



(19) österreichisches
patentamt

(10) **AT 009 320 U1 2007-08-15**

(12)

Gebrauchsmusterschrift

(21) Anmeldenummer: GM 461/05 (51) Int. Cl.⁸: **A61K 35/14**
(22) Anmeldetag: 2005-07-07
(42) Beginn der Schutzdauer: 2007-06-15
(45) Ausgabetag: 2007-08-15

(73) Gebrauchsmusterinhaber:
CREMER CLAUS PETER MAG.
D-83088 KIEFERSFELDEN (DE).
BRANDER MARCEL G. DR.
CH-6440 BRUNNEN AM
VIERWALDSTÄTTERSEE (CH).

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER AUFBEREITUNG ZUR GEWINNUNG VON VAKZINEN**

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die neue Verwendung des aus dem Eigenblut eines Patienten gewinnbaren sogenannten BC (Buffy Coat = weißer Zellanteil), bei der Herstellung von Vakzinen für eine Immuntherapie. Die Grundsubstanz der Vakzine besteht dabei aus einer Suspension befreiten BC, wobei die Zellen in Zellfragmente zertrümmert und in bekannter Weise inaktiviert sind.

AT 009 320 U1 2007-08-15

DVR 0078018

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vakzine auf der Basis von Eigenblut zur Durchführung einer Immuntherapie, insbesondere bei Tumorleiden und Autoimmunkrankheiten.

Der theoretische Hintergrund und Grundlagen, die zur Herstellung entsprechender Vakzinen geführt haben, sind einschließlich der notwendigen Literaturhinweise in der DE 42 04 132 C2 ausführlich behandelt. Dort wird von einer Aufbereitung für die Gewinnung von Vakzinen ausgegangen, die aus einer Kultur von vom jeweiligen Patienten stammenden körpereigenen, polymorphen Mikroorganismen besteht, wobei ein die Mikroorganismen enthaltendes zur Impfung des Nährmediums verwendetes Präparat durch Kultivierung von Eigenblut in einem flüssigen Medium und nachfolgende Filtrierung frei von vollständigen Körperzellen gewonnen wird. Als homologes Nährmedium wird aus dem Eigenblut gewonnenes Serum möglichst aus ein und derselben Blutprobe verwendet. Es können auch dem Nährmedium embryonale Proteinextrakte zugesetzt werden. Schließlich wird eine Inaktivierung durch Wärmebehandlung zur Fertigstellung einer Vakzine vorgenommen. Bei den erwähnten polymorphen Mikroorganismen handelt es sich insbesondere um sogenannte „Kommensalen“, die auch innerhalb der Zellorganisation vital bleiben können und sich unbeeinflusst von der körpereigenen Abwehr vermehren. Diese Mikroorganismen wurden unter anderem von Dr. R. Pekar, Wien und Bad Ischl, Dr. von Brehmer, München, Prof. Dr. Enderlein, Berlin, Dr. Prof. Dr. Gerlach, Wien und Dr. W. Reich, Wien und Berlin erforscht und beschrieben.

Beim Herstellungsverfahren nach der genannten Literaturstelle wird aus der Vene entnommenes Eigenblut des nüchternen Patienten mit Aqua ad injectionem gemischt und gut geschüttelt, so daß Hämolyse auftritt. Dieses Hämolsat wird drei Tage bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Ferner wird ebenfalls Eigenblut zur Gewinnung von Serum verwendet, das ebenfalls inkubiert wird. Schließlich wird das Hämolsat zentrifugiert, steril filtriert, einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen, um das Vorhandensein von vollständigen Zellen ausschließen zu können und endlich in das Serum, das hier ein homologes Nährmedium bildet, eingebracht. Nun erfolgt eine weitere Inkubation im Brutschrank, wobei ein Teil der Kultur mit sterilem Parafinöl überschichtet wird, um bei diesem Teil auch Formen zu züchten, die nur im anaeroben Milieu gedeihen. Die aerobe und die anaerobe Kultur werden dann zusammengeführt und ein sich hier bildender Bodensatz, der nun das Präparat bildet, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Die dabei erhaltene Suspension wird zwei Stunden lang bei 70° C inaktiviert. Dann werden aus der Suspension Verdünnungsstufen für parenterale Applikationen und Potenzierungen für enterale Verabreichungen hergestellt.

Wie sich aus den obigen Darlegungen ergibt, ist das bekannte Verfahren aufwendig, benötigt viele Kontrollen, weil durch die wechselnden Zusätze und Behandlungen Fremdkörper eingeschleust oder unerwünschte Reaktionen auftreten können, so daß das Verfahren in der Praxis nur in hochorganisierten Laboratorien angewendet werden kann, wobei der angestrebte Autoimmuneffekt nicht ausreichend sicher gewährleistet erscheint.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine in der Herstellung einfache Vakzine der eingangs geschilderten Art zu schaffen, die hoch wirksam ist, einen geringen Laboraufwand bei der Herstellung benötigt und bei der Herstellungsfehler oder die Einschleusung von unerwünschten Bestandteilen weitgehend ausgeschlossen sind.

Die erfindungsgemäße Vakzine ist dadurch gekennzeichnet, daß ihre Grundsubstanz aus einer durch Dispergierung aus dem von Eigenblutproben des jeweiligen Patienten gewonnenen und vom roten Blutbild und weißen Blutkörperchen befreiten BC (Buffy Coat = weißer Zellanteil) in wässriger Lösung erhaltenen Suspension besteht, in der die Zellen in (Kanülengängigkeit aufweisende) Zellfragmente zertrümmert und in an sich bekannter Weise durch Wärmebehandlung inaktiviert sind.

Der BC enthält nach den Erkenntnissen der Erfindung alle für die Vakzine interessanten Teile des Blutbildes und kann überdies unmittelbar aus einem Senkungsvorgang unterzogenen Blut-

proben erhalten werden. Die vom Arzt zur Entnahme der Eigenblutproben verwendeten Ampullen bzw. Injektionsspritzen können sogar als Gefäße für den Absetzvorgang Verwendung finden, so daß bis zur Weiterverarbeitung des BC Kontaminationen der Blutproben ebenso ausgeschlossen werden können, wie Präparatverwechslungen bei den länger dauernden Verfahren unter Einsatz von Brutschränken usw.. Für die Herstellung der Vakzine erhält das zuständige Labor die dem Absetzvorgang unterzogenen Blutproben und kann nun die Vakzine herstellen. Dabei wird der BC vom roten Blutbild und weißen Blutkörperchen befreit. Zur Herstellung der Suspension erfolgt ein Zusatz von steriler physiologischer Kochsalzlösung und eine Verarbeitung im Turbogenerator. Bei dieser Dispergierung im Turbogenerator werden die Zellen physikalisch zertrümmert, wobei die Größe der erhaltenen Fragmente durch die Drehzahl und die Verweildauer im Turbogenerator einflußbar ist. Dabei kann die Drehzahl zwischen 5.000 und 20.000 U/min gewählt werden. Auf jeden Fall ist im Hinblick auf die spätere Verwendung der Vakzine eine ausreichende Zertrümmerung der Zellen anzustreben, um die sogenannte Kanülgängigkeit zu gewährleisten. Durch die Dispergierung kommt es zu einer DNA und RNA-Freisetzung. Um sicher zu gehen, daß eine ausreichende Zertrümmerung der Zellen stattgefunden hat, kann nachträglich eine Kontrolle im Mikroskop z. B. im Phasenkontrastmikroskop mit Vergrößerungsfaktor 1.500 vorgenommen werden.

Nach weiteren der Erfindung zugrunde liegenden Erkenntnissen sind Tumor- und Immunzellen elektrisch negativ geladen. Um zu vermeiden, daß diese Spannungsbarriere bei Koppelmechanismen überwunden werden muß bzw. diese Mechanismen beeinträchtigt, sind erfindungsgemäß die Zellfragmente der Suspension depolarisiert. Diese Depolarisierung erfolgt einfach dadurch, daß die Suspension mit Gleichstrom durchflutet wird, wodurch es zu einem Ionenpotentialausgleich in den Ionenkanälen der Zellwandfragmente kommt und die Zellwandfragmente beidseits elektrisch neutral werden.

Schließlich kann in Weiterbildung der Erfindung die Vakzine mit Serumaktivatoren, Immunmodulatoren und nativen Zellen (Thymojekt) zur nach der Abfüllung in Ampullen und der inaktivierenden Wärmebehandlung gebrauchsfertigen Vakzine ergänzt sein.

Durch Serumaktivatoren werden im Blut des Patienten vorhandene pathogene Antikörper sterisch modifiziert. Sie induzieren deshalb nach der Verabreichung der Vakzine durch Reinjektion die Bildung von neuen spezifischen Antikörpern gegen die pathogenen Antikörper. Diese Antikörper komplexieren und unterdrücken die Synthese der pathogenen Antikörper im Sinne der Jerne'schen Netzwerktheorie.

Die erwähnten nativen Zellen, die zugesetzt werden, können aus der humanen Nabelschnur bzw. Föten von Schafen gewonnen werden.

Die erhaltenen Vakzine werden in der Immuntherapie eingesetzt. Indikationen sind Tumorleiden und Autoimmunkrankheiten. Die Wirkungsweise läßt sich dadurch erklären, daß das autologe (körpereigene) Eiweiß dem Organismus in lesbarer Form als Immunogen präsentiert wird. Durch die in der Vakzine enthaltenen Auslöser werden Informationen auf den Zellmembranen für das Immunsystem lesbar und erkennbar, so daß das Immunsystem wieder ansprechen und reagieren kann, wobei in der Praxis, nach bisherigen Erfahrungen, keine Operation mehr notwendig wird.

Ausführungsbeispiel für das Herstellungsverfahren:

Vorbereitung:

Gewinnung des BC

Das Blut wird vom Arzt mit drei 10-ml Spritzen nativ entnommen und verbleibt in den Spritzen. Die drei Spritzen werden senkrecht mit der Öffnung nach oben bei Raumtemperatur für

24 - 26 Stunden stehen gelassen; während dieser Zeit bildet sich der sogenannte BC.

Schritt 1:

- 5 Unter sterilen Kautelen (Steril banch) wird der Inhalt der drei Spritzen in eine sterile Petrischale gegeben. Mittels Pinzette und Skalpell wird der BC vom roten Blutbild getrennt und in ein separates steriles Gefäß gegeben; hinzugefügt werden 30 ml NaCl und 1 ml Serum.

Schritt 2:

- 10 Dispergierung des Inhalts mittels Turbogenerator mit 25.000 U/min über 10 Minuten.

Schritt 3:

- 15 Durchflutung der Suspension mit Gleichstrom für 10 Minuten zur Depolarisierung der Zellfragmente (weißes Blutbild, inkl. aller Komensalen und Onkomykoplasmen).

Schritt 4:

- 20 Durchblasung mit Ozongas 50 ml (zur Vorbeugung gegen eine theoretisch denkbare äußere Kontaminierung).

Schritt 5:

- 25 Hinzufügung von 1 ml Serumaktivator der Fa. Vitorgan. Hinzufügung von Immunmodulatoren und Thymojekt.

Schritt 6:

- 30 Abfüllen und sterilen Kautelen in sterile Impfstoffampullen; pro Amp. 1,5 ml.

Schritt 7:

Inaktivierung bei 70° C im Warmbad über 2 Stunden.

35

Ansprüche:

- 40 1. Vakzine auf der Basis von Eigenblut zur Durchführung einer Immuntherapie, insbesondere bei Tumorleiden und Autoimmunkrankheiten, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Grundsubstanz der Vakzine aus einer durch Dispergierung aus dem von Eigenblutproben des jeweiligen Patienten gewonnenen und vom roten Blutbild und weißen Blutkörperchen befreiten BC (Buffy Coat = weißer Zellanteil) in wässriger Lösung erhaltenen Suspension besteht, in der die Zellen in (Kanülengängigkeit aufweisende) Zellfragmente zertrümmert und in an sich bekannter Weise durch Wärmebehandlung inaktiviert sind.
- 45 2. Vakzine nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Zellenfragmente der Suspension depolarisiert sind.
- 50 3. Vakzine nach den Ansprüchen 1 und 2, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Suspension mit Serumaktivatoren, Immunmodulatoren und nativen Zellen (Thymojekt) zu nach der Abfüllung in Ampullen und der inaktivierenden Wärmebehandlung gebrauchsfertige Vakzine ergänzt ist.

55

Keine Zeichnung

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : A61K 35/14 (2006.01)		AT 009 320 U1
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: A61K 35/14		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): A61K		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, Fulltext, Medline		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 12.01.2006 eingereichten Ansprüchen erstellt.		
Die in der Gebrauchsmusterschrift veröffentlichten Ansprüche könnten im Verfahren geändert worden sein (§ 19 Abs. 4 GMG), sodass die Angaben im Recherchenbericht, wie Bezugnahme auf bestimmte Ansprüche, Angabe von Kategorien (X, Y, A), nicht mehr zutreffend sein müssen. In die dem Recherchenbericht zugrundeliegende Fassung der Ansprüche kann beim Österreichischen Patentamt während der Amtsstunden Einsicht genommen werden.		
Kategorie ^{*)}	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
Y	DE 42 04 132 A1 (PEKAR, R. und WINKELSTRÖTER, H.) 13. August 1992 (13.08.1992) Ansprüche 1, 3, 19, 16	1, 3
Y	WO 1999/038520 A1 (SHARMA, Y.) 5. August 1999 (05.08.1999) Ansprüche 1, 2, 5, 19, 35, 37	1, 3
A	REDMANN, K. et al. Macrophage membrane potential test: an electrophysiological modification of the Field-Caspary test in melanoma patients. Acta biologica et medica Germanica, DDR 1975, Band 34, Nr. 11-12, Seiten 1911-1914; Medline Zusammenfassung NLM788420 Medline Zusammenfassung NLM788420	1, 2
^{*)} Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist.		
Datum der Beendigung der Recherche: 28. März 2007		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER

Hinweis

Die **Kategorien** der angeführten Dokumente dienen in Anlehnung an die Kategorien der Entgegenhaltungen bei EP- bzw. PCT-Recherchenberichten zur raschen Einordnung des ermittelten Stands der Technik.

Bitte beachten Sie, dass nach **der Zahlung der Veröffentlichungsgebühr** die **Registrierung** erfolgt und die **Gebrauchsmusterschrift veröffentlicht** wird, auch wenn die Neuheit bzw. der erforderliche erfinderische Schritt nicht gegeben ist. In diesen Fällen könnte ein allfälliger **Antrag auf Nichtigkeitsklärung** (kann von jedermann gestellt werden) zur Löschung des Gebrauchsmusters führen. Auf das Risiko allfälliger im Fall eines Nichtigkeitsantrags anfallender Prozesskosten (die gemäß §§ 40 bis 55 Zivilprozessordnung zugesprochen werden) darf hingewiesen werden.

Ländercodes von Patentschriften (Auswahl, weitere Codes siehe **WIPO ST. 3**.)

AT = Österreich; **AU** = Australien; **CA** = Kanada; **CH** = Schweiz; **DD** = ehem. DDR; **DE** = Deutschland; **EP** = Europäisches Patentamt; **FR** = Frankreich; **GB** = Vereinigtes Königreich (UK); **JP** = Japan; **RU** = Russische Föderation; **SU** = Ehem. Sowjetunion; **US** = Vereinigte Staaten von Amerika (USA); **WO** = Veröffentlichung gem. PCT (WIPO/OMPI);

Die genannten Druckschriften können in der Bibliothek des Österreichischen Patentamtes während der Öffnungszeiten (Montag bis Freitag von 8 bis 12 Uhr 30, Dienstag von 8 bis 15 Uhr) unentgeltlich eingesehen werden. Bei der von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamtes betriebenen Kopierstelle können **Kopien** der ermittelten Veröffentlichungen bestellt werden.

Über den Link <http://at.espacenet.com/> können **Patentveröffentlichungen am Internet** kostenlos eingesehen werden.

Auf Bestellung gibt die von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamtes betriebene Serviceabteilung gegen Entgelt zu den im Recherchenbericht genannten Patentedokumenten allfällige veröffentlichte **"Patentfamilien"** (den selben Gegenstand betreffende Patentveröffentlichungen in anderen Ländern, die über eine gemeinsame Prioritätsanmeldung zusammenhängen) bekannt.

Auskünfte und Bestellmöglichkeit zu den Serviceleistungen erhalten Sie unter der Telefonnummer
+43 1 534 24 - 738 bzw. 739

Schriftliche Bestellungen:

per FAX Nr. + 43 1 534 24 – 737 oder per E-Mail an Kopierstelle@patentamt.at