

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) FI 752064 A7

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **752064**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.07.1975**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.07.1975**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.01.1976**

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

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

17.07.1974 SE 7409359

23.07.1974 SE 7409589

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Astra Läkemedel Ab, Fack 151 85 Södertälje, Sverige, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Nabih, Ibrahim Mohamed, Egypt, EGYPTI, (EG)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

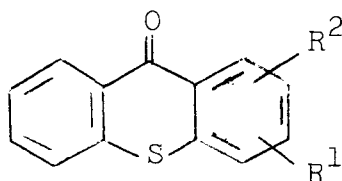
**Halkiomatotartunnan, kasvaimen kasvun ja maksamatotaudin immunologinen ja immunoterapeuttinen torjunta
Immunologisk och immunoterapeutisk kontrol av schistosomiasisinfektion, tumörtillväxt och fascioliasis**

Astra Läkemedel Aktiebolag, 151 85 Södertälje, Ruotsi

Halkiomatotartunnan, kasvaimen kasvun ja maksamatotaudin immunologinen ja immunoterapeuttinen torjunta -
Immunologisk och immunoterapeutisk kontrol av schistosomiasis-infektion, tumörtillväxt och fascioliasis

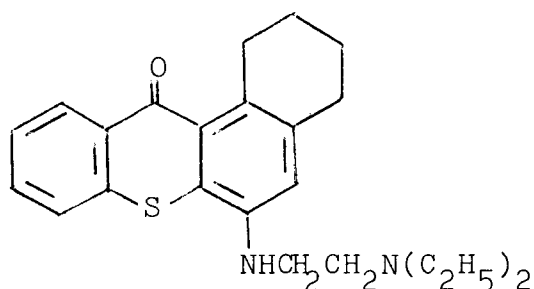
Tämä keksintö koskee menetelmää farmakologisten ominaisuuksien aikaansaamiseksi biologisiin systeemeihin ja tällä tavoin saatua valmistetta. Keksintö koskee myös menetelmää halkiomatotaudin, kasvaimen kasvun ja maksamatotaudin immunologisen ja immunoterapeuttisen torjunnan aikaansaamiseksi.

Tarkemmin sanoen farmakologiset ominaisuudet saavutetaan käsittelemällä biologista systeemiä yhdisteellä, jolla on kaava

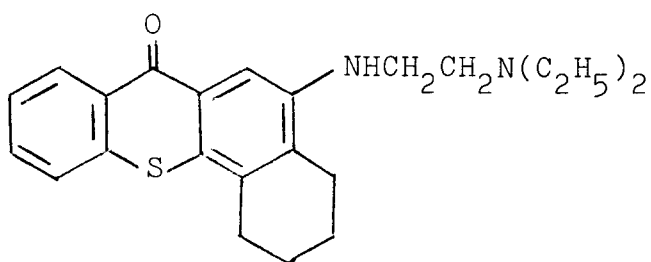


jossa R^1 on ryhmä $-NHCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$ ja R^2 on tiaksantonimolekyyliin kondensoitu sykloheksyylijäännös.

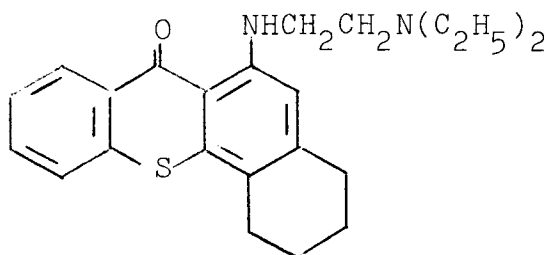
Erityisen suositeltavia ovat yhdisteet 4-(β -dietyyliaminoetyyliamino)-1,2-sykloheksanotiaksantoni



2-(β-dietyyliaminoetyyliamino)-3,4-sykloheksenotiaksantoni



ja 1-(β-dietyyliaminoetyyliamino)-3,4-sykloheksenotiaksantoni



Näiden yhdisteiden valmistuksen kuvauksen suhteen katso amerikkalainen patentti n:o 3 767 674.

Keksintö käsittää myös sopivat kaavan I yhdisteiden suolat.

Useita biologisia systeemejä voidaan käyttää käsittelyyn kaavan I yhdisteillä.

Näiden yhdisteiden soveltamista erilaisiin biologisiin systeemeihin kuvataan alla erikseen kullekin biologiselle systeemille ja niiden yhteydessä selostetaan kullekin biologiselle systeemille ominaisia ongelmia.

A. Kaavan I yhdisteiden käyttö cercaria-heimon eliöihin

Cercaria-heimo on tartuntaa aiheuttava vaihe halkiomatojen elämän kiertokulussa. Ne kehittyvät ja irtaantuvat erityisestä väli-isännäs-

tä, joka on makean veden etanoiden erikoislaji. Kun cercariae-eliöt pääsevät toisen isännän, esim. ihmisten kehoon tartunnan kautta, ne kehittyvät sukukypsiksi tai täysi-ikäisiksi madoiksi, halkiomadoiksi. Nämä elävät porttiverisysteemissä ja sitä muodostavissa suolilieve-laskimoissa. Huolimatta siitä, että nämä madot elävät veren ympäröimänä tässä systeemissä, ne selviytyvät isäntäeläimen puolustussysteemistä. On olemassa erilaisia teorioita ja selityksiä sille tavalle, jolla madot selviytyvät isäntäeläimen immunologisesta systeemistä, kuten esimerkiksi, että ne peittävät itsensä isäntäeläimen antigeeneillä, jotka tekevät ne tunteettomiksi isäntäeläimen immunipuolustuskomponenteille. Tämän systeemin komponenteista selviämisen yhteydessä on enemmän tai vähemmän samankaltaisuutta sen tavan kanssa, jolla kasvainsolut myös selviävät isäntäeläimen immunisysteemistä, ollen täysin tunteeton isäntäeläimelle.

Tämä sovellutus kuvaa ja osoittaa uuden tavan immunisysteemin käynnistämiseksi ja halkiomatotartunnan sekä kasvainkasvun torjumiseksi immunologisesti ja immunoterapeuttisesti (hoito). Molemmat vaikutukset voidaan saavuttaa hyvin tuloksin antamalla kemiallisesti esikäsiteltyjä cercariae-eliöitä. Cercariae-eliöiden käsittelyyn käytettävät yhdisteet (kemikaalit) ovat yllä olevan yleisen kaavan I mukaisia.

Cercariae-eliöitä käsitellään näillä aineilla koelasissa 24 tunnin ajan suspensiossa, jossa on 2000 cercariae-eliötä 40 ml:ssa vettä, joka sisältää 0,2 mg kaavan I yhdistettä, esim. 1-(β -dietyyliamino-etyyliamino)-3,4-sykloheksenotiaksantonia (väkevyydeltään 2 mg/ml:n liuoksesta). 10 minuutin kuluttua cercariae-eliöt alkoivat halvaantua ja lopettivat dynaamisen liikkeensä. 24 tunnin kuluttua cercariae-eliöt ovat kuolleita ja cercariae-eliöt ovat imeneet itseensä suurimman osan liuoksessa olevasta aineesta (spektraalilaskenta osoitti, että kukin cercaria-eliö imee itseensä n. 0,25 μ g lisättyä ainetta). Mikroskooppisesti havaittiin, että cercariae-eliöt saivat kudoksiinsa tämän aineen värin. Käsitellyt cercariae-eliöt jätetään 24 tunnin jälkeen laskeutumaan 4⁰C:ssa. Yläpuolella oleva neste poistetaan ja kerrostuneet cercariae-eliöt otetaan talteen ja suspendoidaan uudelleen fysiologiseen liuokseen, esim. BSS-liuokseen (tasapainoitettu suolapuskuroitu liuos). Niiden laskettiin vastaavan standardilukemaa millilitraa kohti suspensiota. Esimerkiksi 200-300 esikäsiteltyä cercariae-eliötä käytettiin alla kuvatuissa kokeissa.

Halkiomatotautia vastaan:

a) Immunologiseen torjuntaan:

Kuudelletoista CBA-sukuiselle hiirelle annettiin vatsakalvon sisäisellä ruiskeella 1 ml yllä kuvattua kemiallisesti esikäsiteltyä cercaria-suspensiota kolmasti joka toinen päivä. Kahden viikon kuluttua 8 hiirtä tästä ryhmästä altistettiin tartunnalle tuoreilla, elävillä, myrkyllisillä cercariae-eliöillä yhdessä toisen immunoimattoman neljän hiiren ryhmän kanssa. Seurasi tartunnan tarkkailua ja seuranta 8 viikon kuluttua tartunnan jälkeen sekä immunoidulla että immunoimattomalla ryhmällä. Munien määrä ja erittyminen ja sen jälkeen ruumiinavaus osoitti tartunnan kehittymistä vertailueläimissä (immunoimattomat) kun taas immunoidussa ryhmässä se ei onnistunut kehittymään.

b) Immunoterapeuttiseen torjuntaan:

Kuudelle ACA-sukuiselle hiirelle, joilla jo oli todettu Schistosoma mansoni-tartunta ja joiden ulosteissa esiintyi voimakasta munien erittymistä, annettiin vatsakalvonsisäisesti ruiskeilla kolmena ruiskeena joka toinen päivä 1 ml suspensiota, joka sisälsi esikäsiteltyjä cercariae-eliöitä. Kuuden viikon kuluttua käsittelyn jälkeen hiiriryhmä tutkittiin munien lukumäärän ja ruumiinavauksen avulla. Vain kuolleita tuhoutuneita matoja ja kuolleita mustia munia oli läsnä isäntäeläinten kudoksissa. Nämä löydökset osoittavat, että todetun tartunnan käsittely voidaan parantaa kemiallisesti esikäsitellyillä cercariae-eliöillä.

Kasvaimissa:

Immunoterapeuttiseen hoitoon:

Esimerkki

Hiirien ryhmille (6 hiirtä jokaisessa), joilla oli todettuja Ehrlich-verivatsasyöpäkasvaimia (ELD) yhdessä ryhmässä ja TA₃-tyyppiä (nisäsyöpä) tai EL₄-tyyppejä (hiirileukemia) sen jälkeen, kun niihin oli istutettu 10⁵ tuoretta, myrkyllistä kasvainsolua, annettiin vatsakalvonsisäisesti tai ihonalaisesti yksi ml yllä kuvattua suspensiota, joka sisälsi n. 300 kemiallisesti esikäsiteltyä cercariae-eliötä kerran joka toinen päivä kolme kertaa. Kasvainkoon, solujen lukumäärän ja isäntäeläinten painojen seuranta osoitti selvää takaisinpalaamista kasvainkoossa, mahdollisesti täydellistä paranemista joissakin tapauksissa. Tämä kuvaa uutta kasvien hoitotapaa.

B. Kaavan I yhdisteiden käyttö Lymnae-tyyppisiin etanoihin ja meta-cercaria-eliöihin

Maksamatotauti on loistauti, jonka aiheuttaa tartunta *Fasciola hepatica* lajilla (maksamato), joka normaalisti elää lampaiden, nautakarjan ja ihmisen maksoissa. Täysi-ikäinen mato elää sappitiehyissä, joihin munat lasketaan ja tyhjentyvät suolikuonaan. Ripsitoukka selviytyy munista ja leviää sen erikoiseen väli-isäntään, Lymnae-tyyppisiin etanoihin, joissa tartuttava muoto, meta-cercaria kehittyy ja joista se vapautuu tartuttamaan lopullista isäntäeläintä ihmistä tai nautakarjaa.

Taudin hoito kemiallisin keinoin on monimutkaista ja saavuttaa harvoin menestystä johtuen käytettyjen aineiden myrkyllisyydestä isäntäeläimelle. Tauti aiheuttaa valtavia taloudellisia ja ihmistyövoiman menetyksiä. Joissakin maissa tartunta kotieläimillä nousee 25-30 %:iin.

Tämä patenttihakemus kuvaa tehokasta tapaa sekä tartunnalta suojaamiseksi että jo todettujen tartuntojen hoitamiseksi.

Perinnöllinen ja antigeeninen riippuvuussuhde hallitsee tavallisesti biologista spesifisyyttä toisen tartuttavan muodon ja sen erityisen väli-isännän välillä, jossa se kehittyy ennen kuin se vapautuu leviämään lopulliseen isäntäeläimeensä.

Tämä johdattaa mieleen tämän riippuvuussuhteen hyväksikäytön järjestyksellisenä lähestymistapana taistelussa tautia vastaan. Näistä syistä ehdotettiin väli-isännän, "Lymnae"-etanoiden tai välivaiheen, tartuttavan vaiheen kemiallista käsittelyä, sillä molemmilla on yhteiset antigeenit.

Kemiallinen käsittely on ajateltu toteutettavaksi erikoisilla kemiallisilla systeemeillä, jotka voivat saada aikaan tai panna alulle kemiallisia muutoksia synnynnäisten antigeenien luonteessa. Niinpä antigeenien kemiallisella muutoksella ja sitä seuraavalla solun välittämän immuunisuuden alkuunpanolla saavutetaan viivytetty yliherkyys, immunologinen reaktio, joka on tavallisesti vastuussa siirtymisen tai tartunnan torjunnasta.

Tässä työssä käytetyn kemiallisen systeemin tyyppi on yllä olevan yleisen kaavan I yhdisteet. Tämän tyyppiset rakenteet, joilla on taipumus asettua DNA-matriisiin johtuen tiaksantonirungosta ja mukana

olevan molekulaarisen tetraliinisysteemin reaktiivisuudesta, pyrkivät häiritsemään DNA/RNA-systeemistä riippuvaa proteiinisynteesiä, mikä johtaa näin antigeenisten ominaisuuksien muuttumiseen.

Näissä kokeissa kemiallisesti esikäsitellyistä etanoista tai kemiallisesti esikäsitellyistä meta-cercariae-eliöistä saatuja uutteita annettiin tartuttamattomille eläinryhmille, jotka myöhemmin altistettiin loisen tartunnalle. Tartunnan kehittymisen myöhempi tutkiminen esi-immunoiduilla ryhmillä verrattuna vertailuryhmiin osoitti tartunnan epäonnistumista immunoiduissa eläimissä samalla, kun se kehittyi vertailueläimissä.

Toisissa kokeissa, joissa käytettiin jo tartutettuja eläimiä uusien antigeenien terapeuttisten vaikutusten tutkimiseen, kemiallisesti esikäsitellyistä etanoista tai esikäsitellyistä meta-cercariae-eliöistä saatu uute osoittautui molempia teitä, sekä ihonalaisesti että vatsakalvonsisäisesti olevan tehokas poistamaan tartunnan käsitellyistä isäntäeläimistä, mikä todettiin munien erittymisen lakkaamisena ja matojen tuhoutumisena ruumiinavaustutkimuksella.

Esimerkki

Neljän Lymneae-tyyppisen etanan annettiin reagoida 4-(β -dietyyliamino-etyyliamino)-1,2-sykloheksenotiaksantonin kanssa liuoksessa, jonka väkisyys oli 4 mg/etana. 24 tunnin kuluttua yhdiste oli lähes täysin imeytynyt etanoihin ja pieni jäännösosa siitä oli muuttunut väriltään keltaisesta vaaleanpunaiseksi. Etanoiden kuoret poistettiin ja pehmeitä kudoksia uutettiin 5,8 %:ssa natriumkloridiliuoksessa, jonka tilavuus oli 0,75 ml/etana. Homogeeninen osa sentrifugoitiin ja yläpuolinen liuos laimennettiin vastaamaan 1,5 ml/etana 2 %:ssa NaCl-liuoksessa (Liuos I). Tätä käytettiin puheena oleviin tutkimuksiin.

Meta-cercariae-eliöiden kemikaalikäsittely toteutettiin suspendoimalla 200-250 meta-cercariae-eliötä liuokseen, jossa oli 10 ml 1-(β -dietyyliamino-etyyliamino)-3,4-sykloheksenotiaksantonia (laimennus 1 mg/ml), 24 tunnin ajan. Analyysi osoitti aineen imeytymistä cercaria-eliöihin n. 50 μ g/cercaria-eliö. Esikäsitellyt cercariae-eliöt eristettiin sitten ja suspendoitiin uudelleen 0,9 %:seen NaCl-liuokseen.

Immunoointikokeet:

Kahdesta kuuden hiiren ryhmästä toiselle ryhmälle annettiin 0,4 ml liuosta I joko ihonalaisesti tai vatsakalvonsisäisesti kolme kertaa kerran joka päivä. Toiselle ryhmälle annettiin 10-12 esikäsiteltyä cercaria-eliötä samoin jompaa kumpaa tietä. Kahden viikon kuluttua molemmat ryhmät altistettiin tartunnalle antamalla (mahalaukkusyöttöputkella) 6-8 meta-cercaria-eliötä/hiiri molemmille ryhmille yhdessä vertailuryhmän kanssa.

Molempien ryhmien immunoitujen ja vertailuryhmän tutkiminen seuraamalla munanerittymistä ja ruumiinavaustutkimuksella osoitti tartunnan kehittymistä vertailueläimissä ja sen epäonnistumista esi-immunoiduissa eläimissä.

Immunoterapiakokeet:

Kahdesta hiirien (ACA-sukuista) ryhmästä, jotka jo oli tartutettu maksamatotaudilla ja jotka osoittivat munaneritystä ulostuksissaan, annettiin toiselle 0,4 ml liuosta I joko ihonalaisesti tai vatsakalvonsisäisesti kolme kertaa joka toinen päivä. Toiselle ryhmälle annettiin jompaa kumpaa tietä 10-12 esikäsiteltyä cercaria-eliötä. Kolmen viikon kuluttua käsittelyn jälkeen seurasi tutkimus seuraamalla munaneritystä tai matojen tuhoutumista käsitellyissä hiirissä ruumiinavauksen avulla. Molemmissa käsitellyissä ryhmissä munat olivat lakanneet erittymästä ja ruumiinavauksessa löydettiin kuolleita, tuhoutuneita matoja. Tartunnan jatkumista ja siihen liittyvää munaneritystä havaittiin vertailueläimillä.

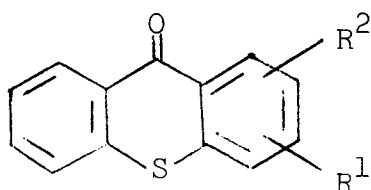
Tätä lähestymistapaa ja käyttöperiaatetta, nimittäin antigeenejä, jotka ovat peräisin loisen tartuttavasta välivaiheesta tai itse loisen väli-isännästä, jossa välivaihe kehittyy ja jolla on yhteinen antigeeni sen kanssa, esim. Lymneae-tyyppisiä etanoita maksamatotaudin kyseessä ollen tai esim. Hetrophyes hetrophyes-lajin kyseessä ollen, jossa tapauksessa voitaisiin käyttää antigeenejä, jotka on saatu Perinella conica-tyyppisistä väli-isäntäetanoista; voitaisiin käyttää yleispätevästi suojelemaan lopullista isäntäeläintä tai hoitamaan sitä tartuntaa vastaan.

Kuitenkin käsittelemättömästä väli-isännästä, esim. Lymneae-etanoista saatuja uutteita maksamatotaudin kyseessä ollen tai tartunnan käsittelemätöntä välitilaa, esim. meta-cercariae-eliötä voitaisiin yhtä

hyvin käyttää aikaansaamaan haluttu immunologinen ja immunoterapeuttinen torjunta, mutta pienemmällä teholla kuin esikäsiteltyjä eliöitä käytettäessä.

Patenttivaatimukset

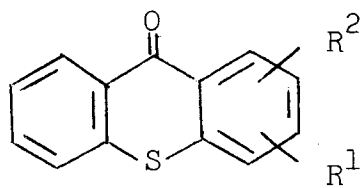
1. Valmiste a) halkiomatotaudin ja kasvaimien kasvun tai b) maksamatotaudin torjuntaan, t u n n e t t u siitä, että se sisältää a) cercariae-eliöitä tai b) meta-cercariae-eliöitä tai Lymneae-etanoiden uutetta, joita on esikäsitelty yhdisteellä, jolla on kaava



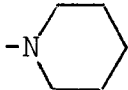
I

jossa R^1 on ryhmä $-NHCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$ ja R^2 on sykloheksyylijäännös, joka on kondensoitu tiaksantonimolekyyliin.

2. Menetelmä a) cercariae-eliöiden tai b) meta-cercariae-eliöiden tai Lymneae-etanoiden käsittelemiseksi, t u n n e t t u siitä, että levitetään a) cercariae-eliöille tai b) meta-cercariae-eliöille tai Lymneae-etanoille patenttivaatimuksen 1 mukaista yhdistettä.
3. Menetelmä a) halkiomatotaudin ja kasvaimien kasvun tai b) maksamatotaudin hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että annetaan hoidon tarpeessa olevalle isäntäeläimelle farmaseuttisesti hyväksyttävä määrä a) cercariae-eliöitä tai b) meta-cercariae-eliöitä tai Lymneae-etanoiden uutetta, jota on esikäsitelty patenttivaatimuksen 1 mukaisella yhdisteellä.
4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen valmisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että käsitellään a) cercariae-eliöitä tai b) meta-cercariae-eliöitä tai Lymneae-etanoita yhdisteellä, jolla on kaava



I

jossa R^1 on $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  tai 

ja R^2 on sykloheksyylijäännös, joka on kondensoitu tiaksantonimolekyyliin.