



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **273 198 A5**

4(51) A 61 K 35/74

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 303 580 7	(22)	05.06.87	(44)	08.11.89
(31)	872,131	(32)	09.06.86	(33)	US

(71)	siehe (73)
(72)	Urban, Richard W., US
(73)	CELL TECHNOLOGY INC., Boulder, Colorado, 80301, US
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Modifikationsmittels

(55) verbessertes Modifikationsmittel, minimale Toxizität und Immunabweichung, konstante Qualität, Stabilität und Wirksamkeit

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Modifikationsmittels der biologischen Reaktion zur Behandlung eines Patienten, das aus natürlichen Membranbläschen und Ribosomen in einer Suspensionspufferlösung besteht. Erfindungsgemäß sind diese Membranbläschen und Ribosomen einem ausgewählten Mikroorganismus endogen, der keine signifikante immunabweichende Reaktion in dem Patienten hervorruft und im wesentlichen in Menschen nicht pathogen ist, der ausgewählte Mikroorganismus auch ein solcher ist, bei dem Membranbläschen aus Zellmembranmaterial gebildet werden können, die Bläschen leicht von der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie des Patienten endozytiert werden, das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion im wesentlichen frei von Endotoxin, intakten Zellen, Zellwänden und Zellmembranfragmenten ist, das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion des weiteren einen mittleren Durchmesser von mehr als 170 nm nach der Korngrößenanalyse aufweist.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Modifikationsmittels der biologischen Reaktion, **gekennzeichnet durch das Züchten von Bakterienzellen eines Stammes eines Mikroorganismus, der nicht in der Mikroflora des zu behandelnden Patienten vorhanden ist und der ein gemeinsames bakterielles Antigen hat, das mit den die normale Mikroflora des zu behandelnden Patienten bildenden Organismen nicht oder nur schlecht kreuzreagiert, das Ernten der gezüchteten Zellen, das Auflösen von Endotoxin mit einem geeigneten Detergenten, das Unterziehen des Zellkonzentrats einer Spaltung, die ausreicht, um Membranbläschen mit einem mittleren Durchmesser von nicht weniger als 180 nm zu erzeugen, das Abscheiden der Membranbläschen und freien Ribosomen von dem restlichen Zellmaterial und Ribosomen in einer geeigneten Pufferlösung.**
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß die Zellauflösung mechanisch bei einem Druck von über 10000 psi erfolgt.**

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Modifikationsmittel der biologischen Reaktion zur Behandlung eines Patienten, bestehend aus natürlichen Membranbläschen und Ribosomen in einer Suspensionspufferlösung.

Die Erfindung betrifft allgemein ein pharmazeutisches Produkt mit immunmodulierenden Eigenschaften. Sie betrifft im besonderen ein Modifikationsmittel der biologischen Reaktion (BRM, engl. biologic response modifier), das als ein Mittel definiert ist, welches das Verhältnis zwischen einer Krankheit und dem Wirt modifiziert, indem es die biologische Reaktion des Wirtes auf die Krankheit mit sich ergebenden therapeutischen Wirkungen modifiziert.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die BRM lassen sich in zwei Kategorien einteilen:

1. biologische oder chemische Mittel, die einen oder mehrere Widerstandmechanismen des Wirts stimulieren oder anderweitig verändern können, und 2. gereinigte Zellprodukte, die direkte Wirkungen auf eine spezielle Krankheit zeigen. Die erste Gruppe von BRM, unter die die Erfindung fällt, besteht aus Mitteln, die das immunologische Reaktionsvermögen des Wirts aktivieren, erhöhen oder anderweitig modifizieren und allgemein als Immunmodulatoren bezeichnet werden.

Ein BRM kann allein oder in Verbindung mit anderen Mitteln zur Erhöhung des Widerstandes gegenüber bzw. der Genesung von dem Befall durch Krankheitserreger, zur Modifizierung oder Herbeiführung der Verträglichkeit von Fremdgewebsverpflanzungen, zur Förderung der Tumorabstoßung oder -stabilisierung und zur Hemmung von Tumorrückfällen im Anschluß an andere Formen der Therapie, zur Wiederherstellung von normalen Helfer-Suppressor-Mechanismen oder zu einer anderweitigen Förderung einer normalen Immunreaktion verwendet werden.

Seit Beginn dieses Jahrhunderts ist eine große Vielzahl von Immunmodulatoren/Immunadjuvantien entwickelt worden. Die überwiegende Mehrzahl dieser Mittel ist mikrobieller (bakterieller/fungaler) Herkunft, wobei die populärsten von den Gattungen *Corynebacteria*, *Mycobacteria* und *Nocardia* (CMN-Organismen) hergeleitet sind. Die verschiedenen Immunadjuvantien bestehen aus entweder intakten lebensfähigen Zellen, toten Zellen, Zellwänden, verschiedenen Zellwandfragmenten, Endotoxin, verschiedenen Typen von Polysacchariden oder subzellulären Fraktionen wie Ribonukleinsäure oder Ribosomen. Obwohl alle diese Mittel eine immunpotenzierende/-modulierende/-unterstützende Wirksamkeit in Gewebekultur, Tieren und Menschen gegen Infektions- und Geschwulstkrankheiten gezeigt haben, leiden sie allgemein unter Widersprüchen bei der Produktion und Zusammensetzung und weisen eine mäßige bis starke Toxizität auf. Was die Behandlung von Geschwülsten betrifft, so ist keines dieser Mittel bislang bei der Behandlung einer festgestellten Erkrankung nützlich gewesen. Diese Mittel weisen zudem typisch einen Wirksamkeitsverlust bei wiederholter Anwendung (Anergie), Immunabweichung, Überempfindlichkeitsreaktionen, Entwicklung chronischer Entzündungszustände und/oder die Entwicklung verschiedener anderer unerwünschter Zustände auf.

Aufgrund des Unvermögens, diese Mittel wegen ihrer Verunreinigung und/oder Komplexität chemisch zu definieren, und in dem Versuch, die Veränderlichkeit der Immunreaktionen und toxischen Komplikationen zu reduzieren, haben eine Reihe von Forschern entweder verschiedene spezifische Fraktionen dieser Quellen extrahiert oder verschiedene Komponenten, die eine immunologische Wirksamkeit zeigen, synthetisiert. Beispiele für untersuchte spezifische Fraktionen sind die Zellwandfraktion Muramyltripeptid, staphylokokkales Protein A, verschiedene Polysaccharide, die RNA-Fraktion¹⁾ und die ribosomale Fraktion.²⁻⁶⁾

Bezüglich der ribosomalen Fraktion ist der Wirkungsmechanismus je nach der Ribosomenquelle unterschiedlich. Obwohl die Mehrzahl der ribosomalen Vakzine ein Adjuvans für die Wirksamkeit benötigt, ist dies bei ribosomalen Vakzinen, die aus *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* hergestellt werden, nicht der Fall.²⁾ Darüber hinaus scheinen aus *Mycobacterium tuberculosis*³⁾ und *Salmonella typhimurium*⁴⁾ hergestellte ribosomale Vakzine eine zellvermittelte Reaktion zu bewirken, während aus *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* hergestellte ribosomale Vakzine eine humorale Reaktion vermitteln.⁵⁾ Wenn auch die extrahierte ribosomale Fraktion theoretisch der Wirkstoff ist, so gibt es doch in vielen Fällen einen erheblichen Meinungsstreit darüber, ob andere, als Verunreinigungen vorhandene Zellkomponenten (RNA, Protein, Endotoxin, Zellwand) für das beobachtete Immunreaktionsvermögen verantwortlich sind.

Bekannte Zellfraktionsvazine können manchmal für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Infektionskrankheiten geeignet sein. Sie sind jedoch aus verschiedenen Gründen für den Einsatz als nichtsensibilisierende, allgemeine Immunmodulatoren für die Behandlung von Geschwulstkrankheiten ungeeignet. Das Vorhandensein von Zellwand, Endotoxin, oder schlecht abbaubaren Komponenten führt oft zu Toxizitäten ähnlich denen, die mit den intakten Organismen erreicht werden. Darüber hinaus können unerwünschte immunabweichende Reaktionen und komplexe Immunreaktionen hervorgebracht werden, da solche Vakzine im typischen Fall von Organismen stammen, die Teil der eigenen Mikroflora des Wirts sind oder die leicht mit dieser reagieren (gemeinsame Antigene). Solche Vakzine enthalten charakteristischerweise auch Fraktionen mit physikalischen und/oder chemischen Merkmalen, die für eine allgemeine immunpotenzierende Wirksamkeit suboptimal sein können.

Urban et al.⁶⁾ berichteten über die Fähigkeit von aus einem spezifischen Bakterienorganismus gewonnenen Polyribosomen (Aggregate von Ribosomen), die Entwicklung von kutanen SaD2 Fibrosarkomen in DBA/2 Mäusen zu unterdrücken. Polyribosomenfraktionen wurden aus Zellkulturen durch osmotisches oder mechanisches Auflösen (je nach dem Bakterientyp) mit anschließendem Differentialzentrifugieren gewonnen. Obwohl die Wirkung auf den SaD2-Murintumor positiv war, konnte der Mechanismus der hervorgerufenen biologischen Reaktion nicht aus den Daten bestimmt werden. Obwohl die Toxizität sehr niedrig war, führte der von Urban et al. beschriebene Prozeß zu einer extremen Veränderung des Polysomenprofils (Größenverteilung) und einer sehr niedrigen Produktausbeute. Es wurde keine Beständigkeit der Qualität, Stabilität und Wirksamkeit erreicht.

Kirsh et al.⁷⁾ haben über eine Immunstimulation und -modulation durch den Einschluß von spezifischen Antigenen oder Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion in Liposomen berichtet. Liposomen, die Arzneimittel enthalten, werden für die Behandlung von metastatischem Krebs angewendet.⁸⁾

Allerdings ist die Behandlung von Geschwulstkrankheiten (Krebs) mit Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion allein oder in Liposomen eingeschlossen bis jetzt entmutigend gewesen. Obwohl eingeschlossene BRM nichteingeschlossene BRM in der Wirksamkeit übertreffen, könnte die Einschränkung des therapeutischen Nutzens darauf zurückgeführt werden, daß die Immunaktivierung auf die Makrophagen begrenzt ist. Tumorzellen entwickeln selten, wenn überhaupt, Widerstand gegenüber Abtötung durch Makrophagen im Vergleich zu natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen. Die Anzahl von Makrophagen ist in diesen Fällen zu gering, als daß diese selbst die Zerstörung von großen Tumormassungen wirksam vermitteln könnten.

Ziel der Erfindung

Es ist ein Ziel der Erfindung, ein verbessertes Modifikationsmittel der biologischen Reaktion zur Verfügung zu stellen.

Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, ein verbessertes Modifikationsmittel der biologischen Reaktion zur Verfügung zu stellen, das eine minimale Toxizität und Immunabweichung aufweist.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, ein verbessertes Modifikationsmittel der biologischen Reaktion zur Verfügung zu stellen, das mit konsistenter Qualität, Stabilität und Wirksamkeit hergestellt werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Membranbläschen und Ribosomen von einem ausgewählten Mikroorganismus aufzufinden sowie ein Verfahren zur Herstellung des Modifikationsmittels der biologischen Reaktion mit den gewünschten Eigenschaften, das eine konsistente Qualität und hohe Ausbeute liefert.

Das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion umfaßt sehr allgemein natürliche Membranbläschen und Ribosomen in einer Suspensionspufferlösung. Die Bläschen bestehen aus Zellmembranstoff, der einem ausgewählten Organismus endogen ist. Die Ribosomen sind ebenfalls dem ausgewählten Organismus endogen. Das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion ist im wesentlichen frei von Endotoxin, intakten Zellen, Zellwänden und Zellmembranfragmenten. Der ausgewählte Organismus ist ein Organismus, der keine signifikante immunabweichende Reaktion hervorruft, der in Menschen nichtpathogen ist und dessen Membranbläschen aus Zellmembranstoff gebildet werden können und dessen Bläschen leicht von der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie endozytiert werden. Das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion weist einen mittleren Durchmesser von mehr als 170nm bei der Teilchengrößenanalyse auf.

Die Erfindung kann direkt Zellen der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie aktivieren. Die Aktivierung der Monozyten-Makrophagen oder Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie führt zur Herbeiführung von über Monozyten-Makrophagen vermittelten bakteriziden Wirksamkeiten (Figur 3) und Tumorzytotoxizität (Tabelle 3), veränderten Spiegeln verschiedener weißer Blutzellen, die bei der Immunfunktion eine Rolle spielen (z. B. Monozyten, Neutrophilie (Tabelle 4), zur in-vivo-Hervorrufung von Tumorzeltotoxizität (K562, Raji, Co 38) beim Menschen (Figur 10), Hervorrufung von durch die natürliche Killerzelle vermittelter Zytotoxizität (Figur 2), Hervorrufung von antikörperabhängiger Zeltotoxizität (Figur 4) und Hervorrufung der Freisetzung von Interleukin I (IL-I) (Figur 5) und eventuell von Interleukin II (IL-II) (Figur 10).

Zum Zwecke der Genauigkeit werden die in dieser Spezifikation und den beiliegenden Patentansprüchen verwendeten nachfolgenden Begriffe definiert:

„Nichttoxisch“ bedeutet innerhalb eines Toxizitätsgrades, der für den Säugetierwirt verträglich ist, der eine Therapie mit dem Modifikationsmittel der biologischen Reaktion enthält.

„Nichtimmunogen“ bedeutet das Hervorrufen einer genügend niedrigen immunogenen Reaktion oder überhaupt keiner Reaktion, so daß die unerwünschten immunabweichenden, chronischen entzündlichen und Überempfindlichkeitsreaktionen in dem Säugetierwirt nicht wesentlich zutage treten.

„Mittlerer Durchmesser“ steht für den mittleren Durchmesser der MSD-Kornverteilungsanalyse, gemessen mit einem BI-90 Kornsiebklassierer (Brookhaven Instrument Corp.). Diese Messung schließt eine Intensitätswichtung des Größenmittelwertbildungsprozesses ein und ist in dem Betriebshandbuch für das Gerät, Kapitel 6, ausführlich erklärt.

„Im wesentlichen nicht pathogen in Menschen“ bedeutet nicht oder selten mit Krankheit im Menschen normaler Gesundheit

verbunden sein. Da die meisten Mikroorganismen opportunistische Infektionen unter den richtigen Umständen hervorrufen können, z.B. in Personen, deren Immunsystem bloßgestellt ist, schließt diese Definition nur jene Organismen aus, die normalerweise nichtopportunistische Infektionen hervorrufen.

„Im wesentlichen frei von Endotoxin, intakten Zellen, Zellwänden und Zellmembranfragmenten“ bedeutet ein genügend niedriger Grad biologischer Aktivität solcher Fraktionen zur Aufrechterhaltung eines hierin definierten nichttoxischen Merkmals.

„Immunabweichende Reaktion“ bedeutet eine Immunreaktion, die weg von der zu behandelnden Krankheit gerichtet ist. So kann zum Beispiel die Erscheinung des ursprünglichen Antigenverstoßes (original antigenic sin) das Immunsystem dazu bringen, daß es entsprechend historischen Herausforderungen reagiert oder auf die gewöhnliche Mikroflora reagiert, wenn es von einem Antigen herausgefordert wird, das ähnlich denen ist, die von der historischen Herausforderung oder der gewöhnlichen Mikroflora beherrscht werden. Auch eine polyklonale Aktivierung kann nichtspezifische fehlgerichtete anamnestiche Reaktionen hervorrufen. Schlecht abbaubare Teilchen können zu einer Distraction der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie (d.h. Fremdkörperreaktion, chronische Überempfindlichkeit) führen, was eine Mitwirkung dieser Zelllinie als Reaktion auf die Krankheit verbietet. Eine „signifikante“ immunabweichende Reaktion ist eine solche, die die Wirkung der gewünschten Immunreaktion so dämpft, daß sie für medizinische Zwecke nicht akzeptabel ist.

„Natürliche Membranbläschen“ bedeutet Membranbläschen, die aus Membranen hergestellt werden, welche von lebenden oder toten natürlichen Zellen stammen.

Obwohl wissenschaftliches Beweismaterial zur Klärung der Gründe für die beobachtete Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion nicht verfügbar ist, ist deutlich, daß das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion bestimmte Unterscheidungsmerkmale besitzt. Es ist somit klar, daß das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion zwei verschiedene Teilchenklassen enthält, und zwar natürliche Membranbläschen und Ribosomen. Die Ribosomen können als Monomere oder als größere Polymere existieren, der mittlere Durchmesser der Ribosomenpopulation ist jedoch kleiner als der mittlere Durchmesser der Membranbläschenpopulation. Die relativen Mengen der zwei Populationen scheinen die Wirksamkeit des Produktes, bestimmt durch in vitro durchgeführte Standard-NK-Zellproben, zu beeinflussen. Die relativen Populationen beeinflussen natürlich auch den gemessenen mittleren Durchmesser der Gesamtpopulation von Teilchen. Es wird davon ausgegangen, daß ein mittlerer Durchmesser von mehr als 170 nm zur Erreichung der gewünschten Wirksamkeit erforderlich ist. Unterhalb dieses Wertes scheint die in Standard-NK-Zellproben beobachtete Wirksamkeit des Produktes wesentlich zu fallen.

Es ist auch beobachtet worden, daß die Größe der Bläschen in der Bläschenpopulation eine Wirkung auf die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion hat. So sind in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung im wesentlichen alle Bläschen im Durchmesser größer als 110 nm, und der mittlere Durchmesser der Bläschenpopulation liegt bei mindestens 180 nm, vorzugsweise etwa 210 nm. Es ist beobachtet worden, daß Präparate mit Durchmessern unterhalb dieser genannten Werte eine geringere als die gewünschte Wirksamkeit in in-vitro-NK-Zellproben haben. Es ist auch klar, daß Präparate, die nur Membranbläschen enthalten, und Präparate, die nur Ribosomen enthalten, unter die gewünschten Wirksamkeitswerte fallen, was auf einen möglichen Synergismus in Gegenwart der zwei Populationen hindeutet.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Modifikationsmittels der biologischen Reaktion, das gekennzeichnet ist durch das Züchten von Bakterienzellen des Stammes *Serratia marcescens*, das Ernten der gezüchteten Zellen, das Auflösen von Endotoxin mit einem geeigneten Detergent, das Unterziehen des Zellkonzentrats einer Behandlung, die ausreichend ist, um Ribosomen zu produzieren und Membranbläschen mit einem Durchmesser von nicht weniger als 110 nm zu produzieren, das Abscheiden der Ribosomen und Membranbläschen von dem restlichen Zellmaterial in dem Zellysate und das Wiederaufschwimmen der Ribosomen und Bläschen in einer geeigneten Pufferlösung in entsprechenden Konzentrationen, so daß der mittlere Teilchendurchmesser nach der Korngrößenanalyse mehr als 170 nm beträgt.

Die Zellauflösung erfolgt mechanisch.

Insbesondere ist das erfindungsgemäße Verfahren gekennzeichnet durch das Züchten von Bakterienzellen der Art *Serratia marcescens* in einem geeigneten Kulturmedium, das Abkühlen der Kultur auf 0–4°C, das Ernten der Bakterienzellen, das Waschen und Aufschwimmen der geernteten Zellen in einem nichttoxischen, gut vertragenen Puffersystem, das eine für die Bildung und Unversehrtheit der Zellmembranbläschen geeignete Umgebung aufrechterhält, das Auflösen der geernteten und aufgeschwommenen Zellen in Gegenwart eines Detergenten zur Herbeiführung von Membranfragment- und Endotoxinindissoziation, wobei bei diesem Auflösungsschritt Membranbläschen mit einem Durchmesser von mindestens 110 nm erzeugt werden, das Reinigen der Bakterienzellysate von Zellrückständen einschließlich intakten Zellen, Zellwänden und Membranfragmenten, das Schichten des gereinigten Zellysats auf Dichtegradientmaterial, das von Menschen gut vertragen wird und nichtimmunogen ist, das Pelletisieren der Membranbläschen- und Ribosomenfraktionen im wesentlichen ohne Pelletisieren anderer kleinerer Fraktionen, das aseptische Entfernen des Dichtegradientmaterials und das Spülen und Wiederaufschwimmen der Membranbläschen des genannten Bereichs zusammen mit den restlichen Ribosomen in der Pufferlösung.

Die Zellauflösung erfolgt hierbei mechanisch bei einem Druck von über 10000 psi (703,1 kp/cm²).

In einer weiteren Ausbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung des Modifikationsmittels durch das Züchten von Bakterienzellen eines Stammes eines Mikroorganismus, der nicht in der Mikroflora des zu behandelnden Patienten vorhanden ist und der ein gemeinsames bakterielles Antigen hat, das mit den die normale Mikroflora des zu behandelnden Patienten bildenden Organismen nicht oder nur schlecht kreuzreagiert, das Ernten der gezüchteten Zellen, das Auflösen von Endotoxin mit einem geeigneten Detergenten, das Unterziehen des Zellkonzentrats einer Spaltung, die ausreicht, um Membranbläschen mit einem mittleren Durchmesser von nicht weniger als 180 nm zu erzeugen, das Abscheiden der Membranbläschen und freien Ribosomen von dem restlichen Zellmaterial in dem Zellysate und das Wiederaufschwimmen der Bläschen und Ribosomen in einer geeigneten Pufferlösung.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert. In der beiliegenden Zeichnung zeigen:

- Fig. 1: ein Elektronenmikrobild, das das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion der Erfindung in einer etwa 82000fachen Vergrößerung darstellt;
- Fig. 2: eine graphische Darstellung einer menschlichen natürlichen Killerzellenprobe bei Verabreichung des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion im Vergleich zur Verabreichung von Leukozyteninterferon;
- Fig. 3: eine graphische Darstellung einer Standardprobe, die die bakteriziden Eigenschaften des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels demonstriert;
- Fig. 4: ein Vergleich einer antikörperabhängigen Zellzytotoxizitätsprobe (ADCC) bei Verabreichung des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion im Gegensatz zur Verabreichung von Leukozyteninterferon;
- Fig. 5: eine graphische Darstellung der Induktion von Interleukin 1 (IL-1) unter Verwendung des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion;
- Fig. 6: eine graphische Darstellung, die die Wirksamkeit der natürlichen Killerzelle (NK) die Wirkung der Verarmung verschiedener Populationen menschlicher peripherer mononukleärer Blutzellen darstellt (Diese Untersuchung demonstriert den Verlust an Wirksamkeit der NK-Zelle bei Entfernung von NK-Zellen, aber nicht bei Entfernung von B-Zellen oder T-Zellen, wenn das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion angewendet wird. Die Entfernung von Monozyten (nicht dargestellt) beseitigt ebenfalls diese Wirkung, was darauf hindeutet, daß die NK-Zellaktivität über die Monozyten-Makrophagen-Population vermittelt wird.);
- Fig. 7: die Ergebnisse von in-vivo-Untersuchungen der Anwendung der Erfindung bei prostatatischen Schuppenzellkarzinomen bei Ratten (R3337 A) (schnelles Wachstum);
- Fig. 8: die Ergebnisse von in-vivo-Untersuchungen von Prostatakarzinomen bei Ratten (R3327 H) (langames Wachstum);
- Fig. 9: die Ergebnisse von in-vivo-Untersuchungen von beidseitigen prostatatischen Adenokarzinomen (R3327 CF) bei Ratten veranschaulicht und auch Ergebnisse im Zusammenhang mit anderen Behandlungen;
- Fig. 10: eine Zusammenfassung von Daten, die aus der Behandlung von Krebspatienten im Endstadium gewonnen wurden, die die Wirksamkeit der peripheren mononukleären Blutzellen des Patienten zur Abtötung spezifischer Tumorzellen 24 Stunden nach in-vivo-Verabreichung der Erfindung dargestellt. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit der in-vitro-Aktivierung von menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen mit Interleukin II;
- Fig. 11: eine Reihe von graphischen Darstellungen natürlicher Killerzellenproben, die die Wirksamkeit von aus den Quellenmikroorganismen *Pseudomonas*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* und *E. chloacae* hergestellten Präparaten mit Alpha-Interferon vergleichen;
- Fig. 12: eine Reihe von graphischen Darstellungen natürlicher Killerzellenproben, die die Wirksamkeit von aus den Quellenmikroorganismen *Erwinia chrysanthemi* und *Flavobacterium* hergestellten Präparaten mit Interferon vergleichen.

Figur 1 ist ein Elektronenmikrobild mit einer etwa 82000fachen Vergrößerung, das das Aussehen der Membranbläschen im Querschnitt und auch freie Ribosomen von unterschiedlicher Teilchengröße (d. h. Monomere und kleine Polymere) zeigt. Die hergestellten Bläschen sind nach zwei Methoden gemessen worden:

1. direkte Messung des zirkularisierten Querschnitts, der auf den Elektronenmikrobildern zu sehen ist, und
2. mathematisch mit Hilfe der Messung der Teilchendiffusionskoeffizienten, die von der Lichtstreuungsanalyse mittels eines B 190 Kornsiebklassierers (Brookhaven Instrument Corp.) gewonnen wurden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stammen die Membranbläschen und die dazugehörigen Ribosomen von dem gramnegativen Bakterium *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* ist ein gut bekannter Organismus, und viele Stämme sind von einer Reihe von Quellen verfügbar. Von der Amerikanischen Typenkultursammlung (American Type Culture Collection), Rockville, Maryland 20852, sind sechzig Stämme erhältlich. Dieser Organismus liefert eine besonders geeignete Quelle zur Herstellung des Produkts mit einem hohen Grad an immunmodulierender/immuntherapeutischer Aktivität im Vergleich zu anderen Bakterienquellen und ist im wesentlichen frei von Toxizität.

Die zum Entwickeln der unten dargelegten Daten tatsächlich benutzten spezifischen Stämme von *Serratia marcescens* waren: *Serratia* 2000 (SM 2000) Cell Technology (Boulder, Colorado, USA) Stamm der Firma, pigmentierte und nichtpigmentierte Varianten;

Serratia MSC unbekannter Herkunft von der Vorratskultur beim Metropolitan State College (Denver, Colorado USA);

Serratia marcescens ATCC 60; und

Serratia marcescens CU unbekannter Herkunft von der Vorratskultur an der Universität von Colorado (Boulder, Colorado, USA).

Die gewünschten bakteriellen Membranbläschen und Ribosomen lassen sich bequem und wirtschaftlich mit Hilfe der erfindungsgemäßen Methode, die ein einfaches, schnelles und reproduzierbares Verfahren ist, aus einer geeigneten Quelle von *S. marcescens* Bakterienzellen der stationären Phase oder Log-Phase isolieren. Es werden Reagenzien angewendet, die die erforderlichen Bedingungen für die Aufrechterhaltung der Integrität und Konformation der isolierten spezifischen Fraktionen liefern. Jegliche Reagenzien, die von sich aus toxisch (unannehmbar toleriert) sein könnten oder eine Immunreaktion auf andere Weise beeinflussen oder anderweitig verändern könnten, werden vermieden.

Das bevorzugte Isolationsverfahren umfaßt das Züchten einer Keimpartie der Bakterienzellen in einem geeigneten Kulturmedium bei einer geeigneten Temperatur (30–40°C) zu einer Log-Phasen-Kultur (eine gegebene Wachstumsphase wird auf eine Endproduktausbeute und Konsistenz bezogen ebenso wie die Enddichte von lebensfähigen Zellen pro Volumeneinheit verarbeiteten Kulturmediums); das schnelle Abschrecken der Log-Phasen-Kultur auf 0–4°C; das Ernten der Bakterienzellen; das Waschen und Aufschwemmen der geernteten Zellen auf eine vorgeschriebene Dichte in einem geeigneten Puffersystem, das ein Milieu aufrechterhält, welches für die Bildung und Stabilität der Membranbläschen und für die Stabilität der Ribosomen geeignet ist; das Aufbrechen (Auflösen, Aufplatzen) der Zellen in einem geeigneten Zellspalter oder Französischen Druckzelle zur Erzeugung von Membranbläschen mit einem Durchmesser von mehr als etwa 110nm oder 0,11 Mikrometer (das Zerreißen der

Zellen findet in Gegenwart eines geeigneten Detergents zur leichteren Endotoxinauflösung statt); das Reinigen der Bakterienzellsate von Zellresten einschließlich intakten Zellen, Zellwandfragmenten und großen ribosomalen Anhäufungen und Polysomen, Legen des gereinigten zellulären Lysats, das die Bläschen und restlichen löslichen Zellbestandteile enthält auf ein geeignetes lineares oder diskontinuierliches Dichtegradientmaterial, das nichttoxisch (zulässige Toleranz) und nichttimmunogen ist; das Pelletisieren der geeigneten Bläschen- und Ribosomenfraktionen bei Minimieren des Pelletisierens unannehmbarer kleinerer Fraktionen; das aseptische Entfernen des Dichtegradientmaterials; das Spülen der pelletierten Fraktion und das anschließende gleichmäßige Wiederaufschwimmen der Membranbläschen und Ribosomen bei minimalem Zerschneiden in einem geeigneten Puffersystem.

Bei der Durchführung des obenbeschriebenen Isolationsverfahrens kann das Schnellabschrecken der Log-Phasen-Kultur auf 0–4°C mit jedem geeigneten Mittel herbeigeführt werden, zum Beispiel durch die Anwendung eines Trockeneis-Alkohol-Gemischs, eines Aceton-Eis-Gemischs, eines Alkohol-Eis-Gemischs oder von Spezialvorrichtungen wie Kühlschlängen. Alle nachfolgenden Schritte werden vorzugsweise bei 0–4°C durchgeführt. Das Zellernten kann durch Zentrifugieren durchgeführt werden, stattdessen können aber auch Zellerntevorrichtungen/Eindicker verwendet werden. Das Reinigen von Zellrückständen und das Isolieren der spezifischen Bläschenfraktion kann insgesamt durch Zentrifugieren erreicht werden. Die Membranbläschen- und Ribosomenfraktionen können auch durch Anwendung der Korngrößenabschluß-Chromatografie isoliert werden. Gereinigtes Zellysat wird durch Gele wie Sephadex G-25, G-50, G-100, G-200, Sepharose 2B, Sephacryl S-200, Sephacryl-500, Biogel P-30, Sepharose 4B, TSK HW-75F Fractogel (alles Warenzeichen) oder andere ähnliche Gele mit einer Molekülausschlußgrenze von rund 5000 bis 40000000 Dalton geleitet. Gereinigtes Zellysat wird in eine vorgesättigte Säule gegeben. Die Membranbläschen erscheinen im Volumen der Zwischenräume, während andere Proteine, Zellrückstände und Detergent in größeren Volumina herausgelöst werden. So werden zum Beispiel 1 ml gereinigtes Lysat in eine 10 ml große G-100 Sephadex (TM) Säule gefüllt und mit Pufferlösung herausgelöst. Die Membranbläschen erscheinen im Volumen der Zwischenräume. Andere Proteine und Zellprodukte werden bei höheren Volumina herausgelöst. Das Produkt kann wiederholt durch die Säule geleitet werden, doch verursacht jeder Durchlauf mindestens eine zweifache Verdünnung der Probe. Das Produkt kann (wenn erforderlich) durch Ultrafiltration oder durch Zentrifugieren eingedickt werden.

Säulen und Gele können auf sterile und endotoxinfreie Weise hergestellt werden, wie von den Gelherstellern angegeben ist. Sephadex-Gel (TM) kann zum Beispiel im Autoklav bei 15 Pound/Quadratzoll im Flüssigkreislauf 15 Minuten lang behandelt werden. Das Gelmaterial wird auf Raumtemperatur abgekühlt, in eine mikrogereinigte endotoxinfreie Säule gegossen und bei einem Durchsatz von 8–30 ml/h gefüllt. Der Säulenabfluß kann mit Hilfe des gut bekannten LAL-Versuchs auf eine Endotoxinverunreinigung geprüft werden.

Ein geeignetes Puffersystem zur Isolierung der Membranbläschen- und Ribosomenfraktionen der Erfindung besteht aus 20 mM $MgSO_4$, 50 mM NH_4Cl und 20 mM Tris HCl, pH 7,6; und für die Endsuspension kann die obige Pufferlösung oder Tris oder phosphatgepufferte isotonische Salzlösung mit dem gleichen pH-Wert verwendet werden. Das Magnesiumsulfat kann durch jede andere geeignete Quelle von Magnesiumionen wie Magnesiumacetat ersetzt werden. Die Komponenten des Puffersystems und ihre spezifischen Konzentrationen können verändert werden, so lange die Unversehrtheit der durch die beschriebene Verfahrensweise isolierten Membranbläschen- und Ribosomenfraktion aufrechterhalten wird. Tris-HCl kann durch Trizma 7,1, Trizma 7,2 oder jede andere geeignete Tris-Puffersubstanz, die auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,6 eingestellt ist, ersetzt werden. Jedes beliebige Puffersystem/Puffersubstanz, die die Unversehrtheit der Membranbläschen oder Ribosomen nicht verändern und die zulässig von den Geweben und dem intakten Organismus bei der angewendeten Konzentration toleriert werden, können verwendet werden. Der tatsächliche pH-Wert des Puffersystems muß mit der Aufrechterhaltung der Bläschen und Ribosomen und der Gewebe, in die der Stoff eingespritzt wird, vereinbar sein.

Die Zellen werden so aufgelöst, daß ein Bruch und Scheren der Zelle verursacht wird, um die Membranbläschen zu erzeugen. Jede geeignete Verfahrensweise, die die gewünschten Membranbläschen erzeugt, kann angewendet werden. Es ist gefunden worden, daß eine mechanische Ausführung der Auflösung (Lysis), z. B. in einem Zellspalter oder einer Französischen Druckzelle, vorzuziehen ist. Die mechanische Auflösung (Lysis) wird durchgeführt, um genügend Scherung zur Erzeugung der Membranbläschen und dazugehörigen Ribosomen zu erreichen.

Ein zufriedenstellendes Auflösungsverfahren besteht in der Anwendung eines Mikroverflüssigers (Microfluidizer 110, Modell 110T von der Biotechnology Development Corporation). Die Mikrofluidisation ist die dynamische Wechselwirkung von zwei Bakterienflüssigströmen in genau definierten Mikrokanälen, die zur Auflösung der Bakterien und zur Herstellung von Membranbläschen einheitlicher Größe führt. Die Bakteriensuspension wird durch die Wechselwirkungskammer des Mikroverflüssigers bei 10000 bis 14000 psi (709 bis 984 kp/cm^2), 6 bis 12mal gepumpt, um die Auflösung der Zellen und den richtigen Größenbereich der Bläschen zu sichern. Optimale Bedingungen sind 11000 psi (773 kp/cm^2) und neun Durchläufe. Eine geeignete Zellenkonzentration für die Mikrofluidisation (Vol. Zelle: Vol. Pufferlösung) ist 0,16.

Wo eine Französische Druckzelle angewendet wird, sollte der Betriebsdruck der Zelle für einen hohen Grad an Zellspaltung sorgen, so daß die gewünschten Membranbläschen gebildet werden. Ein bevorzugter Druck liegt bei etwa 12000 psi (844 kp/cm^2), Drücke im Bereich von etwa 10000 psi bis etwa 35000 psi (709 bis 2460 kp/cm^2), sind jedoch auch zufriedenstellend. Eine zufriedenstellende Französische Druckzelle ist das Modell Nr. J43339, 40000 psi (2812 kp/cm^2) Nennbetrieb, das von SLM Instruments in Champagne, Illinois, erhältlich ist. Eine automatische Hydraulikpresse wird angewendet, um die Zelle unter Druck zu bringen, vorzugsweise auf eine Nennhöhe von 12000 psi (844 kp/cm^2). Der Druck darf nicht um mehr als etwa ± 500 psi schwanken. Drücke unter 12000 psi (844 kp/cm^2) (Zelldruck) führen zu einer wesentlich geringeren Auflösung (Lysis) der Zellen und zunehmend mehr Bläschen von weniger als etwa 110 nm. Das Ausgangsventil wird geöffnet, um einen Lysatabfluß in einer Menge von etwa 20 ml pro Minute zu gewährleisten. Ein Abfluß von nur 1,0 ml/Minute ist jedoch auch akzeptabel (Bereich 1–40 ml/Minute). Der Durchsatz muß so sein, daß Bläschen des festgelegten Größenbereichs zur Verfügung gestellt werden. Der geeignete Zellkonzentrationsbereich für den Durchlauf in der Französischen Druckzelle (Vol. Zellen: Vol. Zellen + Vol. Pufferlösung) beträgt 0,16 bis 0,32.

Ein Detergent sollte angewendet werden, um Endotoxine und Membranfragmente zu kleineren, leichter trennbaren Teilchen aufzuspalten. Ein besonders geeignetes Detergent für den Einsatz in dem Zellauflösungsverfahren ist Natriumdeoxycholat. Ein geeigneter (Deoxycholat-) Endkonzentrationsbereich liegt bei 0,15–0,34. Es sollte ein nichttoxisches (gut toleriertes) Detergent angewendet werden.

Das erfindungsgemäße Produkt ist im wesentlichen frei von Zellwänden, biologisch aktivem Endotoxin, wie durch verschiedene biologische Versuche und Humantoxizitätsuntersuchungen festgestellt worden ist, und frei von Zellmembranfragmenten. Das Produkt ist ebenfalls frei von intakten Zellen. Um dies zu erreichen, werden vorzugsweise zwei Zentrifugierungsschritte angewendet. Die erste Zentrifugierung ist wie folgt:

a) Zwanzig Milliliter kalten Bakterienzellsats werden während des Auflösungsprozesses in einer mikrogereinigten, sterilen Polycarbonatflasche eines Beckmann #30 Rotors mit einer Temperatur von 0–1 °C aufgefangen. Die Anzahl solcher Zentrifugenflaschen, die so vorbereitet sind, wird durch die Menge an herzustellendem Endprodukt bestimmt. Diese Lysatvolumen repräsentiert ein laufendes, senkrecht $R_{\min.}$ von 72 mm und ein nützliches $R_{\max.}$ von 95 mm. Die Röhrchen werden in einem vorgekühlten (0–4 °C) Beckman #30 Rotor bei 16000 U/Min. unter Anwendung einer normalen Beschleunigung in einer Beckmann-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Zentrifugierzeit ist so hoch, daß der durchschnittliche S-Wert, berechnet zwischen $R_{\min.}$ und $R_{\max.}$ 600 beträgt. Zentrifugierzeiten, die zu durchschnittlichen S-Werten des Lysats unter 600 führen, resultieren in einem wesentlichen Produktverlust. Durchschnittliche S-Werte, die wesentlich über 600 (z. B. 900 S) liegen, laufen Gefahr, daß das Produkt am Ende mit verschiedenen toxischen Zellbestandteilen verunreinigt ist. So lange es zu keiner Produktverunreinigung kommt, bringen die höheren Durchschnittswerte von S eine erhöhte Produktausbeute. Ein anwendbarer sicherer Bereich liegt bei etwa 600 bis 800 S (im Durchschnitt). Bei Anwendung eines Beckmann #30 Rotors, Polycarbonatflaschen und eines Lysatvolumens von 20,0 ml wird ein gereinigtes Lysat bei einem Durchschnitt von 600 S mit $W^2t = 3,55 \times 10^9$ gewonnen (20minütiger Lauf bei 16000 U/Min. + 3 Min. zur Erreichung der Geschwindigkeit bei normaler Beschleunigung). Bei diesem Verfahren werden intakte lebensfähige und tote Zellen und alle großen Zellfragmente und subzelluläre Komponenten einschließlich großer Polysomenaggregate mit einem durchschnittlichen S-Wert von über 600 entfernt. Das Zentrifugierverfahren wird bei 0–4 °C durchgeführt. Die Bremse wird bei 500–1000 U/Min. freigegeben, und den Rotor läßt man vollständig zum Stillstand kommen. Um ein Herumwirbeln des Röhrcheninhalts zu vermeiden, sollte die Bremse nicht unter 500 U/Min. freigegeben werden. Ein Freigeben der Bremse bei Umdrehungszahlen über 1000 verlängert nur den Produktionsprozeß. Es können auch andere Rotoren und Zentrifugen angewendet werden (z. B. Sorvall Superspeed und ein SS-34-Rotor, Beckman Superspeed Zentrifugen und gleichwertige oder größere Rotoren), so lange die Methode eine gleichwertige ist.

b) Alle Verfahren werden bei 0–4 °C durchgeführt. Das gereinigte Lysat wird sorgfältig und aseptisch mit einer kalten sterilen, nichtpyrogenen Spritze und 18 G Spinalnadel (oder Gleichwertigem) geerntet (15–16 ml Gesamtvolumen). Die Nadelspitze wird dabei einige Millimeter unterhalb der Lysatoberfläche gehalten, und es ist darauf zu achten, daß die Seiten der Zentrifugenflasche nicht berührt und das Pellet nicht gestört wird. Das geerntete Lysat wird sofort durch einen kalten 0,45 Mikrometer großen Filter (z. B. Millex HA, Millipore) gegeben und in einem bzw. mehreren kalten, sterilen, nichtpyrogenen, vorzugsweise nichtbindenden Plaste-/Glasröhrchen aufgefangen.

Nach dem ersten Zentrifugierungsschritt und der Filtration wird das Lysat dann sofort auf Saccharosegradienten in mikrogereinigten, sterilen, kalten Polycarbonatzentrifugenflaschen geschichtet. Das verwendete Verdünnungsmittel ist das oben beschriebene Puffersystem. Die beschichteten Gradienten werden dann dem zweiten Zentrifugierungsschritt unterzogen.

Die Produktionsparameter sind folgende:

(1) Grundproduktausbeute (1–1,2 mg Produkt/1,0 ml gereinigtes geschichtetes Lysat/Gradient).

50 Beckman-Rotor:

Gradient: 4–5 ml 15% (Masse in Massekonzentration) Saccharose geschichtet auf 3,0 ml 30% (Masse in Massekonzentration) Saccharose in Polycarbonatflaschen – scharfe Grenzfläche.

Die Saccharose ist steril und endotoxinnegativ nach einer quantitativen Limulus-Bestimmung.

Probengröße: 1,0 ml gereinigtes/gefiltertes Lysat

Zentrifugierung: 0–4 °C; langsame Beschleunigung; 38000 U/Min.; 60 Minuten bei Geschwindigkeit.

(2) Zur Erhöhung der Menge an durch Zentrifugieren isoliertem Produkt können die folgenden Rotoren angewendet werden:

30 Beckman-Rotor:

Gradient: 11,0 ml 15% (Masse in Massekonzentration) Saccharose (je nach dem geschichteten Lysatvolumen) geschichtet auf 9,0 ml 30% (Masse in Massekonzentration) Saccharose in Polycarbonatflaschen – scharfe Grenzfläche.

Die Saccharose ist steril und endotoxinnegativ nach einer quantitativen Limulus-Bestimmung.

Probengröße: 4–5 ml gereinigtes/gefiltertes Lysat

Zentrifugierung: 0–4 °C; langsame Beschleunigung; 30000 U/Min.; 120 Minuten bei Geschwindigkeit. Die Zeit bei

Geschwindigkeit (+ oder –) wird zur Maximierung der Ausbeute und Minimierung der Kontamination eingestellt. Dies hängt von dem Volumen des geschichteten Lysats ab. Abbremsung erfolgt bei 1000 U/Min. (Nicht unter 500 U/Min.) Siehe Anleitungen des Herstellers hinsichtlich der Empfehlungen zum Abbremsen bei spezifischen Zentrifugen/Rotor-Kombinationen.

14 Beckman-Rotor:

Gradient: 100 ml 25% (Masse in Massekonzentration) Saccharosepuffer in Polycarbonatflaschen. Die Saccharose ist steril und endotoxinnegativ nach einer quantitativen Limulus-Bestimmung.

Probengröße: 100 ml gereinigtes/gefiltertes Lysat.

Zentrifugierung: 0–4 °C; langsame Beschleunigung; 14000 U/Min.; 12 Stunden bei Geschwindigkeit; Abbremsen bei 500 U/Min. während der Verlangsamung.

10 Beckman-Rotor:

Gradient: 200 ml 25% (Masse in Massekonzentration) Saccharosepuffer in Polycarbonatflaschen. Die Saccharose ist steril und endotoxinnegativ nach einer quantitativen Limulus-Bestimmung.

Probengröße: 200 ml gereinigtes/gefiltertes Lysat.

Zentrifugierung: 0–4 °C; langsame Beschleunigung; 10000 U/Min.; 23 Stunden bei Geschwindigkeit; Abbremsen bei 500 U/Min. während der Verlangsamung.

Das zweite Zentrifugierverfahren ermöglicht über die Pelletierung die Isolierung der Membranbläschenfraktion von spezifischer Größe und der Restribosomenfraktion, wobei kleinere Fraktionen wie DNA-Fragmente, RNA-Fragmente, Proteinfragmente, Zellwandfragmente und Membranfragmente in den oberen Abschnitten des diskontinuierlichen Gradienten zurückgelassen werden. Die spezifische Zentrifugierungszeit bei diesen Rotoren ist so, daß das Endprodukt nicht wesentlich

durch unerwünschte Zellbestandteile verunreinigt wird. Wenn die Zentrifugenzeiten zur Reduzierung der Menge an den obigen Verunreinigungen nicht verändert werden kann, kann das folgende Waschverfahren angewendet werden:

Zum Beispiel für den #30 Beckman-Rotor:

- a. Die Pellets (von dem #30 Beckmann-Rotor oder einem gleichwertigen Rotor, siehe oben) werden mit 10ml einer geeigneten Pufferlösung auf jeweils 12 Röhrchen wiederaufgeschwemmt. Die wiederaufgeschwemmten Pellets werden in einen sterilen, nichtpyrogenen mikrosauberen Behälter gegeben. Die Zentrifugenröhrchen werden dann mit 2ml einer geeigneten Pufferlösung auf jeweils 10 Röhrchen gespült. Die Spüllösung wird dann mit den wiederaufgeschwemmten Pellets in dem entsprechenden Behälter vermischt. Die Lösung wird durch wiederholtes Pipettieren (zehnmal mit einer 10-ml-Spritze) oder durch Herumschwenken für einige Sekunden vermischt.
- b. 5 ml der wiederaufgeschwemmten Pellets werden in ein steriles, nichtpyrogenes Polycarbonatzentrifugenröhrchen des #30 Rotors, das 15ml geeignete Pufferlösung enthält, pipettiert.
- c. Die Röhrchen werden 25 bis 40 Minuten zentrifugiert bei normaler Beschleunigung und Abbremsung.

Es können auch andere Arten von Zentrifugen und Rotoren angewendet werden, so lange die Methode eine gleichwertige ist (z. B. hat der 50.2 Ti Beckman-Rotor eine kürzere Laufzeit bei Anwendung von Gradienten der gleichen Größe). Anstelle des diskontinuierlichen Gradienten können auch geeignete lineare Gradienten angewendet werden.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren isolierte pelletierte Fraktion wird gewaschen und anschließend in einer der oben beschriebenen geeigneten Suspendierflüssigkeiten oder Pufferlösungen aufgeschwemmt und mit einem geeigneten Filter von 0,45 oder 0,22 Mikrometer filtersterilisiert.

Die Suspendierflüssigkeit kann von jeder geeigneten pharmazeutischen oder vorzugsweise analysenreinen Qualität und ohne Fraktionen sein, die zum Ausfällen, zum Abbau, zur Zusammenballung oder funktionalen Hemmung der suspendierten Fraktion beitragen könnten.

Die Produktquantisierung basiert auf dem Nukleinsäuregehalt, der nach den folgenden Formeln bestimmt wird:

$$E_{260} = 0,0373 - 0,0079 (A_{260}/A_{280})$$

$$\text{Mikrogramm Nukleinsäure} = A_{260}/E_{260}$$

Eine 0,05-ml-Probe des wiederaufgeschwemmten Produktkonzentrats wird in der geeigneten wiederaufschwemmenden Pufferlösung verdünnt, so daß A_{260} für Standardisierungszwecke zwischen 0,4 und 0,5 liegt. Unter Anwendung der Suspendierpufferlösung als Blindprobe wird dann die Extinktion bei 280nm, 260nm, 225nm und 215nm bestimmt. Wenn der Nukleinsäuregehalt bestimmt ist, wird das Produkt auf eine Endkonzentration von 1,0mg Nukleinsäure pro 0,5 ml Pufferlösung verdünnt. Der Proteingehalt des Produkts kann mit Hilfe der folgenden Formel näherungsweise bestimmt werden:

$$\text{Mikrogramm Protein/ML} = 144(A_{215} - A_{225}).$$

Die durchschnittliche Produktausbeute bei Anwendung des Zentrifugierens ist 1,0-1,2 mg pro 1,0ml gereinigtes Lysat. Das Mittel des Extinktionsverhältnisses A_{260}/A_{280} beträgt 1,7626 bei einer Standardabweichung von 0,0626. Der mittlere E_{260} beträgt 0,0232 bei einer Standardabweichung von 0,0007.

Der Grund für die hohe funktionelle Wirksamkeit (unten beschrieben) von Produkt mit Bläschen dieser Größe wird gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden.

Nichtsdestoweniger wird angenommen, daß die spezifizierete Größe der Membranbläschen, d. h. ein mittlerer Durchmesser von mindestens 180nm, und im wesentlichen eine Mindestgröße von etwa 110 nm signifikant sind./15/

Das erfindungsgemäße Präparat ist im wesentlichen frei von biologisch aktiven Endotoxinen und Zellwandfraktionen, wodurch eindeutig Toxizitätsprobleme reduziert werden. So verursacht die Erfindung beispielsweise keine kutane Nekrose/ Geschwürbildung oder den Tod bei vier Tage alten Mäusen, wie nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt ist. Bei dieser Untersuchung bekamen vier Tage alte Mäuse (C57B1/6) die Erfindung im nuchalen (Nacken-) Bereich eingespritzt und wurden auf die Entwicklung von Nekrose und/oder Tod beobachtet. Darüber hinaus wiesen diese Tiere eine normale Gewichtszunahme auf - ein weiteres Zeichen für das Fehlen von toxischen Verunreinigungen.

Tabelle 1 Dermonekrosetest

Anz. v. Tieren	Erfindung Dosis	Nekrose/Tod			
		18 h	24 h	48 h	96 h
4	10 µg	0/0	0/0	0/0	0/0
7	100 µg	0/0	0/0	0/0	0/0
6	200 µg	0/0	0/0	0/0	0/0

Das mittlere Gewicht der Gruppe mit 100µg bei t_0 und 24 Stunden nach der Injektion betrug 1,72g bzw. 2,94g.

Das mittlere Gewicht der Gruppe mit 200µg bei t_0 , 24 Stunden und 6 Tage nach der Injektion betrug 1,57g, 2,16g bzw. 4,5g.

Eine Untersuchung der Histaminüberempfindlichkeit in 8 Wochen alten CFW-Mäusen erbrachte ebenfalls das Fehlen von Toxizität infolge von Endotoxin.

Tabelle 2 Histaminüberempfindlichkeitstest

A. Endotoxin Dosierung (Mikrogramm)	Weg	D/T*
E. coll (Phenol, Sigma) 0,5	i.p.	4/6
E. coll (TCA, Sigma) 0,5	i.p.	3/6
B. Erfindung Dosierung (Mikrogramm)		
100	i.p.	0/6
200	i.p.	0/6
600	i.p.	0/6
2000	i.p.	0/7

* Todesfälle auf die Gesamtzahl der behandelten Mäuse nach einem i.p. Angriff mit 0,5mg Histamindiphosphat (Sigma) 90 Minuten nach der Verabreichung. Endotoxin (0,5 Mikrogramm) mit i.p. Verabreichung führt zu 50% zum Tod nach Histaminangriff. 7/7 Mäuse, Ratten und Guinea Schweine zeigen typisch hypothermische Reaktionen nach der Verabreichung von Endotoxin oder infektiösen Angriff, während sie nach Verabreichung der Erfindung Hyperthermie (1-2°C) entwickeln.

Darüber hinaus haben einmalige oder wiederholte Injektionen bei Mäusen, Ratten, Guinea Schweinen und Menschen (über 100 Personen) nicht zu Anergie, Pruritis, DIC (disseminierte intravaskuläre Koagulation), Adjuvansarthritis, Anaphylaxie (Überempfindlichkeit), Erhöhung der Leberenzyme oder Nekrose oder Geschwürbildung lokaler Injektionsstellen über einen Dosisbereich von 5 Mikrogramm bis 10 Milligramm (bei zwei- bis dreimaliger Verabreichung in der Woche an Personen) geführt. Die maximale Gesamtdosis in einer Woche hat 12 Milligramm nicht überschritten. Bei intravenöser Verabreichung an Kaninchen ist eine beidseitige hämorrhagische Nekrose der Nieren nicht aufgetreten.

Die Membranbläschen in dem erfindungsgemäßen Produkt scheinen von Monozyten und Makrophagen leicht endozytiert zu werden, wie mit der Phasenkontrastmikroskopie beobachtet wird. Es ist bekannt, daß die Endozytose zu einem Umschlagen der Zellmembran führt und daß ein Membranzyklisieren in der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie diese Zellen aktiviert.

Die Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie werden künstlich in verschiedene funktionelle Kategorien aufgespalten, von denen jede eine zunehmend differenziertere Zelle repräsentiert. Diese Kategorien (die Terminologie kann unterschiedlich sein) sind: Monozyten, normale oder residente Makrophagen, stimulierte Makrophagen, aktivierte nichttumorzide Makrophagen, aktivierte tumorzide Makrophagen. Je differenzierter die Zelle, um so weniger hartnäckig ist sie gegenüber den verschiedenen Stimulierungstypen, doch um so eingeschränkter kann sie möglicherweise in Effektorfunktionen werden. Im Gegensatz dazu wird in fortgeschrittenen und chronischen Krankheitszuständen die Monozyten-Makrophagen-Zelllinie zunehmend hartnäckiger gegenüber Stimulierung, wie dies beim Immunsystem im allgemeinen der Fall ist. Von diesen Stufen ist nur für die aktivierten tumorziden Makrophagen nachgewiesen worden, daß sie direkt zytotoxisch gegenüber Tumorzellen sind.

Spezifischer gesagt, die Monozyten-Makrophagen-Produktendozytose ist im Zusammenhang mit Murinzellen beobachtet worden. Normale Monozyten und residente Makrophagen wurden gesunden erwachsenen C57B1 Mäusen, ohne vorherige manipulative Verfahren und ohne Heparin, aus der Bauchhöhle entnommen. Die anfängliche anhaftende Zellpopulation bestand aus mehr als 90% gerundeten Zellen, wobei die restlichen Zellen die typische Morphologie von Makrophagen hatten.

Runde Zellpopulationen bestanden aus Monozyten und großen Zahlen von Zellen, die das Aussehen von Lymphozyten mittlerer Größe hatten. Alle Zellen endozytierten Produkt und waren somit Glieder der Monozyten-Makrophagen Zelllinie.

Innerhalb von Minuten nach der in-vitro-Zuführung des erfindungsgemäßen Produkts zu einer gereinigten frischen Population von Monozyten und residenten Makrophagen (gerundete Zelle) begannen zahllose winzige Bläschen, die mit der Zeit an Größe und Zahl zunahm, direkt unter den Zellmembranen zu erscheinen. Die phagozytische Aktivität veränderte sich in direktem Verhältnis zur Konzentration des zugeführten erfindungsgemäßen Produkts. Autophagozytischer Tod mit vorangegangener extremer Vakuolisierung unter Beibehaltung einer gerundeten Zellmorphologie trat auf, als die Konzentration an dem erfindungsgemäßen Produkt 50 Mikrogramm pro 3ml Medium/10⁵ Zellen überschritt. Es wurden weder eine phagozytische Aktivität noch eine Zellaktivierung beobachtet, nachdem Endotoxin oder BCG-Zellwände bei verschiedenen Konzentrationen identischen Zellpopulationen zugeführt worden waren. B16 Melanom- und Niereneithelzellen zeigten keine phagozytische Aktivität in Gegenwart des erfindungsgemäßen Produkts oder in Gegenwart von Endotoxin oder BCG-Zellwandprodukten. Es ist möglich, daß ein Rezeptor, der für einen Bestandteil der Bläschen und/oder Ribosomen der Erfindung spezifisch ist, existiert, der die scheinbare schnelle Internalisierung des erfindungsgemäßen Produkts durch die monozytenresidenten Makrophagen erklären würde. Andere Erklärungen, die nichtspezifische physikalische und/oder chemische Wechselwirkungen (wie relative Hydrophobizität) einschließen, sind ebenfalls möglich.

Die unten angeführte Tabelle 3 faßt die Ergebnisse einer monozytenresidenten Makrophagen-Zytotoxizitätsuntersuchung zusammen, bei der das erfindungsgemäße Produkt bei Konzentrationen von 0 bis 100 Mikrogramm in Abständen von 5 Mikrogramm in 25-cm²-Kolben, die 10⁵ B16 Melanomzellen als Zielzellen und peritoneale Monozyten/residente Makrophagen der Maus als Effektorzellen enthielten, in vitro verabreicht wurde. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen ist in der linken Spalte angegeben. Die Zellen wurden in 95%igem Ethanol fixiert und mit Mayers Hematoxylin 96 Stunden nach Versuchsbeginn gefärbt. Die mit einem Pluszeichen versehenen Ergebnisse bedeuten, daß ein makroskopisches Wachstum bei 80%-100% Konfluenz leicht sichtbar war. Ein negatives Zeichen deutet darauf hin, daß kein sichtbares makroskopisches Wachstum vorhanden war, wobei eine wesentlich reduzierte oder fehlende Zielzellpopulation mikroskopisch bestätigt wurde.

Tabelle 3 Tumorzytotoxizitätsversuch

E/Z Verhältnis	Sichtbares (konfluentes) Wachstum bei 96 Stunden bei Produktkonzentration (Mikrogramm)															
	0	3	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70-100
2:1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1:1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1:2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, daß sehr spezifische Konzentrationen (5, 1' und 50 Mikrogramm) des erfindungsgemäßen Produkts die Differenzierung von peritonealen Monozyten/residenten Makrophagen bis zu einem tumorzytotoxischen Zustand hervorrufen. Hohe Zytotoxizitätswerte werden bei Effektor-Ziel-Verhältnissen von 2:1 oder weniger erreicht. Die beobachteten tumorzytotoxischen Wirkungen waren extreme Vakuolisierung, Zellkontraktion und/oder Erhöhung der Phasendichte; sie wurden innerhalb von nur acht Stunden nach der Zuführung der wirksamen Konzentrationen an dem erfindungsgemäßen Produkt beobachtet.

Früher veröffentlichte Untersuchungen zeigen, daß aktivierte nichttumoride Makrophagen 18 Stunden Lymphokinen ausgesetzt sein müssen, bevor sie Zielzellen töten, wobei Monozyten und residente Makrophagen nicht reagieren. Die zytotoxische Aktivität, die in Monozyten/residenten Makrophagen durch das erfindungsgemäße Produkt hervorgerufen wird, ist sehr schnell und einmalig. Die Tatsache, daß die Kulturen vor der Beendigung vier Tage lang inkubiert wurden, demonstriert die schnelle und wirksame Herbeiführung der Effektorzellfunktion und langfristigen Zielzellüberwachung im Ergebnis der Verabreichung des erfindungsgemäßen Produkts. Die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Produkts, die Werte von verschiedenen weißen Blutkörperchenzählungen (WBC) und die neutrophilen Werte zu verändern, ist in Tabelle 4 dargestellt. Tabelle 4 enthält die Anzahl der weißen Blutkörperchen und neutrophilen Werte für eine Reihe von im Endzustand kranken Patienten, die vor und nach der Verabreichung des erfindungsgemäßen Produkts entnommen wurden. Die Dosishöhen sind angegeben. Das Produkt wurde drei Wochen lang einmal in der Woche verabreicht. Aus den Beispielen in Tabelle 4 ist ersichtlich, daß die angegebene Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Produkt die Anzahl der weißen Blutkörperchen und Neutrophilie wesentlich erhöht. Es ist zu beachten, daß die Veränderung der Anzahl der weißen Blutkörperchen nicht zwangsläufig weder bei allen Dosierungen noch bei allen Patienten eine Erhöhung ist. (Sie ist aber keine Abnahme.) Bestimmte Patienten reagieren jedoch auf die Verabreichung des erfindungsgemäßen Produkts mit einer wesentlichen Erhöhung der Anzahl der weißen Blutkörperchen und Neutrophilie, wie in Tabelle 4 gezeigt ist.

Tabelle 4

Patient Nr.	Produkt- dosis (mg)	WBC × 1000		Neutrophile (%WBC)	
		davor	24 h danach	davor	24 h danach
D59261	1,0	18	27	88	92
D25940	1,0	3,8	6,2	58	70
D78252	1,5	8	10,5	67	82
D45851	1,5	8,6	13,6	77	90
	3,0	13,3	22,7	90	92
D80822	2,0	6,7	7,8	59	74
	3,0	6,1	9,6	59	75
D82088	4,0	3,2	9,4	70,3	93
	6,0	3,5	6,3	56	85
D90607	6,0	8,0	9,6	72	84

normale Bereiche: WBC $7,8 \pm 3 \times 1000$
Neutrophilie 40-70%

Patienten mit niedrigen WBC-Werten vor der Therapie gelangen 24 Stunden nach der Therapie in den normalen Bereich. Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Produkts führt auch zur Erhöhung der Anzahl von peripheren mononukleären Blutzellen (natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Zellen und/oder Monozyten) beim Menschen und bewirkt keine Thrombozytopenie (Daten nicht angegeben). Das erfindungsgemäße Produkt hat somit keine zytostatische Wirkung auf das Knochenmark.

Eine richtige Immunfunktion erfordert das koordinierte Zusammenwirken von verschiedenen Zelltypen und die regelmäßig folgende Erzeugung und Freigabe von zahllosen Zellprodukten. Es ist bekannt, daß die Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie eine zentrale Rolle spielen, insofern als optimale Antikörperreaktionen (B-Zellfunktion), zellvermittelte Immunität (T-Zellfunktion) und möglicherweise die Aktivität der natürlichen Killerzelle (NK-Zelle) bei ihrem Fehlen nicht auftreten. Obwohl verschiedene kooperative zelluläre Bahnen in der Gewebekultur aufgeklärt werden können, ist es nicht möglich, die Vielheit von Bahnen und die wirksamen Kontrollmechanismen im Menschen als Patient zu bestimmen. Da die im Menschen auftretenden verschiedenen spezifischen und/oder nichtspezifischen Immuneffektormechanismen im wesentlichen unbekannt sind, sollte ein zur Potenzierung/Modifizierung der Immunfunktion ausgewähltes Mittel jegliche stattfindenden Reaktionen vermehren oder beim Fehlen von Reaktionen die Systemreaktionsschwelle herabsetzen und somit das Erkennen, die Aktivierung und Auswahl der entsprechenden Effektorfunktionen ermöglichen. Das ideale aktivierende Mittel sollte nicht immunabweichende, anergische oder aberrante Überempfindlichkeitsreaktionen, die auf es selbst oder kreuzreagierende Einheiten gerichtet sind, hervorrufen oder die Auswahl einer spezifischen singulären Effektorbahn fördern oder lenken. Das erfindungsgemäße Produkt erfüllt diese Forderungen, da keine dieser Erscheinungen während klinischer Tests mit signifikanten Werten beobachtet worden ist.

Figur 2 veranschaulicht die Fähigkeit des Modifikationsmittels der biologischen Reaktion dieser Erfindung, natürliche Killerzellen beim Menschen in einer Weise zu stimulieren, die mit der von Leukozytinterferon vergleichbar ist. Das in-vitro-Experiment veranschaulicht den Grad der Auflösung von Zielzellen (gemessen in Form der Freisetzung von radioaktivem Chrom aus den Zielzellen) durch die Wirkung der menschlichen natürlichen Killerzellen bei verschiedenen Dosishöhen des erfindungsgemäßen Produkts und Interferon, was in den entsprechenden graphischen Abbildungen dargestellt ist. Die Codes für die Dosiswerte sind unter jeder graphischen Darstellung angegeben, wobei der Dosiswert Null den Hintergrund oder die Nullrate für die Chromfreisetzung aus den Zielzellen darstellt.

Die Versuche wurden gemäß den in der Literatur/8, 9/ beschriebenen Versuchen durchgeführt. Menschliche K562 Zellen von der Myeloidtumormlinie wurden mit radioaktivem Natriumchromat markiert und dienen als die Zielzellen. Die verwendeten Effektorzellen waren nichtverarmte menschliche periphere mononukleäre Blutzellen. Das Abtöten wird durch die folgende Formel berechnet:

$$\% \text{ Freisetzung} = \frac{\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{Kontrollfreisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{Kontrollfreisetzung}} \times 100$$

Die experimentelle Freisetzung ist die Zählung der Radioaktivität pro Minute (CPM) in Gegenwart des Produkts und Effektor- plus Zielzellen, und die Kontrollfreisetzung ist die Zählung pro Minute (CPM), die nur mit Hilfe der Effektor- plus Zielzellen ermittelt wird. Die maximale Freisetzung erhält man durch Inkubieren einer aliquoten Menge Zielzellen in Saponin, einem Detergent. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen an, daß, obwohl nicht so hoch wie bei Interferon bei relativ niedrigen Verhältnissen von Effektor zu Zielzelle, es trotzdem bei einer signifikanten Höhe, vergleichbar der von Interferon, zu einer NK-Zellenzytotoxizität beim Menschen in Gegenwart von Monozyten deutlich kommt. Die statistische Analyse von mehr als 30 Produktpartien zeigt, daß das erfindungsgemäße Produkt in der Hervorrufung von NK-Zellenzytotoxizität gleich oder besser ist als Leukozyteninterferon. Die durch das erfindungsgemäße Produkt hervorgerufene NK-Zellenzytotoxizität ist der von Interferon bewirkten Zytotoxizität ähnlich und ist von einer Reihe von Variablen abhängig, zu denen das Alter und das Geschlecht des Blutspenders, die Methode der Zellagerung und das Verhältnis der vorhandenen Zelltypen gehören.

In Figur 3 sind die bakteriziden Eigenschaften des Modifikationsmittels der biologischen Reaktion der Erfindung dargestellt. Die graphische Darstellung in Figur 3 zeigt auf der Ordinate die logarithmische Zahl von *Listeria monocytogenes* in peritonealen Zellen bei der Maus. Die Abszisse stellt die Zeit in Stunden dar. *Listeria monocytogenes* ist ein Bakterium, daß beim Menschen eine akute Meningitis mit oder ohne damit verbundene Septikämie hervorruft. Der in Figur 3 dargestellte Versuch ist ein Standardversuch für die bakterizide Wirksamkeit. Die Vergleichsbasis ist Proteosepepton, das bekanntlich bakterizide Makrophagen zutage bringt, das aber nicht vom Menschen toleriert wird. Der Versuch ist beschrieben in: Cruprinski, C. J., Henson, P. M., und Campbell, P. A., 1984, J. Leukocyte Biol. 35:193.

Die Linien in der graphischen Darstellung zeigen die Veränderung der Anzahl von Bakterien in der Kultur über drei Stunden, wenn diese Zellen ausgesetzt werden, die aus der Bauchhöhle von Mäusen zu verschiedenen Zeiten und für mehrere unterschiedliche Vorbehandlungsschritte wie folgt entnommen wurden:

- A. keine peritonealen Zellen – Bezugsbasis des Bakterienwachstums;
- B. intraperitoneale Injektion von Proteosepepton 14 Tage vor der Entnahme;
- C. intraperitoneale Injektion des erfindungsgemäßen Produkts 14 Tage vor der Entnahme;
- D. intraperitoneale Injektion des erfindungsgemäßen Produkts 7 Tage vor der Entnahme;
- E. intraperitoneale Injektion des erfindungsgemäßen Produkts 1 Tag vor der Entnahme;
- F. intraperitoneale Injektion von Proteosepepton 1 Tag vor der Entnahme.

Wie aus Figur 3 ersichtlich ist, zeigen die oberen, die Bezugsbasis darstellenden Linien, daß die Kulturen stetig gewachsen sind. In den Fällen, wo die Zellen den Mäusen entnommen wurden, nachdem 0,2 Milligramm des erfindungsgemäßen Produkts intraperitoneal injiziert worden waren, sind Wachstumsabnahmen mit unterschiedlichem Gefälle in Abhängigkeit von der Injektionszeit vor der Entnahme zu verzeichnen, die im wesentlichen der Proteosepeptonvergleichsprobe bei 1 Tag entsprechen. Diese Daten zeigen, daß die bakterizide anregende Wirksamkeit des Produkts sogar 14 Tage nach einer einzigen Injektion hoch bleibt. Die verlängerte Wirkung des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion bei der Anregung von Makrophagen mit ausgeprägter bakterizider Wirksamkeit demonstriert somit dessen Nützlichkeit als therapeutisches Mittel für bakterielle Infektionen.

Die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion, die Wirksamkeit von antikörperabhängiger Zellzytotoxizität (ADCC) zu modulieren, ist in Figur 4 dargestellt. Angewendete Verfahren sind in der Literatur beschrieben./10, 11/ Bei diesem Versuch werden periphere Blutmonozyten des Menschen als die Effektorzellen bei den festgelegten Effektor-Ziel-Verhältnissen angewendet. Die Zielzellen waren mit Chrom markierte YAC-Murinezellen, und der verwendete Antikörper war Kaninchen-Antimäusezellen.

Aus Figur 4 ist ersichtlich, daß das Niveau für die Tötung, zum mindesten bei relativ hohen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen, für das erfindungsgemäße Produkt höher ist als für Interferon bei Produktdosierungshöhen von 15 Mikrogramm pro Milliliter und darunter, aber bei 20 Mikrogramm pro Milliliter (einer Konzentration, die zum autophagozytischen Absterben der Monozytenpopulation bei diesem Versuch führt) auf dem Niveau der Nullrate zu liegen schien.

Die Fähigkeit des erfindungsgemäßen Produkts, die Freisetzung von Interleukin 1 (IL-1) zu stimulieren, ist in Figur 5 veranschaulicht. Die angewendeten Versuchsverfahren sind in der Literatur beschrieben./12, 13/ Periphere mononukleäre Blutzellen wurden aus Blut präpariert, das den Versuchspersonen entnommen worden war. Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen des erfindungsgemäßen Produkts inkubiert. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wurden aliquote Mengen des Kulturmediums „geerntet“ und bei verschiedenen Verdünnungen in einem Blastogeneseversuch getestet. Die Blastogenese wurde durch Zählungen von radioaktivem (tritiertem) Thymidin pro Minute bestimmt, das von 10^6 Murinthymozyten nach 72 Stunden Inkubation in den überstehenden Flüssigkeiten der geernteten Kultur aufgenommen wurde. In Figur 5 ist die Höhe der Nullrate durch die massiven Kreise angezeigt. Es ist zu sehen, daß mit Ausnahme der niedrigsten Dosierung von

Fortsetzung von Tabelle 5

Patient Nr.	Dosis (mg)	Diagnose	Reaktion
D78252	1,5	Dickdarm/Leber	keine
D45851	1,5 3,0, 5,0, 6,0	Adenokarzinom Mastdarm/abd	gering
D180849	2,0, 3,0	Brust-Ca	keine
D80922	2,0, 3,0	Lymphoma (LHL)	keine
D81828	2,5, 8,0	Lymphoma (NHL)	p partiell
D62984	2,5, 4,0	Lymphomy (HL)	stabil
D82088	2,5, 4,0, 6,0	Glioblastoma	gering
D76339	4,0, 6,0	Bauchspeicheldrüse	stabil
D82568	4,0	Kaposi Sarcoma	stabil
C03343	5,0, 8,0	Nierenzelle	stabil
D87354	5,0, 1,5	Nodular lymphoma	partiell
D90607	6,0	Adenokarzinom Lunge	keine
D91834	6,0	Melanom	keine
A039585	0,25	Nierenzelle	stabil
A768642	0,25, 0,5, 1,0, 2,0	Dickdarm/Leber	stabil
A661981	0,5	Lungen-Ca, adeno	stabil
A078379	0,5	Parotid-Ca	gering
A017231	0,25	Dickdarm-Ca	keine
A055001	1,0	Lungen	stabil
A666522	1,0	Lungen-Ca große Zelle	keine
A403927	1,0	Lungen-Ca schuppig	keine
A032896	1,5	Adenokarzinom, Nacken	p partiell
A708029	1,5	Bronchioalveolar	stabil
A044130	1,5	Lungen-Ca schuppig	stabil
A223211	2,0	Lungen-Ca	stabil
D47379	8,0	Prostata	keine
D88652	5,0	Dickdarm	keine
D93503	8,0	Dickdarm	stabil
D94245	8,0	NH-Lymphoma	gering
D86141	8,0	Dickdarm	keine
D96464	8,0	Melanom	keine
D94257	10,0	Gallenblase	keine
D97735	10,0	Dickdarm	keine
E01514	10,0	NSC Lunge	stabil
D98520	10,0	Dickdarm	keine
E01401	10,0	Sarcoma	keine
D66399	1,0	mediastinale Masse	keine
6134	2,0	Lunge	stabil
3374	2,0	Lunge/Prostata unk. primär	stabil
4277	4,0, 6,0	Lunge	stabil
5079	3,0	Magen	keine
0421	4,0	Histiocytom	p partiell
6918	6,0	Gallenblase	keine
2688	8,0	Zunge	keine
8708	8,0	Dickdarm	keine
9222	8,0	Prostata	keine
E07942	2,0	Dickdarm	keine
E13150	4,0	Lunge kleine Zelle	stabil
E14356	4,0	Nacken	keine
E15735	4,0	rektal	keine
D69174	3,0, 4,0	Dickdarm	keine
E11927	4,0	NSC Lunge	keine
E14983	4,0	Kaposi Sarcoma	keine
D70727	3,0, 4,0	Lunge	stabil
E07876	2,0, 3,0	renal	stabil
E04693	1,0, 2,0	Brust	gering
E10311	3,0	Larynx	keine

Fortsetzung von Tabelle 5

Patient Nr.	Dosis (mg)	Diagnose	Reaktion
E09265	3,0	renal	keine
D44296	0,5	Dickdarm	keine
D81828	2,0	NH Lymphoma	keine
E07727	1,0, 3,0	Brust	keine
E03741	0,5	Dickdarm	keine
E05487	2,0	parotid	keine
E03083	0,5, 1,0	Endometrium	stabil
E04545	1,0	gemischte Lymphoma	keine
E05195	2,0	Thymoma	gering

partiell = 50%iger oder größerer Rückgang der Krankheit
 gering = mehr als 25%iger, aber kleiner als 50%iger Rückgang der Krankheit
 stabil = Krankheit nicht fortschreitend
 keine = keine Reaktion

Die obigen Daten zeigen eine 46%ige Reaktionsrate bei fortgeschrittener Krankheit, bei Patienten im Endstadium, bei denen allen die vorangegangene Therapie nicht angeschlagen hat.

Die spezifische Dosierungshöhe und der Behandlungsabstand, die zur Therapie bei einem Menschen gewählt werden, sind oft von Patient zu Patient unterschiedlich. Die Faktoren, die die Dosierungshöhe und den Behandlungsabstand beeinflussen, schließen die Gesamtreaktionsmerkmale des Immunsystems des Patienten, den jeweiligen Typ und Umfang der Krankheit, den Gesamtgesundheitszustand des Patienten, die Krankheitsstelle usw. ein. Dies ist im wesentlichen nicht anders als bei anderen Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion, und die vorteilhaftesten Dosierungspläne können gemäß den Verfahren bestimmt werden, die im Zusammenhang mit anderen Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion und mit Pharmazeutika im allgemeinen angewendet werden.

Die Tatsache, daß die Wirksamkeit bei bestimmten Krankheiten sehr bedeutsam im Vergleich zu anderen verfügbaren Behandlungen sein kann, wird durch die unten in Tabelle 6 angeführten Daten belegt, die sich auf die Behandlung von Gehirntumor, z. B. Glioblastoma, beziehen. Die Daten in Tabelle 6 zeigen, daß bei 6 Fällen von Gehirntumor in drei Fällen selbst bei begrenzter Behandlung eine Verringerung der Tumorgroße zu verzeichnen war. Dies weist eindeutig darauf hin, daß das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion in bezug auf diesen speziellen Tumortyp eine Wirksamkeit zeigt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Reaktionen bei Patienten – Gehirntumor

Patient Nr.	Dosis (mg)	Diagnose	Reaktion
D82088	2,5, 4,0, 6,0	Gehirn	gering
E11928	1,0	Gehirn	partiell
E34415	1,0, 3,0	Gehirn	Fortschreiten
E37376	1,0, 3,0	Gehirn	signifikante funktionelle Verbesserung
RT	1,0, 3,0	Gehirn	Fortschreiten
DR	1,0, 3,0	Gehirn	partiell

Die in der Erfindung angewendeten Membranbläschen und Ribosomen sind leicht biologisch abbaubar. Ein besonders erwähnenswerter Vorteil der Abbauerscheinung besteht darin, daß die partikulierten Populationen des erfindungsgemäßen Produkts in dem biologischen System nur für eine kurze Zeit intakt bleiben, die ausreicht, um die Immunreaktion zu aktivieren, und sich danach schnell abbauen. Somit wird die Entwicklung von schweren, chronischen pathophysiologischen Reaktionen im Ergebnis einer chronischen Immunaktivierung vermieden. Der Abbau ist auf das Vorhandensein von verschiedenen Enzymen (z. B. RNasen, Proteasen, Lipasen) in verschiedenen Zelltypen (z. B. Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen) und Gewebsflüssigkeiten (z. B. Blut, Lymphe) zurückzuführen. Dieser Abbau ist bei erhöhten Temperaturen (z. B. Körpertemperatur, 37°C) schneller und wird bei abnehmender Temperatur zunehmend langsamer. Bei 37°C und 95% Serumkonzentration wird das Produkt (in vitro) in weniger als etwa 2 Minuten abgebaut, wie mit der Kerngrößenanalyse bestimmt worden ist. Die Abbaugeschwindigkeit ist von der Enzymkonzentration und Temperatur abhängig. Sobald es zum Abbau kommt, ist die Wirksamkeit der Zusammensetzung als ein immunmodulierendes Mittel erheblich herabgesetzt.

In Figur 10 ist die Hervorrufung der Killerzellenzytotoxizität im Menschen in vivo gegen drei verschiedene Tumorziele dargestellt. Bei den meisten Individuen werden die peripheren mononukleären Blutzellen K562 Tumorzellen bis zu einem bestimmten Grad in vitro getötet. Allerdings töten periphere mononukleäre Blutzellen die Raji und Colon 38 Tumorzellen nicht. Die Behandlung von Patienten durch in-vivo-Verabreichung von verschiedenen Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion einschließlich Interleukin II (IL-2) hat den Grad der Abtötung in bezug auf die beiden letztgenannten Zielzellen nicht wahrnehmbar verändert. Lediglich die in-vitro-Behandlung der peripheren mononukleären Blutzellen mit bestimmten Modifikationsmitteln der biologischen Reaktion einschließlich IL-2 bringt diese Zellen dazu, andere Typen von Tumorzellen als K562 zu töten. Es ist jedoch gefunden worden, daß das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion die Fähigkeit der peripheren mononukleären Blutzellen zur Tötung solcher Tumorzellen nach einer in-vivo-Behandlung verändern kann. Dies deutet darauf hin, daß nach der Verabreichung des erfindungsgemäßen Produkts die Induktion von LAK-Zellen (zytotoxische T-Zellen) auftritt.

Figur 10 ist repräsentativ für die in-vitro Messung der Killerzellenzytotoxizität in peripheren mononukleären Blutzellen, die von Patienten 24 Stunden nach der Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Modifikationsmittel der biologischen Reaktion gewonnen wurden. Es ist zu sehen, daß gegen alle drei Typen von Tumorzellen eine wesentliche Tötung erfolgt. Die Werte zeigen eine erhebliche in-vivo-Aktivierung der Killerzellen des Patienten. Die Untersuchung der Effektorzellpopulation über spezifische Zellmarkierungsmittel zeigt das Vorhandensein von aktivierten Monozyten, natürlichen Killerzellen und LAK-Zellen. Die in behandelten Patienten beobachteten Zunahmen an natürlichen Killerzellen (zuvor diskutiert) und das Vorhandensein von aktivierten natürlichen Killerzellen bei diesem Versuch demonstrieren die endogene Erzeugung von Interferon in diesen Patienten nach der Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Produkt. Darüber hinaus zeigt das Vorhandensein von aktivierten zytotoxischen „Z-Zellen“ (LAK-Zellen), daß die Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Produkt zur endogenen IL-2-Erzeugung führt. Eine andere einmalige Eigenschaft des erfindungsgemäßen Produkts besteht darin, daß die in vivo aktivierten Killerzellenpopulationen in vitro bei sehr niedrigen Konzentrationen von IL-2 (2 U IL-2/ml) aufrechterhalten werden können. Dies steht im Gegensatz zu den hohen Konzentrationen an IL-2 (500–1 000 U IL-2/ml), die zur Aufrechterhaltung von IL-2 aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) in vitro erforderlich sind.

Die verwendeten peripheren mononukleären Blutzellen wurden aus Vollblut gewonnen, das 24 Stunden nach der Injektion mit dem erfindungsgemäßen Modifikationsmittel der biologischen Reaktion von Patienten entnommen wurde. Die Injektionen waren subkutan und lagen zwischen 1 und 4 Milligramm pro Dosis und wurden dreimal wöchentlich gegeben. Die Versuche wurden vor und 24 Stunden nach der Injektion durchgeführt. Der mit in-vivo-aktivierten Zellen erreichte Zytotoxizitätsgrad hält dem Vergleich mit der Aktivität von in-vitro mit Lymphokin (IL-2) aktivierten Killerzellen stand, die nach Züchtung von menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen mit IL-2 gewonnen wurden.

Die Überlegenheit von Membranbläschen und Ribosomen, die von Organismen des beanspruchten Typs wie *Serratia marcescens* stammen, im Vergleich zu anderen Quellen wird durch die Werte angedeutet, die aus Vergleichsversuchen mit natürlichen Killerzellen gewonnen wurden (Figur 11 und 12). Das Produkt wurde nach der oben beschriebenen Methode aus den angegebenen Organismen hergestellt. Die aus jedem dieser Organismen hergestellten Bläschen lagen innerhalb der oben bezeichneten physikalischen und chemischen Parameter.

Die Tatsache, daß die Quelle eines gegebenen bakteriellen Produkts den Typ und/oder den Grad der biologischen Wirksamkeit beeinflußt, ist für dieses Gebiet nicht neu. Verschiedene Stämme von BCG zeigen spezifische Niveaus der Immunaktivierung in Tiermodellen als auch klinisch. Ribosomenvakzine (zuvor diskutiert) bewirken eine differentielle Aktivierung des Immunsystems in Abhängigkeit von dem Quellenorganismus, und die Überlegenheit von aus *Serratia* gewonnenen Polyribosomen im Vergleich zu anderen Quellen ist angedeutet worden. In der zitierten Veröffentlichung war die Verabreichung von Pufferlösung allein und bakteriellen Polysomen, die aus anderen Bakterienspezies (*Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium bovis* [BCG], *Mycobacterium smegmatis* und *Propionibacterium acnes*) hergeleitet wurden, geringfügig besser als eine Vergleichsgruppe von Mäusen, die überhaupt keine Behandlung erhielten (Tumoraufreten und Tod innerhalb von 60 Tagen). Andererseits zeigten aus *Serratia marcescens* gewonnene Polysomen bei bestimmten Dosierungen das Fehlen einer Tumorentwicklung in 60% oder mehr der Tiere und eine Unterdrückung der Tumorentwicklung bei den restlichen Tieren. Da das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion aus einem Mikroorganismus gewonnen wird, der nicht Bestandteil der Mikroflora des Patienten ist, nicht mit der Infektionskrankheit in normalen Individuen im Zusammenhang steht, und da das gewöhnliche bakterielle Antigen des Mikroorganismus nicht oder schwach mit Organismen kreuzreagiert, die die normale Mikroflora bilden, werden unangemessene Immunreaktionen vermieden. Zu solchen Reaktionen gehören zum Beispiel die Immunabweichung und die Erscheinung des sogenannten ursprünglichen Antigenverstoßes, der allgemein bei gegenwärtig entwickelten Immunpotentiators (z. B. BCG, *C. parvum*, Zellwandfraktionen) beobachtet wird. Wahrscheinlich sind aus diesen Gründen aus *E. coli*, *M. smegmatis* und *Streptococcus pneumoniae* hergestellte Polyribosomenaggregate sehr schlechte Quellen für biologische Reaktionen, während *S. marcescens*, das nicht Bestandteil der Mikroflora des Wirtes ist und nicht leicht mit dieser kreuzreagiert, eine ausgezeichnete Quelle für das Modifikationsmittel der biologischen Reaktion ist.

Es muß erwähnt werden, daß es andere Mikroorganismen gibt, die als Quelle für die in der Erfindung genutzten Membranbläschen und Ribosomen geeignet sind. Das Grundmerkmal solcher Mikroorganismen muß sein, daß der Mikroorganismus kein Bestandteil der Mikroflora des Patienten ist. Zudem darf das gewöhnliche bakterielle Antigen des Mikroorganismus nicht mit den Organismen, die die normale Mikroflora bilden, reagieren oder zumindest schlecht kreuzreagieren. Der Organismus sollte also kein solcher sein, der eine immunabweichende Reaktion hervorruft. Der Organismus muß ein solcher sein, der nicht oder selten eine Krankheit im Menschen hervorruft. Und schließlich muß der Quellenmikroorganismus ein solcher sein, in dem die Zellmembran Bläschen in dem entsprechenden Größenbereich bildet. Beispiele für geeignete Mikroorganismenquellen außer *Serratia marcescens* sind: *Erwinia chrysanthemi* (Pectobacterium) ATCC 14092 und in geringerem Maße *Enterobacter aerogenes* ATCC E13048. Präparate aus den obigen Stämmen zeigen eine Wirksamkeit des Typs der oben im Zusammenhang mit Präparaten aus *S. marcescens* beschrieben ist. Genauer gesagt, Figur 11 zeigt, daß *E. aerogenes* eine wesentlich höhere Wirksamkeit als *Pseudomonas*, *E. coli* und *E. cloacae*, wenn auch eine geringe Wirksamkeit als Alpha-Interferon bei spezifischen Dosierungshöhen zeigt. In ähnlicher Weise vergleicht Figur 12 *E. chrysanthemi* (wirksam) mit *Flavobacterium* (nicht wirksam) und Interferon. Es können auch andere Mikroorganismen als Quellen verwendet und wie oben zur Erzeugung von Ribosomen und Bläschen der festgelegten Größe verarbeitet werden. Unter Anwendung der an früherer Stelle beschriebenen in-vitro-Versuche kann ihre Wirksamkeit leicht beurteilt werden, um zu entscheiden, ob sie als ein Modifikationsmittel der biologischen Reaktion geeignet sind oder nicht.

Da das erfindungsgemäße Modifikationsmittel der biologischen Reaktion frei von lebensfähigen Zellen, toten Zellen, Zellwand und biologisch aktivem Endotoxin ist, ist die Erkennung aufgrund von Kreuzreaktionsfähigkeit so gering wie möglich, sind solche Komponenten, die schlecht abbaubar sind, eliminiert und sind die Komponenten, die bekanntlich stark toxisch sind (z. B. Endotoxin) oder die zu chronischen Entzündungssituationen führen können, z. B. Adjuvensarthritis, Granulome, Geschwürbildungen, verringert oder ausgeschlossen. Darüber hinaus werden durch eine Minimierung von Zelloberflächenbestandteilen Veränderungen in den Immunreaktionen ausgeschlossen, die bekanntlich mit dem Stamm des Organismus zusammenhängen, als auch phenotypische Veränderungen eliminiert.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Modifikationsmittels der biologischen Reaktion sind zahlreich. Durch Aktivieren von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie wird die für eine optimale Immunfunktion erforderliche Zellkooperation gefördert. Die Aktivierung von früh differenzierten Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie (Monozyten, normale/residente Makrophagen) fördert die Mehrfacheffektorfunktionen. Die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Produkts hat sowie die Hervorbringung vielfacher Typen von Effektorfunktionen, die von den Versuchsbedingungen oder den Parametern des Wirts der Krankheit abhängig sind, gezeigt.

Dem Fachmann werden aus der Beschreibung dieser Spezifikation verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu den hier gezeigten und beschriebenen offenbar werden. Diese Modifikationen gehören mit zum Umfang der beigefügten Patentansprüche.

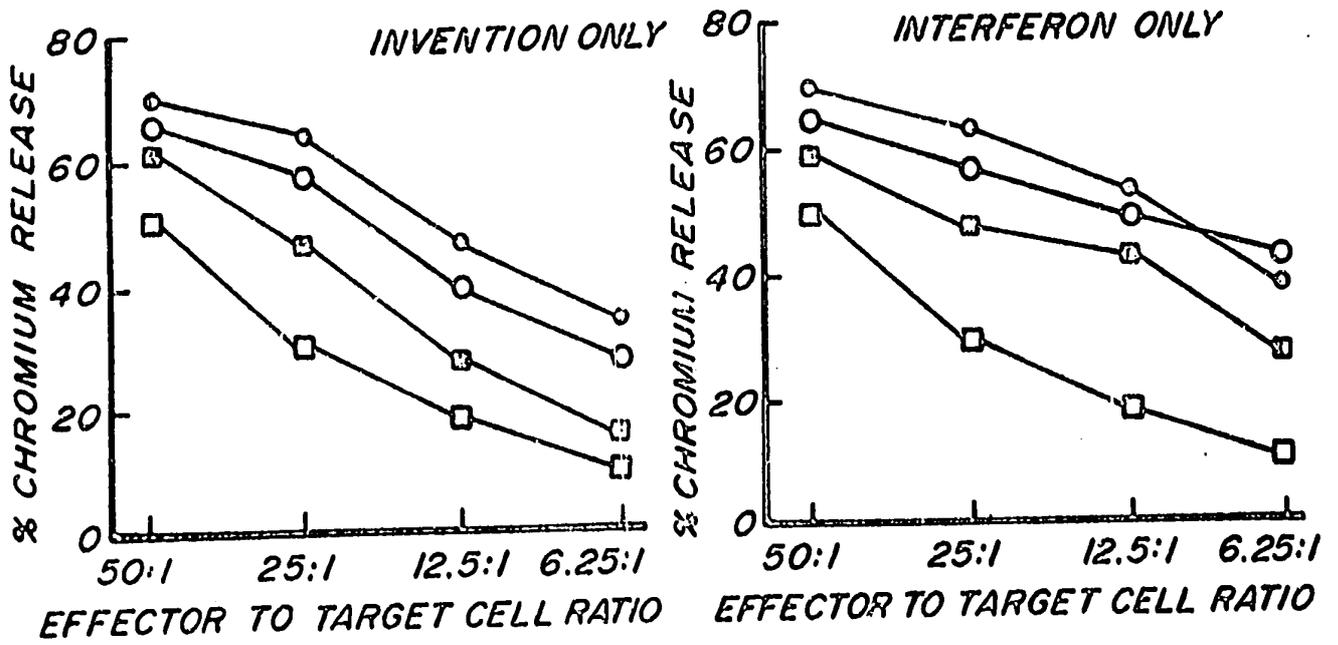
Fußnoten

- 1 Millman, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147:765-769, 1974, *Infect. Immun.*, 14:929-933, 1976.
- 2 Thomas, D. W., und Weiss, E., *Infect. Immun.*, 6:355-363, 1972.
- 3 Klun, D. L., und Youmans, G. P., *RES J. Reticuloendo Thel. Soc.*, 13:263-274, 1973.
- 4 Smith, R. A., und Bigley, N. J., *Infect. Immun.*, 6:384-389, 1972.
- 5 Swendsen, C. L., und Johnson, W., *Infect. Immun.*, 14:345-354, 1976.
- 6 *Cancer Research*, 40:1501-1505, 1980.
- 7 Bergman, R. K., et al., *Infection and Immunity*, 18:352-355, 1977.
- 8 West, W. H., Cannon, G. B., Kay, H. D., Bonnard, G. D., und Herberman, R. B. (1977) Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. (Natürliche zytotoxische Reaktionsfähigkeit von menschlichen Lymphozyten gegen eine Myeloidzelllinie: Charakterisierung von Effektorzellen.) *J. Immunology* 118:355.
- 9 de Landazuri, M. O., Silva, A., Alvarez, J., und Herberman, R. B. (1979), Evidence that natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity are mediated in humans by the same effector cell populations (Beweis dafür, daß die natürliche Zytotoxizität und antikörperabhängige Zellzytotoxizität im Menschen von den gleichen Effektorzellpopulationen vermittelt werden), *J. Immunology* 123:252.
- 10 Fuson, E. W., Whitten, H. D., Ayers, R. D., und Lamon, E. W., (1978), Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by human lymphocytes. I. comparison of IgM- and IgG-induced cytotoxicity. (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch menschliche Lymphozyten. I. Vergleich von IgM- und IgG-vermittelter Zytotoxizität.) *J. Immunology* 120:1726.
- 11 Kay, H. D., Bonnard, W. H., West, W. H., und Herberman, R. B., (1977), A functional comparison of human Fc-receptor-bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. (Ein funktioneller Vergleich: von menschlichen Fc-Rezeptor tragenden Lymphozyten, die bei der natürlichen Zytotoxizität und antikörperabhängigen Zellzytotoxizität wirksam sind.) *J. Immunology* 123:252.
- 12 Conlon, P. J. (1983) A rapid biologic assay for the detection of Interleukin 1. (Ein biologischer Schnellversuch zum Nachweis von Interleukin 1.) *J. Immunology* 131:1280.
- 13 Wood, D. D., Bayne, E. K., Goldring, M. B., Gowen, M., Hamerman, D., Humes, J. L., Ihrie, E. J., Lipsky, P. E., und Staruch, M. J., (1985), The four biochemically distinct species of human Interleukin 1 all exhibit similar biologic activities. (Die vier biochemisch verschiedenen Arten des menschlichen Interleukin 1 weisen alle ähnliche biologische Wirksamkeiten auf.) *J. Immunology* 134:895.
- 14 Dinarello, C. A., 1984, *New England J. of Med.*, 311:1413-1418.
- 15 Kreuter, J., und Haenzel, I., 1978, *Infect. and Immun.* 19:667-675.

FIG 1



FIG. 2 HUMAN NATURAL KILLER CELL ASSAY



INVENTION:

- 10 ug/ml
- 3 ug/ml
- 1 ug/ml
- 0.1 ug/ml

INTERFERON:

- 1000 U/ml
- 500 U/ml
- 250 U/ml
- 0 U/ml

FIG. 3

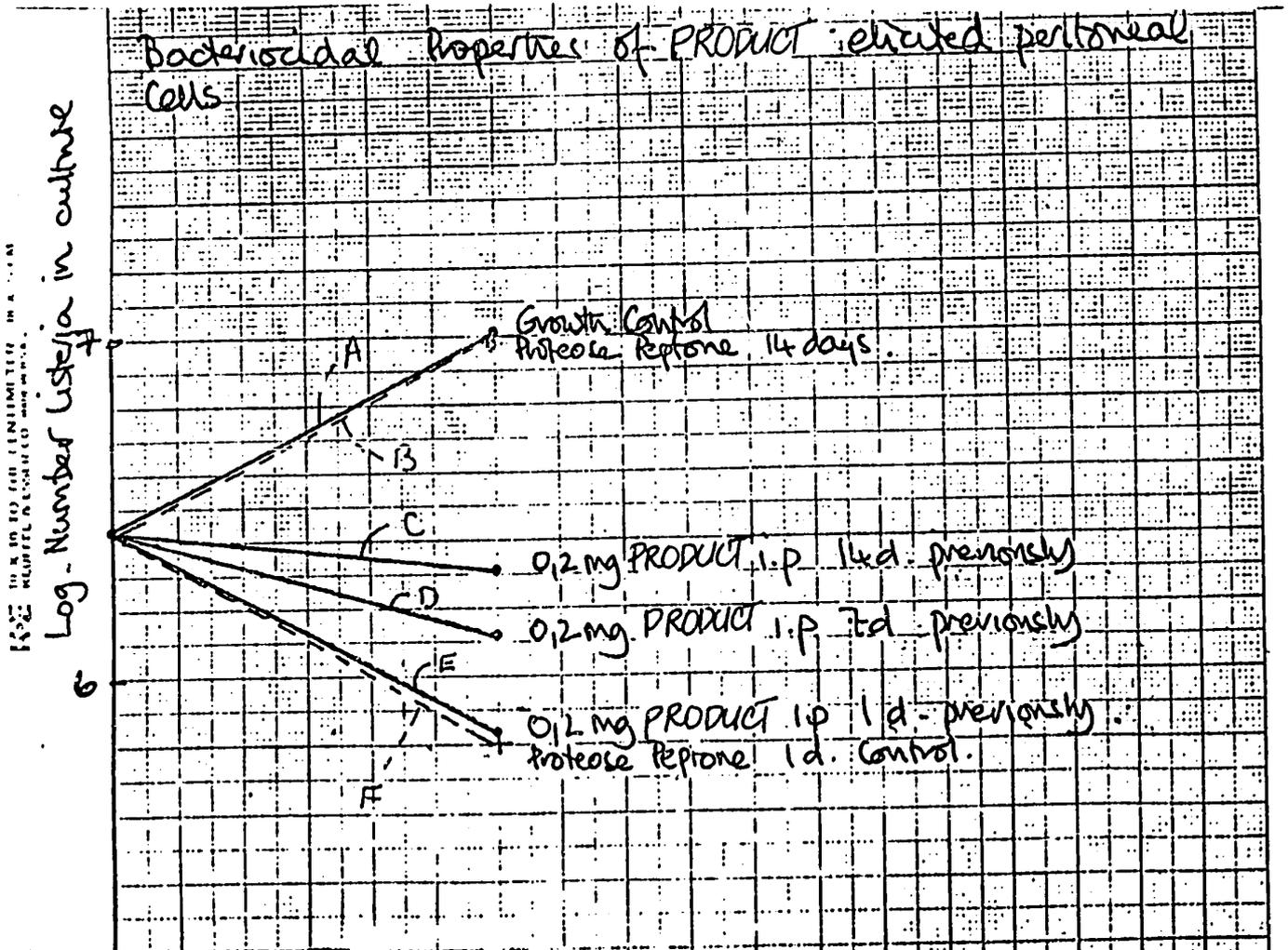
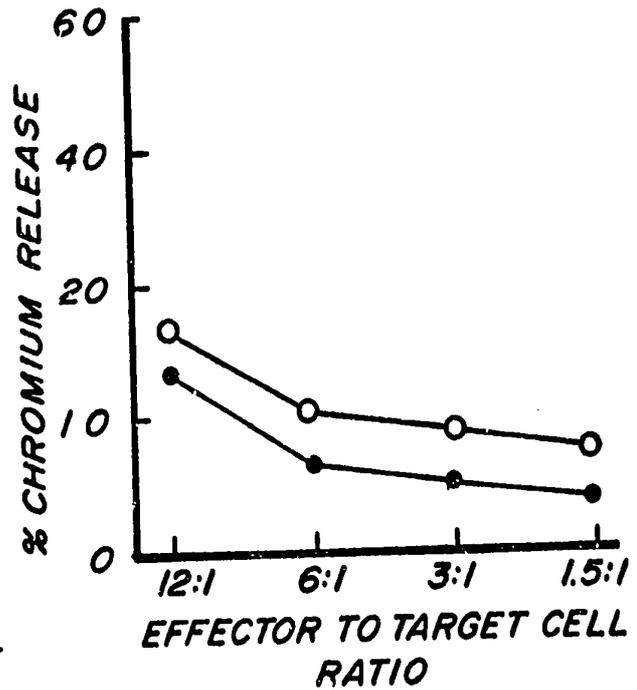
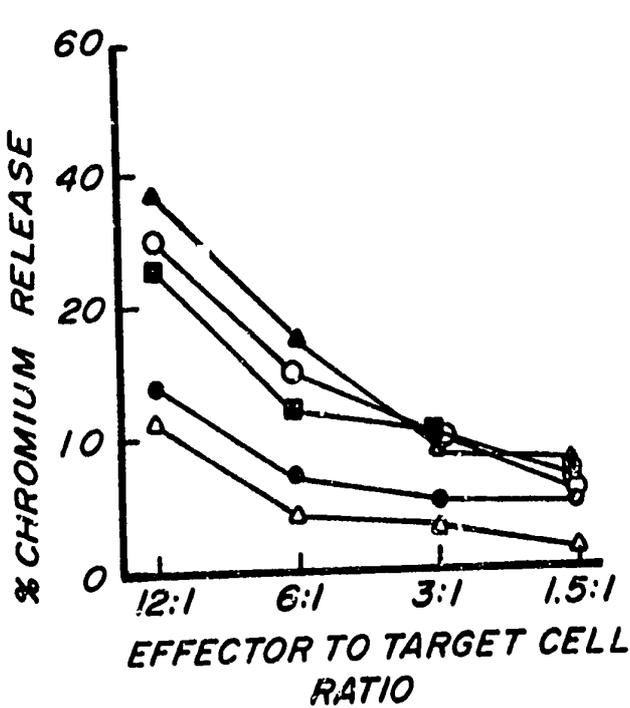


FIG. 4 ADCC ASSAY



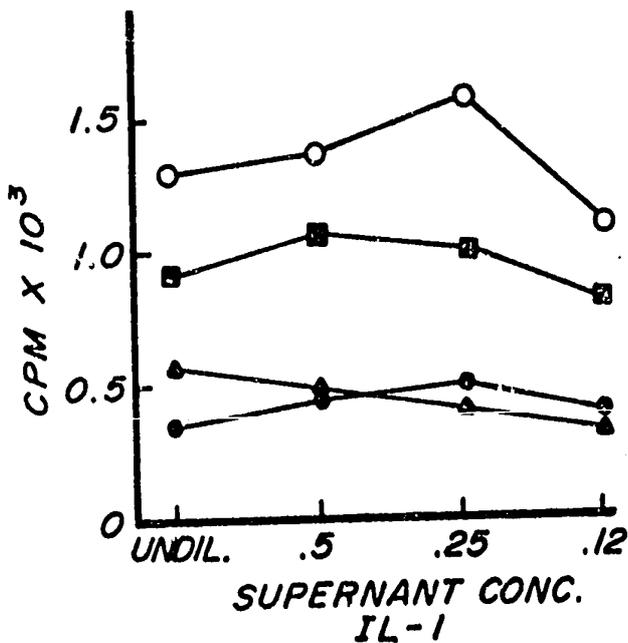
PRODUCT:

- △ 20 ug/ml
- 15 ug/ml
- 10 ug/ml
- ▲ 3 ug/ml
- 0 ug/ml

INTERFERON:

- 1000 U/ml
- 0 U/ml

FIG. 5 IL-1 ASSAY

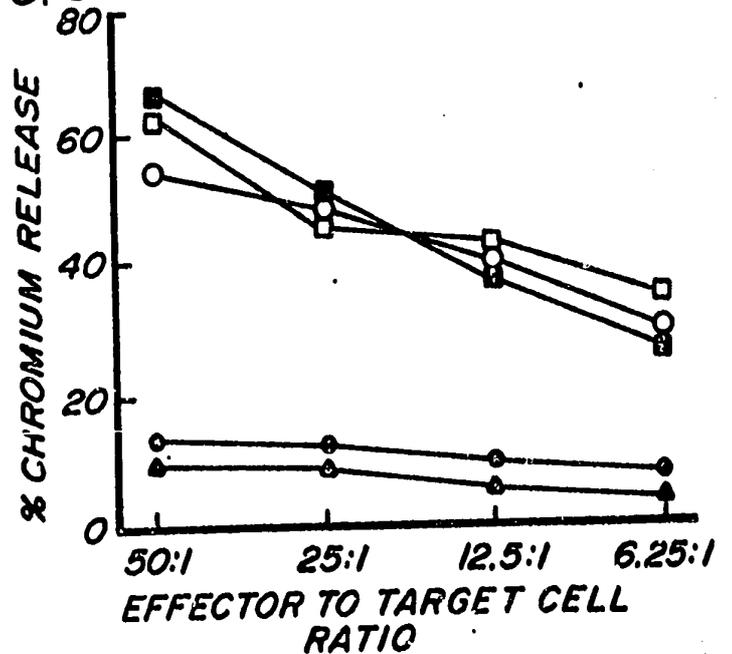


PRODUCT:

- 10 ug/ml
- 3 ug/ml
- ▲ 1 ug/ml
- 0 ug/ml

FIG. 6

HUMAN NATURAL KILLER CELL ASSAY



INVENTION:

- NON-DEPLETED + 3 ug/ml
- B-CELL DEPLETED + 3 ug/ml
- T-CELL DEPLETED + 3 ug/ml
- △ NK CELL DEPLETED + 3 ug/ml
- NO INVENTION: NON-DEPLETED

FIG. 7 RAT SQUAMOUS CELL CARCINOMA
RAPID GROWTH TUMOR

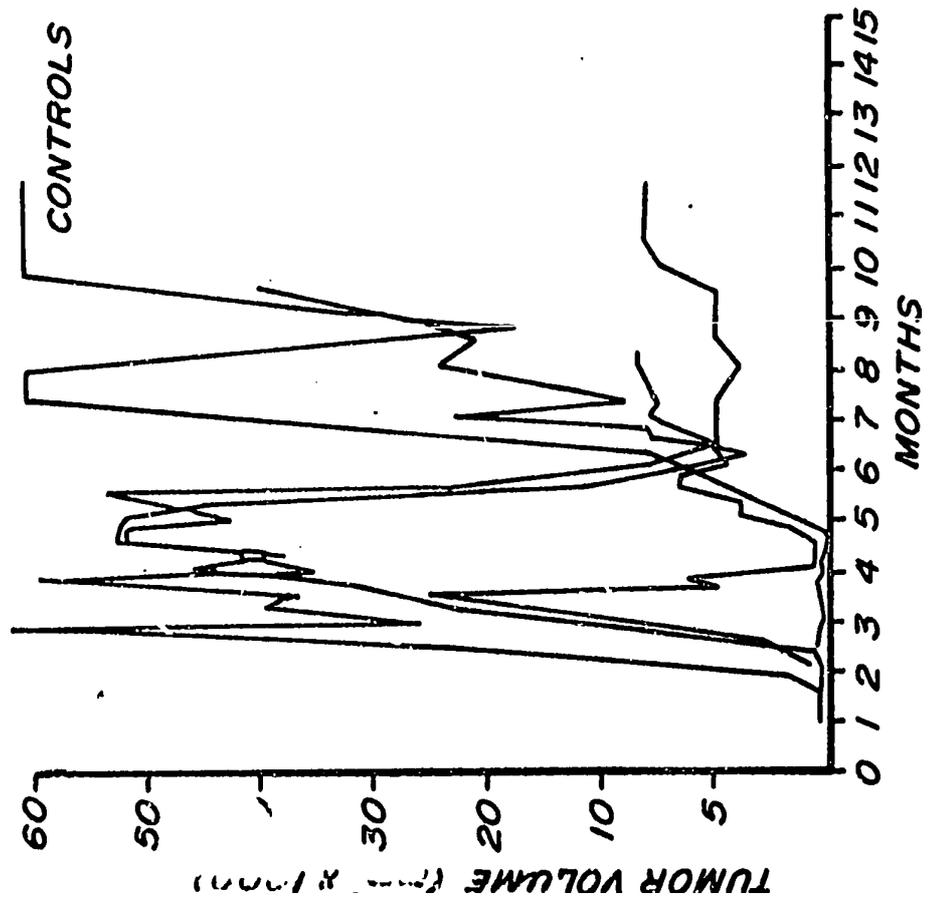
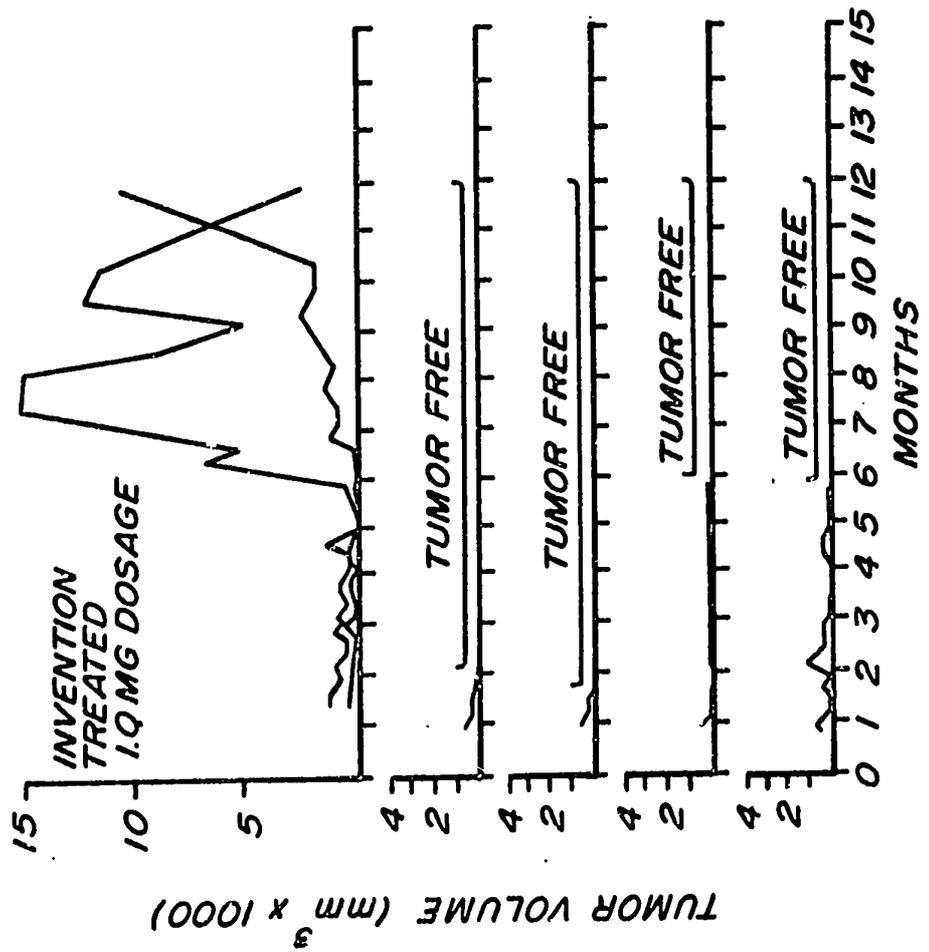
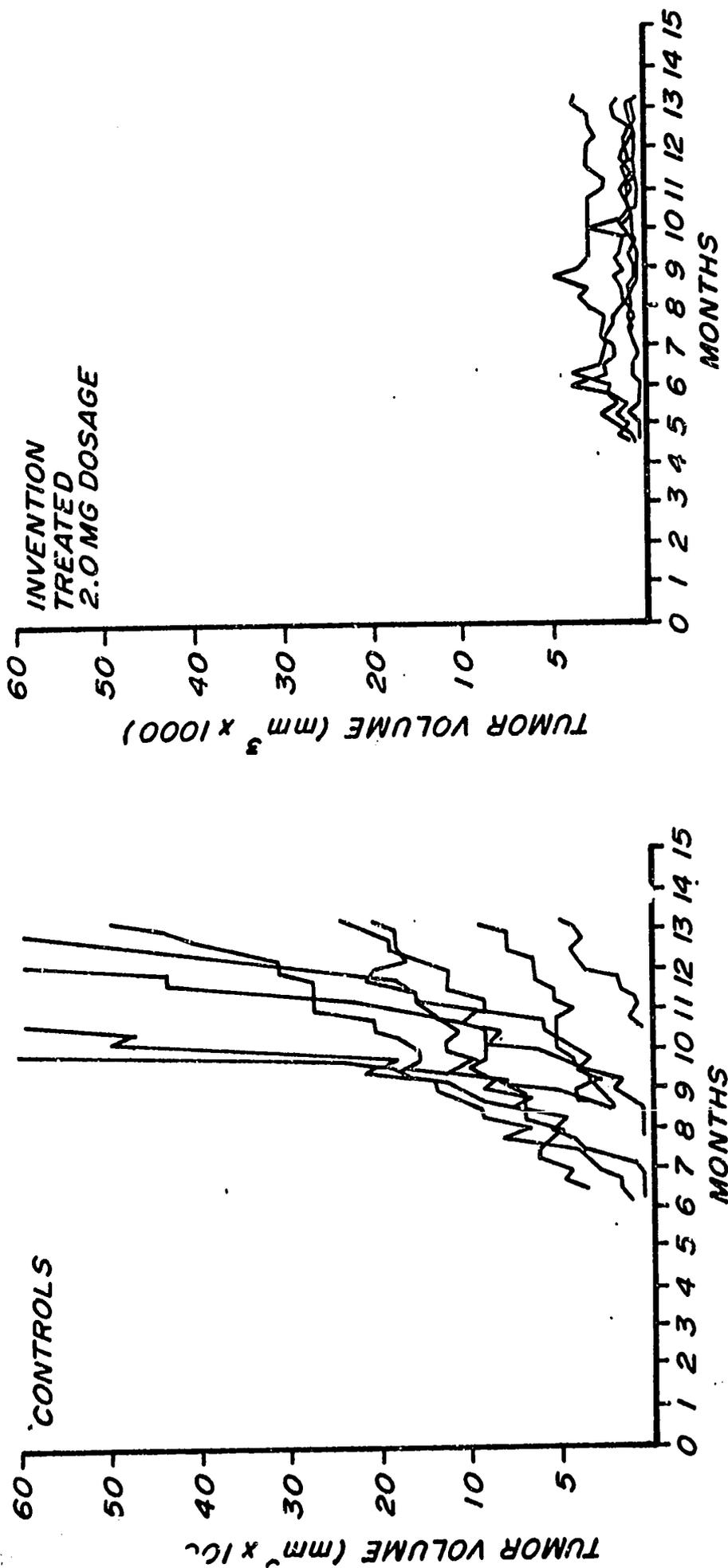
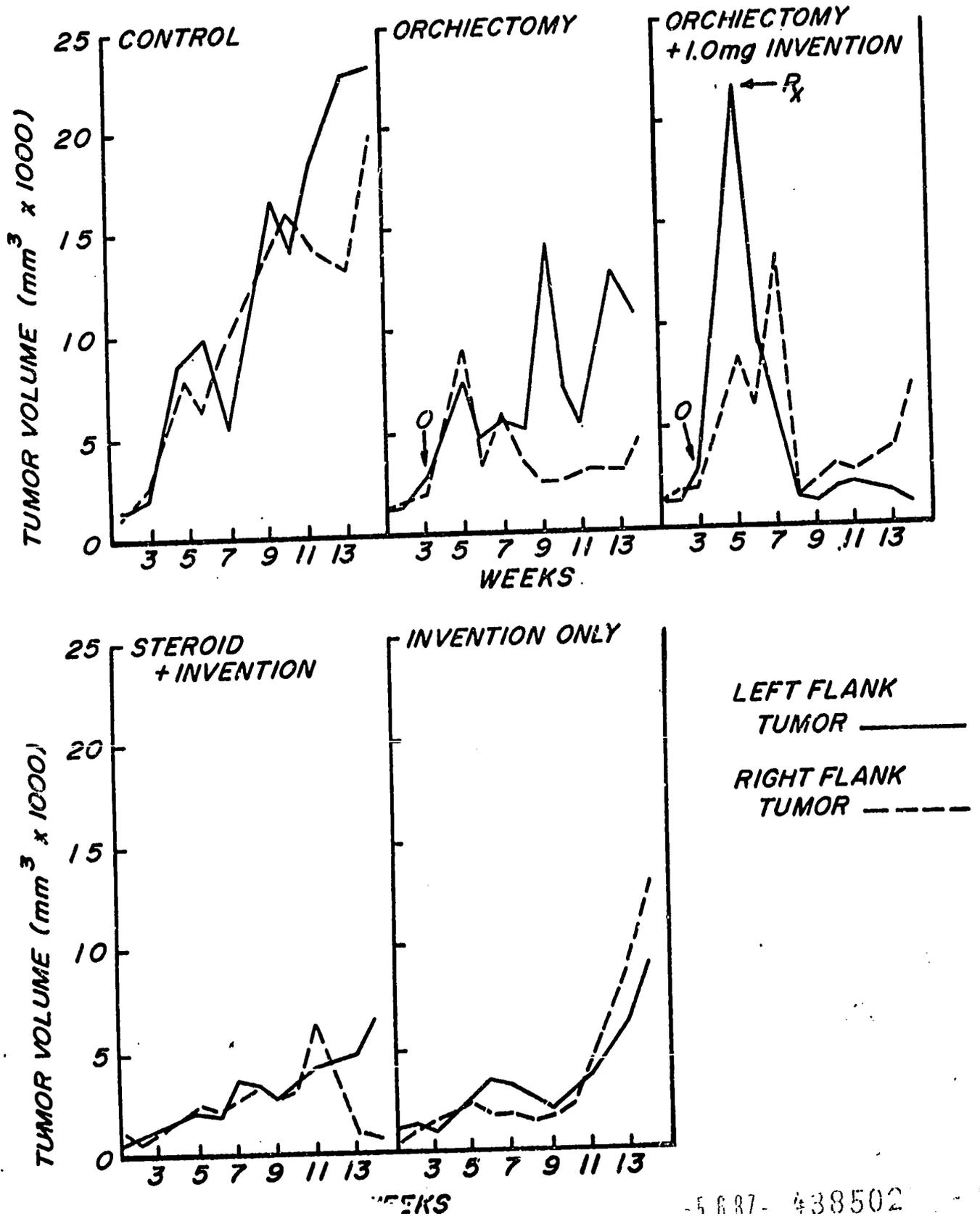


FIG. 8 RAT PROSTATIC CARCINOMA
SLOW GROWTH TUMOR



**FIG. 9 RAT PROSTATIC ADENOCARCINOMA
BILATERAL TUMORS**



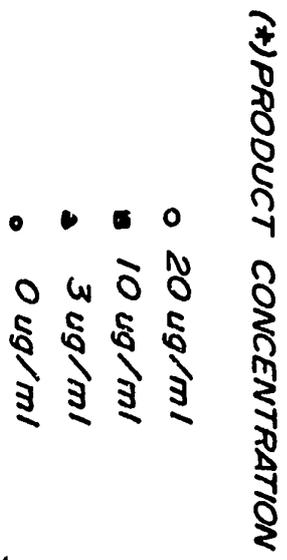
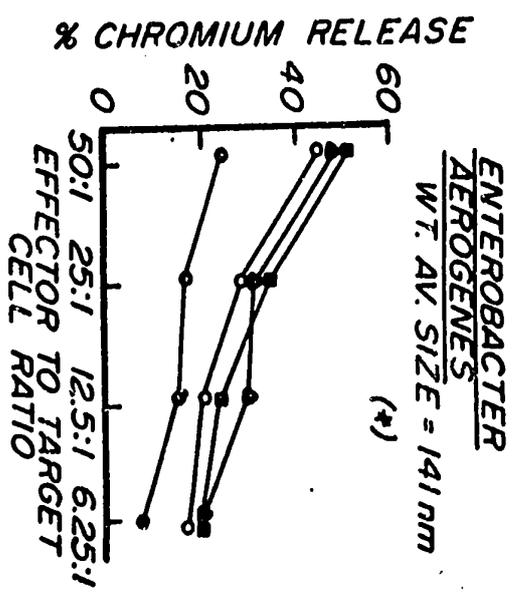
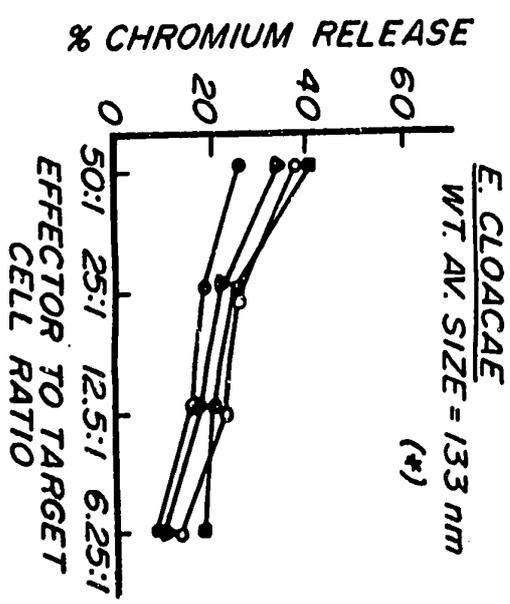
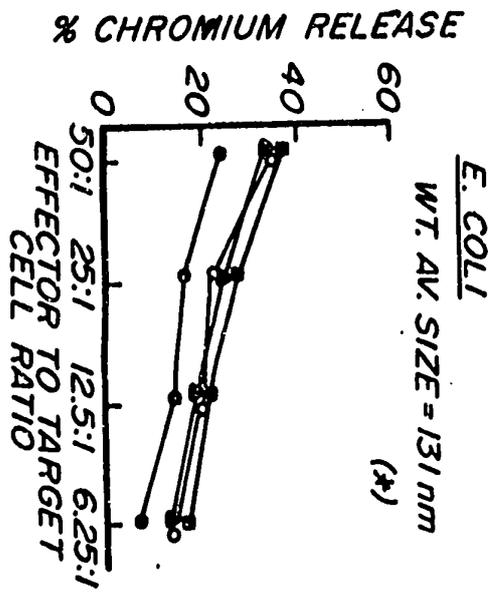
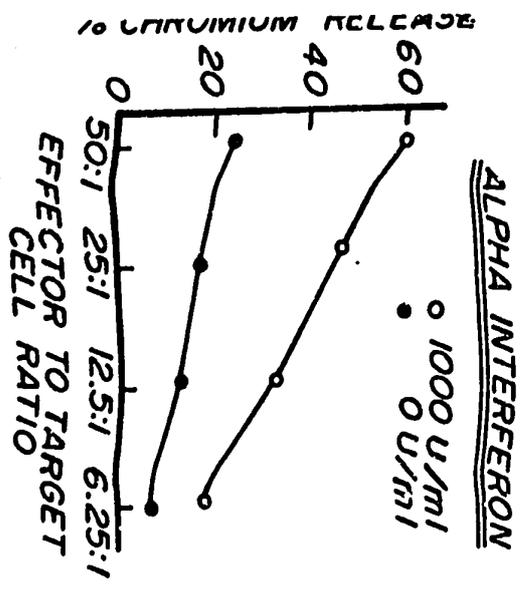
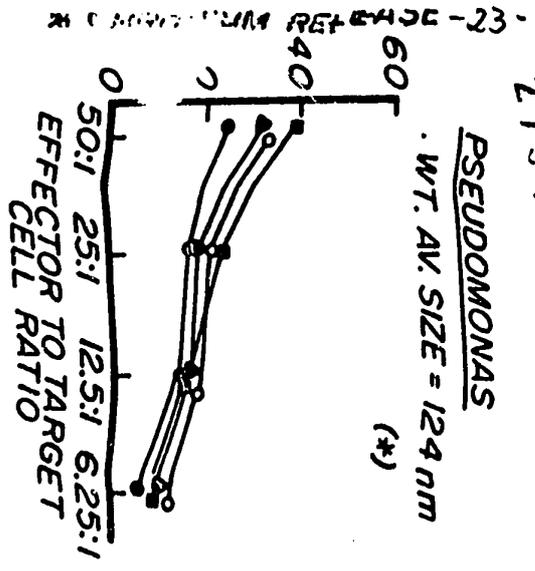


FIG. 11 IN VITRO COMPARISON OF PRODUCT SOURCES WITH INTERFERON
 (HUMAN NK CELL ASSAY. K562 TARGET. 18HR PRODUCT INCUBATION. 4HR ⁵¹CR RELEASE ASSAY)

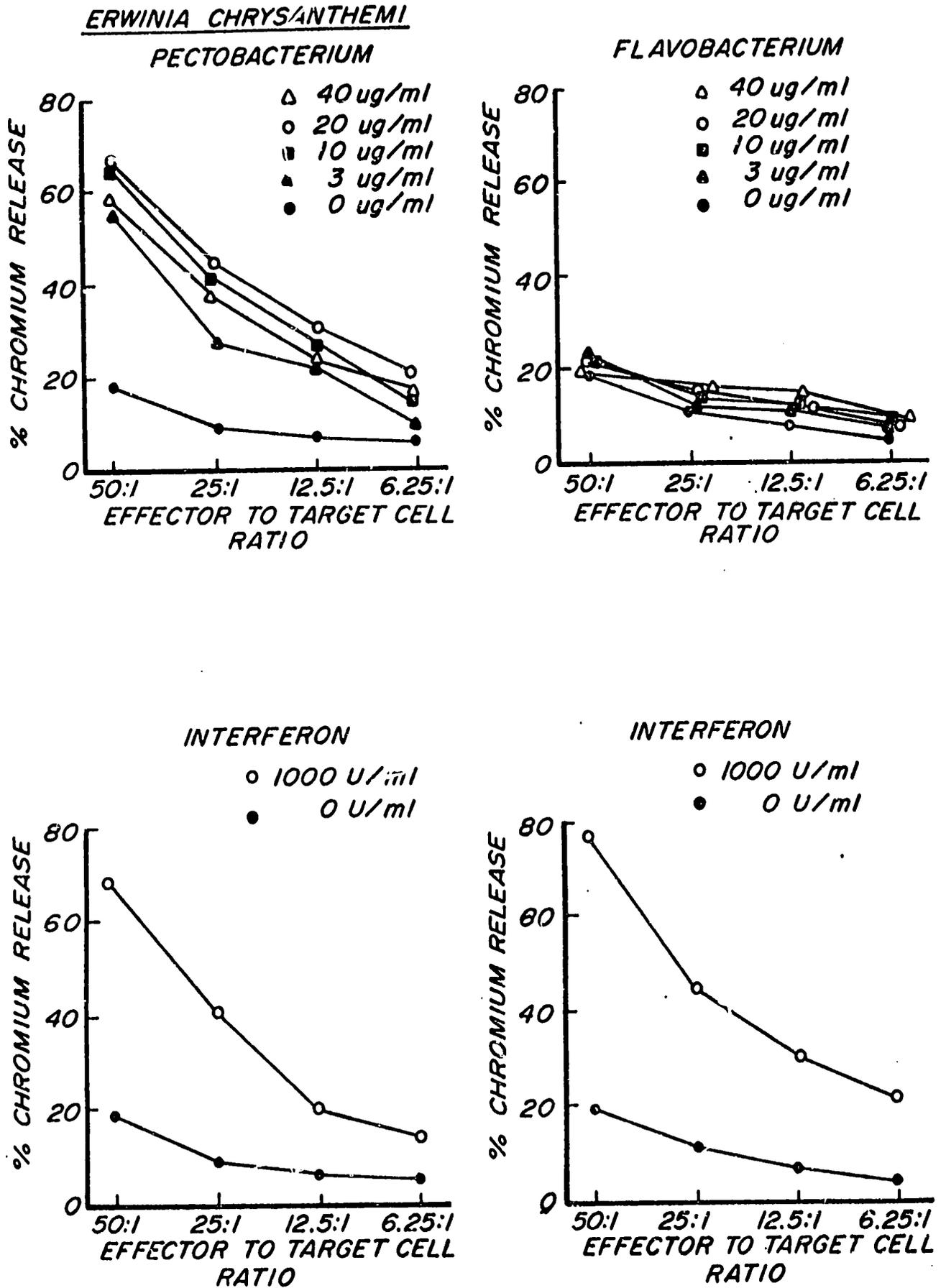


FIG. 12 IN VITRO COMPARISON OF PRODUCT SOURCES WITH INTERFERON

(HUMAN NK CELL ASSAY, K562 TARGET, 18 HR PRODUCT INCUBATION, 4 HR ⁵¹CR RELEASE ASSAY)