



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 31/685	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/08746 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Juni 1991 (27.06.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/02233 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 1990 (11.12.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 41 009.9 12. Dezember 1989 (12.12.89) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MED-MARK PHARMA GMBH [DE/DE]; Lohengrinstraße 8, D-8022 Grünwald (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : WECKER, Eberhard [DE/DE]; Holzbühlweg 4, D-8700 Würzburg (DE). SCHIMPL, Anneliese [DE/DE]; Königsbergerstraße 44, D-8700 Würzburg (DE). NORDSTRÖM, Rabbe [DE/DE]; Lohengrinstraße 8, D-8022 Grünwald (DE).	(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Möhlstraße 22, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: KILLING OF ACTIVATED LYMPHOCYTES (54) Bezeichnung: ELIMINIERUNG VON AKTIVIERTEN LYMPHOZYTEN (57) Abstract 2-Methyl-1-octadecylglycero-(3)-phosphocholine is suitable for killing mammalian lymphocytes activated by antigens or mitogens. (57) Zusammenfassung 2-Methyl-1-Octadecylglycero-(3)-phospho-cholin eignet sich zur Eliminierung von Antigen- oder Mitogen-aktivierten Lymphozyten bei Säugern.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco		

Eliminierung von aktivierten Lymphozyten

B e s c h r e i b u n g

Wesentliche Elemente des Immunsystems bei Säugetieren sind die T- und B-Lymphozyten. Während deren Entwicklung bilden diese spezifische Rezeptoren für Antigene, so daß jeder derartige Lymphozyt für den Rest seiner Lebensdauer für ein einziges Antigen Spezifität erlangt. Die ruhenden Lymphozyten (kleine Lymphozyten) einschließlich der Gedächtniszellen zirkulieren durch die Körpergewebe und Lymphorgane sowie die Körperflüssigkeiten und überwachen daher den Körper hinsichtlich des Auftretens ihrer Antigene. Tritt das spezifische Antigen auf, so erfolgt eine antigeninduzierte Lymphozyten-Proliferation unter Ausbildung der aktivierten großen Lymphozyten. Diese Proliferation läßt sich auch *in vitro* durch Kultivierung der Lymphoidzellen mit speziellen Antigenen darstellen. Mit dem gleichen System läßt sich auch zeigen, daß mitogene Lectine, also Proteine, welche spezifische Zelloberflächen-Determinanten, die aus Kohlehydraten bestehen, binden und vernetzen, Lymphoidzellen ebenfalls stimulieren. Eine Lymphozyten-Aktivierung durch entweder Antigene oder Mitogene führt schließlich zur Reifung des Lymphozyten zu einem Lymphoblasten. Experimentell kann die mitogene Stimulation von Lymphozyten beispielsweise durch Phytohämagglutinin (PHA) und Concavalin A (Con A) im Falle von T-Zellen, sowohl humanen als auch tierischen Ursprungs, durch Lipopolysaccharide (LPS) im Falle von B-Zellen ausgelöst werden.

Die primäre Immunantwort ist daher das Resultat einer Stimulierung der jeweils für das Antigen oder Mitogen spezifischen Lymphozyten, so daß diese aus dem ruhenden Zustand in den aktivierten Zustand übergehen, zu großen Lymphozyten werden, welche proliferieren und sich zu Effektorzellen (beispielsweise T-Zellen mit zytotoxischen oder anderen Funktionen oder Antikörper-bildenden Plasmazellen, die aus reifen B-Zellen gebildet werden) oder Gedächtniszellen differenzieren. Durch

die Aktivierung der ruhenden Gedächtniszellen wird dann die sekundäre Immunantwort ausgelöst, die wiederum Effektorzellen und Gedächtniszellen hervorruft.

Durch die primäre oder sekundäre Immunantwort werden nun erwünschte wie auch unerwünschte Folgeerscheinungen bewirkt. Zu den in den meisten Fällen unerwünschten Folgeerscheinungen gehören beispielsweise Transplantatabstoßungen, allergische Reaktionen und dgl.. Generell lassen sie sich als erworbene, durch externe Antigene verursachte immunologische Krankheiten oder Erscheinungen bezeichnen.

Wenn es gelingen würde, selektiv die aktivierten Lymphozyten zu eliminieren, ohne die Eigenschaften der ruhenden Lymphozyten nachteilig zu verändern, so könnte man hierdurch generell erworbene immunologische Krankheiten, die durch externe Antigene verursacht werden, unterbinden. Auf diese Weise könnten z.B. sowohl allergische Reaktionen als auch Transplantatabstoßungen unterbunden werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches spezifisch aktivierte Lymphozyten zu eliminieren vermag, ohne ruhende Lymphozyten zu beeinträchtigen, insbesondere ohne ruhende Lymphozyten in bezug auf ihre Stimulierbarkeit durch Antigene oder Mitogene nachteilig zu beeinflussen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Verwendung von 2-Methyl-1-Octadecylglycero-(3)-phosphocholin, im folgenden als ET18OCH₃ bezeichnet, zur Eliminierung von Antigen- oder Mitogen-aktivierten Lymphozyten bei Säugern bzw. durch die Verwendung von ET18OCH₃ zur Herstellung eines Arzneimittels für die Eliminierung von Antigen- oder Mitogen-aktivierten Lymphozyten.

ET18OCH₃ und seine Herstellung ist bekannt. Weiter ist bekannt, daß ET18OCH₃ als Mittel gegen Tumoren (DE-A1 2619686) und gegen Multiple Sklerose (DE-A1 3530767) verwendet werden kann. Eine spezifische Eliminierung aktivierter Lymphozyten, wie sie durch die Erfindung gezeigt wird, konnte daraus nicht hergeleitet werden. Die Erfindung beruht auf dem Erkenntnis, daß ET18OCH₃ selektiv durch Antigen oder Mitogen aktivierte Lymphozyten eliminiert. Selbst eine längere Einwirkung von ET18OCH₃ beeinflußt jedoch die ruhenden Lymphozyten nicht negativ und erlaubt deren nachträgliche antigene oder mitogene Stimulation. Insbesondere wurde gefunden, daß auch längere Applikation von ET18OCH₃ keinerlei negative Effekte auf die Immunreaktion in vivo ausübt und zwar sowohl für B- wie auch für T-Zell-Reaktionen.

Die erfindungsgemäße neue Indikation gestattet es daher, selektiv aktivierte große Lymphozyten zu eliminieren und damit die durch diese Lymphozyten ausgelöste Immunreaktion zu unterbinden. Da gleichzeitig die ruhenden Lymphozyten nicht negativ beeinflußt werden, wird durch das erfindungsgemäße Mittel die Wirksamkeit des Immunsystems an sich nicht beeinträchtigt. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber bisher bekannten immunsuppressiven Mitteln dar, die stets das gesamte Immunsystem beeinflußt haben und damit den Organismus in seiner Abwehrfähigkeit gegenüber anderen Antigenen und Mitogenen entscheidend geschwächt haben.

Die wirksame Dosis von ET18OCH₃ hängt von der Art der Verabreichung ab. Im allgemeinen werden bei der Humanapplikation Dosen zwischen 10 und 1000 mg/Person/Tag bei oraler Verabreichung angewendet. Bei dieser Applikationsweise, die beispielsweise durch Auflösen der Wirksubstanz in einem geeigneten Träger wie Milch durchführbar ist, werden vorzugsweise 30 bis 300 mg/Person/Tag eingesetzt. Bei Verabreichung durch Infusion können diese Dosen noch deutlich heraufgesetzt wer-

den. Bei topischer Applikation kommen die üblicherweise angewendeten Wirkstoffkonzentrationen auch hier in Betracht.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung in Verbindung mit der Zeichnung. In der Zeichnung stellen dar:

Abb. I A den Einbau von ^3H -Thymidin als Maß für die Lymphozytenaktivität bei Zusatz von Zellaktivatoren

Abb. I B den ^3H -Thymidineinbau durch Lymphozyten unter dem Einfluß von Zellaktivatoren bei Zusatz von ET180CH_3 am ersten Tag

Abb. I C eine Darstellung analog I B bei ET180CH_3 -Zugabe am zweiten Tag

Abb. II A den Einbau von ^3H -Thymidin in stimulierten Lymphozyten

Abb. II B eine Darstellung analog Abb. II A, jedoch bei Zusatz von ET180CH_3 bei Zellstimulation erst nach ET180CH_3 -Verabreichung

Abb. II C die Kontrollergebnisse ohne Stimulation und ET180CH_3 -Zusatz

Abb. III A zeigt den Einfluß von ET180CH_3 auf die Entstehung von spezifischen Antikörper produzierenden Zellen

Abb. III B zeigt den Thymidin-Einbau durch T-Lymphozyten mit und ohne Vorbehandlung durch ET180CH_3

Abb. III C zeigt analoge Ergebnisse wie in Abb. 3B bei B-Lymphozyten.

Beispiel 1

Aus Milzzellen von Balb C Mäusen wurden die T-Lymphozyten durch Passage durch Nylonwolle isoliert. Diese wurden anschließend in Kultur mit den polyklonalen T-Zellaktivatoren Con A oder Anti-CD3-Antikörpern oder zur Kontrolle mit dem B-Zellaktivator LPS aktiviert. Jeweils der Hälfte der Kulturen wurde nach 1 oder 2 Tagen ET180CH₃ (10 µg/ml) zugesetzt. Die andere Hälfte diente als Kontrolle. Am 3. Kulturtag wurde zu allen Kulturen ³H_Thymidin zugesetzt und dessen Einbau wurde am 4. Tag gemessen.

Abb. I A zeigt die zu erwartende Stimulation der Zellen in Form von erhöhtem ³H-Thymidineinbau nach polyklonaler Aktivierung mit Con A oder Anti-CD3-Antikörpern. Die geringgradige Steigerung nach Zugabe des B-Zellmitogens LPS bedeutet, daß noch restliche B-Lymphozyten in den Kulturen vorhanden waren. Alle diese Aktivierungsergebnisse wurden durch die Zugabe zu den Kulturen von ET180CH₃ am 1. Tag (siehe Abb. 1 B) vollkommen unterdrückt, durch Zugabe am 2. Tag (Abb. 1C) fast noch ebenso vollständig.

Daraus ergibt sich, daß ET180CH₃ in vitro die Proliferation von T- und B-Lymphozyten der Maus praktisch vollständig verhindert. Die benutzten Aktivatoren führen nach etwa 24 Stunden zur ersten Zellteilung, so daß ET180CH₃ zu diesem Zeitpunkt zugegeben auch das Eintreten der Zellen in erste S-Phase verhindern kann. Da jedoch auch die Zugabe von ET180CH₃ nach 48 Stunden noch eine fast vollkommene Hemmung bewirkt, beweist dies, daß auch bereits proliferierende Zellen gegenüber ET180CH₃ hochempfindlich sind.

Beispiel 2

Um festzustellen, ob ET18OCH₃ in geeigneten Konzentrationen dazu benützt werden kann, aus einer Population von Lymphozyten nur die aktivierten und proliferierenden Zellen spezifisch zu eliminieren, die ruhenden dagegen auszusparen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Durch Nylonwolle gereinigte T-Lymphozyten von Balb C Mäusen (H-2^d) wurden mit Milzzellen von C57B16 Mäusen (H-2^b) im Sinne einer "mixed lymphocyte reaction" kokultiviert. Der Hälfte der Kulturen wurde am 3. Tag ET18OCH₃ (10 µg/ml) zugesetzt, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Eine weitere Kontrollkultur bestand aus Balb C T-Lymphozyten alleine und ohne ET18OCH₃. Nach 7 Tagen Kultur wurden alle Zellen zur Entfernung der ET18OCH₃ gewaschen und erneut in Kultur mit Zellen von C57B16 Mäusen bzw. mit Zellen von CBA Mäusen (H-2^k), mit den polyklonalen T-Zellaktivatoren Con A oder Anti CD3 Antikörpern oder mit dem B-Zellmitogen LPS stimuliert. Nach drei Tagen wurde dann ³H-Thymidin zugesetzt und dessen Einbau nach einem weiteren Tag bestimmt.

Abb. II A zeigt die Resultate mit den Kontrollen ohne ET18OCH₃. Dabei ist zu bemerken, daß auch die Kulturen ohne weitere Zusätze bereits einen relativ hohen background-Einbau von Thymidin zeigten, der eine weitere Zunahme nach Stimulation maskierte. Als einziges ergab Con A hier eine signifikante Erhöhung des Einbaus.

In Abb. II B sind die Ergebnisse der Kultur mit ET18OCH₃-Zusatz gezeigt. Der unspezifische background Wert ist hier völlig verschwunden, da unspezifisch proliferierende Zellen eliminiert waren. Auch die mit C57B16 Zellen restimulierten Kulturen zeigten keinen ³H-Thymidineinbau mehr. Bemerkenswert ist jedoch die Reaktion auf die neue allogene Stimulation mit CBA Zellen und vor allem die sehr gute Reaktion auf Con A und

Anti CD3 Antikörper. LPS ergab keine Stimulation, da die B-Lymphozyten im Laufe der Kultur abgestorben waren.

Abb. II C zeigt die Ergebnisse mit den ganz unstimulierten Kontrollen und ohne ET180CH₃. Das Fehlen signifikanter Stimulationserfolge auch mit Con A ist dadurch zu erklären, daß unstimulierte Mäuse-Lymphozyten eine 9-tägige Kulturperiode nur schlecht überstehen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß diejenigen T-Lymphozyten, die spezifisch durch ein Allo-Antigen, hier H-2^b von C57B16 Mäusen zur Proliferation aktiviert worden waren, in Anwesenheit von ET-18 vollständig eliminiert wurden. Im Gegensatz dazu blieben jedoch T-Lymphozyten anderer Antigen-Spezifitäten, die deshalb im Ruhezustand verharrten, nicht nur erhalten, sondern waren auch nachträglich noch sehr gut zur Proliferation aktivierbar. Dies wurde durch die Reaktion auf CBA, Con A und Anti CD3 Antikörper nachgewiesen. Daß ganz unstimulierte Lymphozyten (Abb. II C) auch ohne ET180CH₃ nicht mehr stimulierbar waren, zeigt, daß ET180CH₃ ruhende Zellen überhaupt nicht schädigt.

Dieser Versuch zeigt also, daß mittels ET180CH₃ Antigen-spezifisch aktivierte T-Zellklone selektiv eliminiert werden können, daß jedoch T-Zellen anderer Antigen-Spezifitäten davon nicht betroffen werden und durchaus reaktiv bleiben.

Beispiel 3

C57b16 Mäuse wurden mit je 100 µg des klassischen Träger-Hapten-Antigens TNP-KLH (Trinitrophenyl keyhole limpet hemocyanine) immunisiert. Nach 8 Wochen erhielten die Tiere eine Booster-Injektion von je 30 µg TNP-KLH. Gleichzeitig damit und dann täglich für insgesamt 5 Tage erhielt ein Teil der

Tiere 1 mg ET18OCH₃ pro Tier und Tag in Milch mittels Schlundsonde, der andere Teil Milch ohne ET18OCH₃. Eine Woche nach Boost bzw. nach der ersten ET18OCH₃-Gabe wurden die Milzen der Tiere entnommen. Die Milzen von nicht immunisierten Tieren mit und ohne ET18OCH₃ dienten als Kontrolle.

Mit einem Teil der Milzzellen wurden direkte und indirekte hämolytische Plaquetests zum Nachweis von B-Lymphozyten durchgeführt, die Anti-TNP-spezifische Antikörper der Klasse IgM oder IgG produzieren.

Abb. III A zeigt, daß die Entstehung von spezifischen Antikörper produzierenden Zellen durch ET18OCH₃ in vivo nicht beeinflusst wurde. Die Spezifität der Daten ist durch die geringe Zahl von Antikörper produzierenden Zellen bei den nicht-immunisierten Tieren, die background Werten entspricht, gezeigt.

Dieses Ergebnis zeigt, daß ET18OCH₃ keinerlei hemmende Wirkung in vivo auf die primäre oder sekundäre humorale Immunreaktion, gemessen durch die Entstehung von spezifischen Antikörper produzierenden B-Lymphozyten nach Antigengaben, ausübt.

Ein weiterer Teil der oben genannten Milzzellen wurde in vitro kultiviert und mit KLH (Restimulation von T-Lymphozyten) bzw. Concanavalin A (allgemeines T-Zellmitogen) oder mit TNP-KLH (Restimulation von B-Lymphozyten) bzw. SRBC (Schaferythrozyten zur primären Stimulation von B-Lymphozyten in vitro) versetzt.

Die T-Zellreaktionen wurden im Proliferationstest durch ³H-Thymidineinbau, die B-Zellreaktionen im hämolytischen Plaquetest bestimmt.

Abb. III B zeigt den Thymidineinbau von KLH restimulierten und von Con A aktivierten T-Lymphozyten, links von Tieren ohne, rechts mit ET180CH₃-Vorbehandlung in vivo. Dies zeigt, daß die Restimulation mit KLH dosisabhängig und spezifisch ist. Die in vivo Vorbehandlung der Tiere mit ET180CH₃ hat keinerlei negativen Effekt auf die T-Zell-Restimulation bzw. mitogene Stimulation.

Abb. III C zeigt die Ergebnisse mit B-Lymphozyten. Die Restimulation mit TNP-KLH ist spezifisch, wie auch die Primärstimulation mit SRBC. Auch hier reagieren die Zellen aus ET180CH₃ vorbehandelten Tieren mindestens so gut wie die aus Kontrolltieren. Sowohl ruhende T- als auch ruhende B-Zellen behalten daher ihre Stimulierbarkeit auch nach Verabreichung von ET180CH₃ bei.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verwendung von 2-Methyl-1-Octadecylglycero-(3)-phosphocholin zur Eliminierung von Antigen- oder Mitogen-aktivierten Lymphozyten bei Säugern.
2. Verwendung von $ET18OCH_3$ zur Herstellung eines Arzneimittels für die Eliminierung von Antigen- oder Mitogen-aktivierten Lymphozyten.

1/4

Abb. I

ET18 - in vitro Versuch III

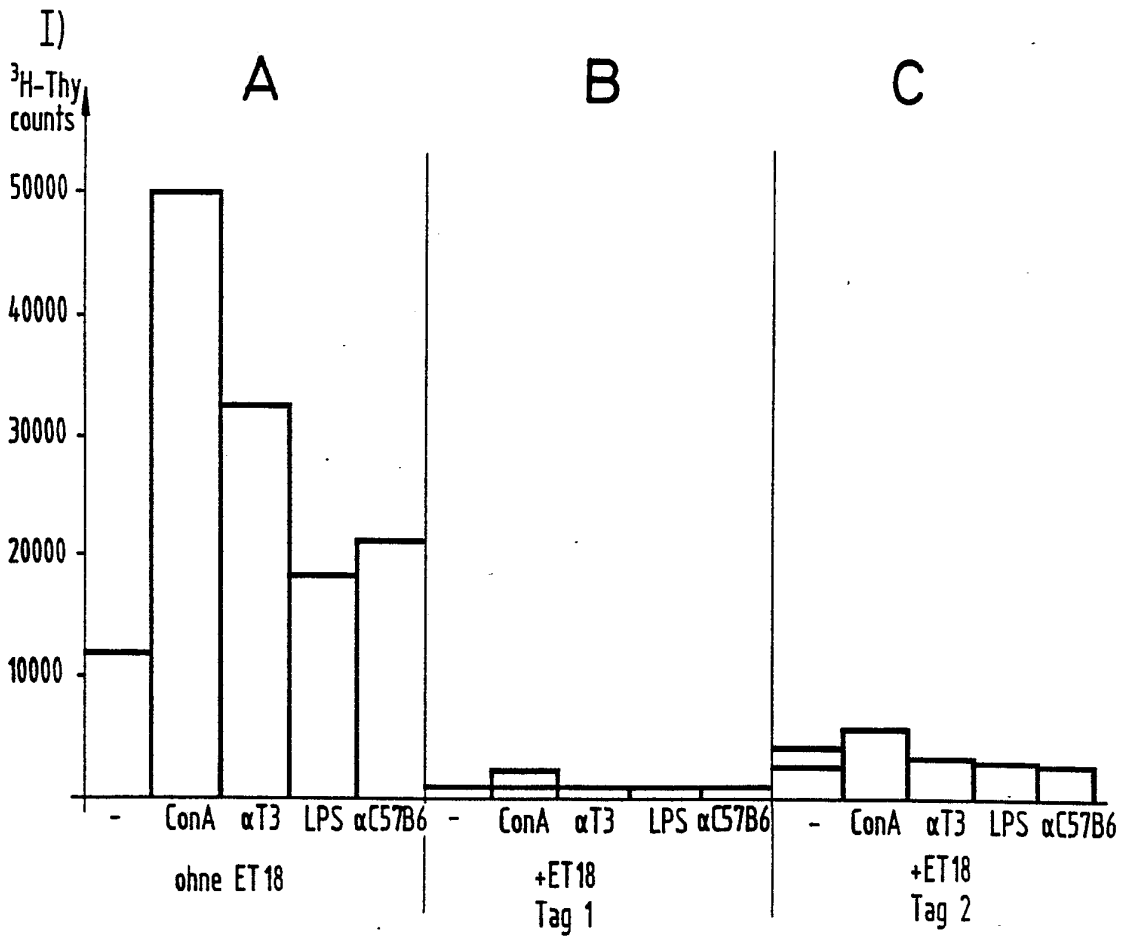
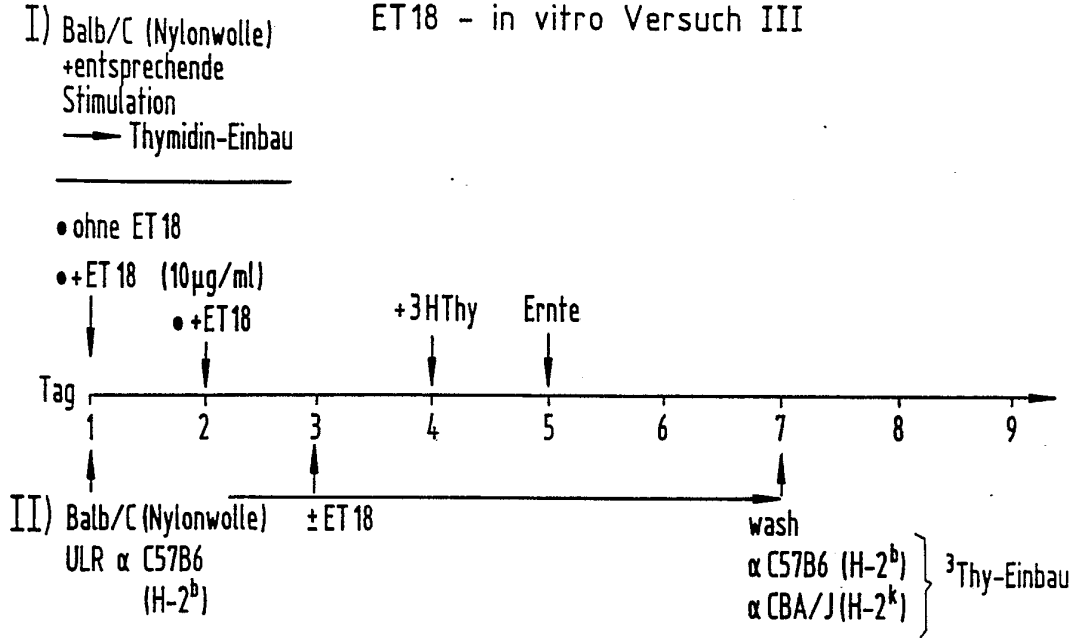
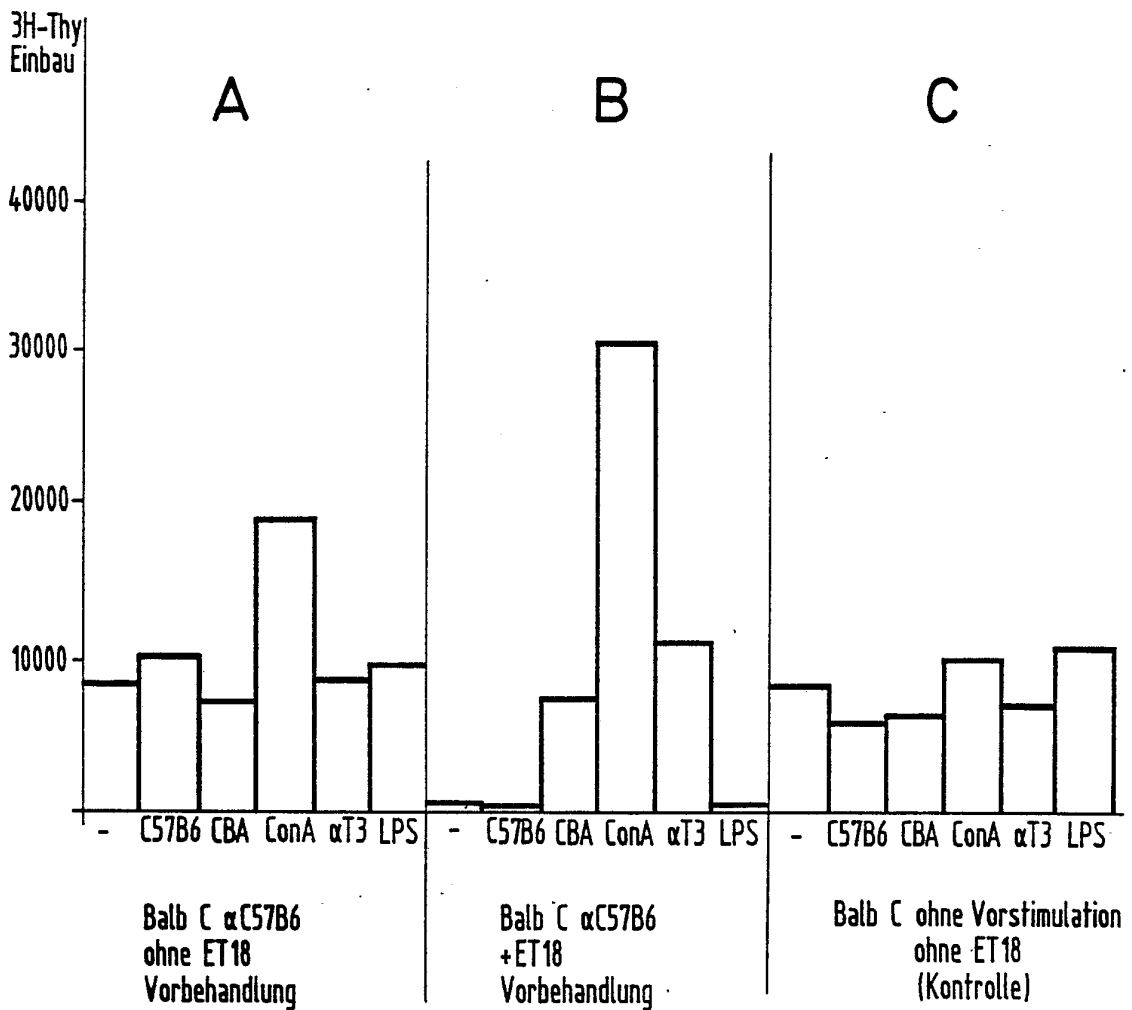


Abb. II

II)



aktivierte Zellen nach einer Woche in Kultur

$2,4 \times 10^6$

$0,1 \times 10^6$

$1,3 \times 10^6$

Gesamtzahl aller Zellen

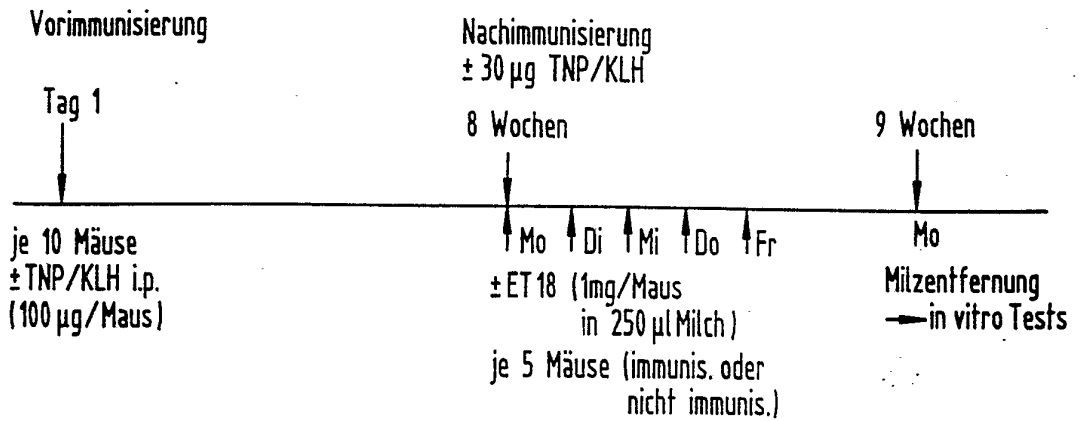
$\sim 10^7$

$\sim 10^7$

$\sim 10^7$

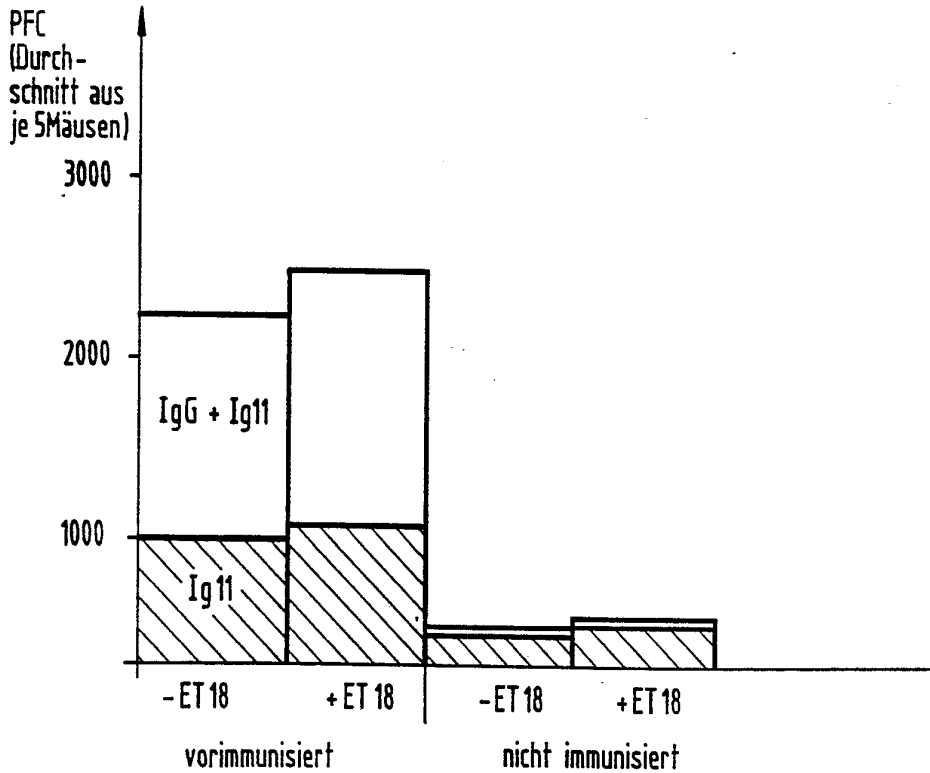
Abb. III A

ET 18 - in vivo Versuch



Test 1: Plaque Test (sofort)

Antigen: TNP-KLH



4/4

Abb. III B

Restimulation der T_H-Zellen mit KLH bzw. ConA → ³H-Thymidin Einbau nach 3 Tagen → ET18 Effekt?

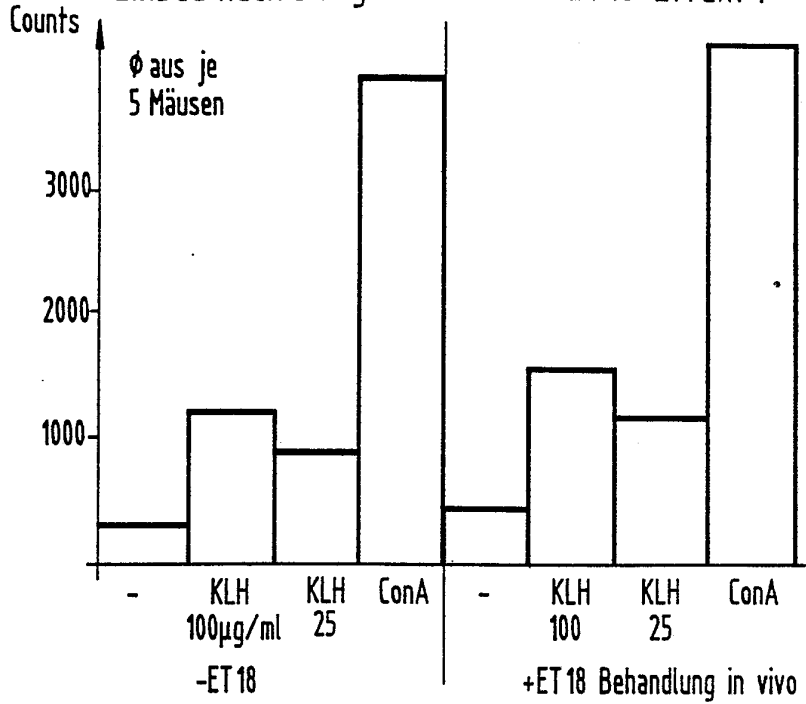
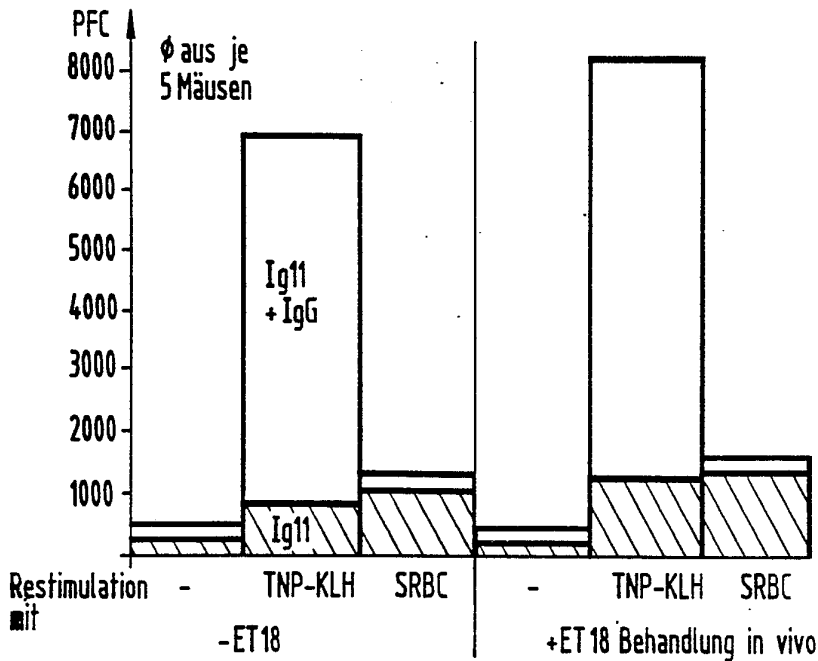


Abb. III C

III) Restimulation der B-Zellen → Plaque Test nach 7 Tagen



→ Bei allen 3 Tests: kein Effekt einer in vivo Behandlung (5 x 1mg ET18 p.o.)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/02233

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ A 61 K 31/685		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Immunobiol, volume 156, No. 4/5, 1979, R. Andreesen et al.: "Alkyl-lysophospholipid induced suppression of human lymphocyte response to mitogens and selective killing of lymphoblasts", pages 498-508, see the whole document	1-2
--		
X	Lipids, volume 22, No. 11, 1987, American Oil Chemists' Society, W.E. Berdel et al.: "Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH ₃ 1", pages 967-999, see abstract; page 968, right-hand column, lines 33-41	1-2
--		
A	Blood, volume 64, No. 6, December 1984, Grune & Stratton, Inc., Plc., L. Glasser et al.: "Purging murine leukemic marrow with alkyl- lysophospholipids", pages 1288-1291, see abstract	1-2
--		
./.		
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
8 March 1991 (08.03.91)	11 April 1991 (11.04.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

E	WO, A, 9014829 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 13 December 1990 see pages 1-5; examples 1-5; pages 9-13; figures 1-6 -----	1-2
---	---	-----

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers 1-2, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is not clear which specific therapeutic application is claimed by "Elimination of antigen or mitogen activated lymphocytes" (Claims 1,2). See PCT Art. 6; 6R 01/83, EPO Official Journal 1985, volume 8, pages 60-63

3. Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9002233

SA 42480

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/03/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9014829	13-12-90	DE-A- 3918082	24-01-91

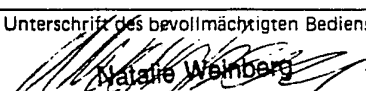
EPO FORM 10479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 90/02233

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl. ⁵	A 61 K 31/685	
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. ⁵	A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	Immunobiol, Band 156, Nr. 4/5, 1979, R. Andreesen et al.: "Alkyl-lysophospholipid induced suppression of human lymphocyte response to mitogens and selective killing of lymphoblasts", Seiten 498-508 siehe das ganze Dokument ---	1-2
X	Lipids, Band 22, Nr. 11, 1987, American Oil Chemists' Society, W.E. Berdel et al.: "Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH ₃ ¹ ", Seiten 967-999 siehe Zusammenfassung; Seite 968, rechte Spalte, Zeilen 33-41 --- ./. .	1-2
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
8. März 1991	11. 04. 91	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 Natalie Weinberg	

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2		
A	Blood, Band 64, Nr. 6, Dezember 1984, Grune & Stratton, Inc., Plc., L. Glasser et al.: "Purging murine leukemic marrow with alkyl-lysophospholipids", Seiten 1288-1291 siehe Zusammenfassung -----	1-2
E	WO, A, 9014829 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 13. Dezember 1990 siehe Seiten 1-5; Beispiele 1-5; Seiten 9-13; Figuren 1-6 -----	1-2
V. <input checked="" type="checkbox"/> BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIENEN HABEN¹		
Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:		
1. <input type="checkbox"/> Ansprüche Nr., weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich		
2. <input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. 1-2...., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich Es ist nicht klar, welche spezifische therapeutische Anwendung durch "die Eliminierung von Antigen - oder Mitogenaktivierten Lymphozyten" (Ansprüche 1,2) beansprucht wird. Siehe PCT Art. 6; 6R 01/83, Amtsblatt EPA 1985, Vol.8, Seiten 60-63		
3. <input type="checkbox"/> Ansprüche Nr., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.		
VI. <input type="checkbox"/> BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG²		
Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:		
1. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.		
2. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich		
3. <input type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:		
4. <input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.		
Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs		
<input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.		
<input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.		

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9002233
SA 42480

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 26/03/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A- 9014829	13-12-90	DE-A- 3918082	24-01-91

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82