

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 801420 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **801420**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.05.1980**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.05.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.11.1980**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

10.05.1979 DE 2918927

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Limburg, Hans, Holbeinstrasse 6/III München, BRD, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Limburg, Hans, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Syöpäkasvainten käsittelyyn käytettävä lääkevalmiste ja menetelmä sen valmistamiseksi.

Läkemedelspreparat för behandling av kräftsvulster och förfarande för framställning av detta.

Hans Limburg, Holbeinstrasse 6/III, D 8000 München 80, Länsi-Saksa

Syöpäkasvainten käsittelyyn käytettävä lääkevalmiste ja menetelmä sen valmistamiseksi - Läkemedelspreparat för behandling av kräftsvulster och förfarande för framställning av detta

Jo kauan on ollut tunnettua käsitellä syöpäkasvaimia sytostaattisilla aineilla, Melkein kaikkien sytostaattisten aineiden haittana on niiden korkea myrkyllisyys ja yleisesti ottaen myös haitallinen vaikutus terveiden solujen kasvuun. On myös havaittu, ettei tunnetuilla sytostaattisilla aineilla ole yhtä hyvää tehoa kaikkiin syöpälajeihin. Myös eri potilailla, joilla on samankaltainen syöpä, sytostaattisten aineiden vaikutus on usein erilainen. Jotta tällaisissa tapauksissa voitaisiin valita sopivin sytostaattinen aine ja käsitellä syöpäkasvainta selektiivisesti näin valitulla aineella, Limburg ja Krahe ovat ehdottaneet kyseisestä syöpäkasvaimesta otetun kudosiselityksen käyttöä määrittäessä eri sytostaattisten aineiden vaikutus kasvaimeen, so. onkobiogrammin määrittämiseen. Katso Deutsche Medizinische Wochenschrift, vol. 89 (1964), sivu 1938.

Vaikka edellä mainitulla menetelmällä on etuna, ettei potilaan elin tai elimet, joita on tarkoitus käsitellä, joudu kyseistä

olevan kasvaimen suhteen tehottoman sytostaattisen aineen myrkkyy-
vaikutukselle altistetuksi, niin potilas joutuu kuitenkin suoraan
altistetuksi sytostaattiselle aineelle. Tällaisen aineen vaikutus
on osoittautunut vaurioita tuottavaksi varsinkin käytettäessä suu-
ria annoksia ja pitkää hoitoaikaa.

Keksinnön kohteena on lääkevalmiste käytettäväksi eri syöpä-
lajien käsittelyyn, jota valmistetta voidaan käyttää joko yksinään
tai yhdessä sellaisen sytostaattisen aineen kanssa, joka on spesi-
fisesti tehokas kyseessä olevan kasvaimen suhteen. Lääkevalmiste
on potilaan hyvin sietämä.

Tämä sekä muut keksinnön kohteet selviävät seuraavasta seli-
tyksestä, esimerkeistä ja vaatimuksista.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään lähtöaineena syöpä-
päsoluja, joita saadaan tavallisella tavalla. Syöpäsoluja voidaan
saada esimerkiksi käsittelemällä trypsiinillä kirurgisesti poistet-
tua kasvainkudosta; ks. Limburg et al., Deutsche Medizinische
Wochenschrift, vol. 89 (1964), sivu 1938, joka liitetään tähän vii-
tejulkaisuna. Seuraavassa kuvataan edullinen menetelmä syöpäsolujen
saamiseksi:

Aluksi haluttu pahanlaatuinen syöpäkudos poistetaan kirurgi-
sesti steriileissä olosuhteissa. Kudosta käsitellään trypsiiniliuok-
sella ja viljellään sitten Leighton-putkissa kiilleliuskoilla. Pois-
tettu kudos hienonnetaan mekaanisesti steriileissä olosuhteissa
kudosmassaksi. Tällöin on huolehdittava siitä, että käytetään vain
kiinteää vahingoittumatonta syöpäkudosta, jossa ei ole olennaises-
ti lainkaan verta tai kuolleita soluja. Kudosmassaan lisätään
0,25-%:inen trypsiiniliuos fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa
suolaliuoksessa (PBS), joka sisältää sterilointitarkoituksessa
100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 0,1 mg/ml streptomysiiniä, ja mas-
saa sekoitetaan sitten 37°C:ssa. Kun kyseessä on kiinteämpi, konsis-
tenssiltaan kovempi kudos, voidaan trypsiiniliuoksen pitoisuutta
lisätä aina 2 %:iin asti. Noin 20 minuutin kuluttua irronneet yksit-
täiset solut, jotka sisältävät mahdollisimman vähäisessä määrin ku-
dosta, kaadetaan toiseen steriiliin pulloon. Trypsiinin vaikutus
toiseen steriiliin pulloon kaadettuun solususpensioon keskeytetään
jäähdyttämällä suspensio jäähauteessa 4°C:seen. Tämä sekoitus- ja
dekantointivaihe suoritetaan useampia kertoja, kunnes trypsiinikä-

sittelyyn käytetyssä pullossa ei ole enää jäljellä kiinteää kudosta. Trypsiinikäsittelyn päätyttyä jäähdytetty solususpensio karkeasuo-
datetaan, edullisesti steriilin sideharsokerroksen lävitse, jota
ei ole käsitelty kemikaaleilla. Suodos lingotaan kierrosnopeudella
noin 800 - 1 000 r/min ja solulaskeutuma erotetaan suodoksesta.

Trypsiinikäsittelyä ei tarvitse suorittaa sellaisille syöpä-
soluille, jotka ovat jo erillisinä soluina, kuten esimerkiksi as-
kiitti- ja leukemiasyöpäsoluille.

Tämän jälkeen syöpäsoluja kasvatetaan tunnetulla tavalla syö-
päviljelmän saamiseksi esimerkiksi edellä mainitussa julkaisussa,
Deutsche Medizinische Wochenschrift, kuvatulla tavalla. Seuraavassa
kuvataan solujen viljely:

Solulaskeutuma laimennetaan nestemäisellä ravintoväliaineel-
la konsentraatioon $2-4 \times 10^6$ elävää solua/ml, ja laimennettua solu-
suspensiota pipetoidaan yhtä suuret määrät noin 30 putkeen. Yhdestä
suspensiotipasta määritetään mikroskoopilla aluslasilla laimennus.
Laimennus on sopiva, kun noin 125-kertaisella suurennuksella näkö-
kentässä on noin 20 solua. Putkikokeessa lisätään kuhunkin Leighton-
putkeen noin 1 ml nestettä. Käytetyllä ravintoväliaineella on edul-
lisesti seuraava koostumus:

	Tilavuus-%
Morjan-Morton-Parker -kudosviljelyväliaine	
(TCM) (DIFCO:n kaupallinen tuote)	25,0
Hank'in liuos (+1 % fenolipunaisen liuosta, joka on valmistettu laimentamalla 0,5 g:sta fenoli- punaista 0,05-m NaOH:ssa 20 ml:ksi	55,0
MEM-vitamiiniliuos (10-%:inen)	5,0
L-glutamiini (10-%:inen)	5,0
Vasikan seerumi	10,0

Ravintoväliaineeseen lisätään steriiliyden varmistamiseksi
100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 0,1 mg/ml streptomysiiniä.

Solususpensiota inkuboidaan inkubaattorissa 37°C :ssa. Ravin-
toväliaineen värin muutos punaisesta keltaiseksi osoittaa solujen
aineenvaihduntaa. Aina aineenvaihdunnan tapahduttua ravintoväliaine
vaihdetaan. Viljelmän kasvua tutkitaan ja seurataan mikroskooppi-
sesti heijastuvalla valolla. Lähtöaineen luonteesta riippuen vil-
jelmillä on erilaiset kasvuominaisuudet. Kohdun limakalvon syövän

tai munasarjasyövän solut voivat esimerkiksi kasvaa 48 tunnissa hyvinmuodostuneeksi solujen yksikerrokseksi. Muista pahanlaatuisista kasvaimista saadut solut, kuten suomumaiset epiteelisyöpäsolut vaativat aina 120 tuntiin asti riippuen siitä, missä määrin ne ovat kypsyneet.

Soluviljelmien herkkyyskoe eri sytostaattien suhteen suoritetaan esimerkiksi Limburg'in et al., *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (cit. loc.) esittämällä tavalla. Seuraavassa kuvataan tätä menetelmää lähemmin:

Kokeisiin käytetään vain hyvin kasvaneita soluviljelmiä. Viljelymateriaalin määrästä riippuen viljelmän herkkyyttä voidaan kokeilla minkä tahansa sytostaatin suhteen. Yhden viljelmän herkkyys 10-20 eri kemoterapeutin suhteen voidaan kokeilla samanaikaisesti lisäämällä kemoterapeutteja kuhunkin putkeen sopiviksi konsentraatioiksi. Kutakin sytostaattia käytetään herkkyyskokeessa sellaisena konsentraationa, jona sitä käytetään jatkuvassa tai jaksottaisessa ihmislääkityksessä; ohj^äkonsentraatiot on esitetty taulukossa 1. Eri sytostaatit ovat farmaseuttisten valmisteiden muodossa ja lisätään sellaisina koeputkiin. Jatkuvasti tarkastelemalla viljelmiä mikroskoopilla, voidaan morfologiset vauriot useimmissa tapauksissa havaita 24 tunnin kuluttua ja antimetaboliitteja käytettäessä 48 tunnin kuluttua.

In vitro kokeissa käytetään seuraavia terapiaan sopivia konsentraatioita. Annokset on laskettu valmistajan suosittelemista konsentraatioista, ja ne koskevat potilasta, jonka paino on keskimäärin 60 kg, tai 1 m²:n kehon pinta-alaa tai noin 5 000 ml:n verimäärää.

Taulukko 1

Sytostaattinen aine	Konsentraatio (μ g/ml)
Syklofosfamidi (Endoxan)	33
Trietyleenitiofosforamidi (Thio-Tepa)	0,42
Podofylliinihappo-2-etyylihydratsidi (Proresid)	33
VM 26	1
Vinkristiini	0,017
Aktinomysiini D	0,05
Adriblastiini	1
5-fluoriurasiili	16,7
Ametopteriini (Methotrexate)	2

Tällä menetelmällä voidaan helposti määrittää minkä tahansa muun sytostaattisen aineen laimennus.

Herkkyyskoe in vitro

Ihmisen syöpäkudoksesta saadun viljelmän herkkyys tai kestävyys määritetään puolikvantitatiivisesti. Täydellisen kestävä viljelelmä vastaa täysin kontrolliputkessa saatua. Osittaista aktiiviteettia osoittaa mikroskoopilla tarkasteltaessa se, että noin 50 % näkökentässä olevista soluista on osittain hajonnut. Kun näkökentässä ei ole lainkaan eläviä soluja ja vain joitakin kutistuneita, kuolleita soluja, niin sytostaatilla on vahva vaikutus. Vain tällaisen tuloksen katsotaan merkitsevän täyttä herkkyyttä. Keskimäärin on havaittu ainakin kahden eri sytostaateilla kokeilluista viljelmistä olevan herkkiä. Vain näitä viljelmiä käytetään seuraavassa kuvatussa soluterapiassa. Tällaisia kokeita on suoritettu yli 3 000 yksityistapauksessa, jolloin ainutlaatuisena tuloksena on ollut, että samanlaisessa paikassa esiintyvistä kasvaimista ja/tai histologisesti samankaltaisesta kasvaimesta eri potilailla saaduilla kasvainsoluviljelmillä saattaa olla erilainen herkkyys saman sytostaatin suhteen ja että metastaasien solut saattavat myös suhtautua sytostaattiin eri tavalla kuin primaarisen kasvaimen solut.

Syöpäsoluviljelmäkoe niiden herkkyiden määrittämiseksi eri sytostaattien suhteen voidaan suorittaa in vivo rotan vastassa.

Herkkyyskoe in vivo

Kun kasvainmateriaalia on saatavana alle 20 g, niin sytostaattinen herkkyyskoe suoritetaan in vivo käyttäen rotan vastaan sijoitettua diffuusiokammiota. Solususpensio valmistetaan samalla tavalla kuin in vitro menetelmässä. Diffuusiokammio koostuu kahdesta suotimesta, jotka on sijoitettu kahteen ruuveilla toisiinsa liitettyyn teflon-renkaaseen. Suotimet toimivat puoliläpäisevinä membraaneina. Niiden huokoskoko on valittu siten, että ne läpäisevät nestettä, elektrolyyttejä ja proteiineja, mutteivät läpäise soluja, kuten leukosyyttejä, makrofageja ym. Suotimen sopiva huokoskoko on noin 0,25 μm . Kammioon pannaan 0,3 ml valmistettua solususpensiota.

Kammiot sijoitetaan heti valmistuttuaan umpisiitosrottakantaan BD2 kuuluvien rottien vatsaonteloon. Kutakin eläintä kohti

käytetään kaksi kammiota. Kammioiden sijoittamisen jälkeen vatsa-
kalvo ja vatsanahka suljetaan. Tällä tavoin kasvainsolut pysyvät
100-%:isesti membraanisuoitimilla, jossa ne saavat kasvaa.

Viidentenä päivänä diffuusiokammioiden vatsaonteloon sijoit-
tamisen jälkeen injektoidaan kunkin rotan vatsaonteloon useita ker-
toja sytostaattista ainetta. Samoin kuin in vitro menetelmässä on
konsentraatio sama kuin ihmisellä terapiassa. 48 tunnin kuluttua
viimeisestä injektioista rotat tapetaan ja diffuusiokammiot poiste-
taan. Membraanisuoitimet eristetään ja kiinnitetään ja solut määri-
tetään Papanicholaou'n menetelmällä. Sytotoksinen aktiviteetti mää-
ritetään käyttäen edellä in vitro kokeen yhteydessä kuvattuja mor-
fologisia kriteerejä.

Solujen heikentämiskäsittely

Kun solujen herkkyyttä eri sytostaattisten aineiden suhteen
on edellä kuvatulla tavalla kokeiltu, havaitaan käsittelemättömien,
alkuperältään edellä kokeiltujen solujen kanssa samanlaisten syöpä-
solujen heikkenevän, kun niitä käsitellään esillä olevan keksinnön
mukaisella menetelmällä.

Keksinnön mukaisen menetelmän suorittamisessa on olennaista,
että kun tietyn soluviljelmän suhteen paras mahdollinen sytostaatti-
nen aine on saatu varmistetuksi, niin soluja käsitellään tällä ai-
neella siten, että ne eivät täysin kuole, vaan ainoastaan osittain
heikkenevät. Tämän saavuttamiseksi on huolehdittava siitä, että in-
kubointiaika sytostaattisen aineen läsnäollessa ei ole liian pitkä.
Kuten voidaan odottaa, niin eri soluviljelmien tarvitsemat inku-
bointiajat vaihtelevat viljelmästä ja sytotaatin aktiivisuudesta riip-
puen. Heikkenemisen jatkumista voidaan seurata noin 125-kertaisella
mikroskooppisuurennuksella. Tämän voi alan asiantuntija suorittaa
vaikeuksitta. Inkubointia jatketaan edullisesti, kunnes mikroskoop-
pitutkimuksessa havaitaan, että vain noin 30-70 %, edullisesti noin
40-60 % soluista on vahingoittumattomia. Sopivaksi inkubointiajak-
si on yleensä osoittautunut noin 4-15 tuntia, ja varsinkin noin
6-12 tuntia. Inkubointi suoritetaan edullisesti noin 37°C:ssa.

Heikentämiskäsittelyssä käytetään kutakin sytostaattista ai-
netta samassa konsentraatiossa kuin edellä kuvatussa kokeessa.

Heikentämiskäsittely suoritetaan edullisesti seuraavasti:
Edellä kuvatulla tavalla trypsiinikäsittelystä saadut solut, joita

ei ole käsitelty sytostaattisella aineella, viedään ravintoväliaineeseen suspendoituina Roux-pulloihin, ja kuumennetaan inkubaatorissa 37°C :seen. Edellä mainitussa kokeessa parhaat tulokset antanutta sytostaattia lisätään pulloihin taulukossa 1 ilmoitetut konsentraatiot.

Kun solut on sopivasti heikennetty haluttuun asteeseen, viljelmä pestään perusteellisesti sytostaattisen aineen poistamiseksi. Tämän vaiheen tarkoituksena on heikentää sytostaattisen aineen vaikutusta soluihin ja estää sytostaattisen aineen reaktion jatkuminen solujen kanssa tai estää solujen mahdollinen kuoleminen. Pesunesteenä käytetään edullisesti fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, vaikka myös muita fysiologisesti hyväksyttäviä liuoksia voidaan käyttää.

Haluttuun asteeseen heikennetyt solut lingotaan sitten 10 minuutin ajan kierrosnopeudella 800 - 1 000 r/min ja suspendoidaan edullisesti fysiologisesti hyväksyttävään nesteeseen, kuten fysiologiseen suolaliuokseen tai vasikanseerumiin. Saadussa farmaseutuksessa valmisteessa, joka laimennettuna on valmista käytettäväksi, on täten käsiteltyjä soluja edullisesti noin 10^6 solua/ml.

Keksinnön mukaisesti valmistetut ~~pre~~preparaatit valmistetaan edullisesti juuri sen potilaan kasvannaissoluista, jota on tarkoitus käsitellä. Täten taataan erityisen hyvä siedettävyyys ja optimiaktiiviteetti. On huomattava, että tietyissä tapauksissa ei erilaisista syistä johtuen ole mahdollista valmistaa preparaattia juuri sen potilaan soluista, jota tullaan käsittelemään. Tällaisia syitä ovat preparaatin valmistukseen tarvittavan ajan niukkuus tai sellaisten henkilöiden puuttuminen, jotka pystyvät suorittamaan preparaatin valmistuksessa tarvittavan syöpäsoluviljelmän kokeilun tai kokeiluun tarvittavan laitteiston puuttuminen. Tällaisissa tapauksissa voidaan käyttää muiden potilaiden syöpäkasvaimista otetuista soluista tehtyjä valmisteita. On tietenkin edullisinta käsitellä potilasta preparaatilla, joka on valmistettu samanlaisen syöpäkasvaimen soluista, kuin se, jota aiotaan käsitellä. Esimerkiksi munasarjasyöpää sairastavaa henkilöä käsitellään preparaatilla, joka on valmistettu muiden potilaiden munasarjasyöpäkasvaimista. On myös mahdollista valmistaa sekapreparaatteja, jotka sisältävät erilaatuisista syöpäkasvaimista saatuja soluja, kuten heikennettyjä rinta- ja munasarjasyöpäsoluja.

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset valmisteet ovat pysyviä suspensioina noin 4 viikkoa niitä säilytettäessä noin 4°C:ssa. Varastointiajan pidentämiseksi farmaseuttiset valmisteet voidaan äkki-jäähdyttää aina lämpötiloihin -80°C asti. Syväjäädetytyinä valmis-teet säilyvät noin vuoden ajan. Tällöin ne edullisesti pakataan tii-viisiin pakkauksiin ja niissä käytetään jonkin verran ylimäärin ra-vintoliuosta. Farmaseuttisia valmisteita voidaan varastoida myös pi-tempiä aikoja lyofilisoituina.

Keksinnön mukaisia farmaseuttisia valmisteita voidaan antaa lääkeeksi millä tahansa sopivalla tehokkaalla tavalla, kuten ihon-alaisena tai lihaksensisäisenä injektiona tai suonensisäisenä in-fuusiona. Edullisin lääkkeenantotapa on ihonalainen tai lihaksensi-säinen injektio.

Edullisessa käsittelymenetelmässä potilaalle annetaan joka käsittelykertana noin 1 ml keksinnön mukaista solususpensiota, joka on laimennettu noin 10-kertaisesti ja sisältää noin 10^6 solua. Kä-sittely toistetaan sopivasti 5-6 kertaa noin 48 tunnin väliajoin. On havaittu, että potilas, jota on käsitelty keksinnön mukaisella farmaseuttisella valmisteella, sietää huomattavasti paremmin vas-taavaa kemiallista sytostaattista ainetta. Tästä syystä on erittäin suositeltavaa, että potilasta sen jälkeen, kun hän on saanut sarjan käsittelyjä keksinnön mukaisella valmisteella, käsitelläänⁿ noin 8 vrk sytostaattisella aineella tavanomaisella tavalla. Tämä aspekti sel-viää seuraavista kliinisisistä tutkimuksista, jotka on esitetty kek-sinnön valaisemiseksi ja selventämiseksi.

Esimerkki

Käytettiin seuraavia reagensseja ja liuoksia:

Pesuliuos valmistettiin lisäämällä 80 ml liuosta A, 100 ml liuosta B, 100 ml liuosta C ja 50 ml antibioottiliuosta pulloon ja laimentamalla kahdesti tislattulla vedellä 1 000 ml:ksi.

Liuos A valmistettiin liuottamalla seuraavat aineet 400 ml:aan kahdesti tislattua vettä:

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	5,75 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g

Liuos B valmistettiin liuottamalla 500 ml:aan kahdesti tislattua vettä:

CaCl ₂	0,5 g
-------------------	-------

Liuos C valmistettiin liuottamalla 500 ml:aan kahdesti tislattua vettä:

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 g
--------------------------------------	-------

Liuokset A, B ja C steriloidtiin autoklaavissa ja säilytettiin 4°C:ssa.

Antibioottiliuos

300 ml:aan kahdesti tislattua vettä liuotettiin

penisilliiniä (Grünenthal, Stolberg)	6 000 000 I.U.
--------------------------------------	----------------

streptomysiiniä (Specia, Pariisi)	1 g
-----------------------------------	-----

Liuosta säilytettiin -20°C:ssa.

Trypsiiniliuos valmistettiin 37°C:n vesihauteessa.

Trypsiinijauhe (Serva-Heidelberg)	25 g
-----------------------------------	------

Hank'in liuos (BSS) (katso jäljempää)	475 ml
---------------------------------------	--------

Liuos suodatettiin steriileissä olosuhteissa, täytettiin pieniin pulloihin ja säilytettiin -20°C:ssa. Trypsiinikäsittelyä varten liuos laimennettiin haluttuun pitoisuuteen pesuliuoksella.

Behring IV ravintoliuos

Hank'in liuos (55 ml perusliuosta A + 55 ml

perusliuosta B + 1 100 ml kahdesti tislattua vettä)

1 100 ml

kudosviljelyväliaineliuos	500 ml
---------------------------	--------

vasikanseerumi	200 ml
----------------	--------

vitamiiniliuos	100 ml
----------------	--------

glutamiiniliuos	100 ml
-----------------	--------

antibioottiliuos	10 ml
------------------	-------

Seos suodatettiin steriileissä olosuhteissa, täytettiin pulloihin ja säilytettiin -20°C:ssa. Ennen käyttöä ravintoliuoksen pH säädettiin arvoon 6,8 - 7,2 natriumvetykarbonaattiliuoksella (22 g NaHCO₃ ja 478 ml kahdesti tislattua vettä).

Hank'in perusliuos A valmistettiin liuottamalla seuraavat aineet 250 ml:aan kahdesti tislattua vettä:

NaCl	40,0 g
------	--------

KCl	2,0 g
-----	-------

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
--------------------------------------	-------

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 g
--------------------------------------	-------

CaCl ₂	0,7 g
-------------------	-------

Liuosta säilytetään 4°C:ssa.

Hank'in perusliuos B valmistettiin liuottamalla seuraavat aineet 240 ml:aan kahdesti tislattua vettä:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
KH_2PO_4	0,3 g
Glukoosi	5,0 g
Fenolipunaisen liuos (1 %)	10,0 ml

Liuosta säilytetään 4°C:ssa.

Fenolipunaisen liuos

Fenolipunainen	0,5 g
0,05-m NaOH	15 ml

Fenolipunainen liuotettiin kylmään NaOH-liuokseen 30 minuutin kuluessa ja liuos laimennettiin sitten 50 ml:ksi kahdesti tislattulla vedellä. Liuosta säilytetään 4°C:ssa.

TCM-liuos

TCM-jauhe (Morgan-Morton-Parker, Difco Laboratories, Detroit, USA)	5,5 g
Hank'in perusliuos A	25 ml
Hank'in perusliuos B	25 ml

perusliuosten seos laimennettiin kahdesti tislattulla vedellä 500 ml:ksi. Jauhe liuotettiin tähän liuokseen.

Glutamiiniliuos

Glutamiinijauhe (Difco Laboratories)	10,0 g
Hank'in perusliuos A	7 ml
Hank'in perusliuos B	6 ml

Perusliuosten seos laimennettiin kahdesti tislattulla vedellä 100 ml:ksi. Glutamiinijauhe liuotettiin saatuun liuokseen.

Vitamiiniliuos

Vitamiini (MEM 100 x, Boehringer, Mannheim)	100 ml
Hank'in perusliuos A	50 ml
Hank'in perusliuos B	50 ml

Perusliuosten seos laimennettiin kahdesti tislattulla vedellä 900 ml:ksi ja vitamiinit lisättiin. Saatu liuos suodatettiin steriileissä olosuhteissa, täytettiin pieniin pulloihin ja säilytettiin -20°C:ssa.

Vasikan seerumi

Vasikansikiön seerumia (Boehringer, Mannheim) säilytettiin -20°C:ssa ja sulatettiin ennen käyttöä vesihauteessa 37°C:ssa.

46 vuotiaan potilaan vaiheessa T4N5Mlc olleesta, poistetusta munasarjakasvaimesta otettua kudosta (50 g) hienonnettiin yhdessä 0,5-%:iseksi laimennetun trypsiiniliuoksen (700 ml) kanssa ja seos pantiin 1 000 ml:n pulloon. Seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla 10 minuuttia. Päällä oleva neste kaadettiin samansuuruiseen jäillä jäähdytettyn pulloon. Kudos-trypsiiniseoksen sekoitus ja päällä olevan nesteen dekantoiminen suoritettiin neljä kertaa. Neljännellä kerralla saatiin kirkas päällä oleva neste. Yhdistetyt päällä olevat nesteet ja jäljellä oleva kudos suodatettiin sitten steriilin sideharson lävitse. Suodos lingottiin 10 minuutin ajan kierrosnopeudella 800 - 1 000 r/min. Laskeutuneelle aineelle kaadettiin 100 ml perusliuosta ja saatu seos lingottiin uudelleen.

Saatuun sedimenttiin pipetoitiin hyvin sekoittaen 5 ml ravintoliuosta, ja seos laimennettiin sitten ravintoliuoksella 400 ml:ksi. Laimennuksen jälkeen solususpension todettiin Zeiss'in käänteismikroskoopilla 125-kertaisella suurennuksella tarkasteltaessa sisältävän noin 20-25 solua näkökentässä. Laimennettu solususpensio jaettiin koeputkiin, 1 ml kuhunkin, ja Roux-pulloihin 100 ml kuhunkin. Solujen kasvun ja metabolian tarkkailu ja muistiinmerkitseminen suoritettiin päivittäin 6 vrk:n ajan. Heti, kun ravintoliuoksen väri muuttui punaisesta keltaiseksi, ravintoliuos vaihdettiin. Solujen kasvu oli hyvä solususpension oltua inkubaattorissa 37°C:ssa 6 vrk.

Putkissa olevilla soluviljelmillä suoritettiin edellä kuvattu in vitro koe taulukossa 1 luetelluilla sytostaateilla taulukossa mainituilla konsentraatioilla. 24 tunnin kuluttua määritettiin solujen morfologiset vauriot mikroskooppisesti. Solususpensio osoittautui herkäksi seuraavien sytostaattien suhteen: adriblastiini, vinkristiini ja proresidi. Kaikki muut luetelluista sytostaateista, tässä tapauksessa kuusi sytostaattia, osoittautuivat tehottomiksi.

Tämän jälkeen kokeessa käytettiin neljällä edellä olevalla menetelmällä valmistettua solususpensiota sisältävää Roux-pulloa, joiden sisältöä kokeiltiin taulukossa 1 ilmoitetuilla konsentraatioilla. Yksi pullo jäi käsittelemättömäksi kontrollinäytteeksi. Sytostaattisten aineiden, adriblastiinin, vinkristiinin ja proresidin vaikutettua soluihin 12 tuntia, näytteitä tarkasteltiin mikroskoopilla, jolloin havaittiin, että vain 60 % soluista oli muuttumattomia. Solut erotettiin linkoamalla 10 minuuttia kierrosnopeudella

800 - 1 000 r/min. Laskeutumalle lisättiin 10 ml uutta ravintoliuosta. Saadut heikennetyt solut suspendoitiin ravintoliuokseen koncentraationa 10^6 solua/ml. Suspensiota säilytettiin 4°C:ssa.

In vitro koe

Joukkoon koeputkia lisättiin kuhunkin 1 ml käsittelemätöntä solususpensiota, joka sisälsi 10^6 solua/ml. Nämä solut oli saatu edellä kuvatulla tavalla käsittelemällä syöpäkudosta trypsiinillä, mutta niitä ei kuitenkaan oltu käsitelty sytostaattisella aineella. Kuhunkin putkeen lisättiin päivittäin 6 vrk:n ajan 0,3 ml yhtä edellä saatua valmistetta, joka sisälsi adriblastiinilla, vinkristiinillä tai proresidilla heikennettyjä soluja. Kokeen aikana putkia inkuboitiin 37°C:ssa. 7-9 vrk:n kuluttua noin 80-90 % kussakin putkessa olevista käsittelemättömistä soluista oli keksinnön mukaisen valmisteiden vaikutuksesta tuhoutunut. Koska sytostaattinen aine oli huolella pesty pois valmisteista, voitiin todeta tämän tuloksen johtuvan solujen välisestä reaktiosta.

Kliininen käsittely

Edellä olevien koetulosten perusteella sekä muiden samanluonteisten lisäkokeiden perusteella ja eläinten syöpäkasvainten soluilla suoritettujen kokeiden jälkeen keksinnön mukaisia valmisteita käytettiin kliiniseen terapiaan. Yhtä poikkeusta lukuun ottamatta kaikilla potilailla oli myöhäisessä vaiheessa oleva syöpä, joka kirurgisista toimenpiteistä, sädehoidosta ja/tai sytostaattikäsitte-lystä huolimatta luokiteltiin kuuluvan vaiheeseen T 4 N3-5 M1c (luokitus: Union International contre le Cancer). Tällaisten potilaiden keskimääräinen elinaika on alle 60 vrk. Keksinnön mukaisia valmisteita käytettiin pääasiassa lisä-immuuniterapiana, jolla pyrittiin vahvistamaan immuunisysteemiä ennen sytostaattikäsitte-lyä vastaavalla sytostaattisella aineella. Kaikkiaan käsiteltiin 22 potilasta, joille kaikille oli ilmoitettu heidän tilansa ja suunniteltu käsittely. 14 potilaalla oli pahanlaatuinen munasarjasyöpä (yh- dellä potilaalla syöpä johtui mesosigmoidisyövän uusiutumisesta). neljällä rintasyöpä, yhdellä haimasyöpä, yhdellä retikuloendoteeli- sarkooma, yhdellä umpisuolisarkooma ja yhdellä kohdun runko-osan syöpä.

Potilaista otettiin kirurgisin toimenpitein syöpäkudosta, ja kudoksenäytteitä käsiteltiin edellä kuvatulla tavalla keksinnön mukaisten valmisteiden saamiseksi. Kullekin potilaalle annettiin erikseen valmistettuja solususpensioita kaikkiaan 6-8 kertaa 10 ml annoksina intragluteaali-injektioina. Jokainen 10 ml:n annos sisälsi 10^6 solua eli 1 ml valmistetta ravintoliuoksessa ja 9 ml fysiologista keittosuolaliuosta tai vasikanseerumia. Joissakin tapauksissa annettiin haluttaessa kunkin 10 ml:n annoksen yhteydessä 1 ml 0,5-%:ista lidokaiiniliuosta (ksylokaiini). Ensimmäisessä hoitosarjassa injektoiden lukumäärä riippui saatavissa olevien solujen lukumäärästä, ja injektioita annettiin useimmissa tapauksissa 5-8 injektiota 48 tunnin väliajoin. 8-20 vrk odotusajan jälkeen (huonokuntoisimmilla potilailla odotusaika oli ylärajalla) sytostaattikäsittely suoritettiin yksilöllisten koetulosten mukaan, useimmissa tapauksissa seuraavan ohjelman mukaisesti: 1 mg vinkristiiniä suonensisäisenä injektiona; kuuden tunnin kuluttua adriblastiinia suonensisäisesti 40 mg kehon pinnan m^2 :ä kohti; 48 tunnin kuluttua syklofosfamidia tai proresidia 25 mg/kehonpaino-kg liuotettuun 500 ml:aan fysiologista suolaliuosta. Adriblastiinin myrkyllisyydestä johtuen kahden sytostaattikäsittelysarjan väliin jätettiin kolmen viikon väliaika ennen kuin kaikkiaan 550 mg adriblastiinia annettiin. Milloin koetulos osoitti syöpäsolujen sietävän käytettyä sytostaattia, otettiin käyttöön viikon väliajoin toinen sytostaattinen aine, kuten 5-FU, metotreksaatti, leukoveriini tms.

Tällä käsittelyllä potilaiden tila parani sekä subjektiivisesti että objektiivisesti arvostellen. Paikallisia tai yleisiä sekundaarisia vaikutuksia ei esiintynyt. Vaikka solususpension voitiin olettaa olevan myrkyllistä, niin sen injisoiminen ei aiheuttanut paikallista tai yleistä punotusta tai turvotusta. Kivun tunnetta tai vastaavaa reaktiota ei havaittu. Paraneminen oli siinä määrin pysyvänlaatuista, että kaikissa tapauksissa voitiin viimeistään 20 vrk:n kuluttua aloittaa normaalisti vaarallinen sytostaattiterapia.

Neljälle edellä mainituista 22 potilaasta ei annettu jälkihoitona sytostaattihoitoa, koska he kieltäytyivät siitä tai heidän kasvaimensa olivat selvästi liian pitkälle kehittyneitä. Kuitenkin näidenkin potilaiden elinaika oli epätavallisen pitkä. Esimerkiksi 60 vuotiaalle naiselle, jonka rintasyöpä oli yli nyrkinkokoinen ja

jolla oli luumetastaaseja sekä osoitetusti aivometastaaseja, suoritettiin rinnan poisto ja sen jälkeen käsittely keksinnön mukaisella valmisteella. Ilman muuta terapiaa hän eli vielä 270 vrk.

Viittä potilasta käsiteltiin myös heterologisilla syöpäsolususpensioilla, joita he hyvin sietivät.

Kaikkien potilaiden hengissäpysymisaika on tällä hetkellä keskimäärin 350 vrk, joka on lähes kuusinkertainen aikaisempaan keskiarvoon verrattuna. Viisi potilasta oli edelleen hengissä 245-665 vrk kuluttua. Näistä kolmella ei esiintynyt kasvaimen uusiutumista, joihin kasvaimiin hoito oli siten tehonnut. Kaikki käsitellyt potilaat olivat hyvässä yleiskunnossa.

Seuraavassa kuvataan edellä mainituista 22 potilaasta erikseen kahden käsittely sekä lisäksi yhden muun potilaan käsittely keksinnön mukaisella valmisteella.

1) 46 vuotiaalla potilaalla oli sairaalaan tullessaan molemmissa rinnoissa kasvaimet, jotka olivat olleet niissä jo kaksi vuotta, sekä suuria kasvaimia vatsassa. Potilas oli erittäin huonossa yleiskunnossa. Yleisen esihoidon jälkeen hänen molemmat rintansa, joissa syöpä oli laajalti levinnyt, sekä imusolmukkeet kainaloista poistettiin kirurgisesti kahdessa leikkauksessa kesäkuussa 1978. 14 vrk myöhemmin poistettiin kohtu ja kaksi munasarjakasvainta. Muuta syöpäkudosta vatsapaidassa ja vatsakalvossa, imusolmukkeissa ja muissa paikoissa ei voitu kirurgisesti poistaa. Potilas ei saanut sädehoitoa, vaan hänelle annettiin 12 injeksiota keksinnön mukaista valmistetta, joka oli valmistettu hänen omista esikäsitellyistä syöpäsoluistaan (edellä olevan esimerkin mukaisesti), ja sen jälkeen hän sai yhdistettyä kemoterapiaa. Potilas toipui täydelleen immuuniterapian aikana ja sietäi hyvin sitä seuraavaa sytostaattikäsittelyä. Kaikkiaan 12 kuukauden kuluttua potilas ilmoitti olevansa hyvässä kunnossa. Hän pystyi hyvin hoitamaan työnsä eikä välttanut mitään vaivoja. Kliinisisissä tutkimuksissa ei havaittu kasvainten uusiutumista vatsan alueella eikä rinnan alueella. Käsitelyn alussa hänen kasvaintilanteensa oli vaiheessa T4 N5 Mlc.

2) 32 vuotiaalla potilaalla oli sairaalaan tullessaan suuri kasvain vatsassa. Hänen kohtunsa ja sen kaksi sivuelintä oli poistettu toisessa sairaalassa vuotta aikaisemmin suhteellisen munasarjasyöpäkasvaimen vuoksi. Tämän johdosta hän oli saanut myös syto-

staattihoitoa. Aikaisempi munasarjasyöpä aiheutti uusiutueessaan lähes lapsen pään kokoisen mesosigmakasvaimen, joka poistettiin. Mesosigmakasvaimen poistoa ei voitu suorittaa täydellisesti siten, että vain tervettä kudosta olisi jäänyt. Potilaalla oli myös mätästaaseja imusolmukkeissa ja lantion seinämässä. Potilaalle suoritettiin leikkauksen jälkeen lisähoitona immuuniterapiaan antamalla 12 injektiota hänen omista kasvaimistaan valmistettua preparaattia. Koska potilas sitten muutti pois, ei hänelle voitu antaa sytostaattihoitoa tämän jälkeen. Potilas palasi useita kertoja jälkitarkastukseen. 11 kk immuuniterapian alkamisesta hänen terveydentilansa oli erinomainen eikä kliinistä indikaatiota uusiutumuksesta havaittu. Koko vatsa oli kasvaimista vapaa.

3) 41 vuotiaalla, edellä kuvattuun potilasryhmään kuulumattomalla potilaalla oli sairaalaan tullessaan T1 vaiheessa oleva pieni kyhmy, joka oli mahdollisesti syöpäkasvain, vasemmassa rintarauhasessa. Mammografian, termografian ja solututkimuksen tulokset olivat vasemman rinnan suhteen positiiviset ja epävarmat oikean rinnan suhteen, jossa oli pieni kyhmy (Papanicolaou 3). Vasemmasta rinnasta poistettu kasvainkudoksen histologinen tutkimus osoitti sen olevan kovasyöpätyyppiä oleva rintasyöpä (T1 Nx Mo), jonka läpimitta oli noin 2 cm. Tämän potilaan tapaus kuvataan erillisenä, koska hänen syöpäkasvaimensa oli vasta alkuvaiheessa. Potilas suostui yksinkertaiseen nisän poistoon vasemmasta rinnasta, mutta kieltäytyi oikeaan rintaan kohdistuvista toimenpiteistä. Hän kieltäytyi myös sytostaatti- tai muusta hoidosta, mutta suostui soluhoidoon. Keksinnön mukaisesti hänelle annettiin heterologista solukäsittelyä valmisteella, joka oli valmistettu toisesta potilaasta saaduista rintasyöpäsoluista, joita oli käsitelty keksinnön mukaisesti. Solukäsittely suoritettiin edellä kuvatun menetelmän mukaisesti joka toinen päivä antamalla kuusi lihaksensisäistä injektiota 10 ml:n solususpensioannosta, joista jokainen sisälsi 10^6 solua. 12 kk käsittelyn jälkeen potilaan syöpä ei ollut uusiutunut. Oikeassa rinnassa oleva mahdollinen kasvain oli täysin hävinnyt.

Edellä olevista tutkimuksista ilmenee, että useimmissa tapauksissa ei ollut mahdollista antaa riittävän suuria annoksia materiaalin puutteen vuoksi. Edullisesti kullekin syöpäpotilaalle tulisi antaa hoitosarja, joka käsittää 5-6 injektiota aina 48 tun-

nin väliajoin yhden kuukauden aikana, sitten joka kolmas kuukausi ja sen jälkeen vastaavina kuukausina neljän peräkkäisen puolivuoden aikana ja lopuksi vastaavina kuukausina useiden peräkkäisten vuosien aikana. Tällaisia käsittelyjä voidaan suorittaa ainoastaan heterologisilla syöpäsoluilla, jotka tulisi ottaa mahdollisuuksien mukaan samankaltaisista elimistä, jollei autologisia soluja ole saatavissa. Heterologiset syöpäsolut voidaan sekoittaa suhteessa 1:1 lyofilisoitujen syöpäsolujen kanssa, joita ei tarvitse esikäsitellä.

Haluamatta sitoutua mihinkään erityiseen teoriaan, hakija katsoo seuraavan perusteella keksintönsä mukaisesti tuotettujen valmisteiden olevan tehokkaita syövän hoidossa: Keksinnön mukainen syövän käsittelymenetelmä kehitettiin perustuen olettamukseen, että pahanlaatuinen kasvainsolukko alkaa kasvaa kehospesifisten solujen autonomisen, progressiivisen ja liiallisen uudiskasvun johdosta. Keksinnön mukainen menetelmä perustuu suurelta osalta potilaan immunologisen vastustuskyvyn parantamiseen ennen sytostaattihoidon alkamista antamalla potilaalle injektioina ultrasuodatettuja kehospesifisiä sytostaattiesikäsiteltyjä syöpäsoluja, kuten edellä on kuvattu.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä valittujen syöpäsolujen eristämiseksi, viljelemiseksi ja kasvattamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

- 1) syöpäkasvaimesta otetaan syöpäsoluja,
- 2) näitä soluja viljellään inkuboimalla kasvuväliaineessa solunkasvatusolosuhteissa, jolloin saadaan soluviljelmä,
- 3) etukäteen määrättyihin, vaiheesta 2 saatuihin useisiin soluviljelmän annoksiin lisätään useita eri sytostaattisia aineita, ja kunkin sannonksen saamat näkyvät morfologiset vauriot havaitaan,
- 4) sytostaattisista aineista valitaan sellainen, joka aiheuttaa mainituille, sille herkille soluille näkyviä morfologisia vaurioita,
- 5) vaiheessa 2 valmistetun viljelmän loppuosaa käsitellään vaiheessa 4 valitulla sytostaattisella aineella inkuboimalla siten, että noin 30-70 % soluista mikroskooppitarkastelussa osoittautuu vaurioitumattomiksi ja että mainitut solut eivät täysin kuole, vaan ainoastaan osittain heikkenevät,
- 6) vaiheessa 5 saadut heikennetyt solut pestään fysiologisesti hyväksyttävällä liuoksella olennaisesti kaiken sytostaattisen aineen poistamiseksi heikennetyistä soluista, ja

7) näin käsitellyt solut suspendoidaan fysiologisesti hyväksyttävään nesteeseen farmaseuttisesti hyväksyttävän valmisteensaamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen 5 inkubointi suoritetaan noin 4-15 tunnin aikana.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen 5 mukainen inkubointi suoritetaan noin 6-12 tunnin aikana.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen 5 mukainen inkubointi suoritetaan noin 37°C:ssa.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen 5 mukainen inkubointi suoritetaan siten, että noin 40-60 % soluista jää vaurioitumattomiksi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä valmistettu syövän selektiiviseen hoitoon tarkoitettu farmaseuttinen valmiste, *PL Patenttivaatimus 82/1000* t u n n e t t u siitä, että se sisältää syöpäsoluja, jotka on heikennetty käsittelemällä syostaattisella aineella, jonka suhteen syöpäsolut ovat herkkiä.

7. Farmaseuttinen valmiste valittujen syöpäkasvainten käsittelyyn, t u n n e t t u siitä, että se sisältää olennaisesti patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä valmistettuja heikennettyjä syöpäsoluja suspensiona.

8. Menetelmä sellaisten heikennettyjen, valittujen syöpäsolujen suspension valmistamiseksi, joihin valitun sytostaattisen aineen sytostaattinen aktiivisuus vaikuttaa, t u n n e t t u siitä, että syöpäsolujen soluviljelmää käsitellään sytostaattisella aineella, joka vaikuttaa näihin soluihin, ja että soluja inkuboidaan tällöin niin kauan, että mikroskooppitutkimus osoittaa vain noin 30-70 % mainituista soluista olevan vaurioitumattomia, ja että näin heikennetyt solut pestään fysiologisesti hyväksyttävällä liuoksella sytostaattisen aineen poistamiseksi siitä.

9. Farmaseuttinen valmiste valittujen syöpäkasvainten käsittelyyn, *PL Patenttivaatimus 82/1000* t u n n e t t u siitä, että se koostuu patenttivaatimuksen 8 mukaisella menetelmällä valmistetusta heikennettyjen syöpäsolujen suspensiosta.

10. Menetelmä valittujen syöpäkasvainten käsittelemiseksi parantamalla syövästä kärsivän henkilön immunologista lähtöasemaa ennen sytostaattista kemoterapiaa, t u n n e t t u siitä, että

a) mainitulle henkilölle annetaan etukäteen määrätty määrä patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä tuotettuja soluja niin kauan, että potilaan sietokyky tämän sytostaattisen kemoterapeutin suhteen paranee, ja

b) potilaalle annetaan tätä kemoterapeuttista ainetta.

11. Farmaseuttinen valmiste syövän käsittelyyn, *PL Patenttivaatimus 82/1000* t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu kasvattamalla syöpäsoluja

a) ottamalla syöpäkasvaimesta syöpäsoluja,

b) viljelemällä näitä soluja inkuboimalla kasvuväliaineessa solunkasvatusolosuhteissa soluviljelmän saamiseksi,

c) käsittelemällä vaiheesta b saatua soluviljelmää sytostaattisella aineella ja inkuboimalla, kunnes noin 30-70 % syöpäsoluista

mikroskoopitarkastelussa osoittautuu vaurioitumattomiksi, jolloin mainitut solut eivät ole täysin kuolleet, vaan ainoastaan osittain heikentyneet,

d) erottamalla vaiheessa c saadut heikentyneet solut linkoamalla ja pesemällä ne fysiologisesti hyväksyttävällä liuoksella olennaisesti kaiken sytostaattisen aineen poistamiseksi heikennettyistä soluista, ja valmistamalla suspendoimalla näin heikennettyistä erotetuista soluista farmaseuttisesti hyväksyttävä valmiste.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa 1 käytetään syöpäsoluina erillisiä askiittisyöpäsoluja tai leukemiasyöpäsoluja.

13. Patenttivaatimuksen 6 mukainen farmaseuttinen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se säilytetään jäädytettynä.

14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisävaiheena saatu, heikennettyjä soluja sisältävä suspensio jäädytetään.

15. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisävaiheena saatu, heikennettyjä soluja sisältävä suspensio lyofilisoidaan.

16. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että osa heikennettyjä soluja sisältävästä suspensiosta jäädytetään ja osa heikennettyjä soluja sisältävästä suspensiosta lyofilisoidaan, jäädytettyä ja lyofilisoitua valmistetta säilytetään sopivissa säilytysolosuhteissa ja jäädytetty valmiste sulatetaan ja siihen sekoitetaan yhtä suuri määrä lyofilisoituja soluja.

17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa 5 saadut heikennetyt solut erotetaan linkoamalla kierrosnopeudella noin 800 - 1 000 r/min ja pestään sitten vaiheen (6) mukaisesti.

Patentkrav:

1. Förfarande för isolering, odling och drivning av valda kancerceller, k ä n n e t e c k n a t av steg för

1) tillhandahållande av en källa av kancerceller;

2) odlande och inkuberande av nämnda celler i ett näringshaltigt tillväxtmedium under celltillväxtförhållanden för erhållande av en cellkultur;

3) utsättande av ett flertal i förväg bestämda partier av cellkulturen från steg (2) för ett flertal cytostatiska medel och observerande av synlig morfologisk skada i varje parti;

4) väljande av det cytostatiska medel som åsamkar synlig morfologisk skada på nämnda mottagliga celler;

5) behandlande av återstående delen av cellkulturen från steg (2) med cytostatiska medlet från steg (4) och inkuberar så, att från ca. 30 till 70 % av nämnda celler förblir intakta under mikroskopisk undersökning och så att nämnda celler icke helt dödas utan endast försvagas partiellt;

6) tvättande av de försvagade cellerna från steg (5) med en fysiologiskt godtagbar lösning för avlägsnande av väsentligen allt cytostatiskt medel från nämnda försvagade celler; och sedan

7) suspenderande av de sålunda behandlade cellerna i en fysiologiskt godtagbar vätska för ett farmaceutiskt godtagbart preparat.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkubationen i steg (5) utföres under en tid av ca. 4-15 timmar.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkubationen i steg (5) utföres under en tid av 6-12 timmar.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkubationen i steg (5) utföres vid en temperatur av ca. 37°C.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkubationen i steg (5) utföres så, att ca. 40-60 % av nämnda celler förblir intakta.

6. Farmaceutiskt preparat för behandling av valda cancer och framställt genom förfarandet i patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det innehåller mottagliga cancerceller som försvagats genom behandling med ett cytostatiskt medel, för vilka nämnda cancerceller är känsliga.

7. Farmaceutiskt preparat för behandling av cancer, k ä n n e t e c k n a t därav, att det väsentligen består av en suspension av försvagade cancerceller som producerats genom förfarandet i patentkravet 1.

8. Förfarande för framställning av en suspension av försvagade, valda cancerceller som är mottagliga för cytostatisk aktivitet hos ett valt cytostatiskt medel, k ä n n e t e c k n a t därav, att man behandlar en cellkultur av cancerceller med ett cytostatiskt medel, för vilket nämnda celler är känsliga, och inkuberar en tid tills mikroskopisk undersökning indikerar att endast ca. 30-70 % av de sålunda behandlade cellerna är intakta, och sedan tvättar de sålunda försvagade cellerna med en fysiologiskt godtagbar lösning för avlägsnande av nämnda cytostatiska medel.

9. Farmaceutiskt preparat för behandling av valda cancer, k ä n n e t e c k n a t därav, att det väsentligen består av en suspension av försvagade cancerceller som framställts enligt förfarandet i patentkravet 8.

10. Förfarande för behandling av valda cancer genom förbättrande av immunologiska utgångsförhållandet hos en person som lider av nämnda cancer före cytostatisk kemoterapi, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet inkluderar:

a) administrerande av en i förväg bestämd mängd av celler som framställts genom förfarandet i patentkravet 1 åt nämnda person under sådan tid tills toleransen hos nämnda patient gentemot nämnda cytostatiska medel förbättrats, och därefter

b) administrerande av nämnda kemoterapeutiska medel.

11. Farmaceutiskt preparat för behandling av en cancer, k ä n n e t e c k n a t därav, att det producerats genom drivande av nämnda cancerceller genom

a) tillhandahållande av en källa för nämnda cancerceller;

b) odlande och inkuberande av nämnda celler i ett näringshaltigt tillväxtmedium under celltillväxtförhållanden för erhållande av en cellkultur;

c) behandlande av cellkulturen från steg (b) med ett cyto-
statiskt medel och inkuberande av den sålunda behandlade kultu-
ren tills ca. 30-70 % av nämnda celler förblir intakta under
mikroskopisk undersökning och så att nämnda celler icke dödas
helt utan endast partiellt försvagas;

d) separerande av de försvagade cellerna genom centrifuge-
ring och tvättande av de försvagade cellerna från steg (c) med
en fysiologiskt godtagbar lösning för avlägsnande av allt cyto-
statiskt medel från nämnda försvagade celler; och att de sålunda
försvagade och separerade cellerna suspenderas i ett farmaceu-
tiskt godtagbart preparat.

12. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att i steg (1) tillhandahålls en källa av indivi-
duella kanceraskitceller eller leukemiceller.

13. Farmaceutiskt preparat enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det föreligger i fruset lagringstill-
stånd.

14. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att det inkluderar ett ytterligare steg för frysan-
de av den resulterande lösningen av försvagade celler.

15. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att det inkluderar ett ytterligare steg för lyofili-
serande av den resulterande lösningen av försvagade celler.

16. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att det inkluderar frysande av en del av den resul-
terande lösningen av försvagade celler och lyofiliserande av en
annan del av den resulterande lösningen av försvagade celler,
hållande av den frusna och den lyofiliserade delen under lagrings-
förhållanden och sedan upptinande av den frusna delen och blan-
dande av densamma med en lika stor mängd lyofiliserade delen un-
der lagringsförhållanden och sedan upptinande av den frusna delen
och blandande av densamma med en lika stor mängd lyofiliserade
celler.

17. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t
därav, att de försvagade cellerna från steg (5) separeras i en
centrifug med en hastighet av ca. 800 till ca. 1000 rpm., varef-
ter tvättas enligt steg (6).



Missing part

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE *K 2024458 (30.12/04) ja K 2643215 (A61K 41/00)*

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Nature vol. 248 (1974) 690-691

Nature vol. 209 (1966) 694-696

24/6-85 Leena Kivisto

Allekirjoitus