

Sonderdruck aus:

# Erfahrungsheilkunde

## Acta medica empirica

Zeitschrift für die ärztliche Praxis

**Hauptschriftleitung:**

Dr. med. Heinz Grunewald, Heidelberg

**Schriftleitung:**

Dr. med. H.-G. Eberhardt / Dr. med. W. Gedeon

**Wissenschaftlicher Beirat:**

J. Bischko, Wien / H.-J. Bredt, Gießen / U.

Derbolowsky, Homburg / W. Dogs, Rinteln / J. P.

Dosch, Schwendt (Tirol) / K.-H. Gebhardt,

Karlsruhe / R. Gruner, Saalgau / Ch. Herrmann,

Heidelberg / H. Huneke, Düsseldorf / W. A.

Laabs, Bad Salzuflen / H. Müller, Niefern-

Öschelbronn / E. Rauch, Maria Wörth / R. Rei-

chert, Mannheim / D. Reinstorff, Hamburg / H.

Stadlaender, Wolfsburg / E. W. Stiefvater, Frei-

burg / F. Vida, Karlsruhe / E. v. Weckbecker, Bad

Brückenau / H. Zulla, Konstanz

Karl F. Haug Verlag, Postfach 102840, 6900 Hei-

delberg 1

Heft 8/1989

### Biologische Wirkungen eines Ribonucleinsäure-haltigen Arzneimittels

E. Lodemann\* / G. Hochheimer\*\* / M. Pilgram\*\*\*

HAUG

Karl F. Haug Verlag GmbH & Co. · Fritz-Frey-Straße 21 · 6900 Heidelberg 1 · Telefon (0 62 21) 4 99 74

## Biologische Wirkungen eines Ribonucleinsäure-haltigen Arzneimittels

E. Lodemann\* / G. Hochheimer\*\* / M. Pilgram\*\*

### Zusammenfassung

Es werden zwei biologische Systeme vorgestellt, die (2'-5')-Oligoadenylsynthetase in Lymphozyten und das Oligoribonucleotid-bewirkte Priming der DNA-Replikation, in denen eine stimulierende Wirkung von Regeneresen® in vitro meßbar ist. Im Fall der Oligoadenylsynthetase konnte die Stimulation auch in vivo bei neun Patienten, die mit AU 4® behandelt wurden, nachgewiesen werden. Die Frage, inwieweit diese beiden Systeme an den sicher vielfältigen Wirkungen der Regeneresen beteiligt sind, kann anhand der bisherigen Erkenntnisse noch nicht abschließend beantwortet werden.

### Summary

Two biological systems sensitive to in vitro stimulation by Regeneresen® are described, namely the interferon-induced (2'-5')-oligoadenylate synthetase in lymphocytes, and the oligo-ribonucleotide-dependent priming of DNA replication. In the first case, stimulation could also be shown in nine patients treated with AU 4®. The significance of both systems for the therapeutic effects of Regeneresen remains to be elucidated.

Durch langjährige klinische Erfahrung ist die Wirksamkeit von Regeneresen® bei verschiedenen chronischen und degenerativen Krankheiten belegt worden. Im folgenden sollen einige Aspekte diskutiert werden, die sich bei der Suche nach mögli-

chen Wirkungsmechanismen dieser Ribonucleinsäure-haltigen Arzneimittel ergeben haben.

So wird schon seit längerem eine Interferon-induzierende Wirkung von Regeneresen in Betracht gezogen. Basis für diese Annahme ist die Tatsache, daß nicht nur höher-molekulare doppelsträngige Ribonucleinsäuren, sondern, wie bereits 1969 gezeigt werden konnte [1], auch entsprechende Oligoribonucleotide von etwa 15 Basenpaaren an Interferon zu induzieren vermögen. 1981 wurde von Wacker und Eichler über die Induktion von Interferon in Mäusen nach i.p. Applikation von RN 13® berichtet [2]. Da die im Tierversuch beobachteten Effekte relativ schwach waren, entschieden wir uns bei unseren Untersuchungen für die Durchführung ähnlicher Versuche in menschlichen Lymphozytenkulturen. Dadurch wurden einerseits Tierversuche vermeidbar, andererseits hatte diese Methode den Vorteil, daß Lymphozyten ein durch Interferon-induzierbares Enzym enthalten, das in Lymphozytenextrakten empfindlich nachweisbar ist und zudem in vivo etwa die dreifache Halbwertszeit hat wie Interferon [3].

Dieses Enzym, die (2'-5')-Oligoadenylsynthetase, wurde erstmals 1977 von Kerr und Mitarbeitern [4] beschrieben und wird als einer der Mediatoren der antiviralen Wirkung der Interferone angesehen. Es ist in der Lage, in Gegenwart doppelsträn-

giger RNA aus Adenosintriphosphat Oligonucleotide mit der seltenen 2'-5'-Internucleotidbindung zu synthetisieren, die dann ihrerseits eine gegen einzelsträngige RNA gerichtete Endonuclease aktivieren (Übersicht s. [5]).

Da innerhalb einer Versuchsreihe jeweils mit den Lymphozyten einer Blutspende gearbeitet werden konnte, ergaben sich gut vergleichbare Bedingungen, wie sie sonst nur durch aufwendige Versuche mit größeren Kollektiven von Versuchstieren geschaffen werden können.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind im folgenden kurz zusammengefaßt:

Abb. 1 zeigt ein representatives Beispiel für den Verlauf der relativen Oligoadenylsynthetase-Aktivität in Lymphozytenkulturen mit verschiedenen Zusätzen in Abhängigkeit von

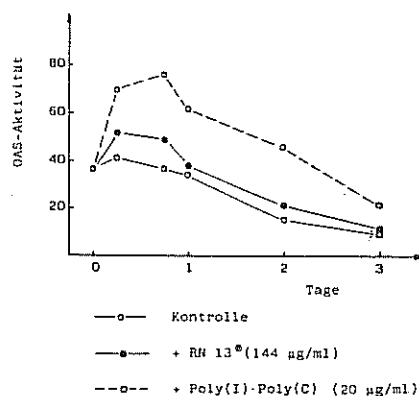


Abb. 1: Oligoadenylsynthetase-Aktivität in Lymphozytenkulturen (in Prozent vom Laborstandard)

\* Abteilung für Therapeutische Biochemie, Zentrum der Biologischen Chemie der Universität Frankfurt/Main

\*\* Abteilung V, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Bundeswehrkrankenhaus Ulm

der Inkubationszeit. Bei den Kontrollkulturen ist anfänglich ein geringfügiger Anstieg der Oligoadenylatsynthetase-Aktivität, wahrscheinlich bedingt durch das fötale Kälberserum im Medium, zu beobachten. Danach folgt ein Abfall der Enzymaktivität, der der Halbwertszeit des Enzyms in Lymphozyten von etwa 20 Stunden [3] entspricht. Der Abfall unter das Ausgangsniveau erklärt sich mit einem auch unter Normalbedingungen leicht erhöhten Enzymspiegel in den Lymphozyten, der wahrscheinlich auf konstitutiv vorhandene geringe Interferonspiegel im menschlichen Serum zurückzuführen sein dürfte [6]. Dieser annähernd konstante Interferon-Spiegel ist in den Lymphozytenkulturen wahrscheinlich nicht vorhanden, da die ursprüngliche geringe Interferonkonzentration durch Rezeptorbindung, Internalisierung und Abbau eliminiert wird.

In den Kulturen mit RN 13-Zusatz ist der Anstieg deutlicher, das extrapolierte Maximum liegt bei etwa 12 Stunden. Am deutlichsten ist die Enzyminduktion natürlich in Gegenwart der als Interferon-Induktor bekannten, doppelsträngigen Ribonucleinsäure Poly(I)·Poly(C).

Um den Unterschied zwischen den Kontroll- und den RN 13-Kulturen statistisch abzusichern, wurden separate Testreihen mit den Lymphozyten verschiedener Spender bei einer Inkubationszeit von 18—24 Stunden durchgeführt. Die in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen auf den ersten Blick Mittelwerte der Kontroll- und RN 13-Kulturen, deren Fehlergrenzen sich deutlich überlappen. Betrachtet man aber die Tendenz der Abweichungen zwischen den jeweiligen Wertepaaren aus einem Experiment, so sind in fast allen Fällen positive Differenzen zugunsten der RN 13-Kulturen zu verzeichnen. Die statistische Auswertung der Ergeb-

Tab. 1: Oligoadenylatsynthetase-Aktivität in Lymphozytenkulturen mit und ohne Zusatz von RN 13<sup>®</sup>, Interferon bzw. Poly(I) · Poly(C). (Prozent vom Laborstandard [Inkubationszeit: 18—24 Std.]; Zusatz von RN 13: 144 µg/ml; Interferon: 5 U/ml; PolyIC: 20 µg/ml Lymphozyten von verschiedenen Spendern.)

| Vers.-Nr. | Kontrolle | RN 13 <sup>®</sup> | Interferon | PolyIC |
|-----------|-----------|--------------------|------------|--------|
| 1         | 36        | 49                 |            |        |
| 2         | 33        | 38                 |            |        |
| 3         | 36        | 49                 |            | 76     |
| 4         | 38        | 48                 |            |        |
| 5         | 26        | 34                 |            |        |
| 6         | 27        | 29                 |            |        |
| 7         | 26        | 31                 | 60         |        |
| 8         | 48        | 62                 | 97         |        |
| 9         | 41        | 34                 |            |        |
| 10        | 24        | 35                 | 64         |        |
| $\bar{x}$ | 33,5      | 40,9               |            |        |
| s         | +7,8      | +10,6              |            |        |

nisse nach dem t-Test für gepaarte Daten ergibt dann auch gegenüber den Kontrollkulturen eine signifikante Steigerung der Oligoadenylatsynthetase-Aktivität in den RN 13-behandelten Kulturen ( $p < 0.001$ ).

Da ein Anstieg der Oligoadenylatsynthetase-Aktivität in Lymphozyten nach bisherigen Erkenntnissen immer auf eine Steigerung des Interferon-Spiegels im Serum bzw. im Medium zurückzuführen ist und außerdem der durch RN 13-bewirkte Anstieg durch Zusatz von Antikörpern gegen menschliches Interferon-alpha unterdrückt werden kann (Ergebnisse nicht dargestellt), sprechen die vorliegenden Resultate eindeutig für eine Interferon-Induktion durch RN 13.

Um zu kontrollieren, ob eine derartige Wirkung von Regeneresen auch in vivo feststellbar ist, wurden bei einer Gruppe von neun Patienten, die wegen Tinnitus mit Regeneresen behandelt wurden, zur Zeit 0 und nach 60

Std., d. h., nach drei Injektionen von jeweils 2 x 5 ml AU4<sup>®</sup>, periphere Lymphozyten gewonnen und auf ihre Oligoadenylat-Synthetase-Aktivität getestet.

Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen in fast allen Fällen einen Anstieg der Oligoadenylatsynthetase-Aktivität, der sich bei Auswertung nach dem t-Test für gepaarte Daten als schwach signifikanter Unterschied ( $0,025 < p < 0,02$ ) erwies. Somit ließ sich die in Lymphozytenkulturen gefundene schwache, aber signifikante Interferon-induzierende Wirkung von Regeneresen auch in vivo bestätigen.

Da die Interferone zu der wichtigen Gruppe der regulatorischen Cytokine gehören, sie in ihrer Bedeutung also nicht auf die antivirale Wirkung beschränkt, sondern u. a. auch an der Modulation der Expression bestimmter Gene beteiligt sind, ist die Bedeutung auch einer relativ schwachen Erhöhung des Interferon-Spie-

Tab. 2: Relative Oligoadenylatsynthetase-Aktivität in den Lymphozyten von Patienten nach einer dreitägigen Behandlung mit AU 4<sup>®</sup> (2 x 5 ml täglich).

| Efd. Nr.  | Patienten |      |              | Probanden |      |              |
|-----------|-----------|------|--------------|-----------|------|--------------|
|           | vor       | nach | Änderung (%) | vor       | nach | Änderung (%) |
| 1         | 3,5       | 4,8  | 37           | 1,6       | 2,3  | 24           |
| 2         | 1,3       | 1,9  | 46           | 2,0       | 2,5  | 25           |
| 3         | 3,9       | 4,1  | 5            | 3,2       | 2,9  | -9           |
| 4         | 7,9       | 11,1 | 41           | 4,1       | 4,9  | 20           |
| 5         | 0,8       | 1,0  | 25           | 3,6       | 4,5  | 25           |
| 6         | 1,6       | 1,8  | 13           | 1,0       | 0,7  | -30          |
| 7         | 1,3       | 2,5  | 92           | 1,7       | 1,4  | -18          |
| 8         | 2,1       | 3,2  | 52           | 4,0       | 4,8  | 20           |
| 9         | 1,8       | 1,7  | -5           | 1,5       | 1,2  | -20          |
| $\bar{x}$ |           |      | 34           |           |      | 4            |
| s         |           |      | +29          |           |      | +23          |

\* bezogen auf einen Laborstandard

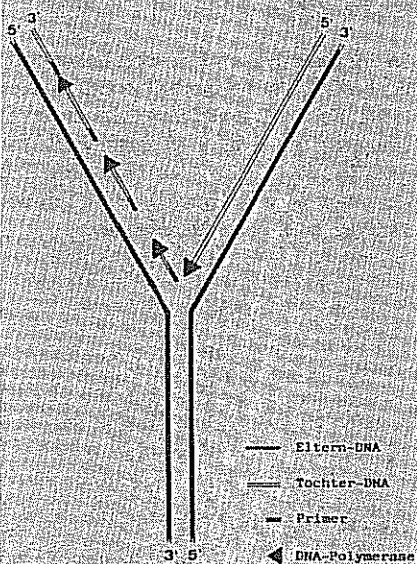


Abb. 2: DNA-Replikations-Gabel

gels nicht zu unterschätzen. Es ist durchaus denkbar, daß ein Teil der (unspezifischen) Wirkung von Regeneresen auf diese Erhöhung des Interferon-Spiegels zurückzuführen ist.

Ein anderer Teil der Wirkung kann im Bereich der DNA-Synthese gesehen werden: Die DNA-Synthese (Replikation) verläuft nach einem sog. semikonservativen Mechanismus, d. h., jede der gebildeten Tochter-Desoxyribonucleinsäuren besteht aus einem kompletten Elternstrang und einem neugebildeten Strang (Abb. 2). Da die DNA-Synthese grundsätzlich vom 5'- zum 3'-Ende erfolgt, die die Ablesung also vom 3'- zum 5'-Ende, kann nur ein Strang kontinuierlich synthetisiert werden. Der andere Strang entsteht diskontinuierlich in Form von DNA-Stücken, sog. Okazaki-Fragmenten, die bei Eukaryonten jeweils etwa 200 Nucleotide lang sind und schließlich durch DNA-Ligase verknüpft werden.

Es ist eine besondere Eigenheit der DNA-Polymerase, daß sie zum Kettenfang die freie 3'-OH-Gruppe eines an die Matrizen-DNA gebunde-

nen „Primers“ benötigt, an die das erste der Desoxyribonucleotide angeknüpft wird. Primer sind Oligoribonucleotide mit einer Kettenlänge von etwa 10 Nucleotiden, die in den Zellen von einem speziellen Enzym, der Primase, synthetisiert werden. Die DNA-Synthese läuft dann weiter, bis das Enzym auf das Ende des vorhergehenden Primers trifft, der durch das Reparatursystem des Polymerase-Multienzymkomplexes als falsch (RNA!) erkannt und eliminiert wird, wobei die entstehenden Lücken mit Desoxyribonucleotiden aufgefüllt werden. Anschließend erfolgt dann die schon erwähnte Verknüpfung der Fragmente durch die DNA-Ligase. Der Priming-Vorgang wurde bisher überwiegend in dem relativ übersichtlichen System der Bakteriophagen-Replikation studiert und ist im eukaryontischen System nur erst teilweise aufgeklärt. Es bleiben daher noch viele Fragen zu beantworten, von denen zwei für unsere Problematik von besonderem Interesse sind:

1. Werden Primer wahllos synthetisiert oder gibt es spezifische Sequenzen auf der eukaryontischen DNA, an denen die Primer gebildet werden?
2. Ist der Priming-Vorgang ein limitierender Faktor der DNA-Synthese, der möglicherweise alterationsanfällig ist? (Von der Primase in *E. coli* ist z. B. bekannt, daß ihre Messenger-RNA aufgrund einer speziellen Eigenschaft nur schwach exprimiert wird).

Beide Fragestellungen sind für die Klärung möglicher Wirkungsmechanismen der Regeneresen wichtig, da wir inzwischen wissen, daß Teile der Präparate aus Oligoribonucleotiden der Kettenlänge 10—20 bestehen.

Wie Abb. 3 zeigt, sind Regeneresen tatsächlich in der Lage, in einem in vitro DNA-synthetisierenden System als Primer zu fungieren. Diese Wirkung ist für die einzelnen Regenerese-

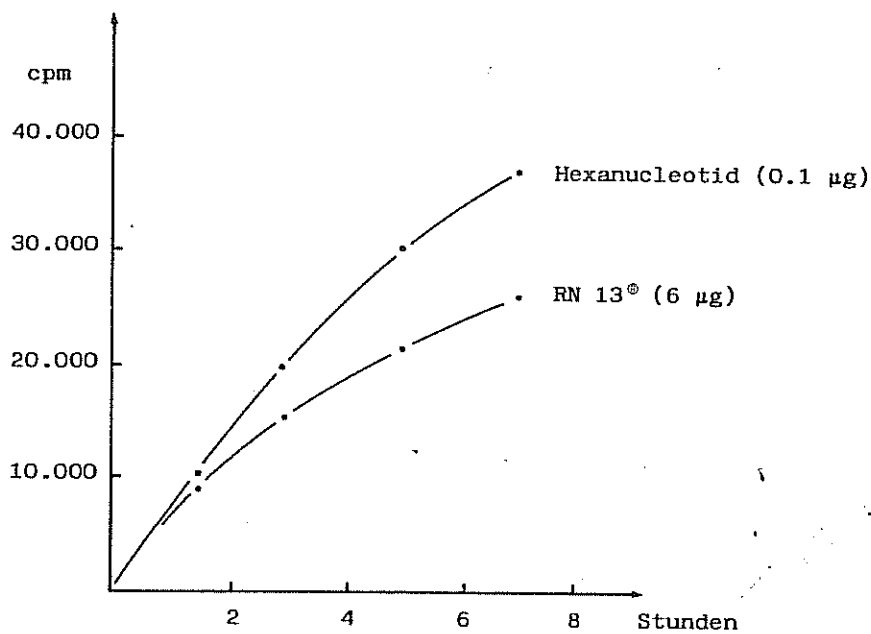


Abb. 3: DNA-Synthese in Gegenwart eines synthetischen Hexaribonucleotids und von RN 13® als Primer. (Das verwendete System [Multiprime DNA Labelling Systems — Amersham-Buchler] besteht im wesentlichen aus dem Kleenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* und der DNA des Bakteriophagen Lambda. Gemessen wird der Einbau von <sup>3</sup>H-CTP.)

Tab. 3: DNA-Synthese in Gegenwart verschiedener Regeneresen® als Primer.

$$\frac{(\text{cpm Regeneresen} - \text{cpm Plazebo}) \times 100}{(\text{cpm Kontrolle} - \text{cpm Leerwert})}$$

| Primer                    | µg RNA | cpm   | %*  |
|---------------------------|--------|-------|-----|
| -- (Leerwert)             | --     | 736   | --  |
| Plazebo                   | --     | 1004  | 0   |
| Hexanucleotid (Kontrolle) | 0.4    | 16060 | 100 |
| Hefe-RNA                  | 12     | 5584  | 30  |
| Regeneresen®              |        |       |     |
| RN 13®                    | 12     | 11603 | 69  |
| Osteochondrin®            | 12     | 13736 | 83  |
| AU 4®                     | 12     | 14512 | 83  |
| Thymus                    | 12     | 12248 | 73  |
| Herz                      | 12     | 11891 | 71  |
| Pankreas                  | 12     | 7017  | 39  |
| Muskulatur                | 12     | 9957  | 58  |
| Knorpel                   | 12     | 12596 | 76  |
| Leber                     | 12     | 8124  | 46  |

sen graduell verschieden (s. Tab. 3), Hefe-RNA ist als Primer weniger wirksam. An der sehr viel kleineren Menge an synthetischem Hexanucleotid, die für eine etwa vergleichbare Wirkung ausreichend ist, kann man erkennen, daß die Regeneresen nur z. T. aus Primer-wirksamen Oligoribonucleotiden bestehen.

Die Aussagekraft dieser Ergebnisse darf natürlich nicht überbewertet werden, da es sich bei dem verwendeten Enzym um das sog. Kleenow-Enzym, ein Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*, und bei der Matrizen-DNA um die DNA des Bakteriophagen Lambda handelt. Es ist jedoch bekannt, daß die DNA-Polymerase-alpha, die in den Zellen höherer Organismen für die Vermehrung der chromosomalen DNA zuständig ist, ebenfalls des Primings bedarf. Versuche mit spezifischen Systemen, die z. Z. noch nicht zugänglich sind, sollen zu gegebener Zeit zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse herangezogen werden.

Die Autoren danken der Firma Laboratorium Prof. Dr. H. Dyckerhoff & Co. GmbH, Köln, für die Unterstützung der Untersuchungen, und Frau A. Böttcher-Purkl für geschickte technische Assistenz. Ein Teil der vorgetragenen Ergebnisse ist Teil der Doktorarbeit von G. Hochheimer.

### Literatur

- [1] A. Wacker et al.: Einfluß der Kettenlänge von Oligonucleotiden auf die Interferon-Induktion. *Naturwiss.* 56 (1969) 638.
- [2] A. Wacker; Eichler, A.: Über die Interferon induzierende Wirkung von RN 13 Regeneresen. *Erfahrungsheilkunde* 30 (1981) 936—939.
- [3] E. Lodemann et al.: Serum Interferon Level and (2'-5') Oligoadenylate Syn-

- thetase Activity in Lymphocytes during Clinical Interferon Application. *J. Interferon Res.* 5 (1985) 621—628.
- [4] *I. M. Kerr et al.*: Nature of the Inhibitor of Cell-Free Protein Synthesis Formed in Response to Interferon and Double-Stranded RNA. *Nature* 268 (1977) 540—542.
- [5] *E. Lodemann*: Die Interferone — Erforschung, Wirkung und Bedeutung. *Naturwiss.* 71 (1984) 547—551.
- [6] *M. G. Tovey et al.*: Interferon Messenger RNA is Produced Constitutively in the Organs of Normal Individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5038—5042.
- (Für die Verfasser: Priv.-Doz. Dr. *E. Lodemann*, Abteilung für Therapeutische Biochemie, Zentrum der Biologischen Chemie, Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt/M. 70)

\*

Die der „Erfahrungsheilkunde“ eingeschickten Manuskripte dürfen nicht gleichzeitig anderen Zeitschriften zur Veröffentlichung angeboten werden. Im allgemeinen werden nur Arbeiten als Erstdruck angenommen. Mit der Annahme des Manuskriptes durch die Schriftleitung und den Verlag tritt der Autor sowohl das alleinige Abdrucksrecht für diese Zeitschrift als auch für andere Nachdrucke und Vervielfältigungen an den Verlag ab. Die „Erfahrungsheilkunde“ und alle in ihr enthaltenen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlags unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Bearbeitung in elektronischen Systemen.