



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 411 425 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 872/2002

(51) Int. Cl.⁷: A61K 35/78

(22) Anmeldetag: 07.06.2002

(42) Beginn der Patentdauer: 15.06.2003

(45) Ausgabetag: 26.01.2004

(56) Entgegenhaltungen:
EP 0799578A2 EP 0770324A2

(73) Patentinhaber:
ÖKOPHARM FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGS-GMBH
A-5580 UNTERNBERG, SALZBURG (AT).

(54) VERWENDUNG EINES AUS ELEKTROLYTANGEREICHERTEN PFLANZENKEIMLINGEN
HERGESTELLTEN PRÄPARATES

AT 411 425 B

(57) Beschrieben wird die Verwendung eines aus elektrolyt-
angereicherten Pflanzenkeimlingen hergestellten Präpara-
tes zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur
T-Lymphozytenvermehrung.

Die Erfindung betrifft neue Verwendungen von Präparaten, die aus elektrolytangereicherten Keimlingen hergestellt werden.

Während der positive Einfluss regelmäßigen Obst-, Gemüse und Ballaststoff-Konsums auf die Gesundheit und das Immunsystem unbestritten ist, zeigt die Zufuhr einzelner isolierter Vitamine oft widersprüchliche Ergebnisse in klinischen Untersuchungen und Interventionsstudien.

Es ist bekannt, dass bedarfssadäquat dosierte und kombinierte Mikronährstoff-Komplexe einen positiven Einfluss auf das Immunsystem von HIV-positiven Patienten haben, insbesondere den Quotienten aus T-Helferzellen und T-Suppressorzellen steigern können (N. Fuchs et alii: WMW 1996; 145:483-493. I. Guth et alii: J.f.Ortho Med. 5; 4 (1997) 325-348).

Dagegen führte die isolierte Zufuhr einzelner Nährstoffe, z.B. von antioxidativem beta-Carotin zu erhöhter Lungenkrebs-Inzidenz und höherer Mortalitätsrate bei Rauchern (ATBC-Studie: New England Journal of Medicine 1994; 15: 1029-1035). Eine andere Studie zeigte einen Anstieg des Schlaganfall-Risikos nach Einnahme von isoliertem, synthetischem Vitamin E.

Offensichtlich also zeigen Labor-Vitamine nicht immer jene positiven Wirkungen, wie sie von Vitalstoffen aus Obst und Gemüse erwartet werden.

Ein wesentlicher Grund für die unterschiedliche Wirkung von "chemischen" und "natürlichen" Vitaminen beim Menschen mag die Komplexität des menschlichen Zellstoffwechsels sein. Aus der Biochemie sind bis heute etwa 50.000 verschiedene Stoffwechselreaktionen bekannt. Jede dieser Reaktionen benötigt ein spezielles Vitamin, Spurenelement oder einen anderen Vitalstoff, um optimal ablaufen zu können. Der menschliche Körper benötigt also nicht einzelne Vitamine und Spurenelemente um gesund zu bleiben, sondern eine Vielzahl von einander unterstützenden und regenerierenden Vitalstoffen (Vitaminen, Spurenelementen, essentiellen Fettsäuren, sogenannten sekundären Pflanzenstoffen). Wie zahlreiche Ernährungs-Studien zeigen, bedarf der humane Stoffwechsel, insbesondere auch jener des Immunsystems, des komplexen Zusammenspiels zellulärer Enzym-Aktivatoren, einander regenerierender antioxidativer Systeme, hochungesättigter Fettsäuren zur Regeneration der zellulären Biomembranen sowie interstitieller Bindegewebsmodulatoren.

Vergleichende Untersuchungen des pflanzlichen und humanen Zellstoffwechsels zeigten weitgehende Analogien im Metabolismus von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten. Im Gegensatz zur humanen Zelle ist jedoch die Pflanzenzelle in der Lage, die für Wachstum und Regeneration vermehrt benötigten organischen Reduktions-Äquivalente (z.B. Vitamine) über photosynthetische Prozesse endogen zu synthetisieren (A.E.Harmuth-Hoene, A.E. Bognar et alii: Der Einfluss der Keimung auf den Nährwert von Weizen, Mungbohnen und Kichererbsen, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1987, 185; 286-393). Die gesteigerte endogene Syntheseleistung keimender Getreidezellen für antioxidative Vitamine und hochungesättigte Fettsäuren ist somit vermutlich biochemischer Ausdruck des erhöhten Bedarfs im Rahmen reduktiver Aufbau- und Regenerationsprozesse. Im Rahmen zahlreicher Versuchsreihen gelang es, keimende Getreidesamen mit mineralischen, essentiellen Spurenelementen anzureichern (J. Lintschinger, N. Fuchs et alii: Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa; Plant Foods for Human Nutrition 50: 223-237, 1997). Durch die moderate Zufuhr essentieller Spurenelemente wurde sowohl die enzymatische Syntheseleistung zur Ausbildung organischer Vitamine, als auch der Gehalt an organisch gebundenen Spurenelementen gesteigert (J. Lintschinger, N. Fuchs et alii: Selenium Enriched Sprouts. A Raw Material For Fortified Cereal-Based Diets; J. of Agricultural and Food Chemistry, 2000: 48, 11: 5362-5368).

Die Keimung von Pflanzensamen in Elektrolyt-Lösungen zur Herstellung elektrolytangereicherter Keimlinge ist beispielsweise in den EP 0 770 324 A und EP 0 799 578 A beschrieben.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Verwendungen für derartige Präparate aus elektrolytangereicherten Keimlingen zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines aus elektrolytangereicherten Pflanzenkeimlingen hergestellten Präparates zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur T-Lymphozytenvermehrung in nicht-immunsupprimierten Personen. Es zeigte sich überraschender Weise, dass die erwähnten Präparate nicht nur bei immunsupprimierten Personen mit pathologischen Werten hinsichtlich des zellulären Immunsystems eine positive Wirkung erzielen können, sondern auch bei nicht-immunsupprimierten Personen. Es zeigte sich allerdings im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass sich - im Gegensatz zur Behandlung von immunsupprimierten Personen, bei denen die Behandlung mit einer Steigerung des Quotienten aus T-Helfer-

zellen und T-Suppressorzellen einhergeht (vgl. EP 0 799 578 A) - bei nicht-immunsupprimierten Personen dieser Quotient in die gegenteilige Richtung, also mehr in Richtung der T-Suppressorzellen entwickelt.

Vorzugsweise werden erfindungsgemäß daher generell CD3+ spezifische Immunzellen vermehrt, insbesondere CD3+/CD4+ spezifische Immunzellen (Helferzellen), CD3-/CD16,56+ spezifische Immunzellen (natürliche Killer-Zellen), CD4+/CD45RA+ spezifische Immunzellen (naive T-Zellen) und CD3+/CD8+ spezifische Immunzellen (Suppressorzellen).

Generell zeigte sich eine Verjüngung des Immunsystems mit der erfindungsgemäßen Verwendung. Insbesondere ergab sich eine Verbesserung der Vigilanz und eine Erhöhung der Reagibilität des Immunsystems.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen haben sich insbesondere im geriatrischen Bereich bewährt, wie die in den Beispielen gezeigten Ergebnisse der medizinischen Studie eindrucksvoll belegen.

Erfindungsgemäß werden die pharmazeutischen Präparationen vorzugsweise in Lebensmittel-form zur Verfügung gestellt, um so die prophylaktische Anwendung so leicht wie möglich für die Ziel-Individuen zu gestalten.

Dabei war es aber umso überraschender, dass zwar die zelluläre Immunantwort spezifisch mit den erfindungsgemäßen Verwendungen beeinflusst werden konnte, nicht aber die humorale Immunantwort. Weiters konnten auch keine signifikanten Wirkungen auf das rote Blutbild (Erythrozyten, Hämoglobin, etc.), auf die Blutchemie (ausgenommen Cholesterin und LDL) oder die Thrombozytentzahl durch die erfindungsgemäße Verabreichung der elektrolytangereicherten Keimlings-Präparate nachgewiesen werden. Auch klinische Parameter, wie Gewicht, Temperatur, Herzfre-quenz, Blutdruck und EKG blieben unbeeinflusst.

Bevorzugte elektrolytangereicherte Keimlinge, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwen-det werden können, sind die gemäß der EP 0 770 324 A geoffenbarten Keimlinge bzw. die gemäß der EP 0 799 578 A beschriebenen Kombinationspräparate.

Bevorzugter Weise sollten die erfindungsgemäßen Keimlinge einen im Vergleich zu herkömmlich (also in herkömmlichem Leitungswasser) aufgekeimten Samen um mindestens 10 bis 20 %, vorzugsweise um mindestens das 1,5- bis 3-fache, insbesondere um mindestens das 5- bis 10-fache, erhöhten Gehalt an einem oder mehreren Elektrolyten, vorzugsweise an Zink, Eisen, Kalium, Magnesium, Kupfer, Mangan, Strontium, Selen, Molybdän, Chrom, Arsen, Vanadium und/oder Kobaltionen, aufweisen.

Bei der herkömmlichen Samenkeimung, bei welcher die Samen in destilliertem Wasser oder in Leitungswasser zur Keimung gebracht worden sind, treten immer zum Teil erhebliche Verluste an diesen für die Ernährung wichtigen Bestandteilen auf. Diese Verluste waren sowohl durch den beginnenden Stoffwechselprozess des Pflanzenkeimlings selbst bedingt, aber auch durch die Natur des Quellmittels Wasser, welches zu einer zusätzlichen Elektrolytauslaugung des Keimlings beitrug, da, im Gegensatz zum Ruhezustand (Samen), die Schale des Keimlings einer Elektrolytauslaugung sehr wohl zugänglich ist.

Es hat sich weiters gezeigt, dass die erfindungsgemäß verwendeten elektrolytangereicherten Keimlinge nicht nur eine höhere Konzentration an Mineralstoffen aufweisen, sondern, bedingt durch den erhöhten Mineralstoffgehalt, auch ganz allgemein im Hinblick auf ihre Inhaltsstoffe verbessert sind, beispielsweise einen erhöhten Vitamingehalt aufweisen.

Eine bevorzugte Herstellungsform der erfindungsgemäßen Keimlinge besteht darin, dass die keimfähigen Samen in eine Elektrolytlösung eingebracht werden und die Keimlinge in der Elektrolytlösung bei einer geeigneten Temperatur während einer Zeitdauer, die ausreicht, um in den Keimlingen eine Elektrolytanreicherung zu erzielen, inkubiert werden.

Unter Verwendung einer Elektrolytlösung, also einer Lösung, die im Gegensatz zu den herkömmlichen Keimungslösungen (Leitungswasser bzw. destilliertes oder sterilisiertes Wasser) erhöhte Ionenkonzentration beinhaltet, können die im Zuge der Keimung auftretenden Elektrolyt-verluste ausgeglichen werden bzw. sogar durch einen Elektrolytfluss aus der Keimungslösung in die Keimlinge ins Gegenteil verkehrt werden. Somit können Keimlinge entstehen, die z.T. sogar einen gegenüber dem Samen erhöhten Gehalt an Elektrolyten aufweisen.

Unter Elektrolytlösung wird vorzugsweise eine wässrige Lösung verstanden, welche mit einem oder mehreren Elektrolyten wie nachstehend definiert versetzt bzw. angereichert ist.

Die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung kann um mindestens 10 bis 20 % über derjenigen von herkömmlichem Leitungswasser liegen, vorzugsweise ist die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung zumindest in Bezug auf Eisen- und/oder Kupfer- und/oder Mangan- und/oder Strontium- und/oder Lithium- und/oder Molybdän-Ionen zweimal so hoch wie die von herkömmlichem Leitungswasser, besonders bevorzugt mindestens fünfmal so hoch, insbesondere mindestens zehnmal so hoch.

Die geeignete Temperatur zur Durchführung der Keimung ist selbstverständlich von Samenart zu Samenart verschieden. Prinzipiell ist die Keimungstemperatur, welche im Stand der Technik für die jeweilige Samenart beschrieben ist, auch für das erfindungsgemäße Verfahren anzuwenden. Vorzugsweise liegt diese Temperatur zwischen 10 und 50°C, insbesondere zwischen 20 und 30°C.

Die Zeitdauer, um in den Keimlingen eine ausreichende Elektrolytanreicherung zu erzielen, ist ebenfalls von Keimlingsart zu Keimlingsart unterschiedlich, es hängt auch davon ab, welche Elektrolytwerte im Keimling erreicht werden sollen. Auch hier dienen für eine bestimmte Art die Keimungsdauern, welche im Stand der Technik beschrieben sind, als Richtwerte, bevorzugterweise wird daher die Keimung während einer Zeitdauer von etwa 12 bis 120 Stunden, insbesondere etwa 60 bis 100 Stunden, durchgeführt.

Es versteht sich, dass sowohl die Keimungstemperatur als auch die Keimungsdauer von einem Fachmann ohne weiteres durch einfache Versuche für jedes System optimiert werden und für bestimmte Arten durchaus auch über oder unter den oben angegebenen Richtwerten liegen kann.

Als bevorzugte Keimlinge sind erfindungsgemäß Keimlinge von gängigen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorgesehen, insbesondere Keimlinge von Hülsenfrüchten und Getreidesamen. Besonders bevorzugte Keimlinge sind daher Weizen-, Buchweizen-, Quinoa-, Mungbohnen-, Bockshornklee-, Rettich-, Alfalfa-, Mais-, Kürbis-, Walnuss-, Roggen-, Gerste-, Reis-, Adzuki-Bohnen-, Erbsen-, Hirse-, Palmen-, Hafer-, Kichererbsen-, Kresse-, Leinsamen-, Linsen-, Senf-, Sesam-, Sojabohnen-, Sonnenblumen-, Amaranthkeimlinge und Mischungen dieser Keimlinge.

Die Elektrolytlösung kann 1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 10 mg/l oder mehr, insbesondere 50 mg/l oder mehr Zink- und/oder Eisen- und/oder Kalium- und/oder Magnesiumionen, 0,5 mg/l oder mehr, vorzugsweise 5 mg/l oder mehr, insbesondere 25 mg/l oder mehr Kupfer- und/oder Mangan- und/oder Strontium- und/oder Lithiumionen, 0,1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 1 mg/l oder mehr, insbesondere 5 mg/l oder mehr Selen- und/oder Molybdän- und/oder Chrom- und/oder Arsen- und/oder Vanadium- und/oder Kobaltionen enthalten mit der Maßgabe, dass sich die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung in zumindest einer Ionenspezies von der Ionenkonzentration in Leitungswasser um mindestens 10 bis 20 % unterscheidet.

Eine besonders bevorzugte Elektrolytlösung enthält zumindest 0,5 mg/l Kupfer- und/oder 1 mg/l Zink- und/oder 0,1 mg/l Kobalt- und vorzugsweise mindestens 0,1 mg/l Molybdän- und/oder 0,5 mg/l Lithium- und/oder 1 mg/l Selen- und/oder 1 mg/l Vanadiumionen.

Die elektrolytangereicherten Keimlinge können nach ihrer Herstellung je nach Verwendungszweck gewaschen, getrocknet und gegebenenfalls für den Verkauf geeignet weiterverarbeitet werden. Besonders bevorzugt ist die Aufbereitung der erfindungsgemäßen Keimlinge zu Frischkost, zu Brotaufstrichen, zu Backwaren, Suppen oder zu Snack-artigen Lebensmitteln oder Nahrungsergänzungen in Form von Mueslis, Kautabletten, Kapseln oder Liquida.

Vorzugsweise werden bei den erfindungsgemäßen Verwendungen die Keimlinge in Kombination mit Mikronährstoffen eingesetzt. Bevorzugte Mikronährstoffe sind dabei mehrfach ungesättigte Fettsäuren, natürliche Karotenoidgemische, Keimextrakte, natürliche Anthocyangemische, natürliche Tocopherol- und Tocotrienolgemische, Vitamine und Coenzyme, essentielle und nicht essentielle Aminosäuren, Mineralstoffe und Mischungen derselben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung im Sinne der Ansprüche ist selbstverständlich auch der nicht-therapeutische Bereich.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden medizinischen Studie auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, näher erläutert.

B e i s p i e l :
Medizinischer Bericht über die Verwendung von einem Mikronährstoff-Konzentrat, enthaltend Präparationen von elektrolytangereicherten Keimlingen, zur Immunmodulation in der Geriatrie.

Indikation:

Ernährungssupplementation von Bewohnern einer geriatrischen Institution mit Erhebung der Auswirkungen auf das Immunsystem.

5 **Prüfmedikation:**

Auf Basis getrockneter elektrolytangereicherter Keimlinge, insbesondere Weizenkeimlinge, mit hohen Gehalten endogener Vitamin-, essentieller Fettsäuren- und Spurenelemente-Komplexe wurde ein diätetisches Lebensmittel PMN®-Mikronährstoff-Konzentrat im Rahmen der vorliegenden Studie eingesetzt ("Immunstabilisierender Faktor" ISF® (Integriertes Mikronährstoffkonzentrat PMN® vis vitalis AG/Österreich) versus Placebo: Suspendierbare Pulver in vier Geschmacksrichtungen (Tomate, Knoblauch-Spargel, Gemüse, Pilze). In heißem Wasser aufgelöst, 3 Monate hindurch, täglich in Form einer Suppe verabreicht.).

PMN® steht für Pan Molekulare Nährstoffe und drückt die Lückenlosigkeit der Nährstoff-Komplexe im Gegensatz zu synthetischen Vitamin- und Spurenelement-Kombinationen aus.

15

Studienablauf:

Screeningphase

Blutabnahme aller Parameter

20 2 Monate Supplementation

Grippeimpfung in der 8. Woche

1 Monat Supplementation

Blutabnahme aller Parameter

2 Monate Follow up

25

Zielgrößen:

I) Immunologie

1) Lymphozytenphänotypisierung per FACS

2) Lymphozytenfunktionstestung (IL-2, IL-2R)

Lymphozytenaktivierbarkeit in vitro

30 3) Antikörpertiter nach Grippeimpfung

Parameter der Sicherheit:

I) Labor

II) klinische Parameter

35 III) Erfassung von unerwünschten Wirkungen

Die primären Zielvorgaben lagen vorrangig in der Erhebung von schulmedizinisch akzeptierten und relevanten Parametern, mittels derer die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das Immunsystem evaluiert werden kann. Da es sich um die Beurteilung eines Mikronährstoffpräparates in Form eines Supplements zur täglichen Ernährung handelt, wurde nach einer Patientenpopulation gesucht, in der der Faktor Ernährung möglichst homogen verteilt ist. Diese wurde in Form von Bewohnern einer geriatrischen Institution gewählt, da alle an der Prüfung teilnehmenden Personen von derselben Großküche versorgt werden und es somit zu keiner Verfälschung der Ergebnisse kommt.

45

Die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das Immunsystem wurden entsprechend der zellulären und humoralen Immunität des Menschen mit Parametern, die beiden gerecht werden, evaluiert. Diese waren: Leukozytenphänotypisierung per FACS, in vitro Aktivierung der T-Lymphozyten mit Bestimmung von IL-2 und IL-2r, sowie Antikörpertiterbestimmung nach einer Grippeimpfung im Laufe der Prüfung.

50

Beschreibung des Patientenkollektivs:

Rekrutiert wurden Patienten beiderlei Geschlechts, die seit mindestens 3 Monaten im Geriatriezentrum wohnhaft waren. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde vom Patienten oder seinem Sachwalter eingeholt.

55

106 Personen wurden randomisiert. 54 in der Verum- und 52 in der Placebogruppe.

Verum: 45 weibliche, 9 männliche.

Placebo: 44 weibliche, 8 männliche.

Das mittlere Patientenalter betrug 85 Jahre (62-98) in der Verum- und 85,5 Jahre (65-98) in der Placebogruppe. Die Alters- und Geschlechtsverteilung entspricht demographischen Studien aus dieser Alterspopulation. Diese Verteilungsmuster, Alter und Geschlecht betreffend, ändern sich nicht signifikant in Bezug auf die für die "per protocol Analyse" definierten Patienten. Als solche wurden Patienten definiert, die mindestens 80% der Therapietage wenigstens 50% des Prüfpräparates konsumiert haben. Dies waren in der Verumgruppe 40 (32 weibliche und 8 männliche) und in der Placebogruppe 42 (35 weibliche und 7 männliche) Personen.

10

I) Zielparameter

5

1) Leukozytenphänotypisierung:

15

Diese wurde mittels einer standardisierten, good laboratory practice-konformen Methode per FACS durchgeführt. Bestimmt wurden die Oberflächenmarker CD2+/CD3-, CD2+/CD3+, CD3+, CD3+/CD4+, CD3+CD8+, CD3-/CD16,56+, CD3+/CD16,56+, CD19, CD3+/HLA-DR+, CD4+/CD45RA+, CD4+/CD45RO+, CD8+/CD38+.

20

Mit Hilfe von Oberflächenmarkern an den Lymphozyten können die einzelnen Subpopulationen beschrieben und quantifiziert werden. Lymphozyten sind eine Fraktion der Leukozyten. Diese wurden im Zuge der Blutabnahmen zu Beginn und am Ende der Prüfung abgenommen und ausgewertet.

25

Leukozyten:

Im Vergleich der Ausgangswerte zwischen den beiden Gruppen findet sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,468$).

30

Die statistische Auswertung der Veränderungen innerhalb der Gruppen zueinander zeigt eine Signifikanz zugunsten der Verum-Gruppe von $p=0,03$.

35

Eine Vermehrung der Leukozyten kann, aus medizinischer Sicht, einen Infekt andeuten. Ein Vergleich dieses Einzelparimeters mit den Ergebnissen der Blutsenkung, des CRP und der Aufzeichnung von fiebersenkenden Medikamenten/Antibiotika und Fiebertagen lässt in Kombination all dieser Parameter den Schluss zu, dass die Leukozytenvermehrung in der Verum-Gruppe nicht durch vermehrte Infekte verursacht ist.

40

Lymphozyten:

45

Der Vergleich der Ausgangswerte ist mit $p=0,989$ nicht signifikant.

Eine Signifikanz von $p=0,034$ bei der Gegenüberstellung der Gruppenveränderungen Beginn-Ende zeigt eine Vermehrung der Lymphozyten in der Verum-Gruppe.

50

In Zusammenschau mit den anderen erhobenen Parametern, ist aus medizinisch-hämatologischer Sicht ein Einfluss durch die Prüfsubstanz anzunehmen. Dies wird insoferne bestärkt, da sich aus der Kombination aller vorliegenden Daten (siehe oben) keine anderen Ursachen (Infekte etc.) im klinischen Sinn verifizieren lassen.

55

Die Lymphozyten repräsentieren das Immunsystem. Man unterscheidet T- und B-Lymphozyten. Die T-Ly repräsentieren die zelluläre Immunität und die B-Ly die humorale (Produktion von Immunglobulinen). In früheren Studien (siehe Einleitung) sind Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das zelluläre Immunsystem beobachtet worden. Mit Hilfe der FACS-Untersuchung wurden die Lymphozyten subtypisiert.

B-Lymphozyten:

55

Der Oberflächenmarker CD-19 ist repräsentativ für die Population der B-Ly.

Weder in der Verum- ($p=0,216$) noch in der Placebo-Gruppe ($p=0,509$) kommt es zu Veränderungen während des Studienverlaufs. Auch eine Auswertung der Verläufe einander gegenübergestellt, zeigt keine Signifikanz ($p=0,856$).

Da B-Ly immunglobulinproduzierende Zellen sind, wurde deren Auswertung in Kombination mit den Labordaten der Elektrophorese diskutiert:

55

Sowohl in der Gesamtproteinmenge, als auch in den einzeln ausgewerteten Subgruppen (Alb, α_1 , α_2 , β und γ -Globuline) kam es zu keinen medizinisch interpretierbaren Veränderungen. In

der Zusammenschau aller, das humorale Immunsystem repräsentierenden Parameter, kommt es in keiner der beiden Gruppen zu einer Veränderung im Sinne einer hämatologisch-immunologischen Relevanz.

5 **Zelluläre Immunität:**

Mit Hilfe der Oberflächenmarkerprofile CD2+/CD3+, CD2+/CD3- und CD3+ wurde die Population der T-Ly ermittelt. Zusätzliche Fraktionierungen der "Helperzellen" (CD3+/CD4+), "Suppressorzellen" (CD3+/CD8+), "natürlichen Killerzellen" (CD3-/CD16,56+), "aktivierten T-Ly" (CD3+/HLA-DR+) und der "zytotoxischen T-Ly" (CD8+/CD38+) wurden zur exakten Beschreibung der zellulären Immunität herangezogen.

10 T-Lymphozyten:

CD3+ definiert T-Ly allgemein. Da in der Immunologie eine Zellart nicht durch einen einzigen Marker, sondern durch Kombinationen aus denselben eingegrenzt wird, wurde auch CD2+/CD3+ bestimmt, um die Population der T-Ly möglichst exakt darzustellen.

15 In der Auswertung beider Lymphozytenprofile lagen keine signifikanten Unterschiede der Ausgangswerte vor.

20 CD3+

In der Verumgruppe kommt es zu einem signifikanten Anstieg im Verlauf ($p=0,004$). Der Gruppenvergleich zueinander liegt mit $p=0,023$ ebenfalls signifikant zu Gunsten Verum vor.

25 CD2+/CD3+

Auch hier kommt es zu einem signifikanten Anstieg in der Verumgruppe ($p=0,011$) und einer Signifikanz von $p=0,037$ im Vergleich Verum zu Placebo.

Durch diese exakte Definition der T-Ly und einer statistischen Signifikanz in beiden Populationen ist der Schluss zulässig, dass die Prüfsubstanz eine Veränderung dieser Zellen bewirkt.

30 Helperzellen CD3+/CD4+

Mit einem $p=0,014$ innerhalb des Verlaufes und einem $p=0,093$ im Gruppenvergleich zeigt sich in dieser Subpopulation ebenfalls ein Effekt zu Gunsten von Verum.

35 Suppressorzellen CD3+/CD8+

Innerhalb der Verumgruppe zeigt sich ein signifikanter Anstieg mit $p=0,003$. Keine Signifikanz liegt mit $p=0,061$ im Gruppenvergleich vor.

40 Ratio CD4+/CD8+

Dieser Wert ist in der Verumgruppe mit $p=0,019$ signifikant im Verlauf abgefallen. Im Gruppenvergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,979$).

45 Natürliche Killerzellen CD3-/CD16,56+

Mit $p=0,026$ findet sich eine signifikante Zunahme dieser Zellen in der Verumgruppe. Der Gruppenvergleich resultiert in einem p -Wert von 0,509 als nicht signifikant.

50 T-Lymphozyten in aktiverter Form CD3+/HLA-DR+

Diese Zellen repräsentieren jenen Anteil, der durch einen internen oder externen Reiz in eine aktivierte Form übergegangen ist. Weder innerhalb der Gruppenverläufe, noch im direkten Gruppenvergleich kommen Signifikanzen zur Darstellung.

55 Zytotoxische T-Lymphozyten CD8+/CD38+

Signifikante Anstiege sind sowohl in der Verum- ($p<0,001$), als auch in der Placebogruppe ($p=0,002$) zu verzeichnen. Der Gruppenvergleich ist mit $p=0,089$ im nicht signifikanten Bereich.

Repräsentative T-Ly Marker des "alten" Immunsystems

Mit den beiden hier gesondert evaluierten Parametern wurde der Einfluss der Prüfsubstanz auf

das Immunsystem des alten Menschen beschrieben.

"naive Zellen" CD4+CD45RA+

5 Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen findet sich eine signifikante Zunahme von $p=0,032$ zu Gunsten Verum. Der Anstieg innerhalb des Verumverlaufes zeigt einen p-Wert von 0,026.

Zellen mit "memory-Funktion" CD45RO+

Die Verumgruppe verzeichnet einen Anstieg von $p=0,037$, zwischen den Gruppen entstand kein signifikanter Unterschied.

10

2) Lymphozytenaktivität:

Zur Testung der Lymphozytenaktivität wurden ausreichende Mengen an Zellmaterial von jedem Patienten für die Zeitpunkte Beginn und Ende bei -70°C tiefgefroren. Alle Proben wurden gemeinsam, nach "good laboratory practice guidelines", einer Aufarbeitung für folgende Parameter zugeführt:

15

- Anzahl der aktivierbaren Lymphozyten
- Anzahl Interleukin-2 Rezeptor (IL-2r)
- Interleukin-2 (IL-2)

20

Anzahl der aktivierbaren Lymphozyten

Es wurden jeweils exakt 3000 Lymphozyten untersucht. Die Angaben beziehen sich auf die Prozentzahl der davon in vivo aktivierbaren Zellen. In beiden Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg von $p<0,001$. Der p-Wert im Gruppenvergleich beträgt 0,095.

25

Interleukin-2 Rezeptor

Bestimmt wurde die mittlere Anzahl der Interleukin-2 Rezeptoren per 1000 Zellen. Ein $p<0,001$ findet sich im Verlauf beider Gruppen. Der Vergleich ergibt keine Signifikanz mit $p=0,488$.

30

Interleukin-2

Die Werte werden als Faktor dargestellt. Ermittelt wird, um das Wievielfache sich die IL-2 Produktion nach Stimulierung im Vergleich zu "Beginn" erhöht. In der Verumgruppe findet sich ein Wert von $p=0,054$. In der Placebogruppe von $p=0,045$. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen liegt bei $p=0,102$.

35

3) Antikörpertiter nach Grippeimpfung

Einen Monat nach der Grippeimpfung wurden die Seren auf Antikörper gegenüber der Stämme Caledonia, Panama und Yamanashi untersucht.

40

Caledonia

Die Anstiege waren in beiden Gruppen mit $p<0,001$ signifikant. Der Gruppenunterschied lag mit $p=0,745$ im nicht signifikanten Bereich.

45

Yamanashi

Neben signifikanten Gruppenanstiegen ($p<0,001$) zeigt sich eine Signifikanz von $p=0,042$ von Placebo.

50

Panama

Die Beurteilung dieses Parameters ist wegen einer Signifikanz von $p=0,007$ zu Gunsten von Placebo bei den Ausgangswerten nur eingeschränkt beurteilbar.

Zusammenfassende Beurteilung aller erhobenen Immunparameter

Im folgenden Abschnitt werden die, der Prüfung zugrundeliegenden, wissenschaftlich belegten Fakten den Ergebnissen gegenübergestellt.

55 Aus den Untersuchungen der letzten Jahre ist bekannt, dass die Immunantwort mit zunehmendem Alter abnimmt. Dies betrifft besonders die Fraktion der T-Lymphozyten.

Die Analyse der zellulären Immunität anhand der T-Lymphozyten hat in der vorliegenden Prüfung zum Ergebnis, dass die mit Verum behandelte Gruppe einen signifikanten Anstieg dieser Zellen von $p=0,032$ (CD3+) und $p=0,037$ (CD2+/CD3+) aufweist. Die Gesamtlymphozytentanzahl nimmt mit $p=0,034$ ebenfalls signifikant zu.

5 Sowohl die klonale Proliferation, als auch der Reifungsprozess der Lymphozyten nehmen mit zunehmendem Alter ab. Das Verhältnis unreifer zu reifer Zellen verschiebt sich in Richtung der unreifen Formen. Das Äquilibrium Suppressor - zu Helfer-Lymphozyten verändert sich in Richtung Helferzellen.

10 Die Ergebnisse in der Verumgruppe zeigen eine signifikante Vermehrung von CD3+/CD4+(Helfer) mit $p=0,014$ und CD3+/CD8+ von $p=0,003$. Die Veränderungen des T4/T8-Verhältnisses mit 0,019 im Sinne eines Wertabfalles zeigen eine relative Vermehrung der Suppressorzellen an. Im Gegensatz dazu kommt es in der Placebogruppe zu keiner Signifikanz.

15 Weiters ist bekannt, dass neben einer Verminderung der Suppressorzellen im Alter diese auch eine geringere Zytotoxizitätskapazität aufweisen.

20 In der Beurteilung der CD8+/CD38+ zytotoxischen T-Zellen im vorliegenden Datenmaterial findet sich ein Anstieg in beiden Gruppen (Verum: $p=<0,001$, Placebo: $p=0,002$). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist mit $p=0,089$ nicht signifikant, zeigt aber einen deutlicheren Zuwachs in der Verumgruppe. Die "natürlichen Killerzellen" (CD3-/CD16,56+) steigen in der Verumgruppe signifikant an ($p=0,026$)

25 Naive (CD45RA+) und memory T-Zellen (CD45RO+) unterliegen während des fortlaufenden Lebens einer zunehmenden Gewichtung der memory-Funktion. Dies wird mit der Abnahme der "Vigilanz" des alternden Immunsystems in Verbindung gebracht. Mit einem p-Wert von 0,032 liegen die naiven T-Zellen der Verumgruppe am Ende der Prüfung signifikant höher als Placebo.

30 Die erwähnten, in der Literatur angeführten, phänotypischen Veränderungen resultieren in einer reduzierten Lymphozytenfunktion im Alter. Eine verminderte Proliferationstendenz nach Antikörperstimulus ist ebenso nachweisbar wie eine geringere Zytokinproduktion.

35 In der vorliegenden Prüfung wurden neben einer *in vitro* Stimulierung die Expression von IL-2r und der Produktionszuwachs von IL-2 gemessen. Da das Immunsystem sehr komplexen Einflüssen unterliegt bzw. ebenso reagiert, finden sich sehr große Standardabweichungen bei den erhöhten Parametern.

Der Median des Prozentsatzes von aktivierbaren Zellen am Studienende beträgt 32% (2-61) in der Verum- und 26% (10-52) in der Placebogruppe. Die Auswertung der IL-2r pro Zelle zeigt einen Median von 7378 (2622-28659) in der Verum- und von 5884 (2927-30732) in der Placebogruppe. Die Zunahme der IL-2 Produktion bezogen auf 1000 Zellen weist sehr hohe Standardabweichungen auf und ist im Gruppenvergleich mit 0,102 nicht signifikant.

40 In Zusammenfassung aller aufgelisteten Parameter zeigt sich ein positiver Einfluss von Verum auf phänotypische Leukozytenveränderungen im Sinne einer Vermehrung der Zellen der zellulären Immunantwort. Werden die Aktivitätsparameter (IL-2, IL-2r) auf die Anzahl der aktivierbaren Lymphozyten bezogen, zeigt sich auch hier eine Veränderung zugunsten von Verum.

45 Im Gegensatz dazu sind keine Veränderungen im Bereich der humoralen Immunität zu erkennen. Die Population der B-Lymphozyten zeigt in keiner Gruppe deutliche Tendenzen. Dies gilt ebenso für die in Zusammenhang stehende Globulinanalyse.

Bei der Analyse der erhobenen Grippeantikörpertiter liegt eine signifikante Erhöhung der Spezifität "Yamanashi" in der Placebogruppe vor. "Panama" kann wegen signifikanter Ausgangsunterschiede nicht evaluiert werden. "Caledonia" ist im Gruppenvergleich nicht signifikant.

50 Es kann somit aus hämatologischer Sicht gesagt werden, dass die Prüfsubstanz einen positiven Einfluss auf das zelluläre Immun-System bei älteren Menschen hat.

Gesamtbeurteilung:

55 Die Beurteilung des roten Blutbildes wird ebenfalls als Parameter zur Evaluierung der Lebensqualität herangezogen. Dies basiert auf der Tatsache, dass eine erhöhte Sauerstoffsättigung des Blutes verbesserte cognitive Leistungen mit sich bringt. Ein Zusammenhang der Veränderungen des roten Blutbildes mit den hier angeführten Testergebnissen, ist möglich, in den vorliegenden Größenordnungen aber nicht beweisend.

Parameter der Sicherheit:

I) Laborparameter

Blutbild:

5 Für die immunologischen Untersuchungen war die Gewinnung von ausreichend Leukozyten essentiell. Die Beschreibung der einzelnen Parameter wurde im Kapitel "Immunologie" abgehandelt.

Thrombozyten

10 Sowohl in der Verum-, als auch in der Placebogruppe sind keinerlei Änderungen erkennbar. Die Mediane und Mittelwerte liegen zu Beginn und am Ende im Normalbereich.

Rotes Blutbild:

Erythrozyten

15 Es treten keine Signifikanzen auf. Alle erhobenen Werte liegen im standardisierten Normalbereich.

Hämoglobin:

20 Zwischen den Gruppen und Untersuchungszeitpunkten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. In der Verumgruppe bleiben Median und Mittelwert stabil. Der Median in der Placebogruppe verändert sich von 13,1 auf 12,8. Ebenso ist ein Abfall des Mittelwertes von 12,94 auf 12,73 zu verzeichnen.

Hämatokrit

25 In der Placebogruppe findet sich ein signifikanter Abfall des Wertes während des Studienverlaufes ($p=0,002$).

MCV

30 Es kommt zu einem signifikanten Abfall der Werte innerhalb beider Gruppen ($p<0,001$ Verum und Placebo). Dieser Abfall ist deutlicher in der Placebogruppe.

MCH

Keine Signifikanzen kommen zur Darstellung. Der Median ist in der Verumgruppe mit 28,9 (vor) zu 28,85 (nach) sehr stabil. In der Placebogruppe ändert er sich von 29,4 auf 28,5.

35 MCHC

In beiden Gruppen ist ein signifikanter Anstieg während des Verlaufes zu verzeichnen (Verum $p=0,025$, Placebo $p=0,003$).

Eisen:

40 Dieser Parameter wurde wegen seiner Verbindung zur Hämoglobinsynthese zum Blutbild hinzugefügt. Gemessen wurde der freie Eisenspiegel. In der Verumgruppe kommt es zu einem deutlichen Abfall während der Prüfung mit einem p -Wert von 0,075.

Bilirubin

45 Dieser Wert wurde ebenfalls wegen seiner Nähe zum roten Blutbild hier angeführt. In der Verumgruppe kommt es zu einem signifikanten Abfall mit $p=0,017$.

Gesamtbeurteilung der vorliegenden Parameter des roten Blutbildes:

50 Hämoglobin, Hämatokrit und MCV fallen in der Placebogruppe teilweise signifikant ab. Der Eisenspiegel in der Verumgruppe verzeichnet einen nahezu signifikanten Abfall. In Zusammenfassung aller erhobenen Befunde ist eine positive Auswirkung der Prüf-Substanz auf das rote Blutbild nachvollziehbar.

Blutchemie:

55 Eisen und Bilirubin wurden bereits beim roten Blutbild gelistet. Es werden hier nur jene Para-

meter angeführt, bei denen signifikante Änderungen eingetreten sind. Die übrigen sind deskriptiv dem biometrischen Bericht zu entnehmen.

Kreatinin

5 Mit p=0,006 zeigt sich eine signifikante Verminderung dieses Parameters in der Placebogruppe.

GGT

Es findet sich ein signifikanter Anstieg in der Verumgruppe von p=0,049.

10 LDH

In der Placebogruppe zeigt sich ein signifikanter Anstieg von p=0,01.

Cholesterin

15 Die Verumgruppe verzeichnet einen signifikanten Abfall von p=0,002.

LDL

Eine Verminderung dieses Parameters mit p<0,001 wurde in der Verumgruppe evaluiert.

20 Albumin

P=0,005 bei einem Abfall in der Verumgruppe.

α 2-Globulin

25 Sowohl in der Verum-, als auch in der Placebogruppe kommt es zu signifikanten Abfällen. P=0,018 bei Verum und p=0,026 bei Placebo.

Blutsenkung

nach 1 Stunde:

30 In beiden Gruppen ist ein signifikanter Abfall zu verzeichnen. Verum: p=0,044; Placebo: p=0,012

nach 2 Stunden:

Auch hier zeigt sich eine Signifikanz im Abfall von p=0,027 für Placebo. Die Verumgruppe ist mit p=0,09 nicht signifikant.

35 **Interpretation der Sicherheitsdaten aus medizinischer Sicht:**

Auffällig ist der Abfall von Cholesterin und der Low-density-Lipoproteine (LDL) in der Verumgruppe. Eine Erhöhung von LDL gilt als internistischer Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen. Eine Besserung dieses Parameters kann als Benefit für die Patienten interpretiert werden. Eine Aussage über die anderen, signifikant veränderten Laborparameter (Kreatinin, GGT, Albumin, 40 α 2-Globulin und LDH) ist aufgrund eines Mangels an konformen Tendenzen bei klinisch verwandten Parametern nicht möglich.

II) klinische Parameter

Gewicht:

45 Vergleich der Mediane Screening zu Follow up nach 5 Monaten: Der Median in der Verumgruppe steigt von 67 auf 68,5 kg an. In der Placebogruppe sinkt er von 59,5 auf 57,5 kg.

Body mass Index:

Der Median in der Verumgruppe betrug 25,95 zu Beginn und 26,3 am Ende der Prüfung. Jener der Placebogruppe lag bei 24,4 vor bzw. 24,1 nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes. Es besteht somit keine signifikante Änderung innerhalb oder zwischen den beiden Gruppen.

Temperatur:

Alle erhobenen Mediane liegen in beiden Gruppen, zu allen Zeitpunkten bei 36,2 - 36,3 Grad und entsprechen klinisch einer normalen Körpertemperatur.

Herzfrequenz:

Die medizinische Evaluierung aller Mittelwerte und Mediane, zu allen Zeitpunkten, zeigt normofrequente und nicht relevante Daten.

- 5 Blutdruck
diastolisch:
Zu allen Zeitpunkten und in beiden Gruppen keine Werte von klinischer Relevanz.
systolisch:
Ebenso, wie beim diastolischen Wert ohne Veränderungen in den Verläufen.

- 10 EKG:
Als "pathologisch" bezeichnete Aufzeichnungen:
Im Vergleich Screening zu Studienende nach 3 Monaten ändert sich in der Verumgruppe die Anzahl von 19 auf 15. In der Placebogruppe von 22 auf 16.

- 15 **III) Erfassung von unerwünschten Wirkungen**
Es liegen keine Berichte über unerwünschte Wirkungen vor. Die "serious adverse event reports" betreffend die, während der Prüfung verstorbenen Patienten, wurden an die Ethikkommission weitergeleitet. Auch bei der medizinischen Interpretation der Labor- und Klinikparameter können keine unerwünschten Wirkungen abgeleitet werden. Eine Sichtung der erhobenen ICD-9 Codes für die neu aufgetretenen Erkrankungen, entspricht der normalen Inzidenz und Prävalenz in der untersuchten geriatrischen Personengruppe.

25 **PATENTANSPRÜCHE:**

1. Verwendung eines aus elektrolytangereicherten Pflanzenkeimlingen hergestellten Präparates zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur T-Lymphozytenvermehrung in nicht-immunsupprimierten Personen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass CD3+ spezifische Immunzellen vermehrt werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass CD3+/CD4+ spezifische Immunzellen (Helferzellen) vermehrt werden.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass CD3-/CD16,56+ spezifische Immunzellen (natürliche Killer-Zellen) vermehrt werden.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass CD4+/CD45RA+ spezifische Immunzellen (naive T-Zellen) vermehrt werden.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass CD3+/CD8+ spezifische Immunzellen (Suppressorzellen) vermehrt werden.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Präparation im geriatrischen Bereich eingesetzt wird.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Präparation in Lebensmittelform zur Verfügung gestellt wird.

45 **KEINE ZEICHNUNG**

50

55