



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 665 355 A5

⑤① Int. Cl.4: A 61 K 35/74

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 3039/85

㉒ Anmeldungsdatum: 12.07.1985

③① Priorität(en): 12.07.1984 US 630013

㉔ Patent erteilt: 13.05.1988

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 13.05.1988

㉗ Inhaber:
Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton/MT
(US)

㉚ Erfinder:
Ribi, Edgar Ernst, Hamilton/MT (US)

㉛ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Pharmazeutische Zusammensetzung.**

⑤⑦ Eine pharmazeutische Zusammensetzung ist dazu fähig, das Auftreten eines akuten Strahlungs-Syndroms in warmblütigen Tieren zu verhindern, das entsteht, wenn man die warmblütigen Tiere einer ganzen Körperdosis von mindestens 100 Rad einer Röntgenstrahlung aussetzt. Ausserdem verhindert sie das Auftreten von Septikämie in warmblütigen Tieren. Diese Zusammensetzung enthält

- (a) gereinigtes, entgiftetes Endotoxin, welches kein nachweisbares 2-Keto-3-desoxyoctanoat, zwischen 350 und 475 nMol/mg Phosphor und zwischen 1700 und 2000 nMol/mg an Fettsäuren enthält und
- (b) einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

PATENTANSPRÜCHE

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, die fähig ist, das Auftreten eines akuten Strahlungs-Syndroms in warmblütigen Tieren zu verhindern, das entsteht, wenn man die warmblütigen Tiere einer ganzen Körperdosis von mindestens 100 Rad einer Röntgenstrahlung aussetzt, und das Auftreten von Septikämie in warmblütigen Tieren zu verhindern, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung

(a) gereinigtes, entgiftetes Endotoxin, welches kein nachweisbares 2-Keto-3-desoxyoctanoat, zwischen 350 und 475 nMol/mg an Phosphor und zwischen 1700 und 2000 nMol/mg an Fettsäuren enthält und

(b) einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Form einer NaCl/Phosphat-Pufferlösung vorliegt.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffmenge in einem Bereich von 1 und 1000 µg liegt.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffmenge in einem Bereich von 25 und 200 µg liegt.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die fähig ist, (1) das Auftreten eines akuten Strahlungs-Syndroms in warmblütigen Tieren zu verhindern, das entsteht, wenn man die warmblütigen Tiere einer ganzen Körperdosis von mindestens 100 Rad einer Röntgenstrahlung aussetzt, und (2) das Auftreten von Septikämie in warmblütigen Tieren zu verhindern.

Wenn man warmblütige Tiere einer ganzen Körperdosis von mindestens etwa 100 Rad einer Röntgenbestrahlung aussetzt, so tritt eine komplexe Reihe von Symptomen auf, die als akute Strahlungs-Syndrome bezeichnet werden. Die Natur und die Heftigkeit akuter Strahlungs-Syndrome kann direkt mit der Dosis der Röntgenbestrahlung, der warmblütige Tiere ausgesetzt werden, in Beziehung gebracht werden. Ganz allgemein konnte festgestellt werden, dass das hämopoetische System, welches für die Produktion der Blutzellen verantwortlich ist, bei der Bestrahlung am schwersten beschädigt wird.

Die einzige wichtigste Konsequenz einer hämopoetischen Zerstörung, die einer Bestrahlungsaussetzung mit hohem Niveau folgt, ist die Tatsache, dass die antimikrobielle Immunität sowohl exogenen als auch endogenen Mikroorganismen gegenüber aufs Spiel gesetzt wird. Nach einer Bestrahlung mit einem hohen Niveau an Röntgenstrahlen sind alle warmblütigen Tiere, einschliesslich von Menschen, gegenüber einem breiten Spektrum von Bakterien, Viren, Protozoen usw. anfällig, wie es in «Beneficial Effects of Endotoxins», herausgegeben von Alois Nowatny, Seiten 127–148, Plenum Press, 1983, diskutiert wird.

Um die toxische Wirkung der Röntgenstrahlung zu bekämpfen, ist es notwendig, die Produktion und die Differenzierung von Granulocyten (granulopoiesis) zu stimulieren. Granulocyten sind weisse Blutzellen, wie z. B. Makrophagen, Monocyten, Eosinophile und Basophile. Es ist bekannt, dass Blut einen Faktor enthält, der als Koloniestimulierungsfaktor (CSF) bekannt ist und der für eine Granulopoese notwendig ist. Dieser Kolonie-stimulierende Faktor ist in Chervenick, P.A. et al., Science 118 164, 1972, und Golde, D.W. et al., Lancet 2, 1397, 1972, beschrieben. Daher kann der Grad, in welchem Blut einen Kolonie-stimulierenden Faktor aufweist, direkt mit der Fähigkeit des Körpers, ho-

hen Bestrahlungsdosen zu widerstehen, in Beziehung gebracht werden.

Septikämie ist ein klinisches Syndrom, bei welchem die Infektion durch den Körper mit Hilfe des Blutstroms disseminiert. Septikämie stellt eine möglicherweise schreckliche Blutinfektion dar, die durch die verschiedensten Bakterien verursacht werden kann. Durch die Anwesenheit von Mikroorganismen und/oder die Anwesenheit ihrer giftigen Nebenprodukte im Blutstrom wird ein pathologischer Zustand verursacht.

In einem 1974 veröffentlichten Bericht wurde beschrieben, dass in den Vereinigten Staaten von Amerika jährlich 71 000 Menschen von Septikämie befallen werden, wovon ungefähr 25% der Fälle tödlich verlaufen. Eine der Hauptursachen für Septikämie sind post-operative Infektionen, die durch endogene Bakterien, welche aus dem Atmungstrakt oder dem gastrointestinalen Trakt stammen, verursacht werden (siehe Cruse, P.J.E., et al. Arch., Surg. 107, 106–210, 1973).

Gereinigtes, entgiftetes Endotoxin (RDE) ist dadurch gekennzeichnet, dass es zwischen 350 und 475 nMol/mg an Phosphor und zwischen 1700 und 2000 nMol/mg an Fettsäuren sowie kein nachweisbares 2-Keto-3-desoxyoctanoat aufweist. Gereinigtes und entgiftetes Endotoxin stellt gegenüber Endotoxin-Extrakten, die aus Enterobacteriaceae erhalten wurden, eine hervorragende Verbesserung dar, da das Endotoxin gereinigt und entgiftet ist und aus diesem Grund keine höchstgiftigen Komponenten mehr enthält, durch deren Anwesenheit Endotoxin-Extrakte für eine therapeutische Anwendung nicht geeignet waren (siehe Peptides as Requirements for Immunotherapy of the Guinea-Pig Line-10 Tumor with Endotoxins; Ribí, et al. Cancer Immunol. Immunother. Band 7, Seiten 43–58 [1979]). Die nützlichen Wirkungen von gereinigtem und entgiftetem Endotoxin im Vergleich zu Endotoxin-Extrakten, werden z. B. in den U.S. Patenten Nrn. 4 436 727 und 4 436 728; sowie in Ribí, E. Journal of Biological Response Modifiers 3:1–9, Raven Press, (1984) beschreiben.

Es ist daher ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die anfangs definierte pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie

(a) gereinigtes, entgiftetes Endotoxin, welches kein nachweisbares 2-Keto-3-desoxyoctanoat, zwischen 350 und 475 nMol/mg an Phosphor und zwischen 1700 und 2000 nMol/mg an Fettsäuren enthält und

(b) einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält.

Die erfindungsgemässe pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Verhinderung des Auftretens von Septikämie bei warmblütigen Tieren verwendet werden.

Durch Anwendung der genannten Zusammensetzung kann also das Auftreten eines akuten Strahlungs-Syndroms bei warmblütigen Tieren, das entsteht, wenn man die warmblütigen Tiere einer ganzen Körperdosis von mindestens etwa 100 Rad einer Röntgenstrahlung aussetzt, verhindert werden, wenn man den warmblütigen Tieren vor der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen eine wirksame Menge der erfindungsgemässen Zusammensetzung verabreicht.

Gereinigtes, entgiftetes Endotoxin, wie es hier verwendet wird, kann gemäss den in den U.S. Patenten Nrn. 4 436 727 und 4 436 728 beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere kann man Endotoxin-Extrakte, die zur Herstellung von gereinigtem, entgiftetem Endotoxin eingesetzt werden, aus beliebigen Enterobacteriaceae, einschliesslich der Elternorganismen und der Mutanten erhalten. In den weiter oben genannten Patenten sind Typen von Mikroorganismen angegeben, die man zur Herstellung des Ausgangsmaterials einsetzen kann, und ebenfalls sind verschiedene

Methoden zur Herstellung des Ausgangsmaterials angegeben. Die bevorzugte Methode zur Herstellung des Endotoxinextraktes wurde durch Chen et al., J. Infect. Dis 128 543 (1973) offenbart.

Das gereinigte, entgiftete Endotoxin, wie es weiter oben hergestellt wurde, wird mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger vereinigt, wie z. B. eine NaCl/Phosphatpuffer-Lösung, die parenteral injiziert werden kann, z. B. intravenös, intraperitoneal oder auch intramuskulär. Die erfindungsgemässe Zusammensetzung enthält vorzugsweise 1 bis 1000 µg gereinigtes, entgiftetes Endotoxin, insbesondere 25 bis 200 µg, basierend auf der Verabreichung an einen typischen 70 kg schweren erwachsenen Patienten. Diese Zusammensetzung kann an Patienten einmal, zweimal oder dreimal pro Woche verabreicht werden und die Zahl der Verabreichung beträgt üblicherweise etwa zwei- oder dreimal.

Die das entgiftete, gereinigte Endotoxin enthaltende Zusammensetzung, wenn sie zur Verhinderung des akuten Strahlungs-Syndroms verwendet wird, sollte mindestens 24 Stunden den warmblütigen Tieren vor der Röntgenstrahlung in hoher Dosis von mindestens etwa 100 Rad verabreicht werden, vorzugsweise zwischen etwa 24 und 48 Stunden.

Beispiel 1

Versuch zur Induktion eines Kolonie-stimulierenden Faktors (CFS) in vivo

Drei Gruppen von NMRI-Mäusen (jede Gruppe enthielt fünf Mäuse) wurden jeweils 5 µg der Testsubstanz, wie sie in Tabelle I identifiziert ist, intravenös injiziert.

Tabelle I

| Substanz | Kolonien (X + Stanverschiebung)* |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Gereinigtes entgiftetes Endotoxin aus S. minnesota R595 | 80 ± 3,6 |
| Gereinigtes entgiftetes Endotoxin aus S. typhimurium G30/C21 | 72 ± 9,3 |
| Saline-Kontrolle | 0 |

* Arithmetisches Mittel

Zwei Stunden nach der Injektion erhielt man Blut aus dem Plexus orbitalis und sofort anschliessend wurde dieses Blut dreifach untersucht, um den CSF-Gehalt zu bestimmen. Diese Versuchsmethode wurde von Metcalf, D. und Moore, M.A., in Haemopoetic Cells, North Holland Publishing Company, Amsterdam, Holland, 1971, beschrieben. Der CSF-Gehalt wurde als Anzahl von Kolonien in 10⁵ kernhaltiger Markknochenzellen/ml ausgedrückt. Wie in Tabelle I gezeigt ist, zeigen die zwei Gruppen von Mäusen, denen RDE injiziert wurde, einen bedeutende CSF-Aktivität, während die Kontrollgruppe der Mäuse, welcher nur Saline injiziert wurde, keine CSF-Aktivität aufweist. Durch diesen Versuch wird festgelegt, dass das gereinigte und entgiftete Endotoxin die Produktion von CSF stimuliert, welches zur Herstellung Differenzierung von Granulocyten (Granzlopoiesis) notwendig ist.

Beispiel 2

Schutz vor Röntgenbestrahlung

Zwei Gruppen von C3HeB/FeJ-Mäusen, jede Gruppe bestand jeweils aus 20 Mäusen, wurde je die in Tabelle II beschriebene Testsubstanz intravenös injiziert. Den Mäusen wurde die Injektion 24 Stunden bevor der Bestrahlung mit 600 Rad Röntgenstrahlen mit einer Geschwindigkeit von 70 Rad pro Minute verabreicht. Eine dritte Gruppe von 20 Mäusen (Kontrollgruppe) erhielt keine Injektion mit der

Testsubstanz. Diese dritte Gruppe wurde der Strahlung auf die gleiche Weise als die weiter oben genannten zwei Gruppen von Mäusen ausgesetzt.

Wie von A. Nowatny, Seite 127 festgestellt, lag der Gipfel der Häufigkeitsquote der Sterblichkeit für eine mittlere letale Dosis an Röntgenstrahlung zwischen 10 und 14 Tagen nach der Bestrahlung. Demgemäss erwartete man, dass beide Gruppen der Kontrolltiere sowie diejenigen Tiere, die vor der Bestrahlung mit gereinigtem und entgiftetem Endotoxin behandelt wurden, die ersten 10 Tage, nachdem man sie einer Strahlung mit hohem Niveau ausgesetzt hatte, wie weiter oben beschrieben ist, überleben würden. Nach 15 Tagen überlebten 85% der mit RDE behandelten Tiere die Bestrahlung, während nur 55% der Kontrolltiere überlebten. 20 Tage, nachdem die Tiere der Strahlung ausgesetzt wurden, blieben 20–75% der mit RDE behandelten Mäuse am Leben, während nur 25% der Kontrolltiere überlebten. Daraus geht hervor, dass das gereinigte, entgiftete Endotoxin einen wichtigen Faktor bei der Herabsetzung des Todesrisikos nach der Bestrahlung mit einem hohen Strahlungsniveau darstellt.

Tabelle II

| Präparat | Dose (µg) | Anzahl der Tiere | % Überlebende am Tag | | | |
|--------------------|-----------|------------------|----------------------|----|----|----|
| | | | 10 | 15 | 20 | 30 |
| Kontrolle | – | 20 | 100 | 55 | 25 | 20 |
| RDE-S. minnesota | 100 | 20 | 100 | 85 | 75 | 75 |
| RDE-S. typhimurium | 100 | 20 | 100 | 85 | 70 | 65 |

Beispiel 3

Schutz gegen das Auftreten von Septikämie

14 NMRI-Mäuse wurden mit einem Mikrogramm RDE vorbehandelt, das man durch eine intraperitoneale Injektion verabreichte. 24 Stunden später wurde jede der Mäuse operiert, wobei man das Zökum jeder einzelnen Maus unterband und punktierte, damit die Mäuse innerlich dem Angriff von Mikroorganismen ausgesetzt waren, wobei diese Mikroorganismen die Fähigkeit besaßen, das Auftreten von Septikämie günstig zu beeinflussen. Nach beendeter Operation wurden die Tiere 120 Stunden lang beobachtet. Eine zweite Gruppe von Mäusen wurde anschliessend auf genau die gleiche Weise operiert, aber diese Mäuse wurden nicht mit gereinigtem und entgifteten Endotoxin vorbehandelt. Die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle III zusammengestellt. 71% der mit RDE behandelten Mäuse überlebten 120 Stunden nach der Induktion der Septikämie. Diejenigen Mäuse, die nicht mit RDE vorbehandelt wurden, wiesen nur eine Überlebensrate von 21% auf.

Aus diesen Resultaten geht hervor, dass das gereinigte und entgiftete Endotoxin das Auftreten von Septikämie verhindert.

Tabelle III

Nichtspezifische Widerstandsfähigkeit gegenüber von Septikämie, die Mäusen durch zökale Unterbindung und Punktion induziert wurde

| Vorbereitung | 120 Std. nach der Induktion von Septikämie | |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------|
| | Tot/total | % Überlebende |
| 1 µg, ip, 24 Stunden vor der Operation | | |
| keine | 11/14 | 21 |
| RDE (S. typhimurium) | 4/14 | 71 |