



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 655 246 A5**

⑤① Int. Cl.⁴: A 61 K 49/00
C 12 N 11/02
C 12 Q 1/00
G 01 N 33/53

// (A 61 K 49/00, 35:66, 37:24)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	9166/80	㉗ Inhaber:	Human Oltoanyag Termelő és Kutató Intézet, Budapest X (HU)
㉒ Anmeldungsdatum:	12.12.1980		
㉓ Priorität(en):	27.12.1979 HU HU 299 27.11.1980 HU HU 299	㉘ Erfinder:	Riedl, Zoltan, Dr., Budapest (HU) Sztankov, Laszlo, Dr., Szentendre (HU) Horvath, Istvan, Dr., Budapest (HU)
㉔ Patent erteilt:	15.04.1986		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	15.04.1986	㉙ Vertreter:	Rottmann Patentanwälte AG, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus lipoidlöslichen Stoffen.**

⑤⑦ Partikel aus lipoidlöslichen Stoffen werden hergestellt, indem man eine Lösung dieses Stoffes in einem geeigneten Lösungsmittel - enthaltend einen oberflächenaktiven Stoff - mit Wasser oder einer wässrigen Elektrolytlösung vermischt. Der pH-Wert beträgt 2 bis 10 und das Volumen-Verhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase 0,1 bis 900 : 100. An die erhaltenen Partikel können biologisch aktive Stoffe gebunden werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus lipoidlöslichen Stoffen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des lipoidlöslichen kornbildenden Stoffes in einem geeigneten Lösungsmittel, welches zusätzlich auch einen oberflächenaktiven Stoff enthält, mit Wasser oder mit einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 in einem Volumenverhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase von 0,1 bis 900 : 100 vermischt und die ausgefallenen Partikel abtrennt.

2. Partikel aus lipoidlöslichen Stoffen, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1.

3. Komposition bestehend aus Partikeln aus lipoidlöslichen Stoffen nach Anspruch 2 und an diesen Partikeln gebundenen biologisch aktiven Stoffen.

4. Komposition nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die biologisch aktiven Stoffe Treponema-, Difteria- und Tetanus-Bakterien, Hepatitis- und Myxomatosis-Viren oder deren Zellfraktionen oder Stoffwechselprodukte, menschliches Choriogonadotropin-Hormon, Hystamin- und gamma-Globulin-Eiweiss sind.

5. Verfahren zur Herstellung von Kompositionen nach Anspruch 3, bestehend aus Partikeln lipoidlöslicher Stoffe nach Anspruch 2 und an letztere gebundenen biologisch aktiven Stoffen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des lipoidlöslichen kornbildenden Stoffes in einem geeigneten Lösungsmittel, welches zusätzlich auch einen oberflächenaktiven Stoff enthält,

a) und den in Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff in ein mit einem Rührer ausgerüstetes Gefäss einbringt, worin das Volumenverhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase 0,1 bis 900 : 100 beträgt, das Lösungsmittel ein Alkohol ist und das erhaltene Reaktionsgemisch mindestens eine Minute lang vermischt, danach höchstens sieben Tage lang stehen lässt und die ausgefallenen Partikel trennt, oder

b) mit Wasser oder mit einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 in einem Volumenverhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase von 0,1 bis 900 : 100 vermischt, die ausgefallenen Partikel abtrennt und sie dem im Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff zugibt und suspendiert.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die abgetrennten Partikel der Lipoidlöslichen Stoffe in Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 suspendiert und danach lyophilisiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man das erhaltene Produkt lyophilisiert und gewünschtenfalls strahlensterilisiert.

8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Eilecithin oder Cholesterin als lipoidlöslichen kornbildenden Stoff verwendet.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Partikel zentrifugiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus lipoidlöslichen Stoffen, Kompositionen, die diese Partikel und zu denen gebundene biologisch aktive Stoffe enthalten, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Bei in vitro Untersuchungen wird zur Bindung biologisch aktiver Stoffe z. B. ein Latex, eine spezifisch polymerisierte, geeignete Korngrösse aufweisende Polystyrolsuspension in breitem Umfang verwendet (Am. J. Med. 21, 888-892

[1956]). Die Latexsuspension wird aus Styrol hergestellt. Es ist bekannt, dass die Styrolmoleküle zur Autopolymerisation sehr leicht bereit sind. Dementsprechend wird das handelsübliche Styrol vor der Herstellung des Latexes zur Gewinnung des Styrolmonomers destilliert und das so erhaltene Monomer polymerisiert. Wegen der chemischen Struktur des Styrolmoleküls ist auch die hergestellte Latexsuspension zur Autopolymerisation bereit. So altern die Körner auch während der Lagerung der Suspension und darüber hinaus wird das Reagens zur Durchführung von Niederschlagsreaktionen ungeeignet sein (J. A. M. A. 168 [2], 180-181, [1958]).

Die Herstellung der Reagenzien auf der Basis vom Latex-Trägersystem erfolgt mindestens in zwei Schritten. In dem ersten Schritt wird das Trägersystem selbst hergestellt danach die biologisch aktiven Stoffe an diesem Trägersystem gebunden. Die Herstellung dieser Reagenzien nimmt viele Zeit in Anspruch und ist nur zur Durchführung der in vitro Untersuchungen geeignet, da das Styrol bezüglich des Organismus stark schädlich ist.

Als in vivo Adjuvanten werden die Freund-Adjuvant in breitem Umfang verwendet (Molecular Biology 13, Biochemistry and Biophysics, 1973 New York). Diese Adjuvanten können wegen der Nebenwirkungen, welche deren Anwendung in der Humantherapie unmöglich machen, auch unter Prüfbedingungen nur beschränkt angewandt werden. Die vorgeschlagenen Partikeln können vorteilhafter verwendet werden, als die in der Humantherapie angewandten metallhaltigen Adjuvanten (Molecular Biology 13, Biochemistry and Biophysics, 1973 New York) und die Immunstimulanten vom Typ Saponin, welche das Blutbild verändern (Acta vet. scand. 19, 7-40 [1978]).

Zur Zeit sind Versuche im Gange, bei parenteraler Verwendung Liposom zur Bindung von biologisch aktiven Stoffen zu benutzen (Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 88-92 [1975]). Das Liposom ist eine aus Cholesterin und einem nicht artfremden oberflächenaktiven Stoff gebildete Partikel. Diese Partikeln werden aus den Chloroformlösungen der erwähnten Stoffe hergestellt; die Ausbildung der Ladungsverhältnisse erfolgt durch Zugabe von Phosphatidylcholin. Die Chloroformphase wird zur Trockne gebracht, so bildet sich eine Lipidschicht an der Wand des Gefässes. Als zweite Schritt wird die wässrige Lösung des biologisch aktiven Stoffes diesem Film zugegeben (Britische Patentschrift Nr. 28 131/74). Die Herstellung dieses Systems ist nicht kontinuierlich, in einem Vorgang wird nur wenig Material gewonnen. Die Korngrösse der so hergestellten Partikel variiert sich in breitem Bereich.

Ziel der Erfindung ist die Beseitigung der Nachteile des in vitro angewandten Latexes, sowie die der in vivo verwendeten Adjuvanten (Freund-Adjuvant, Adjuvant vom Typ Saponin, metallhaltige Adjuvanten und Liposom) durch Vorschlagen eines Trägersystems, welches in beidem Gebiet verwendbar ist, nicht zur Autopolymerisation neigt, bezüglich des Organismus nicht artfremd ist, und in den verschiedenen Gebieten der Immunologie und der Biologie sowohl in der Humantherapie als auch in der Veterinärmedizin verwendet werden kann.

Bezüglich dieses Trägersystems ist es erforderlich, dass biologisch aktive Stoffe und Moleküle zu dessen Oberfläche gebunden werden können.

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist, dass die Bildung der Partikel und die Bindung der biologisch aktiven Stoffe auch in einem Schritt durchgeführt werden können und eine kontinuierliche Herstellung vorgenommen werden kann. Dem-

gemäss können grössere Mengen des gewünschten Stoffes erhalten werden und dies macht das Verfahren wirtschaftlicher als die oben erwähnten bekannten Verfahren.

Es wurde gefunden, dass die Ausbildung der Körner des Trägersystems und die Bindung der biologisch aktiven Stoffe an den so erhaltenen Partikeln auch in einem Schritt durchgeführt werden kann. Dies erfolgt auf folgender Weise. Man löst z. B. Cholesterin und einen nicht artfremden oberflächenaktiven Stoff, z. B. Eilecithin in abs. Alkohol. Der biologisch aktive Stoff, d. h. Trepomena-, Difteria- und Tetanus-Bakterien, Hepatitis- und Myxomatosis-Viren oder deren Fraktionen oder Stoffwechselprodukte, menschliches Chorio Gonadotropin Hormon, Hystamin- und gamma-Globulin-Eiweiss oder Aminoglykosid-Antibiotikum, wird in einer wässrigen Elektrolytlösung vorgelegt. Danach werden die alkoholische Phase und die wässrige Phase vereinigt. So erfolgt die Bildung des Partikelsystems und die Bindung des biologisch aktiven Stoffes in einem Schritt.

Das vorgeschlagene Verfahren kann auch in zwei Schritten durchgeführt werden. In diesem Falle wird der kornbildende Stoff in der Alkoholphase gelöst und diese mit der wässrigen Elektrolytphase vermischt. So erhält man die «leeren» Partikel, an welchen später biologisch aktive Stoffe gebunden werden können.

Die auf beide Weisen erhaltenen Suspensionen können zentrifugiert, dekantiert und der erhaltene Niederschlag im Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung suspendiert und mit Ultraschall behandelt werden.

Die Lagerung erfolgt entweder durch Lyophilisierung oder Kühlung. Der lyophilisierte Stoff wird zusätzlich strahlensterilisiert.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Partikeln aus lipidlöslichen Stoffen sowie von Kompositionen, die diese Partikel und an denen gebundene biologisch aktive Stoffe enthalten. Die Herstellung der Partikel sowie die der Kompositionen sind neu. Die Verwendung der Kompositionen ist auch neu.

Die erfindungsgemässen Partikel und die Kompositionen werden hergestellt, wie dies in den Ansprüchen 1 und 5 definiert ist. Bei der Herstellung wird zweckmässigerweise so vorgegangen, indem man eine Lösung des lipidlöslichen, kornbildenden Stoffes in einem geeigneten Lösungsmittel, zweckmässigerweise in Alkohol welches zusätzlich auch einen oberflächenaktiven Stoff enthält

a) und den in Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff in ein mit einem Rührer ausgerüstetes Gefäss hineinbringt, worin das Volumenverhältnis der alkoholischen und der wässrigen Phase 0,1–900 : 100 beträgt, und das erhaltene Reaktionsgemisch mindestens eine Minute lang vermischt, danach höchstens 7 Tage lang stehen lässt und die ausgefallenen Partikel trennt, oder

b) mit Wasser oder mit einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 in einem Volumenverhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase von 0,1–900 : 100 vermischt, die ausgefallenen Partikel trennt und gegebenenfalls im Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 suspendiert und danach lyophilisiert, oder

c) mit Wasser oder mit einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 in einem Volumenverhältnis der Lösungsmittelphase zur wässrigen Phase von 0,1–900 : 100 vermischt, die ausgefallenen Partikel trennt, die so erhaltenen Partikel dem im Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff zugibt, das erhaltene Reaktionsgemisch mindestens eine Minute lang vermischt, da-

nach höchstens 7 Tage lang stehen lässt und die gebildeten Partikel trennt, oder

d) die Partikel nach der Verfahrensvariante b) dem im Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff zugibt und suspendiert und

das erhaltene Produkt nach den Verfahrensvarianten a) und c) gegebenenfalls lyophilisiert und gewünschtenfalls strahlensterilisiert.

10 Durch das vorgeschlagene Verfahren kann ein seit langem bestehender Wunsch erfüllt werden, da das Verfahren kontinuierlich durchgeführt werden kann und so die Gewinnung der Suspension in grossen Mengen ermöglichen.

Die Vorteile der Erfindung sind wie folgt:

15 1. In dem vorgeschlagenen Verfahren erfolgt die Bildung der Partikel und die Bindung der biologisch aktiven Stoffe in einem Schritt.

2. Das Verfahren ist kontinuierlich, so können Partikel aus lipidlöslichen Stoffen in grossen Mengen hergestellt werden.

3. Die Partikel des Trägersystems sind bezüglich des Organismus nicht artfremd.

4. Den Punkten 1 und 2 gemäss ist das Verfahren wirtschaftlich.

25 5. Durch das Verfahren können neue Systeme in grossen Mengen hergestellt werden, welche als Reagenzien zur Durchführung von schnellimmundiagnostischen Untersuchungen in vitro geeignet sind, z. B.

a) Diagnostikum zur schnellen quantitativen Bestimmung von Rheumatoid arthritis,

30 b) Reagenzien zu weiteren schnellimmundiagnostischen Bestimmungen.

6. Die schnellimmundiagnostischen Reaktionen können mit den immundiagnostischen Reagenzien gemäss Punkt 5 als Typfelreaktionen durchgeführt und das Ergebnis in einigen Minuten erhalten werden.

7. Da die Partikel des Trägersystems keine artfremden Stoffe bezüglich des Organismus enthalten, sind sie zur Einführung von biologisch aktiven Stoffen in den Organismus geeignet, weiterhin

40 a) auf dem Gebiet der mit Viren durchgeführten aktiven Immunisierung können sie die Antigenität der lebendigen oder getöteten und freigelegten Viren erhöhen,

45 b) auf dem Gebiet der mit Bakterien durchgeführten aktiven Immunisierung sind sie zur Stimulierung der mit getöteten und freigelegten Bakterien, mit den Zellfraktionen und Stoffwechselprodukten von Bakterien und mit deren Derivaten durchgeführten Immunisierung geeignet,

50 c) sie sind weiterhin zur Steigerung der mit Pilzenfraktionen durchgeführten Immunisierung geeignet.

8. An den Partikeln können auch solche biologisch aktiven Stoffe gebunden werden, welche in sich keine oder nur geringe Immunantwort im Organismus induzieren, doch durch diese Bindung geben sie eine grössere Immunantwort. So kann durch die Verwendung der vorgeschlagenen Partikel eine Adjuvantenwirkung (z. B. bei Haptenen, Hormonen, Enzymen und Hystamin) erreicht werden. Eine parenterale Impfung mit diesen Partikeln hat den Vorteil, dass in diesem Falle keine Veränderungen weder an die Stelle der Impfung noch in anderen Stellen des Organismus erfolgen. Der Stoff saugt sich in vollem Masse auf und weist keine schädigende Nebenwirkung auf.

9. In der vorgeschlagenen Weise können auch solche biologisch aktiven Stoffe gebunden werden, welche sich wegen ihren kleinen Molekülen aus dem Organismus relativ schnell eliminieren, doch kann man voraussetzen, dass ihre Elimination durch ihre Bindung an das Partikelsystem langsamer

werden wird und so eine «verzogene Arzneiwirkung» erreicht werden kann.

Im nachfolgenden wird die Durchführung des vorgeschlagenen Verfahrens ausführlich beschrieben werden. Im Verfahren werden eine organische Lösungsmittelphase, zweckmässigerweise eine Alkoholphase, und die wässrige Phase in einem Volumenverhältnis der beiden Phasen von 0,1–900 : 100 vermischt. So erreicht man die optimale Korngrösse, sowie die ideale Adsorptionsfähigkeit der Partikel gegenüber biologisch aktiven Stoffen.

Verfahrensvariante a)

Das Verfahren wird in der Vorrichtung gemäss der Figur 1 durchgeführt. In den Behälter 1 wird die Lösung von Lecithin und Cholesterin in abs. Alkohol, in den Behälter 2 der in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegte biologisch aktive Stoff eingefüllt. Nachdem der Rührer in Bewegung gesetzt wurde, lässt man die Gehalte der Behälter 1 und 2 in den Rührbehälter 4 fliessen, tropfen oder streuen. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wird eine Minute lang mit einer Geschwindigkeit von 50 rpm gerührt, danach aus dem Rührbehälter 4 durch das Überlaufrohr 5 in den Sammelbehälter 6 fliessen gelassen. Hier wird das Reaktionsgemisch so lange gerührt, bis die gewünschte Menge an den Partikeln erhalten wird. Das so erhaltene Produkt wird 5 bis 10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, 30 Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 6000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Niederschlag dekantiert. Falls das Produkt unmittelbar verwendet wird, wird es in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, völlig homogenisiert, danach mit Ultraschall behandelt. Falls das erhaltene Produkt erst später angewandt wird, wird der Niederschlag in destilliertem Wasser aufgenommen, völlig homogenisiert, dosiert und lyophilisiert, danach strahlensterilisiert.

Verfahrensvariante b)

Das Verfahren wird in der Vorrichtung gemäss der Figur 1 durchgeführt. In den Behälter 1 wird die Lösung von Lecithin und Cholesterin in abs. Alkohol, in den Behälter 2 eine wässrige Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 eingefüllt. Nachdem der Rührer in Bewegung gesetzt wurde, lässt man die Gehalte der Behälter 1 und 2 in den Rührbehälter 4 fliessen, tropfen oder streuen. Nach Vermischen gelangt das erhaltene Suspensionsgemisch aus dem Rührbehälter 4 durch das Überlaufrohr 5 in den Sammelbehälter 6. Hier wird das Reaktionsgemisch so lange gerührt, bis die gewünschte Menge der Partikelsuspension erhalten wird.

Die erhaltene Suspension wird 30 Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 6000 rpm (4000–6000 g) zentrifugiert, danach dekantiert. Der erhaltene Niederschlag wird in destilliertem Wasser aufgenommen, völlig homogenisiert, danach mit Ultraschall behandelt. Nach Dosierung wird das Produkt strahlensterilisiert. Die so hergestellte leere Partikel enthält in lyophilisierter Form in der Einheitsmenge (Partikeleinheit) 11,2 mg Trockensubstanz und dies entspricht einer Partikelnummer von $1,5\text{--}2,5 \times 10^8$.

Verfahrensvariante c)

Das Verfahren wird in der Vorrichtung gemäss der Figur 1 durchgeführt. In den Behälter 1 wird die Lösung von Lecithin und Cholesterin in abs. Alkohol, in den Behälter 2 eine wässrige Elektrolytlösung mit einer pH-Wert von 2 bis 10 eingefüllt. Nachdem der Rührer in Bewegung gesetzt wurde, lässt man die Gehalte der Behälter 1 und 2 in den Rührbehälter 4 fliessen, tropfen oder streuen. Nach Vermischen gelangt das erhaltene Suspensionsgemisch aus dem Rührbehälter 4 durch das Überlaufrohr 5 in den Sammelbehälter 6.

4

Hier wird das Reaktionsgemisch so lange gerührt, bis die gewünschte Menge der Partikelsuspension erhalten wird. Das Suspensionsgemisch wird 30 Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 6000 rpm zentrifugiert, danach dekantiert. Im Falle unmittelbarer Verwendung nimmt man den biologisch aktiven Stoff in physiologischer Kochsalzlösung auf, in dieser Lösung suspendiert man den erhaltenen Niederschlag. Die Suspension wird homogenisiert und mit Ultraschall behandelt. Falls die Verwendung erst später erfolgt, gibt man den in destilliertem Wasser oder in einer wässrigen Elektrolytlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10 vorgelegten biologisch aktiven Stoff dem Niederschlag zu. Das erhaltene Reaktionsgemisch wird völlig homogenisiert mit Ultraschall behandelt, 5 bis 10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, dosiert und lyophilisiert. Das lyophilisierte Produkt wird dann strahlensterilisiert.

Verfahrensvariante d)

Die nach der Verfahrensvariante b) hergestellten Partikeln können bei biologisch aktiven Stoffen als Adjuvant angewandt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Produktion von Hepatitis-Antikörper

Lebendige und getötete Hepatitis-Viren werden zu Partikeln gebunden, indem man einer lyophilisierten Partikeleinheit [hergestellt nach der Verfahrensvariante b)] 10^9 Viruspartikeln zugibt. Durch die Verwendung des so erhaltenen Immunisierungstoffes erreicht man höheren Antikörpertiter, als die der Literatur.

Protektive Wirkung durch inaktivierte Myxomatosis-Virus Vakzinen

In der Veterinärmedizin war zur Immunisierung gegen diesem Virus nur der Impfstoff, welcher mit lebendigem Virus hergestellt wurde, protektiv. Hasen werden mit inaktivierter Myxomatosis-Vakzine geimpft, worin die Nummer der Viruspartikeln der Infektion 10^8 /ml beträgt. Die Hasen werden mit 1 ml der Vakzine, welche zu 1 Partikeleinheit [Verfahrensvariante b)] gebunden ist, subcutan geimpft. Der Kontrollinfektion gemäss, welche an dem 30-sten Tage nach der Impfung erfolgte, gibt die so hergestellte und verwendete Vakzine auch gegen die lebendigen Viren der Kontrollinfektion von 100 Infektionsdosen einen völligen Schutz.

Falls die Partikeleinheit nach der Verfahrensvariante a) hergestellt wird, so schützt der erreichbare Antikörpertiter bei gleicher Immunisierung gegen 10 Infektionsdosen.

Immunität gegen Treponematosen

Aus den freigelegten Zellen des Stammes *Treponema pallidum* Budapest (10^7 /ml) wird Antigen durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Das so erhaltene Antigen wird zu den lyophilisierten Partikeln gebunden, worin 2 lyophilisierte Partikeleinheiten pro 1 ml Antigen angewandt werden. Die Tiere werden in jede Woche insgesamt sechsmal geimpft, worin der Gehalt des Antigens 1 ml beträgt und die Impfungen werden intramusculär, intravenös und subcutan durchgeführt. In den Tieren konnte ein hoher spezifischer Antikörpertiter und Chamker-Immunität erreicht werden.

Immunisierung gegen Tetanus

a) Zu einer Partikeleinheit [Verfahrensvariante b)] wird die Einheitsmenge des Tetanus-Toxoids gebunden und das erhaltene Material lyophilisiert. Vor der Verwendung wird das Material in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, worin die Menge der physiologischen Kochsalzlösung dem Volumen der Suspension vor der Lyophilisierung ent-

spricht. Die Wirksamkeit wurde an Meerschweinchen nach den amerikanischen, britischen und ungarischen Arzneibüchern (United States Pharmacopeae, British Pharmacopeae, Pharmacopea Hungaricae) untersucht. Aufgrund der Untersuchungen ist die spezifische Immunogenität des Stoffes gegen Tetanus grösser, als die in den Vorschriften angegebenen Werte des Immuneffektes. Die Untersuchungen wurden auch mit den Impfstoffen, welche nach den Verfahrensvarianten a) und c) hergestellt wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse sind mit den oben angegebenen gleich.

b) Zu einer Partikeleinheit [Verfahrensvariante b)] werden verschiedene Mengen des Tetanus-Toxoids gebunden und das erhaltene Material lyophilisiert. Nach Lyophilisierung wird das Material in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (resuspendiert), worin die Menge der physiologischen Kochsalzlösung dem Volumen der Suspension vor der Lyophilisierung entspricht. Die Wirksamkeit wurde an Meerschweinchen nach den im Beispiel 3 erwähnten Arzneibüchern untersucht. Die spezifische Antigenität übersteigt den in den Vorschriften angegebenen Wert und die Antigenität entspricht dem Dosisantwortgesetz.

c) Zu verschiedenen Mengen der Partikeln [Verfahrensvariante b)] werden gleiche Mengen an Tetanus-Toxoid gebunden. Nach Lyophilisierung wird das Material in physiologischer Kochsalzlösung auf das Volumen, welches dem Volumen der Suspension vor der Lyophilisierung entspricht, resuspendiert. Die Untersuchungen wurden an Meerschweinchen gemäss den im Beispiel 3 erwähnten Arzneibüchern durchgeführt. Die Immunantwort übersteigt in jeden Fällen die in den erwähnten Arzneibüchern angegebenen Antigenitätswerte.

Immunisierung mit kombinierten bakteriellen Antigenen

Zu einer Partikeleinheit [Verfahrensvariante b)] werden Diphtherie- und bakterielle Antigene kombiniert gebunden. Nach Lyophilisierung wird das Material in physiologischer Kochsalzlösung auf das Volumen, welches dem Volumen der Suspension vor der Lyophilisierung entspricht, resuspendiert. Danach werden die Wirksamkeiten der Antigene nach den im Beispiel 3 erwähnten Arzneibüchern an Meerschweinchen und an weissen Mäusen bestimmt. Das Mass der Antigenität übersteigt die in den Arzneibüchern angegebenen Werte.

Beispiel 2

Herstellung von Anti-HCG Immunserum

Zur Herstellung von Antihormonen werden Prüfungen mit Human-Choriogonadotropin (HCG) durchgeführt. Zur Zeit wird die allbekannte schlechte immunogene Adjuvierung mit dem öligen Freund-Adjuvant durchgeführt.

Erfindungsgemäss wird 3000 Ae/mg HCG zu einem Partikeleinheit [Verfahrensvariante b)] gebunden. Mit dem so erhaltenen Impfstoff werden NZW-Hasen mit 2,5 kg Körpergewicht in jeden zwei Wochen subcutan geimpft. Der Antikörpertiter wird nach der 7-ten Impfung bestimmt und ist in jedem Falle grösser, als die der Kontrollgruppe.

Die Impfung der Kontrollgruppe wird auch mit der gleichen Menge von HCG, welches mit Freund-Adjuvant stimuliert wurde, durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe, welche mit dem Freund-Adjuvant geimpft wurde, treten ungewünschte Nebenwirkungen auf, doch findet man keine Nebenwirkungen bei der Gruppe, welche mit den erfindungsgemässen Partikeln geimpft wurde. Nach der oben beschriebenen langen Immunisierungsperiode werden die Hasen verblutet und sezert lassen. Nach der mikroskopischen und histologischen Prüfung treten bei der Niere, der Leber und der Lunge keine pathologischen Änderungen auf.

Beispiel 3

Herstellung von Antihistamin Serum

2,7 mg von detoxiziertem Hystamin (p-Amino-benzo-azo-hystamin) wird zur 2 Partikeleinheit des lyophilisierten Trägers (Verfahrensvariante b)) gebunden und mit diesem Stoff werden Hasen an jeden zweiten Tag immunisiert. Nach der 20-ten Impfung beobachtet man einen hohen Antikörpertiter des Antihistamins.

Beispiel 4

Herstellung von an den Partikeln aus lipoidlöslichen Stoffen gebundenen gamma-Globulin Reagens
2,5 ml 0,25%-ige gamma-Globulin Lösung in einem Puffer mit einem pH-Wert von 6 und die abs. alkoholische Lösung der lipoidlöslichen Stoffe, welche 0,01–0,6% Eilecithin und 0,1–2% Cholesterin enthält werden nach der Verfahrensvariante a) vermischt. Der erhaltene Niederschlag wird in 5 ml – bei der Verdünnung des Blutserums üblicher – physiologischer Elektrolytlösung vorgelegt, in einem Turmix, danach mit Ultraschall behandelt.

Beispiel 5

Verwendung des erfindungsgemäss hergestellten gamma-Globulin Reagens zur quantitativen Bestimmung von Rheumatoid Arthritis

In Rheumatoid Arthritis sind Immunkomplexe anwesend, welche mit den normalen menschlichen Immunoglobulinen in Reaktion treten. Ihre Nachweisung und die Erkennung der Krankheit begründen sich auf dieser Tatsache. Sie können durch verschiedene Reaktionen, z. B. durch Verwendung von Latexpartikeln oder durch die empfindliche WAA-
LER-ROSE Reaktion sichtbar gemacht werden.

Das Latexträgersystem wurde früher beschrieben.

Die WAA-
LER-ROSE Reaktion ist eine passive Hemagglutinationsmethode, ihre Durchführung beansprucht viele Zeit.

Die Blutseren der zu untersuchenden Menschen werden 30 Minuten lang bei 56 °C wärmebehandelt und bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert. Man arbeitet möglicherweise mit frischen Blutseren, welche höchstens eine Woche «alt» sind.

Auf eine bei der Agglutination der Bakterien übliche Glasplatte wird je ein Tropfen (0,5 ml) des zu untersuchenden Blutserums in physiologischer Kochsalzlösung in verschiedenen Konzentrationen aufgebracht. Zu diesen verdünnten Blutseren werden je 0,01 ml des erfindungsgemäss hergestellten gamma-Globulin Reagens zugegeben.

Nachdem das Reagens dem Blutserum zugegeben wurde, wird der Ablauf der Reaktion, die Agglutination gemessen. Die Reagenzien werden so bald wie möglich den verdünnten Blutserumtropfen zugegeben. Unter der Bewegung der Platte vermischt man die zwei Substanzen mit einem Glasstock. Die Auswertung der Reaktion erfolgt unter Verwendung einer Lupe durch Beobachtung mit Augen. Die Stärke der Agglutination wird von 0 bis + + + + geteilt. 0 bedeutet, dass die Agglutination während 5 Minuten nicht vorkommt. Die positive Reaktion wird mit den Kreuzen bezeichnet und ist je stärker, desto grösser die Nummer der Kreuzen ist. Die Bezeichnung + + + + bedeutet, dass starke Aggregate entstehen und unter den Niederschlagsteilchen die Flüssigkeit sauber ist. Zur Kontrolle dient ein Tropfen der zur Verdünnung des Blutserums angewandten physiologischen Kochsalzlösung, welchem 0,01 ml des oben erwähnten Reagens zugegeben wurde. In diesem Falle erfolgt keine Agglutination während der Prüfzeit von 5 Minuten.

Die Bildung der Mikroaggregate kann auch mit einem Mikroskop beobachtet werden. In diesen Fällen wird die Reaktion auf einem Objektträger durchgeführt. Die Beobach-

tung wird mit einem 40 × Objektiv und einem 7 × Okular durchgeführt. Falls nur die Positivität des zu untersuchenden Blutserums in Frage kommt, wird die Reaktion mit konzentrierten Blutseren – ohne Verdünnung – durchgeführt. Die Reaktion wird nach der oben beschriebenen durchgeführt und ist positiv, wenn die Agglutination während einer Minu-

te erfolgt, und ist negativ, wenn die Agglutination während dieser Zeit nicht vorkommt.

Aufgrund der Ergebnisse (Tabelle 1) ist die erfindungsgemäße Komposition zur Durchführung von schneller
s Reihenuntersuchung geeignet.

Tabelle 1

Der Titer des aus lipoidlöslichen Partikeln und zu diesen gebundenen gamma-Globulin hergestellten Reagenses (GLT)

Verdünnung des Blutserums	Der Titer der WAALER-ROSE Reaktion (WRT)						
	0,	32,	64,	128,	256,	512,	1024,
Konzentriert	±	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++
4	—	+	++	+++	++++	++++	++++
8	—	±	+	++	+++	++++	++++
16	—	—	±	+	+++	++++	++++
32	—	—	—	±	++	+++	++++
64	—	—	—	—	±	+	+++
128	—	—	—	—	—	±	±

30

35

40

45

50

55

60

65

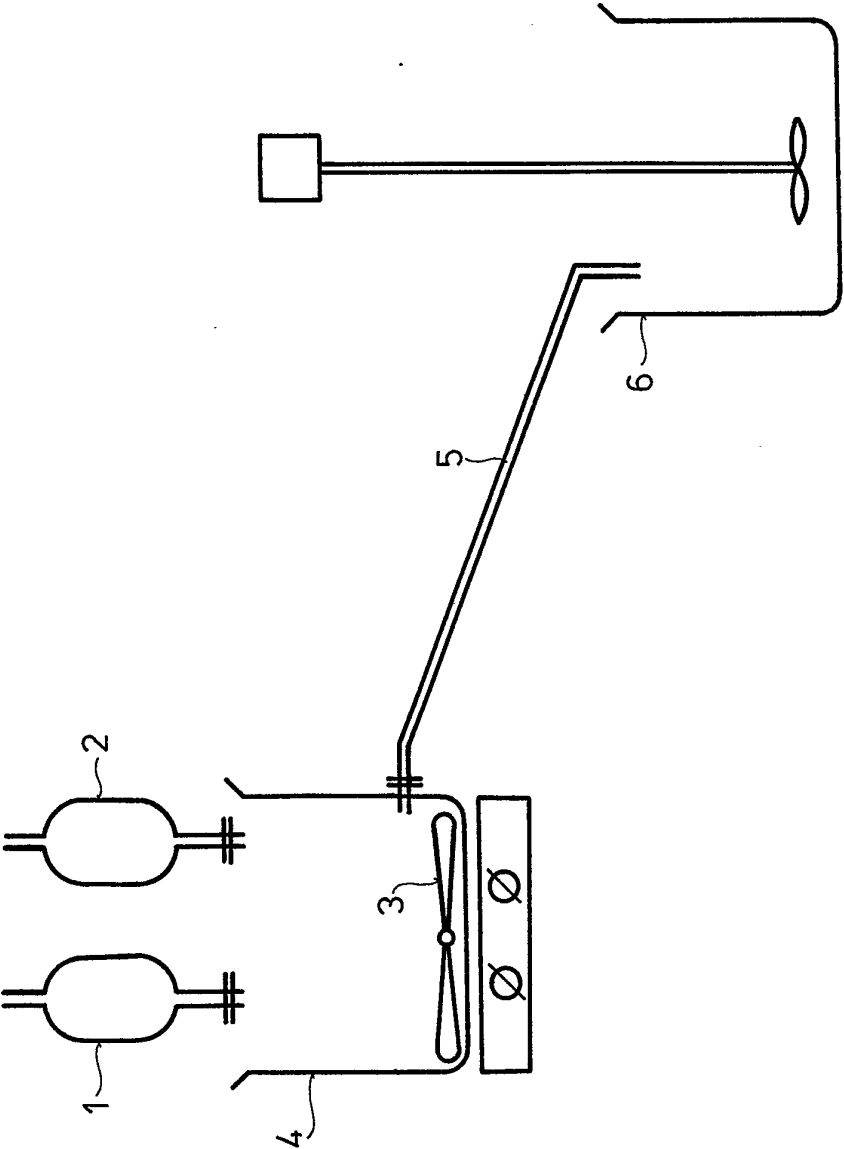


Fig.1