

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 294/95

(22) Anmeldetag: 17. 2.1995

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1997

(45) Ausgabetag: 25. 8.1997

(51) Int.Cl.⁶ : **A61K 39/395**
G01N 33/68

(30) Priorität:

18. 2.1994 US 198067 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

EP 506651A EP 479597A EP 413188A
DERMENT ABSTR. AN 82-40375E, BIOCHEM. J. 271(2) 1990,
PP. 285-296

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

EIBL MARTHA
WIEN (AT).
WOLF HERMANN DR.
WIEN (AT).
MANNHALTER JOSEF W.
WIEN (AT).
LEIBL HEINZ DR.
WIEN (AT).
LINNAU YENDRA DR.
WIEN (AT).

(54) ZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZUR PRÄVENTION UND BEHANDLUNG VON ENTZÜNDUNGEN MIT IMMUNGLOBULIN A

(57) Eine Entzündung kann durch Verabreichung einer IgA-haltigen Zusammensetzung behandelt oder vollständig verhindert werden. Diese Zusammensetzungen können auch eine Immunmodulierung bewirken. Vorzugsweise enthält die Zusammensetzung multimeres IgA und ist im wesentlichen frei von IgG in seinen verschiedenen Formen. Andere Verbindungen, wie Antibiotika, Antiphlogistika und Antacida können auch verabreicht werden. Immunglobulin A kann auch in Impfstoffen zur Prävention einer Entzündung verwendet werden. Zusätzlich wird ein verbesserter Test zur Bestimmung der entzündungshemmenden Aktivität beschrieben.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prävention oder Behandlung von akuten als auch chronischen Entzündungsreaktionen durch Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die Immunglobulin A ("IgA") enthält. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die multimeres IgA enthält, zur Behandlung, Vermeidung oder Linderung solcher Entzündungsreaktionen, auch im Verlauf einer Impfung. Die Erfindung betrifft ferner einen in-vitro-Test zur Bestimmung der entzündungshemmenden und immunmodulierenden Aktivität einer Substanz.

Schädliche entzündliche Vorgänge können überall im Körper auftreten. Z. B. im Bereich der Schleimhäute, wie Entzündung des oberen und unteren Atemwegtraktes, Stomatitis aphthosa, Entzündungsvorgänge im Gastrointestinaltrakt. Einige Entzündungsvorgänge der Schleimhaut werden nicht direkt durch ein infektiöses Agens hervorgerufen, sondern rühren eher von einer Überreaktion des Immunsystems als Reaktion auf eine mikrobielle Infektion her. Beispiele für diese Art von Erkrankungen sind die akute obstruktive Bronchitis und Exazerbation von Asthma bronchiale ausgelöst durch Atemwegsinfektionen.

Schädliche Entzündung kann auch an anderen Orten als Schleimhautoberflächen auftreten. Erkrankungen an solchen nicht die Schleimhaut betreffenden Orten umfassen die rheumatoide Arthritis (systemische jugendliche rheumatoide Arthritis und psoriatische Arthritis), Reiter's-Syndrom, ankylosierende Spondylitis, Crohn's- und Whipple's-Erkrankung mit Arthritis und systemischer Lupus erythematosus.

Schädliche Entzündungen sind im allgemeinen das Ergebnis unkontrollierter Reaktionen im Immunsystem. Bestimmte Antigene spielen eine Rolle beim Entzündungsprozeß und können aufgrund dieser Funktion eine Schädigung verursachen. So werden z. B. die Mehrzahl der toxischen Effekte einer systemischen gram-negativen Infektion und Endotoxinämie durch Wechselwirkung mit Zellen des Immunsystems, insbesondere Makrophagen, vermittelt. Zellen aus der Monozyt/Makrophagen-Linie sind die Hauptquelle von Entzündungszytokinen, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ("TNF- α ") und Interleukin 6 ("IL-6").

Die Entzündungszytokine werden als Reaktion auf eine Vielzahl biologischer Stimuli, wie den z. B. Lipopolysaccharide ("LPS") aus gram-negativen Bakterien, erzeugt. TNF- α und IL-6 spielen eine zentrale Rolle bei den multiplen Effektorfunktionen und zellulären Wechselwirkungen, die nötig sind für eine effektive Immunabwehr während Entzündung und Immunreaktion. Jedoch ist eine unkontrollierte Produktion von Entzündungszytokinen für den Wirt schädlich. Z. B. wurde gezeigt, daß die unkontrollierte LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α ein zentraler Mediator für die LPS-induzierte Toxizität einschließlich des gram-negativen endotoxischen Schocks ist.

Die Injektion hoher Dosen von TNF- α in Ratten oder Mäusen induziert die Symptome und die tödlichen Folgen eines septischen Schocks. Ferner korrelieren hohe Serumspiegel an TNF- α mit der Sterblichkeitsrate von Patienten mit Meningokokkensepsis und septischem Schock. Hohe Spiegel von TNF- α wurden auch bei Neugeborenen mit nekrotisierender Enterocolitis gefunden, was nahelegt, daß TNF- α bei der Pathogenese dieser Krankheit beteiligt sein kann. In der Tat hat Endotoxinexposition und Verabreichung von TNF- α Darmnekrose im experimentellen Modell der nekrotisierenden Enterocolitis bei Neugeborenen induziert. Erhöhte Spiegel an IL-6 werden bei einer Vielzahl klinischer Zustände, einschließlich bakterieller und viraler Meningitis und HIV-Infektion gefunden. Man weiß, daß Endotoxine die IL-6-Synthese induzieren, und daß die Serumspiegel von IL-6 bei Bedingungen, die mit Endotoxämie einhergehen, wie Brandwunden, erhöht sind. Die schädlichen Wirkungen von Bakterientoxinen sind verbunden mit gesteigerter und selbstamplifizierender Freisetzung dieser Mediatoren, die die Entzündung bewirken, oft mit tödlichem Ausgang. Die Todesfolge durch gram-negative Bakteriämie oder Endotoxämie wurde durch Verabreichung spezifischer Anti-TNF-Antikörper verhindert.

Verschiedene Komponenten des Immunsystems sind an Entzündungsvorgängen beteiligt. Eine Hauptkomponente des Immunsystems sind die Immunglobuline. Immunglobulin-haltige pharmazeutische Zusammensetzungen wurden bisher bei der Prophylaxe und Behandlung bakterieller und viraler Infektionen eingesetzt. Z. B. wurde gemäß US-Patent Nr. 4 335 099 eine orale Zusammensetzung, die IgA und Immunglobulin G ("IgG") enthielt, zur Behandlung von Darminfektionen verwendet. Zusätzlich sind Präparationen, die 73 % IgA und 26 % IgG enthalten, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, in der Lage, das Auftreten nekrotisierender Enterocolitis zu vermindern, wenn sie prophylaktisch an Säuglinge mit niedrigem Geburtsgewicht verabreicht werden. Siehe Eibl et al., J. Clin. Imm. 10(6): 72S-79S (1990). Man glaubt, daß dieser Effekt auf der Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes aufgrund des hohen Titers des Antikörpers gegen eine Mehrzahl von potentiellen Pathogenen und Toxinen beruht. Solche Pathogene umfassen Bakterien, die Pertussis, Tetanus oder Diphtherie auslösen, und Viren, wie das Poliovirus, Cocksackievirus, Rotavirus und Echovirus.

Es wurde gezeigt, daß IgA, IgG und Transferrin synergistisch gegen Bakterienwachstum wirken (siehe EP 0 506 651 A). Die Anteile der Wirkstoffe liegen zwischen 0,40 und 0,80 Gew.-Teile IgG und 0,15 bis 0,45 Gew.-Teile Transferrin pro Gewichtsteil IgA.

Es wurde gezeigt, daß IgG, IgA und IgM synergistisch mit anderen pharmakologisch aktiven Verbindungen, wie Antibiotika, agieren. Diese Immunglobuline binden vermutlich an infektiöse Mikroorganismen, was zu einer Agglutination oder Induktion von Phagocytose führt. Siehe EP 0 168 830 A.

Es ist daher bekannt, daß Immunglobuline von Nutzen sein können, da ein spezifischer Antikörper ein spezifisches Antigen erkennt und an dieses unter Neutralisation des Antigens bindet. Man hat jedoch angenommen, daß bestimmte Immunkomplexe eine Rolle bei bestimmten Entzündungsprozessen spielen können. Z. B. wurde vom Auffinden von IgA-Immunkomplexen bei Patienten, die an entzündlichen Darmkrankheiten und ankylosierender Spondylitis leiden, berichtet. Die Patienten, die an diesen Erkrankungen leiden, hatten hohe Konzentrationen an Serum IgA und zirkulierenden IgA-Immunkomplexen. Siehe Peters et al., Ann Rheumat. Dis. 49: 638-640 (1990).

Es wurde gefunden, daß bestimmte IgG-Antikörper enthaltende Zusammensetzungen Schutz gegen systemische Erkrankung durch Staphylokokkeninfektion aufgrund der durch bakterielle Toxine inhibierten T-Zellaktivierung (Superantigene) bewirken. Siehe Takei et al., J. Clin. Invest. 91: 602-607 (1993). Dieser Schutzeffekt von IgG-Zusammensetzungen ist neutralisierenden Antikörpern zuzuschreiben. Der Effekt dieser Antikörper tritt vermutlich durch Inhibierung der T-Zellaktivierung durch das bakterielle Superantigen ein, was sonst zu einem Fortschreiten und einer Verstärkung der systemischen Entzündungsreaktion führen könnte. Daher kann nach der Superantigen-Hypothese die Verwendung bestimmter IgG-Antikörper gegen verschiedene andere Immunerkrankungen als Antikörpermangelsyndrome, von Nutzen sein. Siehe Rich, J. Clin. Invest. 91: 378 (1993).

Das andere vorherrschende Immunglobulin, IgA, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Immunsystem. Z. B. spielt das sekretorische IgA ("SIgA") eine Hauptrolle beim Schutz des Wirts vor Infektion durch pathogene Organismen, die über Schleimhautoberflächen des Atmungs-, Darm- und Urogenitaltrakts eindringen. IgA-Antikörper sind an der Clearance von pathogenen, bakteriellen, viralen oder parasitären Organismen und einer Vielzahl von durch Schleimhautoberflächen aufgenommenen oder inhalierten Antikörpern durch Neutralisierung von Toxinen und viralen Partikeln, durch Verhinderung des Anhaftens des bakteriellen Pathogens und Vermeidung von Kolonisierung und Penetration von Schleimhautoberflächen durch pathogene Mikroorganismen beteiligt.

Die antiinfektiösen Effekte von IgA-haltigen Zusammensetzungen, die im wesentlichen frei von IgG sind, sind in den japanischen Patentpublikationen Sho 56-53622 und Sho 57-89815 offenbart. Diese Zusammensetzungen enthielten 92 % IgA und 6 % IgG. Diese Zusammensetzungen verringerten die durch *Pseudomonas aeruginosa* bei Mäusen verursachte Sterblichkeit. Diese Zusammensetzungen enthalten monomeres IgA, und es wurde gezeigt, daß sie einen neutralisierenden Effekt auf Rotavirus, *Escherichia coli* und *Salmonella typhi* haben. Tests verschiedener Zusammensetzungen zeigten, daß ein niedrigerer Gesamt-IgG-Gehalt im allgemeinen mit stärkeren antiinfektiösen Wirkungen korreliert.

Verfahren zum Erhalt von IgA sind gut bekannt. Z. B. ist ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinzusammensetzungen, die mehr als 10 % IgA enthalten, durch Ionenaustauschchromatographie in DE 39 27 111 C2 offenbart. Wenn die Elutionsbedingungen so gewählt werden, um IgM auszuschließen, kann ein Produkt, das 30 bis 60 % IgA und 70 bis 40 % IgG enthält, erhalten werden. Die Antikomplementaktivität dieser Zusammensetzung ist relativ niedrig.

Frühere Verfahren zur Gewinnung von IgA aus Serum konzentrierten sich auf das Verhindern der Polymerisierung des Immunglobulins unter Vermeidung der Bildung von multimeren IgA. Die Polymerisation von IgA wird typischerweise vermieden, auch wenn SIgA isoliert wird, das tatsächlich dimer ist. Es wurde bisher angenommen, daß die Monomerfraktion von SIgA am wertvollsten ist. Ein Verfahren zur Herstellung einer SIgA-Zusammensetzung wird in EP 0 479 597 A2 beschrieben.

Es wurden Stabilisatoren verwendet, um monomere IgA-Ausbeuten von ca. 80 % zu erreichen. Die Immunglobulinpolymere werden dann durch fraktionierende Präzipitation unter Verwendung von Polyethylenglykol abgetrennt. Das Vermeiden von multimerem IgA im Stand der Technik hat jedoch die klinische Verwendung von IgA eingeschränkt. Diese eingeschränkte Verwendung ist das Ergebnis von sich widerstrebenden Überlegungen der viralen Inaktivierung und Vermeidung von Polymerisation.

Z. B. wurde typischerweise eine IgA-Zusammensetzung auf ca. 60 °C zur Inaktivierung kontaminierender Viren erhitzt. Dieses Erhitzen verursacht auch Immunglobulin-Denaturierung und anschließende Polymerisierung unter Bildung von IgA-Multimeren. Um die Polymerisation während der viralen Inaktivierung zu vermeiden, werden Stabilisatoren zu der Immunglobulin-haltigen Lösung zugesetzt. Diese Stabilisatoren stabilisieren aber auch die kontaminierenden Viren vor Inaktivierung und schützen sie dadurch.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Behandlung und Prävention von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen bei einer Person, wie z. B. einem Patienten, bereitzustellen.

5 Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, ein Verfahren zur Behandlung und Prävention von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen bereitzustellen, in dem IgA einer Person verabreicht wird.

Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, ein Verfahren zur Behandlung und Prävention akuter und chronischer Entzündungsreaktionen bereitzustellen, in dem multimeren Formen von IgA einem Patienten verabreicht werden.

10 Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, eine IgA-haltige pharmazeutische Zusammensetzung in ihren verschiedenen Formen bereitzustellen, die für die Prävention und Behandlung von Entzündungsreaktionen geeignet ist.

Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, eine verbesserte Impfung durch Verabreichung von IgA zur Minimierung von Entzündungen bereitzustellen.

15 Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, einen Test zur Austestung entzündungshemmender Verbindungen bereitzustellen.

Es ist eine weitere erfindungsgemäße Aufgabe, eine Zusammensetzung zur Modulation von bestimmten Aspekten des Immunsystems, wie die Freisetzung bestimmter Zytokine, bereitzustellen.

20 Zur Lösung dieser und anderer Aufgaben wird ein Verfahren zur Prävention oder Behandlung von Entzündungsreaktionen bereitgestellt, das den Schritt der Verabreichung einer IgA-haltigen Zusammensetzung an eine Person, die einer solchen Therapie bedarf, inkludiert. Vorzugsweise enthält die Zusammensetzung multimeres IgA und ist im wesentlichen frei von IgG. Die Zusammensetzung ist ebenfalls im wesentlichen frei von lebensfähigen infektiösen Agenzien, wie Viren. Vorzugsweise werden kontaminierende Viren durch Hitzebehandlung inaktiviert. Andere Verbindungen, wie Antibiotika, antiphlogistische Mittel und
25 Antacida, können ebenfalls der Person verabreicht werden.

Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend multimeres IgA, bereitgestellt.

Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, die IgA enthält. Vorzugsweise enthält die Zusammensetzung multimeres IgA und ist im wesentlichen frei von IgG.
30 Die Zusammensetzung kann auch andere Verbindungen, wie Antibiotika, antiphlogistische Mittel und Antacida enthalten. Eine oder mehrere dieser Verbindungen kann Teil eines Kits zur Hemmung von Entzündungen sein. Der Kit zur Hemmung von Entzündungen sollte Anweisungen für die Verwendung der Zusammensetzung zur Prävention oder Behandlung von Entzündungsreaktionen enthalten. Die Anweisungen können Dosisangaben und Verabreichungswege umfassen.

35 Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt wird ein Verfahren zur Bewertung der entzündungshemmenden Aktivität einer Testsubstanz bereitgestellt, umfassend die Schritte der Inkubation von Zytokinproduzierenden Zellen in serumfreien Medien in Gegenwart von einem Entzündungsstimulus, wie z. B. Antigenen aus inaktivierten Bakterien (*Haemophilus influenzae*) und der Testsubstanz, und Bewerten der inkubierten Zellen nach ihrer Produktion von Zytokinen. Vorzugsweise sind die Zellen Monozyten, und die
40 bewerteten Zytokine umfassen TNF- α , TNF- β , IL-1 oder IL-6. Vorzugsweise werden die Ergebnisse mit der Zytokinproduktion einer Kontrolle verglichen, wie z. B. mit Monozyten, die einem Entzündungsstimulus ausgesetzt wurden, jedoch nicht der Testsubstanz.

Gemäß einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt wird ein Verfahren zur Impfung, umfassend die Verabreichung von IgA und ein Antigen, bereitgestellt. Die Verabreichung kann gleichzeitig oder hintereinander sein. Vorzugsweise umfaßt das IgA multimeres IgA und die Zusammensetzung ist im wesentlichen frei von IgG. Ein Adjuvans kann auch verabreicht werden. Eine oder mehrere dieser Verbindungen kann Teil eines Impfkits sein. Das Impfkit sollte Anweisungen zur Verwendung der Zusammensetzung für die Vermeidung oder Behandlung von Entzündungsreaktionen vor, während und nach der Impfung enthalten.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung, enthaltend IgA, zur
50 Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Prävention und/oder Linderung von Entzündungen sowie zur Immunmodulierung. Weiters betrifft die Erfindung die Verwendung einer Zusammensetzung, enthaltend IgA und ein Antigen, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation, insbesondere zur Herstellung eines Impfstoffes.

Alle Bestandteile und Zusammensetzungen sollten behandelt werden, um potentiell kontaminierende
55 pathogene Mikroben, wie blutübertragbare Viren, zu eliminieren oder inaktivieren. Andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der Erfindung gehen aus der folgenden Beschreibung, Tabellen und Figuren hervor.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt in graphischer Form, daß humanes Serum-IgA die durch Hämophilus influenza Typ B aktivierte TNF- α - und IL-6-Freisetzung in humanen Monozyten herabreguliert.

5 Fig. 2 zeigt in graphischer Form, daß humanes Serum-IgA die Hib-induzierte TNF- α - und IL-6-Freisetzung in humanen Monozyten herabreguliert, wogegen die GM-CSF-Produktion nach Hib-Stimulierung unverändert bleibt.

Fig. 3 zeigt in graphischer Form den Effekt von humanem Serum-IgA auf die TNF- α - und IL-6-Freisetzung in mit gereinigtem LPS-stimulierten Monozyten.

10 Fig. 4 zeigt in graphischer Form die Wirkung von multimerem (hitzeaggregierten) und monomerem IgA auf die Zytokinfreisetzung.

Fig. 5 zeigt in graphischer Form, daß humanes Serum-IgA die TNF- α - und IL-6-Freisetzung in humanen Monozyten herabreguliert, wogegen humanes Serum-IgG keinen Effekt hat.

15 Fig. 6 zeigt in graphischer Form die Bindung von IgA- und IgG-Antikörpern an Hämophilus influenza Typ B.

Fig. 7 zeigt in graphischer Form die Wirkung von humanem Serum-IgA auf die Zytokininduktion und die Zytokinfreisetzung in mit Hib stimulierten Monozyten.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

20 In Anbetracht der Folgen einer schädigenden Entzündung sind Mechanismen erforderlich, um die negativen lokalen und systemischen Folgeerscheinungen, die mit einer akuten und chronischen Entzündung einhergehen, zu verringern. Die Erfindung macht vorteilhaft von einer bislang unbekannten Eigenschaft von IgA Gebrauch, nämlich schädliche Entzündungsreaktionen zu verhindern oder zu behandeln. Diese Eigen-
 25 schaft unterscheidet sich vom bekannten Modell der Antikörperneutralisierung von spezifischen Fremddantigenen. Das Vorhandensein dieser Eigenschaft und die Nützlichkeit von IgA als entzündungshemmendes Mittel waren in Anbetracht der Erkenntnisse von Peeters et al., loc. cit und anderen überraschend.

Die Erfindung betrifft daher Zusammensetzungen und ein Verfahren zum Verhindern oder Behandeln akuter und chronischer Entzündungsreaktionen, wie generalisierte oder lokale Entzündungsreaktionen, mit
 30 einer wirksamen Menge von IgA, sowie die Verwendung dieser Zusammensetzungen zur Herstellung pharmazeutischer Präparationen.

Immunglobulin A kann prophylaktisch an Personen mit einem Entzündungsrisiko verabreicht werden. Diese Personen umfassen solche, die geimpft werden sollen, wie auch solche, die kürzlich geimpft wurden oder auf andere Weise entzündlichen Stimuli oder Zytokinen ausgesetzt sind. Die prophylaktische Verwen-
 35 dung von IgA sollte den Ausbruch schädlicher Entzündungsreaktionen verhindern oder minimieren.

Hinsichtlich der Prophylaxe sollte die Person IgA vor Exposition mit dem Entzündungsstimulus oder unmittelbar nach der Exposition damit erhalten. Z. B. sollte bei allergischen Erkrankungen, wie Rhinitis allergica, die Person vor Exposition mit Allergenen, wie Pollen, behandelt werden. Zusätzlich sollten Personen mit einem Risiko für Infektionen des oberen Atemwegtraktes mit damit einhergehenden Entzün-
 40 dungen IgA wiederholt während der kalten Jahreszeit erhalten.

Immunglobulin A kann auch an Personen verabreicht werden, die bereits an schädlichen Entzündungsreaktionen leiden. Entzündungsreaktionen können bei Personen, die von Bienen gestochen wurden, oder in anderer Weise Entzündungsstimuli ausgesetzt wurden, bekämpft werden. Hierbei sollte IgA die sich entwickelnden Entzündungsreaktionen heilen, mildern oder verringern.

45 Die Verabreichung von IgA kann lokal, oral oder systemisch erfolgen. Es ist bevorzugt, IgA in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zu verwenden, die im wesentlichen frei von IgG ist. Es ist auch bevorzugt, eine Zusammensetzung zu verwenden, die multimeres IgA enthält. Das Vorliegen von IgM sollte ebenfalls verringert oder ganz und gar vermieden werden.

Die Dosis hängt von der Route und der Häufigkeit der Verabreichung, wie auch dem Ausmaß und der
 50 Ursache der Entzündung ab. Wenn hohe Gesamtdosen von IgA verabreicht werden sollen, ist es oft bevorzugt, das IgA in mehreren kleineren Mengen im Verlauf eines Tages zu verabreichen. Diese Erwägungen hinsichtlich der Dosis und dem Verabreichungsweg können ohne weiteres vom Fachmann ermittelt werden.

Z. B. kann IgA oral (im allgemeinen 1 bis 10 g/Tag oder mehr in ernsten Fällen), vorzugsweise in drei
 55 oder mehr Dosen, die gleichzeitig mit einem Antacidium gegeben werden, verabreicht werden.

Zusätzlich kann IgA systemisch durch intravenöse Injektionen (durch Bolus, kontinuierliche Infusion oder beides) verabreicht werden. Typischerweise werden 50 bis 2000 mg IgA/kg/Tag verabreicht. In seltenen Fällen kann intramuskuläre Verabreichung im allgemeinen mit einer Dosis von ca. 50 bis 100 mg

IgA/kg/Tag erfolgen.

Immunglobulin A kann auch lokal verabreicht werden über Routen, wie Inhalation (bis zu 10 ml/Tag, 10 bis 100 mg IgA/ml; nasal: 50 bis 200 mg/ml durch Sprays oder Tropfen) oder durch intraartikuläre Injektion (wie erforderlich, 1 bis 5 ml von 10 bis 100 mg IgA/ml) verabreicht werden. Andere Routen
 5 umfassen Suppositorien (100 bis 1000 mg IgA/Dosis) und transdermale Pflaster. Transdermale Pflaster können zur Behandlung von Hautentzündungen (Psoriasis oder Akne) eingesetzt werden.

Bislang wurden die Wirkungen von IgA gegen Pathogene nur der Vermittlung von spezifischen Antikörpern zugeschrieben. Z. B. war bekannt, daß Antikörper bei der Inhibierung der mikrobiellen Anhaftung und der Neutralisation von Bakterientoxinen und Viruspartikeln beteiligt sind. Es war daher
 10 überraschend, einen allgemeinen entzündungshemmenden und immunmodulierenden Effekt von IgA zu entdecken. Im Gegensatz zur existierenden Hypothese über die Antisuperantigeneffekte bestimmter IgG-Antikörper, hat IgG keinen mit IgA vergleichbaren Effekt im Paralleltest. IgG erscheint tatsächlich eher die Entzündungsaktivität zu verstärken, was unerwünscht ist. Demnach ist es bevorzugt, IgA zu verwenden, das im wesentlichen frei von IgG ist.

15 Gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt die Prophylaxe und Therapie von Entzündungsreaktionen die Verabreichung von IgA einer Person, die es benötigt. Eine solche Person wäre eine, die für Entzündungen empfindlich ist oder tatsächlich an schädlichen entzündlichen Vorgängen leidet. Ein geeignetes Antibiotikum und/oder Antiphlogistikum kann einer solchen Person ebenfalls verabreicht werden. In einigen Fällen kann ebenfalls ein Antacidium enthalten sein. Eine oder mehrere dieser Bestandteile können
 20 zusammen mit geeigneten Gebrauchsanweisungen verpackt werden, die Dosierungs- und Verabreichungsvorschriften angeben. Vorzugsweise ist eine jede der Bestandteile im wesentlichen frei von IgG.

Die Aussage "im wesentlichen frei von IgG" bedeutet ein Maximum von 20 % IgG an der Gesamtmenge der Immunglobuline, vorzugsweise nicht mehr als 10 % IgG. Es ist ebenfalls bevorzugt, daß die Immunglobulinfraction praktisch frei von IgM ist (nicht mehr als 5 %, vorzugsweise nicht mehr als 3 %)
 25 Demnach ist es bevorzugt, das Vorliegen von IgG und IgM bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung zu minimieren oder zu eliminieren.

Das Verfahren und der entsprechende erfindungsgemäße Kit sind ebenfalls in Kombination mit einem Adjuvans geeignet. Diese Adjuvantien sind typischerweise inaktivierte Mikroorganismen oder Toxine, die zur Verstärkung der Immunantwort auf ein für die Impfung verwendetes Antigen eingesetzt werden. Die
 30 Verabreichung von IgA zusammen mit dem Adjuvans stellt sicher, daß die durch das Adjuvans induzierte unerwünschte Entzündung minimiert oder ganz und gar eliminiert wird.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt umfaßt eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens 5 %, vorzugsweise mindestens 10 %, multimeres IgA. Diese Zusammensetzung sollte im wesentlichen frei von polymerem IgG sein. "Im wesentlichen frei von polymerem IgG" bedeutet maximal 10
 35 % polymeres IgG, bezogen auf die Summe der Immunglobuline. Vorzugsweise enthält die Summe der Immunglobuline nicht mehr als 5 % polymeres IgG. Es ist auch bevorzugt, daß die Immunglobulinzusammensetzung, die multimeres IgA enthält, im wesentlichen frei von IgM ist.

Der Wunsch nach multimerem IgA beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß auch ein geringes Ausmaß an IgA-Polymerisation (z. B. durch Hitzeaggregation) den entzündungshemmenden Effekt von IgA
 40 verstärkt. Dieser Effekt von multimerem IgA ist in Anbetracht der bekannten gefährlichen Effekte von polymerem IgG unerwartet, das für nicht-spezifische und übermäßige antikomplementäre Aktivität verantwortlich ist. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung umfaßt vorzugsweise IgA als Hauptbestandteil, und ist wahlweise mindestens im wesentlichen frei von IgG ist. Es ist bevorzugt, das Vorliegen von IgG und IgM in seinen verschiedenen Formen zu minimieren oder zu eliminieren.

45 Die entzündungshemmende Potenz einer Substanz kann mit einem neuen und verlässlichen in-vitro-Test bestimmt werden. Der erfindungsgemäße Test umfaßt die Inkubation von Monozyten (einer Zytokinproduzierenden Zelle) in serumfreien Medien in Gegenwart einer zu testenden Substanz. Die Monozyten werden dann einem Entzündungsstimulus ausgesetzt, der typischerweise bewirken würde, daß die Monozyten Entzündungszytokine exprimieren. Die Menge der exprimierten Zytokine, wie TNF- α , TNF- β , IL-1 und
 50 IL-6 wird dann bestimmt. Durch Vergleich der Menge an exprimierten Zytokinen in den mit der Testsubstanz inkubierten Monozyten gegenüber einer Kontrolle, die in Abwesenheit der Testsubstanz durchgeführt wird, wird ein genauer Nachweis der entzündungshemmenden Aktivität der zu testenden Substanz erhalten. Lymphocyten und Granulocyten können in diesem Test ebenfalls verwendet werden.

Der im erfindungsgemäßen Test verwendete Entzündungsstimulus ist vorzugsweise ein inaktiviertes
 55 Bakterium, wie *Hämophilus Influenza*, oder ein Bestandteil davon. Anderer geeignete Stimuli umfassen E. coli LPS oder Meningokokken-Polyseccharide.

Der oben beschriebene neue Test hat gezeigt, daß IgA eine allgemeine entzündungshemmende Aktivität besitzt, die sich vom gut bekannten Modell der Antikörperfunktion unterscheidet. Diese entzün-

5 dungshemmende Aktivität kann auch durch die Inhibierung der Sauerstoffradikal-Freisetzung durch Monozyten und Granulocyten demonstriert werden. Die Freisetzung dieser Radikale bei einer Entzündungsreaktion führt zu einer wesentlichen Schädigung des Gewebes am Ort der Entzündung. Dieses Phänomen kennt man als "Respiratory burst", der in einem in-vitro-Modell unter Verwendung von Hib, inkubiert in Gegenwart
 10 von neutrophilen Granuloyten, gemessen werden kann. Die entzündungshemmende Aktivität kann auch durch Inhibierung der T-Lymphocytenaktivierung als Reaktion auf ein Superantigen (wie Staphylokokken-Enterotoxine, Toxin 1 des toxischen Schocksyndroms) oder Recall-Antigen (wie dem Tetanustoxoid) bestimmt werden.

12 Der entzündungshemmende Effekt von IgA beruht nicht nur auf dem Vorliegen von spezifischen neutralisierenden Antikörpern. Dies wurde gezeigt durch druchflußcytometrische Analyse unter Verwendung indirekter Immunfluoreszenz. Diese Analyse zeigt, daß IgA- und IgG-Zusammensetzungen vergleichbare Titer an Antikörpern enthalten, die Hib binden, aber nur IgA die TNF- α - und IL-6-Produktion verringern. Die IgG-Zusammensetzungen, die bei ähnlichen Konzentrationen in Parallelexperimenten geprüft wurden, haben keinen verringernenden Effekt auf die Hib-induzierte Zytokinfreisetzung.

15 Die fehlende Abhängigkeit des IgA-Effekts von einer spezifisch neutralisierenden Aktivität wird weiter in Untersuchungen deutlich, wo IgA-Antikörper mit Hib vor Zugabe der Mischung zu den Monozyten vorinkubiert wurden. Diese Vorinkubation erlaubt die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen. Die Inkubation von Hib mit IgA verstärkt jedoch nicht die Hemmung der Freisetzung der Entzündungszytokine.

20 Erfindungsgemäß inhibiert humanes Serum-IgA, das zum großen Teil monomer ist, die Monozyten-Zytokinfreisetzung. Hitzeaggregation, die IgA-Multimere bildet, verstärkt den inhibierenden Effekt von IgA auf die TNF- α -Freisetzung. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung enthält vorzugsweise multimeres IgA, das durch Erhitzen einer Zusammensetzung, die mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 % IgA enthält, in Lösung oder in lyophilisierter Form erhalten werden kann. Die Zusammensetzung sollte im wesentlichen frei von IgG sein und kein nachweisbares IgM enthalten. IgG und IgM
 25 können durch Radialimmundiffusion ("RID") nachgewiesen werden.

30 Vorzugsweise wird eine Plasmafraktion als Quelle für IgA verwendet. Z. B. kann eine IgA-Fraktion durch Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Chromatographie, hydrophile Chromatographie oder Affinitätschromatographie einer Plasmafraktion, wie der Cohn-III-Fraktion, erhalten werden. Dieses Verfahren hilft auch bei der Verminderung von möglicher viraler Infektivität, da Viren durch die Cohn-Fraktionierung
 35 inaktiviert und/oder entfernt werden.

Das Erhitzen kann bei 40 bis 70 °C, vorzugsweise 60 bis 65 °C für mehrere Minuten bis 24 Stunden, vorzugsweise 1 bis 10 Stunden durchgeführt werden. Um makroskopische Aggregate zu entfernen, kann die Fraktion zentrifugiert werden. Anschließend kann das Ausmaß der Multimerisierung durch Gelpermeationschromatographie oder andere übliche Verfahren überprüft werden. Die relative Menge an IgA-Multimeren
 40 kann durch Auswahl der geeigneten Temperatur und Zeit für den Erhitzungsprozeß eingestellt werden.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung sollte frei von antikomplementärer Aktivität sein. Dies wird erreicht durch Verringern des Gehalts an polymerem IgG. Antikomplementäre Aktivität einer Zusammensetzung kann nach einem Verfahren gemäß Kabat und Mayer, EXPERIMENTAL IMMUNOCHEMISTRY (Thomas, Springfield 1961) und Public Health Monograph Nr. 74: STANDARDIZED DIAGNOSTIC COMPLEMENT FIXATION METHOD AND ADOPTION TO MICROTTEST (Washington, 1965) (ch. 4, Complement and Complement Fixation) gemessen werden und entsprechend einem Wert eingestuft werden, gemäß dem mindestens 10 mg Protein notwendig sind für die Neutralisierung einer Einheit von C'H₅₀ (die 50 % hämolytische Einheit, definiert als Menge an Komplement, das für eine 50%ige Lyse erforderlich ist). Vorzugsweise sind mindestens 35 mg Protein für die Neutralisation einer C'H₅₀-Einheit
 45 erforderlich.

Da IgA, das einer Person verabreicht wird, typischerweise aus Blut oder verschiedenen Fraktionen davon gewonnen wird, sollte es behandelt werden, um potentiell kontaminierende Pathogene, wie z. B. Viren, zu eliminieren oder inaktivieren. Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blutprodukten sind in EP 0 159 311 und der US-Anmeldung, Serien Nr. 07/900 164 offenbart, deren gesamte Offenbarung hierdurch durch Bezug mit umfaßt ist. Andere Verfahren zur viralen Inaktivierung können ebenfalls eingesetzt werden. Virusinaktivierung ermöglicht IgA-Zusammensetzungen, die sicher in Bezug auf Übertragung von viralen Infektionen sind.

Wie oben erwähnt, können die erfindungsgemäßen IgA-Zusammensetzungen lokal oder systemisch verabreicht werden. Daher kann die IgA-haltige Zusammensetzung über orale, nasale, intravenöse, intraarterielle, intrakavitäre, intramuskuläre, subkutane, transdermale, rektale oder anderen Routen, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden.

Typischerweise wird IgA mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger kombiniert. Solche Träger umfassen wäßrige Lösungen, nicht-toxische Exzipienten, einschließlich Salze, Konservierungsstoffe, Puffer

und ähnliche, wie beschrieben in REMINGTON'S PHARMCEUTICAL SCIENCES, 15. Ausgabe, Herausgeber: Easton: Mack Publishing Co., S. 1405-1412 und 1461-1487 (1975) und THE NATIONAL FORMULARY XIV., 14. Ausgabe Washington: American Pharmaceutical Association (1975), deren Inhalt durch Bezugnahme mit umfaßt ist. Beispiele nicht-wäßriger Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliches Öl und injizierbare organische Ester wie Ethyloleat. Wäßrige Träger umfassen Wasser, alkoholische/wäßrige Lösungen, Salzlösungen, parenterale Vehikel wie Natriumchlorid, Ringer's-Dextrose, usw. Intravenöse Vehikel umfassen Flüssigkeits- und Nährersatzstoffe. Konservierungsstoffe umfassen antimikrobielle Mittel, Antioxidanzien, komplexbindende Mittel und inerte Gase. Der pH und die exakte Konzentration der verschiedenen Bestandteile der Bindungszusammensetzung wird gemäß Routineverfahren eingestellt.

10 Siehe GOODMAN UND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS (7. Ausgabe).

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern und die Erfindung in keiner Weise limitieren.

BEISPIEL 1 REINIGUNG VON HUMANEM SERUM-IgA

15 Gereinigte Zusammensetzungen von humanem Serum-IgA wurden durch Plasmafraktionierung hergestellt. Zunächst wurde IgA aus der Serum-Cohn-Fraktion-II von großen Plasmapools gemäß EP 0 506 651 gereinigt. Die IgA-angereicherte Zusammensetzung wurde dann unter Erhalt eines End-IgA-Produkts weiter gereinigt, das mehr als 95 % IgA und kein nachweisbares IgG oder IgM, wie durch Radialimmundiffusion

20 überprüft, enthielt. Eine IgG-Zusammensetzung zur Verwendung in Vergleichsuntersuchungen wurde in ähnlicher Weise aus der Cohn-II-Serumfraktion hergestellt (> 97 % Reinheit).

Beide Immunglobulinzusammensetzungen wurden in lyophilisierter Form bei 4°C gelagert, und alle Experimente wurden mit einer Charge der IgA- oder IgG-Zusammensetzung durchgeführt. Unmittelbar vor ihrer Verwendung in Zellkulturen wurden die Immunglobulinzusammensetzungen im RPMI-1640-Medium

25 (Flow Laboratories, Irvine, UK), ergänzt mit Penicillin (100 IE/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Glutamin (2 mM, Gibco, Paisley, Schottland) (RPMI suppl.), das 1 % handelsüblich erhältliches humanes Serumalbumin enthielt (Plasma-Protein-Fraktion-Human 3,5 % IMMUNO AG, Wien), gelöst. Dieses Medium ist als "RPMI-HSA" bekannt.

30 BEISPIEL II HERSTELLUNG VON MULTIMEREM IgA

Humanes Serum-IgA wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in RPMI-HSA gelöst und durch Erhitzen auf 63°C für 20 Minuten aggregiert. Dann wurde die Zusammensetzung bei 600 x g 10 Minuten zur Entfernung makroskopischer Aggregate zentrifugiert.

35 BEISPIEL III HERSTELLUNG VON HUMANEN MONOZYTENKULTUREN UND STIMULIERUNG DER CYTOKINFREISETZUNG

Humane mononukleare Zellen ("MNC") wurde aus heparinisiertem peripherem Blut (7,5 IE von Konservierungsmittel-freiem Heparin/ml) von gesunden Spendern durch flotierende Dichte-Gradienten-Zentrifugation mittels Lymphoprep (Nyegaard & Co, Oslo, Norwegen), gemäß dem Verfahren von Boyum A, Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 77 (1968) isoliert. Die Zellen aus der Zwischenphase wurden aufgesaugt und dreimal in 0,9 % NaCl gewaschen. Nach der letzten Waschstufe wurden die Zellen in einer Konzentrationen von 1×10^6 /ml RPMI suppl., enthaltend 10 % gepooltes, hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei

45 56°C) humanes AB-Serum oder 10%iges inaktiviertes fetales Kalbserum (FKS, Flow Laboratories) (komplettes Medium) resuspendiert.

Zur Herstellung von Monozytenkulturen wurden 1 ml Aliquots der MNC-Suspension auf 24-Well-Plastikgewebekulturplatten mit flachem Boden pipettiert (Falcon 3047 Multivell Tissue Culture Plate, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ). Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂ in angefeuchteter Luft) wurden die anhaftenden Monozyten dreimal mit Kochsalzlösung unter Entfernung nicht-anhaftender Zellen gewaschen. Die anhaftenden Zellen wurden dann weiter im kompletten Medium 24 Stunden zur Reduktion der nicht-spezifischen Hintergrund-Zytokinproduktion inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit 0,15 M NaCl gewaschen und die Zytokinfreisetzung wurde durch Zugabe von hitzeinaktiviertem kapselhaltigem Hib vom Stamm Eagan (Stock 2×10^9 Bakterien/ml,

55 Endkonzentration 1×10^6 Bakterien/ml) oder gereinigtem LPS (Lipopolysaccharid, hergestellt aus E. coli Serotyp 0111:B4 durch Phenolextraktion, erhalten von Sigma Chemicals Co., Sigma Nr. L-2630, Endkonzentration 1 ng/ml) zu den Zellkulturen induziert. 500 µl RPMI-HSA, das Hib (2×10^6 /ml) oder LPS (2 ng/ml) enthielt, wurden mit 0,5 ml IgA oder IgG in RPMI-HSA in Verdünnungen von 0,2 mg bis 20 mg/ml

vermischt. 1 ml dieser Mischung wurde zu einem Well der 24-Well-Plastikgewebekulturplatte zugegeben, das die anhaftenden Monozyten enthielt. In ausgewählten Experimenten wurde die Mischung von Bakterien und Immunglobulin 30 Minuten bei 37 °C vor Zugabe zu den Zellkulturen vorinkubiert. Monozytkulturen, die in Gegenwart von Hib allein, IgA oder IgG allein oder allein im Medium kultiviert wurden, dienten als

5 Kontrollen.

Nach Zugabe von Hib mit oder ohne Immunglobulin zu den Zellen wurden die anhaftenden Monozyten 24 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Die Zellüberstände wurden dann abgesaugt und bei 9000 x g 3 Minuten zur Entfernung von verunreinigendem Zellmaterial zentrifugiert. Dann wurde der Zytokingehalt bestimmt. Falls die Bestimmung des Zytokingehalts nicht am selben Tag durchgeführt

10 werden konnte, wurden die Überstände in Aliquots verteilt, die bei -20 °C eingefroren für einen maximalen Zeitraum von 3 Tagen aufgehoben wurden, bis die TNF- α - und IL-6-Konzentrationen gemessen wurden.

Zur Bestimmung der Anzahl der anhaftenden Zellen pro Well und der Reinheit der anhaftenden Monozyten nach 24-stündiger Stimulierung mit Hib wurden die anhaftenden Zellen sanft abgekratzt. Dann wurden die Zellen zentrifugiert und die Zellzahl wurde mit einem Coulter-Counter gemessen. In vier

15 Experimenten konnten $1,0 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen pro Well (Mittelwert $\pm$ SEM für vier Bestimmungen) nach 24-stündiger Hib-Stimulierung wiedergewonnen werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen (bestimmt durch Trypanblau-Exklusion) war $78 \pm 5,5$ %. Wie mittels Durchflußcytometrie unter Verwendung eines CD14-spezifischen monoklonalen Antikörpers (MO2, Coulter Immunology, Hialeah, FL) in direkter Immunfluoreszenz bestimmt, enthielten die anhaftenden Zellen $86 \pm 4,9$ % Monozyten.

20

BEISPIEL IV ÜBERPRÜFUNG DER CYTOKINFREISETZUNG IN MIT Hib VORBEHANDELTEN MONOCYTEN

Anstelle der 24-stündigen Stimulierung von anhaftenden Monozyten, wie oben beschrieben, wurden die

25 Zellen 3 Stunden mit Hib in Gegenwart von IgA (10 mg/ml) oder Hib allein stimuliert. Dann wurden die Monozytmonoschichten zweimal mit Kochsalzlösung unter Entfernung von freiem Hib gewaschen, und die Zellen anschließend 21 Stunden in frischem Medium, das IgA (10 mg/ml) enthielt, oder in frischem RPMI-HSA alleine (Mediumkontrolle) kultiviert. Dann wurden die Monozytenüberstände, wie oben beschrieben, gesammelt, und die Zytokinkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

30

BEISPIEL V MESSUNG VON TNF- α , IL-6 UND GM-CSF IN MONOCYTÜBERSTÄNDEN

TNF- α -, IL-6- und GM-CSF-Konzentrationen wurden in Monozytenüberständen, verdünnt 1:30 für TNF- α , 1:5 für IL-6 oder 1:2 für GM-CSF unter Verwendung handelsüblich erhältlicher ELISA-Kits bestimmt

35 (TNF- α -EASIA und IL-6-EASIA, Medgenix Diagnostics, Fleurus, Belgien und Quantikine Human GM-CSF Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN). Die in den TNF- α - und IL-6-Tests verwendeten, für das entsprechende Zytokin spezifischen monoklonalen Antikörper sind nicht neutralisierende Antikörper, die mit einem anderen Epitop auf dem Zytokinmolekül reagieren als der Rezeptorbindungsstelle. Folglich sollten die Ergebnisse aus diesen Tests nicht durch das Vorliegen löslicher Zytokinrezeptoren oder Inhibitoren

40 beeinflusst werden. Die Ergebnisse sind als pg/ml IL-6, TNF- α oder GM-CSF, angegeben.

Zur Bewertung der Wirkung von IgA oder IgG auf die Zytokinfreisetzung, wird die Immunglobulin-induzierte Inhibition als Prozentsatz der Kontrolle oder als Prozentinhibition (das ist 100 % - Prozentsatzkontrolle) ausgedrückt, relativ zur Zytokinfreisetzung, die bei Zellkulturen, die mit Hib allein in Abwesenheit von Immunglobulin (100 % positive Kontrolle) inkubiert wurden, beobachtet wird. Der Prozentsatz der

45 Kontrolle wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Kontrolle} = (X-I) / (C-B) \times 100$$

worin X die Zytokinkonzentration der experimentellen Probe (Monozyten plus Immunglobulin plus Hib oder LPS) ist, I ist die Zytokinkonzentration im Überstand der Monozyten, die in Gegenwart von Immunglobulin

50 allein inkubiert wurden, B ist die Hintergrund-Zytokinfreisetzung (Kultur von Monozyten allein) und C ist die Zytokinkonzentration, die von Monozyten, die in Gegenwart von Hib oder LPS ohne Immunglobulin inkubiert wurden (100 % Kontrolle) freigesetzt wurde.

55 BEISPIEL VI Wirkung von IgA auf die TNF- α - und IL-6-Freisetzung bei humanen Monozyten

Humane Monozyten setzen wesentliche Mengen von Entzündungszytokinen frei, wenn sie durch gram-negative Bakterien, wie Hib, stimuliert werden. Die Wirkung von IgA auf die Hib-induzierte Freisetzung von

TNF- α und IL-6 wurde untersucht.

Zunächst wurden humane Monozyten aus mononuklearen Zellen des peripheren Bluts durch Anhaftung an 24-Well-Plastikgewebekulturplatten isoliert (1×10^6 MNC/Well/ml komplettes Medium). Die anhaftenden Monozyten wurden 24 Stunden mit Hib (1×10^6 Bakterien/ml/Well) in RPMI-HSA, enthaltend humanes Serum IgA in den angegebenen Konzentrationen, stimuliert. Kontrollkulturen enthielten Monozyten, die in Gegenwart von Hib allein kultiviert wurden. Nach der 24-stündigen Inkubationsperiode wurden die TNF- α - und IL-6-Konzentrationen in den zellfreien Überständen durch ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als pg/ml (Mittel $\pm$ SEM von 8 Einzelexperimenten) ausgedrückt. Monozyten, die im Medium allein kultiviert wurden, setzten 18 ± 9 pg/ml TNF- α und 61 ± 9 pg/ml IL-6 frei. Die Hintergrund-Zytokinfreisetzung in den Kulturen, die nur IgA allein enthielten, war zwischen 31 ± 20 pg/ml (0,1 mg/ml) und 562 ± 263 pg/ml (10 mg/ml) für TNF- α und zwischen 255 ± 148 und 121 ± 82 pg/ml für IL-6.

Die in Fig. 1 angegebenen Daten zeigen, daß die Inkubation von Monozyten in Gegenwart von Hib (1×10^6 Bakterien/ml) unter serumfreien Bedingungen (in RPMI suppl, enthaltend 1 % HSA) die Freisetzung von signifikanten Mengen an TNF- α (43198 ± 6912 pg/ml) und IL-6 (10990 ± 669 pg/ml) induzierte. Ein Stern ("") bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen IgA-behandelten und Kontrollzellen ($p < 0,005$, Mann-Whitney-U-Test).

Zugabe von IgA in Endkonzentrationen von 0,1 bis 10 mg/ml zu Kulturen von Monozyten und Hib führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der Freisetzung von beiden Zytokinen (Fig. 1). Die IgA-induzierte Inhibierung der TNF- α -Freisetzung war maximal bei 3 mg/ml (%-Inhibierung, Mittelwert $\pm$ SEM von 8 Experimenten: TNF- α 65 ± 5 , statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kulturen mit Hib allein, $p = 0,001636$ beim Mann-Whitney-U-Test) und wurde durch Erhöhung der IgA-Konzentration auf 10 mg/ml nicht weiter verstärkt. Der Effekt von IgA auf die IL-6-Freisetzung war maximal bei 10 mg/ml (81 ± 5 % Inhibierung, $p = 0,000389$), jedoch konnte bei 3 mg/ml ebenfalls eine statistisch signifikante Inhibierung von 59 ± 9 % beobachtet werden ($p = 0,001161$).

Die IgA-induzierte Inhibierung der Zytokinfreisetzung erfolgte nicht aufgrund einer Verminderung der Anzahl von Monozyten in Kulturen oder eine Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen. Wie aus der folgenden Tabelle 1 entnommen werden kann, hatte die Zugabe von IgA (10 mg/ml) zu den Kulturen keine Auswirkung auf die Anzahl der Monozyten pro Well. Die Lebensfähigkeit der Zellen (bestimmt durch Trypanblau-Ausschluß) war ebenfalls unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß IgA einen spezifischen Effekt auf die Produktion und/oder Freisetzung der betreffenden Zytokine hat.

TABELLE 1

Monozytbehandlung	Zytokinfreisetzung	(pg/ml)	Zellen pro Well (10^5)	Monozyteinheit (%)
	TNF- α	IL-6		
Medium	33 ± 20	6 ± 6	$0,8 \pm 0,1$ ⁽¹⁾	$71 \pm 8,9$ ⁽²⁾
IgA ⁽³⁾	127 ± 55	14 ± 14	$1,3 \pm 0,4$	$78 \pm 7,9$
Hib	20553 ± 6272	5405 ± 1615	$1,0 \pm 0,3$	$86 \pm 4,9$
Hib + IgA	11645 ± 4860 ⁽⁴⁾	1313 ± 725 ⁽⁴⁾	$0,9 \pm 0,4$	$80 \pm 5,5$

Die Werte bedeuten den Mittelwert $\pm$ SEM von vier Experimenten.

(1) Die Zellanzahl wurde mit einem Coulter-Counter nach Ablösung der anhaftenden Zellen mit einem Gummiwischer bestimmt.

(2) Bestimmung mittels Durchflußcytometrie mit einem CD14 mAb in direkter Immunfluoreszenz nach Abkratzen der anhaftenden Zellen.

(3) Es wurde humanes Serum-IgA mit 10 mg/ml verwendet.

(4) Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Hib allein ($p = 0,0455$, Friedman chi-Quadrattest für Ränge).

Fig. 2 zeigt, daß humanes Serum-IgA die Hib-induzierte TNF- α - und IL-6-Freisetzung in humanen Monozyten verringert, jedoch keinen Effekt auf die GM-CSF-Produktion nach Hib-Stimulierung in diesem Modell hat. Zuerst wurden anhaftende Monozyten 24 Stunden mit Hib in Gegenwart oder Abwesenheit von IgA (10 mg/ml), wie in Fig. 1 von Experiment 1 erklärt, stimuliert. TNF- α -, IL-6- und GM-CSF-Konzentrationen wurden durch ELISA bestimmt, und die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (Mittelwert $\pm$ SEM von 8 Einzelexperimenten). Die Monozyten, kultiviert im Medium allein, setzten keine nachweisbaren Spiegel an GM-CSF frei, und nur in zwei der 8 Experimente wurde eine niedrige Hintergrund-GM-CSF-Freisetzung (unter 50 pg/ml) in IgA-haltigen Kulturen (10 mg/ml) ohne Hib nachgewiesen. Ein Stern ("") bedeutet einen

statistisch signifikanten Unterschied zwischen IgA-behandelten und Kontrollzellen ($p < 0,005$, Mann-Whitney-U-Test).

Auch hohe Konzentrationen von IgA (10 mg/ml) hatten keinen inhibierenden Effekt auf die GM-CSF-Freisetzung nach der Hib-Stimulierung, wogegen die TNF- α - und IL-6-Freisetzung, gemessen im gleichen Überstand, signifikant herabgesetzt war. Daher erfolgte die Verminderung der TNF- α - und IL-6-Freisetzung nicht aufgrund einer allgemein verringerten Fähigkeit der Monozyten zur Freisetzung von Zytokinen nach Stimulierung mit Hib.

Die Abnahme der in den Monozytenüberständen in Gegenwart von IgA gemessenen TNF- α - und IL-6-Konzentration erfolgte aufgrund einer echten Niedermulierung der Freisetzung von bestimmten Zytokinen und nicht aufgrund einer Inhibierung des Zytokinnachweises. Die in Tabelle 2 unten angegebenen Ergebnisse zeigen, daß Zusatz von bis zu 25 mg/ml an humanem Serum-IgA oder IgG zum Überstand von Hib-aktivierten Monozyten keinen signifikanten Effekt auf die Menge von nachgewiesenem TNF- α oder IL-6 hatte, welches eine mögliche Wechselwirkung von IgA- oder IgG-Antikörpern mit der Messung dieser Zytokine durch die verwendeten ELISA-Tests ausschließt.

TABELLE 2

Immunglobulin ⁽¹⁾	mg/ml	Zytokinfreisetzung (pg/ml) ⁽²⁾	
		TNF- α	IL-6
Keines	Keines	9412 $\pm$ 3108	3054 $\pm$ 1456
IgA	10	9218 $\pm$ 3674	2744 $\pm$ 1622
IgA	25	9187 $\pm$ 3579	2399 $\pm$ 1520
IgG	10	8599 $\pm$ 2781	2628 $\pm$ 1389
IgG	25	9033 $\pm$ 3339	2386 $\pm$ 1499

(1) IgG oder IgA verdünnt in RPMI-HSA oder RPMI-HSA allein wurde zu 24-Stunden-Überständen (verdünnt 1:3 in RPMI-HSA) von Hib-stimulierten Monozyten zugegeben.

(2) Werte bedeuten Mittelwert $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Darüber hinaus war die beobachtete IgA-induzierte Abnahme der TNF- α - und IL-6-Freisetzung kein Artefakt aufgrund der höheren Proteinkonzentration in IgA-haltigen Kulturen. Zugabe von äquivalenten Mengen von humanem Serumalbumin (HSA) zu den Kulturen, was zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml HSA führte, hatte keinen Effekt auf die Hib-induzierte Freisetzung dieser Zytokine. Die Ergebnisse waren wie folgt: (i) TNF- α -Freisetzung, pg/ml [% der Kontrolle] : HSA 10 mg/ml 18540 $\pm$ 5678, HSA 20 mg/ml 14922 $\pm$ 5040 [84 $\pm$ 8 %] und (ii) IL-6-Freisetzung, pg/ml: HSA 10 mg/ml 2426 $\pm$ 687, HSA 20 mg/ml 256 $\pm$ 766 [109 $\pm$ 10 %] (Mittelwert $\pm$ SEM von vier Experimenten).

Die IgA-vermittelte Inhibierung von Hib-induzierter TNF- α - und IL-6-Freisetzung wurde nicht durch Bewirkung einer Wechselwirkung von IgA mit Hib verstärkt. Die Daten zeigten, daß die Vorinkubation von Hib mit IgA (10 mg/ml) den Effekt nicht verstärkte (Prozent Inhibition der Zytokinfreisetzung, Mittelwert $\pm$ SEM: (1) IgA (10 mg/ml) und Hib zugesetzt zu den Zellen ohne Vorinkubation ($n = 8$): TNF- α 63 $\pm$ 7, IL-6 73 $\pm$ 11 und (2) Hib, vorinkubiert mit IgA für 30 Minuten bei 37°C vor Zugabe von Hib und IgA zu den Zellen ($n = 11$): TNF- α 59 $\pm$ 9, IL-6 51 $\pm$ 18).

Die in Fig. 3 angegebenen Experimente zeigen, daß IgA ebenfalls die TNF- α - und IL-6-Freisetzung als Reaktion auf Stimulierung mit einem löslichen Stimulus, LPS gereinigt aus *E. coli*, niederreguliert. Zunächst wurden die anhaftenden Monozyten 24 Stunden mit LPS (1 ng/ml) in RPMI-HSA, enthaltend humanes Serum IgA (0,1 mg/ml bis 10 mg/ml), stimuliert. Die Kontroll-Wells enthielten Monozyten und LPS, Monozyten und IgA oder Monozyten, die in RPMI-HSA allein kultiviert wurden. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde die TNF- α - und IL-6-Freisetzung in den zellfreien Überständen durch ELISA überprüft. Die Ergebnisse in Fig. 3 sind ausgedrückt als Prozentsatz der Kontrollzytokinfreisetzung (Zytokinfreisetzung durch mit LPS in Abwesenheit von IgA stimulierten Monozyten), berechnet wie oben beschrieben (Mittelwert $\pm$ SEM von sechs Experimenten). Die mit LPS stimulierten Kontrollzellen setzten 16657 $\pm$ 5536 pg/ml TNF- α und 1110 $\pm$ 294 pg/ml IL-6 frei.

Die Ergebnisse in Fig. 3 zeigen, daß die Dosisabhängigkeit der IgA-vermittelten Inhibierung vergleichbar für die TNF- α - und IL-6-Freisetzung war. (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks-Test des Unterschieds der Zytokinmengen (pg/ml) zwischen IgA-behandelten und Kontrollkulturen: * $p = 0,029586$, ** $p = 0,018016$.)

BEISPIEL VII WIRKUNG VON MULTIMEREM IgA AUF DIE Hib-INDUZIERTEN TNF- α - UND IL-6-FREISETZUNG

Die in Fig. 4 angegebenen Daten zeigen, daß der immunmodulierende Effekt von humanem Serum-IgA auf die TNF- α -Freisetzung deutlich verstärkt ist, falls IgA in multimerer Form vorliegt.

Aus peripheren mononukleären Blutzellen von gesunden erwachsenen Spendern isolierte humane Monozyten wurden in 24-Well-Plastikgewebepplatten kultiviert. Die anhaftenden Monozyten wurden in Gegenwart von Hib (1×10^5 Bakterien/ml/Well) und monomerem oder hitzeaggregiertem IgA (Endkonzentration 10 mg/ml) inkubiert. Die Kontrollkulturen wurden mit Monozyten und Hib allein kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die zellfreien Überstände gesammelt und die TNF- α - und IL-6-Konzentrationen durch ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als pg/ml ausgedruckt (Mittelwert $\pm$ SEM von 6 individuellen Experimenten).

In sechs Experimenten reduzierte monomeres IgA die TNF- α -Freisetzung um $48 \pm 9 \%$, wogegen die Inhibierung der TNF- α -Freisetzung durch multimeres IgA (hitzeaggregiert) in Parallelexperimenten $73 \pm 5 \%$ war (Mittelwert $\pm$ SEM, $n=6$, $p=0,018686$ im Vergleich zu %-Inhibierung durch monomeres IgA, Mann-Whitney-U-Test). Hitzeaggregation verstärkte leicht den inhibitorischen Effekt von IgA auf die IL-6-Freisetzung (%-Inhibierung, Mittelwert $\pm$ SEM: monomeres IgA $78 \pm 8 \%$, polymeres IgA $89 \pm 3 \%$).

BEISPIEL VIII INHIBIERUNGSSTUDIEN MIT IgA UND IgG

Fig. 5 zeigt, daß IgA deutlich die Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch anhaftende Monozyten nach Stimulierung mit Hib vermindert, IgG, in einer ähnlichen Konzentration hatte jedoch keinen Effekt auf die Zytokinfreisetzung. Zunächst wurden Monozyten aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durch Anhaftung an Plastik isoliert und in Gewebekulturplatten (ca. 1×10^5 anhaftende Monozyten/Well/ml) in Gegenwart von Hib (1×10^6 Bakterien/ml/Well) und IgA oder IgG (Endkonzentration 10 mg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die TNF- α - und IL-6-Spiegel wurden dann in zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (Mittelwert $\pm$ SEM von 8 Einzelexperimenten).

Die in Gegenwart von Hib ohne Immunglobulin kultivierten Monozyten dienen als positive Kontrolle, und Zellen, wurden in Medium allein ohne Hib kultiviert, um die Hintergrund-Zytokinfreisetzung zu bestimmen (TNF- α 202 ± 123 pg/ml, IL-6 15 ± 8 pg/ml). Die in Gegenwart von IgG (10 mg/ml) allein kultivierten Monozyten setzten 449 ± 182 pg/ml TNF- α und 9 ± 5 pg/ml IL-6 frei; die Überstände von Zellen, die mit IgA allein (10 mg/ml) behandelt waren, enthielten 721 ± 244 pg/ml TNF- α und 6 ± 2 pg/ml IL-6. Die statistische Bewertung des Unterschieds zwischen der Zytokinfreisetzung in Gegenwart von IgA oder IgG im Vergleich zu Zellen, die nur in Gegenwart von Hib kultiviert wurden, erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests: * $p=0,004326$, ** $p=0,001638$.

BEISPIEL IX BINDUNG VON IgA UND IgG AN Hib

Da nur IgA und nicht IgG die Hib-induzierte Zytokinfreisetzung niederregulierte, wurde die Bindung von IgA- und IgG-Zusammensetzungen an Hib untersucht. Zunächst wurde Hib mit verschiedenen Verdünnungen von gereinigtem humanem Serum-IgA oder IgG inkubiert. Die Bindung von IgA- und IgG-Antikörpern wurde dann durch indirekte Immunfluoreszenz gemessen und mit einem Zytofluorograph ausgewertet. Die Mediumkontrolle repräsentiert die Färbung der Bakterien nur mit FITC-konjugiertem Anti-IgA- oder Anti-IgG-Reagens.

Die in Fig. 6 gezeigten repräsentativen FACS-Histogramme zeigen, daß sowohl IgA- als auch IgG-Antikörper an Hib binden, und semiquantitative Bestimmungen zeigen, daß beide Zusammensetzungen vergleichbare Titer an Hib-spezifischen Antikörpern enthielten.

BEISPIEL X WIRKUNG VON HUMANEM SERUM IgA AUF DIE CYTOKININDUKTION UND CYTOKINFREISETZUNG VON Hib-STIMULIERTEN MONOCYTEN

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für den inhibierenden Effekt von IgA auf die Hib-induzierte TNF- α - und IL-6-Freisetzung. Z. B. könnte IgA die Hib-induzierte Stimulierung der Zytokinfreisetzung durch Blockade der Bindung von Hib an die Monozytenoberfläche stören. Dies würde zu einer erniedrigten Zytokinfreisetzung führen. Die IgA-vermittelte Verringerung der Hib-induzierten TNF- α - und IL-6-Freisetzung könnte aber auch das Ergebnis einer echten Herabregulierung der Zytokinproduktion und/oder Zytokinfreisetzung in Hib-stimulierten Monozyten sein.

Die folgende Untersuchung erfolgte, um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der entzündungshemmenden Mechanismen von IgA zu gewinnen. Humane Monozyten wurden aus peripheren Blut-mononukleären Zellen

("MNC") durch Anhaftung an 24-Well-Plastikgewebeplatten (1×10^6 MNC/ml/Well) isoliert. Die Monozytenkulturen wurden 3 Stunden mit Hib (1×10^6 Bakterien/ml/Well) in RPMI-HSA, enthaltend 10 mg/ml IgA, stimuliert. Die anhaftenden Monozyten wurden dann zweimal gewaschen, um allen Hib zu entfernen, und weitere 21 Stunden in frischem Medium (RPMI-HSA), enthaltend 10 mg/ml humanes IgA (Hib + IgA $\rightarrow$ IgA) oder nur in frischem RPMI-HSA allein (Hib + IgA $\rightarrow$ Med.) inkubiert. Parallelkulturen wurden 3 Stunden mit Hib stimuliert, gewaschen, und dann 10 mg/ml IgA während der folgenden 21-stündigen Inkubationsperiode ausgesetzt (Hib $\rightarrow$ IgA). Die zellfreien Überstände wurden nach 21-stündiger Inkubation, die der 3-stündigen Hib-Stimulierung folgte, gesammelt, und die TNF- α - und IL-6-Konzentrationen wurden durch ELISA bestimmt. Kontrollzellen wurden 3 Stunden mit Hib stimuliert, dann gewaschen und 21 Stunden in RPMI-HSA ohne IgA (Hib $\rightarrow$ Med.) kultiviert. Diese Zellen setzten 4939 ± 1588 pg/ml TNF- α und 1626 ± 728 pg/ml IL-6 frei. Die Zytokinfreisetzung in IgA-behandelten Zellen ist als Prozentsatz dieser Kontroll-Zytokinfreisetzung, berechnet wie oben beschrieben, ausgedrückt (Mittelwert $\pm$ SEM von 4 Einzelexperimenten). Überstände von zusätzlichen Wells, die nicht mit Hib behandelt worden waren, die aber den entsprechenden Medien-austausch hatten, und nur mit IgA oder Medium allein behandelt wurden, enthielten 65 ± 54 (Med. $\rightarrow$ IgA) und 113 ± 38 (IgA $\rightarrow$ IgA) pg/ml TNF- α und zwischen 8 ± 8 (IgA $\rightarrow$ Med.) und 21 ± 14 (Med. $\rightarrow$ IgA) pg/ml IL-6.

Überstände, die unmittelbar nach der 3-stündigen Stimulierung mit Hib gesammelt wurden, enthielten nur sehr geringe Mengen an TNF- α (502 ± 178 pg/ml) und IL-6 (288 ± 124 pg/ml, Mittelwert $\pm$ SEM von drei Experimenten), wogegen in den Zellüberständen nach einer 21-stündigen Inkubation anschließend an die 3-stündige Stimulierung mit Hib (nachdem der Stimulus durch extensives Waschen entfernt worden war) 2285 ± 463 pg/ml TNF- α und 1900 ± 953 pg/ml IL-6 enthalten waren, was darauf hinwies, daß 88 ± 3 % des gesamten TNF- α und 86 ± 3 % des gesamten IL-6, das während der 3-stündigen Stimulierung mit Hib induziert wird, während der 21 Stunden nach der Stimulierung freigesetzt wird. Kontinuierliche Stimulierung mit Hib für 24 Stunden führte in Parallelkulturen zu 2- bis 3-fach höheren Mengen an TNF- α (12849 ± 2904 pg/ml) und IL-6 (4278 ± 766 pg/ml) im Vergleich zu den Mengen dieser Zytokine in den 21-Stunden-Kulturen von 3 Stunden Hib-vorbehandelten Monozyten.

Wie in Fig. 7 gezeigt, produzierten 3 Stunden mit Hib-stimulierte Monozyten deutlich verminderte Mengen an TNF- α und IL-6, wenn IgA (10 mg/ml) zum System während des Zeitpunkts der Zytokinfreisetzung zugesetzt wurde, nachdem Hib durch extensives Waschen entfernt worden war (Hib $\rightarrow$ IgA). Zusätzlich verminderte zu den Zellkulturen während der 3-stündigen Hib-Stimulierung zugesetztes IgA die TNF- α - und IL-6-Freisetzung während der 21 Stunden nach der Stimulierung, nachdem sowohl IgA als auch Stimulus durch extensives Waschen (Hib + IgA $\rightarrow$ Med.) entfernt worden waren.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß IgA sowohl die Induktion der Zytokinproduktion als auch die Zytokinfreisetzung herabmoduliert. Falls IgA sowohl während der Zytokininduktion (den ersten drei Stunden) wie auch der Zytokinfreisetzung in Abwesenheit des Stimulus (den folgenden 21 Stunden) in den Kulturen enthalten war, war der inhibierende Effekt auf die TNF- α - und IL-6-Freisetzung maximal (Hib + IgA $\rightarrow$ IgA).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß IgA die Freisetzung von TNF- α und IL-6 in mit dem bestimmten Stimulus Hib aktivierten humanen Monozyten herabreguliert. Die TNF- α - und IL-6-Freisetzung wird niederreguliert, wenn IgA während der kontinuierlichen Stimulierung von Monozyten mit Hib in den Kulturen enthalten ist. IgA inhibiert die Freisetzung von TNF- α und IL-6 auch, wenn es nur während der Phase der Zytokininduktion vorliegt. Zusätzlich ist IgA inhibierend, falls es zu Hib-vorbehandelten Monozyten nach der Induktion der Zytokinproduktion während der Phase der Zytokinfreisetzung zugesetzt wird, nachdem der Stimulus durch extensives Waschen entfernt worden war. Wenn IgA sowohl während der Zytokininduktion als auch während der Zytokinfreisetzung in den Zellkulturen enthalten war, ist die IgA-vermittelte Herabregulierung der TNF- α - und IL-6-Produktion maximal. Dies bedeutet in hohem Maße nicht nur einen präventiven Effekt von IgA auf Entzündungsreaktionen, sondern auch einen therapeutischen Effekt. Das Wissen über den vermutlichen Wirkungsmechanismus von IgA, wie oben beschrieben, oder die exakte Richtigkeit desselben ist jedoch nicht für die Ausführung der vorliegenden Erfindung notwendig.

Es ist selbstverständlich, daß die Beschreibung, Tabellen, Figuren und spezifische Beispiele, die nur die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wiedergeben, zur Erläuterung dienen und nicht zur Einschränkung der Erfindung beabsichtigt sind. Verschiedene Abweichungen und Modifikationen innerhalb Idee und Umfang der Erfindung sind dem Fachmann aus der Diskussion und den hierin enthaltenen Daten offensichtlich.

55 Patentansprüche

1. Verwendung einer Zusammensetzung, enthaltend IgA, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Prävention von Entzündung.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von IgG ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin das IgA multimeres IgA enthält.
- 5 4. Verwendung nach Anspruch 3, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von polymerem IgG ist.
- 10 5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei zusätzlich eine pharmazeutische Präparation enthaltend eine Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Antibiotika, Antiphlogistika und Antacida, bereitgestellt wird.
6. Verwendung einer Zusammensetzung, enthaltend IgA, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Linderung von Entzündungen.
- 15 7. Verwendung nach Anspruch 6, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von IgG ist.
8. Verwendung nach Anspruch 6, worin das IgA multimeres IgA umfaßt.
- 20 9. Verwendung nach Anspruch 8, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von polymerem IgG ist.
10. Verwendung nach Anspruch 6, wobei zusätzlich eine pharmazeutische Präparation enthaltend eine Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Antibiotika, Antiphlogistika und Antacida, bereitgestellt wird.
- 25 11. Kit zur Hemmung von Entzündungen enthaltend:
eine Zusammensetzung, enthaltend IgA in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und Anweisungen zur Verabreichung von IgA zur Prävention oder Behandlung von einer Entzündung.
- 30 12. Kit zur Hemmung von Entzündungen nach Anspruch 11, worin das IgA multimeres IgA enthält.
13. Kit zur Hemmung von Entzündungen nach Anspruch 11, worin die Zusammensetzung ferner eine Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe der Antibiotika, Antiphlogistika und Antacida, enthält.
- 35 14. Entzündungshemmende Zusammensetzung, umfassend multimeres IgA, die im wesentlichen frei von IgG ist.
15. Kit zur Hemmung von Entzündungen nach Anspruch 11, worin die Zusammensetzung sicher im Hinblick auf die Übertragung viraler Erreger ist.
- 40 16. Verfahren zur Bestimmung der entzündungshemmenden Aktivität einer Testsubstanz, umfassend die Schritte:
Inkubieren von Zytokin-produzierenden Zellen in Gegenwart eines Entzündungsstimulus und der Testsubstanz; und Bewerten dieser Zellen hinsichtlich ihrer Produktion von Zytokinen.
- 45 17. Verwendung einer Zusammensetzung, welche IgA und ein Antigen umfaßt, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation, insbesondere zur Herstellung eines Impfstoffes.
18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei weiters eine pharmazeutische Präparation enthaltend ein Adjuvans bereitgestellt wird.
- 50 19. Verwendung nach Anspruch 17, worin das IgA multimeres IgA enthält.
20. Verwendung nach Anspruch 19, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von IgG ist.
- 55 21. Impfzusammensetzung, enthaltend ein Antigen und IgA.
22. Impfzusammensetzung nach Anspruch 21, worin das IgA multimeres IgA enthält.

23. Impfzusammensetzung nach Anspruch 21, worin die Zusammensetzung im wesentlichen frei von IgG ist.
24. Impfpräparation nach Anspruch 21, die ferner ein Adjuvans enthält.
- 5 25. Verwendung einer Zusammensetzung, enthaltend IgA, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Immunmodulierung.
26. Verwendung nach Anspruch 25, worin das IgA multimeres IgA enthält.
- 10 27. Immunmodulationskit umfassend:
eine Zusammensetzung, enthaltend IgA in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und Anweisungen zum Verabreichen von IgA zur Bewirkung der Immunmodulation.
- 15 28. Immunmodulationskit nach Anspruch 27, worin das IgA multimeres IgA enthält.

Hiezu 7 Blatt Zeichnungen

20

25

30

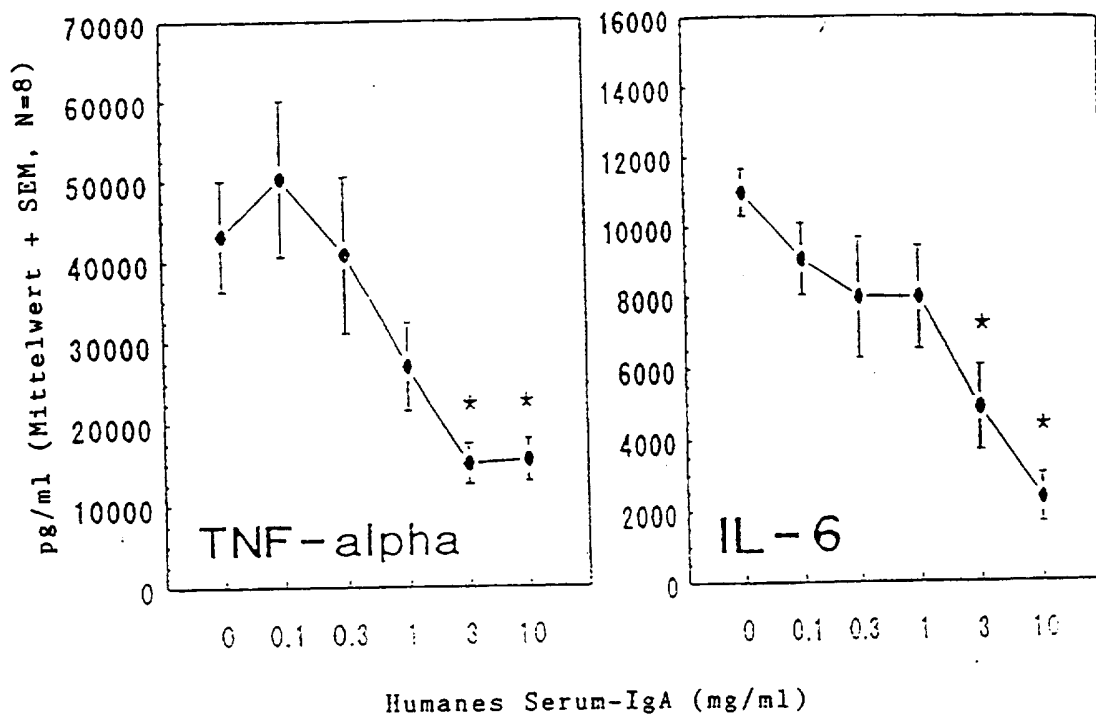
35

40

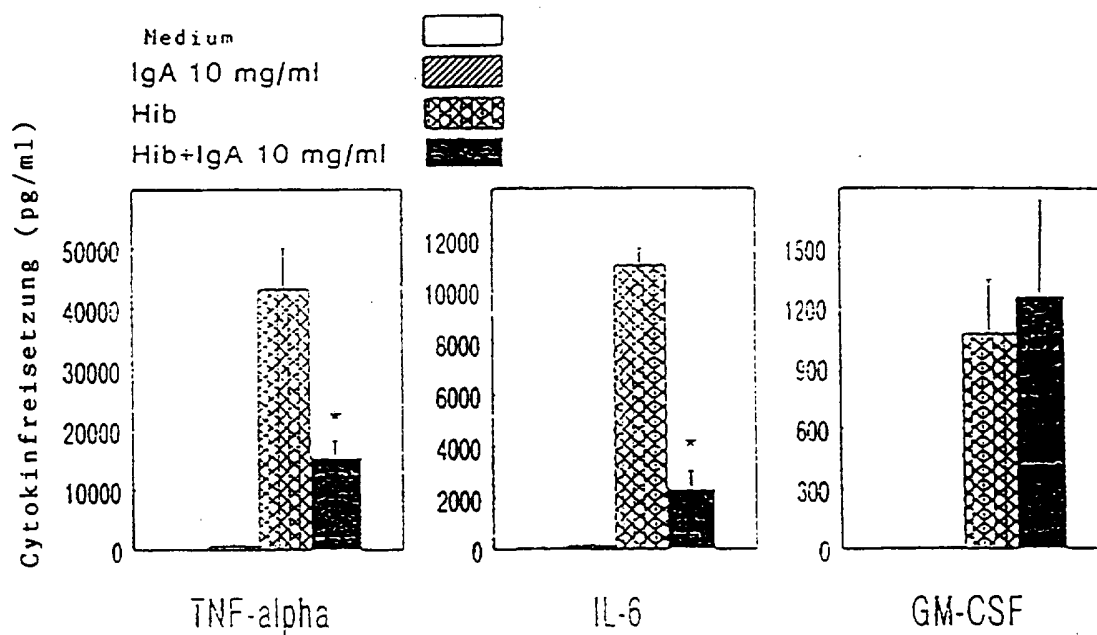
45

50

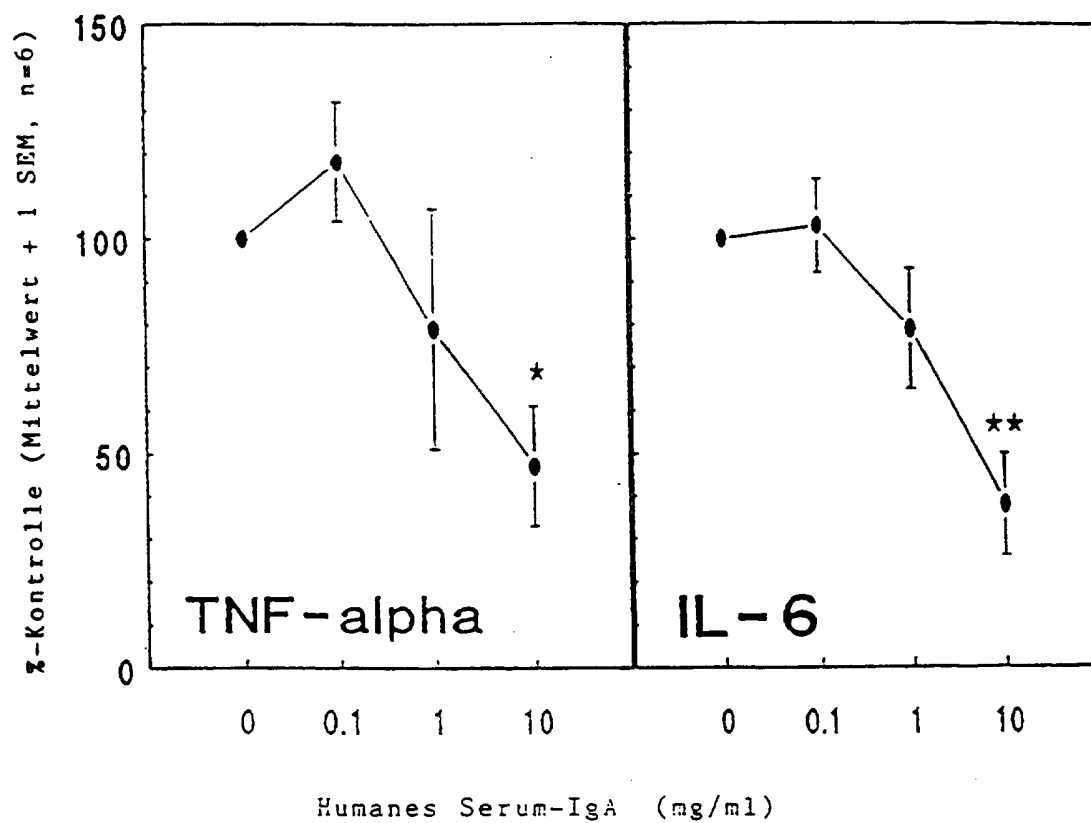
55



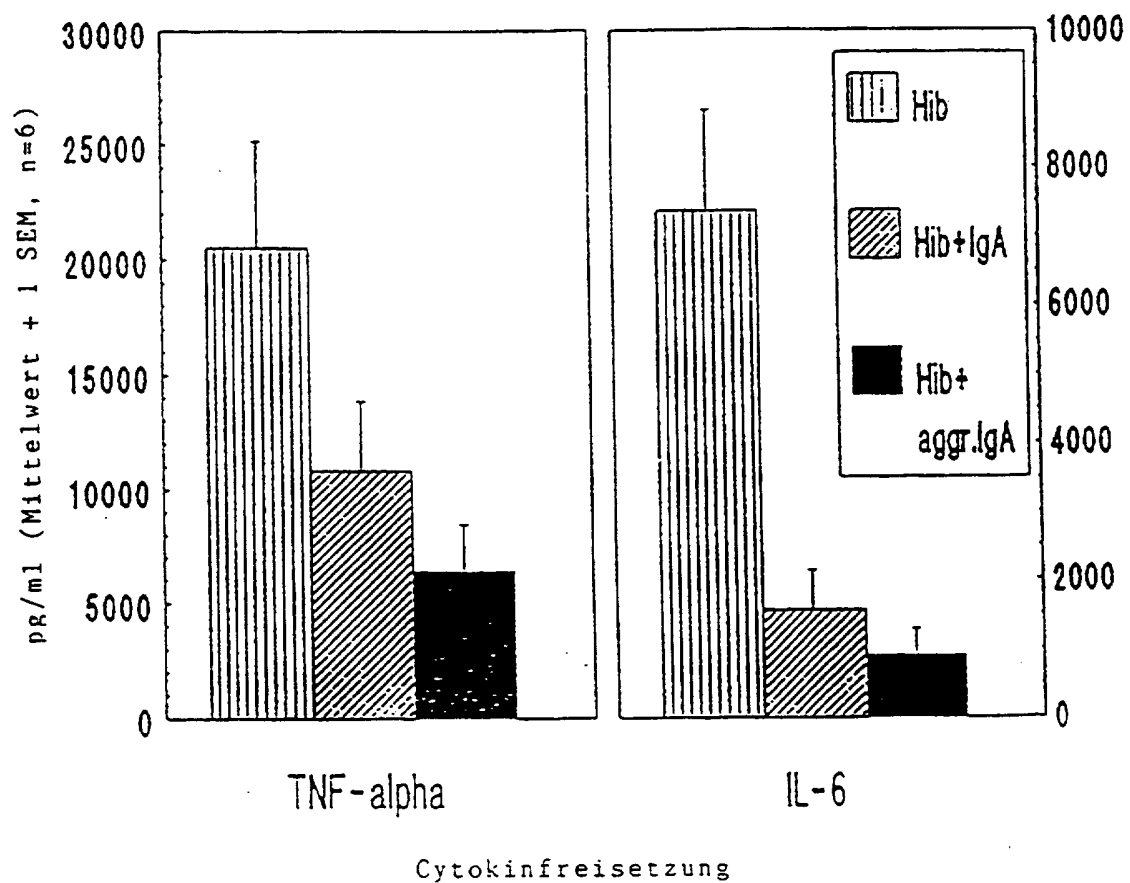
FIGUR 1



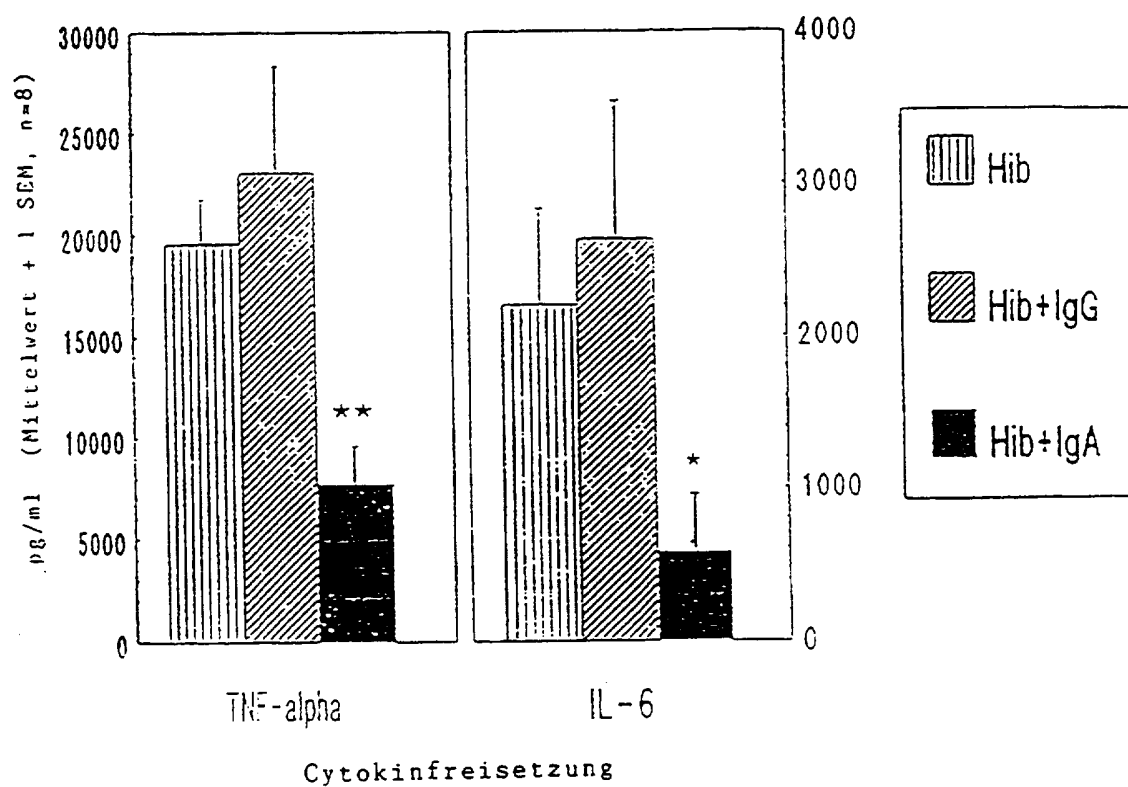
FIGUR 2



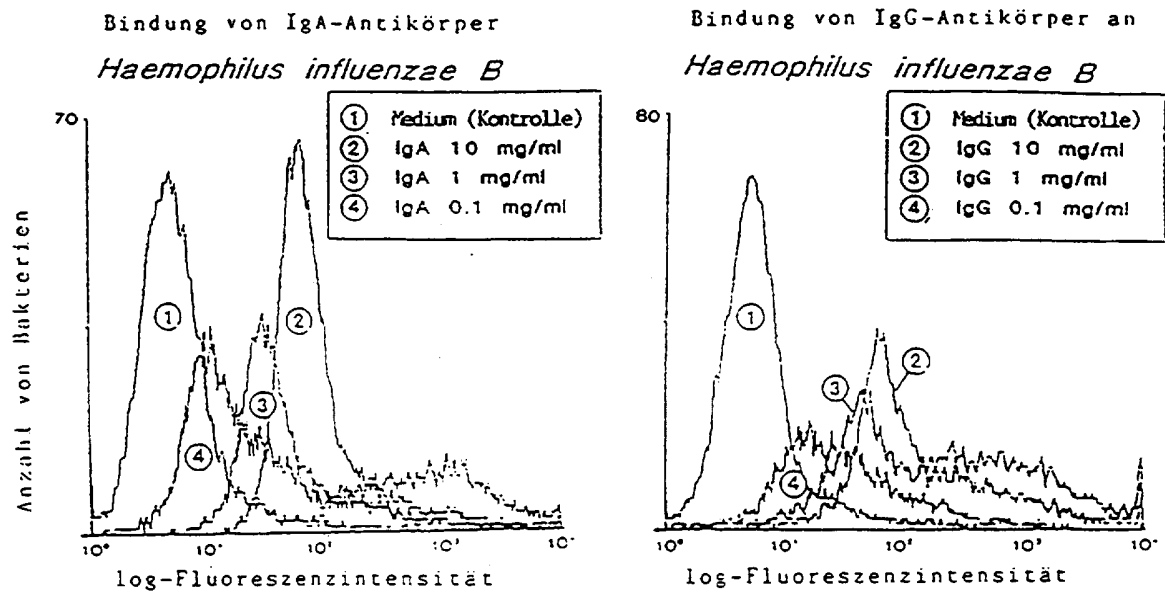
FIGUR 3



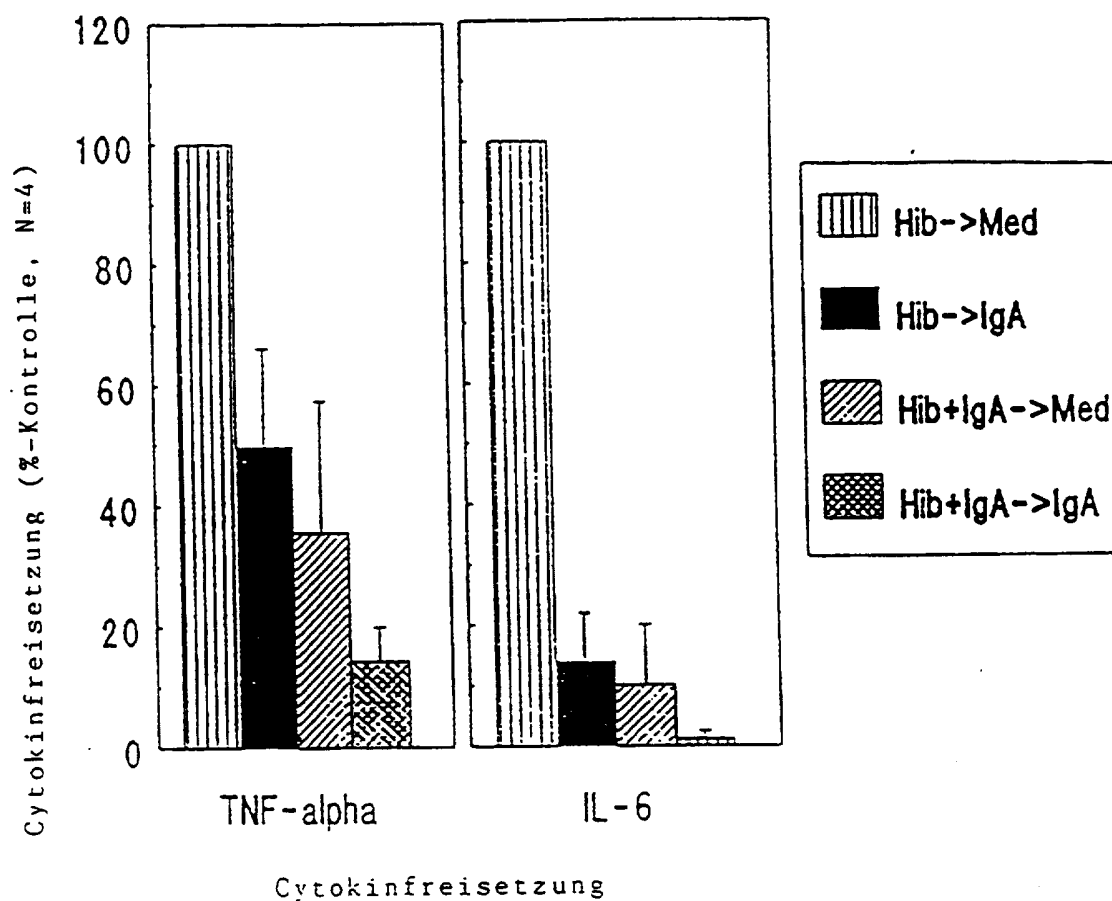
FIGUR 4



FIGUR 5



FIGUR 6



FIGUR 7