



12 A Terinzagelegging 11 8403248

Nederland

19 NL

- 54 **Werkwijze voor de behandeling van afwijkingen van de vasculaire en pulmonaire systemen, alsmede hyperimmune melk.**
- 51 Int.Cl.: A61K35/20, A61K39/395, A23C9/20.
- 71 Aanvrager: Stolle Research and Development Corporation te Cincinnati, Ohio, Ver. St. v. Am.
- 74 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

- 21 Aanvraag Nr. 8403248.
- 22 Ingediend 25 oktober 1984.
- 32 Voorrang vanaf 27 oktober 1983.
- 33 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- 31 Nummer van de voorrangsaanvraag: 546162 .
- 62 - -

- 43 Ter inzage gelegd 17 mei 1985.

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Werkwijze voor de behandeling van afwijkingen van de vasculaire en pulmonaire systemen, alsmede hyperimmune melk.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de behandeling van afwijkingen van de vasculaire en pulmonaire systemen, zoals vasculaire veroudering en arteriosclerose en afwijkingen van de longen, die met roken samenhangen.

5 Beschrijving van de stand der techniek

Het normale vasculaire systeem van zoogdieren, in het bijzonder mensen, omvat alle organen, zoals het hart en de slagaderen, die bij het transport en de circulatie van bloed betrokken zijn. Twee voornaamste afwijkingen beïnvloeden het vasculaire systeem bij dieren: arterio-
10 sclerose en veroudering. Arteriosclerose, een algemene term voor de verdikking en de verharding van de slagaderwand, is verantwoordelijk voor de meerderheid van doden in de Verenigde Staten en de meeste op Westerse voet ingerichte samenlevingen. Er zijn verschillende typen arteriosclerose, zoals atherosclerose, focale verkalking en arteriolo-
15 sclerose. De veranderingen, die samenhangen met arteriosclerose (van de verschillende typen) en veroudering zijn ten dele overlappend (zie bijvoorbeeld Harrison's "Principles of Internal Medicine", 9de druk, blz. 156-1166),

De normale slagaderwand bestaat uit drie redelijk goed begrensde
20 lagen: de intima, de media en de adventitia. De intima is een laag van endotheliale cellen, die het lumen van alle slagaderen bekleden. De endotheliale cellen zijn met elkaar verbonden door een reeks verenigingscomplexen en zijn ook verbonden aan een onderliggend netwerk van los bindweefsel, de basale lamina. De bekledende endotheliale cellen vormen
25 een afsluiting, die de toegang van stoffen uit het bloed in de slagaderwand regelt. De media bestaat uit gladde spiercellen die in hetzij enkelvoudige lagen hetzij veelvoudige lagen zijn opgesteld. De buitenste laag van de slagader is de adventitia, die afgebakend wordt door de uitwendige elastische lamina. Deze uitwendige bekleding bestaat uit een
30 los onderling verweven mengsel van dikke bundels collageen, elastische vezels van variërende grootte en een mengsel van gladde spiercellen en fibroblasten.

De instandhouding van de endotheliale celbekleding is kritisch. Endotheliale celovergang heeft in een langzaam tempo plaats, maar kan
35 in focale gebieden versnellen door verandering van stromingspatronen langs de vatwand. Intacte endotheliale cellen functioneren om klonterring ten dele door voortbrenging van prostacycline, dat de plaatjes-

functie remt te voorkomen, waarbij een onbelemmerde bloedstroom ver-
groot wordt. Wanneer de bekleding echter is beschadigd hechten plaatjes
gedeeltelijk daaraan als gevolg van produktie van een andere klasse
prostaglandinen, de tromboxanen en vormen een stolsel. Het vermogen van
5 de slagaderwand de ongeschondenheid van het endothelium ervan in stand
te houden, plaatjesaggregatie te voorkomen en de voeding van het mid-
dengedeelte ervan te waarborgen, kunnen de kritische determinanten zijn
van het arteriosclerotische proces.

De voornaamste verandering, die plaats heeft met normale veroude-
ring in de slagaderwand is een langzame symmetrische toename in de dik-
10 te van de intima. Dit resulteert uit een opzameling van kleine spier-
cellen. In de niet zieke slagaderwand neemt het lipidegehalte, in
hoofdzaak cholesterolester en fosfolipide, eveneens geleidelijk toe met
de leeftijd. Terwijl het grootste deel van het fosfolipide in de norma-
15 le slagaderwand afkomstig lijkt te zijn van een in situ synthese, lijkt
de cholesterolester, die met de veroudering accumuleert, afkomstig te
zijn van plasma, aangezien het hoofdzakelijk linolzuur bevat, de voor-
naamste plasmacholesterolester van vetzuur. Naarmate de normale slag-
ader veroudert, worden gladde spiercellen en bindweefsel in de intima
20 opgezameld, hetgeen leidt tot een toenemende verdikking van de laag ge-
koppeld met toenemende opzameling van vetzuur, hetgeen resulteert in
een geleidelijke toename in de stijfheid van de vaten. De grotere slag-
aderen kunnen verwijd, gerekt en poreus worden en aneurysmen kunnen ge-
vormd worden in gebieden van uitbreidende, degenererende arteriosclero-
25 tische aanslag.

Verreweg de voornaamste doodsoorzaak in de Verenigde Staten zowel
boven als beneden de leeftijd van 65 is atherosclerose, de atheromateu-
ze vorm van arteriosclerose. De stoornissen worden gewoonlijk geklassi-
ficeerd als vethoudende lagen, vezelachtige aanslagen en gecompliceerde
30 stoornissen. De vethoudende lagen worden gekenmerkt door een accumula-
tie van met lipide gevulde gladde spiercellen en vezelachtig weefsel in
focale gebieden van de intima en worden kenmerkend gekleurd met in vet
oplosbare kleurstoffen. Het lipide is in hoofdzaak cholesterololeaat.
Vezelachtige aanslagen zijn verhoogde gebieden van intima-verdikking en
35 zullen de meest kenmerkende stoornis van vorderende arteriosclerose
zijn. Zij verschijnen in de buikaorta, coronaire slagaderen en carotide
slagaderen in de derde decade en nemen geleidelijk met de leeftijd toe.
Gecompliceerde stoornissen zijn verkalkte vezelachtige aanslagen, die
verschillende graden necrose, trombose en verzwering inhouden.

40 Een aantal factoren, "risico factoren" genoemd, zijn bij indivi-

- duen geïdentificeerd, die atherosclerose ontwikkelen. Het risico factor concept betekent dat een persoon met ten minste één risico factor meer in aanmerking komt een klinisch atherosclerotisch geval te ontwikkelen en dit vroeger te doen van een persoon zonder risico factoren. De aanwezigheid van veelvoudige risico factoren versnelt voorts atherosclerose. Onder de omkeerbare of ten dele omkeerbare risico factoren zijn hyperlipidemie (hypercholesterolemie en/of hypertriglyceridemie), hyperglycemie en diabetes, lage niveaus van lipoproteïnen met hoge dichtheid, hypertensie, corpulentie en het roken van sigaretten.
- 10 Zoals vermeld in Harrison's, hiervoor (blz. 1166), hoewel het aan de dag treden van klinische gevolgen van atherosclerose kan worden verminderd, is nog geen overtuigend voorbeeld van regressie of onderbreking van progressie van atherosclerose door verwijdering om omkering van een of andere enkele of groep risico factoren bij de mens bewezen.
- 15 De neiging tot minder roken, minder cholesterol en vetverbruik en tot vermindering van te groot gewicht en oefeningsprogramma's is nuttig gebleken, voorkoming in plaats van behandeling is echter het doel van volksgezondheidsdeskundigen. Een doelmatig profylaxis programma is nog niet vastgesteld, hoewel voldoende bekend is om zowel identificatie als
- 20 hoog risico en ontwikkeling van maatregelen te begeleiden om het risico te verminderen.

Onder de hiervoor aangehaalde risico factoren, die bijzonder goed geschikt zijn voor therapeutische behandeling, is hyperlipidemie. Hoewel regeling van factoren zoals corpulentie en sigarettenverbruik in

25 een grote mate afhangt van de wil en de geneigdheid van het individu, zou, wanneer een redelijke methode voor het verlagen van de gehalten van bijvoorbeeld serum cholesterol, lipiden met lage dichtheid (LDL) en triglyceride in de bloedstroom werden verschaft, deze geschikt zijn voor behandeling van een breed spectrum individuen.

30 Vanwege de wijd vertakte verspreiding van vasculaire ziekten, zoals arterioscleroseziekten en de van nature plaatshebbende veroudering van het vasculaire systeem en de begeleidende problemen ervan, bestaat een behoefte aan een doelmatige methode voor zowel het voorkomen en mogelijkwijze het behandelen van deze ziekten.

35 Wanneer een natuurlijk voedingsprodukt, zoals bijvoorbeeld melk, verkregen zou kunnen worden met anti-arteriosclerotische en -verouderingseffecten, zou het een gemakkelijk toe te dienen, gemakkelijk beschikbaar, veilig therapeutisch preparaat zijn.

Een ander voornaamste systeem bij zoogdieren, in het bijzonder

40 mensen, dat gekenmerkt wordt door de geleidelijke degeneratie van de

cellen van de organen, die dat systeem vormen, is het pulmonaire systeem, en in het bijzonder de longen en daarmee verbonden bronchi en alveoli. Evenals arteriosclerose en vasculaire veroudering, gaan de bepaalde pulmonaire ziekten, met inbegrip van een algemene afbraak van
 5 het pulmonaire systeem, kortademigheid en een afname in de doelmatigheid van de ademhaling gepaard met en toe te schrijven aan prikkelende middelen en verontreinigingsmiddelen afkomstig van het milieu, zoals die aanwezig in sigarettenrook.

Het is bekend, dat langdurig roken de opzameling van afzettingen
 10 van koolstof en andere stoffen op en in de longen teweeg brengt, die de ademhalingsfunctie van het daarmee verenigde gebied vernietigen. Op soortgelijke wijze vergroot het roken en/of de aanwezigheid van deze afzettingen aanzienlijk het aantal neutrofilis en lymfocyten, die in de zoogdierlongen aanwezig zijn, welke beide typen cellen stoffen voort-
 15 brengen, die voor het longweefsel schadelijk zijn.

Zoals met arteriosclerose is er enige bedwinging of verlichting van de ziekten, die samenhangen met roken tengevolge van een vermindering in de frequentie van roken bij de meeste leeftijdsgroepen. Bij bepaalde delen van de bevolking echter, het meest in het bijzonder bak-
 20 vissen en jonge vrouwen is het roken toegenomen, hetgeen de frequentie van het voorkomen van ziekten, die met roken samenhangen, zowel bij de huidige bevolking en van belang in de voorzienbare toekomst vermenigvuldigt.

Zoals met cardiovasculaire ziekten, zal behandeling op basis van
 25 het vermijden van verontreinigingen, zoals roken, variërend succes hebben, afhankelijk van het individu. Wanneer echter een methode voor het verminderen van de hoeveelheid afgezet produkt zou kunnen worden gevonden, zoals stimulering van de longmacrofaag activiteit, zou een nuttige behandeling voor de meeste individuen ontwikkeld kunnen worden.

Wanneer, zoals met arteriosclerotische en vasculaire ziekten in
 30 het algemeen, een natuurlijk voedingsprodukt, zoals bijvoorbeeld melk, verkregen zou kunnen worden met een effect, dat de longen blootstelt aan rook en de daarmee samenhangende ziekten ontziet, zou dit een gemakkelijk toe te dienen, gemakkelijk beschikbaar, veilig therapeutisch
 35 preparaat zijn.

Het is in de stand der techniek bekend melkprodukten te produceren met een aantal verschillende therapeutische effecten. Beck heeft bijvoorbeeld een melk beschreven, die een antilichaam ten opzichte van
 'Streptococcus mutanten heeft, dat tandcaries remmende effecten heeft
 40 (Amerikaans octrooischrift 4.324.782). De melk wordt verkregen door een

koe met S. mutans antigeen in twee trappen te immuniseren en de therapeutische melk daaruit te verkrijgen. Beck heeft eveneens een melk beschreven met anti-artritische eigenschappen (Amerikaanse octrooiaanvraag 875.140, ingediend 6 februari 1978) en heeft een melk met anti-inflammatoire eigenschappen beschreven en geoctrooieerd (Amerikaans octrooischrift 4.284.623). Heinbach, Amerikaans octrooischrift 3.128.230, heeft een melk beschreven, dat globulinen bevat van α, β, γ componenten, door een koe met antigenen-mengsels te inoculeren. Petersen (Amerikaans octrooischrift 3.376.198 en Canadees octrooischrift 587.849),
 10 Holm, Amerikaanse gepubliceerde octrooiaanvraag nr. 628.987 en Tunnak c.s. (Brits octrooischrift 1.211.876) hebben eveneens antilichaam bevattende melkprodukten beschreven.

Geen van de hiervoor vermelde referenties beschrijven of suggereren echter melk met anti-arteriosclerotische of vasculaire anti-verouderingseigenschappen of een sparende aantasting op aan rook blootgestelde longen.
 15

Samenvatting van de uitvinding

Het is derhalve een oogmerk van de uitvinding melk te verschaffen met gunstige eigenschappen ten opzichte van ziekten van het vasculaire en pulmonaire systeem.
 20

Een ander oogmerk van de uitvinding is het verschaffen van een werkwijze voor de bereiding van een dergelijke melk.

Een verder oogmerk van de uitvinding is het verschaffen van een methode voor het behandelen van vasculaire ziekten bij dieren.

25 Nog een ander oogmerk van de uitvinding is het verschaffen van een methode voor het onderzoeken van ziekten bij dieren, die met de blootstelling van longen aan rook samenhangen.

Deze en andere oogmerken van de uitvinding, die hierna gemakkelijker duidelijk zullen worden, zijn bereikt door het verschaffen van een methode voor het behandelen van vasculaire ziekten bij een dier, die:
 30 toediening van de genoemde dierlijke melk verzameld bij een rund, dat in een hyperimmune toestand wordt gehouden, in een voldoende hoeveelheid om anti-arteriosclerotische, anti-verouderende vasculaire of weefselsparende effecten, omvat.

Korte beschrijving van de tekeningen

35 Een vollediger begrip van de uitvinding en vele begeleidende voordelen daarvan zullen gemakkelijk verkregen worden, wanneer dit beter begrepen wordt onder verwijzing naar de volgende gedetailleerde beschrijving, indien beschouwd in verbinding met de begeleidende tekeningen,
 40 gen, waarin:

840 3248

Figuur 1 microfoto's laat zien van cryostatistische secties van konijnen aorta's gekleurd met Oil Red O om specifiek lipiden aan te tonen. x300;

- 5 A. controle konijnen: talrijke, kleine lipidedruppels (pijlen) zijn aanwezig;
- B. met hyperimmune melk gevoede konijnen: lipidedruppels zijn in de wand van de aorta afwezig. Het lipide (pijl) in het weefsel buiten de aorta is normaal en laat zien, dat lipiden zichtbaar zouden zijn, wanneer zij in de wand van de aorta
- 10 aanwezig waren.

Figuur 2 laat aftastelektronmicrofoto's zien van de inwendige ventriculaire oppervlakken van konijneharten. x1750;

- A. controle: twee trombi liggen beneden het geërodeerde epithelium van het endocardium;
- 15 B. hyperimmune melk: het epithelium is in tact en er is geen bewijs van trombi.

Figuur 3 laat transmissie-elektronmicrofoto's zien van bloedvaten in konijneharten. x3420;

- 20 A. controle: lipide vacuolen zijn aanwezig in de endothelia cellen (bovenste pijlen) en gladde spiercellen (onderste pijlen);
- B. hyperimmune melk: lipide vacuolen zijn in het endothelium en de gladde spiercellen afwezig.

Figuur 1 is een elektromicrofoto (SEM) van de alveolaire wand van een long van een rat, die is blootgesteld aan sigarettenrook gedurende drie maanden. x5750.

- A. controle: overblijfselen (pijlen) zijn aanwezig op de alveolaire wand en de wand is gebarsten, en legt een rode bloedcel (RBC) bloot.
- 30 B. hyperimmune melk: de stofcel (DC) of macrofaag in het midden van de microfoto verslind overblijfselen, hetgeen helpt de alveolaire wand te reinigen van deeltjes, die naar de onderste ademhalingsbaan in de rook zijn gebracht.

Figuur 5 is een elektromicrofoto (TEM) van een rat, die drie maanden aan sigarettenrook is blootgesteld en hyperimmune melk ontving. x5500. Pseudopodieën (P) van de stofcel (DC) hebben de lumenale overblijfselen (pijlen) in de begintrap van fagocytose omgeven.

Figuur 6 is een elektromicrofoto (TEM) van een stofcel van een alveolaire cel type 1 in een rattenlong blootgesteld aan sigarettenrook gedurende drie maanden en die hyperimmune melk heeft ontvangen. x1200.

De stofcel (DC) bevat gefagocytoseerd produkt en is betrokken bij de opname van overblijfselen (pijlen) in het alveolaire lumen. Rode bloedcellen (RBC) bezetten capillaire lumina in de alveolaire wanden.

Gedetailleerde beschrijving van de voorkeursuitvoeringsvormen

5 De uitvinding omvat een natuurlijk voedingsprodukt (melk), dat gunstige eigenschappen heeft ten opzichte van dierlijke vasculaire en pulmonaire systemen, alsmede op een werkwijze ter bereiding daarvan. De melk van de onderhavige uitvinding, die een natuurlijk produkt is, kan gebruikt worden om vasculaire afwijkingen, die samenhangen met een of
10 andere ziekte of letsel, pulmonaire afwijkingen die samenhangen met roken of een natuurlijke toestand, zoals vasculaire veroudering bij dieren en mensen zonder vrees van bijwerkingen, te behandelen.

Tot voorbeelden van vasculaire afwijkingen, die met de melk van de onderhavige uitvinding behandeld kunnen worden, behoren verouderings-
15 ziekten, zoals een vermindering in de stijfheid van vaten, en een vermindering in de wijze waarop de grote slagaderen verwijd en gerekt worden, alsmede een vermindering in aneurismen, die in gebieden van uitbreidende arteriosclerotische aanslagen ontstaan. Een andere door veroudering teweeg gebrachte vasculaire schade, die met de melk van de on-
20 derhavige uitvinding voorkomen of omgekeerd kan worden, is de toename in de dikte van de slagaderintima, de omkering van geleidelijke accumulatie van gladde spiercellen, alsmede een afname in de accumulatie van het lipidegehalte in de slagaderwand.

Onder de abnormale (dat wil zeggen niet door veroudering teweeg
25 gebrachte) afwijkingen van het vasculaire systeem, die met de melk van de onderhavige uitvinding behandelbaar zijn (voorkoombaar of omkeerbaar) is arteriosclerose, die zowel atheromateuze vormen als niet-atheromateuze vormen omvat. Onder de niet-atheromateuze vormen van arteriosclerose, die met de melk van de onderhavige uitvinding behandelbaar
30 zijn, is focale verkalking (ook Mockelbertg's sclerose genoemd), die algemeen is in de onderste extremiteiten, de bovenste extremiteiten en de slagaderlijke toevoer van de genitale streek bij beide sexen. Een andere afwijking is focale verkalking, die afbraak van gladde spiercellen gevolgd door calciumafzetting inhoudt. Een andere niet-atheromateu-
35 ze vorm van arteriosclerose is arteriolosclerose, die hyaline en algemene veranderingen, die zowel de intima als de media van kleine slagaderen en arteriolen, in het bijzonder in de milt, pancreas, de bijnier en de nier beïnvloedt, omvat.

Belangrijk is dat de melk van de onderhavige uitvinding gebruikt
40 kan worden voor de behandeling van atherosclerose. Dit houdt zowel het

voorkomen als de teruggang van de vorming van vethoudende lagen, vezel-
houdende aanslagen en ingewikkelde letsels, zoals hiervoor beschreven,
in. Hoewel het mogelijk is, dat niet omkeerbare risico factoren zoals
atherosclerose, zoals mannelijke sexe of genetische trekken (bijvoor-
5 beeld positieve familie geschiedenis van premature atherosclerose) niet
met de melk van de onderhavige uitvinding kunnen worden omgekeerd, kun-
nen de zogenaamde omkeerbare factoren echter wel omgekeerd worden.

Derhalve is de melk van de uitvinding geschikt bij het verminderen
van de accumulatie van lipiden en bij het voorkomen of omkeren van hy-
10 percholesterolemie of hypertriglyceridemie. Verschillende vormen van
atherosclerosis kunnen behandeld worden.

Ook kan de melk van de uitvinding gebruikt worden om enkele van de
schadelijke invloeden van roken op het longweefsel om te keren of ten
minste dat weefsel en verwante weefsels te sparen tegen de schadelijke
15 invloeden en afwijkingen, die met roken samenhangen, met inbegrip van
een vermindering in het aantal aanwezig macrofagen en een vermindering
van de activiteit ervan, of fagocytose, het vergroten van het aantal in
longweefsel aanwezige neutrofielen en lymfocyten en de schadelijke af-
scheidingen daarvan, en een toename in de dikte van de bloed-lucht-
20 grenslaag en mogelijk daarmee samenhangende kortademigheid.

Bij de werkwijze van de onderhavige uitvinding omvat de runderbron
elk melk producerend lid van het genus Bos, bij voorkeur koeien.

De uitvinding is gebaseerd op de ontdekking, dat wanneer een der-
gelijk rund in een specifieke toestand van immunisering wordt gebracht,
25 door middel van periodieke stimulerings-toedieningen van een antigeen of
een mengsel van antigeen, het rund melk zal produceren, dat zeer gun-
stige eigenschappen bij de behandeling van vasculaire afwijkingen
heeft. De gunstige melkeigenschappen worden niet door alle runderen,
die geïmmuniseerd zijn, geproduceerd. De opwekking van immuun gevoelig-
30 heid alleen is onvoldoende om het verschijnen van de eigenschappen in
melk te veroorzaken, zoals blijkt uit het feit, dat normale koeiemelk
deze eigenschappen niet heeft, zelfs hoewel koeien zijn gesensibili-
seerd tegen verschillende antigenen tijdens normale immunisatie tegen
koeieziekten.

35 Voorts zijn de eigenschappen niet altijd aanwezig in melk, gepro-
duceerd door runderen, die in de immune toestand zijn gehandhaafd door
stimuleringsinjecties. Het is alleen in specifieke hyperimmune toe-
stand, dat de melk de gewenste effecten heeft. Deze speciale toestand
wordt alleen bereikt door toediening van periodieke stimuleringen met
40 voldoende hoge doses antigenen of mengsels van antigenen. Het dose-

ringstraject, dat de voorkeur verdient, dient gelijk te zijn aan of groter dan 50 % van de dosering, die noodzakelijk is om primaire sensibilisatie van het rund te veroorzaken. Er is dus een stimuleringsdoseringsgrens, waar beneden de eigenschappen in de melk niet worden voort-
 5 gebracht, zelfs hoewel de koe kan zijn in wat normaliter een immune toestand wordt genoemd. Teneinde de hyperimmune toestand te bereiken, is het essentieel de rundermelk na een eerste reeks stimulerings-toedieningen te onderzoeken. Wanneer de melk niet de gewenste eigenschappen heeft, dient een tweede reeks stimuleringen met een hogere dosis te
 10 worden toegediend. Dit proces wordt herhaald tot de eigenschappen in de melk verschijnen.

Samenvattend omvat de werkwijze de volgende trappen:

1. Antigeenkeuze.
2. Sensibilisatie van het rund door primaire immunisatie.
- 15 3. Onderzoek van het serum van het rund om het teweeg brengen van de sensibilisatie te bevestigen.
4. Toediening van stimuleringen met geschikte dosering om een hyperimmune toestand teweeg te brengen en te handhaven.
5. Beproeving van anti-verouderings- of anti-arteriosclerotische
 20 eigenschappen van de melk.
6. Het verzamelen van de melk van het rund tijdens de hyperimmune toestand.

Trap 1 - Alle antigenen of combinaties van antigenen kunnen toegepast worden. De antigenen kunnen bacterieel, viraal, cellulair of alle andere
 25 re stoffen zijn, waarop het immune systeem van een rund zal reageren. Het kritische punt bij trap 1 is, dat het antigeen in staat moet zijn een toestand van immune sensibiliteit bij de koe teweeg te brengen. Het antigeen kan volgens elke methode worden toegediend, die sensibilisatie veroorzaakt. Bij voorkeur worden polyvalente antigenen, zoals bacteriën, gebruikt.
 30

Trap 2 - De immuniseringsmethode, die de voorkeur verdient, is door intramusculaire injectie. Echter kunnen andere methoden, zoals intraveneuze injectie, intraperitoneale injectie, orale toediening, rectaal suppositorium, enz. gebruikt worden, op voorwaarde dat de dosis voldoende is om sensibiliteit teweeg te brengen. De dosering is normaliter
 35 1×10^6 cellen tot 1×10^{20} cellen, bij voorkeur 10^8 cellen tot 10^{10} cellen, het meest bij voorkeur 2×10^8 cellen.

Trap 3 is om vast te stellen of de koe al of niet voor het antigeen gevoelig is geworden. Er is een aantal methoden aan de deskundigen in de
 40 techniek van de immunologie bekend om de sensibiliteit te bepalen

(Methods in Immunology and ImmunoChemistry, William, C.A., Chase, W.M. Academic Press, N.Y., London (delen 1-5) 1977)). Tot voorbeelden hiervan behoren huidgevoeligheidsproeven, serumproeven voor de aanwezigheid van antilichamen op de stimulerende antigenen en proeven die ontworpen zijn om het vermogen van immune cellen van de gastheer op reactie op het antigeen te waarderen. Het toegepaste type proef zal grotendeels afhangen van de aard van het gebruikte antigeen. De methode, die de voorkeur verdient, is het gebruik van een polyvalent vaccin bestaande uit veelvoudige bacteriesoorten als het antigeen en het onderzoek op de aanwezigheid van agglutinerende antilichamen in het serum van de koe voor en na prikkeling met het vaccin. Het verschijnen van melk antilichamen na immunisatie binnen het vaccin is indicatief voor sensibiliteit en op dit tijdstip is het mogelijk met trap 4 verder te gaan. De minimumdosis antigeen noodzakelijk om sensibiliteit op te wekken hangt af van het gebruikte type antigeen.

Trap 4 omvat het opwekken en het in stand houden van de hyperimmune toestand. Wanneer eenmaal een rund gebleken is gesensibiliseerd te zijn, wordt deze toestand geïnduceerd door herhaalde stimulerings-toedieningen van een geschikte dosering op vastgestelde tijdsintervallen. De spatiëring van de toediening hangt af van de aard van het antigeen. Een tweewekelijks stimuleringsinterval is optimaal voor polyvalente bacteriële antigenen. Bovendien dienen de stimulerings-toedieningen geen toestand van immune tolerantie teweeg te brengen. Dit zal er de oorzaak van zijn dat het dier overgaat van een hyperimmune toestand tot een toestand van immune tolerantie ten opzichte van het antigeen, in welk geval het dier zal ophouden melk te produceren met de gunstige eigenschappen.

Het zal bijvoorbeeld ook mogelijk kunnen zijn een combinatie van verschillende immuniseringsmethoden te gebruiken, dat wil zeggen intramusculaire injectie voor primaire immunisatie en intraveneuze injectie voor stimuleringsinjecties, enz. Vele verschillende combinaties van immunisatiemethoden kunnen door de deskundigen worden toegepast om de hyperimmune toestand (1) te sensibiliseren en (2) op te wekken.

Trap 5 is het onderzoek van de vasculaire en/of pulmonaire afwijkings-behandelingseigenschappen van de melk. Een reeks onderzoekstechnieken kan gebruikt worden om de invloeden van de hyperimmune melk op de vasculaire en pulmonaire systemen van dieren te onderzoeken. Bijvoorbeeld kan konijne- of ratteweetzel als het proetweetzel worden gebruikt. Tot deze proeven behoren in alle gevallen het voeden van een konijn of rat met een dieet, dat hyperimmune melk bevat (met een controle, die konij-

nen in een dieet met normale melk omvat). Na een vooraf bepaalde tijds-
 periode worden de dieren opgeofferd en kunnen hun vasculaire of pulmo-
 naire systemen onderzocht worden met elk van de volgende technieken:
 5 aftastelektrommicroscopie van het endocardiale oppervlak van het hart
 of longen bronchi en alveoli voor het onderzoek op endotheliale be-
 schadiging respectievelijk de aanwezigheid van overblijfselen; trans-
 missie elektronmicroscopie van vaten voor het onderzoek op lipidedrup-
 pels, endotheliale degeneratie, aanwezigheid van lipide in schuimcellen
 of de neiging van fibrine of plaatjes om op het lumenale oppervlak van
 10 endotheliale cellen te hechten; histologische analyses van harten voor
 het onderzoek op lipiden, bijv. het aantonen van lipiden met in olie
 oplosbare kleurstoffen zoals Oil Red of Sudan Black in secties van be-
 vrozen weefsel of aanwezigheid van enzymen, in het bijzonder cytochroom
 oxidase of van longweefsel voor het aantonen van fagocytose; alsmede
 15 histologisch onderzoek van longweefsel op neutrafiel en leucocyt infil-
 tratie.

Trap 6 omvat verzameling en verwerking van de melk. De melk kan volgens
 gebruikelijke methoden verzameld worden; echter is een speciale verwer-
 king noodzakelijk om de gunstige eigenschappen van de melk te bescher-
 20 men. De gunstige eigenschappen van de melk zijn warmtegevoelig. Dien-
 tengevolge verdient pasteurisatie bij lage temperatuur de voorkeur. De
 pasteurisatietemperatuur dient gedurende 15 seconden niet 71°C te over-
 schrijden. Na pasteurisatie wordt het vet volgens de standaardmethoden
 verwijderd en wordt de melk door verstuiven gedroogd. Gebruikelijke me-
 25 thoden voor het drogen door verstuiven worden gebruikt met de uitzonde-
 ring, dat de melk onder een verminderde druk bij lage temperatuur wordt
 geconcentreerd om de gunstige eigenschappen niet te vernietigen (zie
 bijvoorbeeld Kosikowski, F., "Cheese and Fermented Milk Products", 2de
 druk 1977). Het eindprodukt is een melkpoeder, dat gunstige eigenschap-
 30 pen heeft.

Stroombare melk kan ook worden gebruikt, alsmede geconcentreerde
 melkprodukten of een fractie van de melk, die de biologisch actieve
 factor of factoren bevat, zoals de zure weifractie.

De uitvinding is ten dele gebaseerd op de ontdekking, dat de melk
 35 van een hyperimmuun rund gunstige eigenschappen heeft op het cardiovas-
 culaire systeem. Bijvoorbeeld werd gevonden, dat in harten van vrouwe-
 lijke konijnen, die waren gevoed met een gelijkmatig dieet van hyperim-
 mune melk, de endotheliale cellen van het hart beschermd waren tegen
 uitgebreide endotheliale beschadigingen met variërende mate en ernst
 40 waargenomen bij konijnen, die met normale melk waren gevoed. Bij de

laatstgenoemde konijnen waren kraters of holten aanwezig, waarin een of meer cellen waren gedegenerieerd en losgeraakt, terwijl bij konijnen, gevoed met hyperimmune melk, deze niet aanwezig waren. Transmissie elektronmicroscopie van beide konijnenpopulaties vertoonde belangrijke verschillen in de bloedvaten. Tot wezenlijke pathologische kenmerken van bloedvaten bij controle-harten behoorden grote lipidedruppels, endotheliale degeneratie, veelvoudige kleine lipidevacuolen, enkelvoudig of veelvoudige grote lipidedruppels, die het cytoplasma van endotheliale cellen vullen, schuimcellen latent met lipide en een sterke neiging van fibrineplaatjes om aan het lumenale oppervlak van endotheliale cellen te hechten. Alle hiervoor vermelde stoornissen vergezellen de pathogenese van atherosclerose. Deze stoornissen werden niet aangetroffen in bloedvaten van representatieve gebieden van konijnenpopulaties, die op een gelijkmatig dieet van hyperimmune melk waren. Histologische secties van harten van de konijnen gevoed met de hyperimmune melk en van konijnen gevoed met controle melk, lieten zien, dat lipide aanwezig was in de lumina van enkele bloedvaten van controle harten en cardiale spierweefsels van controle harten met lipide waren gevuld. Coronaire bloedvaten van konijnen op hyperimmune melk misten de atherosclerotische lipide-afzettingen, die bij controlevaten worden waargenomen.

Deze resultaten laten beslissend zien, dat hyperimmune melk de pathogenese van arteriosclerose en veroudering van het hart vertraagt en/of onderdrukt.

Dezelfde proeven bij konijnenpopulaties, alsmede klinische proeven met menselijke individuen, heeft beslissend aangetoond, dat diëten, die de hyperimmune melk van de onderhavige uitvinding bevatten, resulteren in een vermindering van serum cholesterolgehalten, alsmede opmerkelijke verminderingen in triglyceridegehalten en lipidegehalten met lage dichtheid, die alle sleutel risicofactoren zijn, die met cardiovasculaire ziekte samenhangen.

De uitvinding is eveneens gedeeltelijk gebaseerd op de ontdekking, dat de melk van een hyperimmuun rund gunstige eigenschappen heeft op het pulmonaire systeem van aan rook blootgestelde dieren, en in het bijzonder een effect, dat het longweefsel daarvan ontziet. Gevonden werd bijvoorbeeld, dat in de longen van ratten, die met een gelijkmatig dieet van hyperimmune melk zijn gevoed en zijn blootgesteld aan sigarettenrook, het aantal neutrofielen en lymfocyten, dat de longen na blootstelling aan rook infiltreert, aanzienlijk is verminderd in vergelijking met controlegroepen. Ook is het oppervlak van de alveoli "schoner" bij ratten, die de hyperimmune melk hadden ontvangen en waren

blootgesteld aan rook, dan ratten, die alleen aan rook of aan rook plus controle of normale melk zijn blootgesteld. De hyperimmune melk bleek de activiteit van de stofcellen of longmacrofagen te vergroten. De stofcellen in de brochiolen en alveoli van ratten gevoed met een dieet
 5 van hyperimmune melk, waren actiever in de fagocytose van met rook samenhangende overblijfselen in longen van ratten blootgesteld aan rook, dan die ratten, blootgesteld aan rook alleen of rook plus een dieet van niet hyperimmune melk. De bloed-lucht-grenslaag werd eveneens als dunner waargenomen bij ratten, die aan rook zijn blootgesteld en met een
 10 dieet van hyperimmune melk zijn gevoed, dan ratten blootgesteld aan rook alleen of ratten blootgesteld aan rook en gevoed met normale of gecontroleerde melk.

Naast cardiovasculair weefsel zijn 16 andere weefsels, die een of meer componenten van elk hoofdorgaansysteem voorstellen, eveneens bij
 15 dezelfde dieren bestudeerd. Hyperimmune melk heeft geen nadelige effecten op elk van deze weefsels.

De melk van de uitvinding kan in elke hoeveelheid verschaft worden, die omkering van vasculaire afwijkingen of met roken samenhangende pulmonaire afwijkingen bij warmbloedige dieren beïnvloedt of instand
 20 houdt. Dagelijkse hoeveelheden van 1 ml tot 10 liter, betrokken op stroombare melk kunnen verschaft worden, afhankelijk van de bijzondere omstandigheid van de afwijking en de diersoort.

Dezelfde hoeveelheden kunnen bij normale personen gebruikt worden door op preventieve wijze te werk te gaan.

25 Bij een voorkeursvorm wordt de melk periodiek toegediend (bijvoorbeeld dagelijks in doseringen van ongeveer 40 g) gedurende een langere tijdsperiode, zoals ten minste 15-30 dagen en meer tot verscheidene jaren. Zoals duidelijk zal zijn kan de behandelingsduur verkort worden door vergroting van de dagelijkse doseringen. Ook kunnen kleinere dose-
 30 ringen verspreid over de dag doelmatiger zijn dan een enkele dosering, die eenmaal per dag genomen wordt.

De vetvrije melk kan in elk voedingsprodukt worden opgenomen, zolang als het voedingsprodukt niet behandeld wordt bij een temperatuur die te hoog is en de vasculaire behandelingseigenschappen van het pro-
 35 duct zou inactiveren. Een temperatuur lager dan 150°C verdient de voorkeur. Bijvoorbeeld kunnen puddingen of yoghurt met hyperimmune melk bereid worden.

Voorts is gebleken, dat de weifracties het middel of de middelen bevat, die verantwoordelijk zijn voor de waargenomen en hiervoor ver-
 40 melde gunstige eigenschappen. Deze zure weifractie kan eveneens aan si-

ropen, roomijsmengsels, snoepgoed, dranken, veevoeders of dergelijke worden toegevoegd (zie Kosikowski, hiervoor, blz. 446). Die deskundigen, waaraan bekend is dat de weifractie de factoren van belang bevat, zullen duidelijk inzien, dat verdere scheiding kan worden gedaan om
5 krachtigere fracties te verkrijgen.

Voorts kan, bij het verlichten van afwijkingen, die met roken samenhangen, de melk in de te roken stof worden opgenomen, zoals door tabak met een aerosolvorm van de melk te besproeien.

Terwijl nu de onderhavige uitvinding in algemene zin beschreven
10 is, zal deze verder worden beschreven onder verwijzing naar bepaalde specifieke voorbeelden, die slechts ter toelichting worden verschaft en die bestemd zijn ter beperking tenzij anders aangegeven.

Bereiding van melkprodukten

Voorbeeld I

15 Vijf Holstein koeien werden tegen *Escherichia coli* (American Type Culture Strain No. 13076) geïmmuniseerd. De primaire immunisatie werd tot stand gebracht door iontramusculaire injectie van een vaccin, dat door warmte gedode E. coli cellen gesuspenderd in fysiologische zoutoplossing, bevatte. De concentratie van bacteriële cellen was
20 $4 \times 10^8/\text{cm}^3$. Een dosis van 5 cm^3 (20×10^8) cellen werd i.m. eenmaal per week gedurende vier opeenvolgende weken geïnjecteerd. Melk verzameld tijdens de vijfde week werd onderzocht op de aanwezigheid van antilichamen tegen E. coli. De aanwezigheid van antilichaam tegen E. coli werd bepaald onder toepassing van een micro-agglutinatiemethode.
25 de. Deze methode houdt reactie van verschillende oplossingen van melkwei met een gefixeerde concentratie E. coli bacteriële cellen gesuspenderd in een buffer in. De aanwezigheid van antilichamen in de melk veroorzaakt agglutinatie van de bacteriële cellen. De melk wordt op de wijze van een reeks verdund en er komt een punt, wanneer de concentratie van antilichamen te laag is om de agglutinatie-reactie te veroorzaken. De maximum verdunding, die agglutinatie veroorzaakt, is de antilichaamtiter. De aanwezigheid van een hoge antilichaamconcentratie in melk is een indicatie, dat de immunisatiemethode sensibilisatie van het immuunsysteem van de koe tegen het antiogeen veroorzaakt. Tabel A ver-
35 gelijkt de antilichaamtiter tegen E. coli bij vijf koeien vòòr en na primaire immunisatie.

Tabel A

Melk-antilichaamtiter bij 5 koeien vòòr en na
immunisatie tegen E. coli

	<u>Koe nr.</u>	<u>Vòòr immunisatie</u>	<u>Na immunisatie</u>
5	1	0	640
	2	0	1.280
	3	0	5.000
	4	0	1.280
10	5	0	10.000

Bij elk geval was er een aanzienlijke toename in de melktiter tegen E. coli na immunisatie. Daaruit werd geconcludeerd, dat de immunisatie sensibilisatie van de koe tegen E. coli veroorzaakt. Nu een sensibilisatietoestand is opgewekt ontvingen de koeien stimuleringsinjectionen van dezelfde dosis antigeen elke 14 dagen, waarbij dus een periode van hyperimmune toestand werd tot stand gebracht en gehandhaafd, gedurende welke tijd de melk dagelijks werd verzameld en verwerkt onder vorming van taptemelkpoeder.

Het taptemelkpoeder, dat volgens de hiervoor uiteengezette methode was voortgebracht, werd op gunstige eigenschappen onderzocht onder toepassing van een aantal ratten, infra.

Voorbeeld II

Het identieke experiment zoals beschreven in voorbeeld I werd uitgevoerd met de uitzondering, dat een polyvalent vaccin, bestaande uit de in tabel B hierna vermelde bacteriestammen als het gekozen antigeen werd gebruikt. De verschillende bacteriestammen werden verenigd door gelijke gewichten van de gelyofiliseerde bacteriële cellen te mengen en het mengsel in een zoutoplossing te verdunnen onder vorming van een concentratie, die identiek is aan die bij voorbeeld I toegepast. De resultaten van de proeven bij melk geproduceerd onder deze gekozen antigenen waren positief, infra.

Tabel B

Bacteriële antigenen		
	Organisme	ATTC No.
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	11631
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	155
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 1	8671
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 3	10389
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 5	12347
10	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 8	12389
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 12	11434
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 14	12972
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 18	12357
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , A. Type 22	10403
15	<i>Aerobacter aerogenes</i>	884
	<i>Escherichia coli</i>	26
	<i>Salmonella enteritidis</i>	13076
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7700
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9590
20	<i>Salmonella typhimurium</i>	13311
	<i>Haemophilus influenzae</i>	9333
	<i>Streptococcus viridans</i>	6249
	<i>Proteus vulgaris</i>	13315
	<i>Shigella dysenteriae</i>	11835
25	<i>Streptococcus</i> , Groep B	
	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus mutans</i>	
	<i>Corynebacterium</i> , Acne, typen 1 en 2	
30	* American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852	

Opgemerkt dient te worden, dat de in dit voorbeeld geproduceerde
 35 melk identiek is aan die geproduceerd bij een voorkeursuitvoeringsvorm
 van de uitvinding beschreven in de samenhangende Amerikaanse octrooi-
 aanvraag 875.140, ingediend 6 februari 1978 door Beck en Amerikaans oc-
 trooischrift 4.284.623. De aanvrager beschrijft, dat de melk van het
 onderhavige voorbeeld eveneens zeer gunstige anti-artritische eigen-
 40 schappen heeft en het octrooi beschrijft dat de melk anti-inflammatoire

840 3248

eigenschappen heeft.

Voorbeeld III

Een stam van Streptococcus mutans werd in overeenstemming met gevestigde technieken gekweekt. Kweken van S. mutans AHT (serologisch a),
 5 BHT (groep b), 10449 (groep c) en 6715 (groep d) werden gekweekt in een gedialyseerd tryptosemilieu. De cellen werden door centrifugeren bij 4000 x G geogst en vijfmaal met een 0,1 molaire met fosfaat gebufferde zoutoplossing, pH 7,0, gewassen. De cellen werden geïnactiveerd door 30 minuten op 60°C te verwarmen en werden opnieuw gesuspenderd tot een
 10 eindconcentratie van S. mutans AHT, BHT, 10449 en 6715 met 5×10^8 cellen/ml. Dit preparaat werd gebruikt om twee koeien te immuniseren. Elke koe werd bij twee gescheiden gelegenheden geïmmuniseerd met vers antigeen van alle vier groepen van S. mutans (groepen a, b, c en d). Een koe werd vervolgens geïmmuniseerd volgens de gevestigde technieken
 15 van de onderhavige uitvinding om een melkprodukt voort te brengen. Na immunisatie werden bloedmonsters van de koe genomen tot de serum-antilichaamtiter zijn hoogste niveau bereikte, daarna werd de melk verzameld. De melk zelf werd vervolgens gedroogd en verpoederd, opnieuw in overeenstemming met gevestigde technieken onder voortbrengen van een
 20 poedermelk met positieve gunstige eigenschappen.

Opgemerkt dient te worden, dat de in dit voorbeeld geproduceerde melk identiek is met de caries remmende melk beschreven door Beck in het Britse octrooischrift 1.505.513.

Voorbeeld IV

25 Het in tabel C hierna voorgestelde polyvalente vaccin werd gebruikt zoals in voorbeeld II om een koe te immuniseren en hyperimmune melk te verkrijgen met cardiovasculaire of pulmonaire effecten.

Tabel C

	<u>Bacetie</u>	<u>ATTC No.</u>
	1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14212
5	2. <i>Pseudomonas maltophilia</i>	17666
	3. <i>Streptococcus equisimili</i>	9542
	4. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	27957
	5. <i>Streptococcus uberis</i>	27958
	6. <i>Streptococcus bovis</i>	15351
10	7. <i>Streptococcus bovis</i>	27960
	8. <i>Pasteurella multocida</i>	9659
	9. <i>Pasteurella multocida</i>	6533
	10. <i>Pasteurella haemolytica</i>	14003
	11. <i>Pasteurella multocida</i>	15743
15	12. <i>Moraxella bovis</i>	10900
	13. <i>Actinobacillus lignieresii</i>	13372
	14. <i>Corynebacterium renale</i>	10848
	15. <i>Fusobacterium necrophorum</i>	25286
	16. <i>Bacillus cereus</i>	25621
20	17. <i>Salmonella dublin</i>	15480
	18. <i>Salmonella heidelberg</i>	8326
	19. <i>Salmonella paratyphi</i>	11511
	20. <i>Yersinia enterocolitica</i>	9610

25

BIOLOGISCHE STUDIES

A. Cardiovasculaire effecten.

Materialen en methoden1. Dieren

- 30 Negen jonge volwassen vrouwelijke konijnen van de New Zealand White stam werden voor dit onderzoek gebruikt. De konijnen werden gehuisvest in het College of Medicine's Vivarium van de Universiteit van South Alabaman in Mobile. De ruimte, waarin de konijnen werden gehouden, werd op 22,2°C gehouden met 12 uren licht gevolgd door 12 uren
- 35 donker tijdens elke periode van 24 uren. Slechts één konijn werd in elke kooi gehuisvest.

De konijnen werden gevoed met diëten (zie hierna) en opgeofferd tijdens de tweede en derde week na het beëindigen van de diëten.

2. Diëten

- 40 De konijnen werden in twee groepen verdeeld. Beide groepen ontvin-

840 3248

gen een uitgebalanceerd laboratoriumvoer ad libitum. Controle konijnen van groep I (N=4) ontvingen Jerrell's niet vette droge melk opgelost in leidingwater (15 g droge melk/500 ml water). Experimentele konijnen in groep II (N=5) ontvingen dezelfde concentratie droge hyperimmune melk van hetzij de voorbeelden I, II, III of IV, die eveneens in leidingwater was opgelost. Het water-melkmengsel werd dagelijks veranderd. Het verse mengsel werd in gesteriliseerde flessen van glas of kunststof geplaatst. Konijnen ontvingen geen vloeistof anders dan het water, dat gebruikt wordt om de droge melk op te lossen.

10 3. Onderzoeksmethoden

Na 3 maanden drinken van de opgeloste, niet vette droge melk (groep I) of de hyperimmune melk werden de konijnen gewogen en geanaesthetiseerd door injectie van natriumpentobarbital in een oorader. Het lichaamsgewicht van elk konijn op het tijdstip van opoffering werd vergeleken met het lichaamsgewicht ervan op de eerste dag van het dieet. Er was geen wezenlijk verschil tussen de lichaamsgewichten van konijnen, die hyperimmune melk ontvingen en die, die de niet vette droge melk ontvingen. Harten en de grote vaten bij de basis van het hart werden verwijderd en geprepareerd voor onderzoek volgens enkele verschillende methoden. Monsters werden gecodeerd, zodat de onderzoeker niet op de hoogte was of het materiaal controle materiaal of experimenteel materiaal was.

Resultaten en commentaar

1. Aftast elektronmicroscopie

25 Voor SEM werd het inwendige (endocardiaal) oppervlak van het hart afgetast onder toepassing van variabele vergrotingen (X10-40.000). Gebieden van specifiek belang (minimum van 5 willekeurig gekozen gebieden/hart) werden vervolgens bestudeerd en gefotografeerd.

30 Controle harten vertoonden in tegenstelling tot experimentele harten uitgebreide endotheliale beschadiging, die in grootte en ernst varieëerden. Kraters of holten waren aanwezig, waar één of meer cellen waren gedegenerieerd en losgeraakt. Kleine holten waren in vele cellen aanwezig. In sommige gevallen was een fibrineachtige stof gemengd met bloedcellen en plaatjes rond of binnen de kraters. Dergelijke plaatsen 35 werden geïnterpreteerd als trappen in de vorming van atheromateuze trombi.

Verlies van endotheliale cellen zoals duidelijk bij de controle harten, zou bloed in de hartkamers aan endocardiaal bindweefsel blootstellen en leiden tot de vorming van trombi. SEM toonde aan dat hyper- 40 immune melk endotheliale cellen van het konijn beschermde en tromboge-

nese voorkwam.

2. Transmissie elektronmicroscopie

TEM liet aanzienlijke verschillen zien in de bloedvaten van controle harten en experimentele harten. Tot wezenlijke pathologische kenmerken van bloedvaten in controle harten behoorden: (1) grote lipidedruppels, die soms vasculaire lumina afsloten; (2) endotheliale degeneratie; (3) veelvoudige, kleine lipide vacuolen in endotheliale cellen; (4) enkelvoudige of veelvoudige grote lipidedruppels, die bijna het cytoplasma van endotheliale cellen vulden; (5) schuimcellen beladen met lipide; (6) sterke neiging van fibrine en plaatjes om aan het lumenale oppervlak van endotheliale cellen te hechten.

Alle hiervoor vermelde stoornissen begeleiden de pathogenese van atherosclerose. Coronaire, renale en cerebrale slagaders zijn bekend als bijzonder gevoelig voor atherosclerose. Er is focale betrokkenheid van de bloedvaten eerder dan totale betrokkenheid over hun lengte. De ziekte werd niet aangetroffen in bloedvaten van representatieve gebieden van de harten van konijnen, die immune melk dronken.

3. Histologie

Gedeelten van harten van alle controle konijnen werden verdeeld: 1 deel werd in paraffine ingebed en 1 deel in kunststof. Secties van kunststofmonsters gesneden met een dikte van 1 micrometer en gekleurd met toluïndeblauw of paragon lieten duidelijk twee verschillen zien tussen controle harten en experimentele harten: (1) lipide was aanwezig in de lumina van enkele bloedvaten van controle harten en (2) sommige cardiale spierweefsels van controle harten waren met lipide gevuld. Harten van konijnen, die immune melk dronken, manifesteerden deze kenmerken niet.

4. Aantoning van lipiden

Lipiden werden gelokaliseerd met twee standaardmethoden, Oil Red O en Sudan Black B. Beide methode tonen selectief lipiden in secties van bevroren weefsel aan.

Elke methode toonde lipide-afzettingen aan in de tunica intima en tunica media van bloedvaten in controle harten. Deze twee tunica van controle aorta's waren bijzonder zwaar met lipide geïnfilteerd. Tunica intimas van bloedvaten in controle harten bevatten verdikkingen, verenigd met lipide, die typerend waren voor atherosclerose. Coronaire bloedvaten van konijnen op hyperimmune melk misten echter atherosclerotische lipide-afzettingen.

5. Enzymen

De activiteiten van de volgende enzymen werden bestudeerd en ge-

waardeerd in bevroren secties van controle en experimentele konijnhart-
ten: (1) zure fosfatase, (2) alkalische fosfatase, (3) isocitraatdehydro-
genase, (4) succinaatdehydrogenase en (5) cytochroomoxidase. De ac-
tiviteit van zuur fosfatase werd eveneens biochemisch bepaald.

- 5 Van de verschillende enzymen, waarvan de activiteiten werden ge-
waardeerd, vertoonde alleen cytochroomoxidase (een enzym, dat samen-
hangt met veroudering) een aanzienlijk grotere activiteit in controle
harten dan in experimentele harten. Het is opmerkenswaardig, dat con-
trole harten foci van cardiale spiervezels bevatten, met een diameter-
10 afmeting van ongeveer 1 mm, die intensief kleurden. Dergelijke gebieden
waren duidelijk zeer rijk aan mitochondria en kunnen focale veroude-
ringsgebieden zijn.

6. Bloedstroomgehalten

- Analyse van de serum cholesterolgehalten bij de konijnen van deze
15 onderzoeken vertoonden een opmerkelijke toename in serum choleste-
rolgehalten. Deze controle konijnen, gevoed met een dieet zonder hyper-
immune melk, laten een gemiddeld serum cholesterolgehalte van 4450
mg/dl zien. Daarentegen vertoonden de konijnen gevoed met een dieet van
hyperimmune melk een serumcholesterolgehalte, dat gemiddeld minder dan
20 de helft van dat getal was, 2167 mg/dl. Dit wordt verondersteld het me-
chanisme te zijn, waardoor de hiervoor besproken fysiologische verbete-
ringen worden beïnvloed.

7. Klinische onderzoeken

- Klinische onderzoeken zijn nu begonnen bij drie menselijke in-
25 dividuen om de waarde van de hyperimmune melk van de onderhavige uit-
vinding bij de vermindering van de plasma lipide-waarden te bepalen.
Hoewel op geen enkele wijze volledig geven deze onderzoeken duide-
lijk de waarde van het hyperimmune melkdieet aan bij het verminderen
van lipide-waarden. Hoewel niet beproefd tegen controles om voor de
30 hand liggende redenen, zijn aanvangslipidewaarden opmerkelijk voor alle
drie individuen verminderd. De exacte lipide-waarden zijn in tabel C
vermeld.

B. Pulmonaire effecten

- Onderzoeken over de pulmonaire effecten, soortgelijk aan die
35 hiervoor met betrekking tot cardiovasculaire effecten werden uitgevoerd
bij ratten om het effect te bepalen van een dieet van hyperimmune melk
op zoogdieren, die aan sigarettenrook zijn blootgesteld. De diëten en
onderzoeksmethode waren in hoofdzaak soortgelijk aan die hiervoor ver-
meld met betrekking tot de onderzoeken over cardiovasculaire effec-
40 ten, behalve dat de betrokken dieren vrouwelijke albinoratten waren van

de Charles Rivers, CD stam. Een totaal van 68 ratten waren bij de onderzoeken betrokken.

Tabel D

Plasmalipide-waarden voor menselijke individuen			
individu IF	TRIG	CHOL	LDL
begin	88	170	107
6 weken IM	61	140	83
10 individu 2F			
begin	71	173	114
6 weken IM	69	156	97
12 weken IM	87	150	88
15 individu 3M			
begin	675	269	—
6 weken IM	190	264	181
12 weken IM	210	265	178

20 waarden = mg/dl

RESULTATEN EN COMMENTAAR

Door middel van histologisch onderzoek werd vastgesteld, dat de longen van controle ratten, niet blootgesteld aan rook, en de longen van ratten op een dieet van hyperimmune melk en blootgesteld aan rook veel minder neutrofielen bevatten dan de longen van ratten blootgesteld aan rook of aan rook en gevoed met een dieet van normale of controle melk. Lymfocyten waren eveneens minder in aantal in de longen van de controle dieren en zelfs verder verminderd in het bronchiaal verenigde lymfoïde weefsel (BALT) in de longen van ratten, die gevoed werden met een dieet van hyperimmune melk en blootgesteld aan rook.

Aftast-elektronmicroscopie liet zien dat het oppervlak van de alveoli van ratten blootgesteld aan rook en gevoed met een dieet van hyperimmune melk aanzienlijk schoner was dan dat van ratten blootgesteld aan rook of blootgesteld aan rook en gevoed met een dieet van normale of controle melk. Het dieet met hyperimmune melk bleek de activiteit van de stofcellen of longmacrofagen te vergroten. De stofcellen in bronchi, bronchiolen en alveoli waren veel actiever in fagocytose in de longen van ratten blootgesteld aan de rook en gevoed met een dieet van hyperimmune melk dan na de andere experimentele omstandigheden. Van de

ratten blootgesteld aan rook, vertoonden alleen die gevoed met een hyperimmuun dieet stofcellen, constant op de oppervlakken van alveolaire cellen Type 1 in de gasuitwisselingspassages en op de epitheliale cellen van de lucht geleidende passages. Pseudopodiën van stofcellen verslonden produkten van de epitheliale cellen en andere overblijfselen, die aanwezig waren. Derhalve werd de fysiologische "voortreffelijkheid" van de lucht geleidende ademhalingsgedeelten van de long gehandhaafd bij ratten, gevoed met hyperimmune melk, zelfs bij aanwezigheid van overmatige afscheiding en overblijfselen, die met het roken van sigaretten samenhangen.

De bloed-luchtgrenslaag werd als dikker waargenomen in de longen van ratten blootgesteld aan rook met of zonder normale of controle melk dan bij ratten blootgesteld aan rook en gevoed met een dieet van hyperimmune melk. Dit verschijnsel wordt verondersteld nauw samen te hangen met de kortademigheid, die vaak wordt waargenomen in samenhang met roken van sigaretten.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor de behandeling van cardiovasculaire ziekten bij een dier, met het kenmerk, dat men aan het dier melk, verzameld bij een rund, dat in een hyperimmune toestand wordt gehouden, in een hoeveelheid en gedurende een tijdsperiode, die voldoende is om anti-arteriosclerotische en anti-verouderende vasculaire effecten voort te brengen, toedient.
2. Werkwijze voor het behandelen van pulmonaire afwijkingen die samenhangen met milieufactoren bij een dier, met het kenmerk, dat men aan het dier melk, verzameld bij een rund, dat in een hyperimmune toestand wordt gehouden, in een hoeveelheid en gedurende een tijd, die voldoende is om een vermindering in het aantal neutrofielen en lymfocyten aanwezig in het longweefsel, fagocytose van overblijfselen aanwezig in longweefsel of verdunning van de bloed-luchtgrenslaag voort te brengen, toedient.
3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de afwijking arteriosclerose is.
4. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat de milieufactoren rook omvatten, die door verbranding van tabak wordt voortgebracht.
5. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat de arteriosclerose atheromateuze of niet-atheromateuze arteriosclerose is.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de afwijking atherosclerose is.
7. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de afwijking de normale veroudering van het vasculaire systeem betreft.
8. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de melk in poedervorm is.
9. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de melk in stroombare vorm is.
10. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de melk in geconcentreerde vorm is.
11. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de melk in een voedingsprodukt is opgenomen.
12. Werkwijze volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het produkt yoghurt is.
13. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het rund een koe is.
14. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het rund in de hyperimmune toestand wordt gehouden door aan het rund

840 3248

stimuleringsinjecties van een antigeen of mengsel van antigenen toe te dienen.

15. Werkwijze volgens conclusie 14, met het kenmerk, dat het antigeen of mengsel van antigenen geïnjecteerd wordt in een dosis van 5 10^6 cellen tot 10^{20} cellen.

16. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de melk bereid is met een methode, welke het sensibiliseren van een rund met een antigeen of mengsel van antigenen,

10 het toedienen van antigeenbronnen in een dosering, die voldoende is om een hyperimmune toestand bij het rund op te wekken en te handhaven en daarna het verzamelen van de melk van het rund, omvat.

17. Werkwijze volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat de werkwijze voorts het pasteuriseren van de verzamelde melk en het 15 verwijderen van het vet uit de melk omvat.

18. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de melk dagelijks wordt toegediend.

19. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat de melk wordt opgenomen in een stof, die wordt verbrand onder het voortbrengen 20 van de rook.

20. Werkwijze volgens conclusie 19, met het kenmerk, dat de stof tabak is.

21. Werkwijze voor het verlagen van de lipidegehalten in de bloedstroom bij een dier, met het kenmerk, dat men

25 aan het dier melk toedient, dat verzameld is van een rund, dat in een hyperimmune toestand wordt gehouden, in een hoeveelheid en gedurende een tijd die voldoende is om het verlagende effect teweeg te brengen.

22. Werkwijze volgens conclusie 21, met het kenmerk, dat de 30 lipiden gekozen zijn uit de groep bestaande uit triglyceriden, cholesterol, lipiden met lage dichtheid en mengsels daarvan.

23. Werkwijze voor het stimuleren van de longmacrofaagactiviteit bij een dier, met het kenmerk, dat men aan het dier melk toedient, die verzameld is bij een rund, dat in een immune toestand wordt gehouden, 35 in een hoeveelheid en gedurende een tijd die voldoende is om de toename in de macrofaagactiviteit voort te brengen.

24. Hyperimmune melk onder andere geschikt voor de behandeling van cardiovasculaire ziekten bij een dier, met het kenmerk, dat de hyperimmune melk verzameld is bij een rund, dat in een hyperimmune 40 toestand is gehouden.

8403248

25. Hyperimmune melk volgens conclusie 24, met het kenmerk, dat de melk zich in poedervorm bevindt.
26. Hyperimmune melk volgens conclusie 24, met het kenmerk, dat de melk zich in stroombare vorm bevindt.
- 5 27. Hyperimmune melk volgens conclusie 24, met het kenmerk, dat de melk zich in geconcentreerde vorm bevindt.
28. Hyperimmune melk volgens conclusie 24, met het kenmerk, dat de melk zich in een voedingsprodukt bevindt.
29. Hyperimmune melk volgens conclusie 28, met het kenmerk, dat
10 het voedingsprodukt yoghurt is.
30. Hyperimmune melk volgens conclusie 24, met het kenmerk, dat het rund een koe is.
31. Werkwijze voor het winnen van hyperimmune melk met het kenmerk, dat het rund in een hyperimmune toestand wordt gehouden door toediening aan het rund van stimuleringsinjecties van een antigeen of
15 mengsel van antigenen.
32. Werkwijze volgens conclusie 31, met het kenmerk, dat het antigeen of mengsel van antigenen geïnjecteerd wordt in een doses van 10^6 cellen tot 10^{20} cellen.
- 20 33. Werkwijze volgens conclusie 31 of 32, met het kenmerk, dat de melk bereid wordt volgens een methode, welke het sensibiliseren van een rund met een antigeen of mengsel van antigenen,
het toedienen van antigeenbronnen in een dosering, die voldoende
25 is om een hyperimmune toestand bij het rund teweeg te brengen en te handhaven en daarna het verzamelen van de melk bij het rund, omvat.
34. Werkwijze volgens conclusie 33, met het kenmerk, dat de werkwijze voorts het pasteuriseren van de verzamelde melk en het verwijderen van het vet uit deze melk omvat.
- 30 35. Farmacologisch preparaat, met het kenmerk, dat het preparaat hyperimmune melk volgens conclusie 24 respectievelijk verkregen volgens een of meer van de conclusies 31-34 bevat.
36. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 35, met het kenmerk, dat de hyperimmune melk wordt opgenomen in een stof, die wordt verbrand,
35 om rook teweeg te brengen.
37. Farmacologisch preparaat volgens conclusie 36, met het kenmerk, dat deze stof tabak is.

+++++

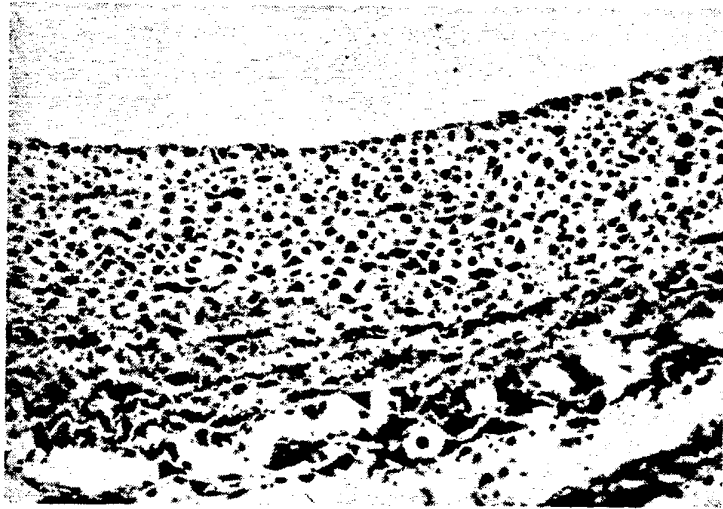


FIG. 1 A

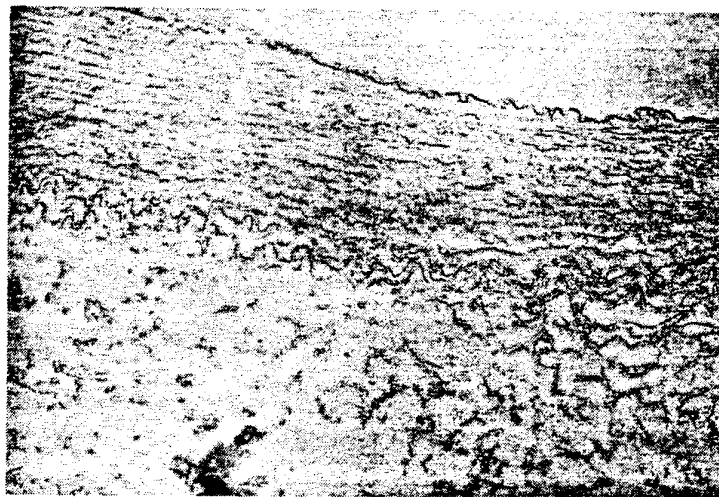


FIG. 1 B

8403248
Fig. 1. Microfoto's van cryostatistische secties van konijnaorta's gekleurd met Oil Red O om specifiek lipiden aan te tonen x 300.

- A. Controle. Talrijke, kleine lipidedruppels (pijlen) zijn aanwezig.
- B. Immune melk. Lipidedruppels zijn in de wand van de aorta afwezig. Het lipid (pijl) in het weefsel buiten de aorta is normaal en laat zien dat lipiden zichtbaar zouden zijn, wanneer zij in de wand van de aorta aanwezig zouden zijn.

2/8

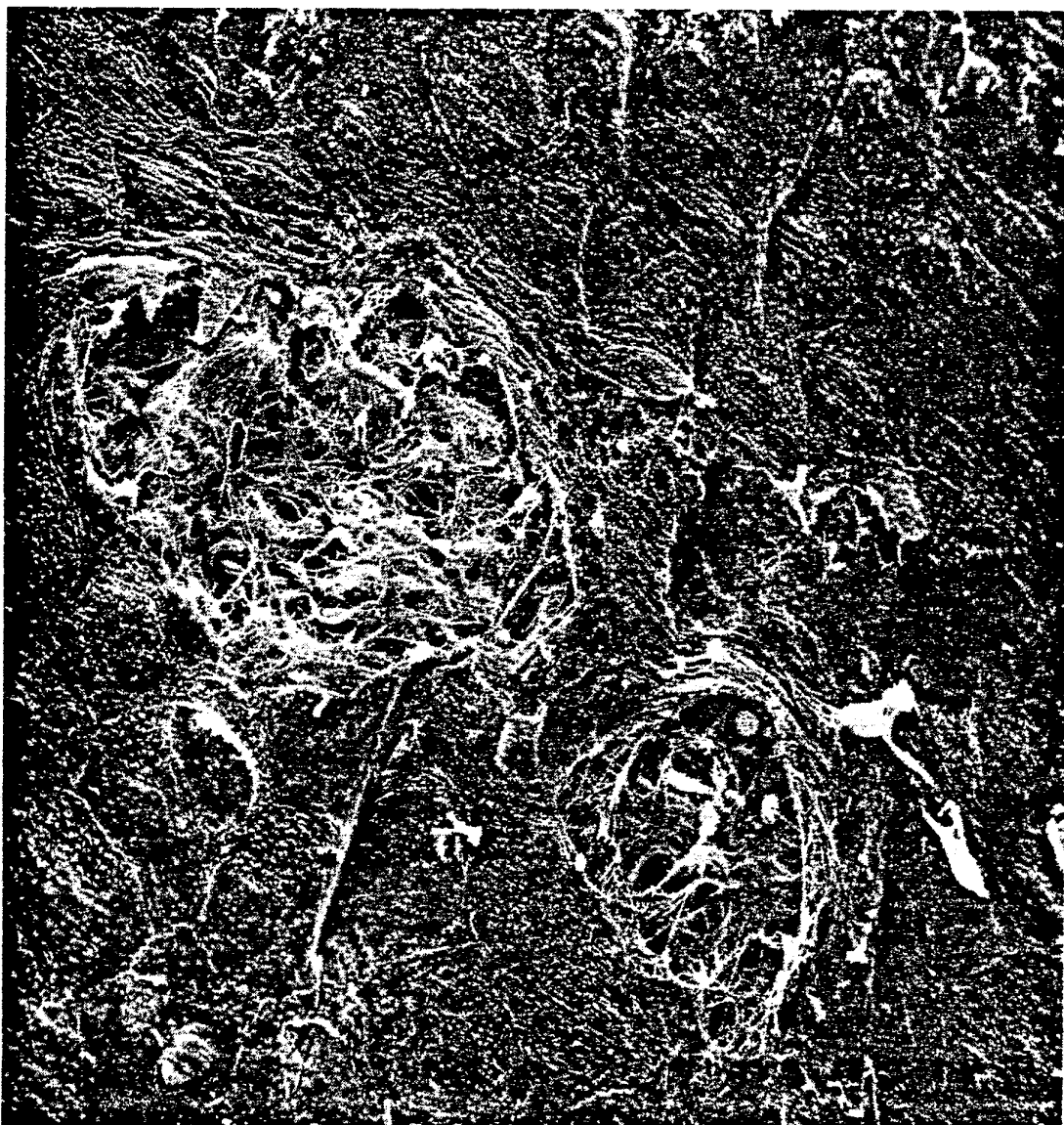


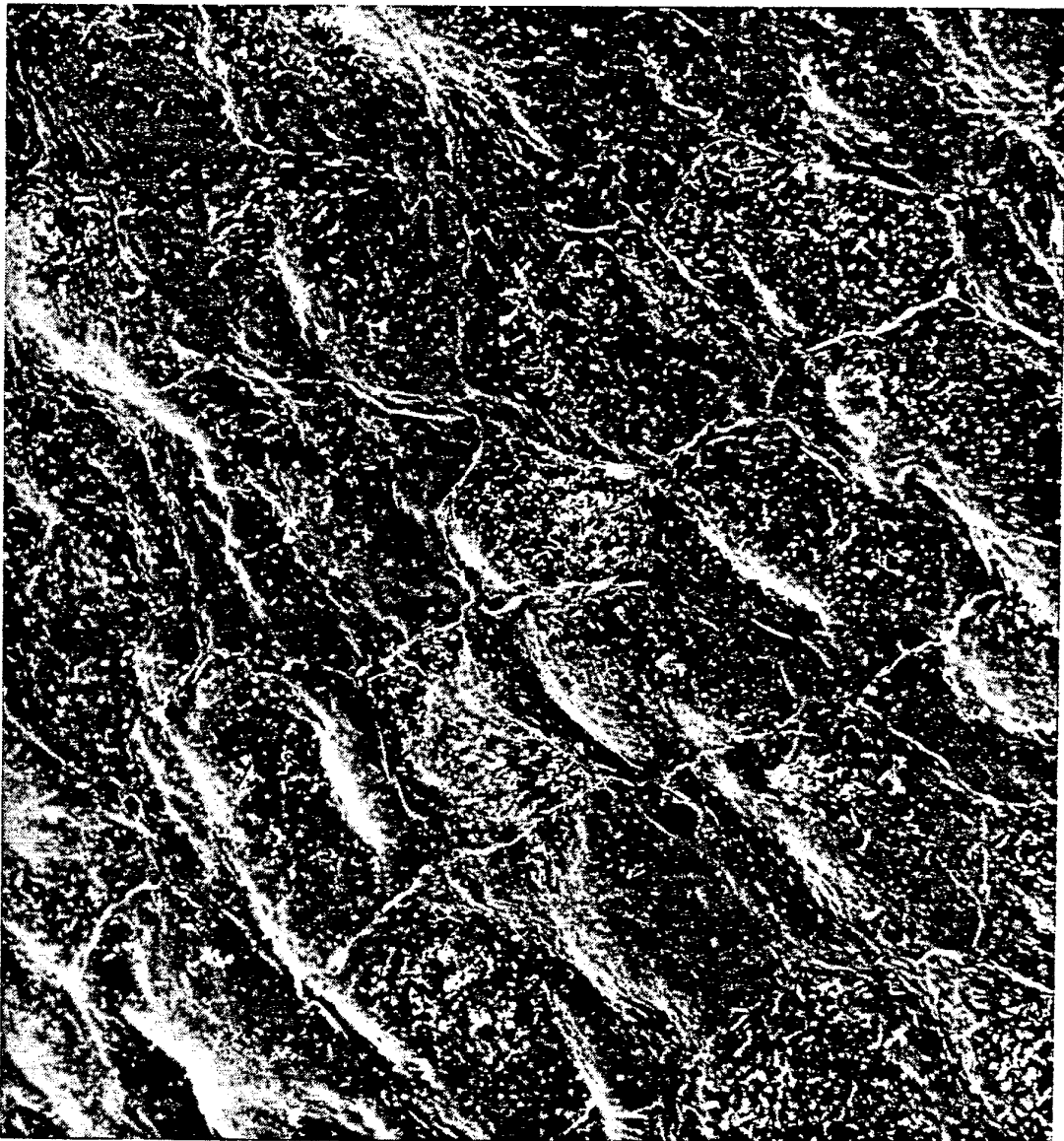
FIG. 2 A

84 03 248

Fig. 2. Aflastelectron microfotografen van het inwendige ventriculaire oppervlak van konijnenharten x1750.

A. Controle. Twee thrombi liggen beneden het geerodeerde epithelium van het endocardium .

3/8



84 03 248

FIG. 2 B

B. Immune melk. Het epithelium is intact en er is geen bewijs van thrombi.

84 03 248



FIG. 3 A



FIG. 3 B

3. Transmissien electron microfoto's van bloedvaten in konijnenharten x3420.

Controle. Lipide vacuolen zijn aanwezig in de endotheliale cellen (bovenste pijlen) en gladde spiercellen (onderste pijlen).

Immune melk. Lipide vacuoles zijn in het endothelium en de gladde spiercellen afwezig.

5/8



FIG.4 A

84 03 248

6/8



84 03 248

FIG. 4 B

7/8



FIG. 5

8403248

8/8



FIG. 6

84 03 248