

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①1 **CH 651 063 A5**

⑤1 Int. Cl.⁴: C 12 N 13/00
C 12 P 1/02
C 12 N 1/00
A 23 K 1/16

// (C 12 N 13/00, C 12 R 1:85)

①2 **PATENTSCHRIFT** A5

②1 Gesuchsnummer: 3131/81

②2 Anmeldungsdatum: 14.05.1981

②4 Patent erteilt: 30.08.1985

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 30.08.1985⑦3 Inhaber:
Elkawi AG, Zug⑦2 Erfinder:
Erfinder hat auf Nennung verzichtet⑦4 Vertreter:
Prof. Dr.phil. H. Utiger, Zürich

⑤4 **Verfahren zur Gewinnung anaboler, atmungsfördernder, niedermolekularer Wirkstoffe für prophylaktische, therapeutische, zell- und gewebekulturtechnische Zwecke.**

⑤7 Die Wirkstoffe werden aus einem Hefepiasmolysat gewonnen, indem Hefepilze im Momente ihres maximalen Wachstums aufgeschlossen werden. Der Aufschluss erfolgt durch Anwendung von Ultraschall, bei gleichzeitiger Einwirkung proteolytisch wirksamer Fermente. Der Überstand wird einer Dialyse unterworfen und unter schonendster Behandlung eingeengt. Die Wirkstoffe dienen prophylaktischer, therapeutischer, zell- und gewebekulturtechnischer Zwecke.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung anaboler, atmungsfördernder, niedermolekularer Wirkstoffe für prophylaktische, therapeutische, zell- und gewebekulturtechnische Zwecke, dadurch gekennzeichnet, dass Hefepilze der Familie der Saccharomycetes während ihres maximalen Wachstums durch Ultraschalleinwirkung, bei gleichzeitiger Gegenwart proteolytisch wirksamer Fermente aufgeschlossen werden, wobei anschliessend der Überstand einer Dialyse unterworfen und das Dialysat unter schonendster Behandlung eingengt wird.
2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als proteolytisch wirksames Ferment Papain verwendet wird.
3. Verwendung der nach Patentanspruch 1 oder 2 erzeugten Wirkstoffe für die Gewinnung von Zell- und Gewebekulturen.
4. Verwendung der nach Patentanspruch 1 oder 2 erzeugten Wirkstoffe für die Beschleunigung von Gärprozessen.
5. Tierfutterzusatz, enthaltend die nach Patentanspruch 1 oder 2 erzeugten Wirkstoffe.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung anaboler, atmungsfördernder, niedermolekularer Wirkstoffe für prophylaktische, therapeutische, zell- und gewebekulturtechnische Zwecke.

Es ist bekannt, dass Hefepilze aus der Familie der Saccharomycetes einen hohen Gehalt an Wirkstoffen, wie Vitamine, Fermente und Spurenelemente enthalten. Besonders seien die Riboflavine und ihre Derivate, die Vitamine des B-Komplexes, oder die Wirkstoffe der Atemkette, wie das Cytochrom C erwähnt, die für Mensch und Tier als äusserst wertvoll zu bezeichnen sind.

Ausser diesen bekannten, wachstumsfördernden Stoffe enthalten Hefepilze aber auch noch zum Teil unbekannte Wachstumsfaktoren, die als echte Anabolica bezeichnet werden können, wie sie etwa in embryonalen Geweben, insbesondere auch im Kälberblut enthalten sind, ohne die ein Wachstum von Zellen in vitro nicht stattfinden würde.

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass solche chemisch noch unbekannte, wachstums- und atmungsfördernde Faktoren aus Hefepilzen mit Wirkstoffen aus Kälberserum funktionell eine grosse Ähnlichkeit besitzen, die sich in der Erhöhung der Resistenz von Mensch und Tier gegen bakterielle, virale und andere Schädigungen positiv ausdrückt.

Es wurde nun versucht, in Hefeplasmolysaten derartige therapeutisch anwendbare Stoffe aufzufinden, insbesondere auch solche mit regenerierender Wirkung auf Abbauprozesse.

In der Folge zeigte es sich aber, dass es nicht ohne weiteres möglich war, Stoffe mit regenerierender Wirkung in einem Hefeplasmolysat nachzuweisen oder daraus zu isolieren, da in einem Hefeplasmolysat eine Vielzahl von Substanzen mit verschiedenster Wirkung enthalten sind.

Regenerative Prozesse benötigen bekanntlich eine hohe Stoffwechselleistung, die mit einer Erhöhung der inneren Atmung verknüpft ist. Damit zum Nachweis der gesuchten Stoffe mit regenerierenden und atmungsfördernden Eigenschaften aus Hefeplasmolysaten, sowie zur Ermittlung der geeignetsten, zu dem Wirkungsprinzip führenden Herstellungsverfahren herangekommen werden kann, mussten daher bestimmte Testverfahren herangezogen werden, mit deren Hilfe das Vorhandensein, sowie die Konzentration dieser Stoffe, nachgewiesen werden konnte. Besonders haben sich

hiefür Methoden als günstig erwiesen, wie sie bekannterweise für Gewebekulturen in vitro angewendet werden.

Bis anhin war es nicht gelungen, die gesuchten Wirkstoffe aus Hefezellen in chemisch reiner Form darzustellen, da solche nur in geringsten Konzentrationen in der Hefezelle selbst vorliegen.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass aus einem Hefeplasmolysat niedermolekulare Wirkstoffe mit atmungssteigernden, resp. stoffwechselaktivierenden und regenerationsfördernden Eigenschaften gewonnen werden können, wenn man das erfindungsgemässe Verfahren zu ihrer Herstellung anwendet.

In der genuinen Hefezelle sind diese Wirkstoffe nicht oder nicht ohne weiteres nachweisbar, da sie in gebundener oder inaktiver Form vorliegen und somit dem direkten Nachweis entzogen sind, so dass sie auch therapeutisch nicht in Reaktion treten können. Nach Feststellung solcher Wirkstoffe bestand nun die Aufgabe darin, ein Verfahren zu entwickeln, das gestattet, diese Wirkstoffe aus Hefezellen von den höher molekularen Zellbestandteilen abzutrennen, anzureichern und in einer therapeutisch verwertbaren Form darzustellen.

Versuche haben gezeigt, dass die üblichen Verfahren wie Ausfrieren, Aussalzen, Erhitzen, saure oder alkalische Plasmolyse, Zerreibung usw. der Hefezellen zu keinen befriedigenden Ergebnissen führten. Das Problem, die Hefezellmembran möglichst gründlich und ausreichend zu zerstören, um eine hohe Ausbeute der Wirkstoffe zu erhalten, konnte bis anhin nicht in befriedigender Weise gelöst werden.

In bezug auf die Reinigung der gewonnenen, wachstumsfördernden Inhaltsstoffe war bis anhin keine hiefür geeignete Methode bekannt; insbesondere die Art der Enteiweissung durch Ausfällen der genuinen Eiweisse des Hefezellsaftes mittels der üblichen Methoden, wie z.B. Erhitzen oder durch Anwendung von Trichloressigsäure, war nicht befriedigend, da ein solches Ausfällen des Eiweisses auch die gesuchten Substanzen mitausfällte.

Es wurde nun gefunden, dass der Aufschluss der Hefezellen am wirkungsvollsten dann erfolgt, wenn man einer Hefemasse eine zuckerhaltige Lösung, wie Melasse, Fruchtsaftabfälle und dergleichen zusetzt, diese Hefemasse während 1 bis 3 Tagen bei $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ unter guter Belüftung einem Gärprozess überlässt und die so erhaltene Hefemasensuspension unter Zusatz eines eiweisspaltenden Fermentes, wie z.B. des Papains, beim Optimum der Gärung gleichzeitig mittels eines Ultraschallintegrators von 50 Watt/cm² Leistung solange wirbelt, bis die Temperatur der Hefesuspension auf ca. 40°C gestiegen ist, was bei einem Überstand von 70-75% der Fall ist. Die abgekühlte, auf ein p_{H} von 6,2 abgepufferte Lösung wird hierauf portionenweise abzentrifugiert. Die Überstände der Zentrifugate werden vereinigt und alsdann einer Schlussdialyse unterworfen, die gegen neutral gepuffertes Wasser erfolgt. Daraufhin wird das Ganze in schonendster Weise eingengt. Um das erhaltene Produkt zu konservieren, wird diesem ein bekanntes Konservierungsmittel beigegeben.

Überraschenderweise konnte beim erfindungsgemässen Verfahren festgestellt werden, dass die Ausbeute an atmungsfördernden Wirkstoffen dreimal so gross ist, als bei einer normal angesetzten Papainproteolyse, die ohne gleichzeitige Ultraschalleinwirkung vor sich ging. Dies ist umso überraschender, als dies nicht vorausgesehen werden konnte.

Zum besseren Verständnis des erfindungsgemässen Verfahrens soll nachfolgend ein Ausführungsbeispiel die Erfindung erläutern.

Ausführungsbeispiel

Man versetze 1 kg Hefepilze, vorzugsweise eine ober- oder untergärrige Heferasse der Art *Saccharomyces cerevisiae* mit 100 Liter Wasser, dem man ca. 5 kg zuckerhaltige Rohstoffe zusetzt. Das Ganze wird während 1 bis 3 Tagen bei einer Temperatur von ca. 25°C unter guter Belüftung sich selbst überlassen. Hierauf versetzt man das Ganze mit 2-5% in bezug auf die Gesamtbiomasse mit einem eiweiss-spaltenden Ferment, vorzugsweise mit Papain. Gleichzeitig wird die Gesamtmasse mittels eines Ultraschallintegrators mit 50 Watt/cm² solange gewirbelt, bis die Temperatur der Biomasse auf 40°C gestiegen ist; der Überstand beträgt dann 70-75%. Die Gesamtlösung wird dann auf einen p_H-Wert von 6,2 gebracht und portionenweise zentrifugiert. Die Zentrifugate werden gesamthaft einer Schlussdialyse unterworfen, die bei ca. 25-30°C gegen neutral gepuffertes Wasser erfolgt. Vor Einleitung der Schlussdialyse werden den Zentrifugaten so viel eines Konservierungsmittels zugesetzt, dass die Endkonzentration desselben am Schluss der Dialyse, im Dialysat bei 0,001-0,008% liegt. Als Konservierungsmittel kann in vorteilhafterweise der p-amino-Benzoesäuremethyl- und/oder äthylester verwendet werden.

Es hat sich gezeigt, dass das erwähnte Konservierungsmittel die Sauerstoffaufnahme z.B. eines Leberhomogenates oder einer Hefekultur durch den Wirkstoff höchstens um 10% gegenüber dem Wirkstoff ohne Konservierungsmittelzusatz senkt. Das Schlussdialysat wird alsdann in schonendster Art und Weise auf 50 mg pro ml Dialysat eingeeengt.

Die Standardisierung und Testung des Endproduktes erfolgt dadurch, dass man einer üblichen Gewebekultur in vitro das Endprodukt in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:10 000 zusetzt und dass man zu gegebener Zeit eine Zellzählung durchführt. Gegenüber einer Gewebekontrollkultur ohne Wirkstoffzusatz hat es sich gezeigt, dass die Zellenzahl um mindestens 150% ansteigt.

Es ist auch möglich, eine Standardisierung durch direktes Messen der Zellteilungsbeschleunigung von in vitro ge-

züchteten Zellen wie Fibroblasten menschlicher oder tierischer Herkunft vorzunehmen. Die erhöhte Resistenz wird durch Verabfolgung der erfindungsgemäss gewonnenen Wirkstoffe so bestimmt, dass menschliche oder tierische

- 5 Zellen mittels toxischen Metallsalzen, wie Blei- oder Quecksilberverbindungen versetzt werden, derart, dass sie in ihrer Teilungsfähigkeit eingeschränkt oder blockiert werden. Der Grad der Deblockierung durch das Einwirken der Wachstumsfaktoren ergibt dann den Grad der Resistenzfähigkeit.
- 10 Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Endprodukt durch Anregung des Stoffwechsels ganz generell die Sauerstoffaufnahme und zugleich die Mehrproduktion von Adenosintri-phosphat fördert. Das Endprodukt katalysiert und aktiviert die Atemkette an dem Niveau der Cytochromoxidase. Aus diesen Gründen erfolgt z.B. im Falle
- 15 einer Wunde, unter dem Einfluss des Wirkstoffes, eine vermehrte Zellteilung und somit eine raschere Epithelisierung und Abheilung. Bei Messungen der Futterverwertung von Nutztieren hat es sich herausgestellt, dass ein Zusatz des
- 20 gefundenen Wirkstoffes eine bessere Ausnutzung des Grundfutters bewirkt, so dass solche Tiere ihren erwünschten Reifegrad auch viel schneller erreichen, als Tiere, deren Futter keine Wirkstoffe enthielt.

- Auch hat es sich gezeigt, dass z.B. ein Gärvorgang durch
- 25 Zusatz des erwähnten Wirkstoffes bedeutend aktiviert wird. So konnte festgestellt werden, dass sich der Wirkstoff in der Bierbrauerei mit Erfolg anwenden lässt, indem man einen normalen Gärvorgang, der sonst z.B. 8½ Tage dauert,
- 30 auf 7 Tage reduzieren kann. Der Zeitgewinn von 1½ Tage ist wirtschaftlich gesehen, bedeutend; die Qualität des Bieres ist in beiden Fällen dieselbe.

- Die erfindungsgemäss hergestellten Wachstumsfaktoren finden nicht nur therapeutische Verwendung in der Human- und Tiermedizin, sondern auch im technischen Bereich der
- 35 Gärprozesse, in der Zell- und Gewebezüchtung in vitro und zur besseren Ausnutzung des Grundfutters.