

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Dezember 2005 (22.12.2005)

PCT

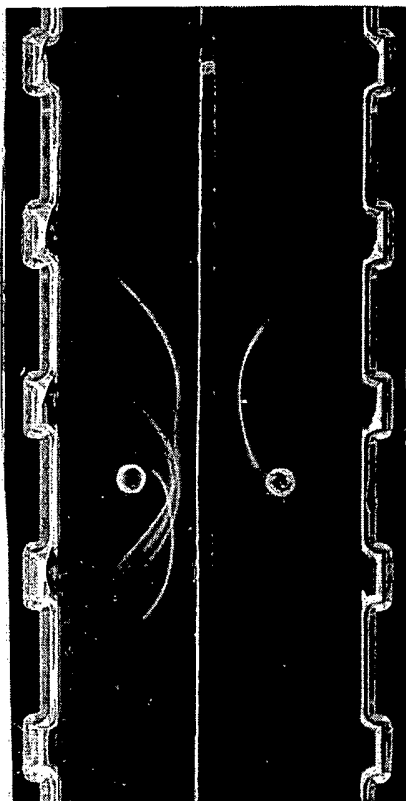
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/121802 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68, 10 2004 043 463.8
33/543, A61K 35/72 8. September 2004 (08.09.2004) DE
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/001008 10 2004 044 257.6
14. September 2004 (14.09.2004) DE
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juni 2005 (07.06.2005) (71) Anmelder und
(72) Erfinder: VOIGT, Heinz [DE/DE]; Im Mosig 8, 74249 Jagsthausen (DE). ZWERGER, Berthold [DE/DE]; Lazarettstrasse 6, 82467 Garmisch-Partenkirchen (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: WITZ, Michael; Paula-Ludwig-Weg 12, 80993 München (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 028 003.7 9. Juni 2004 (09.06.2004) DE
10 2004 042 801.8 3. September 2004 (03.09.2004) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROTEIN DIFFERENTIATION

(54) Bezeichnung: PROTEINDIFFERENZIERUNG



(57) Abstract: The invention relates to a method for protein differentiation, comprising the following steps: an antibody preparation is prepared; a differentiation agent is prepared; at least one fluid sample containing antigens is prepared; and a carrier medium, comprising at least one recess for holding the antibody preparation and a recess for holding the fluid sample is provided; the fluid sample is introduced into the recess for holding the fluid sample and the antigens that are contained in the fluid sample are isolated by electrophoresis; and the antibody preparation is left to react with the antigens that are contained in the fluid sample, in the presence of the differentiation agent. Said method is particularly suitable for the diagnosis of cancer and/or precancerosis, for estimating the chances of success and/or for controlling the treatment of cancer and/or precancerosis, in addition to estimating the sensitivity of medicaments and/or the chemical sensitivity of a test patient. The invention also relates to a device for protein differentiation. A mould extract with prophylactic, therapeutic and immunomodulating properties is among one of the differentiation agents that is disclosed by the invention.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Proteindifferenzierung, welches die Schritte umfasst, dass eine Antikörperzubereitung bereitgestellt wird, dass ein Differenzierungsmittel bereitgestellt wird, dass zumindest eine antigenhaltige fluide Probe bereitgestellt wird und dass ein Trägermedium bereitgestellt wird, welches zumindest eine Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und eine Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe aufweist, dass die fluide Probe in die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe gegeben wird und die in der fluiden Probe enthaltenen Antigene elektrophoretisch aufgetrennt werden, und dass die Antikörperzubereitung mit den in der fluiden Probe enthaltenen Antigenen in Gegenwart des Differenzierungsmittels reagieren gelassen wird. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, zur Abschätzung der Erfolgsaussichten und/oder zur Kontrolle einer Therapie

von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen sowie zur Abschätzung der Medikamentensensitivität und/oder der chemischen Sensitivität einer Testperson. Weiterhin wird eine Vorrichtung zur Proteindifferenzierung vorgeschlagen. Als Differenzierungsmittel wird u.a. ein Schimmelpilzextrakt vorgeschlagen, welcher zudem prophylaktische, therapeutische und immunmodulierende Eigenschaften aufweist.

WO 2005/121802 A1



CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

PROTEINDIFFERENZIERUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, eine Vorrichtung und einen Testkit zur Proteindifferenzierung, ein Arzneimittel zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, ein Arzneimittel zur gezielten Gewebeauflösung, ein Arzneimittel mit immunmodulierender Wirkung, ein Nahrungsergänzungsmittel zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen bzw. ein Nahrungsergänzungsmittel mit immunmodulierender Wirkung, sowie die Verwendung von Schimmelpilzextrakten zur Herstellung solcher Arzneimittel bzw. Nahrungsergänzungsmittel.

Aus US-A-4,244,803 (Spalte 1, Z. 37-67) sind Verfahren und Vorrichtungen zur Bestimmung von Proteinen in einer Antigenprobe mittels Immunelektrophorese bekannt, bei denen die Proteine in der zu analysierenden Mischung zunächst durch eindimensionale Elektrophorese auf einem geeigneten Gelträger aufgetrennt und anschließend senkrecht zur Elektrophoreserichtung einer Doppeldiffusion gegen ein Antiserum unterzogen werden, worauf sich im Bereich zwischen der Antiserumrinne und den fraktionierten Proteinen sogenannte Präzipitationslinien bilden, die dann einer quantitativen Auswertung unterzogen werden. Fig. 1 zeigt eine typische Vorrichtung zur Immunelektrophorese nach US-A-4,244,803.

Alternativ wird in US-A-4,244,803 (Spalte 2, Z. 15-26) ein Verfahren beschrieben, bei welchem die Antigene und Antikörper in geeigneten Vertiefungen vorgelegt werden, wobei die aufeinander zu gerichtete Wanderung der Antigene und Antikörper durch ein angelegtes elektrisches Feld beschleunigt wird, wodurch sich ebenfalls Präzipitationslinien bilden.

Allerdings wird in dieser zum Stand der Technik zählenden Patentschrift die erfindungsgemäße Proteindifferenzierung, insbesondere die Differenzierung des Proteoms einer gesunden Testperson vom Proteom eines an Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen leidenden Patienten, nicht erwähnt.

Es wird daher schon seit langem nach Alternativen zu derartigen Verfahren und Vorrichtungen gesucht, welche eine einfache und sichere Proteindifferenzierung ermöglichen, insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, zur Abschätzung der Erfolgsaussichten und/oder zur Kontrolle einer Therapie von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen sowie zur Abschätzung der Medikamentensensitivität und/oder chemischen Sensitivität einer Testperson.

Diese Aufgaben werden durch das erfindungsgemäße Verfahren, die erfindungsgemäße Vorrichtung und den erfindungsgemäßen Testkit zur Proteindifferenzierung nach den unab-

hängigen Patentansprüchen gelöst. Die abhängigen Ansprüche geben bevorzugte Ausführungsformen an.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Proteindifferenzierung, welches die Schritte umfasst, dass eine Antikörperzubereitung bereitgestellt wird, dass ein Differenzierungsmittel bereitgestellt wird, dass zumindest eine antigenhaltige fluide Probe bereitgestellt wird und dass ein Trägermedium bereitgestellt wird, welches zumindest eine Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und eine Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe aufweist, dass die fluide Probe in die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe gegeben wird und die in der fluiden Probe enthaltenen Antigene elektrophoretisch aufgetrennt werden und dass die Antikörperzubereitung mit den in der fluiden Probe enthaltenen Antigenen in Gegenwart des Differenzierungsmittels reagieren gelassen wird.

Prinzipiell kann das Differenzierungsmittel vor der Elektrophorese zur Anwendung kommen, indem es z.B. direkt zur fluiden Probe gegeben wird, wonach vorzugsweise inkubiert wird, oder bereits im Trägermedium vorhanden ist, oder es kann im Anschluss an die Elektrophorese zur Anwendung kommen, indem es z.B. in eine zusätzlich vorgesehene und zweckmäßig angeordnete Vertiefung des Trägermediums gegeben wird.

Zunächst wird die Ausführungsform behandelt, dass das Differenzierungsmittel vor der Elektrophorese, d.h. noch vor der Zugabe der fluiden Probe in die dafür vorgesehene Vertiefung(en), zur fluiden Probe gegeben wird.

Eine spezielle Ausführungsform dieses Verfahrens besteht darin, dass die Antikörperzubereitung vor der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene in die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung gegeben wird, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe so angeordnet sind, dass während der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen stattfindet. Der Vorteil dieser speziellen Ausführungsform besteht darin, dass die Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen dann beschleunigt abläuft. Die praktische Ausgestaltung entspricht vorzugsweise dem in der Literatur als Überwanderungselektrophorese bezeichneten Verfahren.

Eine weitere spezielle Ausführungsform dieses Verfahrens besteht darin, dass die Antikörperzubereitung nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene in die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung gegeben wird, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe so angeordnet und ausgestaltet sind, dass nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen stattfindet. Eine Möglichkeit der Aus-

gestaltung entspricht dem in der Literatur als Immunelektrophorese nach Grabar und Williams bezeichneten Verfahren.

Als Nächstes wird die Ausführungsform behandelt, dass das Differenzierungsmittel im Anschluss an die Elektrophorese zugegeben wird. Bei dieser Ausführungsform ist es von
5 großem Vorteil, wenn das Trägermedium eine zusätzliche Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels aufweist. Die Antikörperzubereitung und das Differenzierungsmittel werden dann nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene im Wesentlichen gleichzeitig in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung, die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe und die Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels so angeordnet sind, dass nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen in Gegenwart des Differenzierungsmittels stattfindet. Eine Möglichkeit der Ausgestaltung entspricht dem in der Literatur als Immunelektrophorese nach Grabar und Williams bezeichneten Verfahren, wobei eine zusätzliche Vertiefung (Rinne) zur Aufnahme des Differenzierungsmittels vorgesehen ist. Fig. 5 zeigt eine photographische Aufnahme einer geeigneten
10 Gelkonfiguration.

Es ist leicht einzusehen, dass alle hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen so ausgestaltet werden können, dass zusätzlich zur antigenhaltigen fluiden Probe zumindest eine Blindprobe bzw. Gegenprobe analysiert wird.

Als Trägermedium ist prinzipiell jedes Medium einsetzbar, das zur Elektrophorese und Immundiffusion geeignet ist. Vorzugsweise ist das Trägermedium ein Medium, welches aus der Gruppe, bestehend aus Agargel, Agarosegel, Polyacrylamidgel und Nitrocellulose, ausgewählt ist.

Die antigenhaltige fluide Probe ist vorzugsweise eine proteinhaltige biologische Probe,
25 die zweckmäßigerweise ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Cerebrospinalflüssigkeit, Gewebsflüssigkeit sowie aus Abstrichen, Biopsien und/oder Resektionen gewonnenem Material. Diese Aufzählung ist indessen nur als exemplarisch anzusehen, da das erfindungsgemäße Verfahren auch auf andere geeignete Proben übertragen werden kann.

Die Antikörperzubereitung enthält zweckmäßig eine oder mehrere Sorten von gegen die
30 in der fluiden Probe enthaltenen Antigene gerichteten Antikörpern und ist vorzugsweise ein polyklonales Antiserum, insbesondere ein Antihumanserum. Besonders bevorzugt ist die Antikörperzubereitung ein durch Immunisierung eines Säugetiers gewonnenes Antihumanserum.

Das Differenzierungsmittel ist vorzugsweise ein zur Proteindifferenzierung geeigneter Wirkstoff, der insbesondere aus Wirkstoffen bzw. chemischen Mitteln mit chemotherapeutischer, zytostatischer, antitumoraler, proteolytischer, mitosehemmender, metastasenhemmender und/oder angiogenesehemmender Wirkung ausgewählt ist. Als gut geeignet haben sich
5 Pflanzenextrakte, Schimmelpilzextrakte, Schimmelpilze, Schimmelpilzsporen, Hyphen, Mycel und Schimmelpilz-Biosyntheseprodukte sowie Mischungen davon erwiesen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann indessen jedes Medikament bzw. jeder Wirkstoff verwendet werden, der sich im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzen lässt, wobei eine interessante Verwendung des Verfahrens darin besteht, dass die Medikamentensensitivität bzw.
10 chemische Sensitivität einer Testperson gegen diesen Wirkstoff abgeschätzt wird.

Weiterhin hat es sich herausgestellt, dass Schimmelpilzextrakte auch zur *in vivo*-Proteindifferenzierung bzw. Gewebisdifferenzierung, d.h. als Bestandteil von Medikamenten und/oder Nahrungsergänzungsmitteln, verwendet werden können, worauf noch weiter unten eingegangen wird.

15 Der vorbezeichnete Schimmelpilzextrakt wird vorzugsweise aus einem Schimmelpilz der Gattung *Penicillium*, insbesondere der Arten *Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* und/oder *Penicillium roqueforti* gewonnen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen. Weiterhin ist es zur Abschätzung der Erfolgsaussichten
20 und/oder zur Kontrolle einer Therapie von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen sowie, wie oben erwähnt, zur Abschätzung der Medikamentensensitivität und/ oder der chemischen Sensitivität einer Testperson geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Proteindifferenzierung, welche insbesondere zur Durchführung der oben erwähnten Immunelektrophorese nach Grabar und Williams geeignet ist, wobei eine zusätzliche Vertiefung (Rinne) zur
25 Aufnahme des Differenzierungsmittels vorgesehen ist.

Diese Vorrichtung umfasst vorzugsweise ein Trägermedium mit einer Vertiefung zur Aufnahme einer Antikörperzubereitung, einer Vertiefung zur Aufnahme eines Differenzierungsmittels und zumindest einer Vertiefung zur Aufnahme einer antigenhaltigen fluiden
30 Probe, wobei das Trägermedium, die Antikörperzubereitung, das Differenzierungsmittel und die fluide Probe die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen.

In dieser Vorrichtung ist das Trägermedium vorzugsweise als rechteckige Platte mit einer größeren und einer kleineren Seitenlänge ausgebildet. Die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung ist vorzugsweise als langgestreckte, parallel zur größeren Seitenlänge

verlaufende, mittig angeordnete Rinne ausgebildet, die Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels als langgestreckte, parallel zur größeren Seitenlänge verlaufende und von der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung beabstandete, vorzugsweise gleich dimensionierte Rinne und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe als kreisförmige
5 Vertiefung, welche zwischen der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und der Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels angeordnet ist.

Besonders bevorzugt wird diese Vorrichtung in einer Ausgestaltung, wonach zwei Vertiefungen zur Aufnahme fluiden Proben vorgesehen sind, die von der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung im Wesentlichen gleich beabstandet sind, wobei die eine
10 Vertiefung zur Aufnahme der einen fluiden Probe zwischen der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und der Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels angeordnet ist. Fig. 5 gibt eine photographische Abbildung einer geeigneten Gelkonfiguration wieder

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Testkit zur Proteindifferenzierung, welcher das Trägermedium, die Antikörperzubereitung und das Differenzierungsmittel nach mindestens einem der vorausgehenden Definitionen umfasst. Mit einem derartigen Testkit können dem Anwender alle zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens notwendigen Materialien an die Hand gegeben werden.
15

Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, können die Schimmelpilzextrakte auch zur *in vivo*-Proteindifferenzierung bzw. Gewebsdifferenzierung, d.h. als Bestandteil von Medikamenten und/oder Nahrungsergänzungsmitteln, verwendet werden.
20

Krebs ist eine häufig auftretende, oft tödlich endende Krankheit, die durch ein entartetes Wachstum maligner Tumorzellen den Organismus mit unkontrolliert wuchernden und metastasierenden bösartigen Tumoren durchdringt und dadurch zur Zerstörung lebenswichtiger Organe oder Bestandteile des Organismus führt. Präkanzerosen sind morphologisch nachweisbare Vorstufen maligner Tumoren.
25

Es sind chemische Mittel, sogenannte Zytostatika, bekannt, die das Zellwachstum hemmen und infolge des schnellen ungeordneten Wachstums maligner Tumoren diese stärker angreifen als das gesunde Gewebe. Doch führen diese Zytostatika oft nicht zu einer dauerhaften Heilung der Krebserkrankung, sondern zu einer vorübergehenden Eindämmung und Verzögerung des Tumorwachstums, so dass ein erfolgreicher Einsatz von Zytostatika bei der Krebsbekämpfung nur eingeschränkt möglich ist. Außerdem schädigen diese Zytostatika infolge ihrer Wachstumshemmung auch die gesunden Zellen des Organismus und insbesondere das Immunsystem erheblich, so dass ihre Anwendung mit schweren Nebenwirkungen ver-
30

bunden ist. Überdies hat sich die Anwendung von Zytostatika nur bei bestimmten Tumorarten als erfolgversprechend erwiesen. Insgesamt sind also bisher keine chemischen Mittel für eine dauerhaft wirksame Krebsbekämpfung bekannt.

Es wird daher schon seit langem nach Alternativen zu derartigen chemischen Mitteln
5 gesucht. Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, ein natürliches Mittel zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/ oder Präkanzerosen bereitzustellen. Dieses Mittel sollte eine möglichst gute Wirksamkeit bei möglichst geringen Nebenwirkungen aufweisen. Weiterhin sollte das Mittel keine Schädigung des Immunsystems bewirken, sondern nach Möglichkeit eine günstige Wirkung auf das
10 Immunsystem entfalten. Es sollte vorzugsweise sowohl als Arzneimittel als auch als Nahrungsergänzungsmittel einsetzbar sein. Eine weitere Aufgabe bestand darin, eine möglichst günstige Herstellung für ein solches Mittel aufzufinden.

Diese Aufgaben werden durch die erfindungsgemäßen Arzneimittel und Nahrungsergänzungsmittel bzw. durch die erfindungsgemäße Verwendung der Schimmelpilzextrakte zur
15 Herstellung solcher Arzneimittel und Nahrungsergänzungsmittel nach den unabhängigen Patentansprüchen gelöst. Die abhängigen Ansprüche geben bevorzugte Ausführungsformen an.

Speisepilze, insbesondere Schitake, werden in der fernöstlichen Medizin traditionell zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen sowie zur Stärkung des Immunsystems eingesetzt. Demgegenüber stehen Schimmelpilze im Verdacht, aufgrund der von ihnen
20 produzierten Mykotoxine wie z.B. Aflatoxin krebserregend zu sein. In der Lebensmittelindustrie werden daher sogenannte Edelpilz-Kulturen eingesetzt. Aber auch den von diesen Edelpilzkulturen produzierten Mykotoxinen wird mit Argwohn begegnet.

In WO02/11563 wird ein Nahrungsergänzungsmittel zur Vorbeugung und Behandlung von Krebserkrankungen beschrieben, welches ein Biosyntheseprodukt von *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 enthält.
25

Es wurde nun überraschend gefunden, dass es möglich ist, aus Schimmelpilzen Extrakte herzustellen, die in Form von Arzneimitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln zur Lösung der obigen Aufgaben eingesetzt werden können.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Arzneimittel zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, welches
30 einen Schimmelpilzextrakt und gegebenenfalls pharmakologisch akzeptable Träger und/oder Füllstoffe enthält.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist in der Lage, aufgrund seiner mitosehemmenden Eigenschaften das auf einer raschen Zellteilung beruhende Wachstum von manifesten Tumo-

ren zu hemmen bzw. einer weiteren Entartung von Präkanzerosen entgegenzuwirken. Zudem eignet es sich aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften insbesondere bei lokaler Verabreichung dazu, bestehende Tumoren und Präkanzerosen aufzulösen. Es zeichnet sich mithin durch eine antitumorale Wirkung aus. Außerdem weist es insbesondere bei systemischer Verabreichung eine metastasenhemmende sowie vorbeugende Wirkung auf. Es wird vermutet, dass es darüber hinaus auch eine angiogenesehemmende Wirkung aufweist.

Obwohl die Gewinnung der besagten Schimmelpilzextrakte prinzipiell nicht auf bestimmte Schimmelpilze beschränkt ist, werden erfindungsgemäß Schimmelpilze der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und/oder *Fusarium* und insbesondere Schimmelpilze der Arten *Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* und/oder *Penicillium roqueforti* bevorzugt. Geeignete Schimmelpilzstämme können z.B. von der Wiesby GmbH & Co. KG, Niebüll, Deutschland (z.B. *Penicillium candidum*) bzw. von der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland (z.B. *Penicillium roqueforti* und *Penicillium camemberti*) bezogen werden.

Der im erfindungsgemäßen Arzneimittel enthaltene Schimmelpilzextrakt ist zweckmäßig ein zellfreier, vorzugsweise ein steril filtrierter und insbesondere ein pyrogenfreier Extrakt.

Weiterhin ist der Schimmelpilzextrakt zweckmäßig ein wässriger Extrakt. Alternativ ist auch ein Trockenextrakt und vorzugsweise ein lyophilisierter Extrakt möglich.

Allgemein ist das erfindungsgemäße Arzneimittel dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt ein Schimmelpilz-Biosyntheseprodukt, insbesondere ein Mykotoxin und/oder eine Protease enthält. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Schimmelpilz-Biosyntheseprodukte in synthetischer Form und natürliche Schimmelpilz-Biosyntheseprodukte als äquivalent anzusehen.

Das besagte Arzneimittel schädigt im Gegensatz zu den chemischen Mitteln des Standes der Technik das Immunsystem nicht. Darüber hinaus ist es in der Lage, die Wirkung dieser an sich bekannten chemischen Mittel in synergistischer Weise zu verstärken bzw. deren schädliche Wirkung abzuschwächen. Mit anderen Worten kann bei gleicher Dosierung der Zytostatika ein deutlich höherer Wirkungsgrad bzw. bei niedrigerer Dosierung der gleiche Wirkungsgrad erzielt werden. Dadurch können die Nebenwirkungen einer Chemotherapie erheblich reduziert werden.

Somit besteht eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung darin, dass das erfindungsgemäße Arzneimittel zusätzlich mindestens ein an sich bekanntes chemisches Mittel zur Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen enthält, insbesondere

ein Zytostatikum, welches beispielsweise aus Cyclophosphamid, Fluoruracil, Endoxan, Cisplatin und Mischungen daraus ausgewählt ist.

Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, wird angenommen, dass hier ein sogenannter Carrier-Effekt vorliegt. Das bedeutet, dass das Zytostatikum besser in die Zellen eingeschleust wird. Ebenso scheint es, dass die Kombination Zytostatikum/Schimmelpilzextrakt eine wesentlich längere Verweildauer im Körper besitzt. *In vitro*-Untersuchungen der Mitoserate in einer Zellkultur haben gezeigt, dass die Mitoserate beim Kombinationspräparat deutlich niedriger ist als beim Zytostatikum alleine. Analoges gilt für die Chromosomendarstellung.

Das besagte Arzneimittel schädigt also, wie schon gesagt, im Gegensatz zu den chemischen Mitteln des Standes der Technik das Immunsystem nicht. Vorzugsweise weist es eine immunmodulierende Wirkung auf, die auf seinem Gehalt an Schimmelpilzextrakt beruht. Ein derartiges Arzneimittel mit immunmodulierender Wirkung stellt daher einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nahrungsergänzungsmittel zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen Schimmelpilzextrakt gemäß obiger Definition, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält. Desgleichen stellt ein Nahrungsergänzungsmittel mit immunmodulierender Wirkung, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen Schimmelpilzextrakt gemäß obiger Definition, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält, einen weiteren Erfindungsgegenstand dar.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die Verwendungen eines Schimmelpilzextraktes gemäß obiger Definition zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur gezielten Gewebeauflösung, wobei im Falle der Auflösung von Tumoren die oben erwähnten mitosehemmenden und metastasehemmenden Eigenschaften von Vorteil sind, zur Herstellung eines Arzneimittels mit immunmodulierender Wirkung, zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen sowie zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels mit immunmodulierender Wirkung.

Prinzipiell ist die Gewinnung des besagten Schimmelpilzextraktes nicht auf bestimmte Herstellungsverfahren beschränkt. Allerdings ist es ratsam, ein Verfahren zu wählen, bei welchem eine ausreichende Wirksamkeit des Schimmelpilzextraktes gewährleistet ist, ohne dass

der Extrakt anschließend aufkonzentriert werden muss. Auch sollten sich die erforderlichen Reinigungsmaßnahmen zweckmäßigerweise auf ein Minimum beschränken. Weiterhin sollte der Schimmelpilzextrakt, der ja ebenfalls proteolytische Eigenschaften aufweist, sich bei der Lagerung nicht selbst zersetzen, was gegebenenfalls eine ausreichend lange Reifung des Schimmelpilzextraktes erfordert.

Bei dem nachfolgend beschriebenen Herstellungsverfahren müssen alle Schritte unter Sterilbedingungen durchgeführt werden, um eine Besiedlung mit Fremdkeimen auszuschließen. Die Verwendung eines Sterilarbeitsplatzes nach dem derzeitigen Stand der Technik ist daher unbedingt erforderlich.

Hierbei wird in einem geeigneten Nährmedium zunächst ein Schimmelpilzrasen herangezogen. Dieser Schimmelpilzrasen wird dann in einem Extraktionsmedium suspendiert. Anschließend werden die Zellwände der Schimmelpilzzellen aufgebrochen. Die erhaltene Suspension wird dann gegebenenfalls, vorzugsweise unter Anwendung von Scherkräften, einer Reifung unterzogen. Anschließend wird der Extrakt filtriert. Der so gewonnene Extrakt ist direkt zur Herstellung der oben beschriebenen Arzneimittel und Nahrungsergänzungsmittel verwendbar.

Prinzipiell ist jedes Nährmedium zur Anzucht des Schimmelpilzrasens geeignet, sofern es von den Schimmelpilzen verwertbare Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen enthält. Die Inokulierung mit Schimmelpilzen erfolgt zweckmäßig, indem lyophilisierte Schimmelpilzsporen in das ausgewählte Nährmedium gegeben werden. Gegebenenfalls kann der Schimmelpilzrasen später (einmal oder öfter) auf ein neues Medium übergeimpft werden.

Vorzugsweise werden die Schimmelpilze zunächst in einer Sabouraud-Glucose-Bouillon und anschließend auf einem Sabouraud-Glucose-Agar zu einem Schimmelpilzrasen herangezogen.

Prinzipiell eignet sich jedes Medium zur Suspension des Schimmelpilzrasens, um anschließend die Schimmelpilzzellen aufzubrechen, solange gewährleistet ist, dass das Suspensionsmedium die pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe der Schimmelpilze nicht zerstört. Vorzugsweise wird ein wässriges Medium verwendet. Alternativ ist z.B. ein alkoholisches oder wässrig-alkoholisches Medium verwendbar. Besonders gut geeignet ist isotonische Kochsalzlösung.

Schimmelpilzzellen weisen sehr widerstandsfähige Zellwände auf. Das Aufbrechen der Zellwände ist daher schwierig. Prinzipiell ist jedes Verfahren geeignet, mit dem die Zellwände wirksam aufgebrochen werden können, wenn gleichzeitig die pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe der Schimmelpilze geschont werden. Erfindungsgemäß werden die Zell-

wände der Schimmelpilzzellen in einer Zellaufschlussbombe aufgebrochen. Hierzu wird die Suspension der Schimmelpilzzellen in der Zellaufschlussbombe vorzugsweise wiederholt mit Stickstoff bis zu einem geeigneten Druck von ca. 100 bar beaufschlagt, jeweils ca. 30 Minuten äquilibriert und auf Normaldruck entspannt, wobei dieser Zyklus vorzugsweise mindestens zehn Mal durchgeführt wird. Es ist sinnvoll, beim Aufbrechen der Zellwände unter Eiskühlung zu arbeiten.

Die Modalitäten der Reifung der Zellsuspension sind von Fall zu Fall verschieden und müssen auf den Einzelfall abgestimmt werden. Es hat sich indessen gezeigt, dass eine Reifung der Suspension zweckmäßig durchgeführt werden kann, indem die Suspension unter Sterilbedingungen mindestens 8 Monate lang täglich eine Stunde lang einer Ultraschallbehandlung unterzogen wird.

Bei der Verwendung des besagten Schimmelpilzextraktes zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels und insbesondere eines Arzneimittels ist eine angemessene Reinheit des Extraktes erforderlich. Der Extrakt wird dazu zweckmäßig zunächst über Glaswolle und/oder Celite vorfiltriert, danach über ein Filter mit einer Porengröße von maximal 0,4 µm zellfrei filtriert und/oder vorzugsweise über ein Filter mit einer Porengröße von maximal 0,2 µm steril filtriert. Zur Herstellung eines Arzneimittels zur innerlichen Anwendung sollte der Extrakt anschließend gegebenenfalls mittels Ultrafiltration pyrogenfrei filtriert werden.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Die in den Beispielen verwendeten Agargele wiesen eine Agarkonzentration von ca. 1 % auf und waren mit TRIS-Puffer auf einen pH-Wert von ca. 8,5 gepuffert. In den Zeichnungen zeigen:

- Fig. 1 eine Vorrichtung zur Immunelektrophorese nach dem Stand der Technik;
- Fig. 2 den Verlauf der optischen Extinktion eines *Penicillium candidum*-Extraktes im Bereich von ca. 300 nm bis ca. 750 nm;
- Fig. 3 eine photographische Abbildung einer Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese einer Tumorgewebsflüssigkeit;
- Fig. 4 eine photographische Abbildung einer Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese einer Gewebsflüssigkeit eines gesunden Gewebes;
- Fig. 5 eine photographische Abbildung einer Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese einer Serumprobe eines Tumorpatienten;
- Fig. 6 eine photographische Abbildung einer Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese einer Serumprobe einer gesunden Testperson;

- Fig. 7 eine photographische Abbildung einer Agarplatte nach Beendigung einer Überwanderungselektrophorese von Serumproben eines Tumorpatienten;
- Fig. 8 eine mikrophotographische Aufnahme eines Blutkulturausstrichs ohne Schimmelpilzextrakt;
- 5 Fig. 9 eine mikrophotographische Aufnahme eines Blutkulturausstrichs mit *Penicillium roqueforti*-Extrakt;
- Fig. 10 eine mikrophotographische Aufnahme einer Biopsieprobe einer Präkanzerose vom Typ Morbus Bowen;
- Fig. 11 wie Fig. 4, jedoch nach einer medizinischen Behandlung mit *Penicillium candidum*-
10 Extrakt;
- Fig. 12 eine Ausschnittvergrößerung einer Chromosomendarstellung zur Bestimmung der Mitoserate;
- Fig. 13 eine Chromosomendarstellung zur Bestimmung der Mitoserate in einer Blutkultur ohne *Penicillium candidum*-Extrakt;
- 15 Fig. 14 eine Chromosomendarstellung zur Bestimmung der Mitoserate in einer Blutkultur mit *Penicillium candidum*-Extrakt;
- Fig. 15 eine mikrophotographische Aufnahme einer Mäuseleber-Zellkultur mit *Penicillium candidum*-Extrakt;
- Fig. 16 eine mikrophotographische Aufnahme einer Mäuseleber-Zellkultur ohne *Penicillium candidum*-Extrakt.
20

Beispiel 1: Herstellung eines *Penicillium candidum*-Extraktes

Die nachfolgenden Schritte wurden an einem Sterilarbeitsplatz unter laminarer Luftströmung durchgeführt. Eine Ampulle Sporenyophilisat des Schimmelpilzes *Penicillium candidum* Typ SA (Wiesby GmbH & Co. KG, Niebüll, Deutschland) wurde in 500 ml Sabouraud-Glucose-Bouillon (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Über Sterilfilter und Spru-
25 deleinsatz wurde die Lösung zwei Tage lang belüftet. Das dabei entstandene Mycel wurde auf Sabouraud-Glucose-Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überimpft. Nach fünf Tagen hatte sich ein durchgehender, ca. 3 mm starker Pilzrasen gebildet, der sich mühelos mit
30 einem sterilen Skalpell im Ganzen abziehen ließ. 60 g des Pilzmycels wurden unter sterilen Bedingungen in 600 ml isotonische Kochsalzlösung gegeben, mit einem Rührwerk suspendiert und anschließend in eine sterilisierte Zellaufschlussbombe mit 1850 ml Innenvolumen (Modell Nr. 4636, Parr Instrument Company, Moline, Ill., USA) überführt. Die Zellaufschlussbombe wurde unter Eiskühlung 10 Mal mit Stickstoff bis zu einem Druck von ca. 100

bar beaufschlagt, 30 Minuten lang äquilibriert und auf Normaldruck entspannt. (Vorsicht! Bei Überdruck-Arbeiten sind unbedingt die einschlägigen Sicherheitsbestimmungen zu beachten!) Die erhaltene Suspension wurde anschließend in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben, die Luft wurde mit Schutzgas (Stickstoff) verdrängt, der Kolben wurde mit einem Stopfen aus
5 sterilem Silikongummi verschlossen, acht Monate lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und täglich eine Stunde lang einer Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallbad unterzogen. Anschließend wurde zunächst über Glaswolle, Celite und schließlich über ein Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

Der so erhaltene Extrakt wies die folgenden Eigenschaften auf: Zur Bestimmung der optischen Drehung wurde ein Polarimeter mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt und der
10 Nullpunkt überprüft. Die Messung des Extraktes ergab eine Linksdrehung von 0,3°. Die Messung des Trockenrückstandes des Extraktes ergab einen Wert von 1,08 %. Die Messung des Extraktes mit einer Glaselektrode ergab einen pH-Wert von 4,83. Die Ergebnisse der Messung des optischen Extinktion im Bereich von ca. 300 nm bis ca. 750 nm (UV-Vis-Spektrum
15 des Extraktes) sind in Fig. 2 wiedergegeben.

Zur Messung der proteolytischen Wirkung des erhaltenen Extraktes wurde Kälberserum (Newborn Bovine Serum, Flow Laboratories, Irvine, UK) in 2 Proben à 1 ml portioniert. Eine Probe wurde mit 1 ml isotonischer Kochsalzlösung, die andere mit 1 ml des Extraktes vermischt. Nach Ablauf einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (21°C) wurde in
20 beiden Proben das Gesamteiweiß bestimmt. Die Messung erfolgte nach der allgemein anerkannten Biuretmethode mit einem Zeiss-Spektralphotometer. Da die Proben einen Serumanteil von nur 50 % aufwiesen, wurde das Probenvolumen verdoppelt (200 µl). Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{EA - EAB}{ES - ESB} \cdot 6 \text{ g/l}$$

25 wobei EA die Extinktion der Analyse, ES die Extinktion des Standards, EAB die Extinktion des Analysenblindwertes und ESB die Extinktion des Standardblindwertes ist. Es wurden folgende Konzentrationen errechnet: Probe mit isotonischer Kochsalzlösung: 10,4 g/100 ml. Probe mit Penicillium candidum-Extrakt: 8,8 g/100 ml. Demnach betrug die Eiweißreduktion in der Probe mit Penicillium candidum-Extrakt nach einer Stunde ca. 15 %.

30

Beispiel 2: Herstellung eines Penicillium roqueforti-Extraktes

Beispiel 1 wurde unter Verwendung von Sporenyophilisat des Blauschimmelpilzes Penicillium roqueforti (Wiesby GmbH & Co. KG, Niebüll, Deutschland) mit im Wesentlichen

identischen Ergebnissen wiederholt, wobei der erhaltene Extrakt jedoch keiner eingehenden analytischen Charakterisierung unterzogen wurde.

5 Beispiel 3: Immunelektrophorese nach Grabar und Williams mit Vorbehandlung der Proben mit Schimmelpilzsporen

Durch Einschneiden und Ausdrücken von Tumorgewebe (operativ entfernter, durch Histologie gesicherter Tumor) wurde ca. 1 ml Gewebsflüssigkeit gewonnen. Von einem nach Beispiel 2 auf Sabouraud-Glucose-Agar gewachsenen Pilzrasen des Blauschimmelpilzes *Penicillium roqueforti* wurden mit einer sterilen Lanzette Hyphen entnommen, mit denen die Gewebsflüssigkeit kontaminiert wurde. Danach wurde die Probe eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Verreiben mit einem Pistill in einem kleinen Achatmörser homogenisiert. Ca. 20 µl dieser Suspension wurden in der rechten kreisförmigen Vertiefung des Agargels gemäß Fig. 3 vorgelegt. Als Gegenprobe wurde vom selben Patienten gesundes Gewebe, nämlich Bauchdeckenmuskulatur, in gleicher Weise behandelt und in der rechten kreisförmigen Vertiefung des Agargels gemäß Fig. 4 vorgelegt. Gleichzeitig wurden in den beiden linken kreisförmigen Vertiefungen der Agarplatten jeweils ca. 20 µl unkontaminierte Gewebsflüssigkeit beider Gewebearten vorgelegt, d.h. Tumorgewebe in der Platte von Fig. 3 und gesundes Gewebe in der Platte von Fig. 4. Anschließend wurden die in diesen Proben enthaltenen Proteine bei einer Spannung von ca. 200 V und einer Stromstärke von ca. 15 mA während einer Zeitdauer von ca. 90 Minuten elektrophoretisch getrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden in die mittleren Rinnen der Gelplatten jeweils ca. 100 µl eines polyklonalen Ziegen-Antihumanserums einpipettiert (gewonnen mittels Immunisierung von Ziegen und anschließender Gewinnung der Immunglobuline aus Blutproben der - ansonsten unbehelligten - Versuchstiere) und die vollständige Ausbildung von Präzipitationslinien abgewartet (Dauer ca. 48 h). Fig. 3 gibt eine photographische Abbildung der Agarplatte nach Be-

10
15
20
25
30

endigung der Immunelektrophorese des Tumorgewebes wieder, Fig. 4 eine photographische Abbildung der Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese des gesunden Gewebes, wobei sich die Anoden jeweils am oberen Ende und die Kathoden jeweils am unteren Ende der Agarplatten befanden. Die Auswertung ergab, dass bei der kontaminierten Gewebsflüssigkeit aus Tumorgewebe praktisch alle Eiweißfraktionen mit Ausnahme einer vermutlich Albumin darstellenden Fraktion ausgelöscht waren, während bei gesundem Gewebe unabhängig von der Vorbehandlung keine nennenswerte Veränderung auftrat.

Dieser Versuch beweist, dass sich die Sporen des Blauschimmelpilzes *Penicillium roqueforti* (wohl über die Biosyntheseprodukte der Schimmelpilze) als Differenzierungsmittel

eignen, d.h. im erfindungsgemäßen Verfahren in der Lage sind, zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu differenzieren. (Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung können daher sowohl die Sporen, die Hyphen, das Mycel, die Schimmelpilze selbst und die Biosyntheseprodukte der Schimmelpilze als das Differenzierungsmittel angesehen werden.) (Lit: Grabar, P., Williams, C.A., Biochim. Biophys. Acta 10:193-4 (1953)).

Beispiel 4: Immunelektrophorese nach Grabar und Williams mit Vorbehandlung der Proben mit Schimmelpilzsporen

Beispiel 3 wurde unter Verwendung von Hyphen aus einem nach Beispiel 1 herangezogenen *Penicillium camemberti*-Schimmelpilzrasen mit im Wesentlichen identischen Ergebnissen wiederholt.

Beispiel 5: Modifizierte Immunelektrophorese nach Grabar und Williams mit zweiter Rille

Beispiel 3 wurde ohne Kontamination mit Pilzhypen, wiederholt. Ca. 20 µl des zu untersuchenden Serums eines Tumorpatienten wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden in die mittlere Rinne der Gelplatte gemäß Fig. 5 100 µl des Ziegen-Antihumanserums eingefüllt. Gleichzeitig wurden in eine am linken Rand des Gelträgers ausgestochene zweite Rille 100 µl des *Penicillium candidum*-Extraktes von Beispiel 1 eingefüllt. Fig. 5 gibt eine photographische Abbildung der Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese dieser Serumprobe wieder. Als Gegenprobe diente eine Trennung, die mit dem Serum einer gesunden Testperson durchgeführt wurde. Fig. 6 gibt eine photographische Abbildung der Agarplatte nach Beendigung der Immunelektrophorese dieser Serumprobe mit ebenfalls am linken Rand befindlicher zweiter Rinne wieder. Dieser Versuch beweist, dass sich der *Penicillium candidum*-Extrakt als Differenzierungsmittel eignet, d.h. im erfindungsgemäßen Verfahren in der Lage ist, zwischen dem Proteom einer gesunden Testperson und dem Proteom eines Tumorpatienten zu differenzieren. Weiterhin beweist dieser Versuch, dass im erfindungsgemäßen Verfahren eine Erkennung von Krebserkrankungen anhand von Serumproben möglich ist.

Beispiel 6: Modifizierte Überwanderungselektrophorese nach Bussard

Des Weiteren wurden Serumproben eines Tumorpatienten, welche eine Stunde vor dem Einpipettieren mit den nachfolgend angegebenen Zusätzen versetzt worden waren, einer modifizierten Überwanderungselektrophorese nach Bussard unterzogen, bei welcher im Prinzip in Abhängigkeit von den elektroosmotischen Eigenschaften des Gels die Antikörper in

Richtung Kathode und die Antigene in Richtung Anode wandern und beim Zusammentreffen sichtbare Präzipitationslinien bilden. In die mit K1, 2, 3, 4 markierten Startlöcher der Gelplatte gemäß Fig. 7 wurde polyklonales Antihumanserum einpipettiert. In die gegenüberliegenden Startlöcher wurden die Serumproben einpipettiert, und zwar eine mit isotonomischer Kochsalzlösung entsprechend verdünnte Serumprobe (K1), zwei mit einem *Penicillium candidum*-Extrakt nach Beispiel 1 versetzte Serumproben (2 und 4), wobei der Extrakt zuvor mit isotonomischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:3 verdünnt worden war (d.h. der Proteinabbau des verdünnten Extraktes betrug 5 % pro Stunde), sowie eine mit dem unverdünnten *Penicillium candidum*-Extrakt nach Beispiel 1 versetzte Serumprobe (3). Fig. 7 zeigt eine photographische Aufnahme des Gels nach Abschluss der Überwanderungselektrophorese. Wie zu erkennen ist, sind bei der mit den *Penicillium candidum*-Extrakten behandelten Proben (2, 3 und 4) die Präzipitationslinien im Vergleich zur unbehandelten Probe (K1) teilweise ausgelöscht. Besonders ausgeprägt tritt dieser Effekt bei dem unverdünnten *candidum*-Extrakt nach Beispiel 1 in Erscheinung.

15

Beispiel 7: Standardisierung eines *Penicillium candidum*-Extraktes

Beispiel 1 wurde wiederholt. In klinischen Selbstversuchen wurde ermittelt, dass diese Konzentration für injektive Anwendungen des Extraktes noch zu hoch war; es bildeten sich starke Nekrosen an der Injektionsstelle, die wahrscheinlich auf den hohen Proteasengehalt zurückzuführen waren. Nach einer Verdünnung des obigen Extraktes im Verhältnis 1:3 mit isotonomischer Kochsalzlösung (entsprechend einer Eiweißreduktion von ca. 5 % im verdünnten Extrakt) traten nach einer subkutanen Injektion von 1 ml praktisch keine Nekrosen mehr auf. Lediglich eine leichte Hautrötung wurde beobachtet, so dass diese Konzentration als praktikabel anzusehen war.

25 In diesem verdünnten *Penicillium candidum*-Extrakt betrug die L-gamma-Glutamyl-Transferase-Aktivität (gemessen mit dem Monotest "Gamma-GT Neu" der Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland; jetzt Roche Diagnostics GmbH) 8 enzymatische Einheiten pro Liter (8 E/l). (Vgl.: Szasz, G., Persijn, J.P. et al., Clin. Chemie und Clin. Biochem. 12 (1974) 228.)

30 Für klinische Anwendungen ist indessen eine exakte Standardisierung erforderlich. Es wird zweckmäßig auf Cyclopiazonsäure als Leittoxin standardisiert, welche mittels HPLC-Chromatographie (Silica-Säule, wässrig/alkoholisches Laufmittel) bestimmt werden kann.

Beispiel 8: Nachweis der mitosehemmenden Wirkung eines Penicillium roqueforti-Extraktes in einer Blutkultur

Venenblut wurde mit Heparinlösung (Heparin Novo, 25000 IE/5 ml) ungerinnbar gemacht. Das Blut wurde zentrifugiert und die Leukozyten, ein Teil der Erythrozyten und je 2 ml Plasma in 2 Zentrifugengläser überführt, die 7 ml McCoy's 5A Medium (Flow Laboratories, Irvine, UK) enthielten. Einer Kultur wurden 70 mg eines Penicillium roqueforti-Extraktes, der nach Beispiel 2 hergestellt worden war, sowie 2 ml isotonische Kochsalzlösung zugesetzt. Der anderen Kultur wurden lediglich 2 ml isotonische Kochsalzlösung zugesetzt. Beide Kulturen wurden anschließend 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden von beiden Kulturen Ausstriche angefertigt und mit Hemacolor (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Im unbehandelten Präparat (Fig. 8) wurden auf 100 Leukozyten 63 Zellteilungen gezählt, im behandelten Präparat (Fig. 9) kamen auf 100 Leukozyten lediglich 3 Zellteilungen. Dieser Versuch beweist die mitosehemmende Wirkung des Penicillium roqueforti-Extraktes.

15

Beispiel 9: Nachweis der mitosehemmenden Wirkung des Penicillium candidum-Extraktes in einer Blutkultur

In gleicher Weise wurde der Extrakt des Schimmelpilzes Penicillium candidum gemäß Beispiel 1 auf mitosehemmende Wirkung geprüft. Das Ergebnis war im Wesentlichen identisch mit dem des Pilzextraktes Penicillium roqueforti.

20

Beispiel 10: Klinischer Selbstversuch

Einer der Erfinder erkrankte an Morbus Bowen (Präkanzerose) am rechten Schienbein. Nach Sicherung der Diagnose durch Biopsie (vgl. Fig. 10) behandelt sich der Erfinder selbst, indem er täglich 2 ml des verdünnten Penicillium candidum-Extraktes gemäß Beispiel 7 ca. 1 cm neben der erkrankten Hautstelle injizierte. Nach zwei Wochen Behandlungsdauer war die Hautschwellung zurückgegangen und nur noch eine Narbe sichtbar. Eine Wiederholung der Biopsie zeigte ein völlig unverdächtiges Zellbild (vgl. Fig. 11).

25

Beispiel 11: Chromosomendarstellung (standardisierte Methode)

Zwei Durchstechfläschchen Chromosomenmedium 1A (Firma Gibco, Kalifornien, USA (jetzt Invitrogen Corporation): unveröffentlichte Mischung aus Eagle's Minimum Essential Medium, fötalem Kälberserum, Heparin, Antibiotika und Phytohaemagglutinin) wurden mit je 5 ml des beigefügten Lösungsmittels gelöst. In eines der Fläschchen wurde 0,2 ml

30

des verdünnten *Penicillium candidum*-Extraktes gemäß Beispiel 7, in das andere die gleiche Menge isotonischer Kochsalzlösung steril einpipettiert. Nachdem beide Fläschchen auf 37°C erwärmt waren, wurde in jedes 0,2 ml Venenblut gegeben. Danach wurden beide Proben 70 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit kam in jede der Proben 0,3 ml Colcemidlösung (10 µg/ml). Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit hypotonischer Kaliumchloridlösung (0,07 M) gewaschen. Danach wurden die Zellen auf einen gekühlten Objektträger aufgetropft und fixiert. Nach Färbung mit gepufferter Giemsalösung (pH 6,8) erfolgte der Einschluss in Entellan®. Die mikroskopische Auswertung ergab eine um ca. 70 % niedrigere Mitoserate bei der mit verdünntem *Penicillium candidum*-Extrakt gemäß Beispiel 1 behandelten Probe. Fig. 12 zeigt eine Ausschnittvergrößerung, Fig. 13 die Blutkultur ohne *Penicillium candidum*-Extrakt und Fig. 14 die Blutkultur mit *Penicillium candidum*-Extrakt.

Beispiel 12: Mitosehemmung in Zellkultur der Mäuseleber

Einer frisch getöteten Feldmaus (*Microtus arvalis*) wurde unter sterilen Bedingungen die Leber entnommen und mit einer Schere fein zerkleinert. Diese Leberpartikel wurden in einem Trypsinierungskolben mit EDTA-Trypsin (Firma Gibco, Kalifornien, USA (jetzt Invitrogen Corporation) und Eagle's Minimum Essential Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde homogen gemischt und in zwei gleich große Mengen geteilt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit je 5 ml Nährmedium (MEM, 10 % Kälberserum, 1 % NEAA) aufgenommen. Nach gründlichem Mischen wurde diese Lösung in zwei 50 ml-Kulturflaschen aus Kunststoff gefüllt. Einer Flasche wurde zusätzlich 5 µl *Penicillium candidum*-Extrakt gemäß Beispiel 1 zugegeben. Beide Kulturen wurden in einer Atmosphäre aus 20 % O₂, 75 % N₂ und 5 % CO₂ bei 37°C bebrütet. Die Kulturen wurden alle drei Tage mit neuem Nährmedium versorgt. Jedes Mal wurde neuer *Penicillium candidum*-Extrakt hinzugegeben. Nach drei Wochen zeigte sich, dass die Zellteilung in der mit *Penicillium candidum*-Extrakt vermischten Kultur (Fig. 15) wesentlich langsamer ablief, als in der anderen Kultur (Fig. 16).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Proteindifferenzierung, welches die Schritte umfasst,
dass eine Antikörperzubereitung bereitgestellt wird,
5 dass ein Differenzierungsmittel bereitgestellt wird,
dass zumindest eine antigenhaltige fluide Probe bereitgestellt wird und
dass ein Trägermedium bereitgestellt wird, welches zumindest eine Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und eine Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe aufweist,
10 dass die fluide Probe in die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe gegeben wird,
dass die in der fluiden Probe enthaltenen Antigene elektrophoretisch aufgetrennt werden
und dass die Antikörperzubereitung mit den in der fluiden Probe enthaltenen Antigenen
in Gegenwart des Differenzierungsmittels reagieren gelassen wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungsmittel zur fluiden Probe gegeben wird, bevor diese in die dafür vorgesehene Vertiefung des Trägermediums gegeben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperzubereitung
20 vor der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene in die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung gegeben wird, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe so angeordnet sind, dass während der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen stattfindet.
25
4. Verfahren nach Anspruch 3, welches als Überwanderungselektrophorese ausgestaltet ist.
5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperzubereitung
30 nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene in die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung gegeben wird, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe so angeordnet sind, dass nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen stattfindet.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermedium eine zusätzliche Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels aufweist und die Antikörperzubereitung und das Differenzierungsmittel nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene im Wesentlichen gleichzeitig in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben werden, wobei die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung, die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe und die Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels so angeordnet sind, dass nach der elektrophoretischen Auftrennung der Antigene eine Reaktion der Antikörperzubereitung mit den Antigenen in Gegenwart des Differenzierungsmittels stattfindet.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, welches als Immunelektrophorese nach Grabar und Williams ausgestaltet ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermedium ein Medium, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Agargel, Agarosegel, Polyacrylamidgel und Nitrocellulose, ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die antigenhaltige fluide Probe eine proteinhaltige biologische Probe ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die fluide Probe aus der Gruppe, bestehend aus Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Cerebrospinalflüssigkeit, Gewebsflüssigkeit sowie aus Abstrichen, Biopsien und/oder Resektionen gewonnenem Material, ausgewählt ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperzubereitung ein gegen die in der fluiden Probe enthaltenen Antigene gerichtetes polyklonales Antiserum ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Antiserum ein Antihumanserum ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungsmittel ein zur Proteindifferenzierung geeigneter Wirkstoff ist.
- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungsmittel aus Wirkstoffen mit chemotherapeutischer, zytostatischer, antitumoraler, proteolytischer, mitosehemmender, metastasenhemmender und/oder angiogenesehemmender Wirkung ausgewählt ist.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungsmittel aus Pflanzenextrakten, Schimmelpilzextrakten, Schimmelpilzen, Schimmelpilzsporen, Hyphen, Mycel und Schimmelpilz-Biosyntheseprodukten sowie Mischungen davon ausgewählt ist.
- 15 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt aus einem Schimmelpilz der Gattung *Penicillium*, insbesondere der Arten *Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* und/oder *Penicillium roqueforti* gewonnen wurde.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Diagnose von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Abschätzung der Erfolgsaussichten und/oder zur Kontrolle einer Therapie von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.
- 25 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Abschätzung der Medikamentensensitivität und/oder chemischen Sensitivität einer Testperson.
- 30 20. Vorrichtung zur Proteindifferenzierung, umfassend ein Trägermedium mit einer Vertiefung zur Aufnahme einer Antikörperzubereitung, einer Vertiefung zur Aufnahme eines Differenzierungsmittels und zumindest einer Vertiefung zur Aufnahme einer antigenhaltigen fluiden Probe, wobei das Trägermedium, die Antikörperzubereitung, das Differenzierungsmittel und die fluide Probe die in den vorausgehenden Ansprüchen angegebenen Bedeutungen aufweisen.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermedium als rechteckige Platte mit einer größeren und einer kleineren Seitenlänge ausgebildet ist.
- 5 22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung als langgestreckte, parallel zur größeren Seitenlänge verlaufende, mittig angeordnete Rinne ausgebildet ist, die Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels als langgestreckte, parallel zur größeren Seitenlänge verlaufende und von der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung beabstandete Rinne ausgebildet ist und die Vertiefung zur Aufnahme der fluiden Probe als kreisförmige Vertiefung ausgebildet ist, welche zwischen der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und der Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels angeordnet ist.
- 10 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass zwei Vertiefungen zur Aufnahme fluiden Proben vorgesehen sind, die von der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung im Wesentlichen gleich beabstandet sind, wobei die eine Vertiefung zur Aufnahme der einen fluiden Probe zwischen der Vertiefung zur Aufnahme der Antikörperzubereitung und der Vertiefung zur Aufnahme des Differenzierungsmittels angeordnet ist.
- 15 24. Testkit zur Proteindifferenzierung, umfassend das Trägermedium, die Antikörperzubereitung und das Differenzierungsmittel nach mindestens einem der vorausgehenden Ansprüche.
- 20 25. Arzneimittel zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Schimmelpilzextrakt, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält.
- 25 26. Arzneimittel nach Anspruch 25, gekennzeichnet durch eine antitumorale, proteolytische, mitosehemmende und/oder metastasenhemmende Wirkung.
- 30 27. Arzneimittel nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt aus einem Schimmelpilz den Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und/oder *Fusarium* gewonnen wurde.

28. Arzneimittel nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilz den Arten *Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* und/oder *Penicillium roqueforti* angehört.
- 5
29. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt ein zellfreier, vorzugsweise steril filtrierter und insbesondere pyrogenfreier Extrakt ist.
- 10
30. Arzneimittel nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt ein wässriger Extrakt ist.
31. Arzneimittel nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt ein Trockenextrakt, vorzugsweise ein lyophilisierter Extrakt ist.
- 15
32. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 25 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt ein Schimmelpilz-Biosyntheseprodukt, insbesondere ein Mykotoxin und/oder eine Protease, gegebenenfalls auch in synthetischer Form, enthält.
- 20
33. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 25 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens ein an sich bekanntes chemisches Mittel zur Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, insbesondere ein Zytostatikum, enthält.
- 25
34. Arzneimittel nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das chemische Mittel aus Cyclophosphamid, Fluoruracil, Endoxan, Cisplatin und Mischungen daraus ausgewählt ist.
- 30
35. Arzneimittel mit immunmodulierender Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Schimmelpilzextrakt gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält.
36. Nahrungsergänzungsmittel zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Schimmelpilzextrakt

gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält.

- 5 37. Nahrungsergänzungsmittel mit immunmodulierender Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Schimmelpilzextrakt gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32, gegebenenfalls zusammen mit pharmakologisch akzeptablen Trägern und/oder Füllstoffen, enthält.
- 10 38. Verwendung eines Schimmelpilzextraktes gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.
- 15 39. Verwendung eines Schimmelpilzextraktes gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32 zur Herstellung eines Arzneimittels zur gezielten Gewebeauflösung.
40. Verwendung eines Schimmelpilzextraktes gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32 zur Herstellung eines Arzneimittels mit immunmodulierender Wirkung.
- 20 41. Verwendung eines Schimmelpilzextraktes gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32 zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels zur Vorbeugung und/oder Heilung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.
- 25 42. Verwendung eines Schimmelpilzextraktes gemäß der Definition eines der Ansprüche 27 bis 32 zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels mit immunmodulierender Wirkung.
- 30 43. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzextrakt hergestellt wurde, indem unter Sterilbedingungen:
- a) in einem geeigneten Nährmedium ein Schimmelpilzrasen herangezogen wurde,
 - b) dieser Schimmelpilzrasen in einem Extraktionsmedium suspendiert wurde,
 - c) die Zellwände der Schimmelpilzzellen aufgebrochen wurden,
 - d) die erhaltene Suspension gegebenenfalls, vorzugsweise unter Anwendung von Scherkräften, einer Reifung unterzogen wurde, und
 - e) der Extrakt anschließend filtriert wurde.

44. Verwendung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass Schimmelpilze zunächst in einer Sabouraud-Glucose-Bouillon und anschließend auf einem Sabouraud-Glucose-Agar zu einem Schimmelpilzrasen herangezogen wurden.
- 5
45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Schimmelpilzrasen in isotonischer Kochsalzlösung suspendiert wurde.
46. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 45, dadurch gekennzeichnet, dass die
10 Zellwände der Schimmelpilzzellen in einer Zellaufschlussbombe aufgebrochen wurden.
47. Verwendung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Schimmelpilzzellen in der Zellaufschlussbombe wiederholt mit Stickstoff bis zu einem Druck von ca. 100 bar beaufschlagt wurden, jeweils ca. 30 Minuten äquilibriert wurden, auf Normaldruck
15 entspannt wurden und dass dieser Zyklus mindestens zehnmal durchgeführt wurde.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene Suspension unter Sterilbedingungen mindestens 8 Monate lang täglich eine Stunde lang einer Ultraschallbehandlung unterzogen wurde.
- 20
49. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 48, dadurch gekennzeichnet, dass der Extrakt zunächst über Glaswolle und/oder Celite vorfiltriert wurde, danach über ein Filter mit einer Porengröße von maximal 0,4 µm zellfrei filtriert wurde, vorzugsweise über ein Filter mit einer Porengröße von maximal 0,2 µm steril filtriert wurde, und anschließend gegebenenfalls mittels Ultrafiltration pyrogenfrei filtriert wurde.
- 25

Zeichnungen

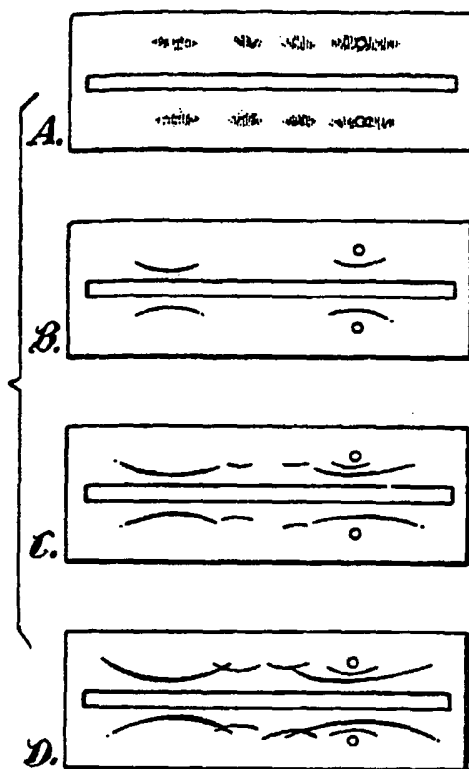


Fig. 1

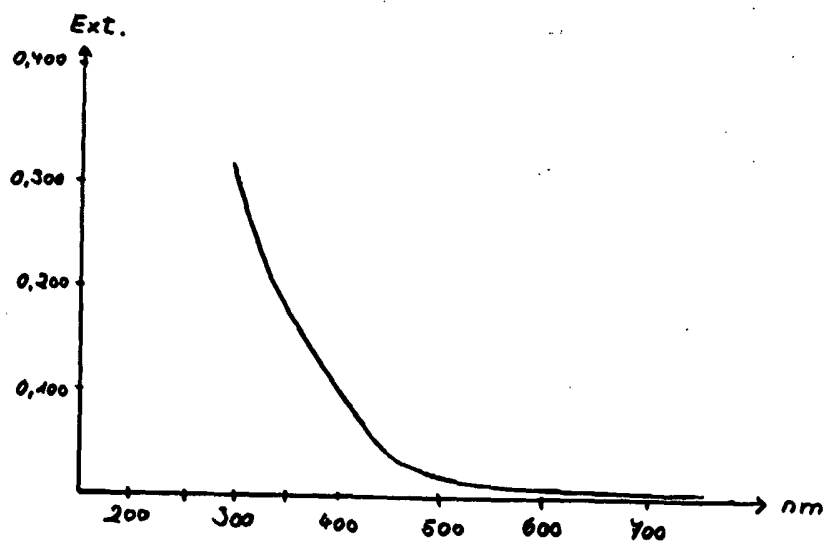


Fig. 2

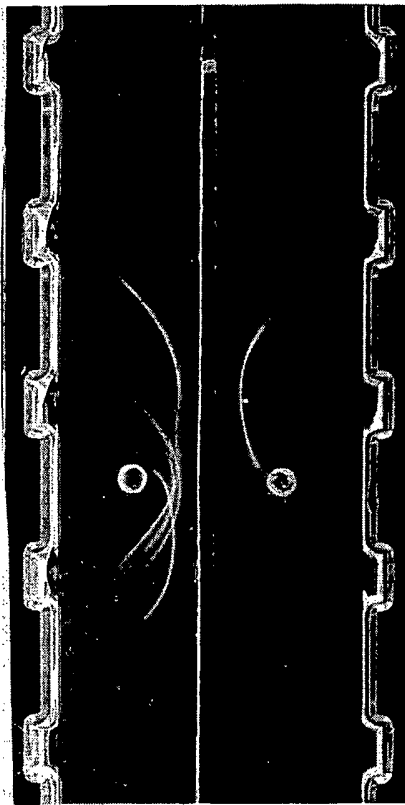


Fig. 3

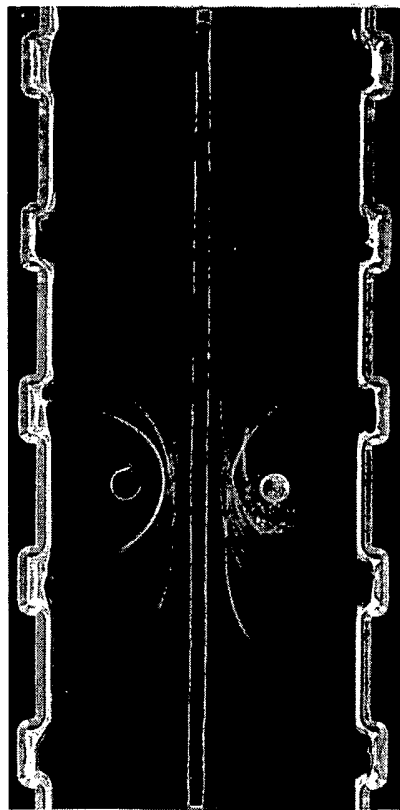


Fig. 4

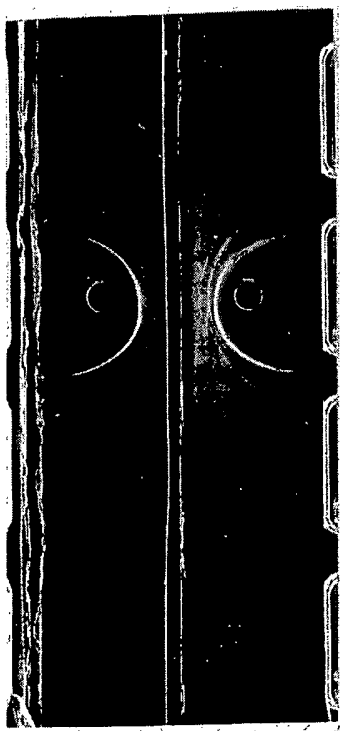


Fig. 5

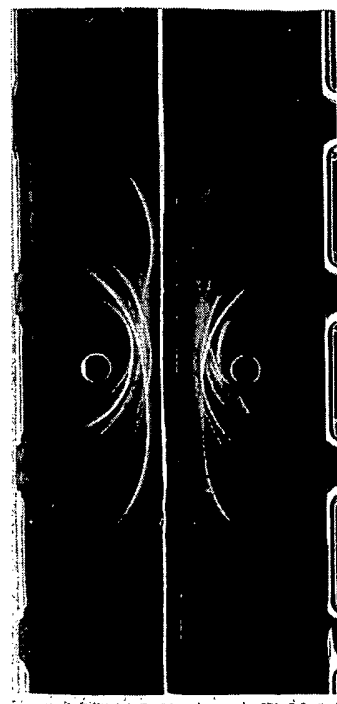


Fig. 6

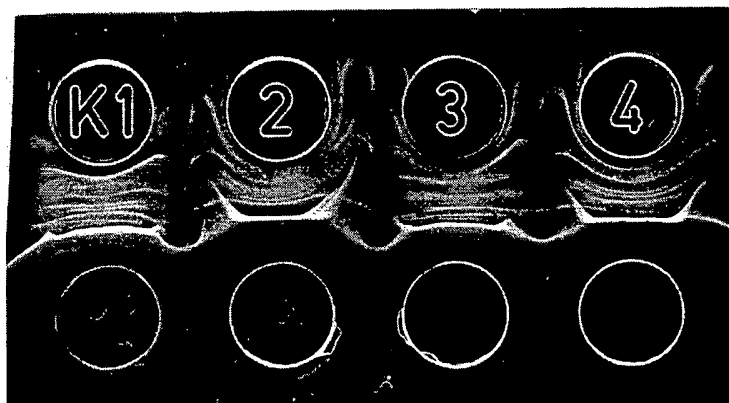


Fig. 7

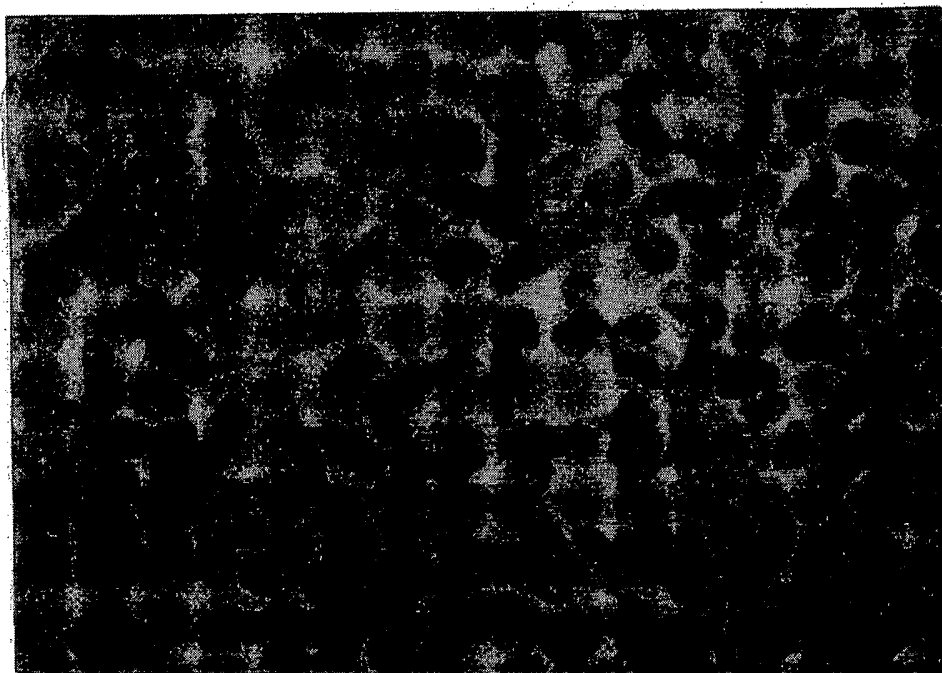


Fig. 8

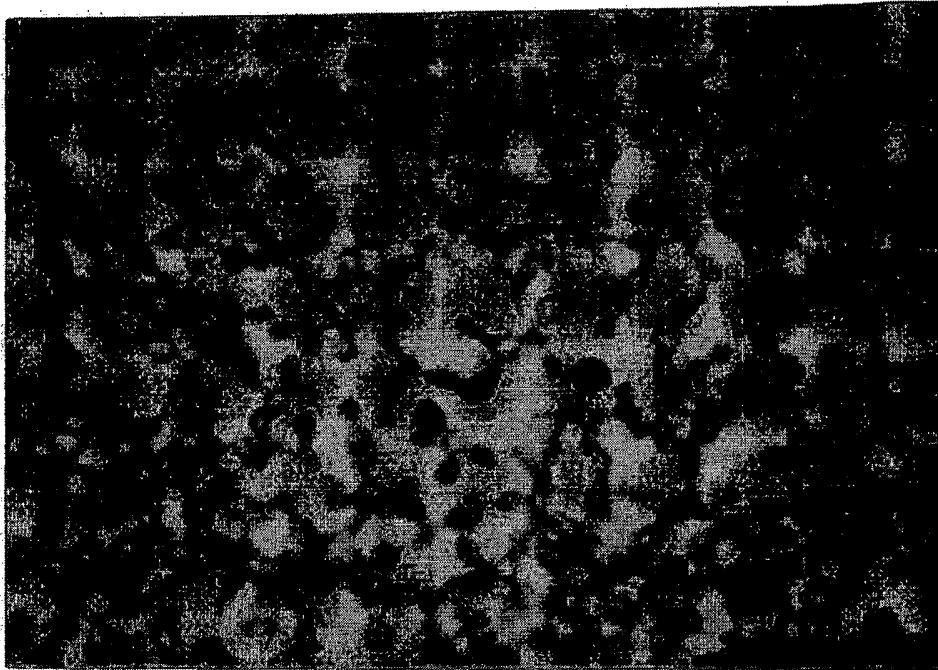


Fig. 9

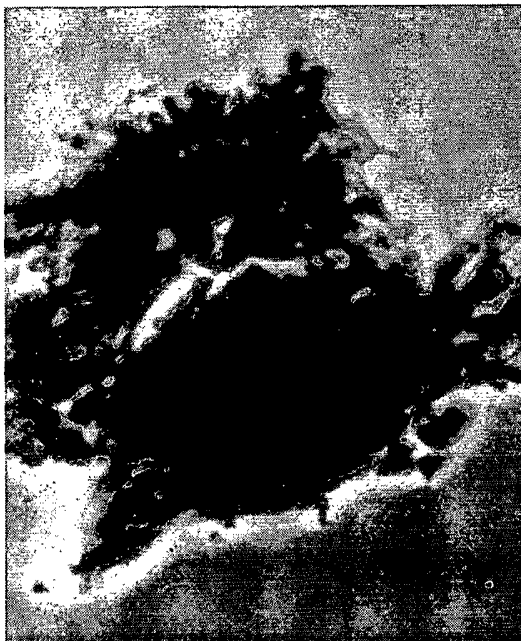


Fig. 10

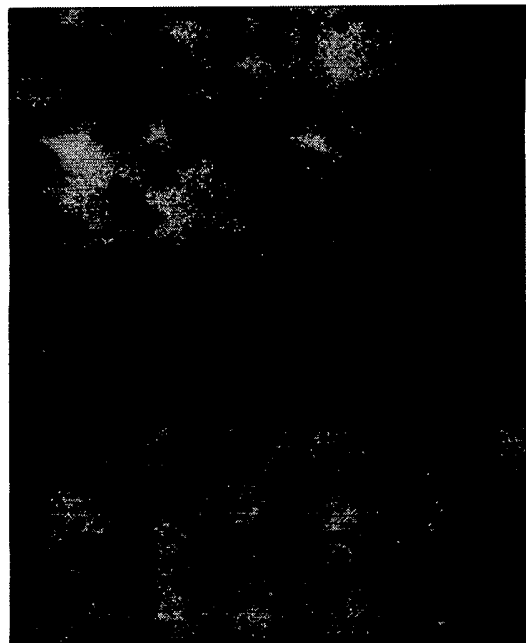


Fig. 11

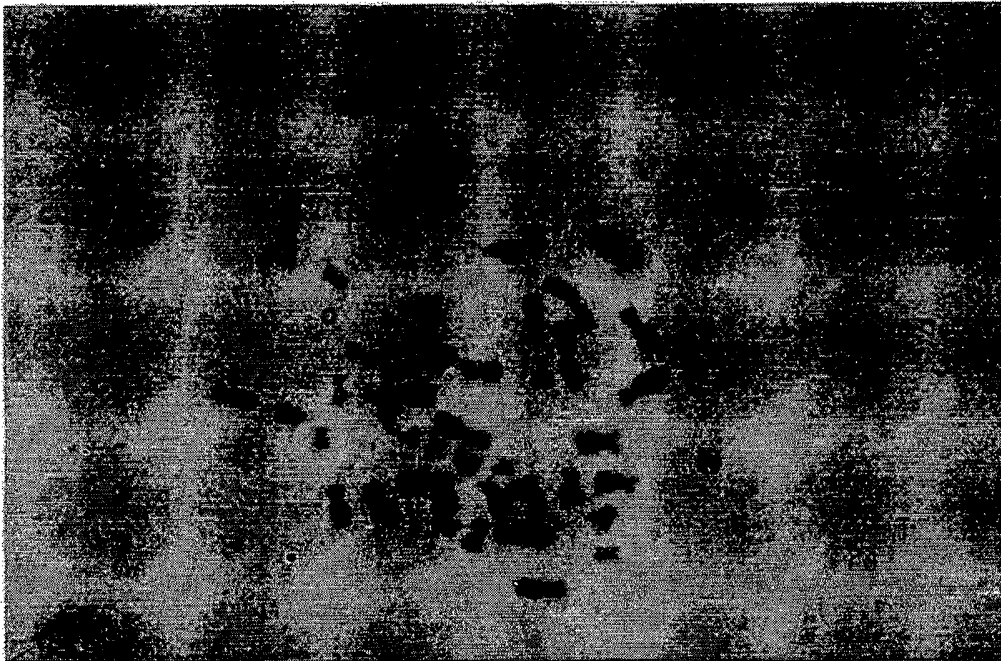


Fig. 12

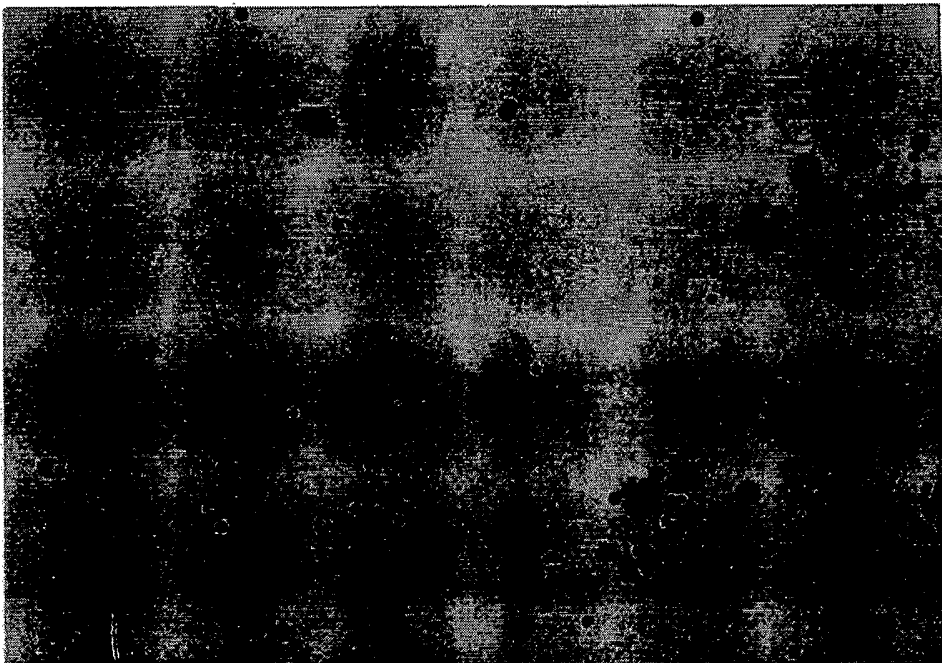


Fig. 13

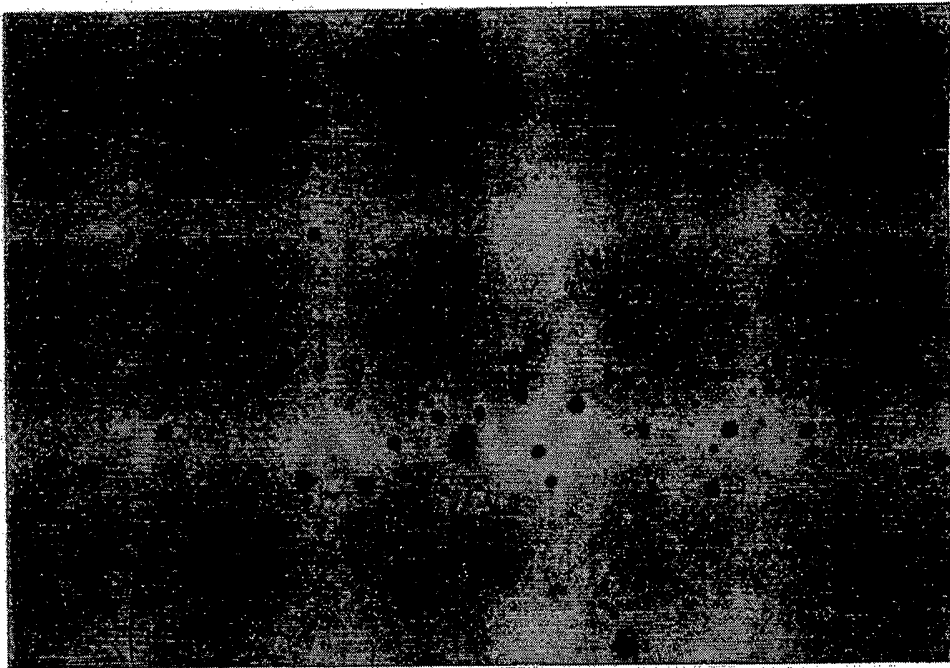


Fig. 14

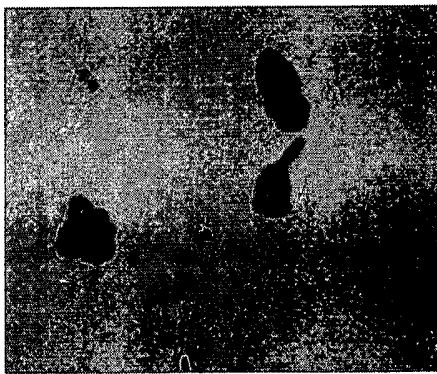


Fig. 15

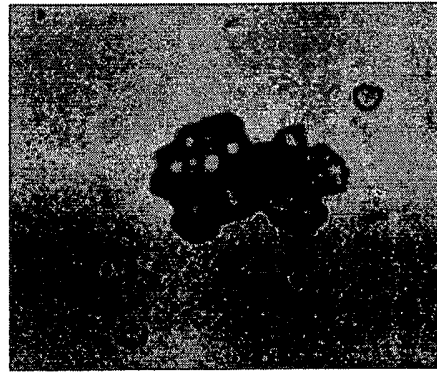


Fig. 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/001008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 G01N33/543 A61K35/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILKINS M R ET AL: "FROM PROTEINS TO PROTEOMES: LARGE SCALE PROTEIN IDENTIFICATION BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS AND AMINO ACID ANALYSIS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 14, January 1996 (1996-01), pages 61-65, XP002923558 ISSN: 1087-0156 the whole document	1,3,4, 7-13, 20-24
X	US 5 500 359 A (SOLVAY ENZYMES) 19 March 1996 (1996-03-19) the whole document	25-27, 29-35, 38-40
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 2005

Date of mailing of the international search report

17/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/001008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BANKS R E ET AL: "THE POTENTIAL USE OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION TO SELECTIVELY OBTAIN DISTINCT POPULATIONS OF CELLS FOR PROTEOMIC ANALYSIS - PRELIMINARY FINDINGS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 20, no. 4/5, April 1999 (1999-04), pages 689-700, XP000925546 ISSN: 0173-0835 page 691, left-hand column -----</p>	<p>1, 3, 4, 7-13, 20-24</p>
X	<p>WO 02/11563 A (SARDARYAN, E) 14 February 2002 (2002-02-14) the whole document -----</p>	<p>25-27, 29-49</p>
X	<p>CA 2 385 744 A (ZENTARIS GMBH) 9 November 2002 (2002-11-09) the whole document -----</p>	<p>25-27, 29-35, 38-40</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2005/001008

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5500359	A	19-03-1996	AU 699133 B2	26-11-1998
			AU 7706294 A	18-04-1995
			BR 9407660 A	28-01-1997
			CA 2172261 A1	06-04-1995
			CN 1134671 A	30-10-1996
			EP 0725646 A1	14-08-1996
			FI 961380 A	26-03-1996
			WO 9508998 A1	06-04-1995
			JP 9503206 T	31-03-1997
			NO 961226 A	23-05-1996
			US 5562900 A	08-10-1996
			US 5662902 A	02-09-1997
			US 5662903 A	02-09-1997
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
WO 0211563	A	14-02-2002	AU 7625501 A	18-02-2002
			BG 107615 A	28-11-2003
			BR 0113121 A	22-07-2003
			CA 2419066 A1	14-02-2002
			CN 1446053 A	01-10-2003
			CZ 20002950 A3	12-12-2001
			EE 200300057 A	15-12-2004
			EP 1320300 A1	25-06-2003
			HU 0301241 A2	28-08-2003
			JP 2004504861 T	19-02-2004
			MX PA03001059 A	14-06-2004
			NO 20030629 A	13-03-2003
			NZ 524555 A	24-09-2004
			PL 359845 A1	06-09-2004
			SK 842003 A3	02-05-2003
			US 2004105864 A1	03-06-2004
			ZA 200301247 A	14-05-2004
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
CA 2385744	A	09-11-2002	NONE	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/68 G01N33/543 A61K35/72

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WILKINS M R ET AL: "FROM PROTEINS TO PROTEOMES: LARGE SCALE PROTEIN IDENTIFICATION BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS AND AMINO ACID ANALYSIS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 14, Januar 1996 (1996-01), Seiten 61-65, XP002923558 ISSN: 1087-0156 das ganze Dokument	1, 3, 4, 7-13, 20-24
X	US 5 500 359 A (SOLVAY ENZYMES) 19. März 1996 (1996-03-19) das ganze Dokument	25-27, 29-35, 38-40
	----- -/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Oktober 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/11/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno de Vega, C

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001008

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BANKS R E ET AL: "THE POTENTIAL USE OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION TO SELECTIVELY OBTAIN DISTINCT POPULATIONS OF CELLS FOR PROTEOMIC ANALYSIS - PRELIMINARY FINDINGS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, Bd. 20, Nr. 4/5, April 1999 (1999-04), Seiten 689-700, XP000925546 ISSN: 0173-0835 Seite 691, linke Spalte -----	1,3,4, 7-13, 20-24
X	WO 02/11563 A (SARDARYAN, E) 14. Februar 2002 (2002-02-14) das ganze Dokument -----	25-27, 29-49
X	CA 2 385 744 A (ZENTARIS GMBH) 9. November 2002 (2002-11-09) das ganze Dokument -----	25-27, 29-35, 38-40

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001008

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5500359	A	19-03-1996	AU 699133 B2 26-11-1998
			AU 7706294 A 18-04-1995
			BR 9407660 A 28-01-1997
			CA 2172261 A1 06-04-1995
			CN 1134671 A 30-10-1996
			EP 0725646 A1 14-08-1996
			FI 961380 A 26-03-1996
			WO 9508998 A1 06-04-1995
			JP 9503206 T 31-03-1997
			NO 961226 A 23-05-1996
			US 5562900 A 08-10-1996
			US 5662902 A 02-09-1997
			US 5662903 A 02-09-1997
			WO 0211563
BG 107615 A 28-11-2003			
BR 0113121 A 22-07-2003			
CA 2419066 A1 14-02-2002			
CN 1446053 A 01-10-2003			
CZ 20002950 A3 12-12-2001			
EE 200300057 A 15-12-2004			
EP 1320300 A1 25-06-2003			
HU 0301241 A2 28-08-2003			
JP 2004504861 T 19-02-2004			
MX PA03001059 A 14-06-2004			
NO 20030629 A 13-03-2003			
NZ 524555 A 24-09-2004			
PL 359845 A1 06-09-2004			
SK 842003 A3 02-05-2003			
US 2004105864 A1 03-06-2004			
ZA 200301247 A 14-05-2004			
CA 2385744	A	09-11-2002	KEINE