



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

AT 392 003 B

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 61/88

(51) Int.Cl.⁵ : A61K 35/14

(22) Anmeldetag: 13. 1.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1990

(45) Ausgabetag: 10. 1.1991

(56) Entgegenhaltungen:

FR-PS1459501 DE-OS3115761 US-PS4511557

(73) Patentinhaber:

GEBRO BROSCHEK KG. PHARMAZEUTISCHE FABRIK
A-6391 FIEBERBRUNN, TIROL (AT).

(72) Erfinder:

HANTICH GERHARD DR.
KITZBÜHEL, TIROL (AT).
KRENAUER JOHANNA ING.
FIEBERBRUNN, TIROL (AT).
EISENREICH VOLKER DR.
FIEBERBRUNN, TIROL (AT).
HESSE ERNST DR.
FIEBERBRUNN, TIROL (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES INSBESONDERE ZUR WUNDHEILUNG ODER ZUR BEHANDLUNG IN DER GERIATRIE VERWENDBAREN WIRKSTOFFES AUS SÄUGETIERBLUT DURCH PAPAINHYDROLYSE UND EIN EINEN SOLCHEN WIRKSTOFF ENTHALTENDES PRÄPARAT

(57) Ein Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven Wirkstoffes insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung cerebralvaskulärer Insuffizienz verwendet das defibrinierte Blut junger Rinder oder Kälber, das einer enzymatischen Papainhydrolyse bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,4 unterworfen wird. Die Reaktion wird mit kaltem Wasser gestoppt, wonach eine Ultrafiltration bis 10.000 D durchgeführt wird. Dann wird das Filtrat eingeengt, mit Alkohol versetzt, mindestens 24 Stunden gekühlt stehengelassen und klarfiltriert. Die erhaltenen Präparate haben erheblich verbesserte wundheilende und geriatrische Wirkungen.

AT 392 003 B

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch aktiven, insbesondere zur Wundheilung oder zur Behandlung in der Geriatrie verwendbaren Wirkstoffes bei welchem defibriniertes Blut von warmblütigen Säugetieren, insbesondere von jungen Rindern oder Kälbern, einer enzymatischen Hydrolyse mit Papain unterworfen, filtriert, das Permeat eingengt und mit Alkohol, vorzugsweise Äthanol, behandelt wird.

Seit vielen Jahren sind zahlreiche Verfahren bekannt, um aus Blut bzw. Blutfraktionen oder aus Organhomogenisaten von Säugetieren oder Menschen Präparate mit wundheilenden, zellatmungsaktiven bzw. stoffwechsel- und wachstumsfördernden Eigenschaften zu extrahieren. Vielfach war die genaue Zusammensetzung dieser Präparate weitgehend ungeklärt, doch hatte sich die Wirkung derselben zur Behandlung schlecht heilender Wunden, wie von Verbrennungen, Ulcus cruris u. dgl., oder zur Verbesserung der Cerebraldurchblutung als günstig erwiesen.

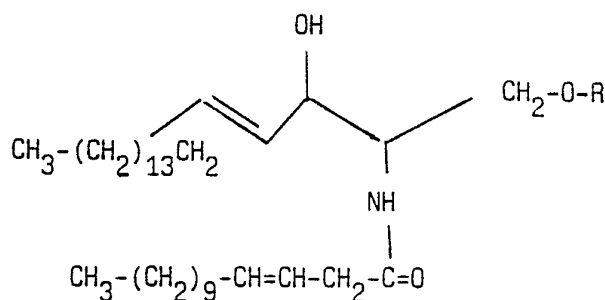
Ein gemeinsames Merkmal der Herstellungsverfahren dieser Präparate besteht meist darin, defibriniertes, häufig auch hämolysiertes Blut von in der Regel jungen Schlachttieren, vor allem Kälbern, jungen Rindern oder Pferden, auf übliche Weise von Zellsubstanzen, Mineralstoffen und/oder Eiweiß zu befreien und die Extrakte als ganzes oder Fraktionen derselben einzuengen und als Wirkstoffpräparate zu formulieren. Die Enteiweißung oder Deproteinisierung erfolgt bei den bekannten Verfahren durch Erhitzen oder Zentrifugieren oder Filtrieren oder aber durch Einwirkung von Säuren oder Alkoholen und anschließende Zentrifugation und/oder Filtration der ausgefällten Proteine.

Eine Deproteinisierung durch Erhitzen und anschließende Filtration mit Hilfe eines Membrantrennverfahrens wird in der EP-A 95 170 beschrieben, wobei als Membrantrennverfahren eine kontinuierliche mehrstufige Ultrafiltration unter Verwendung von Membranen mit einer Molekularausschlußgrenze von über etwa 8000 Dalton angewendet und die teilweise Abtrennung der anorganischen Salze durch Elektrodialyse mit Membranen einer Durchlässigkeit bis zu etwa 300 Dalton durchgeführt wird.

Die EP-A 140 134 beschreibt ein ähnliches Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven Extraktes aus Organen von Säugetieren und aus Zellkulturen, bei welchem das Ausgangsmaterial unter Aufschluß der Zellen zerkleinert, rasch auf eine Temperatur von 70 bis 90° erhitzt, abgekühlt, zentrifugiert, aus der erhaltenen Lösung durch Ultrafiltration die Substanzen mit einem Molekulargewicht von über 10 000 D entfernt und der verbleibenden Lösung durch Elektrodialyse die Salzionen entzogen werden. Als Beispiele für das Ausgangsmaterial für dieses Verfahren werden Thymus, Milz, Leber und andere Organe, aber auch das Blut von Säugetieren, erwähnt.

Aus der AT-PS 274 240 ist es bekannt, hämolysierte Blutkörperchen vom Blut junger Säugetiere, gegebenenfalls nach vollständiger Trocknung oder teilweiser Einengung auf höheren Trockenmassegehalt, mittels Ionenaustauscherverfahren, Absorptionschromatographie, Hochspannungselektrophorese, Hochspannungsdialyse, Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie oder Gegenstromverteilung in Fraktionen aufzutrennen, von denen diejenige mit einem UV-Maximum bei 245 bis 246 m μ zur Isolierung des Wirkstoffs herangezogen wird. Die wahlweise vor der Fraktionstrennung vorgenommene Einengung oder Trocknung kann beispielsweise durch Ultrafiltration oder durch Sprühtrocknung erfolgen.

Schließlich ist es noch aus der EP-A 38 511 bekannt, daß es sich bei biologisch aktiven, zur Wundheilung verwendbaren Substanzen, die aus Organen oder Körperflüssigkeiten von Säugetieren gewonnen werden, um Glykosphingolipide folgender Formel handelt:



worin R ein Oligosaccharid ist, welches 5 Zuckergruppen hat. Hierbei wird diese aktive Komponente durch Homogenisieren des Gewebes oder der Körperflüssigkeit des Säugers mit einer wässrigen 0,2 %-igen NaCl-Lösung, Zentrifugieren oder Filtrieren dieses Homogenisats, Ultrafiltration des erhaltenen Filtrats, Einengen des Permeats, Binden des organischen Materials aus dem konzentrierten Permeat an Aktivkohle, Desorption, Reinigung desselben durch mehrfaches Chromatographieren und Elution dieser organischen Stoffe gewonnen.

Parallel zu dieser Entwicklung gibt es eine Reihe von Verfahren, bei denen zur Herstellung des biologisch aktiven Wirkstoffs das defibrinierte und gegebenenfalls hämolysierte Blut vor jeder weiteren Behandlung enzymatisch hydrolysiert, d. h. einer Verdauung mit einem proteolytischen Enzym unterworfen wird. Proteinabbau-Produkte, die dann in die endgültigen Präparate eingehen, scheinen die Wirksamkeit der erhaltenen

5 Produkte zu fördern und zu verbessern.

Nach der US-PS 2 912 359 wird defibriniertes und hämolysiertes Blut mit proteolytischen Enzymen unter Erwärmen vorverdaut, nach dem Abkühlen zur Entsalzung dialysiert, angesäuert und der dabei erhaltene Niederschlag, der mit Lauge neutral gestellt wird, als Wirkstoff gewonnen.

10 Nach der DE-PS 1 076 888 wird defibriniertes Blut junger Schlachttiere fermentativ abgebaut und/oder nach einer fraktionierten Deproteinisierung mit aliphatischen Alkoholen oder Säuren zur Abtrennung der höhermolekularen Bestandteile einer Dialyse mit Wasser bzw. Alkoholen unterworfen. Das Dialysat wird, wenn nötig, von den organischen Lösungsmitteln befreit und schonend eingengt.

15 In der DE-OS 2 349 186 wird vorgeschlagen, das nach der obigen DE-PS 1 076 888 erhaltene Präparat mit einem physiologisch verwendbaren Säureadditionssalz von Heptaminol-(6-Amino-2-methylheptan-2-ol) zu versetzen, um die Wirkung des Präparates zu potenzieren.

Es ist auch ein Verfahren der eingangs geschilderten Art bekannt (DE-OS 1 949 195) bei welchem die enzymatische Verdauung bei einem pH-Wert von 5 bis 5,5 vorgenommen wird, worauf durch Erwärmen auf etwa 80 °C und anschließende Filtration eine teilweise Deproteinisierung erfolgt. Da hierbei keine völlige Enteiweißung zu erreichen ist, wird noch eine zweite Enteiweißungsstufe verwendet, welche thermisch in Anwesenheit von Papain geführt wird. Dieses Verfahren ist kompliziert und langwierig und schwierig durchzuführen. Im Endprodukt besteht eine relativ hohe Trübungsneigung, wenn die Präparate in flüssiger Form aufbewahrt werden, die Ausbeuten sind in Bezug auf das eingesetzte Blut nicht allzu günstig und die Wirksamkeit des Wirkstoffes selbst scheint nicht überall in der gewünschten Weise gegeben.

20 Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, diese Nachteile der bekannten Verfahren zu vermeiden, die Trübungsneigung zu beseitigen und die Ausbeute und die Wirksamkeit des Wirkstoffes bei verbesserter Verfahrensökonomie zu steigern. Erfindungsgemäß wird hiezu vorgeschlagen, daß die Papainhydrolyse an unhämolysiertem Blut mit aktiviertem Papain bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,4 vorgenommen wird, daß anschließend die Reaktion durch Abkühlen gestoppt wird, daß zur Entproteinisierung und zur Entfernung des Papains bis 10.000 D ultrafiltriert wird und daß sodann das im Wesentlichen proteinfreie Permeat auf 1/25 bis 1/35, bezogen auf das eingesetzte Blut, eingengt, mit Alkohol versetzt mindestens 24 Stunden gekühlt stehengelassen und schließlich klarfiltriert wird.

30 Im Gegensatz zum zuletzt beschriebenen bekannten Verfahren wird eine enzymatische Hydrolyse an nicht hämolysiertem Blut durchgeführt und keine Wärmebehandlung angewendet, solange noch Eiweiß in der Lösung ist. Vielmehr kommt es beim erfindungsgemäßen Verfahren zu einer Erwärmung lediglich bei der Einengung und gegebenenfalls noch bei einer Sterilisation des Endproduktes, wobei jedoch in beiden Fällen es zu keiner Veränderung des Produktes kommt. Während beim bekannten Verfahren durch nachgeschaltete Säulentrennung auf aufwendige Weise eine weitere Befreiung von unerwünschten Substanzen durchgeführt wird, ist dies beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig, was ein Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit sein mag. Während beim bekannten Verfahren das Endprodukt ein Maximum der Molekulargewichtsverteilung im Bereich von etwa 350 bis 400 hat, liegt beim erfindungsgemäßen Verfahren das Molekulargewichtmaximum wesentlich niedriger als 300. Die Molekulargewichtsverteilung des Endproduktes des erfindungsgemäßen Verfahrens weicht daher von jener bekannter Produkte wesentlich ab. Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird als Ausgangsprodukt im wesentlichen unhämolysiertes Blut verwendet, welches also die roten Blutkörperchen noch unzerstört enthält. Eine geringfügige Hämolysen, welche etwa beim Tiefrieren des Blutes eintritt, ist auf das erfindungsgemäße Verfahren ohne Belang und hat keinen Einfluß auf das Endprodukt, wie Untersuchungen bewiesen haben. Die beim erfindungsgemäßen Verfahren mittels der Ultrafiltration durchgeführte Enteiweißung, bei welcher auch das Papain entfernt wird, da dessen Molekulargewicht größer ist als 20.000, entfernt auch das Hämoglobin (Molekulargewicht größer 50.000), so daß zum Zeitpunkt des Alkoholzusatzes kein Eiweiß (Protein) mehr in der Lösung enthalten ist, da Eiweißmoleküle in der Regel ein Molekulargewicht von über 12.000 haben. Beim erfindungsgemäßen Verfahren dient daher die Alkoholfällung zur Entfernung höherer Peptide, die beim bekannten Verfahren eine Trübung verursachen. Im Gegensatz hiezu bleibt beim erfindungsgemäßen Verfahren das erhaltene Produkt völlig trübungsfrei. Vorteilhaft ist auch die vereinfachte Verfahrensführung, da ein Hämolyseschritt eingespart wird. Dies ist so zu verstehen, daß im Zuge der enzymatischen Hydrolyse mit Papain eine Hämolysen erfolgt, so daß also die beiden Schritte der Hydrolyse und der Hämolysen in einem erfolgen. Ein späterer Wasserzusatz zur Erleichterung der Ultrafiltration bzw. zur thermischen Abstopfung der Reaktion bewirkt keine wesentliche Hämolysen mehr.

35 Zudem wird ein Endprodukt erreicht, welches im Vergleich mit bekannten Präparaten eine gesteigerte Wundheilungswirkung aufweist. Außerdem wird eine vergleichsweise verbesserte Sauerstoffutilisation erreicht. Insbesondere werden die cerebrale Durchblutung und die periphere arterielle Durchblutung im Vergleich zu bekannten Präparaten gesteigert. Ferner liefert das erfindungsgemäße Verfahren überraschend hohe Ausbeuten bezogen auf die eingesetzte Blutmenge und ist verfahrenstechnisch äußerst wirtschaftlich.

60 Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Möglichkeit

besteht, die klarfiltrierte Mischung auf die gewünschte Konzentration zu standardisieren, vorzugsweise durch Verdünnung mit destilliertem Wasser.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird defibriertes Blut von Schlachttieren, insbesondere von Kälbern oder jungen Rindern (bis maximal 3 Jahre) als Ausgangsmaterial verwendet. Dieses Blut wird mit einer aktivierten Papainlösung einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen. Hierbei wird zur Vorbehandlung handelsübliches Papain in destilliertem Wasser suspendiert und durch Zentrifugieren von etwaigen Feststoffen befreit. Handelsübliches Papain hat ein ungefähres Molekulargewicht von 25.000, es enthält aber auch niedermolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht bis unter 10.000. Um zu vermeiden, daß diese niedermolekularen Stoffe aus dem Papain in das endgültige Wirkstoffkonzentrat gelangen, wird die wässrige Suspension ultrafiltriert. Das Konzentrat wird dann mit Cysteinlösung versetzt, wodurch das Papain aktiviert und als Inkubationslösung verwendet wird.

Das Blut, das gegebenenfalls in gefrorener Form aufbewahrt war und in diesem Fall vorher aufgetaut wird, wird im Inkubationskessel auf 35 - 42 °C erwärmt, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 6,5 - 7,4 eingestellt und mit der Inkubationslösung vorzugsweise etwa 14 bis 18 h inkubiert. Das fertig inkubierte Blut wird mit frischem aqua dest. ad inject. mit einer Temperatur von 0 - 10 °C kalt versetzt, wodurch die enzymatische Hydrolyse unterbrochen und die Masse für die Ultrafiltration verdünnt wird. Vor der Ultrafiltration wird zum Schutz des Ultrafilters meist vorfiltriert, um Teilchen mit einer Größe von $\geq 50 \mu\text{m}$ abzutrennen.

Anschließend erfolgt die Ultrafiltration, während welcher in regelmäßigen Abständen Proben zur Überprüfung der Filterdichtheit mittels Trichloressigsäurefällung gezogen werden. Die Ergebnisse müssen negativ sein. Durch die Ultrafiltration wird praktisch das gesamte Eiweiß aus der Lösung entfernt. Dies konnte durch eine Molekulargewichtsbestimmung mittels einer SDS-Gelelektrophorese bestätigt werden. Zweckmäßig wird ab der Ultrafiltration unter aseptischen Bedingungen weitergearbeitet.

Das erhaltene Permeat wird so rasch wie möglich im Vakuumverdampfer bei 60 - 80 °C auf 1/25 - 1/33 des ursprünglichen Blutvolumens eingeeengt. Dabei kommt es wieder zu Ausfällungen, die über ein Filter abfiltriert werden. Doch wird durch diese starke Einengung die Wahrscheinlichkeit von Nachfällungen weitgehend herabgesetzt. Das filtrierte Konzentrat wird nun mit einer etwa 2 1/2-fachen Volumsmenge vorgekühlten 96 %-igen Äthanol versetzt und in der Kälte, vorzugsweise bei Kühlraumtemperatur (4 - 6 °C), stehen gelassen. Anstelle von Äthanol kann auch Methanol, Propanol oder Butanol verwendet werden. Nach einer Stehzeit von mindestens 24 h, vorzugsweise etwa 48 h, wird klarfiltriert, was mit Hilfe eines Schwarzbandfilters erfolgen kann. Der zur Fällung zugesetzte Alkohol wird dann im Rotavapor abdestilliert. Dabei kommt es meist nochmals zu einer Ausfällung, die über Schwarzband- und Glasfaservorfilter klarfiltriert wird.

Durch die starke Einengung vor der Alkoholfällung wird es möglich, nur mehr eine Trockengewichtseinstellung auf etwa 200 mg/ml durch Verdünnung mit der entsprechenden Menge destillierten Wassers für Injektionszwecke durchzuführen.

Das fertige Wirkstoffkonzentrat wird über ein Sterilfilter und nochmals durch ein Ultrafilter filtriert und anschließend in sterile Flaschen abgefüllt. Im Allgemeinen ist die Sterilfiltration im Hinblick auf eine Keimentfernung stets erforderlich, wenn der Alkohol abgezogen wird. Die Klarfiltration erfolgt zur Entfernung der Ausfällungen.

Durch die Ultrafiltration vor der Alkoholfällung wird vermieden, daß unwirtschaftlich große Alkoholmengen eingesetzt werden. Die Manipulation kleinerer Mengen ist stets einfacher und daher billiger.

Durch die Alkoholfällung werden aus der Lösung höhere Peptide abgetrennt, welche im Endprodukt durch Agglomeratbildung Ausfällungen bzw. Trübungen verursachen könnten. Es wird dabei ein Produkt erhalten, das im flüssigen Zustand äußerst stabil ist und keinerlei Nachfällungen im pharmazeutischen Endprodukt zeigt, auch wenn dieses bei höheren Temperaturen, z. B. etwa 120 °C, autoklaviert wird.

Die Einengung auf mindestens 1/25 - 1/33 des ursprünglichen Blutvolumens erfolgt, um das Produkt nach der Alkoholfällung nicht mehr weiter einengen zu müssen. Es wird daher nach der Alkoholfällung nur mehr der Alkohol abgedampft und die Masse auf das entsprechende Trockengewicht verdünnt.

Obwohl eine Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Gelelektrophorese für Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 negativ ausfällt, ist es vorteilhaft, zum Abschluß noch eine zweite Ultrafiltration durchzuführen, um ein verläßlich sauberes, steriles und vor allem pyrogenfreies Endprodukt zu erhalten. Verluste hinsichtlich der Ausbeute treten hierbei nicht auf.

Es hat sich herausgestellt, daß es ohne Zwischenschaltung einer Alkoholfällung bei längerer Lagerung des Wirkstoffes oder der verdünnten Ampullenlösung zu Trübungen und Ausfällungen durch Peptid-Agglomerationen kommt, deren Bildung durch Schütteln der Lösung bei 50 °C oder durch Lagerung der Lösung im Kühlschrank bei 5 °C auf wenige Tage verkürzt werden kann. Wird die Ultrafiltration erst nach der Alkoholfällung vorgenommen, so kann trotz der oben erwähnten Aufkonzentrierung der positive Effekt auf die Haltbarkeit ohne Trübung des Wirkstoffes nicht mehr festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Feststellung der Ausfällungstendenz besteht in der Autoklavierung des Fertigproduktes bei 121 °C. Hier kommt es ohne Durchführung der Alkoholfällung zur Trübung nach einigen Tagen bis Wochen.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß durch die entsprechende Vorbehandlung mit Papain und die Vorentweißung mittels Ultrafiltration überrassenderweise ein Produkt erhalten wird, das im Vergleich zu den im Handel befindlichen Präparaten wesentlich höhere Ausbeuten an aktiver Substanz bei gleichen Blutmengen ergibt.

Wie bereits erwähnt, weicht die Molekulargewichtsverteilung beim in erfindungsgemäßer Weise hergestellten Produkt wesentlich von jener in bekannter Weise hergestellter Produkte ab. Dies wurde durch Vergleichsversuche festgestellt, wobei als Vergleichsprodukte folgende Produkte verwendet wurden:

5 Vergleichsprodukt I: Ein im Handel erhältliches eiweiß- und pyrogenfreies Produkt, das aus dem Blut schlachtreifer Kälber gewonnen wird.

Vergleichsprodukt II: Ein anderes im Handel befindliches Produkt, hergestellt im Wesentlichen gemäß der DE-PS 1,076.888.

10 Vergleichsprodukt III: Produkt hergestellt nach dem Verfahren nach der DE-OS 1 949 195.

Methode:

Säule: TSK 2000 SW, 0,75 x 60 cm

Vorsäule: Merck Hibar 100 Diol, 0,4 x 25 cm

Probenvolumen: 20 µl

15 Pumpe: LKB 2150 HPLC-Pumpe mit Rheodyne Injektor

Fluß: 0,5 ml/min

Photometer: LKB 2138 Uvicord S, 280 nm

Schreiber: Servogor S, 30 cm/h

20 Molekulargewichtsstandard:

Substanz	Molekulargewicht	Retentionszeit (min)
Tyrosin	181,19	49,6
Insulin Chain a	2.660	41,8
Ovalbumin	45.000	33,5

25 Die Ergebnisse sind in Fig. 1 im Vergleich zu den Meßergebnissen des erfindungsgemäßen Produktes (IV) dargestellt. Die Diagramme zeigen hierbei die volle Absorption AFS (absorption full scale) in Abhängigkeit von der Retentionszeit RT.

Die Vergleichsprodukte I und II zeigen jeweils nur ein einziges Hauptmaximum bei einer Retentionszeit von 30 47,8 bzw. 48,2 min. Dies entspricht einem ungefähren Molekulargewicht von 350 - 400. Das Vergleichsprodukt I weist je eine Schulter bei einer Retentionszeit von 49,3 min und 56,1 min (entspricht ~ MG 200 bzw. MG < 100) auf, das Vergleichsprodukt II hingegen nur eine Schulter bei RT 56,2 (≠ MG < 100). Die gesamten beim Versuch detektierbaren Substanzen zeigen sich in einem Bereich von MG < 100 bis MG ~ 2.500. Das Vergleichsprodukt III zeigt hingegen zwei Hauptmaxima, eines bei RT = 48,4 min (MG ~ 300), das zweite bei 35 RT = 52,4 min (MG < 150), und weiters im niederen MG-Bereich (< 100) drei Schultern.

Das erfindungsgemäße Präparat (IV) unterscheidet sich wesentlich von den bisher genannten Substanzen. Es weist drei deutliche Maxima auf, wobei das erste Maximum in einem niedrigeren Molekulargewichtsbereich als bei den vorher genannten Präparaten liegt, nämlich ungefähr bei MG 200. Dies wird wahrscheinlich durch die zusätzliche Äthanol-fällung erreicht. Die beiden anderen Maxima befinden sich bei MG < 150 bzw. MG < 100. 40 Außerdem zeigt das erfindungsgemäße Präparat im niedermolekularen Bereich keine Schultern, hingegen zwei im höhermolekularen Bereich bei MG 500 bzw. MG 300.

Die in den Kurven für die Vergleichspräparate I und II links der Maxima aufscheinenden Nebenmaxima sind durch die Konservierungsmittel bedingt und gehören somit nicht zum jeweiligen Präparat.

45 Die genauen Meßergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1:

1. Maxima

	Retentionszeit (min)	ungefähres Molekulargewicht
Vergleichspräparat I	47,8	350 - 400
Vergleichspräparat II	48,2	350
Vergleichspräparat III	48,4 52,4	300 150
erfindungsgemäßes Präparat IV	49,6 52,0 56,2	200 150 100

Tabelle 1 - Fortsetzung:

2. Schulter

		Retentionszeit (min)			ungefähres Molekulargewicht
5	Vergleichspräparat I	49,3	56,1		100 - 200
	Vergleichspräparat II	56,2			100
10	Vergleichspräparat III	50,6	54,9	56,4	150 - < 100
	erfindungsgemäßes Präparat IV	46,9	48,1		300 - 500

15 3. Molekulargewichtsbereich der gesamten beim Versuch detektierbaren Substanzen

		Retentionszeit (min)	ungefähres Molekulargewicht
20	Vergleichspräparat I	43,0 - 58,5	2500 - < 100
	Vergleichspräparat II	40,4 - 59,2	2700 - < 100
	Vergleichspräparat III	39,8 - 67,2	3000 - < 100
25	erfindungsgemäßes Präparat IV	39,5 - 63,5	3000 - < 100

Das erfindungsgemäß hergestellte Produkt wurde ferner in verschiedenen Tests und Untersuchungsreihen auf seine Wirksamkeit in therapeutischer Hinsicht geprüft. Die genauen Versuchsbedingungen werden später angegeben.

30 Bei der Untersuchung der Wirkung des Präparats auf die Inkorporation von ^3H -Thymidin in DNA von menschlichen Fibroblasten und Leberzellen zeigte sich, daß das Präparat im Verhältnis zu bekannten Produkten eine wesentlich stärkere (5 bis 10-fache) Wirkung auf das Wachstum sowohl von Fibroblasten als auch von Leberzellen hat. Hiefür wurde die regenerierende Wirkung des erfindungsgemäß hergestellten Präparates auf menschliche Vorhaut-Fibroblasten untersucht, die durch Entzug von fötalem Kälberserum geschädigt waren. Als
35 Ergebnis zeigte sich, daß das erfindungsgemäße Präparat unter Steigerung der DNA-Synthese eindeutig regenerierend auf geschädigte menschliche Fibroblastenzellen wirkt und daß dabei die Konzentrationsbereiche ebenso wie der Hemmbereich ähnlich wie bei bekannten Produkten sind. Für diese Untersuchungen wurden menschliche Vorhaut-Fibroblasten in der 8. bis 10. Passage mit variablen Mengen an dem erfindungsgemäßen Produkt bzw. dem bekannten Vergleichspräparat I versetzt und der ^3H -Thymidin-Einbau in DNA gemessen. Um
40 die Zellen zu stressen, wurden sie nach Ausplotten zunächst auf 1/2 bis 2/3 Konfluenz anwachsen gelassen und dann in künstlichem Medium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum, einem essentiellen Mediumbestandteil, für 6 bis 9 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt gegen ein solches, welches nur geringe Mengen fötales Kälberserum enthielt sowie steigende Mengen an erfindungsgemäßigem Präparat sowie ^3H markiertes Thymidin bzw. an dem Vergleichspräparat I.

45 Dieser Ansatz wurde 12 bis 24 Stunden inkubiert und die Radioaktivität in der DNA-Fraktion nach entsprechendem Aufarbeiten der Zellen bestimmt.

Fig. 2 der beiliegenden Zeichnung zeigt die Ergebnisse in Diagrammform, wobei mit vollen Linien die Meßkurve für ein erfindungsgemäßes Produkt dargestellt ist, mit strichlierten Linien jene für das bekannte Vergleichspräparat I. Auf der Abszisse ist hierbei die Präparatzugabe in Mikroliter angegeben, auf der Ordinate die
50 radioaktive Zählungsmenge.

Bei der Bestimmung der regenerierenden Wirkung auf menschliche Hepatoma-Zellen, die ebenfalls durch Entzug von fötalem Kälberserum geschädigt worden waren, zeigte sich ebenfalls eine ausgesprochen günstige Wirkung unter Steigerung der DNA-Synthese. Die Untersuchungsmethodik entsprach jener bei der zuvor beschriebenen Fibroblastenuntersuchung, jedoch wurde die Steigerung lediglich gegenüber unbehandelten
55 Kontrollen gemessen. Fig. 3 zeigt die Meßergebnisse für das erfindungsgemäße Präparat.

Die Untersuchung der Steigerung der Zellatmung von Leberzellen, welche nach der Homogenisation eine relativ geringe bzw. relativ hohe Eigenatmung aufweisen, zeigte, daß das neue Präparat eine stärkere Aktivierung hervorzurufen vermag als das bekannte Vergleichspräparat. Im Bereich maximaler Atmungssteigerung wirken beide Präparate in vergleichbarem Ausmaß. Die Messung erfolgte hierbei mittels der bekannten Warburgmethode
60 (beschrieben in der GB-PS 824 375). In der folgenden Tabelle sind die Meßergebnisse für drei Ansätze von

verschiedenen Leberhomogenaten angegeben, wobei ein Vergleich sowohl mit dem bekannten Vergleichspräparat I durchgeführt wurde, als auch gegenüber Messungen ohne Präparatezugabe.

5

Tabelle 2:

	$\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch des Leberhomogenates ohne Präparatezugabe:	Steigerung des O_2 -Verbrauches für:	
		erfindungsgemäßes Präparat:	bekanntes Präparat I:
10	14	410	230
	22	620	700
	63	370	60

15 Rinderblutextrakte enthalten Faktoren, die die Zellaktivität erhöhen (z. B. Teilungsaktivität geschädigter Fibroblasten oder Zunahme des zellulären, mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs). Diese zellaktivierenden Effekte können z. B. im Rahmen der Wundheilung als erwünscht angesehen werden. Unerwünscht hingegen wäre die Aktivierung von neoplastischen Zellen. Untersuchungen zeigten, daß im Gegensatz zum bekannten Vergleichspräparat I das erfindungsgemäße Präparat den Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen (Mäuse-Aszitestumorzellen) nicht aktiviert. Dies wurde im folgenden Experiment überprüft, bei welchem die Sauerstoffaktivität von Mäuse-Aszitestumorzellen nach Zugabe des erfindungsgemäßen Präparates bzw. des Vergleichspräparates I untersucht wurde:

Messung des Sauerstoffverbrauchs: mittels "Clark"-Elektrode Suspensionspuffer: Na_2HPO_4 0.04 Mol/l, NaCl 0,08 Mol/l, MgCl_2 0.005 Mol/l, pH 7,4 (3 ml pro Kammer) Aszitestumorzellen: nach HORNYKIEWICS und SATKE-EICHLER (Arzneimittelforschung 6, 1956) 0,1 bzw. 0,05 ml pro Kammer;
25 erfindungsgemäßes Präparat: Injektionslösung, 40 mg Trockengewicht/ml (0,2 ml/Kammer)
Vergleichspräparat I: Ampullen, Handelspräparat (0,2 ml/Kammer)

In Fig. 4 sind die Ergebnisse für das erfindungsgemäße Präparat (IV) sowie für das Vergleichspräparat (I) graphisch dargestellt. Für das erfindungsgemäße Präparat IV wurde hierbei ein Mittelwert aus sechs Bestimmungen ermittelt, für das Vergleichspräparat I ein Mittelwert aus vier Bestimmungen. Es zeigt sich, daß im Gegensatz zum Vergleichspräparat I das erfindungsgemäße Präparat (IV) die Sauerstoffaktivität (zelluläre Atmung) von Mäuse-Aszitestumorzellen nicht nur nicht steigert, sondern sogar eine Verringerung der Sauerstoffaktivität bewirkt.

Besonders überraschend ist, daß sich beim Einsatz der erfindungsgemäß hergestellten Präparate in der Geriatrie an Patienten mit cerebralkulärer Insuffizienz bei einer Behandlung über vier Wochen eine deutliche Besserung bei der Flimmerfrequenzanalyse zeigt, weiters bei einem durch einen Bewertungsscore ermittelten psychischen Gesamteindruck und beim geriatrischen Bewertungsschema nach Gottfries und Gottfries. Es eignet sich das neue Präparat also auch ausgezeichnet zur symptomatischen Behandlung von psychopathologischen Begleiterscheinungen der cerebralkulären Insuffizienz.

40 Weiters wurden Untersuchungen nach der WARBURG-Methode vorgenommen, um zu erfahren, inwieweit das erfindungsgemäß hergestellte Präparat tatsächlich eine Steigerung des O_2 -Stoffwechsels hervorruft. Es wurde dabei das erfindungsgemäß hergestellte Präparat mit zwei handelsüblichen Produkten (Vergleichspräparate I und II) verglichen. Bei allen drei Präparaten trat eine ausgeprägte Atmungssteigerung im Rattenleberhomogenisat auf, wobei in Abhängigkeit von der Menge und/oder dem Zustand der aktiven Zellbestandteile die Ergebnisse beim einen bekannten Präparat und dem erfindungsgemäß hergestellten Präparat ähnlich bis für das erfindungsgemäß hergestellte Präparat deutlich besser, beim anderen bekannten Präparat jedoch um bis zu 20 % herabgesetzt waren.

Es zeigte sich, daß beim nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Präparat im Vergleich zum erstgenannten bekannten Präparat die 4-fache und im Vergleich zum zweitgenannten bekannten Präparat die 1,4-fache Ausbeute an Wirkstoff bei gleicher Menge eingesetzten Blutes erhalten werden konnte.

50 Schließlich wurde eine Messung des cerebralen Blutflusses bzw. der peripheren arteriellen Durchblutung (an der Oberschenkelarterie) bei Pavianen, die einem künstlichen Sauerstoffmangel ausgesetzt wurden, durchgeführt. Eine solche Messung stellt ein anerkanntes Modell zur Evaluierung von Medikamenten dar, welche die Gehirndurchblutung bzw. die arterielle Durchblutung (besonders in den Beinen), beeinflussen (Meyer J.S., Ishikawa S., Lee T.K., J. Neurosurg. 21, 524 (1964)).

Bei einer vergleichenden Untersuchung zeigt sich, daß das erfindungsgemäße Präparat (IV) (4 ml/kg Körpergewicht intravenös als Injektionslösung) gegenüber dem bekannten Vergleichspräparat I (4 ml/kg Körpergewicht intravenös als Injektionslösung) sowohl die cerebrale als auch die periphere Durchblutung beim Pavian deutlich stärker fördert. Die Meßergebnisse sind für die cerebrale Durchblutung in Fig. 5 dargestellt, für die periphere arterielle Durchblutung in Fig. 6.

60 Andere Herz-Kreislauf-Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Gefäßwiderstand) änderten sich nicht oder nur

geringfügig, sodaß das erfindungsgemäß hergestellte Präparat eine spezifische pharmakologische Wirkung auf die erwähnten Durchblutungsbereiche ausübt.

Das erfindungsgemäß hergestellte Konzentrat kann zur Verwendung in der Therapie nach an sich bekannten Methoden zu Injektionslösungen, Tabletten, Dragees, Wundsalben oder -gelen verarbeitet werden.
 5 Erfindungsgemäße therapeutische Präparate, die insbesondere Wundheilmittel oder geriatrische Präparate sein können, enthalten ein Konzentrat, gegebenenfalls nach dessen Trocknung, das nach dem zuvor beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.

Im folgenden werden genauere Herstellungsangaben und die Beschreibung der Untersuchungsverfahren und ihrer Ergebnisse für das erfindungsgemäß hergestellte Präparat angegeben.

10 Papainvorbehandlung und -aktivierung: Eine Vorbehandlung des Papains ist zweckmäßig, um unlösliche Substanzen abzutrennen und um zu vermeiden, daß niedermolekulare Substanzen ($MG \leq 10.000$) aus dem Papain in das Wirkstoffkonzentrat gelangen.

200 g Papayotin (Fa. Extrakt-Chemie/Aktivität: 80 E/mg) werden in 1 l a. d. suspendiert und anschließend zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC-3, Rotor: HG-4L 3.000 rpm. 20 min).

15 Vorfiltration für Ultrafiltration (die Lösung soll frei von Teilchen $> 10 \mu m$ sein) über: Schwarzbandfilter oder Rundfilter 595, Glasfaservorfilter (Fa. Sartorius), $8 \mu m$ Membranfilter (Fa. Sartorius)

Ultrafiltration: Gerät Pellicon Kassettensystem Fa. Millipore NMGG: 10.000

Probevolumen nach Zentrifugation und Vorfiltration $\rightarrow 0,77 l$

Konzentratvolumen: 0,38 l

20 Durchflußrate: 60 ml/min

Das Konzentrat wird mit Cysteinlösung (3 g Cystein in 0,62 l a. d.) auf 1 l verdünnt = aktivierte Papainlösung (= Inkubationslösung)

Zur erfindungsgemäßen Herstellung der neuen Wirkstoffe wird nun folgendermaßen vorgegangen:

25 Rohstoffe:

100 l durch Rühren defibriniertes Blut von Kälbern oder jungen Rindern (bis max. 3 Jahre alt)

1 l aktivierte Papainlösung

HCl 1 N

Äthanol 96 %

30 aqua dest. ad. injectionem

Inkubation: Das aufgetaute Blut wird im Inkubationskessel auf $37^\circ C$ erwärmt, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird die Inkubationslösung zugegeben und man läßt 14 bis 18 h inkubieren. Das fertig inkubierte Blut wird mit frischem a. d. 1:1 verdünnt und für die anschließende Ultrafiltration vorfiltriert.

35 Vorfiltration: Teilchengröße $\leq 50 \mu m$; Gerät: Seitz Plattenfilteranlage für 7 Filterschichten Seitz Supra 300.

Ultrafiltration: Gerät: Millipore Ultrafilter, Filterfläche: $4,6 m^2$, NMGG: 10.000 Ausgangsvolumen: $\sim 200 l$ Durchflußrate: $\sim 0,7 l/min$.

Das Konzentrat wird bei $\sim 60 l$ mit 30 l a. d. verdünnt und man filtert nochmals bis auf $\sim 20 - 25 l$ Retentat. Gesamtfiltrationsvolumen: 205 - 210 l. Nach 30, 100 und 200 l Permeat werden jeweils Proben zur Überprüfung der Filterdichtheit mittels TCA-Fällung (muß negativ sein!) gezogen.

40 Einengung im Verdampfer: Das Ultrafiltrat wird so rasch als möglich im Verdampfer bei $60 - 80^\circ C$ auf $3 - 4 l$ Endvolumen unter Vakuum aufkonzentriert (Aufkonzentrierung auf $\frac{1}{25} - \frac{1}{33}$ des ursprünglichen

45 Blutvolumens). Dabei kommt es zu starken Ausfällungen, die über ein Schwarzbandfilter abfiltriert werden. Man konzentriert so hoch, um die Wahrscheinlichkeit von Nachfällungen zu verringern.

Äthanolfällung: Das filtrierte Konzentrat wird nun in die 2,5-fache Menge (10 l) vorgekühlten Äthanol 96 Vol.-% eingerührt und in der Kälte (Kühlraumtemperatur: $4 - 6^\circ C$) stehenlassen. Nach einer Stehzeit von 48 Stunden wird klarfiltriert.

50 Verwendete Filter: Schwarzbandfilter, Glasfaservorfilter (Fa. Sartorius). Der zur Fällung zugesetzte Äthanol wird im Rotavapor abdestilliert. Dabei kommt es meist nochmals zu einer Ausfällung. In diesem Falle wird die Klarfiltration über Schwarzband- und Glasfaservorfilter wiederholt. Durch die starke Einengung vor der Äthanolfällung ist nun nur mehr eine Trockengewichtseinstellung auf 200 mg/ml durch Verdünnung mit der entsprechenden Menge frischen Wasser für Injektionszwecke notwendig.

55 Das fertige Wirkstoffkonzentrat wird über ein Sterilfilter ($0,2 \mu m$ Membranfilter, Fa. Sartorius) und nochmals durch ein Ultrafilter (NMGG: 10.000) filtrierte und anschließend in sterile Flaschen abgefüllt. Dieses Wirkstoffkonzentrat ist Ausgangsbasis für die Herstellung von Ampullen, Infusionslösungen, Tabletten, Dragees, Kapseln, Salben, Gels usw. Bevorzugte galenische Formen sind Pulver oder Granulate, die in Hart- oder Weichgelatinekapselform abgefüllt sind.

60

Beispiel 1:

10 l Rinderblut werden am Schlachthof durch Rühren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Das Blut wird in kleinen Portionen (4 - 5 l) eingefroren und erst kurz vor der Verarbeitung wieder aufgetaut. Zur Inkubation wird der pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt, mit 20 g vorbehandeltem aktiviertem Papain versetzt und 15 Stunden bei 37 °C unter Rühren stehengelassen. Die Vorbehandlung des Papains dient der Reinigung von handelsüblichem Papain (z. B. Papayotin, Fa. Extrakt-Chemie, 80.000 E/g). 20 g handelsübliches Papain werden in 200 ml a. d. suspendiert und anschließend wird zentrifugiert. Der Überstand wird für die anschließende Ultrafiltration vorfiltriert. Die Lösung soll frei von Teilchen > 10 µm sein. Bei der Ultrafiltration wird bis auf 50 ml Konzentrat filtriert und anschließend zur Aktivierung des Papains mit Cysteinlösung (300 mg Cystein in 150 ml a. d.) verdünnt auf insgesamt 200 ml. Das Ultrafiltrat wird verworfen. Das inkubierte Blut wird in 10 l vorgekühltes destilliertes Wasser gerührt. Das verdünnte Blut wird für die Ultrafiltration über eine Plattenfilteranlage für 7 Filterschichten vorfiltriert und anschließend durch ein Ultrafilter mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10.000 Dalton filtriert und sofort auf 360 ml eingengt. Die durch das Aufkonzentrieren ausgefallenen Substanzen werden durch Filtration über ein Schwarzbandfilter abgetrennt. Das eiweißfreie Filtrat wird in 900 ml vorgekühltem Äthanol 96 % eingerührt und im Kühlschrank bei 7 °C stehengelassen. Die Überprüfung auf Eiweißfreiheit erfolgt im Schnelltest mit Trichloressigsäure. Nach mindestens 48 Stunden Stehzeit werden die Ausfällungen abfiltriert und der Alkohol im Rotavapor abgezogen. Das so erhaltene Produkt wird mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser auf einen Trockensubstanzgehalt von 200 mg/ml verdünnt und aseptisch in sterile Flaschen abgefüllt.

Analysendaten:

pH-Wert	6,1
Dichte (g/ml)	1,0760
Chlorid*	2,56
Natrium*	1,94
Kalium*	0,16
Ausbeute*	10,9
Osmolalität (mosm/kg)	3.110
Aktivität (Warburg)**	+ 32.1 %

SDS-Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000

* g aus 1 kg Blut

** Differenz gegen Referenzstandard

Beispiel 2

50 l Kälberblut werden am Schlachthof durch Rühren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Das Blut wird sofort wie in Beispiel 1 aufgearbeitet.

Analysendaten:

pH-Wert	6,0
Dichte (g/ml)	1,0840
Chlorid*	2,28
Natrium*	1,60
Kalium*	0,14
Ausbeute*	8,3
Osmolalität (mosm/kg)	3.725
Aktivität (Warburg)**	35,8 %

SDS Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000

* g aus 1 kg Blut

** Differenz gegen Referenzstandard

Beispiel 3:

10 l Rinderblut werden am Schlachthof durch Rühren defibriniert. Die Fibrinflocken werden durch ein Sieb abfiltriert. Anschließend wird mit HCl der pH-Wert auf 7,1 eingestellt, mit 20 g gemäß Beispiel 1 vorbehandeltem aktiviertem Papain 14 Stunden bei 37 °C inkubiert und das inkubierte Blut mit dest. Wasser 1:1 verdünnt. Zur Abtrennung aller Teilchen > 10 µm wird durch ein Plattenfilter vorfiltriert und anschließend erfolgt eine Ultrafiltration bei einer Abscheidegrenze von 10.000 Dalton. Das eiweißfreie Ultrafiltrat (überprüft mittels Fällung mit Trichloressigsäure) wird im Rotationsverdampfer auf ca. 350 ml eingengt, mit 900 ml Äthanol versetzt und 48 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die ausgefallenen Substanzen werden durch Filtration

abgetrennt und der Alkohol wird im Vakuumverdampfer abdestilliert. Dieses Konzentrat wird auf 400 ml verdünnt sterilfiltriert und aseptisch in Ampullen abgefüllt.

Analysendaten:		
5	pH-Wert	6,1
	Dichte (g/ml)	1,0912
	Chlorid*	1,68
	Natrium*	1,19
	Kalium*	0,11
10	Ausbeute	6,0
	Osmolalität (mosm/kg)	3.635
	Aktivität (Warburg)**	28,3 %

SDS-Elektrophorese: frei von Substanzen mit MG > 10.000

* g aus 1 kg Blut

** Differenz gegen Referenzstandard

Beispiel 4:

20 10 l defibriniertes frisches Rinderblut wird mit HCl auf pH 6,5 eingestellt, mit 20 g gemäß Beispiel 1 vorbehandeltem aktivierten Papain bei Raumtemperatur 18 Stunden inkubiert und anschließend unverdünnt ultrafiltriert. Das eiweißfreie Ultrafiltrat wird im Vakuumverdampfer auf 300 ml aufkonzentriert, mit 0,75 l Äthanol versetzt und anschließend 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und der Alkohol im Rotavapor abgedampft. Das Konzentrat wird mit
25 in sterilem, pyrogenfreiem Wasser auf 200 mg Trockensubstanz/ml eingestellt und in sterile Flaschen abgefüllt.

Beispiel 5:

Das gemäß Beispiel 1 bis 4 hergestellte Konzentrat wird mit Aqua ad inject. auf 40 mg/ml verdünnt, der pH-Wert nochmals überprüft bzw. auf 6,9 eingestellt und nochmals zur Entpyrogenisierung mit einem Ultrafilter mit einer Abscheidegrenze bei MG 10.000 filtriert. Diese Injektionslösung wird unter aseptischen Bedingungen in 2 ml, 5 ml bzw. 10 ml Ampullen abgefüllt.

Beispiel 6:

35 Das laut Beispiel 1 bis 4 hergestellte Konzentrat wird mit Aqua ad inject. auf einen Trockenstoffgehalt von 50 - 70 mg/ml eingestellt und lyophilisiert. Tabletten werden hergestellt indem

500,0 g lyophilisiert. Konzentrat

1.987,5 g Methylcellulose

12,5 g Mg-Stearat

40 vermischt und zu 250 mg Tabletten verpreßt werden. Da das lyophilisierte Konzentrat extrem hygroskopisch ist, muß die Tablettierung unter trockener Raumluft (< 20 % relative Feuchte) erfolgen. Die Kerne werden mit einem speichelresistenten, weißen Film überzogen, indem für 750 g Kerne 300 g Sprühlösung bestehend aus:

45 12,0 g Eudragit E 100
1,5 g Polyäthylenglykol 6.000
91,8 g Opaspray white, K 1-7000 (50 % Feststoffanteil, Fa. Colorcon)
97,5 g Isopropanol
97,5 g Methylenchlorid

50 aufgesprüht werden.

Beispiel 7:

55 1,25 l des laut 1 bis 4 hergestellten Konzentrats werden auf 1 kg Granulat bestehend aus 98 % Methylcellulose und 2 % Gelatine, sehr langsam aufgesprüht. Das so erhaltene Granulat wird bei 60 °C in einem Trockenschrank mit Umluft für mindestens 18 Stunden nachgetrocknet. Nach Erreichen einer Restfeuchte von max. 0,5 % wird das Granulat mit 0,5 % Mg-Stearat vermischt und zu 250 mg Tabletten verpreßt.

Die Tabletten werden analog Bsp. 6 überzogen.

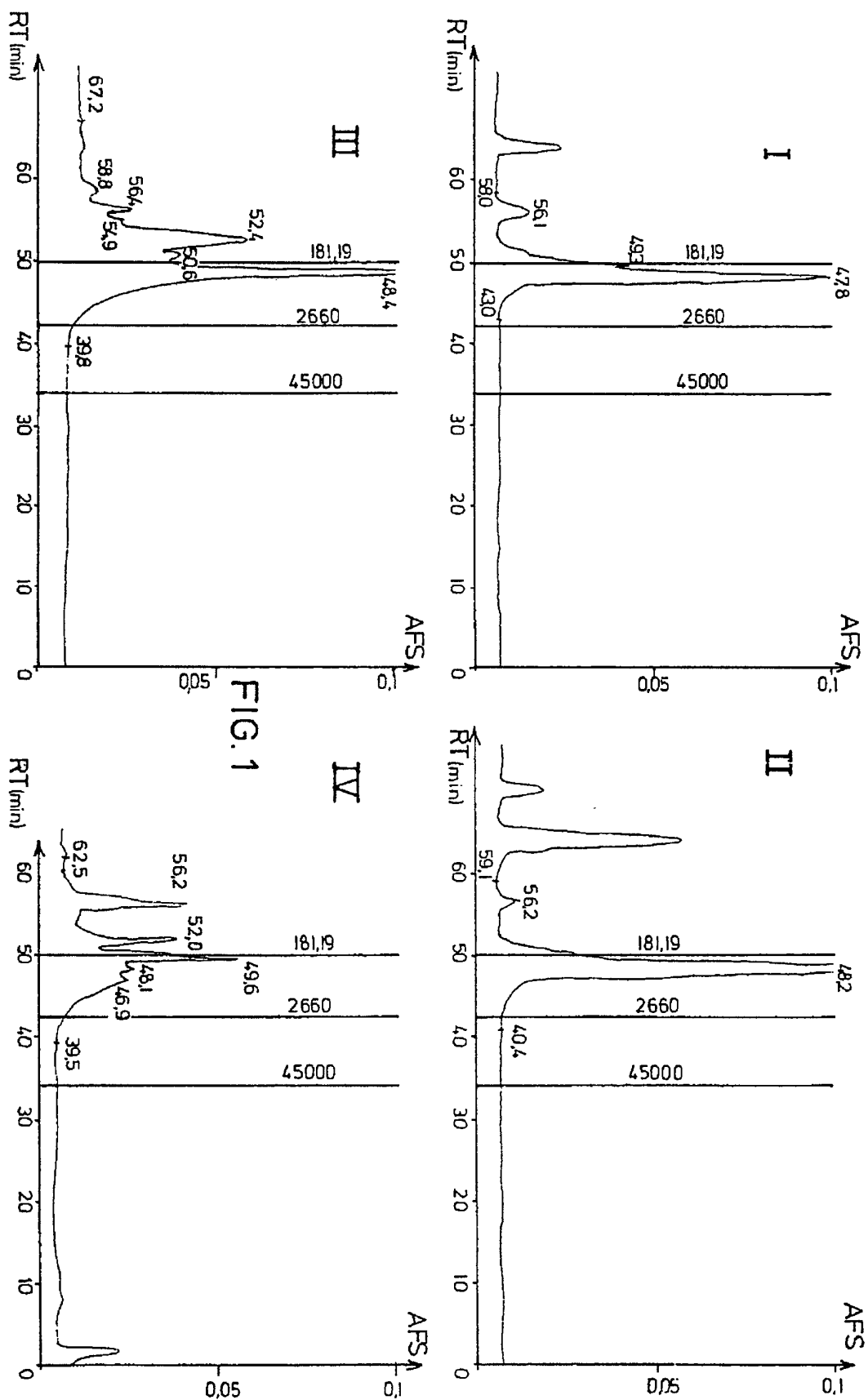
6C

AT 392 003 B

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß für die Papainhydrolyse das Papain durch Ultrafiltration von Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 10.000 befreit und mit Cystein aktiviert wird.
- 5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Papainhydrolyse bei einem pH-Wert von etwa 7 und einer Temperatur von etwa 37 °C während 14 bis 18 Stunden erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Stehzeit nach der Alkoholfällung 24 bis 55 Stunden, vorzugsweise etwa 48 Stunden beträgt.
- 10 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die klarfiltrierte Mischung nach Verdünnung nochmals sterilfiltriert und bzw. oder ultrafiltriert wird.
- 15 15. Therapeutisches Präparat, insbesondere Wundheilmittel oder geriatrische Präparate, enthaltend ein nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestelltes Konzentrat.

20

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen



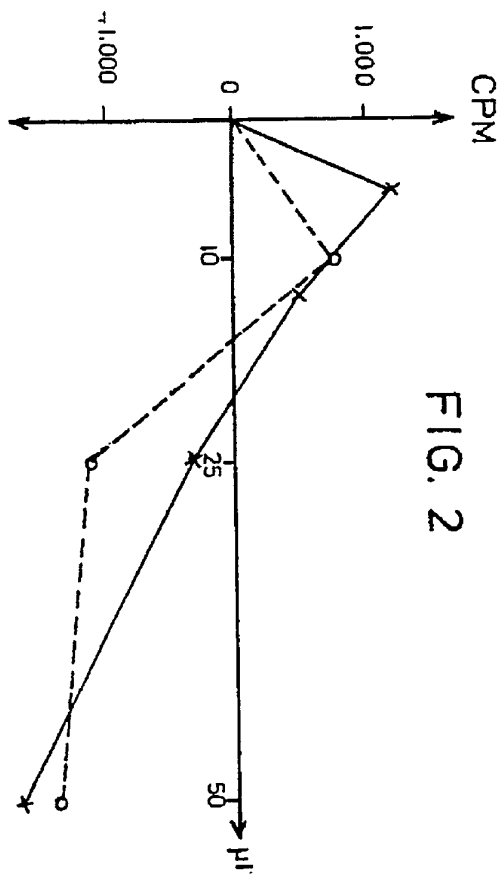


FIG. 2

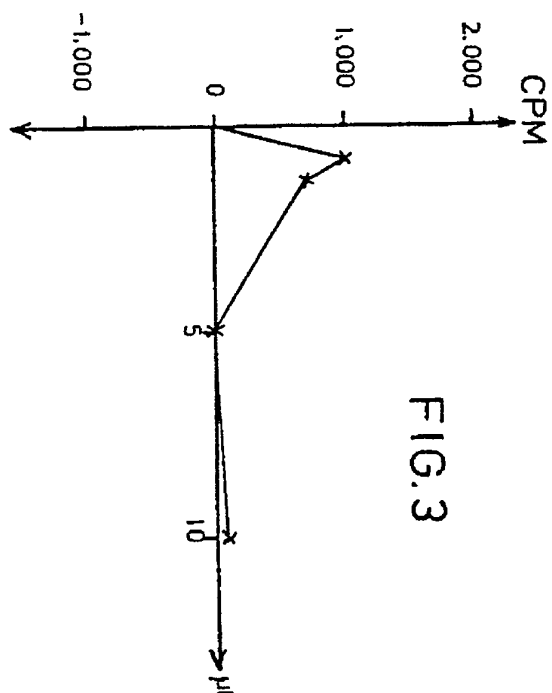


FIG. 3

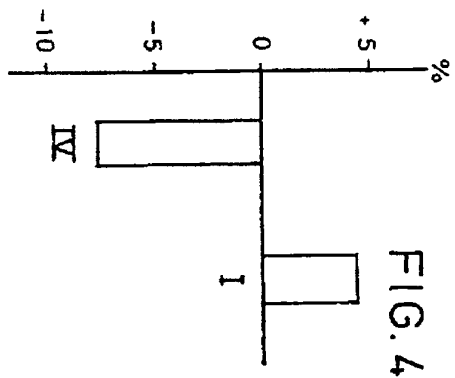


FIG. 4

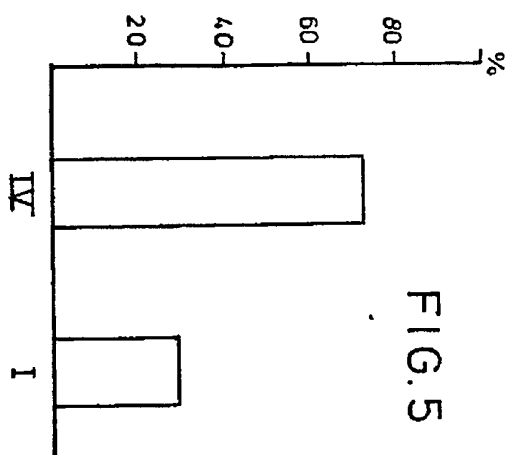


FIG. 5

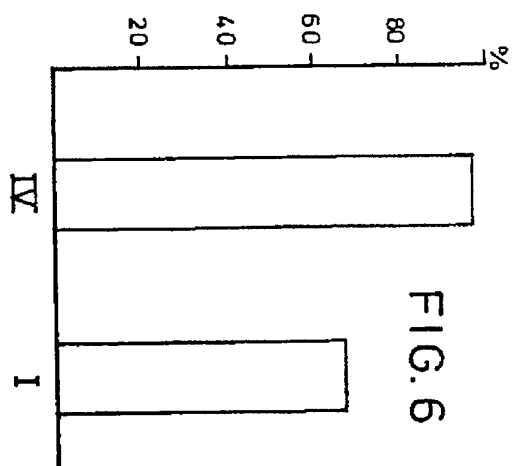


FIG. 6