



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 324 T2** 2005.06.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 969 851 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 324.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR97/00334**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 906 249.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/030716**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.02.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.08.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.06.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 35/74**
A61K 39/106

(30) Unionspriorität:
9602445 **26.02.1996** **FR**

(73) Patentinhaber:
Torossian, Fernand, Dr.med., Toulouse, FR

(74) Vertreter:
**Rechts- und Patentanwälte Reble & Klose, 68165
Mannheim**

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

(72) Erfinder:
**TOROSSIAN, Fernand Narbey, F-31400 Toulouse,
FR**

(54) Bezeichnung: **IMMUNMODULATORISCHER KOMPLEX UND DESSEN VERWENDUNG IN HELICOBACTER ER-
KRANKUNGEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen therapeutischen und präventiven antibakteriellen Impfkomples, der eine Impfwirkung besitzt, die an die Gegenwart von spezifischen Antigenen gegen *Helicobacter pylori* (früher *Campylobacter pylori* genannt), *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter coronari*, und von unspezifischen Antigenen, die eine Immunmodulation sicherstellen, gebunden ist.

[MARSHALL BJ. WARREN Jr., Unidentified cured bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration *Lancet* 1984: i: 1311–4]

[MÉGAUD F. *Helicobacter pylori*, chef de file des bactéries du mucus. *La lettre de l'infectiologue* 1993: 8(suppl. 4): 151–9]

[0002] In der Bakteriologie ist gut bekannt, dass die Antigene auf der Oberfläche von Wänden, Membranen oder Kapseln (kombiniert oder frei in löslicher Form im Kulturmilieu) von Glykoprotein-, Polypeptid- oder Polysaccharidart sind.

[0003] Impfstoffe, die an die Ribonukleinsäure von ribosomaler Herkunft (RNS) assoziative Faktoren wie z. B. Proteoglykan- oder Polysaccharid-Membran-substanzen, die aus pathologischer Keimen extrahiert sind, binden, eignen sich zur Herstellung azellulärer Impfstoffe (vgl. *Inf. and Immunity*, 1, 574–82 1970 und PCT WO 94/22462).

[0004] Diese Impfstoffe verwenden spezifische Antigene entsprechend spezifisch bestimmter mikrobieller Erkrankungen.

[0005] Also steht die Antigenwirkung im Wesentlichen im Zusammenhang mit der RNS (insbesondere den Ribosomen) von unter anderem mikrobiellen Zellen. Die immunologisch kompetenten Zellen verwenden diese RNS direkt als aktive Transporteure.

[0006] Zur Entwicklung des Komplexes der Erfindung mit dem bakteriellen Serotypantigen von *Helicobacter* haben wir dank vorzugsweise kovalenter Bindungen die RNS von vorzugsweise ribosomaler Herkunft an eine Sequenz von Glykoprotein-Aminosäuren, die vorzugsweise in Collagen vom Typ III gegenwärtig ist, gekoppelt. Beim Menschen stellt Collagen ungefähr ein Drittel der Proteine im Organismus dar. Der Typ III wurde wegen seiner Sequenz von Aminosäuren und seiner Gegenwart in der Dermis, der Gefäßwand und den Epithelschleimhäuten des Verdauungssystems gewählt.

[0007] In unserem Komplex verwenden wir zur Stabilisierung Zellmembranfraktionen; die von denselben Keimen stammen wie jene, die zur Entwicklung der ribosomalen RNS gedient haben. Diese Membranfraktionen enthalten die Gesamtheit der Peptidoglykansubstanzen und sind unter anderem als Immu-

nitätsadjuvanzen bekannt.

[0008] Außer *Helicobacter pylori*, *hepaticus* und *coronari* ist es nützlich, Membranfraktionen – Glukopolysaccharide oder Proteoglykane – zu haben, die von verschiedenen mikrobiellen Keimen stammen, die dazu gedient haben, die RNS durch Extraktion ihrer Ribosome, welches Keime sind, die für ihre Immunogenese (Rekrutierung von Makrophagen, Aktivierung von T-Lymphozyten, Potenzialisierung der Synthese von Immunglobulin, IgA-Sekretionsmitteln, insbesondere (11 S), Erhöhung der Phagozytose und Stimulierung der abhängigen T-Zellen) bekannt sind, zu liefern.

[0009] Dies wurde speziell so entworfen, denn im Fall der Erkrankung, herbeigeführt durch *Helicobacter pylori*, *hepeticus* oder *helmannii*, *coronari*, muss der Organismus außer der spezifischen humoralen Immunreaktion eine Zellantwort entwickeln, um die Unwirksamkeit der Antikörper beim Schutz der Person zu kompensieren.

[0010] Es ist bekannt, dass die Antwort auf die Zelltransmission nicht zur Produktion von Antikörpern führt sondern nur zur Erzeugung sensibilisierter und spezifischer Lymphoidzellen des betreffenden Antigens.

[0011] Die T-Lymphozyten handeln selbst und/oder durch die Zytokine, und man beobachtet entweder eine Antwort entzündlicher Art oder eine zytotoxische Antwort.

[0012] Die krankheitserregende Wirkung von *Helicobacter* beruht in seiner Fähigkeit, die Magenschleimhaut zu kolonisieren, im Intestinalsaft zu überleben und sich trotz der Immunreaktion des Wirts zu vermehren und Läsionen zu verursachen, die mitunter irreversibel sind (Adenokarzinom, Intestinallymphom oder MALT (mucuous associated lymphoid tissue)-Lymphome.

[PARSONNET J: *Helicobacter pylori* and gastric cancer; *Gastroenterol Clin North Am* 1993, 22: 89–104] WORTHERSPOON AC, DOGLIONI C, DISS TC et al.: Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*, *Lancet* 1993: 342: 575–7.

MOHANDAS, *Helicobacter pylori* and lymphoma, *N Eng J Med* 1994: 331: 746–7. wenn dies bei der Injizierung unzureichend ist; Widerstand gegen Phagozytose, Herbeiführung von Apoptose usw.

[PETERSON, P. K., VERHOEF, J., SCHMELING, D & QUIE, P. G.: Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leucocytes and monocytes, *J. Infec. Dis.* 136: 502–509, 1977.

KIEHLBAUCH JA, ALBACH RA, BAUM I. L., CHANG KP, Phagocytosis of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes, *Infect*

Immun 1985; 48: 446–51].

INHALTSSTOFFE DES IMPFKOMPLEXES DER ERFINDUNG

[0013] Der Komplex der Erfindung umfasst Doppel-moleküle, welche aus der Kopplung eines funktionellen Arms aus Aminosäuren, welcher die Bindung an einem Target sicherstellt, mit einem genetischen RNS-Arm bestehen, welcher der kodierten Beschreibung der Zusammensetzung des funktionellen Arms entspricht.

A – Die RNS ribosomaler Herkunft können aus Stämmen extrahiert werden, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden, wobei diese Liste nicht einschränkend ist:

- *Helicobacter pylori* (oder *Campylobacter*), *hepaticus*, *coronari*, ...
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Streptococcus* (*pneumoniae* und *pyogen*)
- *Staphylococcus aureus*
- *Serratia marcescens*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*
- *Corynebacterium* (*granulosum*, *parvum*, *acnes*)
- *Mycobacterium* (*tuberculosis*, *smegmatis*, *che-lonei*)
- *Hemophilus influenzae*
- *Pneumococcus Typ II*
- *Rothia dento cariosus*
- *Bacterium coli*
- *Shigella dysenteriae*
- *Enterococcus*
- *Nocardia* (*asteroides*, *brasiliensis*, *rhodocrans*, *opaca*, *rubra*)
- Calmette- und Guerin-Bazillus, oder einer Mischung aus ihnen.

[0014] Das mittlere Molekulargewicht dieser RNS liegt zwischen 5 104 und 108 Dalton.

[0015] Zur Herstellung von RNS existieren mehrere industrielle Verfahren. Als Beispiel nennen wir das RNS-Extraktionsverfahren, das in *Infect and Immunity*, 1. 574–82, 1970 beschrieben ist: die Bakterien werden gemahlen und anschließend einer fraktionierten Fällung unterzogen, die ribosomalen Proteine werden gelöst, die gefällte RNS wird durch Pronase behandelt, und schließlich durch Ionenauschromatographie gereinigt.

[0016] Wenn die RNS auf enzymatischem Weg erhalten wird, kann die endgültige Reinigung durch Sieben erhalten werden. Zu diesem Thema siehe insbesondere:

- C. EHRESMAN (1972) – *Biochimie*, 54, 901
- H. KAGAWA (1972) – *J. Biochem.*, (1972), 827
- M. SANTER (1973) – *J. Bact.* 116, 1304

– NOMURA (1974) – *Ribosomes* – Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

B – Die verwendbaren Membranfraktionen von Bakterienzellen können aus folgenden Stämmen extrahiert werden, wobei diese Listen nicht einschränkend sind:

1 – für die aus Kapseln gewonnenen Polysaccharide

- a. *Helicobacter pylori* und *hepaticus*
- b. *Klebsiella pneumoniae*
- c. *Streptococcus pneumoniae*
- d. *Hemophilus influenza*
- e. *Escherichia coli*

a. *Helicobacter pylori*, *hepaticus* und *coronari*

[HILLS BA, Gastric mucosal barrier evidence for *Helicobacter pylori* ingesting gastric surfactant and deriving protection from it, *Gut*, 1993 May; 34(5): 588–93. GENTA RM; ROBASON GO; GRAHAM DY, Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain, *Human Pathology*: 1994 Mar; 25(3): 221–6.

MAJEWSKI, S. I., and C. S GOODWIN, 1988, Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation, *J. Infect. Dis.* 157: 465–471.

GEIS. G., LEYING, H., SUERBAUM, S., MAI. U. & OPFERKUCH. W.: Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagelle, *J. Clin. Microbiol.* 27: 436–441, 1989].

b. *Klebsiella pneumoniae*

[– C. ERBING, I., KENE, B. LINBERG, J. LONNGREN (1976) – Structural studies of the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* type I (*Carbohydr. Res.*, 50 (1976) 115–20);

– W. NIMMICH (1968) – Zur Isolierung und qualitativen Bausteinanalyse der K. Antigen on *Klebsiellen* (*Med. Mikrobiol. and Immunol.*, 154, 117, 131).

– C. RICHARD (1973) – Etude antigénique et biochimique de 500 souches de *Klebsiella* (*Ann. Biol. Clin.*, 1973)].

c. *Streptococcus pneumoniae*

[– F. KAUFFMANN und E. LUND (1954) (*Int. Bull. Bact. Nomencl.* 4, 125–28).

– FELTON und OTTINGER (*J. of Bacteriology*, 1942, 43.94.105)

– M. COLIN, M. D. MAC LEOD et al., – Prevention of pneumococcal pneumoniae by immunization with specific capsular polysaccharides (*J. Exp. Med.*, 1945, 82, 445–65).

– A. R. DOCHEZ und O. T. AVERY – The elaboration of specific soluble substance by *Pneumococcus du-*

ring growth (1971) (J. Exp. Med. 26, 477–93).

– WESTPHAL und LUDERITZ (1952) (Z. Naturf. 7B, 148).

– C. P. J. GLAUDEMANS und H. P. TREFFERS – An improved preparation of the capsular polysaccharide from *Diplococcus pneumoniae* (Carbon dr. Res. 1967; 4, 181–84)].

d. *Hemophilus influenzae* (aus Kapseln gewonnenes Polysaccharid vom Typ Polyribosphosphat)

[– P. ANDERSON et al., (1972) – Immunisation of humans with polyribosephosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae* type B (J. of Clin. Invest; Vol. 51, 1972, 39–44).

– P. ANDERSON et al., (1977) – Isolation of the capsular polysaccharide from supernatant of *Hemophilus influenzae* type B (Infect. and Immun., 1977, 15 (2), 472–77)].

e. *Escherichia coli* (aus Kapseln gewonnene Polysaccharide)

[– LUDERITZ et al. (1977) – Somatic and capsular antigens of gramnegative bacteria (Compr. Biochem. 26 A, 105–228).

– BOYER H. W. und D. ROULAND-DISSOUX, (1969) – A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol. (41: 459–472).

– CASADABAN, M. und S. N. COHEN (1980) – Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E. coli*, J. Mol. Biol. (138: 179–207).

– LUGTENBERG, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hock und L. van Alphen (1975) – Electrophoretic resolution of the „major outer membrane protein“ of *Escherichia coli* K12 into four bands, (FEBS) Lett. 58: 254–258)1.

2 – Für die Membranliposaccharide (LPS – *Corynebacterium* (avidum, bovis, cliphtheriae, enzymicum, equi, fascians, flaccum, faciens, flavidum, fusiform, granulorum, helolum, hypertropicans, insidiosum, liquefaciens, parvum, pautometabolum, pyogenes, tumescens, xerosis)

– und die gram-negativen:

– *Helicobacter pylori*, hepaticus, coronari

– *Klebsiella* (pneumoniae und rhinoscleromatis)

– *Salmonella typhimurium*

– *Serratia* (marcescens, coralina, indica, plymuthica, kitues

– *Neisseria Meningitidis*

– *Escherichia coli*

[GOODWIN C. S. "Helicobacter pylori: 10th anniversary of its culture in April 1982", (Gut 1993; 34: 293–4).

– C. ERBIN et al. (1977) – Structural studies on the *Klebsiella* LPS (Carbohydr. Res., 56, 377–81).

– O. B. CASTOR et al. (1971) – Characterisation of a highly purified pyrogenic LPS of *Klebsiella pneumoniae* (J. of Pharm. Sci., 60, (10), 1578–80).

– K. FUKUSHI (1964) – Extraction and purification of endotoxin from *Enterobacteriaceae*: a comparison of selected methods and sources (J. of Bacteriol. 87, (2)n 391–400).

– G. A. LIMJUCO – Studies on the chemical composition of LPS from *Neisseria meningitidis* group B (J. of Gen. Microbiol. 1978, 104, 187–91).

– G. A. ADAMS (1967) – Extraction of LPS from gramnegative bacteria with D₂SO (Canad. J. Biochem., 45, 422–26).

– K. G. JOHNSON (1976) – Improved techniques for the preparation of bacterial LPS (Canad. J. Microbiol. (22), 29–34).

– Y. B. KIM et al. (1967) – Biologically active endotoxins from *Salmonella mutans* (J. of Bacteriol., 94, (5), 1320–26)].

3 Für die Membranproteine

– *Helicobacter pylori*

– *Escherichia coli*

– *Serratia marcescens*

– *Streptococcus pyogenes*

– *Salmonella typhimurium*.

Helicobacter pylori, hepaticus, coronari ...

– GOBERT (B.), LABIGNE (A.), de KORWIN (J. D.), CONROY (M. C.), BENE (M. C.), FAURE (G. C.) – Polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori*, (Rev. Esp. Enf Digest, 1980, 78 (suppl 1), 4.

– TOWBIN. H., T. STAEHLIN und J. CORDON, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76-4350-4354,

Escherichia coli

– S. F. STIRM et al. (1967) – Episome carried surface antigen K 88 of *Escherichia coli* (J. of Bacteriol., 93 (2), 731–39),

– S. J. BETZ et al. (1977) – Chemical and biological properties of a protein rich fraction of bacterial LPS (J. of Immunol., 119, (4), 1475–81),

Serratia marcescens

– W. WOBBER (1971) – Studies on the protein moiety of endotoxin from gram-negative bacteria, characterisation of the protein-moiety isolated by acetic acid hydrolysis of endotoxin of *Serratia marcescens*,

Streptococcus pyogenes

– M. K. WITTNER (1977) – Homologous and heterologous protection of mice with group-A Streptococcal

M protein vaccine (Infect. and Immun., 1977, 15, (1), 104–8).

Salmonella typhimurium

- N. KUUSI et al. (1979) – Immunization with major outer membrane protein in experimental salmonellosis of mice (Infect. and Immun., 1979, 25, (3), 857–62).
- C. BARBER et al. (1972) – the protective role of proteins from Salmonella typhimurium in infection of mice with their natural pathogen (Rev. Immunol., 36, 77–81).
- G. DELORD (1979) – Etude d'un antigène vaccinant contenu dans le surnageant de culture de Salmonella typhimurium, souche M-206, thèse de médecine de Lyon n° 428, 1979.
- G. W. GOODMAN (1979) – Characterization of the chemical and physical properties of a novel B-lymphocyte activator endotoxin protein (Infect. and Immun., 1979, 24 (3), 685–96).

4 Für die Teichon- und Lipoteichonsäuren

[0017] Streptokokken, Staphylokokken und Laktobazillen (die Oberfläche gram-negativer Bakterien besteht aus Teichonsäure, welche ein Glycerinpolymer ist, das durch Phosphodiesterbrücken gebunden ist).

[0018] Die folgenden Artikel beschreiben die Herstellungsverfahren:

- M. M. BURGER (1966) – Teichoic acids: antigenic determinants, chain separation and their location in the cell wall (Microbiology 56, 910–17).
- K. W. KNOX (1973) – Immunological properties of teichoic acids (Bacteriol. Reviews, 37, 21, 215–57).
- G. A. MILLER (1976) – Effects of streptococcal lipoteichoic acid on host response in mice (Infect. and Immun., 1976, 13 (5), 1408–17).
- A. J. WICKEN et al. (1975) – Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigens (Science, 187, 1161–67).

Verschiedene mögliche Dosierungen

R. N. S.

– FISKE et SUBBAROW – dosage du phosphore. Chromatographie HPLC sur colonne échangeuse d'ions pour le contrôle qualitatif (J. Biol. Chem. (1926), 66, 375).

Proteine

– LOWRY (J. Biol. Chem. (1951), 193, 265–75).

Hexosen

– T. A. SCOTT – Dosage colorimetr. A l'anthrone

(Anal. Chem. (1953), 25, 1956–61).

Hexosamine

– L. A. ELSON (Biochem. J (1953), 27, 1824–28).

Lipopolysaccharide

– J. JANDA und E. WORK (Febs Letters, 1971, 16 (4), 343–45).

C Die anderen Adjuvansfaktoren der Immunität außer Membranfraktionen sind

- Collagen Typ III
- Natriumchlorid

[0019] Das verwendete Collagen vom Typ III ist gekennzeichnet durch:

- a – Aminosäuresequenzen, die der folgenden Sequenz benachbart sind (die Konzentrationen sind in g/kg ausgedrückt):
 - Asparaginsäure AA 51,5
 - Hydroxyprolin HP 107,0
 - Threonin TH 16,1
 - Serin SE 27,8
 - Glutaminsäure AG 95,9
 - Prolin PR 124,0
 - Glyzin GL 149,0
 - Alanin AL 87,9
 - Valin VA 23,3
 - Methionin ME 7,5
 - Isoleucin IL 14,4
 - Leucin LE 27,8
 - Tyrosin TY 6,7
 - Phenylalanin Pa 14,4
 - Lysin LY 28,6
 - Histidin HI 5,5
 - Arginin AR 73,0
- b – folgende typische Analyse:
 - gelblich weiße Farbe
 - offensichtliche Dichte 250 g/l
 - Feuchtigkeit 6%
 - pH einer Lösung von 10% 6,9
 - Engler-Viskosität von 40°C 2,5

Lösung von 17,75%

- Fettstoffspiegel 0,9%
- Aschespiegel 2,2%
- Fe + Cu + Ca-Spiegel 462 mg/kg
- Schwermetalle, die nicht durch Emissions-Spektrographie mit Bogenanregung feststellbar sind
- C-Elementaranalyse 46,80%
- H 7,10%
- N 14,96%

[0020] Die Zusammensetzung des Impfstoffkomplexes der Erfindung, der RNS oder Fragmente ribosomaler RNS, Membranfraktionen (zum Beispiel Prote-

oglykane von *Klebsiella pneumoniae*) und Collagen vom Typ III bindet, ergänzt durch Natriumchlorid und einen Entzündungshemmer, ermöglicht es durch Verabreichung geringer Dosen, die nicht zur Toxizität führen, ein gutes Schutz- und Heilungsniveau zu erreichen.

[0021] Die bevorzugte Darreichungsform ist die Injektion der oben genannten Zusammensetzung, aber es ist möglich, andere Darreichungsformen und/oder andere Träger oder Additive zu verwenden, die mit einer medizinischen Verwendung kompatibel sind.

WIRKUNGSMECHANISMUS DES IMPFSTOFF-KOMPLEXES

[0022] Dieser therapeutische Komplex (Impfstoff) kann mit einem spezifischen Impfstoff assimiliert werden (durch „inertes System“ dessen Ziel darin besteht, die Immunogenität eines Impfstoffs zu erhöhen, der Untereinheit und aus Peptiden bestehende Impfstoffe rekombiniert), und von einem nicht spezifischen Impfstoff mit den Merkmalen eines Lymphokins, das, indem es sich an die Makrophage fixiert, eine wesentliche Rolle bei den Immunreaktionen auf *Helicobacter* spielt [KAZI, J. L., SINNIAH, R., JAFFRAY, N. A., ALAM, S. M., ZAMAN, V., ZUBERI, S. J. & KAZI, A. M.: Cellular and humoral immune responses in *Campylobacter pylori*-associated chronic gastritis, *J. Pathol.* 159: 231–237, 1989].

[0023] Seit 1974–75 (A. S. und G. P. YOUMANS) ist festgestellt worden, dass die Hemmwirkung der Immunreaktion auf RNS durch verschiedene Hemmstoffe bewerkstelligt wird.

[0024] YOUMANS hatte an einem einzigen Bakterienstamm (*Mycobacterium tuberculosis*) gearbeitet, dessen „Parasitismus“ rein intrazellulär ist.

[0025] VENNEMAN et al. denken ab 1972, dass das echte Antigen möglicherweise mit der RNS assoziiert sein könnte, die die Rolle eines Adjuvans spielen könnte. Sie impfen Mäuse mit ribosomaler RNS, extrahiert durch Phenol bei 65°C aus Ribosomen eines Stamms von *Salmonella typhimurium*. Dreißig Tage nach dieser Impfung stellt sich heraus, dass die Tiere besser geschützt sind als durch einen Impfstoff mit lebendem (geschwächtem) Stamm.

[0026] Es wird vor allem festgestellt, dass das Schutzniveau von der Menge injizierter RNS abhängt.

[0027] Zum Beispiel: die aus *Streptococcus pneumoniae* extrahierte ribosomale RNS führt zu einem Schutz humoraler Art, und die aus *Klebsiella pneumoniae* extrahierte ribosomale RNS führt zu einem Schutz zellulärer Art.

[TRIEU-CUOT. P., G. GERBAUD, T. LAMBERT und

P. COUVALIN (1985) – In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria (*EMBO J.* 4: 3583–3587)].

[0028] Dieses in vivo in Mäuse und Meerschweinchen injizierte Gemisch übt eine Wirkung auf die alveolären Makrophage aus.

[0029] Diese "vorübergehende" Wirkung findet sich wieder, indem man die saure Phosphatase der Hämolysenplaques direkt bei Kontakt mit splenischen Mäuszellen dosiert.

[0030] Auf die Behandlung mit unserem Therapie- und Impfkomples folgt eine zelluläre und humorale immunstimulierende Wirkung mit einer spezifischen und nicht spezifischen signifikanten Wirkung auf *Helicobacter pylori*. Der Organismus des Patienten selbst wird angeregt, die „infizierten Zellen zurückzuweisen“. Die Heilung ergibt sich durch die Wirkung der PMN (polymorphonukleare Leukozyten) und der gleichzeitig angeregten Monozyten.

[ANDERSEN LP, NIELSEN H. Survival and ultrastructural changes of *Helicobacter pylori* after phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *APMIS*: 1993 Jan: 101(1). 61–72]

[STEIGBIGEL, R. T., LAMBERT, L. H. & REMINGTON, J. S.: Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J. Clin. Invest.* 53: 131–142, 1974]

[YAM, L. T., LI. C. Y. & CROSBY, W. H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes, *Am. J. Clin. Pathol.* 55: 283–290, 1971].

[0031] Dieser therapeutische Mechanismus ermöglicht es also dank der durch das hergestellte Adjuvans (Kombination aus Membranproteoglykanen, Collagen vom Typ III, Natriumchlorid)opsonierten RNS (nicht spezifische bakterielle Ribosome) eine natürliche Klonung zu bewirken.

[0032] Diese Klonung führt zu einer Impfung gegen die Idiotypen der Antikörper sowie eine Produktion von Antikörpern gegen den Bindeort der Bakterien. Um die Entzündungsreaktion zu vermindern oder zu hemmen, müssen bei der Behandlung mit dem Impfkomples Kortikoide (z. B. vom Typ Betamethazon) in Form von Dinatriumphosphat in einer Dosis von 20 bis 50 mg auf IV- oder IM-Weg zu verwenden.

[0033] Diese Wirkung wird außerdem durch eine Produktion von endogenem Interferon sowie eine Aktivierung der N. K.-Zellen begleitet.

[0034] Das Ziel unseres immunmodulatorischen Impfkomples besteht also darin, eine lokale und allgemeine Immunreaktion herbeizuführen, deren Wirkung darin besteht, die Vermehrung eines in den Organismus eingeführten Infektionserregers zu verhindern oder wenigstens zu vermindern (bis zu einer

möglichen Selbstverteidigungsschwelle).

– PRUUL, H., LEE, P. C., GOODWIN, C. S. & MACDONALD, P. J. – Interaction of *Campylobacter pyloridis* with human immune defense mechanisms, (J. Med. Microbiol. 23: 233–238, 1987).

– RATHBONE, S. E., TREJDOSIEWICZ, L. K., HEATLEY, R. V. & LOSOWSKY, M. S. – Systemic and local antibody response to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia (Gut 27: 642–647, 1986).

– STACEY, A. R., HAWTIN, P. R. & NEWELL, D. G. – Local immune responses to *Helicobacter pylori* infections, In: Malgertheimer, P. & Ditschuneit, H. (Eds.): *Helicobacter pylori, Gastritis and Peptic Ulcer*, (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1990, pp. 162–166).

[0035] Unsere therapeutische Originalität besteht unter anderem darin, die Existenz „unterdrückender Zellen“, die eine infektionsfördernde Wirkung ausüben, zu mäßigen oder zu unterdrücken, durch zelluläre und/oder humorale Verteidigungsreaktion eine Antiulkusreaktion zu bewirken. Dies ist die therapeutische Antwort auf das ab 1993 durch Kist et al. empfundene Problem.

[0036] (KIST M; SPIEGELHALDER C; MORIKI T; SCHAEFER HE – Interaction of *Helicobacter pylori* (strain 151) and *Campylobacter coli* with human peripheral polymorphonuclear granulocytes) und Entzündungsrückfälle zu verhindern:

– BORODY T, ANDREWS P, MANCUSO N, JANKIEWICZ E, BRANDL S – *Helicobacter pylori* reinfection 4 years posteradication: (Lancet 1992, 339–1295).

– BELL GD, POWELL KU, BURRIDGE SM, HARRISON G, RAMER B, WEIL J, et al. – Reinfection or recrudescence after apparently successful eradication of *Helicobacter pylori* infection: Implication for treatment of patients with duodenal ulcer disease, (Q J Med 1993, 86: 375–382).

[0037] Schlussfolgernd wirkt unser therapeutischer Komplex durch gezielte Entwicklung, die RNS-Moleküle produziert, die eine Entzündung durch den *Helicobacter pylori* blockieren und die Immunverteidigung erhöhen.

[SUERBAUM, S., C. JOSEPHANS und A. LABIGNE (1993) – Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative putants by electroporation-mediated allelic exchange, (J. Bacteriol. 175: 3278–3288).

– HAAS, R., T. F. MEYER und J. P. VAN PUTTEN (1993) – Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis, (Mol. Microbiol. 8: 753–760)

– CHEN M, LEE A, HAZELL S, HU P. LI Y – Protective immunisation against *Helicobacter*, the need for stimulation of common mucosal immune system (abs-

tract), (Gastroenterology 1993, 104 (suppl): A681)].

[0038] Im Übrigen ist bei verschiedenen klinischen Versuchen festgestellt worden, dass der Komplex der Erfindung mit Erfolg die konventionellen Behandlungen ergänzen kann, insbesondere durch Dreifachtherapie im Fall notorischer bakterieller Resistenz.

VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG DES IMPFKOMPLEXES

[0039] Der Impfkomples kann auf oralem oder auf parenteralem Weg verabreicht werden:

- entweder durch direkte intravenöse Injektion
- oder durch Tropfinfusion
- oder durch subkutane Injektion
- oder auf transdermatologischem Weg (auf 24 Stunden).

[0040] Mit diesen verschiedenen Verfahren ist erfolgreich experimentiert worden.

[0041] Die Tagesdosierungen und deren Häufigkeit richten sich stark nach dem Zustand des Patienten. Eine Überdosis birgt keinerlei Risiko, da der Komplex nicht toxisch ist.

[0042] Auf intravenösem Weg können Sequenzen von einer Woche pro Monat verwendet werden, wobei jeder Tag der Behandlungswoche eine Tropfinfusion einer Lösung umfasst, die Folgendes enthält:

- 0,9% Natriumchlorid
- 40 µg Saccharidmembranfraktionen (Proteoglykane von *Klebsiella pneumoniae*)
- 30 µg RNS (ribosomal) von:
- *Helicobacter pylori* 7 µg
- *Diplococcus pneumoniae* 7 µg
- *Streptococcus pyogenes* (A 12) 7 µg
- *Klebsiella pneumoniae* 7 µg
- *Hemophilus influenza* 2 µg
- 10 µg Collagen Typ III wie oben beschrieben
- 8 mg Betamethazon-Dinatriumphosphat (d. h. 2 ml injizierbare Lösung)

[0043] Auf diese Behandlung durch intravenöse Tropfinfusion kann eine Behandlung durch subkutane Injektion bei Patienten folgen, die ambulant behandelt werden können, wobei jede Injektion Folgendes enthält:

- 40 µg Saccharidmembranfraktionen (Proteoglykane von *Klebsiella pneumoniae*)
- 30 µg RNS (ribosomal) von:
- *Helicobacter pylori* 7 µg
- *Diplococcus pneumoniae* 7 µg
- *Streptococcus pyogenes* (A 12) 7 µg
- *Klebsiella pneumoniae* 7 µg
- *Hemophilus influenza* 2 µg
- 10 µg Collagen Typ III wie oben beschrieben
- 0,5 ml Natriumchlorid zu 0,9
- 4 mg Betamethazon-Dinatriumphosphat (d. h. 1

ml injizierbare Lösung)

[0044] Diese Behandlung kann ein paar Wochen lang beibehalten werden.

Auf oralem Weg

- durch Tabletten.
- 2 Tabletten täglich, auf einmal morgens nüchtern eingenommen, wobei jede Tablette Folgendes enthält: – 400 µg Saccharidmembranfraktionen (Proteoglykane von *Klebsiella pneumoniae*)
- 300 µg RNS (ribosomal) von:
 - *Helicobacter pylori* 70 µg
 - *Diplococcus pneumoniae* 70 µg
 - *Streptococcus pyogenes* (A 12) 70 µg
 - *Klebsiella pneumoniae* 70 µg
 - *Hemophilus influenzae* 20 µg
 - 100 µg Collagen Typ III wie oben beschrieben
 - 2 mg Betamethazon-Dinatriumphosphat

[0045] Diese Behandlung kann mit 2 Tabletten täglich einen Monat lang, gefolgt Wiederholungsperioden von 2 Tabletten täglich, eine Woche pro Monat während 3 Monaten verordnet werden.

Auf transdermatologischem Weg

[0046] Therapeutisches transdermatologisches Haftsystem, bestehend aus einem Reservoir und einer durchlässigen Membran, die für ein ununterbrochenes Durchlassen der Wirkstoffe durch die Haut und in den Blutkreislauf mit konstanter Geschwindigkeit sorgt.

[0047] Die Vorrichtung muss auf eine trockene und wenig behaarte Hautoberfläche (z. B. seitliche Bauch- oder Thoraxwand) geklebt werden.

[0048] Sie umfasst:

- Haftpolymer
- Haftmittelträger: Polyethylen
- Schutzfilter aus Silikonpolyester

[0049] Ihr Inhalt ist der einer Tablette und ihre Darreichungsform ist identisch mit dem oralen Weg (ein „Patch“ für 2 Tabletten täglich).

[0050] Die folgenden nicht einschränkenden Beispiele sollen die konkreten Ergebnisse unseres therapeutischen Impfkompleses veranschaulichen.

BEISPIEL 1

[0051] Herr Robert G., 64 Jahre, wird nach Epigastralgien, Pyrosis und Bauchschmerzen in Verbindung mit Transitproblemen, bei denen Diarrhö und Verstopfung sich abwechseln, hospitalisiert. Die Endoskopie des Verdauungstrakts zeigt eine Refluxerkrankung von Magen und Speiseröhre durch Insuffizienz

der Cardia, die eine Ösophagitis und ein Magengeschwür mit sich bringt.

[0052] Biopsien sowie ein schneller Ureasetest werden durchgeführt. Dieser sowie die Anatomopathologie und die Kultur bestätigen die Gegenwart von *Helicobacter pylori*.

[0053] Die konventionelle Behandlung (Antisekretionsmittel und zwei Antibiotika) wird vorgeschrieben. Die Therapie führt nicht zur klinischen Heilung.

[0054] Sechs Wochen nach Abschluss der Behandlung weist die Vernichtungskontrolle durch ¹³C-Harnstoff-Atemtest durch ihr positives Ergebnis eine Vermehrung der Bakterien aus.

[0055] Die Behandlung mit dem Impfkomples der Erfindung wird dann in Form subkutaner Injektionen durchgeführt.

[0056] Einen Monat später wird die klinische Heilung festgestellt, und der ¹³C-Harnstoff-Atemtest ist negativ.

[0057] Sechs Monate später belegen eine erneute Kontrolle durch ¹³C-Harnstoff-Atemtest und die Kontrollendoskopie die erzielte Heilung.

[0058] Seit einem Jahr ist die Heilung endgültig.

BEISPIEL 2

[0059] Herr Serge Y., 48 Jahre, leidet an einer antralen Gastritis vom Typ B. Behandlung durch Immunmodulatorkomplex (einzige vorhergehende Behandlungen waren gastritische Pflaster) in IV-Form. Die klinische Heilung wird fünfzehn Tage nach der therapeutischen Sequenz erzielt. Die Kontrollen (¹³C-Harnstoff-Atemtest) sind seit einem Jahr negativ.

BEISPIEL 3

[0060] Herr Pierre K leidet an einem Zwölffingerdarmgeschwür, das durch Endoskopie bestätigt wird (+ Biopsie, Harnstofftest, ELISA-Tests).

[0061] Die Behandlung auf oralem Weg wird begonnen. Drei Wochen später wird die klinische Heilung erzielt.

[0062] Sechs Wochen später bestätigt die Kontrolle durch ¹³C-Harnstoff-Atemtest die Vernichtung.

[0063] Sechs Monate später wird keinerlei Rückfall festgestellt, und der ELISA-Test zeigt einen nicht signifikanten Antikörperspiegel (< 50%).

BEISPIEL 4

[0064] Frau Sarah L. leidet an einem Zwölffingerdarmgeschwür in Verbindung mit einer Gastritis vom Typ B.

[0065] Bei ihren Geschwistern wird die Gegenwart von Magenkrebs festgestellt. Eine vollständige Bilanz zeigt die Positivität aller Tests durch invasives Verfahren: Kultur, Histologie, Verstärkung des viralen Genoms (PCR), Harnstofftest.

[0066] Die Behandlung auf intravenösem Weg während einer Woche mit anschließenden subkutanen Wiederholungen während sechs Monaten wird begonnen.

[0067] Aufgrund des hohen Familienrisikos wird ab dem dritten Monat eine Endoskopie mit Biopsie durchgeführt: PCR-Zytologie, Kultur und CLO-Test sind negativ.

[0068] Im sechsten Monat bestätigt ein Atemtest (^{13}C) die klinische Heilung.

Patentansprüche

1. Spezifischer, therapeutischer Immunmodulator-komplex, gekennzeichnet dadurch, dass er umfasst:

– Doppelmoleküle, welche aus der Kopplung eines funktionellen Arms aus Aminosäuren, welcher die Bindung an einem Target sicherstellt, mit einem genetischen RNS-Arm bestehen, welcher der kodierten Beschreibung der Zusammensetzung des funktionellen Arms entspricht,

– bakterielle Membranfraktionen, Glycopeptide und/oder Lipopolysaccharide, wobei die Ribonukleinsäuren (RNS) ribosomaler Herkunft sind und aus Stämmen extrahiert werden, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter coronari*, *Campylobacter*, oder einer Mischung aus ihnen.

2. Immunmodulatorkomplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuren aus Aminosäuren von Collagen bestehen.

3. Immunmodulatorkomplex nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuren von Collagen aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: Asparaginsäure, Hydroxyprolin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Aminoessigsäure, Amino-propionsäure, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalalin, Lysin, Histidin, Arginin, oder einer Mischung aus ihnen.

4. Immunmodulatorkomplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zu seiner Verwendung bei der Be-

handlung von Erkrankungen durch *Helicobacter*-Bakterien, durch die Produktion von Antikörpern und die Produktion von endogenem Interferon.

5. Immunmodulatorkomplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zu seiner Verwendung als anti-idiotypischer Impfstoff gegen die Idiotypen von antibakteriellen Antikörpern, wodurch insbesondere die Vermeidung der Rückfälle in die ursprüngliche Pathologie des Verdauungstraktes ermöglicht wird.

6. Immunmodulatorkomplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zu seiner Verwendung gegen die bakteriellen Resistenzen bei herkömmlichen Behandlungen mit Antibiotika oder dergleichen.

7. Immunmodulatorkomplex und spezifischer Anti-*Helicobacter* Impfkomples nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er sich in einer Handelsform präsentiert, welche die gleichzeitige Verabreichung von Hauptgruppen entzündungshemmender Mittel vom Typ Corticoide, Antibiotika, Antisekretionsmittel, (Hemmstoffe der Protonenpumpe, des Typs Omeprazol oder Anti-H₂ ... oder anderer Produkte mit Wirkungen gestattet, die das Bakterienwachstum hemmen, Bakterien töten oder bakteriolytische Wirkung haben, um den *Helicobacter* vollständig zu vernichten, der eine Krankheitserregung durch Faktoren erzeugt, die mit der Bakterie im Zusammenhang stehen (Produktion von unterschiedlichen Zellengiftstoffen, von Entzündungsbeschleunigern: Interleukin I, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (Tumor necrosis factor alpha)), oder durch Faktoren, die mit dem Wirt im Zusammenhang stehen.

8. Immunmodulatorkomplex nach dem vorhergehenden Anspruch, gekennzeichnet durch eine Handelsform in einer Gestalt, welche die Verabreichung auf verschiedenen Wegen ermöglicht: Tropfinfusionen, intravenöse Injektionen, subkutane Injektionen, transdermatologische Vorrichtungen (Hautübertragung), oder orale Verabreichung.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen