, usw. Das spezifische Antigen oder das nicht spezifische Mitogen werden normalerweise einige Wochen nach der Inkubation mit den Protozoen verabreicht. Es ist von Vorteil, die Inokulation der Protozoen in zwei oder mehr Schritten auszuführen und das spezifische Antigen oder das nicht spezifische Mitogen in den Wochen 1 bis 5 nach der Inokulierung, bevorzugterweise in der zweiten Woche nach der letzten Inokulierung mit dem Protozoon, zu verabreichen.

Das spezifische Antigen oder das nicht spezifische Mitogen wird intravenös verabreicht und zwar in einer Menge von ungefähr 5 bis ungefähr 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Lebendgewicht des Säugers. Die Methode, die Menge und die Zeit der Inokulation werden selbstverständlich angepasst werden an die Art des spezifischen Antigens und/oder des nicht spezifischen Mitogens, an die Species des Säugers usw. Die Hyperimmunisierung mit Protozoen geschieht im Säuger normalerweise im Zeitraum von etwa 10 bis 100 Tagen nach der letzten Inokulierung mit den Protozoen, d. h. mindestens 24 Stunden nachdem das spezifische Antigen oder das nicht spezifische Mitogen verabreicht worden ist. Das Blutplasma oder das Serum kann nun vom derart inokulierten Säuger gewonnen werden.

Die Kulturlösung (B), die ebenfalls für die Herstellung der erfindungsgemässen Substanz verwendet werden kann, kann wie folgt gewonnen werden:

Vorerst wird ein Säuger wiederum mittels Protozoen hyperimmunisiert. Dies geschieht analog dem Vorgehen zur Gewinnung der Ausgangssubstanz (A). Anschliessend wird die Milz des derart vorbehandelten Säugers entfernt. Die Milzzellen werden zubereitet gemäss der Methode nach Conroy-Ficoll, Immunol. Cell., 1, 265—268 (1971). Die Milzzellen werden durch Zentrifugierung in heparinierter Hanks-

Lösung gewaschen. Die genannte Lösung enthält 10 Einheiten Heparin pro ml. (Modern Biology Series 23, «Method of Incubating Animal Cells», von Yukiaki Kuroda, Kyoritsu Shuppan, Japan, 1974, nachfolgend als «heparinisierte HBSS» genannt). Das erhaltene Präcipitat wird nun in TC-199 suspendiert (siehe dazu Igaku no Ayumi (Progress of Medicine), 62, No. 6, August 5, 1967). Nun wird die Mischung eingestellt, dass sie ungefähr 10^4 bis ungefähr 10^8 Zellen pro ml enthält. Zum genannten TC-199 Medium mit den Milzzellen werden nun 5 bis 20 G/V-% von hitzeinaktiviertem Kalbserum (im folgenden «HICS» genannt) und Antibiotika (bevorzugterweise 100 Einheiten Penicillin G und 100 µg Dihydrostreptomycin pro ml Medium) gegeben. Weiter werden zum Medium gegeben: etwa 5 bis etwa 150 µg/l – bevorzugterweise etwa 80 µg bis ungefähr 120 µg/ml – eines spezifischen Antigens und/oder eines nicht spezifischen Mitogens. Das Medium wird nun ein bis zwei Tage lang bei 37 °C inkubiert. Bevorzugterweise dauert die Inkubation etwa 48 Stunden und zwar in Anwesenheit von Kohlendioxidgas. Das spezifische Antigen und das nicht spezifische Mitogen, das in dieser Methode eingesetzt werden, sind die gleichen, wie diejenigen, die bei der Herstellung des Blutplasmas oder des Serums (A) weiter oben verwendet werden. Das Medium wird anschliessend zentrifugiert, um die überstehende Lösung zu gewinnen. So wird die Kulturlösung über den Milzkulturen von hyperimmunisierten Säugern gewonnen und dient dann zur Herstellung der erfindungsgemässen Substanz.

Die überliegende Kulturlösung (C) wird beispielsweise wie folgt erhalten:

Wie für (B) werden Milzzellen von entsprechend vorbehandelten Säugern bereitgestellt und weiterbehandelt. Zum so erhaltenen Medium werden nun die überstehende Lösung (B) in einem Verhältnis von 60 bis 70 Vol.-% oder ein spezifisches Antigen in der Menge von 5 bis ungefähr 150 µg/ml – bevorzugterweise in der Menge von 80 bis ungefähr 120 µg/ml – gegeben. In dieser Methode können die gleichen spezifischen Antigene eingesetzt werden, wie weiter oben bei der Herstellung des Substrats (A). Die überstehende Lösung kann auch zusammen mit den spezifischen Antigenen eingesetzt werden. Die Zellen werden anschliessend 3 Wochen lang bei 37 °C kultiviert. In der Zwischenzeit wird etwa $\frac{1}{3}$ des Mediums durch frisches Medium ersetzt, bevorzugterweise alle 3 Tage. Nach Abschluss der Inkubation wird das Medium mit heparinisiertem HBSS gewaschen. Ein spezifisches Antigen und/oder nicht spezifisches Mitogen wird anschliessend zum Medium gegeben und zwar in einer Menge von ungefähr 5 bis ungefähr 150 µg/ml, bevorzugterweise in einer Menge von ungefähr 80 bis ungefähr 120 µg/ml. Das Medium wird nochmals inkubiert bei 37 °C und zwar ein bis zwei Tage lang, bevorzugterweise etwa 48 Stunden lang, immer in Anwesenheit von Kohlenstoffdioxidgas. Die überstehende Lösung von Milzzellkulturen von gesunden Säugern wird dann gleich erhalten wie die entsprechende Lösung (B) weiter oben.

Die erfindungsgemässe Substanz wird nun erhalten durch Einwirkung eines proteolytischen Enzyms auf eines der obengenannten Substrate (A), (B) oder (C). Das erhaltene Produkt wird, falls gewünscht, hydrolysiert. Anschliessend wird es erhitzt, um so das Enzym zu inaktivieren. Schliesslich wird aus der Lösung oder aus der Mischung nach bekannten Trenn- und Reinigungsmethoden die gewünschte Substanz isoliert.

Beispiele für nützliche proteolytische Enzyme sind gewöhnliche Proteinasen, wie Endopeptidasen, Exopeptidasen und Endo- und Exo-Peptidasen, umfassend Pronase, Papain und Chymotrypsin, Trypsin, Aminopeptidase, Carboxypeptidase, usw. Diese Enzyme werden einzeln oder gemeinsam

eingesetzt. Bevorzugte proteolytische Enzyme sind dabei Pronase, Papain und Chymotrypsin. Speziell bevorzugt ist Pronase. Für die enzymatische Behandlung des Substrats werden normalerweise 0,01 bis etwa 0,1 G/V-% des Enzyms eingesetzt. Die Behandlung wird bei denjenigen Temperaturen, pH-Werten, usw. ausgeführt, welche für das eingesetzte Enzym geeignet sind. Beispielsweise wird, bei Einsatz von Pronase, bei einer Temperatur von 36 bis 38 °C und bei einem pH von 7 bis 8 gearbeitet. Die Behandlung ist abgeschlossen, wenn die gesuchte Substanz mit einer maximalen Ausbeute vorliegt. Dies ist normalerweise in 6 bis 24 Stunden der Fall.

Das von der Proteolyse resultierende Gemisch wird nun wärmebehandelt, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Diese Wärmebehandlung kann beispielsweise wie folgt geschehen: Das Gemisch wird etwa 1 Stunde lang auf eine Temperatur von 95 bis 100 °C erwärmt. Die gleiche Wärmebehandlung dient auch zur Sterilisierung des Gemischs und zur Aktivierung der gesuchten Substanz. Ebenso werden dadurch wegen Zersetzung andere unerwünschte Substanzen entfernt. Das von der Proteolyse herstammende Produkt kann, vor der genannten Wärmebehandlung, auch hydrolysiert werden. Die Hydrolyse wird bevorzugterweise dann ausgeführt, wenn eine Zersetzung von nicht enzymolysierter Substanzen gewünscht wird. Die Hydrolyse wird ausgeführt unter Einsatz von Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid oder ähnlicher Alkalien bei pH-Werten von mindestens 12. Die gleiche Hydrolyse kann aber auch unter Einsatz von gewöhnlichen Säuren wie Salzsäure, Schwefelsäure oder ähnlicher ausgeführt werden. Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform wird die Hydrolyse durch tropfenweise Zugabe von 10 N Natriumhydroxid zum enzymbehandelten Produkt ausgeführt. Die Zugabe geschieht sehr langsam über Perioden bis 15 Minuten. Das Medium wird gerührt und, nach Erreichen des pH von mindestens 12, etwa 60 Minuten lang auf 95 bis 100 °C erwärmt. Die erhaltene Mischung wird dann mit Eis abgekühlt und mit einem geeigneten Mittel neutralisiert.

Die gesuchte Substanz wird aus der so erhaltenen Mischung mittels bekannter Methoden isoliert. Beispiele solcher Methoden sind Filtration, Zentrifugation, Gelfiltration, Entsalzung oder eine Kombination der genannten Methoden. Bevorzugterweise wird die Gelfiltration unter Verwendung von Sephadex G-100, Toyopearl HW-40 und Sephacryl S-200 ausgeführt. Die Entsalzung kann ebenfalls mittels Gelfiltration an Sephadex G-15 oder mittels Membranfiltration durch Millipore NMWL 10^3 (Produkt der Nippon Millipore Ltd., Japan), ausgeführt werden.

Die erfindungsgemässe Substanz, die derart isoliert worden ist, wird normalerweise gefriergetrocknet und bei Temperaturen von 2 bis 7 °C aufbewahrt. Die Substanz ist vorteilhafterweise sterilisiert.

Die erfindungsgemässe Substanz wird zu Medizinalzwecken in folgenden Anwendungen eingesetzt. Wie schon beschrieben, zeigt sie Immunoaktivität, speziell Aktivität in der Inhibierung der Vermehrung von verschiedenen Mikroorganismen wie Protozoen, Bakterien, Virus, usw. Die Substanz zeigt aber auch Antitumoraktivität. Sie ist von niedriger Toxizität und effizient in Zusammensetzungen sowohl für Menschen wie auch für Säugetiere.

Beim Einsatz der erfindungsgemässen Substanz in Medizinalanwendungen für Menschen und Säugetiere wird die Substanz in verschiedene pharmazeutische Kompositionen formuliert. Dazu werden verwendet: nicht toxische, pharmazeutisch annehmbare Trägerstoffe und verschiedene Verdüner und Exzipientien. Geeignet sind pharmazeutisch annehmbare nicht toxische Trägerstoffe, umfassen – sind aber nicht beschränkt auf – destilliertes Wasser, Salzlösungen wie Natriumchloridlösung, Alkohole, Polyäthylenglykole,

äthoxylierter Isostearylalkohol, Polyoxyisostearylalkohol, Polyoxyäthylensorbit, Sorbitanester, Gelatine, Lactose, Amylose und ähnliche. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert und, falls gewünscht, mit Hilfsmitteln gemischt werden wie Solubilisierungsmittel, Puffersubstanzen, Analgesika, präservierende Mittel, Stabilisatoren, Emulsifikatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Drucks, Farbstoffe, Geruchsstoffe, usw. Auch können andere, pharmazeutisch wirksame Verbindungen in die Zusammensetzung eingebaut werden.

Solche Zusammensetzungen sind, wenn auch nicht im Sinne einer Einschränkung, parenteral zu verabreichende Präparate. Vor allem ist gedacht an Injektionslösungen, aber auch an Suspensionen und Emulsionen. Die Injektion kann wie üblich intravenös, und zwar einzeln oder in mehreren Portionen verabreicht werden. Die Lösung enthält, ebenfalls wie üblich, Hilfsstoffe wie Glukose, Aminosäuren oder ähnliche. Die Injektion kann aber auch intramuskulär, subkutan, intrakutanös oder intraperitoneal verabreicht werden. Die erfindungsgemässen Substanz können aber auch in Präparate eingebaut werden, die für die orale Einnahme oder für die topische Verabreichung geeignet sind.

Die Menge der aktiven Substanz in der Zusammensetzung sowie die Dosierung derselben werden je nach Methode und Form der Verabreichung, nach Zweck und nach Symptomen des Patienten festgelegt werden. Im Falle von Injektionen mit etwa 1 bis etwa 8 G/V-% an aktiver Komponente, werden sovieler Einspritzungen gemacht, um auf etwa 1 bis etwa 1000 mg/kg Lebendgewicht und Tag zu kommen. Die erfindungsgemässe Zusammensetzung muss nicht einmal täglich verabreicht werden; sie kann auch in drei oder vier Dosierungen pro Tag eingenommen werden. Zusammensetzungen in anderen Formen können in den dabei üblichen Dosierungen verabreicht werden.

Die erfindungsgemässe Substanz wurde pharmakologisch getestet und die entsprechenden Testresultate werden nun im Detail beschrieben.

I. Toxoplasmavermehrungs-Inhibierungstest

Der Test wird gemäss den Methoden ausgeführt, wie sie in den folgenden Literaturstellen beschrieben sind:

Jap. J. vet. Sci., 37, 235 – 243 (1975) und Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A244, 374 – 382 (1979).

Die erfindungsgemässe Substanz, welche gemäss den Verfahren der weiter unten beschriebenen Beispiele erhalten wird, wird untersucht und zwar anhand von Monocyten aus Hunde- oder Rinderblut, anhand von Zellen aus dem menschlichen Herz, anhand von Zellen aus Mäusenieren und anhand von peritonealen Macrophagen der Maus. Die genannten Zellen sind vorbereitet worden gemäss den Methoden der oben angegebenen Literaturstellen. Die folgenden Tabellen 1 bis 5 zeigen die Prozente der Toxoplasmavermehrungs-Inhibierung, die in den genannten Zellen erreicht werden. Das ist der Prozentsatz derjenigen Zellen, in denen die Anzahl von Toxoplasmen 0, 1 bis 5 oder ≥ 6 ist. Verglichen wird immer zu der totalen Anzahl von Testzellen. Die entsprechenden Inhibierungsprozente sind gemäss den folgenden Symbolen bezeichnet:

- < 10 A
- 10 bis < 20 B
- 20 bis < 30 C
- 30 bis < 40 D
- 40 bis < 50 E
- 50 bis < 60 F
- 60 bis < 70 G
- 70 bis < 80 H
- 80 bis < 90 I
- 90 bis ≤ 100 J

Tabelle 1
Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in Monocyten aus Hundeblut

Untersuchungs Nr.	Probe	Konzentration an erfindungsgemässer Substanz (%)	Anzahl von Toxoplasmen in einzelnen Zellen			
			0	1-5	≥ 6	
5	1 Beispiel 2	0,25	I	B	A	
	2 Beispiel 2	0,50	J	A	A	
	3 Beispiel 2	0,75	J	A	A	
	4 Beispiel 2	1,00	J	A	A	
	5 Beispiel 6	0,75	I	B	A	
	15	6 Beispiel 8	0,50	J	A	A
		7 Beispiel 5	1,00	H	B	B
		8 Beispiel 7	0,75	F	C	B
		9 Beispiel 9	0,75	G	C	B
	20	10 Beispiel 10	0,75	G	C	B
11 Vergleichsbeispiel*		10	D	C	D	

*Normales Plasma von Hundeblut

Tabelle 2
Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in Monocyten aus Rinderblut

Untersuchungs Nr.	Probe	Konzentration an erfindungsgemässer Substanz (%)	Anzahl von Toxoplasmen in einzelnen Zellen			
			0	1-5	≥ 6	
35	1 Beispiel 2	0,25	I	A	A	
	2 Beispiel 6	0,25	J	A	A	
	3 Beispiel 8	0,50	J	B	A	
	4 Beispiel 5	0,50	E	D	B	
	40	5 Beispiel 7	1,00	J	A	A
		6 Beispiel 9	0,75	J	C	B
		7 Beispiel 10	0,75	G	C	B
		8 Vergleichsbeispiel*	10	E	D	E

*Normales Serum aus Rinderblut

Tabelle 3
Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in Zellen des menschlichen Herzens

Untersuchungs Nr.	Probe	Konzentration an erfindungsgemässer Substanz (%)	Anzahl von Toxoplasmen in einzelnen Zellen			
			0	1-5	≥ 6	
55	1 Beispiel 2	0,75	I	B	A	
	2 Beispiel 6	1,00	J	A	A	
	60	3 Beispiel 8	0,50	I	B	A
		4 Beispiel 5	0,50	G	C	B
		5 Beispiel 7	0,50	H	B	A
		6 Beispiel 9	0,75	G	C	B
		7 Beispiel 10	0,75	G	C	B
65	8 Vergleichsbeispiel*	10	F	D	B	

*Normales Serum von Rinderblut

Tabelle 4
Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in Zellen von Mäusenieren

Untersuchungs-Nr.	Probe	Konzentration an erfindungsgemässer Substanz (%)	Anzahl von Toxoplasmen in einzelnen Zellen		
			0	1-5	≥6
1	Beispiel 2	0,50	J	A	A
2	Beispiel 6	0,25	J	A	A
3	Beispiel 8	0,50	J	A	A
4	Beispiel 9	0,50	I	B	B
5	Beispiel 5	0,50	G	C	B
6	Beispiel 10	0,75	I	B	A
7	Beispiel 7	0,50	G	C	B
8	Vergleichsbeispiel*	10	E	D	E

*Normales Serum von Mäuseblut

Tabelle 5
Inhibierung von Toxoplasmavermehrung in peritonealen Macrophagen der Maus

Untersuchungs-Nr.	Probe	Konzentration an erfindungsgemässer Substanz (%)	Anzahl von Toxoplasmen in einzelnen Zellen		
			0	1-5	≥6
1	Beispiel 2	0,25	I	B	A
2	Beispiel 5	0,50	E	D	C
3	Beispiel 7	0,50	F	C	C
4	Beispiel 6	1,00	J	A	A
5	Vergleichsbeispiel*	10	D	E	D

*Normales Serum von Mäuseblut

Die Tabellen 1 bis 5 zeigen, dass die erfindungsgemässe Substanz die Toxoplasmavermehrung sowohl in homologen wie auch in heterologen Zellen effektiv inhibiert.

II. Chemotherapie von akuter, experimenteller Toxoplasmose

BALB/c Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 18 bis 20 g werden in 3 Gruppen von je 10 aufgeteilt. Sie bilden die Untersuchungsgruppen für die Chemotherapie von experimenteller Toxoplasmose. Jede Maus wird nun intraperitoneal mit einer isotonischen Natriumchloridlösung, welche zusätzlich 5×10^2 pro 0,25 ml eines virulenten Toxoplasmas Strain S273 enthält, inokuliert. 24 Stunden später wird der Gruppe 1 (Vergleichsgruppe) einmal täglich 4 Wochen lang 0,25 ml Salzlösung gegeben. Der Gruppe 2 wurde Acetylspiramycin in Lösung oral zum Vergleich verabreicht und zwar mit einer Dosierung von 0,2 g/kg Lebendgewicht und Tag, täglich während 4 Wochen. Die erfindungsgemässe Substanz, wie sie im weiter unten beschriebenen Beispiel 6 erhalten wird, wird der Gruppe 3 intraperitoneal verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einmal täglich 4 Wochen lang und zwar bei einer Dosierung von 1 mg/Tier und zusammen mit der oralen Verabreichung von 0,2 g/kg Lebendgewicht und Tag Acetylspiramycin.

Am 30. Tag nach der Infektion wird einmal der Antikörpergehalt im Serum (nach der Latex-Methode) bestimmt, sowie die Anzahl von Gehirnzysten (mittels des Plankton Cy-

tometers) gemessen. Die Reduktion der Zystenanzahl wird gemäss der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Verringerung in \%} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A steht in der obigen Formel für die Anzahl von Gehirnzysten aus der Gruppe I (Vergleichsgruppe) und B ist die Anzahl Gehirnzysten aus den Gruppen II oder III.

Mäuse vom Typ BALB/c werden mit Gehirnhomogenat aus den Mäusen der Gruppen I, II und III inokuliert und auf ihr Überleben untersucht. Die folgende Tabelle 6 zeigt eine Zusammenstellung aller Resultate der obengenannten Untersuchungen.

Tabelle 6

Gruppe	Anzahl Zysten (Reduktion, %)	+HA-Antikörper Titer (Wert) %	Anzahl toter Mäuse
I (Vergleich ohne Wirkstoff)	4302 -	10/10 100	16/16
II (Vergleich mit Acetylspiramycin)	26 (99,4)	7/8 87,5	14/14
III (erfindungsgemässe Substanz)	0 (100)	0/10 0	0/13

Tabelle 6 zeigt, dass akut mit Toxoplasma infizierte Mäuse nur unvollständig geheilt werden durch die Verabreichung von Acetylspiramycin (Gruppe II).

Wenn auch die Anzahl Gehirnzysten in der Gruppe II beinahe so tief liegt wie in der Gruppe III, sind doch alle 14 Sekundär-Mäuse, die mit eben diesem Hirnhomogenat inokuliert worden sind, gestorben. Im Gegensatz dazu zeigt die Gruppe III erstens eine Zystenanzahl von 0 und keine toten Mäuse, wenn entsprechendes Hirnhomogenat inokuliert wird. Dieses deutet auf totale Abwesenheit von Toxoplasma hin, währenddem in den Hirnsubstanzen der Mäuse aus der Gruppe II Toxoplasmaaktivität immer noch, wenn auch in latentem Zustand, vorhanden ist.

Die Toxoplasmose kann somit derart vollständig geheilt werden.

III. Chemotherapie von experimenteller chronischer Toxoplasmose

Es werden vier Gruppen von je 10 BALB/c-Mäusen gebildet. Jedes Tier enthält intraperitoneal 0,5 ml einer Salzlösung, die 10^2 schwach virulente Toxoplasmen des Stammes S-273 enthalten. Vier Wochen nach der Infektion werden die Mäuse nochmals mit 0,5 ml der gleichen, das Toxoplasma enthaltenden Salzlösung inokuliert. Vier Wochen später wird einer Gruppe die erfindungsgemässe Substanz verabreicht, wie sie im weiter unten beschriebenen Beispiel 6 erhalten wird. Eine weitere Gruppe enthält Acetylspiramycin alleine und eine dritte Gruppe erfindungsgemässe Substanz plus Acetylspiramycin. Die letzte Gruppe schliesslich, die vierte, erhält gar nichts, sie stellt also die eigentliche Kontrollgruppe dar. Bei Verabreichung der erfindungsgemässen Substanz alleine werden jedem Tier täglich 0,5 ml einer Salzlösung intraperitoneal verabreicht, wobei diese Dosis 20 mg der erfindungsgemässen Substanz enthält. Wenn Acetylspiramycin verabreicht wird, enthalten die 0,5 ml Salzlösung

8 mg des genannten Wirkstoffes. Diese Salzlösung wird oral verabreicht. Bei der Verabreichung der beiden Stoffe zusammen gelten die gleichen Quantitäten und die gleichen Lösungen sowie auch die gleiche Verabreichungsmethode.

Die erhaltenen Effekte werden anhand der Anzahl Gehirnzysten, anhand der Verringerung davon und anhand des Antikörpertiters im Serum bestimmt. Die entsprechenden Resultate sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Gruppe	Gehirnzysten		Antikörpertiter
	Anzahl	Reduktion (%)	
I (Vergleichsgruppe)	1608,90	—	1:128–1:512
II (nur Acetylspiramycin)	1052,15	34,61	1:128–> 1:512
III (nur erfindungsgemässe Substanz)	1061,43	32,91	1:256–> 1:512
IV (Kombination von Acetylspiramycin und erfindungsgemässe Substanz)	765,79	52,40	≥ 1:512

Tabelle 7 zeigt, dass die mittlere Anzahl Zysten von ungefähr 1609 bei der Kontrollgruppe I auf eine durchschnittliche Anzahl von 1061 reduziert werden kann, wenn nur erfindungsgemässe Substanz verabreicht wird (Gruppe III). Die entsprechende Reduktion geht bis auf 766 bei der Verabreichung von erfindungsgemässer Substanz plus Acetylspiramycin (Gruppe IV). Die derart erreichte Verringerung liegt bei über 50%. Dies zeigt, dass die erfindungsgemässe Substanz Immunoaktivität hinsichtlich therapeutischer Effekte hat, um Gehirnzysten von mit *Toxoplasma* chronisch infizierter Mäuse zu verringern.

IV. Antibakterielle Aktivität in Macrophagen

1) Gram-positive Bakterien (*Bacillus subtilis* H IAM 1521) oder gram-negative Bakterien (*Escherichia coli* B wilder Stamm oder *Proteus vulgaris* HX 19) werden 30 Minuten lang auf peritoneale Macrophagen von normalen Mäusen einwirken gelassen. Dann wird die Mischung 24 Stunden lang in TC-199 Medium mit 10%-igem fötalem Kälberserum inkubiert. Die Bakterien der genannten Typen werden dabei in etwa 50 mal der Menge der vorliegenden Macrophagen eingesetzt (Experiment A). Die Macrophagen werden nun weiter inkubiert und zwar 2 Stunden lang im gleichen Medium, einmal in Anwesenheit von 0,75 mg/ml an erfindungsgemässer Substanz aus dem Beispiel 6 (Experiment C) und einmal ohne erfindungsgemässer Substanz (Experiment B). Die Anzahl Bakterien, welche nach der zweiten Inkubation in den Macrophagen zurückbleiben, wird gezählt und zwar anhand von Referenzfarbmustern. In der folgenden Tabelle 8 sind die entsprechenden Resultate zusammengestellt.

Die Tabelle 8 zeigt, dass die erfindungsgemässe Substanz effektiv die Vermehrung von gram-positiven und gram-negativen Bakterien in peritonealen Macrophagen von gesunden Mäusen inhibiert.

2) Durch Wiederholen des Vorgehens gemäss Experiment C wurden nochmals Macrophagen inkubiert mit der Ausnahme, dass dieselben 4 Stunden lang im gleichen Me-

dium, aber in Anwesenheit von 0,75 mg/ml der erfindungsgemässen Substanz aus dem Beispiel 6 behandelt wurden.

Tabelle 8

	Anzahl Bakterien in Macrophagen	Experiment A (0 Std.)	Experiment B (nach 2 Std.)	Experiment C (nach 2 Std.)
10 E. coli	0	0 (%)	1,3 (%)	2,7 (%)
	1–10	9,7	33,6	56,9
	11–20	29,7	36,0	28,8
	21–30	24,6	17,3	7,7
15	≥ 31	36,0	11,7	4,0
P. vulgaris	0	32,0 (%)	36,2 (%)	50,5 (%)
	1–10	59,3	57,3	41,8
	11–20	4,2	3,0	5,0
20	21–30	2,7	2,2	1,3
	≥ 31	1,8	1,3	1,3
B. subtilis	0	0 (%)	1,2 (%)	3,2 (%)
25	1–10	9,5	29,2	34,7
	11–20	18,5	37,2	33,5
	21–30	22,8	21,2	19,3
	≥ 31	49,2	11,3	9,3

30 Die Macrophagen werden daher in destilliertem Wasser aufgenommen und anschliessend auf einer flachen Unterlage inkubiert. Die Anzahl der lebenden *E. coli*-Zellen in den Macrophagen wird anschliessend bestimmt. Das gleiche Verfahren wird an einer Kontrollsubstanz in Abwesenheit von erfindungsgemässer Substanz ausgeführt.

Die Figur 3 zeigt die Resultate. Kurve 1 stellt die Resultate mit erfindungsgemässer Substanz, Kurve 2 die Resultate ohne erfindungsgemässe Substanz dar. Wie schon Tabelle 8 zeigt auch diese Untersuchung, dass die erfindungsgemässe Substanz die Vermehrung von *E. coli* in peritonealen Macrophagen von gesunden Mäusen auffällig zu inhibieren vermag.

45 V. Inhibierung der Vermehrung von Viren

Die erfindungsgemässe Substanz aus Beispiel 6 wird in Eagle's Minimum Essential Medium (siehe dazu Igaku no Ayumi, Progress of Medicine, 62, No. 6, 5. August 1967) aufgelöst.

50 Die verschiedenen Konzentrationen der beigegebenen Substanz sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengestellt. Die Lösung wird nun mittels einer 0,45 µm Membrane filtriert (Produkt von Nippon Millipore Ltd), um dieselbe zu sterilisieren. Zu je einem ml der Lösung werden nun HEP-2 Zellen (10⁶-Zellen pro Platte) gegeben, welche von humanen epithelalem Laryngal-Tumor stammen und das Ganze wird 2 Tage lang inkubiert. Anschliessend werden die Zellen mit 2 PFU (Plaque Formation Unit / Zellen von Herpes Simplex Virus, Type II, Stamm 186) infiziert und 18 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Dann werden die Platten auf –80 °C abgekühlt, um die Reaktion abzubrechen. Die Anzahl der Viren wird anschliessend gezählt. Das gleiche Verfahren wird ausgeführt mit der Ausnahme, dass die HEP-2 Zellen mit 0,2 PFU/Zelle des Herpes Simplex Virus Typ II (Stamm 186) infiziert werden und das Ganze dann 25 Stunden lang bei 37 °C inkubiert wird. Kontrolluntersuchungen werden auch ausgeführt, bei denen dann die erfindungsgemässe Substanz eingesetzt wird.

Die folgende Tabelle 9 zeigt die entsprechenden Resultate:

Tabelle 9

Konzentration der erfindungsgem. Substanz (mg/ml)	Vermehrung der Viren (PFU $\times 10^4/10^5$ -Zellen)	
	2 PFU/Zellen	0,2 PFU/Zellen
0 (Vergleich)	196,0 \pm 9,5	192,0 \pm 36,0
1	157,0 \pm 3,0 (P < 0,001)	121,0 \pm 2,0 (P < 0,001)
5	94,0 \pm 9,0 (P < 0,001)	38,0 \pm 2,0 (P < 0,001)
10	9,8 \pm 0,7 (P < 0,001)	9,7 \pm 1,7 (P < 0,001)

Die signifikante Differenz P in Tabelle 9 wird mittels des Student's- t-Testes berechnet. Die Tabelle zeigt, dass die erfindungsgemässe Substanz die Vermehrung von Viren signifikant inhibiert und zwar bei einer Konzentration von 1 bis 10 mg/ml.

VI. Antitumor-Effekt

0,1 ml einer Salzlösung mit 10^6 -Zellen von Mäuse-Leukämie P-388 wird intraperitoneal in männliche 10 Wochen alte BDF₁ Mäuse transplantiert und zwar im mittleren Teil des Magens und auf der rechten Seite davon.

Während der folgenden 9 Tage wird erfindungsgemässe Substanz aus dem Beispiel 6 und 1-(2-Tetrahydro)-5-fluoruracil (Ftorafur, FT207, Produkt der TAIHO Pharm. Co., Ltd., Japan) intraperitoneal in das Organ der Tiere injiziert. Die Verabreichung erfolgt entweder getrennt oder im Gemisch.

Die erfindungsgemässe Substanz wird dabei täglich verabreicht und zwar in einer Menge von 3,0 mg in 0,1 ml Salzlösung auf 10 g Lebendgewicht. Ftorafur 207 wird ebenfalls täglich verabreicht und zwar in einer Menge von 1,0 mg/0,1 ml Salzlösung auf 10 g Lebendgewicht.

Einer entsprechenden Kontrollgruppe werden gar keine Antitumor-Wirkstoffe verabreicht.

Der Antitumor-Effekt wird in Funktion der Überlebenszahl berechnet und zwar zu jenem Zeitpunkt, da alle Tiere der Kontrollgruppe gestorben sind. Die folgende Tabelle 10 zeigt die entsprechenden Resultate.

Tabelle 10

Untersuchungsgruppe	Anzahl Mäuse	Anzahl der Überlebentage jeder Maus	Durchschnittl. Überlebenstage	Überlebenszahl (%)	Mittleres Gewicht in (g) vor der Transplantation
Vergleichsgruppe (keine Wirkstoffe)	7	9, 9, 10, 10, 10, 11	9,86 \pm 0,69	0	25,86
Erfindungsgemässe Substanz 300 mg/kg	7	11, 11, 12, 12, 12, 13	11,86 \pm 0,69	20,29	26,14
Ftorafur 100 mg/kg	7	12, 12, 13, 13, 14, 15, 16	13,57 \pm 1,51	37,68	26,14
Ftorafur 100 mg/kg + erfindungsgemässe Substanz 300 mg/kg	7	16, 17, 18, 18, 18, 19, 20	18,00 \pm 1,29	82,61	25,86

Die obige Tabelle zeigt, dass die erfindungsgemässe Substanz einen gewissen Antitumoreffekt zeigt, sogar wenn sie alleine verabreicht wird. Zusammen mit bekannten Antitumor-Wirkstoffen zeigt sie einen synergistischen Antitumoreffekt.

VII. Akute Toxizität

Die erfindungsgemässe Substanz wird auf ihre akute Toxizität untersucht und zwar gemäss der Methode von Litchfield and Wilcoxon (J. Pharmacol. Exp. Ther., 90, 99, 1949) unter Verwendung von weiblichen BALB/c Mäusen.

Es wurden keine Sterbefälle beobachtet, bei der Verabreichung von erfindungsgemässer Substanz bis zu 4000 mg/kg Lebendgewicht intraperitoneal oder bis zu 2000 mg/kg intravenös. Dementsprechend liegt der LD₅₀ Wert der erfindungsgemässen Substanz über 4000 mg/kg bei intraperitonealer Verabreichung und bei über 2000 mg/kg bei intravenöser Verabreichung.

Im folgenden werden nun Beispiele beschrieben, in denen vorerst die Herstellung der Ausgangssubstrate für die Herstellung der erfindungsgemässen Substanz erläutert wird.

Referenzbeispiel 1

5 Beagles-Hunden von je etwa 10 kg Lebendgewicht wurden 10^6 Toxoplasma (Toxoplasma gondii) intraperitoneal

inokuliert. 5 Wochen nach der Inokulation wurden die Tiere nochmals mit 10^6 Toxoplasmen des gleichen Stamms inokuliert. Die Hunde waren nachher toxoplasmahyperimmun.

2 Wochen nach der zweiten Inokulation wurden jedem Hund intravenös 10 μ g/kg Lebendgewicht TLA injiziert. 24 Stunden nach der Injektion wurde das Blut der Tiere gewonnen.

Das daraus gewonnene Blutplasma zeigt einen Antikörpertiter von mindestens 1:1000 gemäss dem Sabin-Feldman-Farbtiter oder von mindestens 1:4000 gemäss der indirekten Immunfluoreszenz-Methode. Nur Immunoglobulin G (Ig G) Antikörper wird festgestellt.

Referenzbeispiele 2 und 3

Gemäss dem Vorgehen von Referenzbeispiel 1 wird Substrat gewonnen, in dem jedoch TLA ersetzt wird durch Con A oder PHA.

Die entsprechend gewonnenen Blutplasmen zeigen die folgenden Antikörpertiter:

65 Farbtiter:	mindestens 1:1000
Indirekte Immunfluoreszenzmethode:	mindestens 1:4000
(nur Ig G Antikörper wird festgestellt).	

Referenzbeispiel 4

Das Vorgehen gemäss Referenzbeispiel 1 wird wiederholt mit der Massnahme, dass *Toxoplasma gondii* und TLA ersetzt werden durch *Piroplasma* (*Babesia gibsoni*) und BLA. Erhalten werden schliesslich Blutplasmen von *Piroplasma* hyperimmunen Hunden. Der Antikörpertiter dieses Blutplasmas beträgt ebenfalls 1:1000, wenn er mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode bestimmt wird.

Referenzbeispiel 5

6 Monate alten Kälbern werden $2,5 \times 10^8$ *Toxoplasmen* (*Toxoplasma gondii*) cervical intramuskular inokuliert. 5 Wochen nach der Inokulation werden die Tiere nochmals mit 5×10^8 *Toxoplasmen* des gleichen Stammes inokuliert. 2 Wochen nach der zweiten Inokulation wird TLA intravenös injiziert und zwar bei jedem Tier mit einer Dosierung von $1 \mu\text{m}/\text{kg}$ Lebendgewicht. 24 Stunden nach der letzten Injektion wird das Blut der Tiere gewonnen und daraus das Serum abgetrennt. Das Serum hat einen Latexagglunitertiter von mindestens 1:2048.

Referenzbeispiel 6

Das Vorgehen gemäss Referenzbeispiel 5 wird wiederholt mit der Ausnahme, dass *Toxoplasma gondii* und TLA ersetzt werden durch *Piroplasma* (*Babesia spp*) resp. BLA. Erhalten werden so Sera von *Piroplasma* hyperimmunen Kälbern. Diese Sera haben Antikörpertiter von 1:256 bis 1:1000 (Messung mittels Immunofluoreszenz-Methode).

Referenzbeispiel 7

Mäusen werden je 1×10^6 *Toxoplasmen* (*Toxoplasma gondii*, schwach virulenter Stamm) intraperitoneal inokuliert. 5 Wochen nach der Infektion werden die Tiere nochmals je mit 1×10^6 *Toxoplasmen* des gleichen Stammes inokuliert. Während der zweiten Woche nach der zweiten Inokulation wird den Tieren intraperitoneal TLA injiziert und zwar mit einer Dosierung von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ Lebendgewicht. 24 Stunden nach der genannten Injektion wird das Blut der Tiere gewonnen und daraus das Serum abgetrennt. Dieses zeigt einen Antikörpertiter von mindestens 1:4000 (Bestimmung mittels Immunofluoreszenz-Methode).

Referenzbeispiel 8

Das Vorgehen gemäss Referenzbeispiel 7 wird wiederholt mit der Ausnahme, dass *Toxoplasma* und TLA ersetzt werden durch *Piroplasma* (*Babesia rhodhaini*), resp. BLA. Erhalten werden so Sera von *Piroplasma*-hyperimmunen Mäusen. Das Serum weist einen Antikörpertiter von mindestens 1:4000 auf; Bestimmung mittels Immunofluoreszenzmethode.

Referenzbeispiel 9

Das Vorgehen gemäss Referenzbeispiel 7 wird wiederholt mit der Änderung, dass *Toxoplasma* und TLA ersetzt werden durch *Haemosporidia* (*Plasmodium berghei* NK-Stamm), resp. MLA. Erhalten wird so das Serum von *Haemosporidia*-hyperimmunen Mäusen. Das Serum weist einen Antikörpertiter von mindestens 1:1000 auf (Bestimmung mittels indirekter Immunofluoreszenz-Methode).

Referenzbeispiel 10

Milzzellen von *Toxoplasma*-hyperimmunen Mäusen werden zweimal mit heparinierter HBSS (10 Einheiten Heparin pro ml) gewaschen und zwar mittels Zentrifugierung. Die Sedimente werden anschliessend in TC-199 Medium suspendiert, welches zusätzlich 20% wärmeinaktiviertes Kälberserum (HICS) und 100 Einheiten Penicillin G und $100 \mu\text{g}$ Dihydrostreptomycin pro ml als Antibiotika enthält. Erhal-

ten wird so ein Medium mit 1×10^7 Zellen pro ml. Nach Zugabe von $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ TLA werden die Zellen 48 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Dann wird die überliegende Flüssigkeit abgetrennt und zwar mittels Zentrifugierung bei 4°C . Die Zentrifugierung erfolgte bei 3000 Umdrehungen pro Minute und dauerte 30 Minuten.

Referenzbeispiel 11

Aus einer gesunden Maus wird die Milz entfernt. Die Milzzellen werden aufgetrennt und zwar mittels der Conray-Ficoll Methode und zweimal mit heparinisierendem HBSS mit 10 Einheiten Heparin pro ml mittels Zentrifugierung zweimal gewaschen. Das Sediment wird anschliessend in TC-199 Medium mit 20% HICS und dem gleichen Antibiotika wie im Referenzbeispiel 10 suspendiert. Erhalten wird ein Medium mit ungefähr 10^7 Zellen pro ml. Nach Zugabe von 66 Vol.-% der im Referenzbeispiel 10 gewonnenen Kulturlösung werden diese Zellen 3 Wochen lang inkubiert. Ein Drittel des Mediums wird alle 3 Tage erneuert. Nach Abschluss der Inkubation wird die Kultur mit heparinisierendem HBSS (10 Einheiten Heparin pro ml) gewaschen und mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ TLA versetzt. Die Zellen werden nochmals 48 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die überliegende Lösung wird abgetrennt und zwar wiederum mittels Zentrifugierung bei 4°C . Die Zentrifugierung geschah auch hier bei 3000 Umdrehungen pro Minute und dauerte 30 Minuten.

Referenzbeispiel 12

Analog dem Verfahren gemäss Referenzbeispiel 11 wird eine überliegende Kulturlösung gewonnen mit der Ausnahme, dass $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ TLA anstelle der Kulturlösung aus Referenzbeispiel 10 ersetzt wird.

Im folgenden werden nun Beispiele der Herstellung der erfindungsgemässen Substanz beschrieben.

Beispiel 1

$0,1 \text{ g}$ Pronase (Pronase P, Produkt der Kaken Chemical Co., Ltd., Japan) werden zu 100 ml Blutplasma aus Referenzbeispiel 1 gegeben. Das Plasma mit dem Enzym werden nun 12 Stunden lang unter Rühren bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird die Mischung erhitzt, um so das Enzym zu inaktivieren. Die Mischung wird darauf mit Eiswasser abgekühlt.

Das enzymbehandelte Plasma wird nun der Gelfiltration an Sephacryl S-200 unterzogen. Verwendet werden $18,6 \text{ ml}/\text{Stunde}$ einer $0,01 \text{ M}$ Phosphatpufferlösung mit einem pH von 7,2. Erhalten wird so die Fraktion, die *Toxoplasma* inhibitorisch aktiv ist.

Die Roh-Fraktion wird nochmals der Gelfiltration unterzogen und zwar am Toyopearl HW-40, wobei die resultierende aktive Fraktion am Sephadex G-15 (Kolonnen 40 cm hoch, $1,2 \text{ cm}$ Durchmesser) mittels zweifach destilliertem Wasser entsalzt wird. Erhalten werden so $0,6 \text{ g}$ der erfindungsgemässen Substanz mit den oben beschriebenen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften.

Die Substanz wird nun mittels Filtration sterilisiert, gefriergetrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Beispiel 2

Eine weitere Portion des Blutplasmas aus Referenzbeispiel 1 wird mit einem Enzym behandelt und zwar gleich wie im Beispiel 1.

Dann wird zu 100 ml erhaltenem Plasma 10 ml einer 10 N Natriumhydroxidlösung gegeben und dies unter Rühren. Die Lösung wird nun auf 90 bis 100°C erwärmt und bei dieser Temperatur 60 Minuten lang gerührt und dann wieder abgekühlt. Der pH der Lösung wird nun durch Zugabe von 10 N HCl-Lösung auf 7,0 eingestellt. Die Mischung wird

nun über Toyo Filter Papier No. 5C (Produkt der Toyo Roshi Co., Ltd. Japan) filtriert. Das Filtrat wird bei 10 000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang filtriert und die überstehende Lösung wird gewonnen.

Die so gewonnene überstehende Lösung wird der Gelfiltration an Sephacryl S-200 (Kolonnen 90 cm hoch, Durchmesser 0,9 cm) unterzogen, wobei mit einer 0,01 M Phosphatpufferlösung von pH 7,2 eluiert wird. Die Eluierungsrate beträgt 18,6 ml/Stunde. Erhalten wird so eine rohe Fraktion.

Die Roh-Fraktion wird noch einmal der Gelfiltration unterzogen und zwar diesmal am Toyopearl HW-40. Die resultierende aktive Fraktion wird an Sephadex G-15 (Kolonnen 40 cm hoch, Durchmesser 1,2 cm) entsalzt und zwar unter Verwendung von doppelt destilliertem Wasser. Erhalten werden so 0,54 g der erfindungsgemässen Substanz mit den oben angegebenen physico-chemischen und biologischen Eigenschaften. Die Substanz wird mittels Filtration sterilisiert, gefriergetrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

Beispiele 3 bis 13

Die erfindungsgemässe Substanz wird in den folgenden Beispielen analog hergestellt wie im Beispiel 2 mit der Ausnahme, dass als Blutplasma, Serum oder überstehende Kulturlösung (je 100 ml) diejenigen der Referenzbeispiele 2 bis 12 verwendet werden.

Bsp. No.	Referenz-Beispiel Nr. (Substrat)
3	2 (Toxoplasma-hyperimmuner Beagle-Hund)
4	3 (Toxoplasma-hyperimmuner Beagle-Hund)
5	4 (Piroplasma-hyperimmuner Beagle-Hund)
6	5 (Toxoplasma-hyperimmunes Kalb)
7	6 (Piroplasma-hyperimmunes Kalb)
8	7 (Toxoplasma-hyperimmune Maus)
9	8 (Piroplasma-hyperimmune Maus)
10	9 (Haemosporidia-hyperimmune Maus)
11	10 (Milzzellen von Toxoplasma-hyperimmuner Maus)
12	11 (Milzzellen von gesunder Maus)
13	12 (Milzzellen von gesunder Maus)

Die erfindungsgemässe Substanz aus all diesen Beispielen ist die gleiche, wie sie im Beispiel 2 erhalten wird und zwar

hinsichtlich physikalischer, chemischer und biologischer Eigenschaften.

Die erfindungsgemässe Substanz gemäss Beispiel 6 wird weiter untersucht und zwar hinsichtlich ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln gemäss der folgenden Methode:

100 mg der Substanz werden zu je 5 ml eines organischen Lösungsmittels gegeben und dann 30 Minuten lang darin gerührt. Die Mischungen werden dann 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um sie so in überliegende Lösung und ausgefallene Feststoffe aufzutrennen. Jene der Fraktionen werden nun getrocknet, in 1 ml reinem Wasser aufgenommen und auf den Gesamtstickstoffgehalt hin untersucht. Die entsprechenden Resultate sind die folgenden:

	Überliegende Fraktion (µg)	Unlösliche Fraktion (µg)	Gehalt in überliegender Lösung (%)
20 Äthanol	2,10	56,06	3,6
Methanol	49,41	6,72	88,0
Äther	0,01	59,75	0
Benzol	0,02	58,75	0
25 Chloroform	1,72	63,79	2,6
Aceton	0,14	66,91	0,2

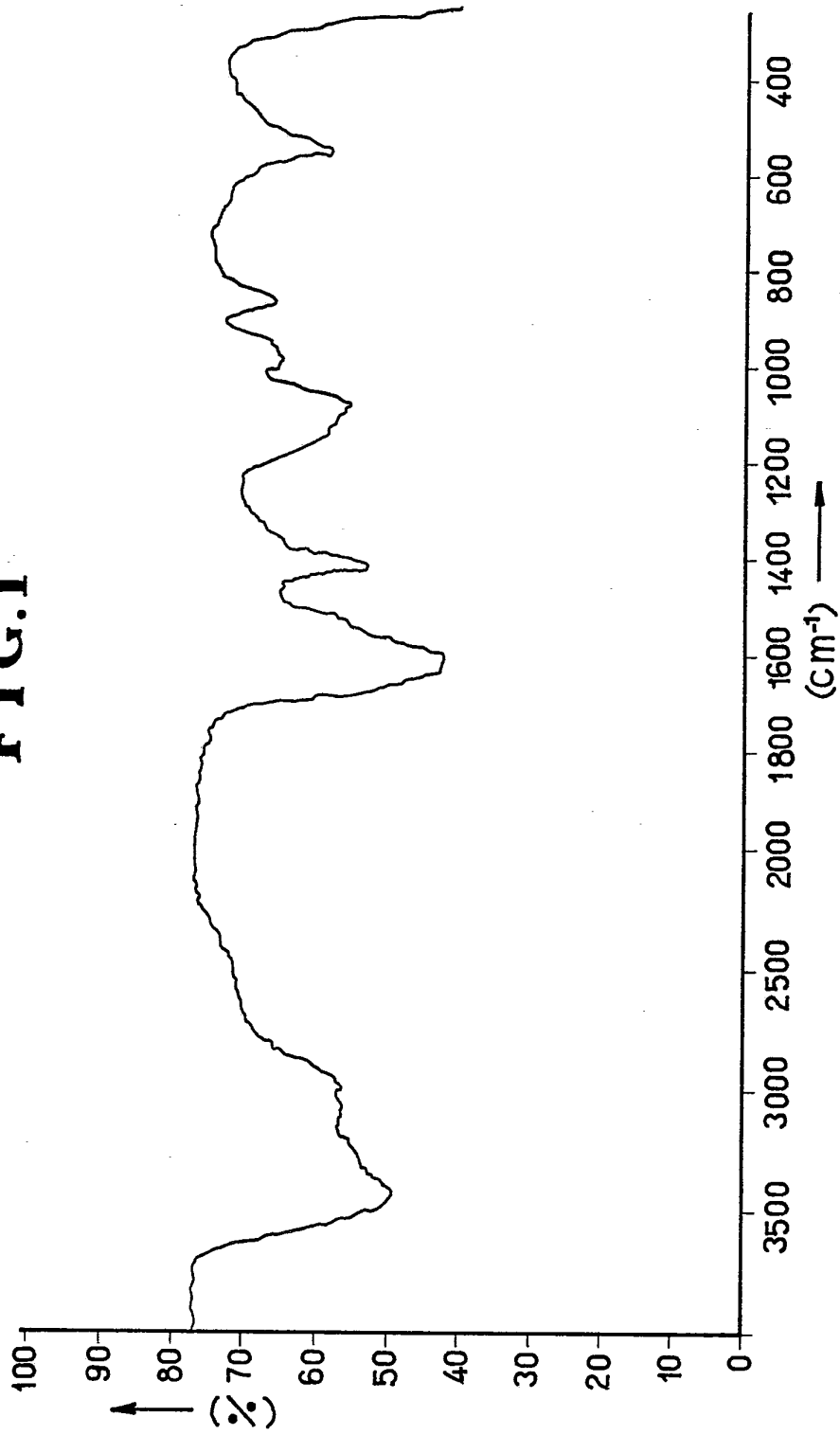
Beispiel 14

Die erfindungsgemässe Substanz wird gleich zubereitet wie im Beispiel 2 mit der Ausnahme, dass anstelle von Pro-nase die gleiche Menge Papain (Produkt der Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) eingesetzt wird. Die erhaltene Substanz ist identisch mit derjenigen, wie sie in Beispiel 2 erhalten wird.

Beispiel 15

Die erfindungsgemässe Substanz wird gleich zubereitet wie im Beispiel 2 mit der Ausnahme, dass anstelle von Pro-nase Chymotrypsin (Produkt der Miles Feravac. Ltd.) in gleicher Menge eingesetzt wird. Die erhaltene Substanz ist die gleiche wie diejenige, die im Beispiel 2 erhalten wird.

FIG.1



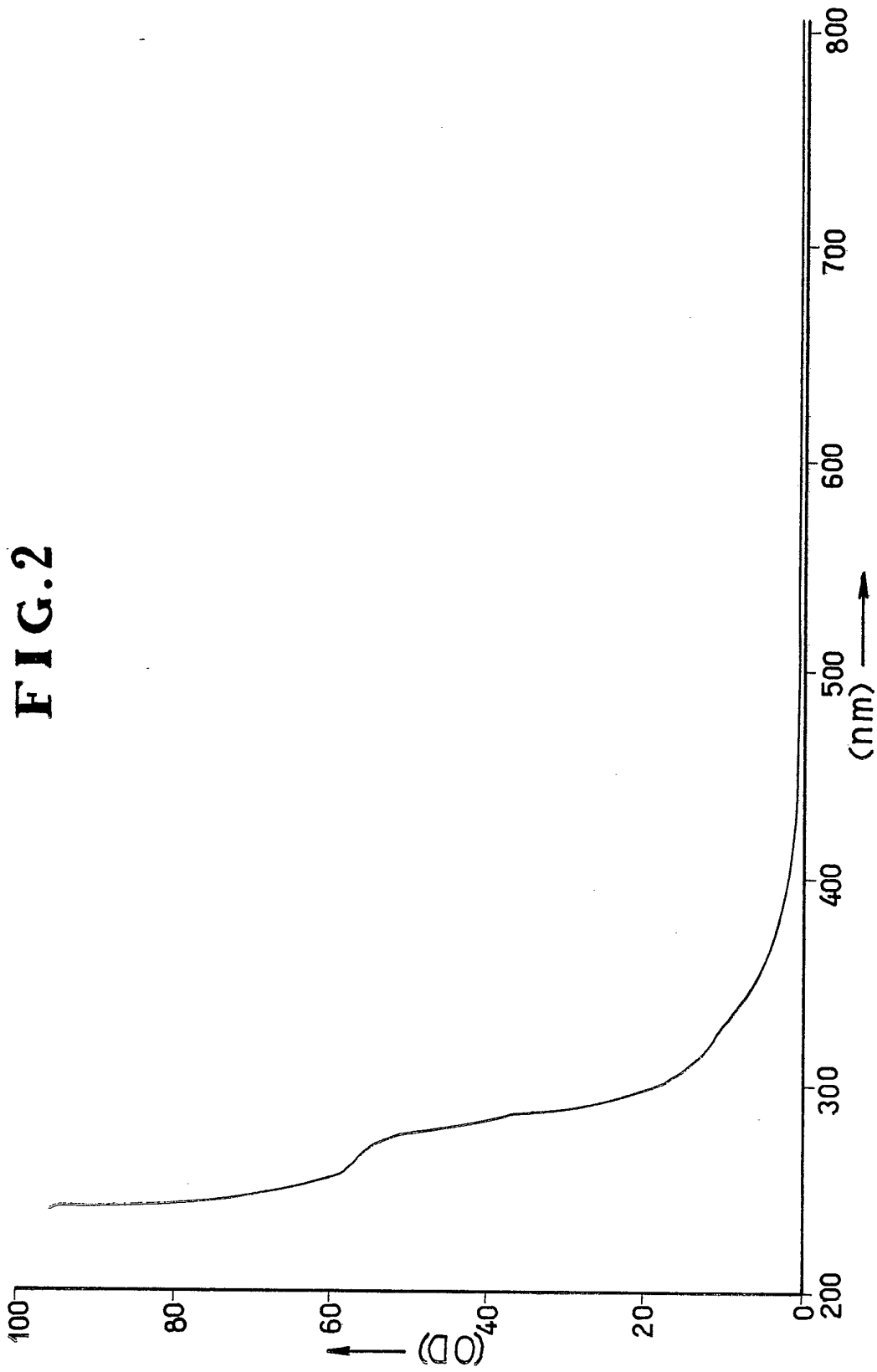


FIG.2

FIG. 3

