

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 972744 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **972744**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**A23L 1/305  
A61K 31/195**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.02.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.06.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.08.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **22.02.1996 PCT/EP1996/000739**  
Internationell ansökan - International  
application

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

23.02.1995 US 392694 14.06.1995 GB 9512100

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Novartis Nutrition AG**, Monbijoustrasse 118 3011 Bern, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Schneider, Heinz**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Papula Oy**, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

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

**Aminohappokokoonpanoja ja niiden käyttö kliinisessä ravinnossa  
Aminosyresammansättningar och användning därav i klinisk näring**

## AMINOHAPPOSEOKSIA JA NIIDEN KÄYTTÖ SAIRAALARAVINNOSSA

Keksintö koskee spesifisten aminohappojen käyttöä lääkeaine tai ravintoformulaatiossa, jota voidaan antaa hoidollisesti potilaille, jotka kärsivät monista sairauksista ja patologisista tiloista.

Nyt on yllättäen havaittu, että m.m. glysiini soveltuu kohonneiden TNF-tasojen aiheuttamien lukuisien sairaustilojen ja vammauttavien tai muiden patologisten tilojen metabolisten vaikutusten minimoimiseen ja/tai estämiseen.

Edellä mainittujen vaikutusten valossa tuotetaan farmaseuttisia seoksia, formulaatioita ja ruokavalioita, jotka sisältävät glysiiniä, samoin kuin menetelmiä glysiinin käyttämiseksi. Seoksissa, formulaatioissa ja ruokavalioissa ja keksinnön menetelmissä käyttöä varten glysiini käytetään tarkoituksenmukaisesti vapaan aminohapon muodossa, glysiinin esiasteiden, erityisesti alaniinin tai seriinin, muodossa vastaavasti vapaan aminohapon muodossa, mainittujen aminohappojen fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai aminohappojen ja/tai niiden fysiologisesti hyväksyttävien suolojen seosten muodossa. Glysiiniä käytetään edullisesti vapaan aminohapon muodossa, fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai glysiini-seoksen muodossa vapaan aminohapon muodossa glysiinin ollessa fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa; edullisimmin glysiini on vapaan aminohapon muodossa.

Hakemuksessa käytettynä termin keksinnön aminohappo on tarkoitus viitata glysiiniin, alaniiniin ja/tai seriiniin vapaan aminohapon muodossa ja/tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa.

Siten keksintö tuottaa ainakin yhden aminohapon, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa kuoliokasvaintekijän (TNF) tasojen

alentamiseksi potilaissa, joissa tasot ovat kohonneet niiden yli, jotka välittävät fysiologista homeostaasia ja paikallista tulehtumista. Tällainen TNF-tasojen alentaminen voidaan saada aikaan esim. ehkäisemällä tai alentamalla:

- (i) makrofagityyppisten solujen kuoliokasvaintekijän (TNF) tuotantoa;
- (ii) TNF:n vapautumista makrofagityyppisistä soluista; ja/tai
- 10 (iii) TNF:n sitoutumista TNF-reseptorien avulla.

Ilmaisulla "kohonneet sen yli, joka välittää fysiologista homeostaasia ja paikallista tulehtumista" tarkoitetaan TNF-määrää, joka on suurempi kuin kehon lämpötilan, unen ja ruokahalun vuorokausirytmien säätelyyn tarvittava minimi tai autoeritteisten ja lisäeritteisten vaikutusten kohdistamiseen niitä soluja ympäröiviin soluihin, joissa TNF tuotetaan tai eritetään sisäisten tulehdusvaikutusten pitämiseksi etäällä tällaisista soluista, tarvittava minimi.

20 Keksintö tuottaa lisäksi ainakin yhden aminohapon, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa makrofagityyppisten solujen aiheuttaman - TNF-välitteisen - ainakin yhden proteiinin, joka on valittu ryhmästä interleukin 1, interleukin 2, interleukin 6, interleukin 8, interleukin 10, endoteeli-, verihiutale- ja leukosyyttiselektiini, leukosyytin toimintaan liittyvä antigeeni 1, myö-

30 häisaktivointiantigeeni 4, solujen väliset adheesiomolekyylit, verihiutaletekijä 4, neutrofiili attraktio/aktivointiproteiini, Sialyl-Lewis-X, gamma-interferonisyntyyiset peptidit, makrofagitulehdukselliset proteiinit alfa ja beta, epiteeliperäinen neutrofiilinen attraktioaine, granulosyytin kemotaktinen proteiini 2, monosyytin kemotaktinen proteiini 1, suonisolun adheesiomolekyyli 1 ja lymfosyytin funktionaa-

linen antigeeni 3, tuotannon estämiseksi tai vähentämiseksi.

Samalla kun keksinnön mukainen käyttö koskee erityisesti niitä makrofagityyppisiä soluja, jotka  
 5 ovat veressä (monosyytit ja yksi-tumaiset fagosyytit), maksassa (Kupffer-solut), hermojärjestelmässä (mikroglia-solut), ruoansulatusjärjestelmässä (suolilieve/suoli), sydämessä, munuaisissa ja luussa (luusoluperäiset makrofagit), kaikki solut, jotka  
 10 tuottavat sidottua tai vapaata TNF, ovat keksinnön aminohappojen kohteita. Erityisesti on korostettava, että tuotantoon vapautumalla keuhkoperäisistä tai siellä olevista makrofageista tai TNF:n sitoutumiseen niihin vaikuttaa keksinnön mukaisen lääkeaineen tai  
 15 formulaation antaminen potilaalle.

Keksintö tuottaa myös menetelmän endotoksisen shokin ja/tai happivajaus-reperfuusiovaurion jälkeisen kuoleman vaaran vähentämiseksi, erityisesti tapaturmassa (monivamma-, palo- ja leikkauksen jälkeiset potilaat  
 20 samoin kuin verenmyrkytyspotilaat), joka menetelmä sisältää tehokkaiden määrien antamisen keksinnön aminohappoa. Endotoksinen shokki ja happivajaus-reperfuusiovaurio ovat molemmat tiloja, jotka voivat johtaa potilaan kuolemaan ja joihin liittyy kohonneita  
 25 TNF-tasoja.

Keksintö tuottaa lisäksi ainakin yhden aminohapon, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa liiallisesta alkoholin käytöstä  
 30 johtuvan maksasairauden ja siitä tuloksena olevien suolisto- ja haimasairauksien vaaran estämiseksi tai vähentämiseksi tällaisen hoidon tarpeessa olevissa potilaissa. Tätä taudinsyytä varten glysiinin ja/tai seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttävien suolojen käyttö on edullista ja glysiinin tai sen fysiolo-

gisesti hyväksyttävien suolojen käyttö on erityisen edullista.

Lisäksi keksintö tuottaa ainakin yhden aminohapon, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiini-  
5 nin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttävät suolat, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa etanolin myrkyllisyyden estämiseksi tai vähentämiseksi tällaisen hoidon tarpeessa olevissa potilaissa. Tätä taudinsyytä varten glysiinin  
10 ja/tai seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttävien suolojen käyttö on edullista ja glysiinin tai sen fysiologisesti hyväksyttävien suolojen käyttö on erityisen edullista.

Keksintö tuottaa myös ainakin yhden aminohapon, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa etanolin poistamiseksi vatsalaukusta ennen systeemiseen verenkiertoon pääsyä tällaisen hoidon tarpeessa olevissa potilaissa.  
20

Keksintö tuottaa myös keksinnön aminohapon käytön ruokien, virvoitusjuomien, vitamiinien tai farmaseuttisten valmisteiden lisäaineena etanolin myrkyllisyyden käsittelemiseksi ja menetelmän etanolin myrkyllisyyden estämiseksi käyttäen tehokasta määrää keksinnön aminohappoa.  
25

On edullista, että lääkeainetta tai formulaatiota annetaan potilaalle siinä määrin, että keksinnön aminohappo alentaa TNF-tasoja verenkiertojärjestelmässä alle 250 pg/ml ( $\pm 10$  %), erityisesti vammautuneiden potilaiden kyseessä ollessa, jotka kärsivät vakavista (toisen tai kolmannen asteen) palovammoista, joissa on saattanut olla bakteeristen endotoksiinien vuotoa yleiseen verenkiertoon verenmyrkytyksen selvien kliinisten ilmenemismuotojen puuttuessa. On edullisempaa, että keksinnön aminohappo alentaa TNF-tasoja verenkiertojärjestelmässä alle 80 pg/ml ( $\pm 10$  %) ja vielä  
30  
35

edullisempaa, että TNF-tasot alenevat alle 20 pg/ml ( $\pm 10$  %). Asiantuntija on hyvin tietoinen miten tällaiset tasot todetaan, erityisesti immunosorbtiio- tai radioimmunologisiin analyysihin kytketyn tunnetun entsyymin avulla.

Keksintö tuottaa myös ainakin yhden aminohapon valittuna ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fysiologisesti hyväksyttävät suolat, käytön lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa TNF:n aiheuttaman (toiminnallisen) samalajisen siirrännäisen hylkimisen estämiseksi tai vähentämiseksi. Samalajinen siirrännäinen voidaan liittää mihin tahansa elimeen, mutta suurimmat hyödyt potilaalle havaitaan keuhkoon, sydämeen, suoleen/suolilieveeseen ja munuaiseen liittyvän kudoksen siirron tai injektiokirurgian yhteydessä.

Siinä tapauksessa, että lääkeaine tai formulaatio on määrä antaa kudoksensiirtopotilaille, se saattaa edullisesti sisältää ainakin yhden seuraavista yhdisteistä: TNF:ta vastaan rakennettuja neutralointivasta-aineita, TNF-liukoisia reseptoreita tai niiden johdannaisia tai osia ja syklisiä polypeptidi-immunosuppressiivisia aineita. Esimerkki tunnetuista lääkeaineeseen sulkeumaan tarkoitetuista sopivista syklisistä polypeptidi-immunosuppressiivisista aineista on syklosporiini tai sen tehokas johdannainen. Erityisen sopiva TNF liukoinen reseptori sisältää synteettisen dimeerisen liukoisen fuusioproteiinirakenteen, joka yhdistää kaksi p60 TNF-reseptoria IgG-molekyylin Fc-osan kanssa. Tämä fuusioproteiinirakenne omaa suuremman affiniteetin ja se on parempi TNF:n bioaktiivisuuden inhibiittori kuin kumpikaan monomeerisistä luonnon TNF-reseptoreista (p80 tai p60) tai TNF-vasta-aineista.

Ravintoformulaatio tai lääkeaine voidaan antaa joko sairauden ennalta ehkäisemiseksi, esim. ennen

leikkausta, akuutissa vaiheessa, esim. leikkauksen jälkeen, tai sekä että.

Ravintoformulaatio tai lääkeaine voidaan antaa potilaalle suolen sisäisesti tai ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti. Suoleen antoreitti on edullinen erityisesti jälki- tai ennalta ehkäisevää hoitoa ajatellen; erityisesti ajateltuja suolen sisäisiä antoreittejä ovat suun kautta, nenän kautta antaminen ja/tai letkun kautta syöttäminen. Lääkeaine tai formulaatio annetaan mukavasti vesiliuoksen muodossa. Sopivassa muodossa suolen kautta antamista varten oleva lääkeaine tai formulaatio on näin ollen edullisesti vesiliuoksen tai jauheen muodossa, jolloin jauhe lisätään sopivasti veteen ennen käyttöä. Letkun kautta syöttöä varten lisättävän veden määrä riippuu m.m. potilaan nestetarpeista ja kunnosta. Havaitaan, että akuuttia hoitoa varten ruoansulatuskanavan ulkopuolinen käyttöreitti on edullinen. Ruoansulatuskanavan ulkopuolinen käyttöreitti on myös aiheellinen esim. siellä, missä tarkoituksena on hallita kroonisen endotoksemian vaikutuksia.

Lääkeaine tai formulaatio voi olla siten formuloitu, että se siirtää potilaaseen 1-80 g keksinnön aminohappoa 24 tunnissa. Annettavan lääkeaineen tai formulaation määrä riippuu suuressa määrin potilaan erityisvaatimuksista. Tällaiset päivittäiset keksinnön aminohappomäärät ovat sopivia haluttujen vaikutusten tuottamiseen samoin kuin ennalta ehkäisevään/esihoitoon. Siinä tapauksessa, että lääkeaine tai formulaatio sisältää yhtä keksinnön aminohappoa (L-konfiguraatiossa), sitä voidaan antaa potilaalle sellainen määrä, että aminohapon pitoisuus potilaan verinesteessä kohoa 0,5 ja 2,0 mM:n välille, edullisesti välille 1,0-2,0 mM. Vaikka tätä korkeampia pitoisuuksia on ennakoitu, on odotettavissa, että saadaan aikaan huomattavia kliinisiä vaikutuksia formulaation tai lääkeaineen antamisen seurauksena, mikäli hapon

pitoisuutta lisätään, joten se on alueella 1,2-1,5 mM. Loukkaantuneille hyperkatabolisille potilaille voi myös olla hyödyllistä kohottaa verinesteen glysiini-, seriini- tai alaniinitasoja n. 0,2-0,3 mM:iin, joka  
 5 vastaa terveiden yksilöiden verinesteen glysiinitasoa.

Keksinnön edullisin lääkeaineeseen tai formulaatioon yhdistettävä aminohappo käytettäväksi keksinnön mukaisesti on glysiini tai sen fysiologisesti hyväksyttävä suola.  
 10

Yleisesti on tarkoitettu käyttää keksinnön aminohappoa yhdessä yhden tai useamman seuraavista komponenteista kanssa:

(i) omega-3-polytyydyttämättömät rasvahapot (PUFA, polyunsaturated fatty acid) tarvittaessa seostettuna omega-6-PUF-happojen kanssa;  
 15

(ii) L-arginiini tai muut fysiologisesti hyväksyttävät yhdisteet, jotka on yhdistetty polyamiinien synteesiin, tai niiden seokset; ja

20 (iii) nukleiiniemäslähde.

Tällöin lääkeaineen tai ravintoformulaation, joka sisältää keksinnön aminohappoa yhdessä arginiinin tai muiden fysiologisesti hyväksyttävien polyamiinien synteesiin liitettyjen yhdisteiden, kuten ornitiinin, käyttö on edullista. Lääkeaineen tai ravintoformulaation, joka sisältää keksinnön aminohappoa, arginiinia tai ornitiinia ja omega-3-polytyydyttämättömiä rasvahappoja (PUFA), käyttö on myös edullista.  
 25

Nukleiiniemäslähteet, jotka ovat sopivia käytettäväksi keksinnön aminohappojen yhteydessä, käsittävät tai sisältävät nukleiiniemäksiä, nukleosidejä, nukleotidejä, RNA, DNA, niiden vastikkeita ja/tai seoksia, jotka sisältävät yhden tai useampia näistä yhdisteistä.  
 30

35 Luonnon nukleiiniemäksiin kuuluvat puriinit adeniini ja guaniini samoin kuin pyrimidiinit sytosiini, tyymiini ja urasiili. Nukleiiniemäslähteiden olles-

sä vapaiden nukleiiniemästen muodossa se on edullisesti urasiili.

Luonnon nukleosideihin kuuluvat riboosinukleosiidit adenosiini, guanosiini, uridiini ja sytiidiini ja deoksiriboosinukleosiidit deoksiadenosiini, deoksiguanosiini, deoksitymidiini ja deoksisytidiini.

Luonnon nukleotideihin kuuluvat luonnon nukleosidien fosfaattiesterit, kuten adenylaatti-(AMP), guanylaatti-(GMP), uridylaatti-(UMP), sytidylaatti-(CMP), deoksitymidylaatti- (dTMP), deoksisytidylaatti(dCMP)monofosfaatit ja luonnon nukleosidien, kuten ADP ja ATP, di- ja trifosfaatit.

Puhdistettu nukleiiniemäslähde, kuten juusto, on edullinen. Kuitenkin muita lähteitä, kuten liha ja vastaavat, voidaan käyttää. Edullinen nukleiiniemäslähde on RNA.

Näin ollen keksintö tuottaa lääkeaineita tai ravintoformulaatioita, jotka sisältävät tehokkaita määriä:

(a) keksinnön aminohappoa (komponentti (a)) liitettynä yhteen tai useampaan komponenttiin, jotka on valittu

(b) omega-3-PUF-hapoista tarvittaessa seostettuna omega-6-PUF-happoihin (komponentti (b));

(c) L-arginiinistä tai muista fysiologisesti hyväksyttävistä yhdisteistä, jotka liittyvät polyamiinien synteesiin, tai niiden seoksista (komponentti (c)); ja

(d) nukleiiniemäslähteestä (komponentti (d)).

Mainittuja lääkeaineita ja ravintoformulaatioita nimitetään hakemuksessa tämän jälkeen keksinnön ruokavalioiksi.

Annostuksen pitäisi olla sellainen, että lääkeaineet tai ravintoformulaatiot ovat tehokkaita kuoliokasvaintekijän (TNF) tasojen alentamiseen potilaissa, joilla tasot ovat kohonneet niiden tasojen yli,

jotka välittävät fysiologista homeostaasia ja paikallista tulehtumista.

Yksi yksikköannos tällaista lääkeainetta tai ravintoformulaatiota sisältää edullisesti 1,5-80 paino-osaa komponenttia (a) liitettynä seuraaviin määriin yhtä tai useampaa (b)-(d):sta valittua komponenttia: 0,1-20 paino-osaa komponenttia (b), 3-40 paino-osaa komponenttia (c) ja 0,1-4,0 paino-osaa komponenttia (d). Erityisen edullinen yksi yksikköannos sisältää 1,5-80 paino-osaa komponenttia (a) liitettynä seuraaviin määriin yhtä tai useampaa (b)-(d):sta valittua komponenttia: 2-5 paino-osaa komponenttia (b), 7,5-20 paino-osaa komponenttia (c) ja 1,7-2,0 paino-osaa komponenttia (d).

Päivittäin annettujen komponenttien (a)-(d) määrä vastaa sopivasti 1,5-80 g komponenttia (a), 0,1-20 g, edullisesti 2-5 g, komponenttia (b), 3-40 g, edullisesti 7,5-20 g, komponenttia (c) ja 0,1-4,0 g, edullisesti 1,7-2,0 g, komponenttia (d).

Komponentin (d) suhteen edellä oleva annostus on tarkoitettu RNA:lle, DNA:lle, nukleosideille tai nukleotideille. Nukleiiniemäksille yhden painoyksikön nukleiiniemästä katsotaan olevan sama kuin 2,5-3,0 painoyksikköä RNA, DNA, nukleosidejä tai nukleotidejä.

Käytettäessä lääkeaineita tai ravintoformulaatioita, jotka sisältävät keksinnön aminohappoa yhdessä yhden tai useamman edellä mainituista komponenteista (b), (c) ja (d) kanssa, tällaiset lääkeaineet tai ravintoformulaatiot sisältävät sopivasti yhdessä yksikköannoksessa

(a) 1,5-80 paino-osaa yhtä tai useampaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin,alaniinin ja seriinin, vapaassa muodossa tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai niiden seoksia,

yhdessä yhden tai useamman yhdisteen kanssa, jotka valitaan ryhmästä, joka sisältää

(b) 2-5 paino-osaa omega-3-polytyydyttämättömiä rasvahappoja;

(c) 7,5-20 paino-osaa L-arginiinia tai L-ornitiinia tai niiden seoksia; ja

5 (d) 1,7-2,0 paino-osaa RNA.

Edulliset lääkeaineet tai ravintoformulaatiot sisältävät yhdessä yksikköannoksessa:

(a) 1,5-80 paino-osaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, jossa on glysiini, alaniini ja seriini, vapaassa tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan tai niiden seoksen muodossa, liitettynä

(c) 3-40 paino-osaan, edullisesti 7,5-20 paino-osaan, arginiinia tai vastaavaan määrään yhtä tai useampia muita fysiologisesti hyväksyttäviä yhdisteitä, 15 jotka liittyvät polyamiinien synteesiin, tai vastaavaan määrään arginiinin seosta tällaisten yhdisteiden kanssa.

Edullisemmin keksinnön lääkeaineet tai ravintoformulaatiot sisältävät komponenttia (a) yhdessä 20 komponentin (c) kanssa painosuhteessa 1:2-4:1, erityisen edullisesti painosuhteessa 1:1-2:1.

Lisäksi edulliset lääkeaineet tai ravintoformulaatiot sisältävät yhdessä yksikköannoksessa:

(a) 1,5-80 paino-osaa aminohappoa, joka valitaan 25 ryhmästä, jossa on glysiini, alaniini ja seriini, vapaassa tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan tai niiden seoksen muodossa, liitettynä

(b) 0,1-20 paino-osaan, edullisesti 2-5 paino-osaan, omega-3-PUF-happoja; ja

(c) 3-40 paino-osaan, edullisesti 7,5-20 paino-osaan arginiinia tai vastaavaan määrään yhtä tai useampia muita fysiologisesti hyväksyttäviä yhdisteitä, 30 jotka liittyvät polyamiinien synteesiin, tai vastaavaan määrään arginiinin seosta tällaisten yhdisteiden kanssa.

Omega-3-PUF-hapot on edullisesti suojattu peroksiyhdisteeksi hapettumista vastaan.

Fysiologisesti hyväksyttävät tavat omega-3-PUF-happojen suojaamiseksi peroksiyhdisteeksi hapettumista vastaan ovat alalla tunnettuja. Niihin kuuluvat omega-3-PUF-happojen fysiologisesti hyväksyttävä mikrokapselointi ja fysiologisesti hyväksyttävien antioksidanttien käyttö.

Tyypillinen fysiologisesti hyväksyttävänä mikrokapselointiaineina käytettäväksi sopiva esimerkki on tärkkelys. Mikrokapselointi voidaan suorittaa sinänsä tunnetulla tavalla. Mikrokapselit voidaan päällystää sinänsä tunnetulla tavalla fysiologisesti hyväksyttävien päällystysaineiden, kuten arabikumin, avulla.

Tyypillisiin esimerkkeihin keksinnön menetelmässä käytettäväksi sopivista antioksidanteista kuuluvat antioksidanttitiamiinit, kuten vitamiini C, vitamiini E tai niiden seokset.

Lisätyn antioksidantin määrän pitäisi olla riittävä estämään omega-3-PUF-happojen hapettuminen peroksiyhdisteiksi. Tällaiset määrät voidaan helposti laskea. Yleensä käytännön syistä peroksiyhdisteiksi hapettumisen estämiseen käytettyjä antioksidanteja käytetään ylimäärin. On havaittu, että omega-3-PUF-happojen yhteydessä annetun minkä tahansa muun aineen mukanaolo saattaa vaatia käytettävän antioksidantin määrän säätämistä.

Omega-3 PUF-happoja voidaan käyttää omega-3-PUF-happojen fysiologiseen tarjontaan sopivassa muodossa, esim. vapaan hapon muodossa, triglyseridin muodossa tai omega-3-PUF-happojen fysiologisesti hyväksyttävien luonnollisten lähteiden muodossa. Tällaisiin luonnollisiin lähteisiin kuuluvat pellavaöljy ja kalaöljyt, kuten menhadenöljy, lohiöljy, makrilliöljy, tonnikalaöljy, turskanmaksaöljy ja anjovisöljy. Mainitut luonnolliset lähteet, erityisesti kalaöljyt, sisältävät huomattavia määriä omega-3-rasvahappoja. Käytettäessä omega-3-PUF-happoja triglyseridin muodossa

triglyseridit voivat sisältää muiden fysiologisesti hyväksyttävien rasvahappojen estereitä. Edullisiin omega-3-PUF-happoihin kuuluvat eikosapentanonihappo (EPA) ja dokosaheksanonihappo (DHA) vapaassa muodossa, triglyseridin muodossa tai luonnollisten lähteiden muodossa, joiden EPA- ja/tai DHA-pitoisuus on korkea.

Kun keksinnön aminohappoja annetaan lääkeaineen muodossa, tällainen lääkeaine sisältää 100 g kohti 1-99 g keksinnön aminohappoa.

Yleensä suotuisia vaikutuksia saadaan aikaan annettaessa keksinnön ruokavalioita kaavamaisen ruokavalion muodossa, joka riippuen olosuhteista voi olla täydellinen kaavan muodossa oleva ruokavalio (s.o. ruokavalio, joka tarjoaa pääasiassa kaiken tarvittavan energian, aminohapot, vitamiinit, mineraalit ja hivenaineet) tai ruokavalion täydennys. Ruokavalio otetaan mukavasti vesipitoisen nesteen muodossa. Kaavan mukainen ruokavalio saattaa näin ollen sisältää hiilihydraattilähteen, rasva-aineiden rasvaa (rasvalähteen) ja proteiinia (typpilähteen) ja ainakin yhden rasvahapon, joka valitaan ryhmästä, jossa on glysiini, L-alaniini ja L-seriini tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, joka on tunnettu siitä, että happoa tai suolaa on mukana kaavan muodossa olevassa ruokavaliossa määrältään 0,5-10 g/100 g. Kaavan muodossa oleva ruokavalio sisältää edullisesti lisäksi muita ravitsemuksellisesti edullisia ainesosia, kuten vitamiineja, mineraaleja, hivenaineita, kuituja (edullisesti liukoisia kuituja).

Esimerkkeihin sopivista typpilähteistä kuuluvat ravitsemuksellisesti hyväksyttävät proteiinit, kuten soijapapu ja herasta saatavat proteiinit, kaseinaatit, ja/tai proteiinihydrolysaatit. Sopiviin hiilihydraattilähteisiin kuuluvat sokerit, kuten malto-  
dekstriinit. Esimerkkeihin sopivista rasvalähteistä kuuluvat triglyseridit samoin kuin di- ja monoglyseridit.

Esimerkkeihin keksinnön lääkeaineeseen tai formulaatioon yhdistettävistä sopivista vitamiineista kuuluvat vitamiini E, vitamiini A, vitamiini D, vitamiini K, foolihappo, tiamiini, riboflaviini, vitamiini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, niasiini, biotiini ja pantoteenihappo ravitsemuksellisesti hyväksyttävässä muodossa.

Esimerkkeihin lääkeaineeseen tai formulaatioon yhdistettävistä sopivista mineraali-alkuaineista tai hivenaineista kuuluvat natrium, kalium, kalsium, fosfori, magnesium, mangaani, kupari, sinkki, rauta, seleeni, kromi ja molybdeeni ravitsemuksellisesti hyväksyttävässä muodossa.

Erityisesti lääkeaine tai formulaatio sisältää edullisesti beta-karotiinia (vitamiini A), vitamiini E, vitamiini C, tiamiinia, vitamiini B<sub>12</sub>, koliinia, seleeniä ja sinkkiä ravitsemuksellisesti hyväksyttävässä muodossa.

Hakemuksessa käytetty termi liukoinen kuitu viittaa kuituihin, jotka kykenevät osallistumaan tärkeään käymiseen paksusuolessa lopulta lyhytketjuisten rasvahappojen tuottamiseksi. Esimerkkeihin sopivista kuiduista kuuluvat pektiini, guarkumi, karobikumi, ksantaanikumi, jotka voivat valinnaisesti olla hydrolysoituja. Aikuisille liukoisen kuidun kokonaismäärä päivää kohden on sopivasti alueella 3-30 g.

Havaitaan, että omega-3-PUF-happoja voidaan antaa suurempia määriä kuin hakemuksessa edellä esitetyt ja että tällaiset suuremmat määrät eivät yleensä huononna haluttua vaikutusta eivätkä aiheuta ei-toivottuja sivuvaikutuksia.

Keksinnön formulaatiossa komponenttina (c) käytettäväksi sopiviin yhdisteisiin kuuluvat L-arginiini ja L-ornitiini, edullisimmin L-arginiini. Komponenttia (c) voidaan käyttää vapaassa muodossa, fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa, esim. suolan muodossa fosforihapon, sitruunahapon, viinihapon, fumaarihapon, adipiinihapon tai maitohapon kanssa

tai pienen peptidin muodossa. Edullisesti käytetään vapaassa muodossa olevaa L-arginiinia.

Hakemuksessa käytetty termi pieni peptidi viittaa peptideihin, joissa on 2-6, edullisesti 2-4, aminohappoa.

Kuten jo on osoitettu, omega-3-PUF-hapot annetaan sopivasti peroksyhdisteiksi hapettumista vastaan suojattujen tai suojaamattomien kalaöljyjen muodossa. Tällaiset kalaöljyt sisältävät myös omega-6-PUF-happoja.

Omega-6-PUF-hapoilla on myös edullinen vaikutus immuunireaktioon ja infektion vastustuskykyyn leikkauksen yhteydessä. Näin ollen keksinnön ruokavaliot sisältävät tarkoituksenmukaisesti lisäksi omega-6-PUF-happoja.

Keksinnön käyttötarkoitusta varten omega-6-PUF-hapot voivat olla vapaassa muodossa tai omega-6-PUF-happojen fysiologiseen tarjontaan sopivassa muodossa, esim. triglyseridin muodossa. Esimerkkeihin keksinnön mukaisesti käytettävistä erityisen sopivista omega-6-PUF-hapoista kuuluvat linolihappo ja arakidonihappo, linolihapon ollessa edullisin. Esimerkit sopivista omega-6-PUF-happolähteistä ovat alalla tunnettuja. Niihin kuuluvat kalaöljyt ja kasvisöljyt. Esimerkkeihin omega-6-PUF-happolähteistä, joissa on korkea linolihappopitoisuus, kuuluvat safloriöljy, auringonkukkaöljy, soijaöljy, puuvillansiemenöljy ja maissiöljy.

Omega-6-PUF-happojen päivittäinen alueella 1,5-5,0 g olevan määrän antaminen yleensä riittää edullisen vaikutuksen savuttamiseen. Lääkeaineiden tai ravintoformulaation edellä määritetty yksi yksikköannos voi näin ollen sisältää lisäksi 1,5-5 paino-osaa omega-6-PUF-happoja.

Komponenttien (b), (c) ja (d) ja omega-6-PUF-happojen lisäksi keksinnön ruokavalioihin voidaan lisätä lisäkomponentteja ja niillä saattaa olla suotui-

nen vaikutus keksinnön aminohapon toimintaan. Eräs esimerkki tällaisista hyödyllisistä komponenteista ovat omega-9-PUF-hapot. Tällaisten rasvahapposeosten eräs edullinen luonnollinen lähde ovat kalaöljyt. Ma-  
 5 ku- ja muista syistä kalaöljyjä käytetään edullisesti suun kautta käytettävissä muodoissa kapseloidussa muodossa.

Keksinnön kaavan muodossa olevan ruokavalion ollessa tarkoitettu käytettäväksi ravitsemuksellisenä  
 10 täydennyksenä (esim. ennen leikkaustoimenpidettä) sen kautta tarjotun energia määrän ei pitäisi olla liian suuri, jotta ei tarpeettomasti vähennetä potilaan ruokahalua. Täydennyksen pitäisi sisältää sopivasti määrältään 600-1000 kcal/päivä tarjoavia energialähteitä.  
 15 Täydellisenä kaavan muodossa olevana ruokavaliona käyttöä varten (esim. leikkauksen jälkeiseen hoitoon, tapaturman hoitoon) keksinnön ruokavaliot tarjoavat tarkoituksenmukaisesti 600-1500 kcal/päivä. Typpilähteen, hiilihydraattilähteen ja rasva-ainelähteen osuus  
 20 päivittäisestä kokonaiskalorimäärästä voi vaihdella laajoissa rajoissa. Keksinnön edullisissa formulaatioissa hiilihydraattilähde tuottaa 40-70 % formulaation kokonaisenergian tarjonnasta ja typpi- ja rasva-ainelähde kumpikin 15-30 % kokonaisenergian tarjonnas-  
 25 ta. Käytettäessä täydellisenä ruokavaliona keksinnön ruokavalio annetaan sopivasti vesipitoisen nesteen muodossa määrien ollessa alueella 500-3000 ml. Käytettäessä täydennyksenä antaminen voi tapahtua jauheen tai nesteen muodossa.

30 Tiloihin tai sairauksiin, joissa potilailla on kohonneita TNF-tasoja, joita voidaan hoitaa keksinnön mukaisesti, kuuluvat seuraavat: osteoporoosi; nivel tulehdus; etäispesäke; keuhkosairaudet, kuten akuutista hengitysvajausoireyhtymä (ARDS); tulehdukselliset suolistosairaudet, kuten haavainen paksusuolen  
 35 tulehdus ja Crohnin tauti; sepelvaltimosairaus; maksakirroosi, joko alkoholi- tai virussyntyinen; verenmyr-

kytys, mukaanlukien endotoksinen shokki; happivajaus-reperfuusiovaurio; AIDS:ssa ja syöpäpotilailla havaittu hukkaoireyhtymä; maksatulehdus; munuaistulehdus; patologinen angiogenesis; säteily- ja kemoterapiahoitoja, jotka esim. vahingoittavat luuydintä; elimen hylkiminen; tapaturma; jälki-iskeeminen sydänvaurio; haavaumat; rappeuttavat tilat, kuten liikehermon sairaus ja multippeli skleroosi, jotka liittyvät hermojärjestelmään; aivovamma ja aivotulehdus; haimatulehdus; munuaisvika; diabetes; halvaus; astma ja infektio. Erikoisen hyviä tuloksia on saavutettavissa verenmyrkytyksen, endotoksisen shokin, infektio- ja happivajausreperfuusiovaurion, erityisesti endotoksisen shokin ja verenmyrkytyksen, hoidossa. Erityisen hyviä tuloksia on saavutettavissa myös tulehduksellisten suolistosairauksien, verenmyrkytyksen, kroonisten maksasairauksien, patologisen angiogenesisin ja tapaturman hoidossa.

Infektioita voivat olla haavainfektiot, ontelomärkimät, bakteeriverisyydet, märkäpesäkkeet, verenmyrkytykset ja vastaavat. Niitä voivat aiheuttaa monenlaiset infektioosiset aineet, mukaanlukien bakteerit, virukset, loiset, sienet ja endotoksiinit.

Yleisesti puhuen käsittely keksinnön aminohapolla on tarkoitettu potilaille, joilla TNF-tasot voisivat olla/ovat ainakin hetkellisesti kohonneet niiden tasojen yläpuolelle, jotka välittävät fysiologista homeostaasia ja paikallista tulehtumista. Tällaisiin potilaisiin kuuluvat esim. tapaturmapotilaat (monivamma, palo, suurleikkaus); potilaat, joilla on systeeminen tulehdusreaktio-oireyhtymä (SIRS); verenmyrkytyspotilaat; aikuisiän hengitysvajausoireyhtymäpotilaat (ARDS); potilaat, joilla on akuutti maksavika, joille esihoito ei ole mahdollista, mutta tarvitaan akuuttia vaikutusta; potilaat, joilla on infektion vaara, kuten potilaat, joilla on immunosuppression johdosta alentunut vastustuskyky, säteily- ja/tai kemoterapian koh-

teena olevat potilaat, potilaat, jotka kärsivät diabetes mellituksesta, proteiini-vajaaravitsemuksesta, maha-suolisyöpäkirurgiapotilaat, sydänkirurgiapotilaat, kudoksensiirron kohteena olevat potilaat, potilaat, joilla on liiallisesta alkoholin käytöstä johtuva kasvanut maksasairauden riski ja potilaat, jotka kärsivät ihmisen immuunikatovirusperäisestä infektiosta; ja potilaat ennen ja jälkeen suuria leikkaustoimenpiteitä, esim. mikä tahansa leikkaustoimenpide, joka vaatii yleisnukutuksen, kuten sydämen ohitusleikkaus ja ylävatsan-suolen suurkirurgia.

Keksinnön aminohappoa sisältävän lääkeaine- tai ravintoformulaation antaminen yhdessä komponentin (c) kanssa on tarkoitettu erityisesti osteoporoosin hoitoon.

Glysiinin tai vastaavasti keksinnön aminohapon yllättävä TNF-tasojen alentava farmakologinen toiminta potilaissa, joilla mainitut tasot ovat kohonneet niiden yli, jotka välittävät homeostaasia ja paikallista tulehtumista, on hyödyllistä siinä suhteessa, että se sallii m.m. minimoida endotoksemian, happivajaus-reperfuusivaurion ja infektion vaikutuksia ja vähentää endotoksisen shokin ja verenmyrkytyksen vaaroja ja siten alentaa tai ehkäistä kuolleisuusriskiä.

Keksinnön aminohapot ja erikoisesti keksinnön ruokavaliot ovat, kuten edellä on jo tuotu esiin, erityisen sopivia leikkaukseen tulevien potilaiden hoitoon. Tällainen esihoito on tehokkain annettaessa keksinnön ruokavalio täydennyksen muodossa. Täydennys annetaan edullisesti 3 päivän tai pidemmän jakson kuluessa. Yleensä 3-6 päivää ennen leikkausta alkava ja mainitut 3-6 päivää kestävä esihoito on riittävä halutun vaikutuksen saavuttamiseksi. Esihoito- tai ennaltaehkäisy- tai tarkoituksiin täydennyksen antaminen, joka sisältää 1,5-80 g keksinnön aminohappoa yhdessä 2-5 g komponentin (b) (omega-3-PUF-happoja) ja/tai komponentin

tin (c) kanssa, joka tarjoaa 7,5-20 g L-arginiinia tai L-ornitiinia/päivä, antaa yleensä halutun vaikutuksen.

Tällainen täydennys saattaa sisältää ja edullisesti myös sisältää tehokkaan määrän komponenttia  
 5 (d), omega-6-PUF-happoja, tai edellä esiin tuotuja lisäkomponentteja.

Täydennys annetaan mukavasti täydennyksen antamiseen 3-4 kertaa päivässä sopivien yksikköannosten muodossa. Keksinnön ruokavalioiden sisältäessä energialähteitä ei ole tarkoituksenmukaista tarjota enempää kuin 1500 kcal/päivä. Lukuunottamatta tätä rajoitusta koskien energian tarjontaa keksinnön ruokavalion täydennykset TNF-tasojen alentamiseksi voidaan ja tarkoituksenmukaisesti tarjotaan täydellisen kaavan mu-  
 10 kaisen ruokavalion muodossa, kuten edellä on kuvattu.

Liiallista etanoliaaltistusta seuraavan potilaiden akuutin hoidon ollessa tarpeellinen keksinnön aminohappo annetaan sopivasti ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti. Tyypillisiä tällaiseen akuuttiin hoitoon  
 20 sopivia antomuotoja ovat esim. hakemuksessa aikaisemmin julkistettut vesiliuokset.

Haluttaessa minimoida alkoholin imeytyminen vereen glysiinin aikaansaaman alkoholin mahalaukusta poiston avulla keksinnön aminohappo tuotetaan sopivasti tavanomaisessa suun kautta annettavassa muodossa,  
 25 kuten rakeina, tabletteina, kapseleina, nesteinä (mukaanlukien keitot ja juomat, kuten virvoitusjuomat, janon sammuttajat), jauheina, kaavan muodossa olevina ruokavaliaina j.n.e. Formuloituna fysiologisesti hyväksyttävän formulaation muotoon, kuten kapselin tai tabletin muotoon, tällaiset formulaatiot sisältävät tarkoituksenmukaisesti 0,2-90 p%, edullisesti 30-50 p%, keksinnön aminohappoa. Yleensä tyydyttävä alkoholin (etanolin) poisto vatsalaukusta saadaan aikaan an-  
 30 nettaessa alueella 0,001-5,0 g oleva kokonaismäärä yhtä tai useampaa aminohappoa, jotka valitaan ryhmästä, jossa on glysiini, alaniini ja seriini, vapaassa muo-  
 35

dossa ja/tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa/kg kehon painoa. Antaminen tapahtuu helposti suun kautta ja ennen alkoholin nauttimista.

5 Tyypilliset farmakologisesti hyväksyttävät formulaatiomuodot suun kautta antamista varten sisältävät lisäksi farmakologisesti hyväksyttäviä laimennusaineita, kantoaineita, vitamiineja, mausteita, pigmenttejä ja/tai muita asiantuntijalle tuttuja apuaineita, jotka sopivat yhdistettäväksi tällaiseen formulaatioon.

Keksinnön ruokavalioita ja formulaatioita voidaan saada aikaan sinänsä tunnetulla tavalla esim. seostamalla yhteen ainesosat.

15 Tyypillisiin keksinnön mukaisesti käytettäväksi ja erityisesti potilaiden, joilla on lisääntynyt liiallisesta alkoholin käytöstä johtuva maksasairauksien vaara, hoitoon sopiviin formulaatioihin kuuluvat vesiliuokset, jotka sisältävät pääasiassa 0,1-90 p% ainakin yhtä aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka  
20 sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, loppuosan ollessa tislattua vettä. Keksinnön aminohappoa voi olla mukana liuoksen konsentroidussa muodossa määrältään 15-90 % (liuoksen painosta). Konsentroidut liuokset  
25 ovat sopivia laimennukseen käyttömuodoiksi tai käytettäväksi akuutissa hoidossa. Käyttömuodot, joissa on alempi keksinnön aminohappopitoisuus (esim. 0,1-5 %), on yleensä tarkoitettu ennalta ehkäiseviin tarkoituksiin; konsentroidut liuosmuodot, joissa on suurempi  
30 keksinnön aminohappopitoisuus (esim. 5-40 p%), ovat yleensä sopivampia akuuttiin hoitoon.

Keksinnön lääkeaineeseen tai formulaatioon, erityisesti ruoansulatuskanavan ulkopuoliseen käyttöön, sisältyviin muihin sopiviin formulaatioihin kuuluvat infuusioliuokset, kuten Ringerin ruiskeliuos, Ringerin ruiskeliuos maitohapon suolana, kristal-  
35 loidit, kolloidit tai muut verinesteen vastikkeet,

- liitettynä tai rikastettuna n. 0,1-5,0 g:aan/l glysiiniin, seriinin ja/tai alaniinin infuusioliuosta. Ringerin ruiskeliuos on steriloitu liuos, joka sisältää 3,23-3,54 g natriumia (vastaten 8,2-9,0 g natriumkloridia), 0,149-0,165 g kaliumia (vastaten 0,285-0,315 g kaliumkloridia), 0,082-0,098 g kalsiumia (vastaten 0,3-0,36 g kalsiumkloridia  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :n muodossa), 5,23-5,80 g kloridia ( $\text{NaCl}$ :na,  $\text{KCl}$ :na ja  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :na) ja riittävän määrän vettä 1000 ml liuosta saamiseksi.
- 10 Ringerin ruiskeliuos maitohapon suolana on steriloitu liuos, joka sisältää 2,85-3,15 g natriumia kloridina ja laktaattina, 0,141-0,173 g kaliumia (vastaten 0,27-0,33 g kaliumkloridia), 0,049-0,060 g kalsiumia (vastaten 0,18-0,22 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 2,31-2,61 g laktaattia, 3,68-4,08 g kloridia ( $\text{NaCl}$ :na,  $\text{KCl}$ :na ja  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :na) ja riittävän määrän vettä 1000 ml liuosta saamiseksi.

- Termit kristalloidit ja kolloidit ovat alalla tunnettuja nesteterapian yhteydessä. Niihin kuuluvat verinesteen vastikkeet, kuten (polygeliinipohjainen) Haemaccel ja (gelatiinipohjainen) Gelofusine.

Keksintöä ymmärretään paremmin viittaamalla seuraavaan spesifiseen kuvaukseen.

- 25 ESIMERKKI 1. Ruokavalion glysiinin vaikutukset rottien eloon jäämiseen ja maksavaurioon

- Sprague-Dawley urosrottia (200-250 g) syötetään vapaasti jauheruokavaliolla, joka sisältää 20 p% kaseiinia (vertailuruokavalio) tai 5 p% glysiiniä ja 15 p% kaseiinia (glysiiniruokavalio) 3 päivän ajan ennen LPS-ruisketta. Sitten rottiin ruiskutetaan lipopolysakkaridia (LPS; 10, 20 ja vastaavasti 30 mg/kg) häntälaskimon kautta ja kuolleisuus määritetään 24 tuntia ruiskutuksen jälkeen. Jos rotat pysyvät elossa 24 tuntia, niitä pidetään turvassa olevina, koska myö-
- 35 24 tuntia, niitä pidetään turvassa olevina, koska myö-

TULOKSET

- a) 5 % glysiiniruokavalio tarjoaa 100 %:n suojan 10 mg/kg:n LPS-annosta vastaan verrattuna 50 % kuolleisuuteen vertailuryhmässä, joka on merkittävydeltään  $p < 0,05$  tasolla. 20 mg/kg:n LPS-annoksella havaittiin 30 % kuolleisuus 5 % glysiiniruokavaliolla ja 70 % kuolleisuus vertailuruokavaliolla. 30 mg/kg:lla LPS-kuolleisuus kasvoi 90 %:iin glysiinikäsitellyillä eläimillä ja 100 %:iin vertailueläimillä.
- 10 b) Eloon jääneistä maksan entsyymi AST (aspartaatti-aminotransferaasi; transaminaasi) mitataan osoituksena maksan vaurioitumisesta. AST-taso on tuntuvasti ja merkittävästi alentunut glysiinillä syötetyissä rotissa (2000 IU/l:sta käsittelemättömillä
- 15 syötetyillä rotilla, joita käsiteltiin 10 mg/kg LPS-annoksella).
- c) Rinnakkaisessa koesarjassa määritettiin glysiinin vaikutus kuoliokasvaintekijään (TNF). Seerumin TNF mitattiin ELISA:n avulla. 10 mg/kg LPS-ruiskeen jälkeen seerumin TNF kasvoi nopeasti vertailuruokavaliolla syötetyissä rotissa arvoihin yli 6000 pg/ml 60 minuuttia ruiskutuksen jälkeen ennen laskemista takaisin vertailuarvoihin. Tämä kasvu on merkittävästi vaimentunut (ainakin 50 %:lla;  $p < 0,05$ ) 5 % glysiiniruokavaliolla syötetyissä rotissa, joilla huippu saavutetaan 150 minuuttia ruiskutuksen jälkeen.
- 20 d) Maksa- ja keuhkonäytteet otetaan kudostutkimusta varten 24 h LPS-ruiskeen (10 mg/kg) jälkeen ja hematoksyliini-eosiini värjätään. Vertailuruokavaliolla
- 30 syötetyt rotat osoittavat monia kuolioisia alueita ja neutrofiilin tiivistymistä maksaan ja tuntuvaa välikudoksen turvotusta neutrofiilin keuhkoon tiivistymisen ohella. Glysiiniruokavaliolla syötetyt rotat osoittavat vähemmän kuoliota maksassa ja vähemmän keuhkon
- 35 turvotusta kuin vertailuruokavaliolla syötetyt rotat.

e) Seerumin glysiinipitoisuus määritetään HPLC:n avulla kahdesta vertailuruokavaliolla ja vastaavasti glysiiniruokavaliolla syötetystä rottaryhmästä ja joista kummallekin ryhmälle oli annettu LPS-ruiske (10 mg/kg, suonensisäisesti häntälaskimoon). Glysiiniruokavaliolla syötetty rotta ilman LPS-käsittelyä osoittaa huomattavasti korkeampaa glysiinipitoisuutta (1892  $\mu$ M) kuin vertailuruokavaliolla syötetyt ja ilman LPS-ruisketta olevat rotat (150  $\mu$ M). Glysiiniruokavaliolla syötetyt rotat säilyttävät korkean glysiinipitoisuuden (1727 $\pm$ 515  $\mu$ M) 6 h LPS-ruiskeen jälkeen; vertailuruokavaliolla syötetyillä rotilla seerumin glysiinipitoisuus on 6 h LPS-ruiskeen jälkeen 278  $\mu$ M.

## ESIMERKKI 2. Glysiinin vaikutukset reperfuusiovaurioon alhainen virtaus-takaisinvirtaus maksan perfuusiomallissa

### MENETELMÄT

Käytetyt eläimet. Sprague-Dawley urosrottia, jotka painavat 180-210 g ja joita syötetään Purina-ruokavaliolla. Rotat paastoavat 24 h ennen leikkausta.

Maksan perfuusio. Rotat nukutetaan pentobarbitaalinatriumilla (50 mg) ennen leikkausta ja maksat poistetaan kirurgisesti ja valutetaan porttilaskimoon asennetun kanyylin kautta Krebs-Henseleit-bikarbonaattipuskurilla (pH 7,4, 37°C), joka on kyllästetty happi-hiilidioksidiseoksella (95:5) ei-kierrätetyssä järjestelmässä (Krebs-Henseleit, 1932). Leikkauksen jälkeen maksoja valutetaan virtausnopeuksilla n. 1 ml/g/min 75 minuutin ajan (alhainen virtaus). Sen jälkeen maksoja valutetaan normaaleilla virtausnopeuksilla (4 ml/g/min) 40 minuutin ajan (takaisinvirtaus). Glysiini liuotetaan Krebs-Henseleit-bikarbonaattipuskuriin (pH 7,4, 37°C) ja ruiskutetaan maksaan jatkuvasti alkaen 10 minuuttia ennen takaisinvirtausta

nopeuksilla, jotka johtavat alueella 0,06-2 mM oleviin loppupitoisuuksiin.

Laktaattidehydrogenaasi (LDH). LDH-aktiivisuus perfusaatiotuotteessa määritetään käyttäen normaaleja entsyymimenetelmiä (Bergmeyer, 1988). 3 ml perfusaatiotuotetta sekoitetaan huolella reagenssin kanssa, joka sisältää 15 % trikloorietikkahappoa, 0,375 % tiobarbituurihappoa ja 0,25N suolahappoa ja lämmitetään 15 minuuttia kiehuvaan vesihauteeseen. Jäähdytyksen jälkeen näytteitä sentrifugoidaan 1000 g:ssä 10 minuutin ajan ja määritetään yläpuolella olevan nesteen absorbanssi 535 nm:ssä. LDH:n vapautumisnopeudet ilmaistaan maksan märkápainon grammaa kohti tunnissa.

Trypan-sinisen jakautumisaika ja kudostutkimukselliset menetelmät. Mikroverenkierron ja maksassa tapahtuvan solukuoleman määrittämiseksi ruiskutetaan trypan-sinistä maksaan kaikkien kokeiden lopussa loppupitoisuuksien ollessa 0,2 mM (Belinsky et al., 1984). Maksan pinnan muuttumiseen tasaisen tumman siniseksi kulunut aika merkitään muistiin. Ylimääräinen väriaine poistetaan valuttamalla Krebs-Henseleit-puskurilla vielä 10 minuuttia. Sen jälkeen maksoja valutetaan 1 % paraformaldehydillä 10 minuutin ajan ja kiinteä kudos upotetaan parafiiniin ja työstetään valomikroskopiaa varten. Leikkeet ovat värjäytyneet ainoastaan eosiinilla, soluliman värillä, jolloin trypan-sininen voidaan todeta helposti vaurioituneiden solujen tumissa.

Kaikki peruskudoksen solujen tumat vyöhykkeellä, joka säteilee viisi solua joko porttilaskimoa ympäröiviltä tai keskusta ympäröiviltä alueilta, todetaan trypan-sininen positiiviseksi tai negatiiviseksi. Värjäytymisen prosenttiosuus lasketaan värjäytyneiden tumien lukumäärästä jaettuna solujen kokonaismäärällä annetulla alueella.

Tilastollinen analyysi. Studentin t-koetta tai ANOVA:a käytettiin sovellettuina. Erot todetaan merkittäviksi p:n arvon ollessa alle 0,05.

## 5 TULOKSET

Glysiinin vaikutukset maksasolujen vaurioitumiseen alhainen virtaus-takaisinvirtaus perfuusiomallissa. Alhaisen virtauksen jakson aikana LDH:n vapautuminen on minimaalista (n. 1 IU/g/h 75 minuutin kohdalla). Kun virtausnopeutta lisätään 4 ml:aan/g/min, LDH:n vapautuminen kuitenkin kasvaa vähitellen saavuttaen uuden vakiotila-arvon n. 30 minuutin kuluessa. Suurin LDH:n vapautuminen reperfuusiojakson aikana on n. 35 IU/g/h vertailunäytteissä, mutta se alenee merkittävästi glysiinikäsittelyn avulla annoksesta riippuen. Kun glysiinin pitoisuus kasvaa 2 mM:iin, LDH:n vapautuminen alenee n. 5 IU:aan/g/h; puolet maksimaalisista alenemisistä esiintyi glysiinimäärällä 180  $\mu$ M.

Trypan-sinisen imeytyminen osoittaa solun elinkykyisyyden palautumattoman menetyksen maksaliuskassa. 75 minuutin alhaisen virtauksen happivajausta seuraava 40 minuutin takaisinvirtaus aiheuttaa kuoleman n. 30 %:ssa peruskudoksen soluja keskusta ympäröivillä alueilla, mutta vaikutti vain 2 %:iin soluista aikaisemmin normaali happisilla porttilaskimoa ympäröivillä alueilla. Glysiinin (2 mM) infuusio vähentää solukuolemaa keskusta ympäröivillä alueilla 9 %:iin. Yhteenvetona reperfuusio vaurio, jota esiintyy kun happea syötetään uudelleen aikaisemmin hapettomille keskusta ympäröiville maksaliuskojen alueille, on selvästi alentunut akuutin glysiini-infuusion avulla annoksesta riippuen.

Glysiinin vaikutukset trypan-sinisen jakautumaan. Trypan-sinisen jakautumisaika, maksatiehyiden mikroverenkierron indikaattori, on hieman mutta merkittävästi alempi glysiinillä ruiskutetuissa maksoissa

kuin vertailumaksoissa (n. 190 s glysiini-käsitellyssä maksassa ja vastaavasti 225 s vertailumaksoissa,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ), kun trypan-sininen ruiskutetaan maksaan 5 minuuttia reperfuusion jälkeen. Arvot kuitenkin alenevat huomattavasti glysiinin avulla annoksesta riippuen, kun trypan-sininen ruiskutetaan 40 minuutin reperfuusion lopussa. Trypan-sinisen jakautuminen tasaisesti kesti n. 460 sekuntia vertailunäytteissä, kun taas arvot alenivat n. 250 sekuntiin ruiskutettaessa 2 mM glysiiniä. Pitoisuus, joka sai aikaan trypan-sinisen jakautumisajan alenemisen puoleen maksimaalisesta on myös n. 180  $\mu\text{M}$ .

Glysiini minimoi LDH:n vapautumisen ja solukuoleman melkein kokonaan reperfuusion aikana annoksesta riippuen. Glysiinillä on näin ollen voimakkaita soluja suojaavia vaikutuksia reperfuusioauriota vastaan alhaisen virtauksen-takaisinvirtauksen maksan perfuusiomallissa rotalle.

Trypan-sinisen jakautumisaika alenee glysiinillä annoksesta riippuen puolimaksimaalisen vaikutuksen ollessa samanlainen kuin glysiinin soluja suojaava vaikutus (180  $\mu\text{M}$ ). Koska trypan-sinisen jakautumisaikaan voivat vaikuttaa ei ainoastaan maksan mikroverenkierron häiriöt vaan myös maksasolun vaurio, trypan-sinisen jakautumisaika mitataan vain 5 minuutin takaisinvirtauksen jälkeen reperfuusioaurion ollessa minimaalinen. Tämä arvo alenee myös merkittävästi glysiinin avulla, mutta vähemmässä määrin osoituksena parantuneesta maksan mikroverenkierrosta.

Myös muita mahdollisia happivajaukseen ja reperfuusioaurioon liittyviä mekanismeja, kuten ATP:n nesteenpoistoa ja sauvajyvästen toiminnan muuttumista, tutkitaan. Sappituotantoon, erittäin energiariippuvaiseen prosessiin, glysiini ei vaikuta osoittaen, että glysiini ei minimoi ATP:n nesteenpoistoa, ja hapen imeytymistä, sauvajyvästen toiminnan indikaattoria, glysiini ei myöskään muuta. Päätelmänä glysiini paran-

taa maksan mikroverenkiertoa ja suojaa sitä happiriippuvaista reperfuusiovauriota vastaan.

ESIMERKKI 3. Glysiinillä esikäsittelyn vaikutus kuoleisuuteen osittaisen maksan paikallisen verettömyyden/reperfuusion ja LPS-ruiskeen jälkeen.

Vertailuruokavalion ja vastaavasti glysiiniruokavalion 3 päivän syöttämisen jälkeen rotille järjestetään osittainen maksan paikallinen verettömyys 90 minuutin ajaksi metoksifluraaninukutuksen aikana. Lähes tappava LPS-annos (5 mg/kg) ruiskutetaan häntälasikimön kautta 6 tuntia reperfuusion jälkeen.

#### TULOKSET

Kaikki vertailurotat pysyivät elossa ilman LPS-ruisketta 24 tuntia 90 minuutin osittaisen paikallisen verettömyyden/reperfuusion jälkeen (n=4). Kaikki vertailuruokavaliolla syötetyt ja 90 minuutin osittaiseen paikalliseen verettömyyteen/reperfuusioon altistettut rotat kuolevat 24 tunnin kuluessa (lähes tappavan) LPS-ruiskeen (n=4) jälkeen.

Rottien esikäsittely glysiiniruokavaliolla paransi tuntuvasti elossa pysymistä (5 rottaa kuudesta pysyi elossa) samoissa olosuhteissa (90 minuutin osittainen paikallinen verettömyys/reperfuusio ja annettu LPS-ruiske) havaintojakson (24 tuntia ruikutushetkestä) aikana;  $p < 0,05$  Fisherin kokeella.

ESIMERKKI 4. Ruokavalion glysiinin vaikutukset alkoholiperäiseen maksavaurioon

#### 4.1 Materiaalit ja menetelmät

##### a. Eläimet

Wistar urosrottiin, jotka painoivat kukin 300-320 g, asennettiin Tsukamoton ja Frenchin kuvaamat vatsan sisäiset kanyylit. Kanyylit tunnettiin ihon

alle kaulan selänpuoleiseen asemaan ja kiinnitettiin infuusiopumppuihin jousi-vaijerilaitteen ja pyörivän nivelen avulla, joka mahdollisti rottien vapaan liik-  
kumisen aineenvaihduntahäikeissä. Eläimiin ruiskutet-  
5 tiin jatkuvasti 4 viikkoon asti runsasrasvaista ruoka-  
valiota, joka sisälsi etanolia. Kaikki eläimet saivat inhimillistä huolenpitoa noudattaen säädettyjä suosi-  
tuksia.

#### b. Ruokavalio

10 Käytettiin Thompsonin ja Reitzin kuvaamaa nestemäistä ruokavaliota. Se sisälsi maissiöljyä ras-  
vana (37 % kokonaiskaloreista), proteiinia (23 %),  
hiilihydraatteja (5 %), mineraaleja ja vitamiineja,  
lisäksi etanolia tai samakalorista maltoosi-  
15 dekstriiniä (35 %), jota tämän jälkeen nimitetään nes-  
temäiseksi vertailuruokavalioksi. Glysiini (2 tai 5  
p%) lisättiin nestemäiseen vertailuruokavalioon; täl-  
laisiin ruokavalioihin viitataan hakemuksessa tämän  
jälkeen nestemäisenä 2 % glysiiniruokavaliona ja vas-  
20 taavasti nestemäisenä 5 % glysiiniruokavaliona.

#### c. Virtsan kerääminen ja etanolin analysointi

Virtsassa oleva etanolipitoisuus, joka kuvaa  
veren alkoholitasoja, mitattiin päivittäin. Rotat oli  
majoitettu aineenvaihduntahäikeihin, jotka erottivat  
25 virtsan ulosteista, ja virtsa kerättiin 24 kuluessa  
pulloihin, jotka sisälsivät mineraaliöljyä haihtumisen  
estämiseksi. Joka päivä kello 09.00 virtsan keräyspul-  
lot vaihdettiin ja 1 ml näytettä varastoitiin  
-20°C:ssa mikroputkilossa myöhempää etanolianalyysiä  
30 varten. Etanolipitoisuus määritettiin mittaamalla ab-  
sorbanssi kohdalla 360 nm, joka on tulos NAD<sup>+</sup>:n pel-  
kistymisestä NADH:ksi alkoholidehydrogenaasin avulla.

#### d. Veren kokoaminen ja aspartaatti-aminotrans- feraasi (AST)

35 Veri koottiin häntälaskimon kautta kerran  
viikossa ja sentrifugoitiin. Seerumia varastoitiin  
-20°C:ssa mikroputkilossa siihen asti, kunnes se ana-

lysoitiin AST:n osalta normaalien entsyymaattisten menetelmien avulla. Kerätty veri (100 µl) analysoitiin myös etanolin osalta, kuten edellä on kuvattu, ja maksaportin veri otettiin myös talteen, kun maksan koepalan otto suoritettiin toisena ja neljäntenä etanolilla käsittelyviikkona.

e. Etanolianalyysi hengityksestä, ääreis- ja porttiverestä, ulosteiden ja vatsan sisältö

Etanolipitoisuuksien määrittämiseksi hengityksestä rotat pakotettiin hengittämään suljettuun lämmitettyyn kammioon (37°C) 20 sekunnin ajan ja 1 ml hengitystä kerättiin kaasutiiviiseen ruiskuun. Etanolipitoisuudet analysoitiin kaasukromatografian avulla (GC). Ääreis- ja porttiveri analysoitiin myös GC:n avulla. Veri (100 µl) sekoitettiin 900 µl:aan tislattua vettä suljetussa kolvissa, jota inkuboitiin 30 minuutin ajan 37°C:ssa, ja 1 ml kaasufaasia koottiin ja analysoitiin GC:n avulla. Rotan ulosteet kerättiin suoraan peräaukosta, homogenoitiin tislatussa vedessä ja inkuboitiin ja analysoitiin, kuten edellä on kuvattu veren osalta. Vatsan sisältö kerättiin myös talteen, kun rotat lopetettiin neljäntenä etanolikäsittelyviikkona, ja analysoitiin, kuten edellä on kuvattu veren osalta.

f. Glysiinipitoisuuden määrittäminen verestä

4 viikon etanolikäsittelyn jälkeen koottiin 500 ml verinestettä ja varastoitiin -80°C:ssa veressä olevan glysiinipitoisuuden määrittämistä varten HPLC:n avulla. Glysiinin kvantitatiivinen analyysi heparinisoitussa verinesteessä suoritettiin käyttäen PICP-TAG-menetelmää (Waters, Milford, MA). Verinestenäytteet hydrolysoitiin aluksi HCl:llä ja jatkokäsiteltiin sitten fenyyli-isotiosyanaatilla (PITC) fenyyliitiokarbamyyli(PTC) aminohappojen tuottamiseksi. Aminohapot, mukaanlukien glysiini, määritettiin automatisoidun gradientin käänteisfaasin korkeapainenestekromatografian (HPLC) avulla.

## g. Patologinen arviointi

Rotille suoritettiin maksan koepalan otto ja ruumiinavaus 2 ja 4 viikon etanolikäsittelyn jälkeen. Maksat kiinnitettiin formaliinilla, upotettiin para-

5 fiiniin ja värjättiin hematoksyliinillä ja eosiinilla rasvoittumisen, tulehtumisen ja kuolion arvioimiseksi. Maksan patologia pisteytettiin, kuten Nanji et al. ovat kuvanneet, seuraavasti: rasvoittuminen (prosenttia maksasoluja, jotka sisältävät rasvaa): <25

10 % = 1+; <50 % = 2+; <75 % = 3+, >75 % = 4+; tulehtuminen ja kuolio: 1 pesäke/pienitehoinen kenttä = 1+; 2 tai useampia = 2+.

## h. Tilastot

ANOVA:a tai Studentin t-koetta käytettiin so-

15 vellettuna tilastollisen merkityksen määrittämiseen. Patologisten pisteytysten vertailemiseksi Kruskal-Wallis ANOVA:a käytettiin luokitteluihin. Pienempi p:n arvo kuin 0,05 valittiin ennen tutkimusta merkittä-

vyystasoksi.

20 4.2 TULOKSET

Havaittiin, että nestemäisellä vertailuruokavaliolla, nestemäisellä 2 % glysiiniruokavaliolla ja nestemäisellä 5 % glysiiniruokavaliolla syötettyjen rottien kehon painoilla oli pyrkimys tutkimuksen kes-

25 täessä laskea ensimmäisen viikon aikana. Sitten kehon painot stabiloituivat ja olivat vakioita seuraavan 3 viikon etanolikäsittelyn aikana. Tutkittujen ryhmien joukossa kehon painossa ei ollut merkittäviä eroja.

Etanolin imeytyminen lisääntyi vähitellen 9-

30 10 mg:aan/kg/päivä ensimmäisen viikon aikana leikkauksen jälkeen. Imeytyminen oli 10 ja 13 mg:n/kg/päivä välillä viikkojen 2-4 aikana, eikä merkittäviä eroja esiintynyt ryhmien välillä. Glysiinipitoisuus verines-

teessä 4 viikon käsittelyn jälkeen oli  $779 \pm 66$

35  $\mu$ moolia/l rotilla, jotka saivat nestemäisen 5 % glysiiniä sisältävän ruokavalion, ja  $198 \pm 16$   $\mu$ moolia/l etanolilla syötetyillä rotilla.

Määritettiin päivittäistä virtsan alkoholipitoisuutta kuvaavat käyrät nestemäisellä vertailuruokavaliolla ja nestemäisillä glysiiniruokavalioidella syötetyille rotille. Alkoholitasot vaihtelevat jaksottaisena kuviona läheltä nollaa yli 300 mg:aan/dl nestemäisellä vertailuruokavaliolla syötetyillä rotilla, vaikka etanolia ruiskutettiin jatkuvasti. Nestemäisillä glysiiniruokavalioidella syötetyillä rotilla alkoholipitoisuudet olivat hyvin alhaisia, mutta silti jaksottaisia. Keskimääräiset virtsan alkoholipitoisuudet laskivat merkittävästi annoksesta riippuen; 50 %:n keskimääräinen virtsan alkoholipitoisuuden lasku saatiin syöttämällä nestemäistä 2 % glysiiniruokavaliota, 70 %:n lasku nestemäisellä 5 % glysiiniruokavaliolla.

Seerumin AST nestemäisellä vertailuruokavaliolla syötetyillä rotilla lisääntyi vähitellen altistusaikana ja saavutti 183 IU/l:n tason 4 viikon jälkeen (vertailuarvo 70 IU/l). Tämä lisäys vaimeni merkittävästi molemmilla glysiinikäsittelyillä joka pisteessä tutkimuksen aikana. 4 käsittelyviikon jälkeen seerumin AST-taso oli 66 IU/l 2 % glysiinikäsittelyssä rotissa, joita syötettiin nestemäisellä 2 % glysiiniruokavaliolla ja 100 IU/l ryhmässä, jota syötettiin nestemäisellä 5 % glysiiniruokavaliolla.

Nestemäisellä vertailuruokavaliolla syötetyillä rotilla havaittiin lievää rasvoittumista vain 2 viikon käsittelyn jälkeen. 4 viikon käsittelyn jälkeen mainitulla nestemäisellä vertailuruokavaliolla silminnähtäviä rasvamuutoksia ei ollut nähtävissä vertailurotissa, joita ei oltu käsitelty etanolilla. Nestemäisellä 2 % glysiini- ja nestemäisellä 5 % glysiiniruokavaliolla syötetyissä rotissa rasvamuutokset vaimenivat ja kuolio ja tulehtuminen olivat melkein kokonaan poissa. Rasvoittumisen ja kuolion vähenemiset olivat tilastollisesti merkittäviä nestemäisillä glysiiniruokavalioidella syöttämisen jälkeen; ainoastaan tendenssi tulehtumisen vähenemiseen havaittiin nestemäisillä

glysiiniruokavalioilla syöttämisen jälkeen johtuen suuresta vaihtelusta.

5       Lopuksi, vatsalaukun sisällössä oleva alkoholi myös aleni huomattavasti glysiinikäsitellyissä rotissa. Siten on selvää, että glysiini alentaa etanolipitoisuutta vatsalaukussa mahdollisesti etanoliaineenvaihduntaa koskevien vaikutusten kautta.

TAULUKKO 1

Glysiinin vaikutus etanolipitoisuuksiin rotissa käytettäessä Tsukamoto-French mallia

| <u>Käsittely</u> | <u>Hengitys</u> | <u>Ulosteet</u> | <u>Virtsat</u><br>A.M. | <u>Veri</u><br>24 h | <u>Vatsalaukku</u><br>Porttilaskimo |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Etanoli          | 108±12          | 82±21           | 184±12                 | 211±16              | 199±45                              |
|                  |                 |                 |                        |                     | 357±65                              |
|                  |                 |                 |                        |                     | 761±625                             |
| Etanoli+         |                 |                 |                        |                     |                                     |
| 5 % glysiini     | 5±4***          | 15±11*          | 26±25**                | 24±8***             | 21±13**                             |
|                  |                 |                 |                        |                     | 10±7***                             |
|                  |                 |                 |                        |                     | 26±41*                              |

5

Hengityksen, ulosteiden, veren ja vatsalaukun sisältö kerättiin talteen rotista ja analysoitiin kaasutilan kaasukromatografian avulla. Virtsanäytteet analysoitiin entsymaattisesti. Näytteet on otettu yhteensä kuudesta rotasta. Tulokset on ilmaistu keskiarvona ± standardipoikkeama.

10 \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 etanoli- ja etanoli- + glysiinisyötettyjen rottien arvojen vertailemiseksi Studentin t-kokeen avulla.

ESIMERKKI 5. Enteraalisia koostumuksia

Seuraavissa seoksissa MM edustaa mineraaliseen, SM hivenaineseen ja VM vitamiiniseen. Näiden kolmen seoksen koostumus on seuraavassa:

5                    MM

|    | <u>Ainesosat</u>          | <u>g/100 g</u> |
|----|---------------------------|----------------|
|    | Maltodekstriinejä         | 34,40          |
|    | Kaliumsitraatti/fosfaatti | 34,60          |
|    | Magnesiumdisitraatti      | 8,20           |
| 10 | Kalsiumkloridi            | 8,00           |
|    | Natriumsitraatti/kloridi  | 9,00           |
|    | Sitruunahappo             | 3,50           |
|    | Koliinitartraatti         | 2,30           |

15                    SM

|    | <u>Ainesosat</u>      | <u>g/100 g</u> |
|----|-----------------------|----------------|
|    | Maltodekstriinejä     | 47,79          |
|    | Molybdeenijuusto      | 18,00          |
|    | Kromijuusto           | 9,20           |
| 20 | Sinkkisulfaatti       | 7,00           |
|    | Seleeni-juusto        | 7,00           |
|    | Rauta(II)sulfaatti    | 6,92           |
|    | Kupari(II)glukonaatti | 2,24           |
|    | Mangaani(II)sulfaatti | 1,12           |
| 25 | Natriumfluoridi       | 0,70           |
|    | Kaliumjodidi          | 0,03           |

VM

|    | <u>Ainesosat</u>             | <u>g/100 g</u> |
|----|------------------------------|----------------|
| 30 | Maltodekstriinejä            | 43,44          |
|    | Natriumaskorbaatti           | 35,00          |
|    | Vitamiini E-asetatti 50 %    | 16,00          |
|    | Niasiiniamidi                | 1,55           |
|    | Vitamiini A-asetatti         | 1,20           |
| 35 | Ca-D-pantotenaatti           | 0,98           |
|    | Vitamiini K <sub>1</sub> 1 % | 0,71           |

|   |                                 |      |
|---|---------------------------------|------|
|   | Vitamiini B <sub>12</sub> 0,1 % | 0,30 |
|   | Vitamiini D <sub>3</sub>        | 0,28 |
|   | Vitamiini B <sub>6</sub>        | 0,20 |
|   | Vitamiini B <sub>1</sub>        | 0,17 |
| 5 | Vitamiini B <sub>2</sub>        | 0,15 |
|   | Foolihappo                      | 0,02 |
|   | Biotiini                        | 0,01 |

## Glysiiniä sisältävä koostumus

|    |                       |                |
|----|-----------------------|----------------|
| 10 | <u>Ainesosat</u>      | <u>g/100 g</u> |
|    | Vesi                  | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä     | 10,10          |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja   | 4,60           |
|    | Glysiini              | 3,00           |
| 15 | MM                    | 2,00           |
|    | SM                    | 0,05           |
|    | VM                    | 0,10           |
|    | β-karotiini           | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:        |                |
| 20 | Palmuöljy             | 2,33           |
|    | Auringonkukkaöljy     | 0,26           |
|    | Emulgaattori Nathin E | 0,13           |
|    |                       | 100,00         |

## 25 Glysiiniä ja arginiinia sisältävä koostumus

|    |                     |                |
|----|---------------------|----------------|
|    | <u>Ainesosat</u>    | <u>g/100 g</u> |
|    | Vesi                | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä   | 8,93           |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja | 4,60           |
| 30 | Glysiini            | 3,00           |
|    | Arginiini           | 1,17           |
|    | MM                  | 2,00           |
|    | SM                  | 0,05           |
|    | VM                  | 0,10           |
| 35 | β-karotiini         | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:      |                |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Palmuöljy             | 2,36   |
| Auringonkukkaöljy     | 0,23   |
| Emulgaattori Nathin E | 0,13   |
|                       | 100,00 |

5

Glysiiniä ja kalaöljyä ( $\omega$ -3-rasvahappoja) sisältävä  
koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>      | <u>g/100 g</u> |
|----|-----------------------|----------------|
|    | Vesi                  | 77,40          |
| 10 | Maltodekstriinejä     | 10,10          |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja   | 4,60           |
|    | Glysiini              | 3,00           |
|    | MM                    | 2,00           |
|    | SM                    | 0,05           |
| 15 | VM                    | 0,10           |
|    | $\beta$ -karotiini    | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:        |                |
|    | Palmuöljy             | 1,32           |
|    | Auringonkukkaöljy     | 0,23           |
| 20 | Emulgaattori Nathin E | 0,13           |
|    | Kalaöljy EPAX 3000 TG | 1,04           |
|    |                       | 100,00         |

Glysiiniä ja RNA:ta sisältävä koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>    | <u>g/100 g</u> |
|----|---------------------|----------------|
| 25 | Vesi                | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä   | 9,96           |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja | 4,60           |
|    | Glysiini            | 3,00           |
| 30 | Juustouute-RNA      | 0,14           |
|    | MM                  | 2,00           |
|    | SM                  | 0,05           |
|    | VM                  | 0,10           |
|    | $\beta$ -karotiini  | 0,03           |
| 35 | Rasva-aineita:      |                |
|    | Palmuöljy           | 2,33           |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Auringonkukkaöljy     | 0,26   |
| Emulgaattori Nathin E | 0,13   |
|                       | 100,00 |

5 Glysiiniä, arginiinia ja kalaöljyä ( $\omega$ -3-rasvahappoja) sisältävä koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>      | <u>g/100 g</u> |
|----|-----------------------|----------------|
|    | Vesi                  | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä     | 8,93           |
| 10 | Na/Ca-kaseinaatteja   | 4,60           |
|    | Glysiini              | 3,00           |
|    | Arginiinia            | 1,17           |
|    | MM                    | 2,00           |
|    | SM                    | 0,05           |
| 15 | VM                    | 0,10           |
|    | $\beta$ -karotiini    | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:        |                |
|    | Palmuöljy             | 1,32           |
|    | Auringonkukkaöljy     | 0,23           |
| 20 | Emulgaattori Nathin E | 0,13           |
|    | Kalaöljy EPAX 3000 TG | 1,04           |
|    |                       | 100,00         |

Glysiiniä, arginiinia ja RNA:ta sisältävä koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>    | <u>g/100 g</u> |
|----|---------------------|----------------|
| 25 | Vesi                | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä   | 8,79           |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja | 4,60           |
|    | Glysiini            | 3,00           |
| 30 | Arginiinia          | 1,17           |
|    | Juustouute-RNA      | 0,14           |
|    | MM                  | 2,00           |
|    | SM                  | 0,05           |
|    | VM                  | 0,10           |
| 35 | $\beta$ -karotiini  | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:      |                |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Palmuöljy             | 2,33   |
| Auringonkukkaöljy     | 0,26   |
| Emulgaattori Nathin E | 0,13   |
|                       | 100,00 |

5

Glysiiniä, RNA:ta ja kalaöljyä ( $\omega$ -3-rasvahappoja) sisältävä koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>      | <u>g/100 g</u> |
|----|-----------------------|----------------|
|    | Vesi                  | 77,40          |
| 10 | Maltodekstriinejä     | 9,96           |
|    | Na/Ca-kaseinaatteja   | 4,60           |
|    | Glysiini              | 3,00           |
|    | Juustouute-RNA        | 0,14           |
|    | MM                    | 2,00           |
| 15 | SM                    | 0,05           |
|    | VM                    | 0,10           |
|    | $\beta$ -karotiini    | 0,03           |
|    | Rasva-aineita:        |                |
|    | Palmuöljy             | 1,32           |
| 20 | Auringonkukkaöljy     | 0,23           |
|    | Emulgaattori Nathin E | 0,13           |
|    | Kalaöljy EPAX 3000 TG | 1,04           |
|    |                       | 100,00         |

25 Glysiiniä, arginiinia, RNA:ta ja kalaöljyä ( $\omega$ -3-rasvahappoja) sisältävä koostumus

|    | <u>Ainesosat</u>    | <u>g/100 g</u> |
|----|---------------------|----------------|
|    | Vesi                | 77,40          |
|    | Maltodekstriinejä   | 8,79           |
| 30 | Na/Ca-kaseinaatteja | 4,60           |
|    | Glysiini            | 3,00           |
|    | Arginiinia          | 1,17           |
|    | Juustouute-RNA      | 0,14           |
|    | MM                  | 2,00           |
| 35 | SM                  | 0,05           |
|    | VM                  | 0,10           |

|   |                       |        |
|---|-----------------------|--------|
|   | β-karotiini           | 0,03   |
|   | Rasva-aineita:        |        |
|   | Palmuöljy             | 1,32   |
|   | Auringonkukkaöljy     | 0,23   |
| 5 | Emulgaattori Nathin E | 0,13   |
|   | Kalaöljy EPAX 3000 TG | 1,04   |
|   |                       | 100,00 |

Kuten jo edellä on tuotu esiin kalaöljy on omega-3-PUF-happojen luonnollinen lähde, kun taas auringonkukkaöljy on omega-6-PUF-happojen luonnollinen lähde.

Vaikka keksintöä on valaistu esimerkein viittaamalla glysiinin kykyyn vaimentaa TNF:n lisääntymistä ja siten minimoida endotoksisen shokin ja iskeemisen reperfuusioaurion vaikutuksia rotissa, asiantuntija, joka on ollut hyötyä tästä julkaisusta, havaitsee, että keksintöön kuuluu lisämuotoja näiden erityisesti julkistettujen lisäksi. Esim. keksintö tuottaa lisäksi ainakin yhden aminohapon - tai sen esivaiheen, joka

20 valitaan ryhmästä, jossa on glysiini,alaniini ja seriini tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, käytön syklisten polypeptidi-immunosuppressiivisten aineiden, neutraloivien vasta-aineiden, jotka on rakennettu TNF:ää tai liukoisia TNF-reseptoreita vastaan,

25 immunosuppressiivisten vaikutusten voimistamiseksi synergisesti. Tällainen käyttö saattaa tuottaa myös suojaavan vaikutuksen immunosuppressiiviseen aineeseen nähden, joka voi olla esim. syklosporiini tai FK-506. Lisäksi potilaat, jotka kärsivät useista sairauksista

30 ja/tai tiloista voivat hyötyä keksinnön lääkeaineen tai formulaation antamisesta heille. Tällaisiin sairauksiin ja tiloihin kuuluvat: osteoporoosi; niveltulehdus; etäispesäke; keuhkotaudit, ARDS/keuhkotauti; tulehdukselliset suolistosairaudet, kuten haavainen paksusuolen tulehdus ja Crohnin tauti; sepelvaltimosairaus;

35 maksakirroosi - joko alkoholin tai viruksen aiheuttama; verenmyrkytys, mukaanlukien endotoksinen shok-

- ki; AIDS:ssa ja syöpäpotilailla havaittu hukkaoireyhtymä; maksatulehdus; munuaistulehdus; patologinen angiogenesis; säteily- ja kemoterapiahoidot, jotka esim. vahingoittavat luuydintä; elimen hylkiminen; tapaturma; jälki-iskeeminen sydänvaurio; haavaumat; rappeuttavat tilat, kuten liikehermon sairaus ja multippeli skleroosi, jotka liittyvät hermojärjestelmään; aivovamma ja aivotulehdus; haimatulehdus; munuaisvika; diabetes; halvaus ja astma.

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Ainakin yhden aminohapon käyttö, t u n -  
n e t t u siitä, että se valitaan ryhmästä, joka si-  
sältää glysiinin, alaniinin ja seriinin tai niiden fy-  
5 siologisesti hyväksyttäviä suoloja, lääkeaineen tai  
ravintoformulaation valmistuksessa kuoliokasvainteki-  
jän (TNF) tasojen alentamiseksi potilaissa, joissa ta-  
sot ovat kohonneet niiden yli, jotka välittävät fysio-  
logista homeostaasia ja paikallista tulehtumista.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö,  
t u n n e t t u siitä, että TNF-tasojen alentaminen  
saadaan aikaan ehkäisemällä tai alentamalla:
- (i) makrofagityyppisten solujen kuoliokasvainteki-  
jän (TNF) tuotantoa;
  - 15 (ii) TNF:n vapautumista makrofagityyppisistä so-  
luista; ja/tai
  - (iii) TNF:n sitoutumista TNF-reseptorien avulla.
3. Ainakin yhden aminohapon - tai sen esias-  
teen käyttö, t u n n e t t u siitä, että se valitaan  
20 ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja serii-  
nin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja,  
lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa liialli-  
sesta alkoholin käytöstä johtuvan maksasairauden ja  
siitä tuloksena olevien suolisto- ja haimasairauksien  
25 riskin estämiseksi tai vähentämiseksi tällaisen hoidon  
tarpeessa olevissa potilaissa.
4. Ainakin yhden aminohapon - tai sen esivai-  
heen käyttö, t u n n e t t u siitä, että se valitaan  
ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja serii-  
30 nin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja,  
lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa etanolin  
myrkyllisyyden estämiseksi tai vähentämiseksi tällai-  
sen hoidon tarpeessa olevissa potilaissa.
5. Ainakin yhden aminohapon - tai sen esivai-  
35 heen käyttö, t u n n e t t u siitä, että se valitaan  
ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja serii-

nin tai niiden fysiologisesti hyväksyttäviä suoloja, lääke- tai ravintoformulaation valmistuksessa etanolin poistamiseksi vatsalaukusta ennen systeemiseen verenkiertoon pääsyä tällaisen hoidon tarpeessa olevissa potilaissa.

6. Lääkeaine, tunnettu siitä, että se sisältää pääasiassa tislattua vettä ja 0,1-90 p% yhtä tai useampaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin, vapaassa muodossa tai niiden farmakologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai niiden seoksia.

7. Infuusioneste, tunnettu siitä, että se sisältää infuusionestelitrassa 0,1-5,0 g yhtä tai useampaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin, vapaassa muodossa tai niiden farmakologisesti hyväksyttävän suolan tai seoksia.

8. Lääkeaine tai ravintoformulaatio, tunnettu siitä, että se sisältää tehokkaita määriä:

(a) yhtä tai useampaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin, alaniinin ja seriinin, vapaassa muodossa tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai niiden seoksia (komponentti (a))

yhdessä yhden tai useamman yhdisteen kanssa, jotka valitaan

(b) omega-3-PUF-hapoista tarvittaessa seostettuna omega-6-PUF-happojen kanssa (komponentti (b));

(c) L-arginiinista tai muista fysiologisesti hyväksyttävistä yhdisteistä, jotka liittyvät polyamiinin synteesiin, tai niiden seoksista (komponentti (c));

(d) nukleiiniemäslähteestä (komponentti (d)).

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen lääkeaine tai ravintoformulaatio, tunnettu siitä, että yksi annosyksikkö sisältää

(a) 1,5-80 paino-osaa yhtä tai useampaa aminohappoa, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää glysiinin,

alaniinin ja seriinin, vapaassa muodossa tai fysiologisesti hyväksyttävän suolan muodossa tai niiden seoksia,

yhdessä yhden tai useamman yhdisteen kanssa, joka  
5 valitaan ryhmästä, joka sisältää

(b) 2-5 paino-osaa omega-3-polytyydyttämättömiä rasvahappoja;

(c) 7,5-20 paino-osaa L-arginiinia tai L-ornitiinia tai niiden seoksia; ja

10 (d) 1,7-2,0 paino-osaa RNA.

10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen lääkeaine tai ravintoformulaatio, tunnettu siitä, että se sisältää komponentin (a) yhdessä komponentin (c) kanssa.

15 11. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen lääkeaine tai ravintoformulaatio, tunnettu siitä, että se sisältää komponentin (a) yhdessä komponenttien (b) ja (c) kanssa.

20 12. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen lääkeaine tai ravintoformulaatio, tunnettu siitä, että se sisältää komponentin (a) yhdessä komponenttien (b), (c) ja (d) kanssa.