



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 011 111 A1** 2006.09.14

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 011 111.4**

(22) Anmeldetag: **10.03.2005**

(43) Offenlegungstag: **14.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 35/56** (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) Anmelder:

TOXIMED GmbH, 80331 München, DE

(72) Erfinder:

Weickmann, Dirk, 80339 München, DE

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Pharmazeutischer Wirkstoff zur Beladung dendritischer Zellen und dessen Lösungsmittel**

(57) Zusammenfassung: Pharmazeutischer Wirkstoff aus Tiergiften zur Beladung dendritischer Zellen für die Behandlung von Tumoren, wobei ein spezielles Lösungsmittel aus einer homöopathischen Substanz in Verbindung mit Spinnengiften verwendet wird.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft mit toxischen Substanzen beladene dendritische Zellen, Verfahren zu ihrer Herstellung, sowie die Verwendung dieser dendritischen Zellen zur Behandlung von Tumoren, insbesondere zur Therapie von Tumoren der Schleimhaut und der Haut.

Stand der Technik

[0002] Unter Hautkrebs versteht man an der Haut, seltener an der Schleimhaut, vorkommende Tumore. Die bösartigen Tumore bezeichnet man als Hautkarzinome bzw. Melanome. Die Primärtumore sind in der Haut manifestiert und an der Hautoberfläche als pigmentierte Flächen zu erkennen (Veronesi U., Cascinelli N., Santiani M. (1987); Cutaneous Melanoma. Status of Knowledge and Future Perspective. London, Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto: Academic Press). Um sie von Muttermalen, mit denen sie häufig auf Grund ihres Aussehens verwechselt werden, zu unterscheiden, ist eine Gewebeentnahme und in vielen Fällen Anzucht in Gewebekultur erforderlich. Das aggressivste unter den bekannten Neoplasien ist das maligne Melanom, das oft auch „Schwarzer Krebs“ genannt wird. Ein Problem bei dieser Erkrankung betrifft seine extrem metastatische Ausbreitung, die vor keiner Organgrenze stoppt.

[0003] Die folgenden Therapien werden momentan bevorzugt.

Operative Entfernung

[0004] Das gängigste Verfahren stellt derzeit die operative Entfernung des Hautkrebses dar. Wegen der Tiefe bzw. der Streuung des Hautkrebses ist eine ausreichende Dissektion des Hautkrebses nicht möglich. Daher wird oftmals eine Kombination mit anderen Therapieformen versucht (Voigt H. (1996): 150 Fragen und Antworten zum malignen Melanom. Zuckerschwerdt Verlag, München).

Nachteile

[0005] Stationärer Aufenthalt und/oder Narkose, Wundheilung und Narbenbildung

Strahlentherapie

[0006] Heutzutage wird die Strahlentherapie mit abnehmender Bedeutung bei Hautkrebs hauptsächlich nur noch zur Lymphknoten- und Hautkrebsmetastasenbehandlung eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgt mit ionisierender Strahlung; üblicherweise verwendet man Elektronen-, Gamma-, Neutronen- oder Röntgenstrahlen (Zetkin/Schaldach: Lexikon der Medizin, 16. Auflage 1999, Seite 1922/1923 Ullstein Medical).

[0007] Nachteil der Bestrahlung ist, dass, ähnlich wie bei der Chemotherapie, eine räumliche Begrenzung nicht möglich ist. Durch die Strahlungshärte werden auch gesunde Zellen nachhaltig geschädigt, vor allem die DNA. Da Krebszellen sich meist schneller als gesunde Zellen teilen, werden die Krebszellen unter normalen Umständen bei der Strahlentherapie als erste abgetötet. Allerdings besteht dabei die Gefahr eines Strahlenulcus (Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch 256. Auflage 1990, Seite 1602).

Chemotherapie

[0008] Bei der Chemotherapie gilt, dass vor allem metastasierende Melanome kaum chemoresponsiv sind. Eine Monotherapie mit Zytostatika ist in aller Regel nicht ausreichend, sodass vor allem Polychemotherapien angewendet werden. Es sind vor allem nachfolgende Substanzen, die eine Anwendung finden:

Dacarhazin (DTIC)
Cisplatin (CDDP)
Carboplatin (CBDCA)
Ifosfamid (IFO)
Fotemustin
Bendamustin
CCNU
BCNU
Methyl-CCNU
Cyclophosphamid (CPA)
Vindesin (DVA bzw. VDS)

Vinblastin (VBL)
Vincristin (VCR)
Procarbazin (PBZ)
Mitomycin (MMC)

[0009] Die Anwendung dieser Substanzen erfolgt in den nachfolgenden Therapieprotokollen, welche die derzeit wirksamsten darstelle:

Bleomycin + Vincristin + CCNU + Dacarbazin (Bold-Protokoll)
BCNU + Cisplatin + Dacarbazin + Tamoxifen (+ Interleukin-2/Interferon-alfa)
Cisplatin + Vinblastin + Bleomycin (CVB-Protokoll)
Cisplatin + Vindesin + Dacarbazin (CVD-Protokoll)
BCNU + Hydroxyuracil + Dacarbazin (BHD-Protokoll)
Dacarbazin + Vincristin + BCNU (DVB-Protokoll)
Cisplatin + Ifosfamid
Fotemustin + Interferon-alfa

– Voigt H. (1996) 150 Fragen und Antworten zum malignen Melanom Zuckerschwerdt Verlag, München –

[0010] Neben den positiven Wirkungen gegen die genetisch defekten Zellen weisen die genannten Chemotherapien leider auch viele Nebenwirkungen auf.

[0011] Nachteile der Chemotherapien sind, dass diese auf Grund ihrer chemischen Struktur nur schwer gezielt einzusetzen sind; diese Zytostatika äußerst aggressive Zellgifte sind, die neben Tumorgewebe auch im großen Maße gesundes Gewebe, einschließlich Leber- und Nierenzellen schädigen. Die auftretenden Nebenwirkungen, wie z.B. Haarausfall, Schwindel, Erbrechen, Magen-Darmblutungen, Kreislaufbeschwerden u.a., sind wegen der systemischen Ausbreitung der Zytostatika nur schwer abzuwägen (Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ Heidelberg – Focus 19/1995).

[0012] Diese zahlreichen, gefährlichen und unerwünschten Nebenwirkungen erklären sich vor allem aus der Regenerationshemmung schnell proliferierender Gewebe und betreffen insbesondere das blutbildende System, die Epithelien der Schleimhäute und der Gonaden, sowie die Haut und Hautanhangsgebilde. Unter den lebensbedrohlichen Komplikationen stehen Infektionen an erster Stelle, gefolgt von Blutungen (Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch 256. Auflage 1990, Seite 1866).

Zytokinbehandlung

[0013] Hauptsächlich versucht man hier die bislang nur für Indikationen von Kaposi-Sarkom und Haarzellleukämien zugelassenen Interferon-Therapien anzuwenden. Interferon gehört zu den aktiv gegen entartete Zellen wirksamen Zytokinen. Die Wirkweise basiert auf der Erkennung von Oberflächenproteinen von Krebszellen und deren Zerstörung. Zu den Nachteilen der Interferontherapie gehören Fieber, Anorexie-Nausea-Emeses-Syndrom, Abgeschlagenheit, Kopfdruck, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen, Schwindel, Leberenzymerrhöhung, Pruritus, IIN-Antikörperbildung, Kreislauf- und Blutdruckprobleme (De Vita jr. VT., Helman S., Rosenberg SA. (1991): Biologic Therapy of Cancer Philadelphia: J.B. Lippincott Co.).

Antikörpertherapie

[0014] Neben der Interferontherapie setzt man bei den Immuntherapien bei der Behandlung vor allem auf den Einsatz von monoklonalen Antikörpern. Dazu werden nach einem Verfahren von Köhler und Millstein gezüchtete Myelomzellen mit Nagerlymphozyten fusioniert, welche mit menschlichen antigenen Melanomzellmaterial bzw. Membranfraktionen aus Melanomzellen immunisiert wurden. Dabei entstehen in fast unbegrenzter Menge monoklonale Antikörper aus Melanomzellen. Die Antikörper werden dann injiziert und finden dann auf natürlichem Weg über Immunmodulatoren die Hautkrebszellen und zerstören diese. Nebenwirkungen sind nicht bekannt, da es sich um körpereigene Stoffe handelt, sodass auch keine Immunschockreaktionen auftreten. Der Nachteil bei dieser Therapieform ist jedoch die geringe Sensitivität auf Hautkrebszellen (Voigt H. (1996): 150 Fragen und Antworten zum malignen Melanom. Zuckerschwerdt Verlag, München/Ibelgauffs N. (1992): Lexikon Zytikine. medicon München).

Therapie mit dendritischen Zellen

[0015] Seit ca. 1995 erforscht man intensiv die Möglichkeit des Einsatzes von körpereigenen dendritischen Zellen bei der Behandlung von Hautkrebs. Dazu werden aus Rückenmark- und/oder Blutstammzellen des Pa-

tienten dendritische Zellen in vitro gezüchtet, die dann, wenn sie einen Mindesttiter erreicht haben, dem Patienten wieder geimpft werden. Die dendritischen Zellen suchen und finden aktiv Tumorzellen und greifen diese mit zellzerstörenden Stoffen an. Hierbei ist der geringe Wirkungsgrad der Hauptnachteil, sodass man versucht die dendritische Zelle mit körpereigenen menschlichen Zytokinen und/oder Peptiden (z.B. Anaphylatoxine C3a u.a.) zu beladen (Kirchner H., Kruse A., Neustock P., Rink L. (1994): Cytikine und Interferone, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg). Leider reicht bei den gefundenen Stoffen die Spezivität oft nicht zur vollständigen Abtötung der Tumorzellen aus.

Aufgabenstellung

[0016] Aufgabe dieser Erfindung ist daher die Bereitstellung verbesserter Mittel für die Therapie von Tumorerkrankungen, die mittels dendritischer Zellen angreifbar sind. Die Wirkung dieser Mittel soll weiterhin durch verbesserte spezielle Lösungsmittel erhöht werden.

[0017] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Beladung von dendritischen Zellen mit toxischen Substanzen erreicht, wobei die toxischen Substanzen aus dem Gift von Skolopendern der Gattungen Scolopendra und Hemiscolopendra, Schlangen der Gattungen Bitis und Naja, Spinnen der Gattungen Loxosceles, Sicarius und Pholcus, sowie Skorpionen der Gattung Parabuthus und einer Kombination aus einem oder mehreren dieser Toxine ausgewählt sind.

[0018] Hierbei setzt sich das erfindungsgemäße Lösungsmittel aus mehreren Bestandteilen zusammen:

1. Als Basisbestandteil werden in 15 ml 0,9 prozentiger NaCl – Lösung 7 ml der homöopathischen Substanz Tarantula D4 eingearbeitet.

[0019] Tarantula D4 wird vermischt auf homöopathische Weise unter Schütteln zum Erdmittelpunkt mit 15 ml der 0,9 prozentigen NaCl – Lösung.

[0020] Bekanntermaßen erhält in der Homöopathie der Kranke das betreffende Medikament nicht in seiner Urtinktur, sondern in einer Verdünnungsstufe. Der Begründer der Homöopathie, Samuel Christian Hahnemann, machte die paradox anmutende Beobachtung, dass sich die Wirkung einer Arznei umgekehrt proportional zur Konzentration verhält. Je stärker die Stammlösung verdünnt wird, desto wirksamer wird sie.

[0021] Die D – Verdünnungsstufen werden hergestellt, indem 1/10 der Stammlösung mit 9/10 Alkohol aufgefüllt und dann geschüttelt wird. Dadurch erhält man die erste Verdünnung D1. Von dieser Verdünnung nimmt man erneut 1/10 und verschüttelt es mit 9 Teilen Alkohol, und man erhält eine D2. So wird diese Prozedur fortgesetzt bis schließlich hohe Potenzen wie z.B. D 200 entstehen. Dennoch handelt es sich um hochwirksame Arzneien. Jedoch um hierfür nach einem Erklärungsmodell zu suchen muss man sich von der Physik, die mit einfachen linearen stoffbezogenen Thesen arbeitet, verabschieden.

2. Zu der unter 1. erhaltenen Lösung gibt man bis zu 0,5 ml einer gesättigten Lösung des gesamten Giftcocktails von Spinnen der Arten
 Loxosceles laeta, oder
 Loxosceles gaucho, oder
 Loxosceles Mallorca, oder
 Loxosceles Menorca.

[0022] Von der Art Loxosceles sind in den wärmeren bis zu den tropischen Gebieten von Nordamerika, Mittelamerika, Südamerika und der Karibik ungefähr 50 Arten vertreten.

[0023] In Afrika bis in das Mittelmeergebiet und Südeuropa sind ungefähr 20 Arten von Loxosceles zu finden.

[0024] Die meist in braunen Tönen gefärbten Tiere erreichen eine Länge des Körpers (ohne Beine) von 8 bis 15 Millimetern. Diese Spinnen sind vor allem in der Nacht aktiv und sehr scheu. Ihr Netz ist unregelmäßig aufgebaut. Als Schutzraum suchen sie sich dunkle Stellen unter Steinen oder auch unter Laub. Loxosceles laeta ist meist in Kellern, Garagen, Schuppen, Ställen oder auch in den Wohnungen selbst zu finden. Man muss davon ausgehen, dass die Raumtemperaturen in den Gebäuden es erst ermöglichen, dass sich diese Art so weit, auch in kälteren Regionen, verbreiten konnte.

[0025] Loxosceles – Arten beißen nur bei starkem körperlichem Kontakt.

[0026] Vor allem im Wohnbereich werden die Bisse registriert, die eine Symptomatik ähnlich einem Stechmü-

ckenstich haben. Es gibt den Begriff des „necrotic arachndism„. Dieser beschreibt Hautnekrosen nach Bissen von den Loxosceles – Arten.

[0027] Nekrosen sind aber auch nach Bissen von anderen Spinnen bekannt.

3. Aufgrund unterschiedlicher Mengenverhältnisse der verwendeten Gesamtgift – Cocktails ist es teilweise erforderlich, den Gesamtgift – Cocktail in wasserfreier Ameisensäure anzureiben, der wiederum 1 bis 2 ml des Gesamtextrakts von Bulldog – ants zugemengt wird. Diese Menge bezieht sich auf eine Menge des Gesamtgift – Cocktails Von 10 ml.

[0028] Die Bulldog – ants sind Ameisen die zur Familie der Myrmicinae zählen.

[0029] Sie leben in Australien. Es gibt viele Arten von ihnen und sie sind die größten Ameisen auf der Erde. Sie können eine Länge von bis zu 40 Millimeter erreichen. Sie sind tagaktiv und kommen in verschiedenen Größen und Farben vor.

[0030] Die Bulldog – Ameisen habe einen langen Kopf, große Augen und kräftige Kiefer. Sie greifen oft in größerer Zahl an und ihr Biss ist giftig. Dreißig dieser Ameisen können einen Menschen töten.

[0031] Eine andere Art von Bulldog – ant ist klein, schwarz und bewegt sich springend vorwärts. Diese Art schafft Sprünge in eine Höhe bis 20 Zentimeter.

[0032] In das so erhaltene Lösungsmittel wird dann für den jeweiligen Anwendungsfall der spezielle pharmazeutische Wirkstoff eingearbeitet.

[0033] Nach den bisherigen Erkenntnissen sind die beschriebenen Lösungsmittel nicht toxisch.

[0034] Die Lösungsmittel alleine haben eine tumorzerstörende Wirkung, die im Zellversuch bei Hirntumoren, Magen – Darm – Tumoren und einzelnen Brustkrebspatienten – Zell – Linien positiv überprüft wurden.

[0035] Derart beladene dendritische Zellen sind zur Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Therapie von Hautkrebs und Schleimhauttumoren, einsetzbar. Die dendritischen Zellen können als alleinige Therapie, aber auch als Begleittherapie ohne die Gefahr der Nachteile des derzeitigen Standes der Technik eingesetzt werden.

[0036] Nachfolgend wird die Erfindung näher beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die nachfolgende Beschreibung und die Ausführungsbeispiele beschränkt. Der Fachmann kann die Erfindung auf Grundlage der beiliegenden Patentansprüche unter Berücksichtigung der Beschreibung abwandeln, ohne den Schutzbereich der beiliegenden Ansprüche zu verlassen.

[0037] Die Beladung der dendritischen Zellen erfolgt mit einer und/oder mehreren toxischen Substanzen aus dem Gift von Skolopendern der Gattungen Scolopendra und/oder Hemiscolopendra, Schlangen der Gattungen Bitis und Naja, sowie Skorpionen der Gattung Parabuthus und/oder Spinnen der Gattung Loxosceles, Sicarius und Pholcus, in einer pharmazeutisch und therapeutisch wirksamen Menge. Es ist aber auch möglich, eine Kombination von mindestens zwei dieser toxischen Substanzen aus den Giften einzusetzen.

[0038] Das Gift der oben genannten Tiere enthält einen ganzen Cocktail von Verbindungen, wozu nicht nur Peptidtoxine gehören, sondern auch Toxine mit einer Amidogruppe, die jedoch keine Proteinstruktur aufweisen und beispielsweise ein Molekulargewicht von 30–55 kDa aufweisen. Weiterhin gehören zum Giftcocktail antagonistisch wirkende Substanzen, die eine räumliche und zeitliche kontrollierte Ausbreitung der vom Tier abgegebenen Gifte sicherstellen.

[0039] Bei den Toxinen handelt es sich bevorzugt um Peptidtoxine, Die Toxine weisen im allgemeinen nekrotische, cytotoxische und/oder apoptotische Eigenschaften auf. Die Toxine können durch an sich bekannte Verfahren aus dem Giftcocktail der Tiere isoliert werden. Da dies jedoch mühsam ist, hat sich erfindungsgemäß gezeigt, dass nach einer Fraktionierung des Giftcocktails auch einzelne, die Toxine enthaltende Fraktionen zur Beladung der dendritischen Zellen einsetzbar sind. In diesen Fraktionen liegen die Toxine zusammen mit weiteren Substanzen vor. Da die Fraktionen jedoch so ausgewählt werden, dass sie insbesondere die zelltoxisch, apoptotisch und/oder nekrotisch wirkenden Substanzen enthalten, ist eine Aufreinigung der Toxine bis zu vollständigen Reinheit nicht zwingend notwendig. Falls dies jedoch erfolgt ist und beispielsweise auch die Struktur der Toxine bekannt ist, könnten diese nicht nur in isolierter, reiner Form, sondern auch in rekombinanter Form

eingesetzt werden, wenn es sich um die Peptidtoxine handelt. Die Peptidtoxine besitzen im Allgemeinen ein Molekulargewicht im Bereich von 50–350 kDa, bevorzugt ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Die Toxine können auch synthetisch hergestellt werden, und es sind selbstverständlich auch Abwandlungen der in den genannten Tierarten vorhandenen und erfindungsgemäß zur Beladung der dendritischen Zellen eingesetzten Toxine möglich, also Derivate, die durch chemische Modifikationen der Toxine erhalten wurden. Bei den Peptidtoxinen sind unter Derivaten u.a. solche Toxine zu verstehen, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren hinzugeführt, deletiert und/oder durch andere Aminosäuren ausgetauscht wurden, wobei natürlich jeweils die toxischen Eigenschaften erhalten bleiben. Es sei darauf hingewiesen, dass ein Toxin nicht nur cytotoxische, sondern auch nekrotische und/oder apoptotische Eigenschaften in sich vereinigen kann.

[0040] Die mit den toxischen Substanzen beladenen dendritischen Zellen können zur gezielten Therapie von Tumoren eingesetzt werden. Demzufolge weisen die Toxine zellzerstörende Eigenschaften auf. Da die dendritischen Zellen aktiv Tumorzellen suchen und finden und diese mit zellzerstörenden Stoffen angreifen, werden die toxischen Substanzen so ausgewählt, dass sie zellzerstörende, d.h. cytotoxische, nekrotische und/oder apoptotische Eigenschaften aufweisen. Gerade derartige Substanzen liegen in den Giftcocktails der im Anspruch 1 genannten Tiergattungen vor. Sie eignen sich deshalb in hervorragender Weise zur Therapie von Tumoren der Haut und der Schleimhäute. Es ist aber auch möglich, die derart beladenen dendritischen Zellen mit weiteren, für die Tumorthherapie einsetzbaren Substanzen zu beladen, beispielsweise mit Cytokinen, Cytokin-Rezeptoren, Anaphylatoxinen, Interferonen, Antikörpern, Glykosiden usw.

[0041] Die Beladung erfolgt beispielsweise durch direkte Injektion der toxischen Substanzen in die Zelle, durch Inkubation der dendritischen Zellen mit den toxischen Substanzen oder durch Lipofektion. Ursprünglich handelte es sich hierbei um eine Technik zur Transformation von Zellen mit fremder DNA oder RNA. Effektivitätssteigerung wird dadurch erreicht, dass an Liposomen Antikörper, Proteine, Glykolipide u.a. geknüpft werden, wobei zielgerichtet die Interaktionen von Liposomen und Zelloberfläche beeinflusst werden. Dadurch können die Peptidtoxine oder Zytokine als „zelleigen“ erkannt werden und bei den „normalen“ Stoffwechselfunktionen in die dendritischen Zellen eingeschleust werden (Herder (1995): Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Band 2, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).

[0042] Ein weiteres Verfahren zur Beladung ist die Laser-Mikroinjektion. Dabei werden dendritische Zellen, die in einem die toxischen Substanzen enthaltenden Medium vorliegen, für kurze Zeit mit einem stark fokussierten Laserstrahl behandelt, sodass ein Loch in der Zellwand entsteht, durch welches das umgebende Medium in die Zelle eindringen kann. Die diesem Verfahren zugrunde liegende Technik der Mikromanipulation von Zellen oder Zellverbänden ist bspw. in Schütze K. et al.; Nature Biotechnology, 16,8: 737–742 (1998), Schütze K. et al.; J. Cell Mol. Biol. 55,5: 735–746 (1998), Böhm M. et al.; Americ. J. Pathology; 151,1: 63–67, Ponten F. et al.; Mutation Research Genomics, 382: 45–55 (1997), Bernsen M. et al.; Lab. Invest. 78: 1267–1273 oder Fink L. et al.; Nat. medicine. 4,11: 1329–1333 (1998) beschrieben.

[0043] Bevorzugt ist es, wenn das Peptidtoxin, mit dem die dendritische Zelle beladen wird, und/oder die wahlweise weiteren enthaltenen Substanzen aus dem Gift der Skolopender-Hunderfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *Bitis nasicornis* (Nashornvipere) und der kleineren Bitisarten *B. atropos*, *B. caudalis*, *B. peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulosus*, *Parabuthus villosus*, der Loxosceles-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabbenspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) stammen, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn das Peptidtoxin und/oder die wahlweise weiteren Substanzen aus dem Gift von Skolopendern, *Bitis arietans* und/oder *Loxosceles spiniceps* stammen. Dies hat den Vorteil, dass bei der Substanz die von der Natur vorgegebene haut- und/oder gewebezersetze Wirkung ausgenutzt werden kann. Dabei ist bevorzugt, dass das Tiergiftrogemisch aus männlichen und/oder weiblichen Skolopendern der Gattungen *Scolopendra* und *Hemiscolopendra* ab ca. 15 cm Körperlänge, männlichen und/oder weiblichen Schlangen der Gattungen *Bitis* und *Naja*, bevorzugt ab einer Körperlänge von 50 cm, weiblichen subadulten und/oder adulten Skorpionen der Gattung *Parabuthus*, und/oder aus weiblichen subadulten oder adulten Spinnen der Gattung *Loxosceles* und/oder *Pholcus* und/oder *Sicarius* gewonnen wird. Dies ist vorteilhaft, da weibliche Spinnentiere der Gattungen *Parabuthus*, *Loxosceles*, *Pholcus* und *Sicarius* mehr Gift produzieren als männliche Vertreter. Bei Skolopendern und Schlangen produzieren beide Geschlechter vergleichbare Giftquantitäten und Giftqualitäten. Es ist weiterhin bevorzugt, dass das Tiergiftrogemisch durch manuelles Melken erhalten wird. Dies hat den Vorteil einer besonders schonenden Gewinnung des Tiergiftrogemisches.

[0044] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist überdies bevorzugt, dass das Tiergiftrohgemisch vor der Fraktionierung homogenisiert wird, und es ist weiterhin bevorzugt, dass die Fraktionen vor der Weiterverarbeitung tiefgekühlt und weiter bevorzugt lyophilisiert werden. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Beladungen der dendritischen Zellen eignen sich zur Verwendung in der Medizin. Die mit den pharmazeutisch wirksamen Substanzen beladenen dendritischen Zellen können erfindungsgemäß bevorzugt zur Behandlung von Hautkrebskrankungen verwendet werden. Bevorzugt ist weiterhin die Verwendung eines Peptidtoxins aus dem Gift der Skolopender-Hunderfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornviper) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulatus*, *Parabuthus villosus*, der Loxosceles-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabbspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) in einer pharmazeutisch wirksamen Beladung von dendritischen Zellen zur Behandlung von Hautkrebskrankungen, wobei Peptidtoxine aus dem Gift von Skolopendern, *Bitis arietans* und/oder *Loxosceles spiniceps* besonders bevorzugt sind.

[0045] Außerdem ist die Verwendung eines Peptidtoxins aus dem Gift von Skolopender-Hunderfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornviper) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulatus*, *Parabuthus villosus* und/oder den *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta* und den Pholcusspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA), *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius oweni* und *Sicarius* spp. (Südamerika) in der Medizin erfindungsgemäß vorgesehen.

[0046] Bevorzugt wird das Peptidtoxin durch ein Fraktionierungsverfahren erhalten und es ist weiterhin bevorzugt, dass die pharmazeutisch wirkende Substanz aus dem Giftcocktail einer der genannten Arten erhalten wird. Dadurch kann die pharmazeutische Wirksamkeit der Beladung in ihrer Wirkung vorteilhafterweise auf die zu behandelnde Tumorart und/oder Größe abgestimmt werden.

[0047] Das Peptidtoxin kann durch an sich bekannte Fraktionierungsverfahren zur Auftrennung von Proteinen aus dem Tiergiftrohgemisch (Gesamtgiftcocktail) erhalten werden. Bevorzugt ist, dass das Peptidtoxin durch Gelchromatographie, HPLC, Affinitätschromatographie und/oder Ionenaustauschchromatographie erhalten wird. Es ist aber auch möglich, das Peptidtoxin und/oder die weiteren verwendeten Substanzen aus dem Gift von Skolopender-Hunderfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornviper) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulatus*, *Parabuthus villosus*, der *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabbspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) chemisch synthetisch oder durch geeignete gentechnologische Methoden in rekombinanter Form herzustellen. Wie bei chemischen Substanzen üblich umfasst die vorliegende Erfindung auch Derivate und Salze der erfindungsgemäß bereitgestellten Substanzen. Beispielsweise kann das Peptidtoxin ein oder mehrere Additionen, Substitutionen und/oder Deletionen von Aminosäuren umfassen, wobei sichergestellt sein muss, dass die erfindungsgemäße pharmazeutisch-medizinische Wirkung beibehalten bleibt.

[0048] Bevorzugt ist außerdem, dass das Peptidtoxin in einer solchen Menge zur pharmazeutisch wirksamen Dosis zur Beladung vorliegt, dass durch die dendritische Zelle nur eine kontrollierte Abgabe des Peptidtoxins erfolgt.

[0049] Weiterhin bevorzugt ist eine pharmazeutisch wirksame Beladung, bei der die Menge an Peptidtoxin, die die dendritische Zelle abgeben kann, in ihrer zellzerstörenden Wirkung räumlich und zeitlich einer kontrollierten Ausbreitung unterliegt. Die pharmazeutische Zusammensetzung weist bevorzugt eine Menge an Peptidtoxin auf, die in Abhängigkeit von dem zu behandelnden Hautkrebs und/oder sonstigen Tumor gewählt ist.

Anzucht der dendritischen Zellen

[0050] Bevorzugt sind die menschlichen Rückenmarkstammzellen tiefgefroren in Eppendorf-Probengefäßen (E-cups) mit einem Fassungsvermögen von ca. 1 ml. Dabei handelt es sich bevorzugt um eine gesättigte Stammzellenlösung (Kochsalzlösung oder Plasma, maximal 50 Mikroliter). Zur weiteren Verarbeitung werden bevorzugt 750 µl Medium (37 Grad Celsius), bestehend aus 500 ml DMEM-Hams's F-12, 50 ml RPMI 1260 Penicilin/Streptomycin, 5 ml Glutamin und 50 ml FBS zugegeben.

[0051] Die so verdünnte Suspension wird anschließend 10–15 Sekunden auf niederster Stufe auf dem Vortex ohne Schaumbildung zur homogenen Durchmischung geschüttelt.

[0052] Direkt danach wird die Suspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche eingebracht und mit 20 ml desselben Mediums (37 Grad Celsius) aufgefüllt.

[0053] Dann erfolgt ein leichtes zwei- bis dreimaliges manuelles Schwenken zur optimalen Verteilung der in der Suspension befindlichen Rückenmarkstammzellen in der Zellkulturflasche.

[0054] Diese Zellkulturflasche wird in einen auf 37 Grad Celsius eingestellten Brutschrank eingebracht.

[0055] Bevorzugt ist es, die angesetzte Zellkultur fünf Tage bei gleich bleibender Temperatur (37 Grad Celsius) im Brutschrank zu belassen.

[0056] Damit wird ein Festwachsen der Rückenmarkstammzellen am Flaschenboden ermöglicht. Die erste Sichtkontrolle unter dem Invert-Mikroskop, ob die Rückenmarkstammzellen am Flaschenboden angewachsen sind, ist bevorzugt fünf Tage nach dem Verbringen der Zellkulturflasche in den Brutschrank.

[0057] Bevorzugt ist es, den ersten Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen fünf Tage nach dem Ansetzen der Zellkultur wie folgt vorzunehmen:

Die Mediumflasche wird so gehalten, dass möglichst viel des darin enthaltenen Mediums ausgegossen wird, ohne die bereits festgewachsenen Zellen mit auszuschwemmen. Evtl. verbleibendes Restmedium wird durch leichtes Ausklopfen des Flaschenhalses auf einer Unterlage entfernt.

[0058] Das so gesammelte Medium wird verworfen.

[0059] Anschließend werden 20 ml neues Medium in die Zellkulturflasche vorsichtig eingebracht, ohne die angewachsenen Zellen vom Zellkulturflaschenboden zu lösen. Der so beschriebene Mediumwechsel ist jeweils nach drei bzw. vier Tagen vorzunehmen, bis mehrere Zellschichten übereinander gewachsen sind und sich die ersten Zellen ins überstehende Medium lösen.

[0060] Das Wachstum der Zellkultur wird vor jedem Mediumwechsel unter dem Invert-Mikroskop kontrolliert.

[0061] Wenn die Flasche mit mehreren Zellschichten am Zellkulturflaschenboden bewachsen ist, wird der gesamte Überstand von etwa 20 ml zu gleichen Teilen in 4 kleine 25 cm² Flaschen subkultiviert und im Anschluss daran mit 37 Grad Celsius warmem Medium aufgefüllt.

[0062] Diese Subkulturen werden fünf Tage im Brutschrank bei 37 Grad Celsius ohne weitere Aktivitäten stehen gelassen.

[0063] Ab dem fünften Tag erfolgt jeweils alle drei bzw. vier Tage der zuvor beschriebene Mediumwechsel mit je 5 ml Medium unter laufender Mikroskopkontrolle.

[0064] Wenn der Zellkulturflaschenboden vollständig mit Zellschichten bewachsen ist, erfolgt die Zugabe der Wachstumsfaktorenmischung in der Menge, dass eine Konzentration von je 900 U/ml GM-CSF und IL-4 sowie 700 U/ml sIL-4R (z.B. von Fa. Biochrom) erreicht wird. Bevorzugt ist dabei eine Temperatur von 37 Grad Celsius. Die Zugabe der Wachstumsfaktorenmischung erfolgt mittels einer sterilen 2 ml-Pipette.

[0065] Die Zellkulturflasche wird leicht manuell geschwenkt ohne die Zellen vom Boden zu lösen. Für mindestens 24 Stunden wird die Zellkulturflasche bei 37 Grad Celsius im Brutschrank gelagert.

[0066] Frühestens nach 24 Stunden erfolgt die erste Sichtkontrolle unter dem Invert-Mikroskop, ob sich schon

dendritische Zellen ausdifferenziert haben, die dann jeweils täglich unter sterilsten Bedingungen mittels einer Glas-Pasteur-Pipette mit dem wenigstmöglichen Medium in eine neue Flasche (25 cm²) mit schon auf 37 Grad Celsius erwärmtem Medium (2 ml) überführt werden, bis sich in der Ursprungsflasche keine neuen dendritischen Zellen mehr bilden.

[0067] Der Mediumwechsel für die in der neuen Zellkulturflasche gesammelten dendritischen Zellen wird in der Art bevorzugt vorgenommen, dass das alte Medium bis auf 1 ml mit einer Glas-Pasteur-Pipette unter sterilsten Bedingungen abgesaugt wird, ohne dendritische Zellen mit abzusaugen und dann mit 4 ml neuem, 37 Grad Celsius warmem Medium aufgefüllt wird.

[0068] Dieser Mediumwechsel wird dann anschließend alle drei bzw. vier Tage in der beschriebenen Art vorgenommen.

[0069] Durch die so gewonnen dendritischen Zellen mit einer mindestens drei Wochen langen Lebensfähigkeit steht eine ausreichende Zahl für therapeutische Zwecke zur Verfügung. Wirkweise:

Die dendritischen Zellen erkennen genetisch defekte körpereigene Zellen, docken an diese an und geben die beigeladene Wirksubstanz in die kranke Zelle ab. Die Beiladung bewirkt die gezielte Zerstörung der entarteten Zelle über die zytotoxische Wirkung. Zudem sind dendritische Zellen in der Lage, Informationen über Tumorgeschehen (durch Erkennung von Zytokinen), aber auch Informationen über tumorzerstörende Substanzen an T-Zellen weiterzugeben. Die so „informierten“ T-Zellen bezeichnet man als Killerzellen.

[0070] Vorteil davon ist, dass die dendritischen Zellen in der Lage sind, genetisch defekte Zellen zu erkennen, die beigepackte Ladung zielgenau an den Wirkort zu bringen und die Bildung von Tochtergeschwüren zu verhindern.

Beschreibung

[0071] Neben den ca. 1500 weltweit in gemäßigten Zonen vorkommenden Skorpionarten und den ca. 35000 Webbspinnenarten weiß man nur von etwa 70 Skolopenderarten. Mit Ausnahme von etwa 300 Webbspinnenarten gehören die vorgenannten Tiere alle zu den aktiv giftigen Tieren, die ihre Gifte zum Nahrungserwerb einsetzen. Da diese Tiere nur eine sehr kleine Mundöffnung haben, entwickelten sie die Außenvorverdauung, die über ein hoch entwickeltes Enzym- und Giftsystem ermöglicht wird. Entweder wird ein Giftcocktail direkt in das Beutetier injiziert oder das Beutetier wird mechanisch getötet, zerrissen und/oder durchgekaut und dabei mit dem Giftcocktail durchmischt. Die verflüssigte Nahrung mit kleinsten festen Bestandteilen kann dann eingesogen werden.

[0072] Etwa 50 Webbspinnenarten, ebenso viele Skorpionarten und etwa 20 Skolopenderarten können durch ihre Gifte auch dem Menschen gefährlich werden. Nach wie vor sind vor allem die Gifte der medizinisch wichtigen Arten kaum oder gar nicht erforscht. Die Hauptbestandteile der Arthropodengifte sind:

- Verdauungsenzyme
- Biogene Amine
- Organische Säuren
- Peptide
- Peptidtoxine

[0073] Unter den Peptidtoxinen finden sich folgende Toxingruppen:

- Herzgifte
- Nervengifte
- Blutgifte
- Zellgift
- Gewebe zerstörende Gifte

[0074] Ursprünglich findet durch den Gesamtgiftcocktail von allen giftigen Tieren durch das synergistische und/oder antagonistische Zusammenwirken verschiedener Substanzen generell auch eine Vorverdauung und damit eine gezielte Ursprungszellenveränderung tierischer Zellen statt.

[0075] Bei den in dieser Erfindung verwendeten Skolopender-, Schlangen-, Skorpion- und Spinnenarten finden sich im Gesamtgiftcocktail Substanzen, welche zytotoxisch, nekrotisch und/oder apoptotisch wirken (verdauende Wirkung der Gifte). Substanzen die als Herzgifte, Nervengifte oder Blutgifte wirken, sollen dagegen erfindungsgemäß eher vermieden werden. Mittels HPLC-MS-MS wurden die Peptidtoxine aus dem Gesamt-

giftcocktail bestimmt. Diesen wiederum wurden über Zellversuche spezifische Wirkweisen zugeordnet. Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass Bestandteile der Tiergifte von Skolopender-Hundertfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornvipere) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulosus*, *Parabuthus villosus*, der *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabbenspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) zur Behandlung von Hautkrebserkrankungen verwendet werden können, wobei Peptidtoxine aus dem Gift von Skolopendern, *Bitis arietans* und/oder *Loxosceles spiniceps* besonders bevorzugt sind.

[0076] Der Gesamtgiftcocktail ist auf Grund der Vielzahl der enthaltenen Einzelsubstanzen und seiner daraus resultierenden komplexen Wirkung im Körper derzeit pharmazeutisch noch nicht einsetzbar. Als Abwehrgift von den Tieren eingesetzt, erleidet der Gebissene folgende Symptomatik;

Skolopender der Gattungen *Scolopendra* und *Hemiscolopendra*

[0077] Auf Grund seiner großen Mundwerkzeuge wird der Biss der bis zu 30 cm langen Tiere, immer gespürt. Allgemeine Beobachtungen über die Giftwirkungen von Riesenhundertfüßern (Skolopender) fehlen. Das Gift ist jedenfalls für Kleinsäuger stark wirksam. So genügt beispielsweise der Inhalt einer Giftdrüse um 25 Mäuse mit einem Gewicht von ca. 20 gr. Innerhalb von 7 Stunden zu töten. Das Gift wirkt stark auf das Nervensystem, was zu folgenden Symptomen führt: Beschleunigung des Atems, Schweissausbrüche, Gleichgewichtsstörungen, Erbrechen, Atemlähmung, Krämpfe bis zum Tod. Neuere Arbeiten über Chemie, Biochemie und Toxikologie der Gifte gibt es nicht (Habermehl G. (1987): Gift-Tiere und ihre Waffen Springer-Verlag, Berlin, 4. und nachfolgende Auflagen).

Schlangen der Gattungen *Bitis* und *Naja*

[0078] Der Biss selbst wird von den Gebissenen durch die Wucht, mit dem die Schlange zustößt wahrgenommen. Als Besonderheit ist die Fähigkeit der Speikobras zu erwähnen, die über ihre Zähne mittels Druckluft das Gift zielgerichtet bis zu 5 Meter auf das Opfer versprühen kann. Mit dem Biss setzt über die Giftabgabe sofortiger Schmerz ein. Bald darauf beginnt das Gift mit seiner gewebezersetzen Wirkung. Zunächst beginnt die lokalnekrotische Wirkung, bei der die Hautschichten lysiert werden. Anschließend breitet sich mit Hilfe der permeabilitätssteigernden Enzyme das Gift großflächig in die Bissstelle umgebenden Gewebe aus. Dabei können mit Ausnahme des Skeletts alle Gewebebestandteile über Nekrose zerstört werden.

[0079] Erfolgt der Biss in eine Extremität ist eine Amputation situationsabhängig abzuwägen. Neben den gewebezerstörenden Giften findet man je nach Art noch Neuro- bzw. Cardiotoxine, die in erster Linie für die Schmerzen und die Kreislaufinstabilität verantwortlich sind. Bei den tödlich verlaufenden Bissunfällen stehen Blutvergiftung und Nierenversagen an erster Stelle.

Skorpione der Gattung *Parabuthus*

[0080] Schon der Stich verursacht wegen der im Giftcocktail enthaltenen Neurotoxine starke Schmerzen an der Stichstelle, die den Schmerzen einer Verbrennung ähneln. Die Schmerzen werden nach einiger Zeit von einem Prickeln abgelöst welches letztendlich in eine Gefühllosigkeit übergeht. Die allgemeinen Symptome können nach 5 Minuten, teilweise aber auch erst 24 Stunden nach dem Stich auftreten. Der Gestochene wird erregt, Kinder haben gelegentlich Krämpfe; Reflexe gehen auf ein Minimum zurück oder verschwinden ganz. Das Bewusstsein bleibt erhalten, wobei oft starke Angstzustände auftreten. Es folgt Tränenfluss und eine Erweiterung der Pupillen bei gleichzeitiger Einschränkung der Sehkraft. Der Puls ist beschleunigt und unregelmäßig. Blutdruck kann sowohl erhöht als auch erniedrigt sein. Die Körpertemperatur schwankt stark, wobei eine Hypothermie eine Verschlechterung des Zustandes des Patienten anzeigt. Der Atem geht unregelmäßig. Erbrechen ist ein ernstes Zeichen dafür, dass auch Nervenzentren angegriffen sind. Der Tod tritt überwiegend durch Atemlähmung ein, meist innerhalb 20 Stunden, weniger häufig innerhalb von 30 Stunden (Habermehl G. (1987): Gift-Tiere und ihre Waffen, Springer-Verlag, Berlin, 4. und nachfolgende Auflagen).

Spinnen der Gattung *Loxosceles*

[0081] Der Biss selbst wird in den allermeisten Fällen vom Gebissenen nicht gespürt. Die Bissstelle schwillt nach 2 bis 5 Stunden sehr stark an, wobei das Anschwellen mit starken Schmerzen einhergeht. Die Bissstelle verfärbt sich dunkelrot und es bilden sich Blasen. Anschließend färbt sich das Gewebe schwarz und Hautzellen sterben ab. Dabei hinterbleibt ein Loch in der Haut, welches bis zu 5 cm im Durchmesser betragen kann. Die Heilung kann bis zu 2 Jahren betragen, wobei teilweise eine Hautverpflanzung nötig werden kann. Bei schweren Fällen kommt es zu Blut im Urin und letztlich zu einem Nierenversagen mit Todesfolge. Es gibt ausserdem Fälle mit hämolytischer Anämie und Hämaturie welche mit Sinnesstörungen einhergehen. Die Körpertemperatur kann bis auf 41 Grad Celsius steigen, wobei sich in schweren Fällen auch ein Koma einstellen kann.

Spinnen der Gattung *Pholcus*

[0082] Auch hier wird der Biss in den meisten Fällen nicht gespürt. Nach etwa 2 Stunden rötet sich die Bissstelle deutlich und nässt. Im Laufe der nächsten Stunden löst sich die Hautschicht um die Bissstelle bis zu einer Größe von 3 cm. Es bildet sich eine offene Wunde, die ohne Behandlung bis zu 3 Monate nicht zuheilt. Ohne Behandlung erfolgt die Wundheilung unter starker Narbenbildung. Eine Behandlungsform besteht z.B. in einer Hautverpflanzung. Begleitende Symptome äußern sich in einer Kreislaufinstabilität. Todesfälle sind nicht bekannt.

[0083] Überraschenderweise können jedoch Einzelsubstanzen, von den im Tiergift enthaltenen Peptidtoxinen, welche von von Skolopender-Hundertfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornviper) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulosus*, *Parabuthus villosus*, der *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabben-spinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) stammen, zur Behandlung von Hautkrebserkrankungen sowie parallel bzw. unterstützend zu Hautkrebsoperationen eingesetzt werden, um genetisch entartete Zellen zu zerstören. Beispielsweise kann erfindungsgemäß die Zerstörung von Melanomzellen und/oder von bei der Operation nicht erfasstem Tumorgewebe über das Aufspüren, Enttarnen und die zielgerichtete Elimination der genetisch defekten Zellen erfolgen. Bei der Therapie können zum einen genetisch defekte Körperzellen (Tumorzellen) zerstört werden, da die Oberflächenproteinstruktur und die erfindungsgemäß eingesetzten, mit Peptidtoxin beladenen dendritischen Zellen, diese in ihrer Oberflächenstruktur veränderten Zellen erkennen und zerstören können. Darüber hinaus geben Tumorzellen spezifische Botenstoffe, so genannte Tumormarker ab, auf welche die mit Peptidtoxin beladenen dendritischen Zellen reagieren und daraufhin die Tumorzellen zerstören (Zitvogel L. et al (1999): Novel Immunologic And Therapeutic Attributes of Dendritic Cells (DC): Modulation of Tand NK cell-Mediated-Antitumor Immune Responses, The European Journal Of Cancer, Vol. 35 Supplement 5-S25//Gong J., Avigan D. et al (1999): Activation of Antitumor Cytotoxic T Lymphocytes by Fusions of Human Dendritic Cells and Breast Carcinoma Cells. The European Journal Of Cancer, Vol. 35 Supplement 5-S30).

[0084] Die Funktionsweise basiert auf der Fähigkeit dendritischer Zellen, genetisch defekte Zellen aufzuspüren, erkennen und zerstören zu können und der gewebezerstörenden Wirkung der Peptidtoxine wie folgt: Die Peptidtoxine mit einem Molekulargewicht von ca. 50–350 kDa, im Fall von Skorpionen, Spinnen und einigen Skolopendern typischerweise ca. 100 kDa, besitzen eine gewebezerstörende Wirkung, darunter auch eine Hautzelltypen zerstörende Wirkung. Auf Grund ihres hohen Molekulargewichts und ihrer räumlichen Struktur haben sie in Geweben ohne die Hilfe von so genannten Durchdringungsenzymen nur eine geringe Ausbreitungstendenz. Dendritische Zellen werden mit Hilfe eines Wachstumsfaktorengemisches (GM-CSF/IL-4, bevorzugt in Kombination mit dem Interleukin-Rezeptor sIL-4R) bevorzugt aus Rückenmarkstammzellen wegen ihrer Gleichheit hergestellt und isoliert.

[0085] Die so gewonnen dendritischen Zellen werden bevorzugt mit den hautnekrotisch wirksamen säulen-chromatographisch erhaltenen Einzelkomponenten aus den Giften der Skolopender-Hundertfüßerarten *Scolopendra gigantea* ssp., *Hemiscolopendra* spp., der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *bitis nasicornis* (Nashornviper) und der kleineren Bitisarten *B.atropos*, *B.caudalis*, *B.peringueyi* und der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, der Parabuthus-Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulosus*, *Parabuthus villosus*, der *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*.

[0086] *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, der Sechsaugenkrabbenspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis* und/oder der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp. (RSA) und *Pholcus* spp. (Kuba) über Lipofektion beladen. Die quantitative Beladung der dendritischen Zellen kann durch eine ca. 1,66%ige Zugabe von Phenyl-Gal-Nac gesteigert werden.

[0087] Gegebenfalls können weitere im Tiergiftrohgemisch enthaltene Substanzen die Wirkungen der Peptidtoxine, mit denen die dendritischen Zellen beladen werden, unterstützen.

[0088] Die Wirkweise der mit Peptidtoxinen beladenen dendritischen Zellen kann durch Austestung dieser in entsprechenden gesunden und tumorösen Zelllinien erfolgen. Erfindungsgemäß stammen die toxischen Substanzen, bzw. das Peptidtoxin, mit welchem die dendritischen Zellen beladen werden, aus dem Gift von Skolopendern der Familie Scolopendridae, Schlangen der Familie Viperidae, Schlangen der Familie Elapidae, Spinnen der Familie Sicaridae (erfindungsgemäß gehören zur Familie der Sicaridae neben *Sicanus* auch die Gattungen *Loxosceles* und *Scytodes*), Spinnen der Familie Pholcidae, Skorpione der Familie Buthidae.

[0089] Bevorzugt sind die Gattungen *Scolopendra* und *Hemiscolopendra*, *Bitis* und *Naja*, sowie *Loxosceles*, *Pholcus* und *Parabuthus*. Im Bereich der Gattungen *Scolopendra* und *Hemiscolopendra* können die *Scolopendra*- und *Hemiscolopendra*-Riesenhundertfüßerarten *Scolopendra morsitans*, *Scolopendra gigantea* und *Hemiscolopendra* spp., im Bereich der Gattung *Bitis* die *Bitis*-Schlangenarten *Bitis arietans*; *Bitis gabonica* und *Bitis nasicornis*, im Bereich der Gattung *Naja*, die *Naja*-Schlangenarten *Naja melanolcuca*, *Naja pallida* und *Naja sputatrix*, im Bereich der Gattung *Loxosceles* die *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, im Bereich der Gattung *Sicarius* die *Sicarius*-Spinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius oweni*, *Sicarius testaceus*, *Sicarius argentinensis*, im Bereich der Gattung *Pholcus* die *Pholcus*-Spinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus* spp. (RSA), *Pholcus* spp (Kuba) und *Pholcus opilionides*, im Bereich der Gattung *Parabuthus* die *Parabuthus*-Skorpioarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulatus* und *Parabuthus villosus* besonders bevorzugt werden. Unter den Spinnen der Gattung *Loxosceles* sind erfindungsgemäß auch die weiteren Arten einsetzbar.

[0090] Unter den Skolopendern der Gattung *Scolopendra* und *Hemiscolopendra* sind erfindungsgemäß alle Arten mit einer Körperlänge ab 10 cm einsetzbar. Unter den Schlangen der Gattung *Bitis* sind auch alle Zwergpuffotternarten erfindungsgemäß einsetzbar. Unter den Schlangen der Gattung *Naja* ist erfindungsgemäß auch die asiatische Speikobra *Naja naja atra* einsetzbar.

[0091] Unter den Spinnen der Familie Pholcidae sind erfindungsgemäß alle größeren Arten einsetzbar.

[0092] Unter den Skorpionen der Gattung *Parabuthus* sind erfindungsgemäß auch alle zentralafrikanischen Arten einsetzbar. Daneben sind erfindungsgemäß die Skorpione der Gattungen *Opisthophthalmus*, *Androctonus* und *Nebeo* einsetzbar.

[0093] Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutisch wirksamen Beladung dendritischer Zellen kann so erfolgen, dass dendritischen Zellen ein Peptidtoxin unter dem Mikroskop direkt über eine Mikropapillare injiziert wird, und diese Zellen dann in der Kulturflasche rückgeführt werden. Bei dieser Prägung kann die schon mit diesem Peptidtoxin beladene dendritische Zelle ihre Information über die Aufnahme eines Zellgiftes an die anderen dendritischen Zellen weitergeben. Dadurch kann nach ca. 72 Stunden eine Lösung dieses verwendeten Peptidtoxins ins Medium zugegeben werden. Nach weiteren 48 Stunden haben die dendritischen Zellen eine bestimmte, vom Peptidtoxin und den dendritischen Zellen abhängige Menge des Peptidtoxins aufgenommen.

[0094] Die Herstellung kann auch so erfolgen, dass einer Kultur dendritischer Zellen, in welcher sich auch Hautkrebszellen befinden, direkt in die Kulturflasche ein Peptidtoxin, welches die Hautkrebszellen zerstört, zugeimpft wird. Dadurch dass das Gift intakte Krebszellen zerstört, werden beim Tumorzellenabbau bestimmte Marken frei, welche den dendritischen Zellen anzeigen, dass die Tumorzellenzerstörung mit Hilfe des Peptidtoxins effektiver erfolgen kann, wobei die Adaption der dendritischen Zellen mit den wirksamen Substanzen über die Zugabe von Phenyl-Gal-Nac quantitativ gesteigert werden kann.

[0095] Dadurch kann nach etwa 24 Stunden eine weitere, konzentrierte Zugabe des Peptidtoxins erfolgen, welches dann auch von den dendritischen Zellen aufgenommen wird. Ziel bei den Herstellungsverfahren ist es, eine möglichst hohe quantitative Beladung der dendritischen Zellen mit diesem Peptidtoxin zu erreichen.

Eine Bestimmung der Konzentration der Zelle ist meßtechnisch derzeit nicht oder nur sehr schwer möglich. Die Medium-Konzentrationen an zu beladender Substanz bewegen sich im letzten Inkubationsschritt jedoch üblicherweise, abhängig vom verwendeten Toxin, im Bereich von ca. 0,5 µg/ml bis 250 µg/ml.

[0096] Bevorzugt kann die Gewinnung eines Tiergiftrohgemischs so erfolgen, dass dieses durch an sich bekannte Verfahren aus den Spinnentieren und Skolopendern gewonnen wird und eine Fraktionierung des Tiergiftrohgemischs durch ebenfalls an sich bekannte Fraktionierverfahren zur Auftrennung von Proteinen vorgenommen wird, um die Peptidtoxine und/oder die sonstigen zellzerstörend wirkenden Substanzen in möglichst voneinander getrennter Form in getrennten Fraktionen zu erhalten. Zur Herstellung einer pharmazeutisch wirksamen Beladung dendritischer Zellen werden bevorzugt einzelne Fraktionen verwendet. Bevorzugt können als Peptidtoxine auch zellzerstörend wirkende Schlangengifte wie z.B. das Kobraschlängengift Najatoxin-S eingesetzt werden, jeweils zur Beladung der zur Therapie eingesetzten dendritischen Zellen. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutisch wirksamen Fraktionen der Peptidtoxine können aus dem Giftcocktail, der über manuelles Melken der o.g. Tierarten gewonnen werden kann, z.B. über säulenchromatographische Aufreinigung, spezifische Giftkomponenten (nekrotisch und zytotoxisch wirkende Peptidtoxine) selektiert werden. Die Analytik zur Differenzierung der in den Fraktionen enthaltenen Komponenten kann über HPLC-MS-MS (z.B. mit einem Gerät der Fa. Perkin-Elmer) erfolgen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei einem Teil der hochmolekularen Substanzen über die Darstellung toxischer Gruppen vom NX-NHX-NOX- und SX-Typ, um Peptidtoxine handelt. Dieses wird durch ihre Wirkweise im Zellversuch bestätigt. (Burde R., Schrottenloher E., Weickmann D. (2000): In vitro Versuche zur Anwendung/Verwendung von zellzerstörenden Giftkomponenten der Sechsaugen-Krabbspinnen *Sicarius* spp. In der biologischen Krebstherapie.

[0097] Arachnologisches Magazin 2(8)_ 1-7 und Lundblad R.L. (1995): Techniques in Protein Modification, CRC Press, London, Tokyo).

[0098] Die erfindungsgemäß für die pharmazeutisch wirksame Beladung verwendeten Substanzen können auf natürlichem Weg gewonnen werden. Dabei handelt es sich um von Riesenhundertfüßern der Gattungen *Scolopendra* *Hemiscolopendra*, von Schlangen der Gattungen *Bitis* und *Naja*, von Webspinnen der Gattungen *Loxosceles*, *Sicarius* und *Pholcus* und von Skorpionen der Gattung *Parabuthus* produzierte Gift, die ursprünglich zum Beutefang und zur Vorverdauung tierischen Proteins entwickelt wurden. Diese natürliche Wirkweise kann durch eine funktionserhaltende, schonende Gewinnung des Giftgrundstoffes (z.B. durch manuelles Melken) erhalten werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Melkweisen von Arthropoden, mittels eines elektrischen Verfahrens (Weickmann D. (1991): Haltung und Giftigkeit von *Sicaridae*. Arachnologischer Anzeiger 16: 12-13; Weickmann D., Burda R. (1994): Electrophoresis of scorpion venoms, Electrophoresis Forum (1994), Abstracts, Techn. Universität München, Okt-24-26), bei dem den Tieren das Gift über einen elektrischen Impuls, der bei den Tieren die Kontraktion der Giftdrüsen auslöst, entzogen wird (die Spinnen sind hierbei bevorzugt unterkühlt, Skorpione und Skolopender geben bei Unterkühlung kaum bis kein Gift ab), wird gemäß der vorliegenden Erfindung der Giftcocktail über ein manuelles Verfahren, bei dem die Tiere unter Ausnutzung ihres natürlichen Abwehrverhaltens zur Abgabe ihres Giftes stimuliert werden, erhalten.

[0099] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung ist eine manuelle Melkweise der Spinnen vorgesehen. Dadurch werden echte, unverfälschte native Gift gewonnen, während bei der elektrischen Melkweise von den Spinnengiften durch Elektronenfluss umstrukturierte Substanzen bzw. Moleküle erhalten werden, die in ihrer Wirkweise geändert sein können oder auch Substanzen in den Giften vorhanden sein können, die das Tier sonst nicht abgeben würde, während bei den Riesenhundertfüßern durch die herkömmlichen elektrischen Verfahren kein Gift abgegeben wird. Die durch elektrisches Melken zusätzlich von den Spinnentieren abgegebenen Substanzen können, müssen aber nicht zwingend die medizinische Wirksamkeit der einzelnen im Gesamtgiftcocktail enthaltenen Verbindungen negativ beeinflussen. Standardmäßig kann eine Qualitätskontrolle des Rohgiftes über elektrophoretische Verfahren erfolgen.

[0100] Die folgenden Beispiele zeigen vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung, sollen den Schutzzumfang der Erfindung jedoch nicht beschränken.

[0101] In den Beispielen und der Beschreibung wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen:

[0102] Fig. 1 zeigt eine SDS-PAGE von Gesamtgiftcocktails aus Skorpionen, die in manueller und elektrischer Melkweise gewonnen wurden; Bahnen von links nach rechts: Molekulargewichtsstandard; *Androctonus* anst. *Hector*; mechanische Melkweise, elektrische Melkweise; *Nebo hierichinticus*, mechanische Melkweise, elektrische Melkweise; *Opisthophthalmus* sp., mechanische Melkweise, elektrische Melkweise.

Beispiele

1. Melken

a) Skolopender

[0103] Zur manuellen Melkung werden Tiere ab einer Körperlänge von ca. 10 cm der Gattungen *Scolopendra* und *Hemiscolopendra*, die *Scolopendra*- und *Hemiscolopendra*-Riesenhundertfüßerarten *Scolopendra morsitans*, *Scolopendra gigantea* und *Hemiscolopendra* spp. verwendet. Dabei werden die Skolopender mit den Fingern einer Hand hinter dem Kopf gegriffen, mit dem Handballen so fixiert, dass das Tier nicht mit dem zu Greifzangen umgebildeten letzten Beinpaar stechen kann. Dann lässt man das Tier durch eine Folie beißen, die über ein Reagenzglas gespannt ist.

[0104] Beim Biss wird gleichzeitig Gift abgegeben, welches sich am Reagenzglas sammelt. Das so gesammelte Gift wird in einen Exsikator gebracht. Dieser wird dann für mindestens 12 Stunden in einer Tiefkühltruhe bei mindestens minus 14 Grad aufbewahrt.

b) Schlangen

[0105] Zur Melkung werden Schlangen der Gattungen *Bitis* und *Naja* ab einer Körperlänge von etwa 50 cm verwendet. Dabei werden die Schlangen mit festem Griff hinter dem Kopf fixiert und der Körper über den Arm gelegt. Dann lässt man die Schlange durch eine Folie, die über ein Becherglas gespannt ist, beißen. Oder man lässt die zu melkende Schlange vorsichtig direkt an den Rand eines Becherglases bzw. einer Abdampfschale beißen. Beim Biss wird jeweils Gift abgegeben, welches sich am Becherboden sammelt. Das so gesammelte Gift wird in einem Exsikator getrocknet. Das getrocknete Gift kann bei plus 4 Grad Celsius mehrere Jahre aufbewahrt werden.

c) Spinnen

[0106] Zur manuellen Melkung werden adulte Weibchen der *Loxosceles*-Spinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles deserta*, im Bereich der Gattung *Sicarius* die *Sicarius*-Spinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius gweni*, *Sicarius testaceus*, im Bereich der Gattung *Pholcus* die *Pholcus*-Spinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus* spp. (RSA), *Pholcus* spp. (Kuba) und *Pholcus opilionides*, mit den Fingern einer Hand in Rückenlage fixiert, dabei mit einer in der anderen Hand befindlichen Spritze (2 ml Braun Injekt von der Fa. B. Braun) mit aufgesetzter steriler Kanüle (20 oder 21 von Becton Dickinson), die Tageszeit spielte keine Rolle, bei einer Raumtemperatur von 21 bis 27 Grad Celsius, bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 60%, an den Cheliceren durch Berühren mit der stumpfen Seite der Kanüle zur Abgabe des Giftes stimuliert. Dabei ist es bevorzugt, dass die Stimulationszeit nicht länger als 90 Sekunden dauert, da ansonsten das Tier einem unnötigen Stress ausgesetzt wird. Nach Erscheinen des Gifftropfens an den Giftklauen wird dieser mit der Spritze über die Kanüle aufgezo-gen. Für jedes Tier wird eine neue Spritze mit neuer Kanüle verwendet. Anschließend wird die Kanüle mit der Kanülenschutzhülle wieder verschlossen. Die verschlossene Spritze samt aufgezo-genem Gift wird direkt anschließend in einen Exsikator verbracht. Dieser wird dann für mindestens 12 Stunden in einer Tiefkühltruhe bei mindestens minus 14 Grad Celsius aufbewahrt

d) Skorpione

[0107] Zur manuellen Melkung werden Tiere ab einer Körpergröße von etwa 3 cm der Skorpionarten *Parabuthus transvallicus*, *Parabuthus granulatus* und *Parabuthus villosus* verwendet. Dabei werden die Skorpione am Postabdomen direkt hinter der Giftblase mit einer an den Spitzen mit Schaumstoff ummantelten Pinzette gefasst und der Giftstachel bevorzugt auf eine feinstpolierte Aluminiumplatte (ca. 4 x 5 cm) mit einer Dicke von 2 mm kontaktiert. Beim Kontakt gibt der Skorpion einen Gifftropfen auf die Aluminiumplatte ab, die dann in den Exsikator verbracht wird. Dieser wird dann für mindestens 12 Stunden in einer Tiefkühltruhe bei mindestens minus 14 Grad aufbewahrt.

2. Fraktionierung des Gesamtgiftes

[0108] Das durchgefrorene Gesamtgift wird nach Entnahme aus der Tiefkühltruhe in 1 ml Lösungsmittel z.B. Proteinlösungsmittel von Fa. Carl Roth GmbH & Co KG (Lösungsmittel für Protein-Säulenchromatographie: 9,25 M Tris/HCL, pH 6,5 bis 7,3, 1,92 M Glycin, in destilliertem, deionisiertem Wasser (wegen Denaturierung

wird kein SDS im Puffer verwendet)) eingebracht. Dadurch wird Gift in Lösung erhalten. Die so aufbereiteten einzelnen Giftlösungen der jeweiligen Arten können in einem sterilen, sauberen Teflonvial bei Raumtemperatur gesammelt werden. Das verschlossene Teflonvial wird anschließend auf einem Vortex ohne Schaumbildung 30 Sekunden lang geschüttelt, wobei eine homogene Lösung erhalten wird. Nach der Durchmischung wird die gesamte Lösung über einen Plexiglastrichter (um Kontamination zu vermeiden) in eine stehende transparente Plexiglassäule, die einen Durchmesser von 1,5 cm, eine Wandstärke von 2 mm und eine Höhe von 50 cm aufweist, und unten konisch bis auf 1,5 mm zulaufend offen ist, gefüllt mit 20 ml Gel (Fa. Sigma/Supelco, AcA 34; Matrix 3% Acrylamid 4% Agarose; Fraktionierungsbereich (MW): Proteine: 20 bis 350 kDa; Ausschlussgrenze 750 kDa; Kugeldurchmesser 60 bis 140 Mikrometer) eingebracht. Die so eingebrachte Giftlösung durchläuft das Gel und verdrängt dabei den im Gel befindlichen Puffer. Nach vollständigem Eindringen der Giftlösung in das Gel werden zusätzliche 150 ml Lösungsmittel (0,25 M Tris/HCL, pH 6,5 bis 7,3; 1,92 M Glycin) auf die Säule gebracht. Diese zusätzliche Lösungsmittel verdrängt bei seinem Durchlauf durch das Gel die darin befindliche Giftlösung. Die ersten 15 ml, die unten aus der Säule laufen, sind Restpuffer und werden verworfen. Nach diesen 15 ml werden je nach Tierart bis zu 30 Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen. Die Trennung in jeweils 4 ml ist bedingt durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Fraktionen, nachgewiesen durch Elektrophorese, bevorzugt SDS-PAGE. Als Auftragspuffer zum Peptidbindungs- und Proteinschutz werden Roti Load 1+ 2 (Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe: SDS-, Glycerol-, Bromphenolblau-, Phosphatpuffer, Roti Load 1 mit Mercaptoethanol, Roti Load 2 ohne Mercaptoethanol) verwendet. Die einzelnen Fraktionen in steril sauberen verschraubbaren 5 ml Teflonvials getrennt aufgefangen. Die Qualitätskontrolle der einzelnen Fraktionen erfolgt mittels Elektrophorese.

[0109] Die hautzelllysierende Wirkung der Fraktionen wurde bestimmt, indem die einzelnen Fraktionen aus dem Gesamtgiftcocktail der jeweiligen Tierart im Versuch an menschlichen lebenden Zellen in hoch- bis überdosierten Mengen (ca. 200 bis 500 µg/ml verwendetem Medium) ausgetestet wurden. Anwendung zur Beladung dendritischer Zellen fanden diejenigen Peptidtoxine, welche sowohl gesunde Hautzellen, bevorzugt Hautfibroblasten unterschiedlicher Biologie, als auch entartete Hautzellen, bevorzugt 2 Linien von malignem Melanom, zerstörten. Unberücksichtigt blieben diejenigen Peptidtoxine, welche neben Hautzellen auch noch weitere Zellen (z.B. Brustgewebszellen und Leberzellen) schädigten und teilweise sogar lysierten. Im Fall von *Sicarius* wurden Peptidtoxine in den Fraktionen 1–12 erhalten. Diese Fraktionen enthielten Peptidtoxine in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 72 bis ca. 168 kDa. Ein hautzelllysierendes, insbesondere maligne Melanomzellen lysierendes Peptidtoxin ist in Fraktion 10 enthalten.

[0110] Für die erfindungsgemäße pharmazeutisch therapeutisch wirksame Beladung der dendritischen Zellen werden z.B. einzelne hautzelllysierende Fraktionen der Tiergifte verwendet. Diese Fraktionen enthielten Tiergiftproteinbestandteile in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 50 bis 350 kDa bzw. Nichtproteinotoxine mit zumindest einer Amidogruppe in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 30–55 kDa. Eine SDS-PAGE des Gesamtgiftcocktails von Skorpionen ist in **Fig. 1** gezeigt.

[0111] Um die Struktur der einzelnen Substanzen aufzuklären, werden die jeweiligen Fraktionen z.B. über eine HPLC-MS-MS sowie eine DAD-UV-Spektrometrie (DAD bzw. DADI: Direct Analysis of Daughter Ions, Direkte Analyse von Tochterionen) untersucht. Im höheren Molekulargewichtsbereich ab 10.000 konnten keine bekannten Substanzen dargestellt werden. Die Grundgerüstbestimmungen deuten eine Zugehörigkeit eines Teils der Substanzen zumindest zu einem Polypeptidtyp mit toxischen Komponenten, also Polypeptidtoxinen, an. Es wurden jedoch auch Toxine mit einem Molekulargewicht von 30–55 kDa ermittelt, die keine Proteinstruktur aufweisen.

[0112] Fraktionen mit gleichen Zusammensetzungen können zusammen gesammelt werden. Für die weitere Verarbeitung und Lagerung werden die einzelnen Fraktionen gefriergetrocknet, beispielsweise mit folgenden Parametern: Die zu lyophilisierende Fraktion wird in einem offenen, mit perforierter Aluminiumfolie locker bedeckten Teflonvial, auf minus 22 Grad Celsius gekühlt. Zur sicheren Durchfrierung der Probe wird eine Kühlzeit von 11 Stunden (bei Skolopendern mindestens 20 Stunden) eingehalten. Dann wird ein Vakuum von 0,200 mbar angelegt. Nach Erreichen des Vakuums wird die Fraktion auf plus 4 Grad Celsius erwärmt und mindestens 24 Stunden unter Aufrechterhaltung des Vakuums auf dieser Temperatur gehalten. Nach dem Gefrier-trocknungsvorgang wird das Teflonvial mit der lyophilisierten Fraktion luftdicht verschraubt. Die Lagerzeit beträgt bei Raumtemperatur ca. 3 Monate (bei Skolopendergiften 4 Wochen), bei plus 7 Grad Celsius ca. 1 Jahr (Skolopendergifte sind bei dieser Temperatur nur etwa 5 Monate stabil) und bei minus 14 Grad Celsius ca. 5 Jahre (Skolopendergifte sollten bei längerer Lagerung bei minus 80 Grad Celsius gelagert werden).

4. Beladung dendritischer Zellen mit Peptidtoxinen

[0113] 3–5 ml einer Kultur dendritischer Zellen (2,5 bis 15 Millionen dendritischer Zellen/5 ml), hergestellt nach dem in dieser Erfindung weiter oben beschriebenen Verfahren, wurden mit 0,5 bis 2,5 ml einer Hautkrebszelllösung (Überstand einer frisch aufgeklopften reinen menschlichen Hautkrebszellkulturflasche mit etwa 250.000 Hautkrebszellen/ml Zellmedium. Medium: 500 ml DMEM-Ham's F-12, 10 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Glutamin und 50 ml FBS) versetzt. Anschließend wurden 1 bis 2 ml einer Lösung, die ca. 150 µg/ml Peptidtoxi der Fraktion 3 aus *Loxosceles spiniceps* enthielten, zugesetzt. Es wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde unter der sterilen Werkbank mit einer vorher autoklavierten Pasteurpipette etwa 4 ml, Mediumüberstand (möglichst ohne dendritische Zellen) abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgte eine weitere Zugabe von 1 bis 2 ml des Peptidtoxins Lox.Tox. 3 (gleiche Konzentration wie bei erster Zugabe), so dass eine Endkonzentration an Peptidtoxin von ca. 100 µg/ml vorlag. Bis zur Verwendung der so beladenen dendritischen Zellen werden diese weiter bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert.

[0114] Die mit den genannten Toxinen beladenen dendritischen Zellen werden gesammelt/angereichert, so dass eine möglichst gesättigte Lösung an dendritischen Zellen, beladen mit Toxinen, entsteht. Im Mischgewebszellversuch, d.h. einer Kultur aus gesundem Gewebe und Hauttumorzellen (Zellkultur: Malign. Melanom: sicher als diese identifizierten Zellen, vom Patienten nach Absprache mit diesem erhalten, seit 1995 ebenfalls als Langzeit- und Subkultur beobachtet) wurden dann die Wirkungen unterschiedlicher Gifte, mit welchen die dendritischen Zellen beladen werden, ausgetestet. Im Mittel waren die Tumorzellen (malign. Melanomzellen) im Durchmesser 4 mm groß und etwa 1–2 mm dick. Beladene dendritische Zellen wurden direkt ins Medium (500 DMEM-Ham's F-12, 10 ml Penicillin/Streptomycin; 5 ml Glutamin und 50 ml FBS) gegeben, wobei zwar alle Tumorzellbereiche angegriffen wurden, die Prozedur aber am längsten dauerte und nach 3 Wochen wiederholt werden musste. Beim Injizieren von dendritischen Zellen in den Tumor kann sehr selektiv gearbeitet werden, doch sterben viele dendritischen Zellen dabei ab. Am effektivsten erwies es sich, die mit den Giften beladenen Zellen direkt an den Tumorrand zu injizieren, so dass die dendritischen Zellen ihrer Natur entsprechend, den biologisch aktiven Tumorrandbereich zuerst zerstören können. Die lysierten Tumorzellen werden verdaut (teilweise von Makrophagen). Bei sämtlichen untersuchten tierischen Giften wuchsen die lysierten Zellbereiche mit gesunden Zellen wieder zu. In diesem Beispiel wurde die Wirkung der nachfolgenden Gifte untersucht:

Toxine aus:	Fraktionen des Gesamtgiftcocktails	Molekulargewicht in kDa
<i>Scolopendra morsitans</i> C.S.A.	2	130
<i>Hemiscolopendra</i> sp ex Peru	2	140
<i>Bitis arietans</i>	4	125
<i>Bitis gabonica</i>	4	210
<i>Loxosceles laeta</i>	3	160
<i>Loxosceles spiniceps</i>	3	175
<i>Pholcus phalangioides</i>	X	115
<i>Parabuthus transvallicus</i>	17	305

X: viele eng beieinander liegende Banden auf dem Gel, und somit nicht eindeutig bestimmbar, ob Fraktion 5 oder 6.

[0115] Die beste und schnellste Tumorerstörung schon nach einmaliger Gabe von beladenen dendritischen Zellen an den Tumorrand wurde mit Giften von Skolopendern, *Bitis arietans* und *Loxosceles spiniceps* erreicht. Hierbei erfolgte eine vollständige Tumorerstörung schon nach 6 Stunden bei einmaliger Zugabe, wobei die lysierten Zellbereiche mit gesunden Zellen zuwuchsen.

[0116] Wenn nicht alle Tumorzellen zerstört sind, gibt man alle zwei Tage eine neue Gabe an beladenen dendritischen Zellen hinzu.

[0117] Als Lösungsmittel zu den obigen Wirkstoffen wird bevorzugt das oben beschriebene Lösungsmittel verwendet.

Patentansprüche

1. Pharmazeutischer Wirkstoff zur Behandlung von Tumoren, enthaltend in einer pharmazeutisch wirksamen Menge:

- a) dendritische Zellen, wobei diese beladen sind mit
- b) Toxinen und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkenden Stoffen aus dem Giftcocktail von Skolopendern der Gattung Scolopendra, und
- c) wobei als Lösungsmittel in 15 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung 7 ml der homöopathischen Substanz Tarantula D4 verwendet werden, und
- d) wobei zu diesem Bestandteil bis zu 0,5 ml einer gesättigten Lösung des gesamten Giftcocktails von Spinnen der Art *Loxosceles laeta* zugegeben werden, und
- e) wobei je nach erforderlichen Mengenverhältnissen der Gesamtgiftcocktail in wasserfreier Ameisensäure angerieben wird, der wiederum 1 bis 2 ml des Gesamtextrakts von Giften der Ameisen *Bulldog-ants* zugemengt werden, wobei sich diese Menge auf eine Menge des Gesamtgiftcocktails von 10 ml bezieht.

2. Pharmazeutischer Wirkstoff zur Behandlung von Tumoren, enthaltend in einer pharmazeutisch wirksamen Menge:

- a) dendritische Zellen, wobei diese beladen sind mit
- b) Toxinen und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkenden Stoffen aus dem Giftcocktail von Skolopendern der Gattung Scolopendra, und
- c) wobei als Lösungsmittel in 15 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung 7 ml der homöopathischen Substanz Tarantula D4 verwendet werden, und
- d) wobei zu diesem Bestandteil bis zu 0,5 ml einer gesättigten Lösung des gesamten Giftcocktails von Spinnen der Art *Loxosceles gaucho* zugegeben werden, und
- e) wobei je nach erforderlichen Mengenverhältnissen der Gesamtgiftcocktail in wasserfreier Ameisensäure angerieben wird, der wiederum 1 bis 2 ml des Gesamtextrakts von Giften der Ameisen *Bulldog-ants* zugemengt werden, wobei sich diese Menge auf eine Menge des Gesamtgiftcocktails von 10 ml bezieht.

3. Pharmazeutischer Wirkstoff zur Behandlung von Tumoren, enthaltend in einer pharmazeutisch wirksamen Menge:

- a) dendritische Zellen, wobei diese beladen sind mit
- b) Toxinen und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkenden Stoffen aus dem Giftcocktail von Skolopendern der Gattung Scolopendra, und
- c) wobei als Lösungsmittel in 15 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung 7 ml der homöopathischen Substanz Tarantula D4 verwendet werden, und
- d) wobei zu diesem Bestandteil bis zu 0,5 ml einer gesättigten Lösung des gesamten Giftcocktails von Spinnen der Art *Loxosceles Mallorca* zugegeben werden, und
- e) wobei je nach erforderlichen Mengenverhältnissen der Gesamtgiftcocktail in wasserfreier Ameisensäure angerieben wird, der wiederum 1 bis 2 ml des Gesamtextrakts von Giften der Ameisen *Bulldog-ants* zugemengt werden, wobei sich diese Menge auf eine Menge des Gesamtgiftcocktails von 10 ml bezieht.

4. Pharmazeutischer Wirkstoff zur Behandlung von Tumoren, enthaltend in einer pharmazeutisch wirksamen Menge:

- a) dendritische Zellen, wobei diese beladen sind mit
- b) Toxinen und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkenden Stoffen aus dem Giftcocktail von Skolopendern der Gattung Scolopendra, und
- c) wobei als Lösungsmittel in 15 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung 7 ml der homöopathischen Substanz Tarantula D4 verwendet werden, und
- d) wobei zu diesem Bestandteil bis zu 0,5 ml einer gesättigten Lösung des gesamten Giftcocktails von Spinnen der Art *Loxosceles Menorca* zugegeben werden, und
- e) wobei je nach erforderlichen Mengenverhältnissen der Gesamtgiftcocktail in wasserfreier Ameisensäure angerieben wird, der wiederum 1 bis 2 ml des Gesamtextrakts von Giften der Ameisen *Bulldog-ants* zugemengt werden, wobei sich diese Menge auf eine Menge des Gesamtgiftcocktails von 10 ml bezieht.

5. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Skolopendern der Gattung *Hemiscolopendra* verwendet werden.
6. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Schlangen der Gattung *Bitis* verwendet werden.
7. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Schlangen der Gattung *Naja* verwendet werden.
8. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Spinnen der Gattung *Loxosceles* verwendet werden.
9. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Spinnen der Gattung *Sicarius* verwendet werden.
10. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Spinnen der Gattung *Pholcus* verwendet werden.
11. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus dem Giftcocktail von Skorpionen der Gattung *Parabuthus* verwendet werden.
12. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass, anstelle des Merkmals b), die Toxine und/oder wahlweise hierzu synergistisch und/oder antagonistisch wirkende Stoffe aus einer Kombination der Giftcocktails einer oder mehrerer der Tiergattungen *Scolopendra*, *Hemiscolopendra*, *Bitis*, *Naja*, *Loxosceles*, *Sicarius*, *Pholcus* oder *Parabuthus* stammen.
13. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Skolopenderarten *Scolopendra morsitans* oder *Scolopendra gigantea*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.
14. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Hemiskolopenderart *Hemiscolopendra* sp.
15. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Schlangenarten *Bitis arietans* (Puffotter), *Bitis gabonica* (Gabunotter), *Bitis nasicornis* (Nashornviper), *Bitis atropos*, *Bitis caudalis*, oder *Bitis peringueyi*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.
16. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Speikobraarten *Naja melanoleuca*, *Naja pallida*, *Naja naja sputatrix*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.
17. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der araneomorphen Einsiedlerspinnenarten *Loxosceles laeta*, *Loxosceles spiniceps*, *Loxosceles bergeri*, *Loxosceles parami*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles reclusa* oder *Loxosceles deserta*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.
18. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Sechsaugenkrabbenspinnenarten *Sicarius hahni*, *Sicarius albospinosus*, *Sicarius testaceus* oder *Sicarius argentinensis*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.
19. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Zitterspinnenarten *Pholcus phalangioides*, *Pholcus opilionides*, *Pholcus* spp.

(RSA), oder *Pholcus* spp. (Kuba), sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.

20. Pharmazeutischer Wirkstoff nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen ausgewählt werden aus Toxinen der Dickschwanzskorpionarten *Parabuthus Transvallicus*, *Parabuthus granulatus* oder *Parabuthus villosus*, sowie aus Kombinationen von mehreren dieser Toxine.

21. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dendritischen Zellen menschlichen Ursprungs sind.

22. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Toxine durch Fraktionierung des Giftcocktails der genannten Tierarten gewonnen wurden.

23. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die durch Fraktionierung des Giftcocktails gewonnen Toxine zusammen mit weiteren, in den einzelnen Fraktionen vorliegenden Substanzen eingesetzt werden, ohne dass eine weitere Aufreinigung erfolgt.

24. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Toxine in Reinform eingesetzt werden.

25. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Toxine in rekombinanter Form vorliegen.

26. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Toxine Peptidtoxine sind.

27. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidtoxine ein Molekulargewicht von ca. 50–350 kDa haben.

28. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidtoxine nekrotische, cytotoxische und/oder apoptotische Eigenschaften haben.

29. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dendritischen Zellen mit den Toxinen durch Lipofektion und/oder Laser-Mikroinjektion beladen werden.

30. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Toxine eine Amidogruppe, jedoch keine Proteinstruktur aufweisen und ein Molekulargewicht von 30–55 kDa aufweisen.

31. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dendritischen Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge mit den Toxinen beladen sind, wobei die dendritischen Zellen zur Beladung mit einem Medium in Kontakt gebracht werden, in dem die Toxinkonzentration im Bereich von 0,5–250 µg/ml, bevorzugt 80–250 µg/ml, noch bevorzugter ungefähr 170 µg/ml, liegt.

32. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass synthetisch oder rekombinant hergestellte Peptidtoxine eingesetzt werden.

33. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Derivate der Peptidtoxine eingesetzt werden, bei denen ein oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt, deletiert und/oder ausgetauscht wurden, wobei die toxischen Eigenschaften des Toxins im wesentlichen beibehalten bleiben.

34. Pharmazeutischer Wirkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dendritischen Zellen weiterhin mit Interferonen, Cytokinen, Cytokin-Rezeptoren, Anaphylatoxinen, Glycosiden und/oder Antikörpern beladen sind.

35. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Wirkstoffes zur Beladung dendritischer Zellen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die dendritischen Zellen mit einem oder mehreren Toxinen, wie sie in den Ansprüchen 1–34 definiert wurden, in Kontakt gebracht werden, um die Zellen mit den Toxinen zu assoziieren.

36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass zur Beladung die dendritischen Zellen mit den toxischen Substanzen inkubiert werden.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, dass die toxischen Substanzen in die dendritischen Zellen aufgenommen werden oder sich mit den dendritischen Zellen assoziieren.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Beladung durch Lipofektion und/oder Laser-Mikroinjektion der toxischen Substanzen erfolgt.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutische Wirkstoff zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere von Tumoren der Haut und der Schleimhaut geeignet ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen