(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 870 T2** 2005.06.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 690 722 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 870.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/03177**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 911 691.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/021288**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.03.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.09.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.01.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.06.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.06.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 39/00**
A61K 9/14, A61K 33/38, A61K 33/24, A61K 45/00

(30) Unionspriorität:
33385 **18.03.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
Cytimmune Sciences, Inc., College Park, Md., US

(72) Erfinder:
TAMARKIN, Lawrence, Rockville, US; PACIOTTI, Giulio Franco, Baltimore, US

(74) Vertreter:
Sternagel, Fleischer, Godemeyer & Partner, Patentanwälte, 51429 Bergisch Gladbach

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNG UND METHODE ZUR REDUKTION DER TOXIZITÄT VON BIOLOGISCH-AKTIVEN FAKTOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen und Verfahren zum Reduzieren der Toxizität von biologisch aktiven Faktoren, wie z. B. Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Außerdem umfasst die vorliegende Erfindung Impfstoffe, die für die Immunisierung eines Menschen oder Tieres gegen einen biologisch aktiven Faktor wirksam sind, wobei sie die Toxizität des Faktors reduzieren oder eliminieren. Genauer gesagt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Zusammensetzungen, die ein kolloidales Metall in Kombination mit einem biologisch aktiven Faktor enthalten, was den biologisch aktiven Faktor nicht toxisch macht.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Verschiedene biologisch aktive Verbindungen sind aus Menschen oder Tieren isoliert worden, von denen berichtet wurde, dass sie eine therapeutische Wirksamkeit hätten. Diese Verbindungen schließen Cytokine und Wachstumsfaktoren ein. Es wurde jedoch gefunden, dass, wenn diese verschiedenen Faktoren isoliert und gereinigt sind und dann in einen Menschen oder ein Tier injiziert werden, diese häufig schwere Nebenwirkungen auslösen und eine unerwünschte Toxizität aufweisen. Wegen dieser Toxizität war es schwierig, die Verbindungen therapeutisch zu verwenden. Außerdem war es schwierig die aktiven Verbindungen als Antigene zu verwenden, um Antikörper gegen die Moleküle herzustellen.

[0003] Fraker, D. L., Langstein, H. N. und Norton, J. A. beschreiben in dem Journ. of Exp. Med., Band 71, 1989, 1015–1020, die Toxizität von Interleukin-2 (IL-2), wenn es für menschliche Erkrankungen verwendet wird. Die Toxizität basiert auf der Heraufregelung von TNF, welches eine Wirkung als Mediator der Toxizität in Endotoxemia und einer Gramnegativen Sepsis hat. Durch das Injizieren von Anti-TNF-Antikörpern gleichzeitig mit der IL-2-Behandlung kann der toxische Effekt des IL-2 herabgesetzt werden.

[0004] Es wurden Aluminiumverbindungen verwendet, um wasserunlösliche antigene Substanzen zu bilden. Beispielsweise offenbart das U.S.-Patent Nr. 3,577,523, erteilt für Stolar et al., die Kombination von Aluminiumtannat mit antigenen Extrakten, um wasserunlösliche langsam freisetzende antigene Substanzen zu bilden. Genauer gesagt offenbart das Stolar et al.-Patent die Verwendung von antigenen Depotmitteln, die unlösliche antigene Substanzen einschließen, welche langsam aktive Mittel freisetzen, die ohne nachteilige systemische Reaktionen oder andere nachteilige Nebenwirkungen absorbiert werden.

[0005] Metalle wurden außerdem in kapsulären Polysaccharid-Metallkomplex-Impfstoffen verwendet. Z. B. wurde in dem U.S.-Patent Nr. 4,740,589, erteilt für Moreno, ein bakterieller kapsulärer Polysaccharid-Bestandteil mit einem Metall, bevorzugt Aluminium oder Ruthenium, für die Prophylaxe und die Behandlung von bakteriellen Erkrankungen komplexiert. Dieses Patent offenbart außerdem die Formulierung eines Dreikomponentenkomplexes, der ein Polysaccharid, ein Metall und einen dritten Bestandteil eines bakteriellen äußeren Membranproteins enthält. Das '589-Patent offenbart, dass der Komplex einen Gewichtsanteil von Polysaccharid enthält, der "nicht ausreicht, um deutliche toxische Effekte hervorzurufen", wobei der Gewichtsanteil im Allgemeinen 1% oder weniger ist. Letztlich ist die Offenbarung in der '589-Patentanmeldung beschränkt auf die Verwendung der Komplexe zur Prophylaxe und Behandlung von bakteriellen Erkrankungen.

[0006] Das U.S.-Patent NR. 3,269,912, erteilt für Grase, offenbart einen Depotimpfstoff, der ein feinverteiltes Aluminiumoxid enthält, entweder ein Aluminiumoxid oder Aluminiumoxidaerosol, welches wenigstens ein Antigen, das von einem Virus, einem Bakterium oder einem Ectotoxoid abgeleitet ist, dispergiert in einem wässrigen Medium, daran absorbiert hat. Das '912-Patent offenbart auch, dass der Impfstoff eine kolloidale Dispersion des individuellen sphärischen Kristalls von Aluminiumoxid in der Lösung bildet.

[0007] Ausgewählte Metalle sind auch als Komponenten von stabilen Zusammensetzungen von Adjuvansemulsionen verwendet worden. Es ist allgemein in der Fachwelt bekannt, dass Aluminium als das Monostearat oder in Form der hydrierten Salze der Fettsäuren emulgierende Mittel oder Stabilisatoren der Emulsion in der Impfstoffzusammensetzung sind.

[0008] Es besteht jedoch eine wesentliche Notwendigkeit für eine therapeutisch wirksame Zusammensetzung mit reduzierter Toxizität, die in Therapien für einen weiten Bereich von Immunerkrankungen, Krebserkrankungen, viralen Erkrankungen und bakteriellen Erkrankungen verwendet werden kann. Außerdem besteht eine Notwendigkeit für eine Zusammensetzung, die die Toxizität von normalerweise toxischen biologisch aktiven Zusammensetzungen herabsetzt, so dass die Verbindungen als Impfstoffe für den Menschen oder ein Tier verwendet werden können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung erfüllt die oben beschriebenen Notwendigkeiten, indem effektive Zusammensetzungen bereitgestellt werden, die normalerweise toxische Verbindungen enthalten, welche, wenn sie in Kombination mit einem kolloidalen Metall

sind, in signifikant reduzierten toxischen Nebenwirkungen resultieren. Im Allgemeinen enthält die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung eine Mischung eines kolloidalen Metalls, wie z. B. Goldchlorid ($HAuCl_4$) in Kombination mit einer Substanz, die normalerweise für einen Menschen oder ein Tier toxisch ist, welche in der Lage ist eine Immunantwort hervorzurufen, wobei die Zusammensetzung, wenn sie einem Menschen oder einem Tier verabreicht wird, weniger oder nicht toxisch ist.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt eine Zusammensetzung für eine therapeutische Verwendung bereit, enthaltend eine Mischung eines kolloidalen Metalls und eines immunologisch toxischen, biologisch aktiven Faktors, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Hitzeschockproteinen, Kohlenwasserstoffeinheiten von Blutgruppen, Rhesusfaktoren, Glycoproteinen von infektiösen Organismen, Entzündungsproteinen, Lipid A, Endotoxinen und Immun-Regulationsproteinen, wobei im Falle, dass der Faktor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Endotoxinen und ein solches Endotoxin ein Lipopolysaccharid ist, das kolloidale Metall nicht Aluminiumoxid ist.

[0011] Die oben genannte Zusammensetzung ist für die Verwendung zur Verabreichung gegenüber einem Menschen oder einem Tier einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, enthaltend ein kolloidales Metall, wie z. B. $HAuCl_4$, in Kombination mit einer Substanz, die normalerweise für einen Menschen oder ein Tier toxisch ist, welche in der Lage ist, eine Immunantwort hervorzurufen, wobei die Zusammensetzung weniger toxisch oder nicht toxisch ist, wenn sie einem Menschen oder einem Tier verabreicht wird.

[0012] Die Verwendung von kolloidalen Metallen in Kombination mit normalerweise toxischen biologisch aktiven Verbindungen für die Herstellung eines Medikamentes kann in Therapien bei Krebs und einer Immunerkrankung verwendet werden. Die derzeitigen Therapien, die darin bestehen, Faktoren, wie z. B. Interleukine, an einen Menschen oder an ein Tier zu verabreichen, sind in geringem Umfang wirksam, bewirken aber signifikante toxische Nebenwirkungen. Die toxischen Nebenwirkungen beschränken außerdem die Menge der biologisch aktiven Faktoren, die verabreicht werden können, und beschränken daher die Wirksamkeit der Therapie. Außerdem werden manche andererseits therapeutische Verbindungen wegen deren Toxizität überhaupt nicht verwendet. Die Kombination eines kolloidalen Metalls mit solch biologisch aktiven Faktoren reduziert die Toxizität, während die therapeutische Wirksamkeit aufrechterhalten wird.

[0013] Dementsprechend ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung eine Zusammensetzung bereitzustellen, die in der Lage ist, die Toxizität von biologisch aktiven Faktoren zu reduzieren.

[0014] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine Zusammensetzung bereitzustellen, die höhere Konzentrationen von biologisch aktiven Faktoren enthält als derzeit wegen der Toxizität der Substanzen verwendet wird.

[0015] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine Zusammensetzung bereitzustellen, die für die Krebstherapien verwendet werden kann, welche in verringerten Nebenwirkungen aufgrund der Toxizität resultiert.

[0016] Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine Zusammensetzung für die Therapie von einer Immunerkrankung bereitzustellen, die in geringeren Nebenwirkungen aufgrund der Toxizität resultiert.

[0017] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine Zusammensetzung für die Immunerkrankungstherapie bereitzustellen, die in reduzierten toxischen Nebenwirkungen resultiert und die vorteilhaften Wirkungen aufrechterhält.

[0018] Außerdem ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine Zusammensetzung für das Impfen eines Menschen oder Tieres gegen einen normalerweise toxischen biologisch aktiven Faktor bereitzustellen.

[0019] Diese und andere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden offensichtlich nach der Durchsicht der folgenden detaillierten Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0020] Fig. 1 zeigt die Serum-Antikörpertiter in Mäusen, die mit Maus-IL-6 in Kombination mit kolloidalem Gold immunisiert wurden.

[0021] Fig. 2 zeigt die Aufrechterhaltung von biologischer Aktivität von IL-1 nach der Behandlung mit Gold.

[0022] Fig. 3 zeigt die Wirksamkeit mit der Gold IL-6 bindet.

Detaillierte Beschreibung

[0023] Die Begriffe "toxische Reaktion" und "Toxizität", wie sie hierin verwendet werden, schließen die folgenden Antworten eines Tieres oder Menschen ein, ohne auf diese beschränkt zu sein: Fieber, Ödeme, einschließlich zerebralen Ödemen, Psychosen, Autoimmunerkrankungen, Hämorrhagie, Schock, einschließlich hämorraghischem Schock, Sepsis,

Cachexia oder Tod. Der Begriff "kolloidales Metall", wie er hierin verwendet wird, schließt irgendeinen wasserunlöslichen Metallpartikel oder eine metallische Verbindung ein, die in flüssigem Wasser dispergiert ist (ein Hydrosol bildet). Der Begriff "biologisch aktive Faktoren" schließen Interleukin-2 ("IL-2"), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxine, staphylokokkisches Enterotoxin B und andere Toxine, Typ I-Interferon, Typ II-Interferon, den Tumor-Nekrose-Faktor, IL-1, IL-6, IL-8, IL-4, den transformierenden Wachstumsfaktor-B, Lymphotoxin, IL-5, den Migrations-Inhibiierungsfaktor, IL-3, Granulocyten-Macrophagen koloniestimulierenden Faktor ("CSF"), Monocyten-Macrophagen-CSF, Granulocyten-CSF, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, den vaskulären Epithelialwachstumsfaktor ("VEGF"), Angiogenin, den transformierenden Wachstumsfaktor ("TGFα"), Hitzeschockproteine, Kohlenwasserstoffanteile von Blutgruppen, Rhesusfaktoren, Fibroblastenwachstumsfaktor und andere inflammatorische und immunregulatorische Proteine ein, ohne auf diese beschränkt zu sein.

[0024] Die vorliegende Erfindung umfasst eine Zusammensetzung zur Verabreichung normalerweise toxischer biologisch aktiver Faktoren an einen Menschen oder ein Tier. Allgemein umfasst die Zusammensetzung entsprechend der vorliegenden Erfindung eine Mischung eines kolloidalen Metalls in Kombination mit einer Substanz, die normalerweise für einen Menschen oder ein Tier toxisch ist, welche in der Lage ist, eine Immunantwort hervorzurufen, wobei die Zusammensetzung weniger oder nicht toxisch für den Menschen oder das Tier ist, wenn sie an einen Menschen oder ein Tier verabreicht wird. Die Zusammensetzung schließt ggf. einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, wie z. B. eine wässrige Lösung, oder Exzipienten, Puffer, Antigenstabilisatoren oder sterilisierte Trägerstoffe ein. Außerdem können ggf. Öle, wie z. B. Paraffinöl, in die Zusammensetzung eingearbeitet sein.

[0025] Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um einen Menschen oder ein Tier gegen biologisch aktive Faktoren zu impfen, die normalerweise toxisch sind, wenn sie injiziert werden. Außerdem kann die vorliegende Erfindung verwendet werden, um bestimmte Erkrankungen mit Cytokinen oder Wachstumsfaktoren zu behandeln. Durch das Mischen der biologisch aktiven Faktoren mit dem kolloidalen Metall, bevor diese einem Menschen oder einem Tier verabreicht werden, wird die Toxizität des biologisch aktiven Faktors verringert oder eliminiert, was erlaubt, dass der Faktor seine therapeutische Wirkung entfaltet.

[0026] Derzeitige Therapien, die die Verabreichung von biologisch aktiven Faktoren an einen Menschen oder ein Tier umfassen, sind etwas effektiv, wobei sie gleichzeitig deutliche toxische Nebenwirkungen hervorrufen. Außerdem beschränken die toxischen Nebenwirkungen die Menge des Antigens, das verabreicht werden kann und beschränken daher die Wirksamkeit der Therapie. Außerdem verhindert die Toxizität von manchen biologisch aktiven Faktoren deren Verwendung in solchen Therapien. Die Kombination von einem kolloidalen Metall mit solchen biologisch aktiven Faktoren verringert die Toxizität, während die therapeutischen Ergebnisse aufrechterhalten werden oder erhöht werden, wodurch die Wirksamkeit verbessert wird, weil höhere Konzentrationen der biologisch aktiven Faktoren verabreicht werden können, oder indem die Verwendung von Kombinationen von biologisch aktiven Faktoren ermöglicht wird. Die Verwendung von kolloidalen Metallen in Kombination mit biologisch aktiven Faktoren erlaubt daher die Verwendung höherer Konzentrationen von biologisch aktiven Faktoren oder zuvor nicht verwendbaren toxischen Substanzen, um Menschen oder Tieren verabreicht zu werden.

[0027] Der Begriff "biologisch aktive Faktoren" schließt Interleukin-2 ("IL-2"), Lipid A, Phospholipase A2, Endotoxine, staphylokokkisches Enterotoxin B und andere Toxine, Typ I-Interferon, Typ II-Interferon, den Tumor-Nekrose-Faktor, IL-1, IL-6, IL-8, IL-4, den transformierenden Wachstumsfaktor-B, Lymphotoxin, IL-5, den Migrations-Inhibiierungsfaktor, IL-3, den Granulocyten-Macrophagen koloniestimulierenden Faktor ("CSF"), Monocyten-Macrophagen-CSF, Granulocyten-CSF, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, den vaskulären Epithelialwachstumsfaktor ("VEGF"), Angiogenin, TGFα, Hitzeschockproteine, Kohlenwasserstoffeinheiten von Blutgruppen, Rhesusfaktoren, den Fibroblastenwachstumsfaktor und andere inflammatorische und immunregulatorische Proteine ein, ohne auf diese beschränkt zu sein.

[0028] Das kolloidale Metall kann z. B. ausgewählt sein aus den Metallen der Gruppen IIA, IB, IIB und IIIB des Periodensystems, ebenso wie aus den Übergangsmetallen, insbesondere denen der Gruppe VIII. Bevorzugte Metalle schließen Gold, Silber, Aluminium, Ruthenium, Zink, Eisen, Nickel und Calcium ein. Andere geeignete Metalle können auch die folgenden einschließen in allen ihren verschiedenen Oxidationszuständen: Lithium, Natrium, Magnesium, Kalium, Scandium, Titan, Vanadium, Chrom, Mangan, Kobalt, Kupfer, Gallium, Strontium, Niob, Molybdän, Palladium, Indium, Zinn, Wolfram, Rhenium, Platin und Gadolinium. Die Metalle werden bevorzugt in ionischer Form bereitgestellt, (bevorzugt abgeleitet von einer entsprechenden Metallverbindung) z. B. den Al^{3+}-, Ru^{3+}-, Zn^{2+}-, Fe^{3+}-, Ni^{2+}- und Ca^{2+}-Ionen. Ein bevorzugtes Metall ist Gold, insbesondere in der Form von Au^{3+}. Eine insbesondere bevorzugte Form von kolloidalem Gold ist $HAuCl_4$ (E-Y Laboratories, Inc., San Mateo, Kalifornien). Ein weiteres bevorzugtes Metall ist Silber, insbesondere in einem Natriumboratpuffer, mit der Konzentration von zwischen ungefähr 0,1% und 0,001% und am meisten bevorzugt als

eine ungefähr 0,01%ige Lösung. Die Farbe einer solchen kolloidalen Silberlösung ist gelb und die kolloidalen Partikel reichen von 1 bis 40 Nanometern. Solche Metallionen können in dem Komplex alleine oder mit anderen anorganischen Ionen vorliegen.

[0029] Die Menge an kolloidalem Metall, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, liegt zwischen ungefähr 0,001 mg/ml und 1,0 mg/ml mit einer stärker bevorzugten Menge an kolloidalem Metall zwischen ungefähr 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml. Die Menge der Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung, die an Menschen oder Tiere verabreicht wird, variiert entsprechend der Erkrankung, die behandelt werden soll, dem biologisch aktiven Faktor oder den Faktoren, die in der Therapie verwendet werden, den eingebundenen Spezies und dem physikalischen Zustand des Individuums, das behandelt werden soll.

[0030] Um einen Impfstoff gegen biologisch aktive Faktoren herzustellen, wird die Präparation des ausgewählten biologisch aktiven Faktors mit dem kolloidalen Metall in einem salzfreien Medium gemischt, bevorzugt in deionisiertem Wasser. Das salzfreie Medium kann optional mit beispielsweise Tris-Puffer gepuffert sein. In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Lösung mit kolloidalem Metall 1 : 1 mit der Lösung des biologisch aktiven Faktors verdünnt.

[0031] Das Medium sollte bevorzugt keine Natriumionen enthalten. Eine kolloidale Goldlösung hat eine leichtrosa Farbe, diese Farbe sollte sich nicht ändern, wenn die Lösung zugegeben wird, die die biologisch aktiven Faktoren enthält. Wenn die kolloidale Goldlösung von rosa nach purpur umschlägt, weist dies darauf hin, dass das Gold präzipitiert ist und nicht für eine effektive Immunisierung wiederhergestellt werden kann. Die Halbzeit der Mischung von kolloidalem Gold und biologisch aktivem Faktor/biologisch aktiven Faktoren ist ungefähr 24 h.

[0032] Die Mischung von biologisch aktiven Faktoren und kolloidalem Metall wird dann in ein geeignetes Tier injiziert. Beispielsweise erlitten Kaninchen, die zwischen ungefähr 2 und 5 kg wogen, keine registrierbaren Nebenwirkungen, nachdem ihnen alle zwei Wochen eine Zusammensetzung mit kolloidalem Gold und 1 mg von Cytokinen, entweder IL-1 oder IL-2, verabreicht wurden. Da der biologisch aktive Faktor nicht toxisch ist, wenn er gemäß der vorliegenden Erfindung verabreicht wird, kann die optimale Menge eines Antigens an ein Tier verabreicht werden. Die Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung können in einer einzigen Dosis verabreicht werden, oder sie können in mehreren Dosen verabreicht werden, die über eine geeignete Zeitskala ausgedehnt sind, um die sekundäre Immunantwort vollständig ausnutzen zu können.

[0033] Beispielsweise wurden Antikörpertiter aufrechterhalten bei der Verabreichung von Booster-Impfungen einmal im Monat.

[0034] Der Impfstoff kann außerdem ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans enthalten, einschließlich Freund'schem komplettem Adjuvans, Freund'schem unvollständigem Adjuvans, Lipopolysaccharid, Monophosphoryllipid A, Muramyldipeptid, Liposomen, die Lipid A enthalten, Alaun, Muramyltripeptidphosphatidylethanolamin, Schlüsselloch- und Napfschnecken-Hämocyanin, ohne auf diese beschränkt zu sein. Ein bevorzugtes Adjuvans ist Freund'sches unvollständiges Adjuvans, welches bevorzugt 1 : 1 mit der Mischung des kolloidalen Metalls und dem biologisch aktiven Faktor verdünnt wird.

[0035] Die Zusammensetzung ist für die Verwendung zur Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier einer wirksamen Menge der Zusammensetzung, enthaltend ein kolloidales Metall, gemischt mit einem biologisch aktiven Faktor oder Faktoren, wobei die Zusammensetzung weniger oder nicht toxisch ist, wenn sie einem Menschen oder einem Tier verabreicht wird. Die Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung kann als ein Impfstoff gegen eine normalerweise toxische Substanz verabreicht werden, oder kann ein therapeutisches Mittel sein, worin die Toxizität der normalerweise toxischen Mittels reduziert ist, wodurch die Verabreichung von höheren Mengen des Mittels über längere Zeiträume ermöglicht wird.

[0036] Bei der Praktizierung dieser Erfindung wird das Verfahren, durch welches die Zusammensetzung verabreicht wird, nicht als kritisch angesehen. Die Wege, über die die Zusammensetzung gemäß dieser Erfindung verabreicht werden können, schließen subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale, orale und intravenöse Wege ein, ohne auf diese beschränkt zu sein. Ein bevorzugter Weg der Verabreichung ist der intravenöse. Ein weiterer bevorzugter Weg der Verabreichung ist der intramuskuläre.

[0037] Es ist bekannt, dass Interleukin-2 (IL-2) signifikante therapeutische Ergebnisse bei der Behandlung von renalem Krebs zeigt. Die toxischen Nebenwirkungen führen jedoch zu dem Tod einer signifikanten Anzahl von Patienten. Im Gegensatz dazu wird eine geringe oder keine Toxizität beobachtet, wenn IL-2 mit kolloidalem Gold gemischt wird, und eine starke Immunantwort tritt ein. Die Dosen, die früher für die IL-2-Therapie verwendet wurden, waren in der Größenordnung von 21×10^6-Einheiten von IL-2 je 70 kg Menschkörpergewichts pro Tag (7×10^6-Einheiten IL-2 je 70 kg Mensch TID). Eine Einheit entspricht ungefähr 50 Picogramm, 2 Einheiten entsprechen ungefähr 0,1 Nanogramm, also entsprechen 20×10^6-Einheiten 1 mg). In einer Ausführungsform dieser Erfindung ist die Menge von IL-2, die den Kaninchen

gegeben wurde, ungefähr 1 mg pro 3 kg Kaninchen. Dies bewirkt, dass die Studien der Wirkung der Verabreichung von biologisch aktiven Faktoren, die hierin beschrieben sind, Dosen einschlossen, die mehr als 20 Mal höher waren als die, die zuvor Menschen gegeben wurden.

[0038] In einer weiteren Ausführungsform, bei der IL-2 (1 mg pro 3 kg Tier) 3 Kaninchen jeden dritten Tag über eine zweiwöchige Periode hinweg verabreicht wurden, erschienen all die Tiere klinisch krank zu sein und zwei der Tiere starben an den auftretenden toxischen Wirkungen des IL-2. Wenn dieselbe Dosis an IL-2 mit kolloidalem Gold kombiniert wurde und dann den drei Kaninchen für dieselbe zweiwöchige Zeitdauer verabreicht wurde, wurde keine Toxizität beobachtet und eine signifikante Antikörperantwort resultierte in allen drei Tieren. Eine "positive Antikörperantwort", wie es hierin verwendet wird, ist definiert als ein drei- bis vierfaches Ansteigen in einer spezifischen Antikörperreaktivität, wie es durch direkten ELISA bestimmt wird, wobei das Blut nach der Immunisierung mit dem Blut vor der Immunisierung verglichen wird. Ein direkter ELISA wird durch das Binden des IL-2 auf eine Mikrotiterplatte und die Bestimmung der Quantität von IgG, das an das IL-2 auf der Platte gebunden wird, durch Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, das an alkalische Phosphatase konjugiert ist, durchgeführt. Daher wird geglaubt, dass die biologischen Effekte des IL-2 verbleiben. Da die Toxizitätseffekte minimiert worden sind, können größere Konzentrationen von IL-2 verabreicht werden, wenn es notwendig ist, wo eine größere, stärker effektive Immunantwort erforderlich ist.

[0039] Dies Erfindung wird genauer dargestellt durch die folgenden Beispiele, die nicht in irgendeiner Weise dahingehend ausgelegt werden sollen, dass sie dem Umfang dieser Erfindung Grenzen auferlegen sollen. Im Gegenteil soll es klar so verstanden werden, dass zu verschiedenen anderen Ausführungsformen, Modifikationen und Äquivalenten davon Zuflucht genommen werden kann, die sich selbst den Fachleuten auf diesem Gebiet nahelegen, nachdem die Beschreibung hierin gelesen wurde, ohne dass über den Umfang der anhängenden Ansprüche hinausgegangen wird.

Beispiel I

[0040] Dieses Beispiel zeigt, dass kolloidales Gold ansonsten toxische Substanzen neutralisiert und eine Antikörperantwort zulässt. Wenn IL-2 (1 mg pro 3 kg Tier) drei Kaninchen jeden dritten Tag über eine zweiwöchige Periode verabreicht wird, erscheinen all die Tiere klinisch krank zu sein und zwei der Tiere starben an den auftretenden toxischen Effekten des IL-2. Wenn dieselbe Dosis von IL-2 mit kolloidalem Gold kombiniert wird und dann drei Kaninchen über dieselbe zweiwöchige Zeitdauer verabreicht wird, wird keine Toxizität beobachtet und eine signifikante Antikörperantwort ergibt sich in allen drei Tieren. Eine positive Antikörperantwort wird definiert als ein drei- bis vierfacher Anstieg bei der spezifischen Antikörperreaktivität, wie sie durch einen direkten ELISA bestimmt wird, wobei das Blut nach der Immunisierung mit dem Blut vor der Immunisierung verglichen wird. Ein direkter ELISA wird ausgeführt, indem IL-2 an eine Mikrotiterplatte gebunden wird und die Quantität von IgG, das an das IL-2 auf der Platte gebunden ist, durch ein Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, das an alkalische Phosphatase konjugiert ist, bestimmt wird.

Beispiel II

[0041] Dieses Beispiel zeigt außerdem, dass kolloidales Gold ansonsten toxische Substanzen neutralisiert und eine Antikörperantwort erlaubt. Endotoxin oder Lipid A (25, 50 und 100 µg pro 35 mg Maus) werden durch subkutane Injektion jeden vierten Tag über einen zweiwöchigen Zeitraum verabreicht. Zehn Mäusen wird das Endotoxin "nackt" gegeben und für die verbleibenden zehn wird das Endotoxin mit kolloidalem Gold 1 : 1 gemischt. Das Injektionsvolumen wird aufgefüllt durch Zugabe von Kaliumcarbonat/Natriumcitratpuffer, pH 6,5 bei einer 1 : 1-Verdünnung. Das gleiche Protokoll wird auch verwendet, wenn Lipid A die Testsubstanz ist.

[0042] Die Tiere werden bei 15, 30 und 60 min nachfolgend nach jeder Injektion kontrolliert, und dann stündlich und täglich. Die überlebenden Tiere werden auf eine spezifische Antikörperantwort gegenüber der toxischen Substanz, mit der sie injiziert wurden, entweder Endotoxin oder Lipid A, getestet. Die meisten der Tiere, die mit Endotoxin oder Lipid A in Kombination mit kolloidalem Gold injiziert wurden, überlebten, während die, die mit dem nackten Endotoxin oder Lipid A injiziert wurden, während der zweiwöchigen Testperiode starben. Zusätzlich hatten die Tiere, die überlebt hatten, eine Antikörperantwort gegenüber dem spezifischen Toxin, wie es durch direkten ELISA bestimmt wurde.

Beispiel III

[0043] Dieses Beispiel illustriert die Wirkung von kolloidalem Gold auf die Cytokin-Aktivität in vivo. Einer Gruppe von Mäusen wurde IL-2 mit einer Dosis gegeben, die nahe der lag, die Krebspatienten gegeben wird, die sich einer Immunotherapie unterziehen. In früheren Experimenten reduzierten 18 µg von IL-2-Tabletten, die Nacktmäusen gegeben wurden, die Größe eines implantierten Tumors, jedoch töteten sie die Tiere innerhalb von zwei Wochen. Siehe Paciotti, G. F., und Tamarkin, L., Interleukin 2 Differentially Effects to the Proliferation of a Hormone-Dependent and a Hormone-Independent Human Breast Cancer Cell Line In Vitro and In Vivo, Anti-Cancer Research, 8: 1233–1240 (1988), welche hierbei durch Inbezug-

nahme aufgenommen ist.

[0044] Die Wirksamkeit von Gold in einem Mäusemodellsystem wurde durch die folgende Vorgehensweise getestet: eine Gruppe von Mäusen wurde mit IL-2 alleine, IL-2, gemischt mit kolloidalem Gold, kolloidalem Gold alleine oder Kochsalzlösungen behandelt, die durch eine osmotische Minipumpe freigesetzt wurden. Die Mäuse wurden über sieben Tage behandelt, nach welchen sie getötet wurden und deren Lymphocyten gesammelt wurden. Die Zellen wurden hinsichtlich T-Zell- oder B-Zellmarkern angefärbt, unter Verwendung von spezifischen Mäuse-monoklonalen Antikörpern für die flusscytometrische Analyse. Aktivierte T- und B-Zellen wurden durch das Feststellen der T-Zell-Anzahlen, der Verhältnisse von Helfer-T-Zellen zu Suppressor-T-Zellen und dem aktivierten zellulären IL-2-Rezeptor, B-Zell-Anzahlen und natürliche Killerzell("NK")-Anzahlen bestimmt.

[0045] Die wenigen Tiere, die überlebten, dass sie mit IL-2 alleine behandelt wurden, zeigten einen Anstieg in der T-Zell-Anzahl und der Aktivität (wie durch IL-2-Rezeptoren bestimmt). Nahezu all die Tiere überlebten die IL-2-Behandlung in Kombination mit kolloidalem Gold und diese Tiere zeigten einen Anstieg sowohl in der B-Zell-Funktion (wie es durch aktivierte B-Zellen und den gesamten IgG-Gehalt bestimmt wurde, gemessen durch direkten ELISA), einen Anstieg bei der T-Zellfunktion (wie durch die T-Zell-Anzahl und die Aktivität unter Verwendung von IL-2-Rezeptor-Anzahlen als ein Index der Aktivität bestimmt wurde) und einen Anstieg bei der NK-Aktivität.

Beispiel IV

[0046] Das folgende biologische Experiment zeigt, dass kollodiales Gold die Toxizität von Lipopolysaccharid (LPS) reduziert. LPS ist die Lipid/Zucker-Einheit von bakteriellen Zellwänden. Wenn sie in ein Tier injiziert wird, ahmt dieses Molekül viele von den klinischen Antworten eines septischen Schockes nach. Daher wurden den Mäuse variierende Mengen von LPS in Gegenwart oder Abwesenheit von kolloidalem Gold injiziert. Insbesondere wurden Balb/c-Mäusen entweder 100 oder 400 µg LPS (Stamm W. E. coli 055:B5; 10 mg/ml in Wasser; Difco Labs) mit oder ohne kolloidalem Gold injiziert. Der pH der 15 nm kolloidalen Goldmischung (E. Y. Labs) wurde auf ungefähr 10 eingestellt, während der pH des LPS mit 0,1 N NaOH auf 8 eingestellt wurde. Anschließend wurden dann geeignete Volumina (d. h. 10 µl für die 100 µg-Dosis und 40 µl für die 400 µg-Dosis) zu 500 µl des kolloidalen Goldes zugegeben. Die Mischung wurde dann für 30 min stehen gelassen und anschließend in die Mäuse (i. p.) injiziert.

[0047] Innerhalb von 12 h nach der Injektion zeigten alle Mäuse klinische Anzeichen von Depressionen und Anergasia. Innerhalb von 24 h nach der Injektion begannen die Mäuse mit der 400 µg-Dosis zu sterben. Bei 72 h waren alle der Kontrollmäuse bei der 400 µg-Dosis gestorben, während 75% der mit Gold behandelten Mäuse lebten und begannen Anzeichen von klinischer Besserung (z. B. Bewegung) zu zeigen. Darüber hinaus waren die Mäuse mit der 100 µg-Dosis, die mit Gold behandelt waren, aktiver während der 36 h der Beobachtung, obwohl dies subjektiv ist.

Beispiel V

[0048] Das folgende Experiment beschreibt die Verwendung von kolloidalem Gold als ein mögliches Adjuvans für die Herstellung von Maus-Antikörpern gegen Mäuse-IL-6. Dieses Experiment wurde mit zwei Zielen im Sinn durchgeführt: 1) Um zu bestimmen, ob kolloidales Gold als ein Adjuvans für die Generierung einer Immunantwort auf eigene Antigene (d. h. die Generierung einer Immunantwort gegen ein Mausprotein unter Verwendung eines Mausmodells) verwendet werden kann; zweitens, da IL-6 eines der Cytokine ist, von dem angenommen wird, dass es in Krebs Cachexia, Metastasenbildung und Sepsis involviert ist, kann sich die Fähigkeit, Antikörper in einem autologen System zu generieren, als vorteilhaft bei der Generierung eines Impfstoffes gegen das IL-6 und ähnliche endogene Verbindungen erweisen.

[0049] Kurz beschrieben ist das Experiment wie folgt. Mehrere Mäuse wurden mit kolloidalem Gold/Mäuse-IL-6-Mischung wie oben beschrieben immunisiert. Ungefähr 3 Wochen später wurden die Mäuse getötet und das Blut aus dem Rumpf wurde gesammelt und auf die Gegenwart von Antikörpern gegenüber Mäuse-IL-6 durch einen direkten ELISA analysiert, wie oben beschrieben. Die Ergebnisse aus diesem direkten ELISA, die Bestimmung des Serum-Antikörper-Titers in Mäusen, die mit Mäuse-IL-6 in Kombination mit kolloidalem Gold immunisiert worden waren, sind in Fig. 1 dargestellt. Fig. 1 zeigt, dass die Mäuse eine Antikörperantwort gegenüber Mäuse-IL-6 generiert hatten, was darauf hinwies, dass das Gold verwendbar ist für die Generierung von Antikörpern gegen endogene (d. h. eigene) Toxine ebenso wie gegen Cytokine, von denen angenommen wird, dass sie in Sepsis, Krebs Cachexia und Metastasenbildung involviert sind.

Beispiel VI

[0050] Das folgende Experiment zeigt, dass Cytokine, die mit kolloidalem Gold gemischt werden, ihre biologische Aktivität behalten. Das verwendete Modell für diese Experimente ist eines, das in der Fachwelt allgemein bekannt ist. Siehe Paciotti, G. F., und L. Tamarkin, Interleukin 1 directly regulates hormone-dependent human breast cancer cell proliferation in vitro, Mol Endocrinol., 2: 459–464, 1988; und Paciotti,

G. F., und L. Tamarkin, Interleukin-1 differentially synchronizes estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells in the G_0/G_1-phase of the cell cycle, AntiCancer Research, 11: 25–32, 1991. Das Modell basiert auf der Fähigkeit des Cytokins, IL-1, direkt das Wachstum von östrogen-empfänglichen humanen Brustkrebszellen MCF-7 zu inhibieren. Kurz beschrieben inhibiert IL-1 alleine das Wachstum dieser Zellen durch einen gut charakterisierten IL-1-Rezeptor auf der Oberfläche dieser Brustkrebszellen.

[0051] Das folgende Experiment zeigt die Fähigkeit von IL-1 seine biologische Aktivität zu behalten, wenn es mit kolloidalem Gold gemischt ist, durch Bestimmung seiner Fähigkeit das Wachstum dieser Zellen zu inhibieren. Ungefähr 8.000 MCF-7-Zellen werden in 24-Well-Gewebekulturplatten ausplattiert. Am nächsten Tag werden 15 nm Goldpartikel bei 14.000 U/min für 10 min zentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Menschliches IL-1α wurde in Wasser rekonstituiert bis zu einem initialen Stock von 5×10^{-5} M in Wasser. Der pH des Goldes und des IL-1 wurde auf ungefähr 8,0 mit 0,1 M NaOH eingestellt. Vor dem Mischen wurde das IL-1 auf eine Arbeitsstocklösung von 2×10^{-6}, 2×10^{-8} M und 2×10^{-10} M verdünnt, welches 250 µl der Goldlösung (Endvolumen = 0,5 ml) enthielt. Die Goldkontrollen bestanden aus 250 µl des Goldes und 250 µl sterilem Wasser. Nachfolgend wurden alle Arbeitsstocklösungen weiter 1 : 20 in Gewebemedium verdünnt, was in Endkonzentrationen von 10^{-7}, 10^{-9} und 10^{-11} M resultierte. Diese Lösungen wurden dann gleichzeitig mit den entsprechenden Kontrollen direkt zu den MCF-7-Zellen zugegeben. Die Daten, die in Fig. 2 präsentiert werden, sind die Anzahlen von Zellen, die an verschiedenen Tagen nach der Zugabe von IL-1 mit oder ohne das Gold vorlagen.

Beispiel VII

[0052] Das folgende Experiment zeigt die Wirksamkeit, mit der Gold Cytokine bindet. Dieses Experiment demonstriert, dass das Protein aus der Lösung entfernt wird, wenn es mit Gold kombiniert wird und dann zentrifugiert wird. Das Experiment verwendete den IL-6-Standard von ARI's Cytokit™-6. Vor dem Mischen wurde der pH des Goldes und der Cytokinlösungen auf pH 9 mit 0,1 N NaOH eingestellt. Dies Protein wurde entweder mit Gold oder Wasser vorinkubiert, bevor es in dem ARI's Diagnostik-Kit für IL-6 verwendet wurde. Nachfolgend nach dieser Inkubation wurde die kolloidale Gold/IL-6-Mischung zentrifugiert und die Überstände wurden verwendet, um Standardkurven zu generieren. Wie es in Fig. 3 gesehen werden kann, war das Gold sehr effektiv darin, nahezu alles IL-6 in dem Dosisbereich des Assays zu binden, wodurch das IL-6 aus dem Überstand entfernt wurde. Sogar bei der höchsten Endkonzentration (1000 ng/ml) von IL-6 entfernte das Gold nahezu 90% des IL-6 in den Lösungen. Diese Menge basiert auf der optischen Dichte (OD) des 1000 ng/ml IL-6/Gold-Überstandes, welcher gleich ist zu dem 100 ng/ml IL-6-Standard alleine.

Beispiel VIII

[0053] Das folgende Experiment zeigt die physikalischen Änderungen bei der kolloidalen Gold-Suspension durch dessen Mischung mit IL-6, einem potentiellen Antigen für einen Impfstoff. Obwohl Goldpartikel ungefähr 15 nm in der Größe sind, können sie nicht durch einen 0,22 µm – Spritzenfilter gefiltert werden. Wir schreiben dies der Natur der Goldpartikel in dieser kolloidalen Mischung zu. Es wird theoretisiert, dass das Gold als eine kolloidale Mischung Aggregrate bildet, die größer sind als die individuellen Sphären. Obwohl die individuellen Partikel kleiner sind als die Porengröße des Filters, sind die Aggregate viel größer und sind daher nicht filtrierbar. Wir haben jedoch beobachtet, dass das kolloidale Gold, wenn es erst einmal mit dem Protein inkubiert ist, leicht durch die 0,22 µm – Filter filtriert werden kann. Daher scheint die Bindung eines Cytokins die physikalischen Wechselwirkungen der Goldpartikel miteinander zu ändern, was bewirkt, dass die Goldpartikel als einzelne 15 nm Partikel agieren und was die Partikel in die Lage versetzt, leicht filtriert werden zu können. Dieses Experiment definiert die Natur der Bindung eines Antigens an das kolloidale Metall.

Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung für eine therapeutische Verwendung, enthaltend eine Mischung eines kolloidalen Metalls und eines immunologisch toxischen, biologisch aktiven Faktors, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Hitzeschockproteinen, Kohlenwasserstoffeinheiten von Blutgruppen, Rhesusfaktoren, Glycoproteinen von infektiösen Organismen, Entzündungsproteinen, Lipid A, Endotoxinen und Immun-Regulationsproteinen, wobei im Falle, dass der Faktor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Endotoxinen und ein solches Endotoxin ein Lipopolysaccharid ist, das kolloidale Metall nicht Aluminiumoxid ist.

2. Die Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, worin das kolloidale Metall ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus kolloidalem Gold und kolloidalem Silber.

3. Eine Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der immunologisch toxische, biologisch aktive Faktor ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Interleukin-2 ("IL-2"), Phospholipase A2, staphylokkischem Entertoxin B, Typ I Interferon, Typ II Interferon, Tumor-Nekrose-Faktor, IL-1, IL-6, IL-8, IL-4, transformierender Wachstumsfaktor-B, Lymphotoxin, IL-5, Migrationsinhibierungsfaktor, IL-3,

Granulocyten-Macrophagen koloniestimulierender Faktor ("CSF"), Monocyten-Macrophagen-CSF, Granulocyten-CSF, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, vaskulärer Epithelialwachstumsfaktor ("VEGF"), Angiogenin, transformierender Wachstumsfaktor ("TGFα"), Hitzeschockproteinen, Kohlenwasserstoffeinheiten von Blutgruppen, Rhesusfaktoren und Fibroblastenwachstumsfaktor.

4. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, außerdem enthaltend eine pharmazeutisch annehmbare Komponente, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Arzneimittelträgern, Puffern, Antigen-Stabilisatoren und sterilisierten Trägern.

5. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, außerdem enthaltend ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans.

6. Die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Freund's komplettem, Lipopolysaccharid, Monophosphoryllipid A, Muramyldipeptid, Liposomen, enthaltend Lipid A, Alaun, Muramyltripeptid-Phosphatidyl-Ethanolamin, Schlüssellochnapfschnecken-Hämocyanin und Freund's inkomplettem Adjuvans.

7. Ein Impfstoff, enthaltend die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

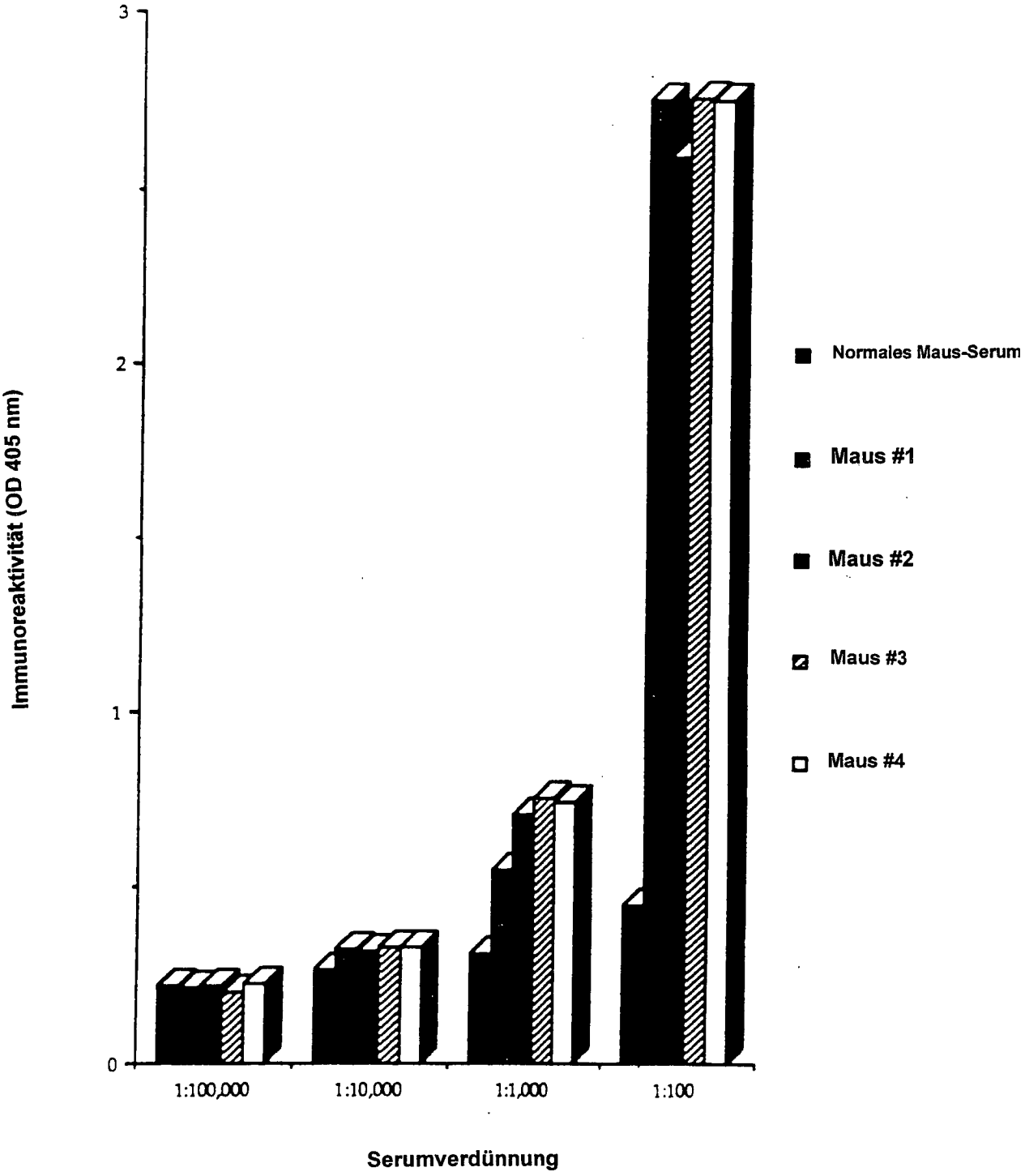
8. Verwendung einer der Zusammensetzungen gemäß Anspruch 1 bis 6 für die Herstellung einer therapeutisch aktiven Zusammensetzung für die Behandlung von Krebs, einer Immunkrankheit, einer viralen Erkrankung oder einer bakteriellen Erkrankung.

9. Verwendung von kolloidalem Metall um die toxischen Nebenwirkungen eines biologisch aktiven Faktors in einer therapeutisch aktiven Zusammensetzung, die einen immunologisch toxischen, biologisch aktiven Faktor enthält, zu reduzieren.

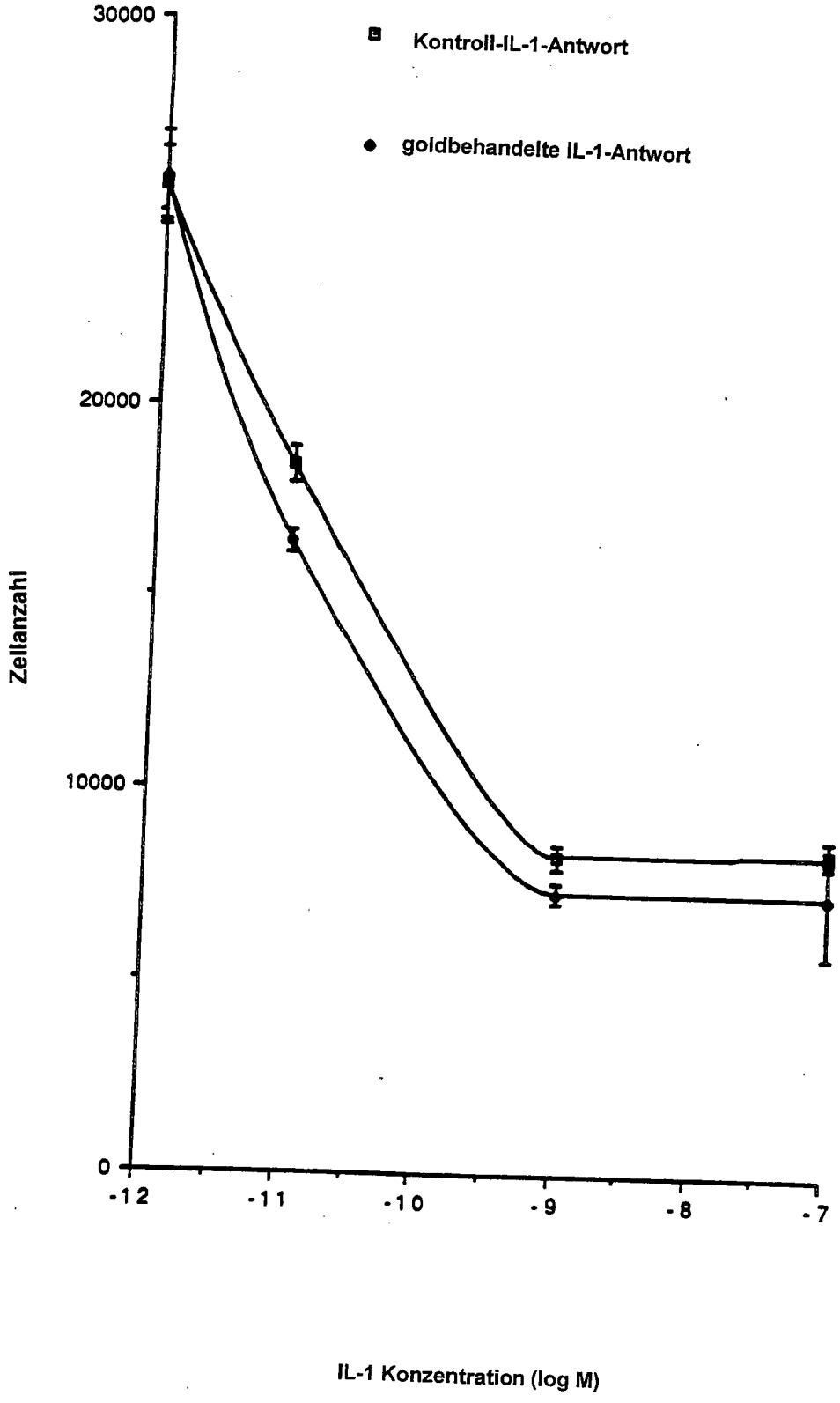
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

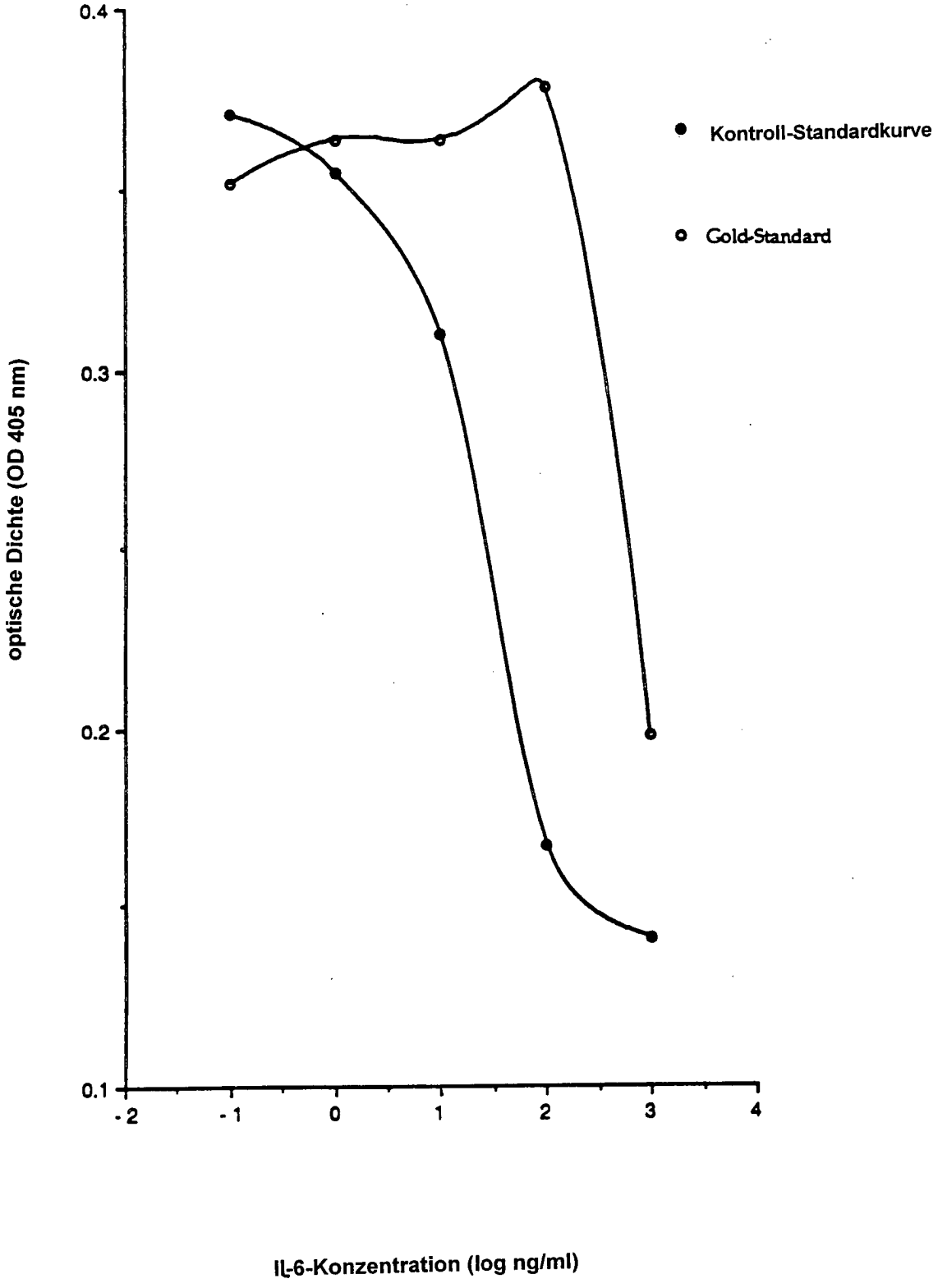
FIGUR I



FIGUR 2.


30000
20000
10000
0
Zellanzahl
Kontroll-IL-1-Antwort
goldbehandelte IL-1-Antwort
-12
-11
-10
-9
-8
-7
IL-1 Konzentration (log M)

FIGUR 3


0.4
0.3
0.2
0.1
optische Dichte (OD 405 nm)
-2
-1
0
1
2
3
4
Kontroll-Standardkurve
Gold-Standard
IL-6-Konzentration (log ng/ml)