

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 20060154 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **20060154**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 31/232 (2006.01)
C07C 69/587 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07C 67/14 (2006.01)
C07C 67/28 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.08.2004**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **17.02.2006**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.05.2006**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **14.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **13.08.2004** **PCT/GB2004/003524**
Internationell ansökan - International
application

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

18.08.2003 GB 0319358 P 14.05.2004 GB 0410846 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • BTG International Ltd, 10 Fleet Place, Limeburner Lane, LONDON EC4M 7SB, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Harbige, Laurence S., London SE10 9LS, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Leach, Michael J., London SE10 9LS, ISO-BRITANNIA, (GB)

3 • Sharief, Mohammed, London SE1 9RT, ISO-BRITANNIA, (GB)

4 • Barraclough, Paul, Surrey KT17 1DH, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

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

Neurogeneratiivisten tilojen hoito

Vård av neurogenerativa tillstånd

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Aikaansaadaan menetelmä neurodegeneratiiviseen sairauteen hoitoa tarvitsevan potilaan hoitamiseksi, jossa menetelmässä tälle potilaalle annetaan terapeuttisesti tehokas annos lipidiglyseridiä, joka käsittää glyseroliosan ja rasvahappo-osan, joka rasvahappo-osa on valittu ryhmästä, jonka muodostavat y-linoleenihappo, dihomio-7-linoleenihappo ja arakidonihappo, jolle menetelmälle on tunnusomaista se, että valittu rasvahappo-osa on kiinnittynyt glyseroliosaan sen sn-2-asemassa. Edullisesti menetelmä on sellainen, jossa lipidiä annetaan sellaisen ajan ja sellaisena annoksena, joka riittää ylläpitämään tai kohottamaan TGF-beta1 -tasot potilaassa terapeuttisiin tasoihin. (Kuvio.)

Ett förfarande presenteras för behandling av en patient i behov av terapi för en neurodegenerativ sjukdom, varvid förfarandet omfattar att man ger patienten en terapeutiskt verksam dos av en lipidglycerid som omfattar en glycerolhalvpart och en fettsyrehalvpart, där fettsyrehalvparten valts ur en grupp vari ingår y-linolensyra, dihomio-y-linolensyra och arachidonsyra, kännetecknad av att den valda fettsyrehalvparten är bunden till vid glycerolhalvparten vid sin sn-2-position. Fördelaktigt är metoden sådan, att lipiden ges under en tidsperiod och i en dos som är tillräckliga för att hålla patientens TGF-beta1 -nivåer vid terapeutiska nivåer eller höja dem till sådana nivåer.

Neurodegeneratiivisten tilojen hoito

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää neurodegeneratiivisten tilojen hoitamiseksi, erityisesti sellaisten tilojen, joissa transformoivan kasvutekijä β :n (TGF- β), erityisesti
5 TGF- β 1:n, lisäys on hyödyllistä. Yksityiskohtaisemmin esillä oleva keksintö aikaansaa hoidon, joka kohdistuu neurodegeneratiivisiin tiloihin, erityisesti sellaisiin kuin esimerkiksi demyelinaatiosairaudet, kuten multippeliskleroosi, Alzheimerin ja Parkinsonin taudit ja degeneratiiviset jälkiseuraukset, jotka liittyvät pään vammaan, aivohalvaukseen ja
10 kallonsisäisiin verenvuotoihin, jolloin hermostollista toimintaa voidaan parantaa tai palauttaa heikentyneestä tilasta, esimerkiksi remyelinaatiolla.

Edelleen aikaansaadaan sellaisten tunnettujen ja uusien yhdisteiden uusi käyttö, jotka käsittävät tyydyttymättömiä rasvahappo-osia, sellaisten lääkkeiden valmistamiseen, joilla
15 kyetään tehokkaasti hoitamaan näitä tiloja, yksityiskohtaisemmin niillä kyetään saavuttamaan neurologisen toiminnan palautumisen osalta aikaisemmin saavuttamattomat onnistumistasot.

Keksijän samanaikaisesti vireillä oleva julkaisematon patenttihakemus PCT/GB04/002089, joka sisällytetään tähän viitteellä, koskee kasvi- ja sieniöljyjen
20 käyttöä neurodegeneratiivisten sairauksien hoitoon. Näissä öljyissä on suuri osuus välttämätöntä rasvahappoa γ -linoleenihappo (GLA) niiden lipidien sn-2-asemassa, tyypillisesti sitä on yli 40 % kaikista öljyn sn-2-rasvahapoista.

Kirjallisuudessa on hyvin selostettu, että välttämättömillä rasvahapoilla (EFA, essential
25 fatty acids), joilla on n-3- ja n-6-tyydyttymättömyysmalli, on hyödyllinen vaikutus monenlaisissa ihmisen fysiologisissa häiriöissä, mukaan luettuna autoimmuunisairaus (WO 02/02105). Harbige (1998) Proc. Nut. Soc. 57, 555-562, tarkasteli ruokavalion täydentämistä n-3- ja n-6-hapoilla autoimmuunisairautsiloissa ja pani erityisesti merkille todistusaineiston γ -linoleenihappoa (GLA) ja/tai linolihappoa (LA) runsaasti sisältävien
30 öljyjen hyödyllisyydestä.

Bates *et al.* panivat merkille, että lipidiöljyjen, jotka käsittivät linolihappo- ja γ -linoleenihappotähteiden seoksen, oli ehdotettu jo 1957 olevan mahdollisesti tehokkaampia tulehdus- ja autoimmuunisairauksien hoidossa, mutta he havaitsivat, että 3 g öljyä

päivässä (Naudicelle-helokkiöljy 7:1 LA:GLA) saavat potilaat, joilla oli pahenemisvaiheita, tulivat sairaammiksi koeöljyllä kuin kontrollilla.

- Vaikka MS-taudin etiologia on säilynyt tuntemattomana, tutkimukset ovat osoittaneet, että
- 5 MS-potilailla on normaalia korkeammat neuro-antigeenisten autoreaktiivisten T-solujen tasot. Nämä T-solut reagoivat *inter alia* emäksiseen myeliiniproteiiniin (MBP) ja oligodendrosyytin myeliiniglykoproteiiniin (MOG) ja niiden aktivaatiotaso on kohonnut verrattuna terveisiin kontrolleihin. Aksonivaurion, esimerkiksi kroonisen tulehduksen, demyelinaation ja astroglioosin, varsinaiset prosessit MS-taudissa ovat mutkikkaita, mutta
- 10 valkean aineen tulehduksen ja demyelinaation katsotaan määrävän sairauden vaikeuden, vaikka viime aikaiset tutkimukset ovat viitanneet siihen, että aksonivaurio MS-taudissa alkaa sairauden varhaisessa vaiheessa ja myötävaikuttaa toimintakyvyn heikkenemiseen (De Stefano *et al.* 2001).
- 15 Kokeellinen autoimmuuni enkefalomyeliitti (EAE) on yleisimmin käytetty eläinmalli MS-taudin immuunivälitteisiin vaikutuksiin. Marsulla suoritettut tutkimukset ovat osoittaneet, että linolihappo osittain estää EAE:n ilmaantuvuutta ja vaikeutta (Mcade *et al.* (1978)). Harbige *et al* (1995, 1997b) osoittivat linolihapon ja γ -linoleenihapon sairautta modifioivat vaikutukset EAE:n kliinisiin ja histopatologisiin ilmentymiin. Annoksesta
- 20 riippuen γ -linoleenihappo oli täysin suojaava akuutissa rotan EAE:ssa, kun taas linolihapolla oli annoksesta riippuva vaikutus kliiniseen vaikeuteen eikä se poistanut sitä.

- Kokeellisista havainnoista huolimatta ymmärretään, että ihmisen sairaus, multippeliskleroosi, on erittäin mutkikas, ja T-solujen ja muiden immuunivastetekijöiden
- 25 aktiivisuus voi käänteisesti pahentaa ja lievittää sitä. Oletetaan, että n-6-rasvahapot edistävät autoimmuuni- ja tulehdussairautta, mikä perustuu tuloksiin, jotka on saatu pelkällä linolihapolla. TGF- β 1:n ja PGE₂:n tuotannon on osoitettu lisääntyvän epäspesifisesti γ -linoleenihapolla ruokituissa hiirissä *ex vivo*. TGF- β 1:n on selostettu olevan suojaava akuutissa ja pahenevassa (relapsoivassa) EAE:ssa ((Racke *et al* (1993);
- 30 Santambrogio *et al.* (1993)), ja PG:n estäjät, kuten indometasiini, lisääntyvät ja siten pahentavat sairautta (Ovadia & Paterson (1982)).

- Sytokiinit on liitetty MS-taudin patogeneesiin, ja monet tutkimukset osoittavat myeliinitoksisten tulehduksellisten sytokiinien (TNF- α , IL-1 β ja IFN- γ) lisääntymisen, joka tapahtuu samanaikaisesti sairauden pahenemisvaiheen kanssa. Sitä vastoin anti-inflammatorisen ja immunosuppressiivisen sytokiinin, transformoivan kasvutekijä beeta-1:n (TGF- β 1), tasot näyttävät olevan pienentyneitä pahenemisvaiheen aikana ja nousevan potilaan alkaessa paranemisvaiheen. Näin ollen tasapaino biologisesti aktiivisen TGF- β 1:n ja proinflammatorisen TNF- α :n, IL-1 β :n ja IFN- γ :n välillä näyttää olevan poikkeavasti säädeltyä MS-taudin aaltoilun aikana.
- 10 EAE:stä tapahtuvan luonnollisen toipumisvaiheen aikana TGF- β 1:tä erittävät T-solut estävät EAE-effektorisoluja, TGF- β 1 ilmentyy keskushermostossa ja EAE:ssä oraalilla toleranssilla indusoidun suojan aikana TGF- β ja PGE₂ ilmentyvät aivoissa (Karpus & Swanborg (1991); Khoury *et al.* (1992)). Harbige (1998) päätteli, että ruokavalion γ -linoleenihapon vaikutukset EAE:hen välittyvät sellaisten Th₃-mekanismien välityksellä,
- 15 joihin liittyy TGF- β 1, ja mahdollisesti superoksididismutaasin antioksidanttiaktiivisuuden kautta.
- Purasruohoöljyn (tyypillisesti 20-23 % γ -linoleenihappoa ja 34-40 % linolihappoa 100 %:n rasvahappopitoisuutta kohti) ja *Mucor javanicus* -sienen öljyn (katso kuvio 1) on
- 20 osoitettu olevan tehokkaita EAE:n eläinmallissa, jota on käytetty tunnistamaan MS-tautiehdokkaita, vaikka niiden ei ole koskaan osoitettu olevan merkittävän tehokkaita ihmisen sairaudessa. Suuret määrät öljyä, joka sisälsi runsaasti linolia ja vähän γ -linoleenihappoa (EPO: linolihappo : γ -linoleenihappo, 7:1), osittain esti EAE:n ilmaantuvuutta ja vaikeutta rotalla (Mertin & Stackpoole, 1978), kun taas edellä viitattu
- 25 Batesin Naudicelle-tutkimus johti potilaiden tilan heikkenemiseen. Huolimatta siitä, että multippeliskleroosista kärsivät henkilöt ovat käyttäneet purasruohoöljyä ja muita GLA/LA-pitoisia öljyjä, kuten esimerkiksi helokkiöljyä, viimeisen 30 vuoden ajan tai niillä main, valtava enemmistö potilaista ei ole toipunut sairaudesta eikä heillä ole esiintynyt merkittävää paranemista, vaan taustalla oleva sairaus on jatkanut etenemistään
- 30 kuolemaan asti.

Käytettäväksi on ehdotettu *inter alia* γ -linoleenihappoa ja linolihappoa runsaasti sisältävää purasruohoöljyä keinona aikaansaada immuunisuppressio multippeliskleroosissa (US

4,058,594). Kriittisesti, ehdotettu annos on 2,4 grammaa öljyä päivässä eikä tehosta tarjota mitään varsinaisia todisteita. Tämä annos on paljon pienempi kuin se pieni annos 5 g/päivä, jonka havaittiin olevan tehon *in vivo* ihmisellä PCT/GB04/002089:n tutkimuksessa.

5

Myös muiden dramaattisempien immunosuppressanttihoitojen, mukaan luettuna T-solujen poistajat ja säätelijät, kuten syklofosfamidi, on osoitettu olevan tehokkaita EAE-mallissa, mutta kun näitä on käytetty ihmisen multippeliskleroositaudissa, oireet paranevat mutta taustalla oleva sairaus jatkaa etenemistään. T-solut tosiaan tuottavat ihmisessä hyödyllisiä sytokiinejä, kuten TGF- β 1:tä, samoin kuin haitallisia. David Baker neurologian laitokselta (Institute of Neurology, Iso-Britannia) on tehnyt yhteenvedon erosta, joka ilmenee siinä mikä on tehokasta EAE:ssä ja MS-taudissa, julkaisussa, jonka nimi on "*Everything stops EAE, nothing stops MS*", 10. toukokuuta, 2004, Ison-Britannian MS-yhdistyksen UK MS Frontiers -kokous.

15

On selvää, että immunosuppressio yksin ei voi parantaa MS-tautia. Tämä johtuu lähes varmasti sellaisesta perustavanlaatuisesta metabolisesta häiriöstä MS-potilailla autoimmuunitaudin lisäksi, joka johtaa kalvojen epänormaalisuuteen, sytokiinisäätelyn häiriintymiseen ja siitä seuraavaan immuunihyökkäykseen ja vaurioitumiseen. Vaikka potilaille tulee paranemisvaiheita aaltoilevassa sairaudessa, taustalla oleva demyelinaatioprosessi etenee.

20

MS-taudin "kultastandardihoitona" (gold standard treatment) on säilynyt interferoni, kuten β -Avonex®, Rebif® ja muut interferonivalmisteet. Tämä kultastandardihoito kohdistuu vain joidenkin potilaiden, esimerkiksi 30 %:n potilaista, tarpeisiin, ja jopa heillä oireiden parantuminen rajoittuu pahenemisjaksojen vaikeuden lievittymiseen. Vaikka oireet voivat vähetä osalla potilaista, sairaudella on taipumus edetä kohti suurempaa toimintakyvyn heikentymistä ja kuolemaa taustalla olevan degeneraation vuoksi.

25

Esillä olevan keksinnön keksijät ovat vielä julkaisemattomassa PCT/GB04/002089:n tutkimuksessaan yllättäen selvittäneet, että suostumalla "korkean annoksen" hoitoon triglyseridiöljyllä, joka sisältää suuria määriä sn-2-asetaman γ -linoleenihappoa (> 40 % tähteistä sn-2-asetamassa on γ -linoleenihappoa), niin että muu rasvahapposisältö on sopiva,

30

lähies kaikissa MS-taudin oireissa voidaan saavuttaa huomattavia paranemistasoja, jotka ylittävät suuresti nykyisellä kultastandardihoidolla saadun. Sellainen onnistuminen on erityisen hämmästyttävää siinä valossa, että aikaisempi muiden γ -linoleenihappoa sisältävien valmisteiden käyttö, esimerkiksi Naudicelle-tutkimus, ei ole tuottanut
5 onnistumista.

PCT/GB04/002089:n tutkimus osoittaa, että noin 18 kuukauden jakson aikana potilailla, jotka ottivat suuren annoksen (15 g/päivä) valikoitua runsaasti sn-2-asemassa γ -linoleenihappoa sisältävää purasruohoöljyä, oli merkitsevä ($p < 0,001$) ja selvä
10 paraneminen EDSS-arvossa, uusiutumiskertoja oli vähemmän, lihasten spastisuus ja kivuliaat sensoriset oireet symptomaattisesti helpottuivat ja kognitiivisten toimintojen objektiiviset mittaustulokset paranivat. Tämän purasruohoöljyn pienet annokset, 5 g/päivä, eivät tuottaneet vaikutusta.

Potilailla, jotka saivat suurimman annoksen tätä purasruohoöljyä, PBMC- (perifeerisen veren mononukleaarisolui) tuottaman TGF- β 1:n taso säilyi koejakson aikana, heillä proinflammatoriset sytokiinit TNF- α ja IL-1 β olivat merkitsevästi ja selvästi ($< 70\%$) alentuneet ja heillä PBMC-kalvon pitkäketjuiset omega-6-rasvahapot dihomio- γ -linoleenihappo (DHIA) ja arakidonihappo (AA) joko säilyivät tai lisääntyivät toisin kuin
20 potilailla, jotka saivat plaseboa ja joilla näitä rasvahappoja hävisi koko koejakson aikana.

Vaikka immunosuppression odottaisi vähentävän aktiivisen vaurioitumisen ja neurodegeneraation lisääntymistä, suuren sn-2-pitoisuuden GLA-öljyhoito ilmeisesti kohdistui sellaisten kalvon avainlipidikomponenttien säilymiseen ja/tai lisääntymiseen,
25 joita muutoin spesifisesti häviää MS-taudissa, mikä sopii yhteen sellaisen metabolisen vian korjautumiseen, jota ei muutoin tehokkaasti hoideta nykyisillä hoidoilla. Se seikka, että pienellä annoksella (5 grammaa/päivä) ei ollut vaikutusta tähän, tukee sellaista päättelyä.

γ -Linoleenihapon (18:3n-6 eli GLA) tiedetään muuttuvan nopeasti pitkäketjuisiksi monitydyttymättömiksi omega-6-rasvahapoiksi dihomio- γ -linoleenihapoksi ja arakidonihapoksi *in vivo* (Phylactos *et al.* 1994, Harbige *et al.*, 1995, 2000). Siitä syystä sen määrittämiseksi, kuinka lisätä kalvon pitkäketjuisten omega-6-rasvahappojen tasoa
30

MS-taudissa, keksijät ovat tarkastelleet tuloksiaan, joita on saatu useilla GLA-pitoisilla öljyillä: sekä sieniperäisillä (*Mucor javanicuksesta*) että kasviperäisillä (*Borago officianalis*, helokki *Oenothera* spp. tai mustaherukka *Ribes* spp.) samoin kuin synteettisellä tri-GLA-öljyllä GLA:n antojärjestelminä MS-taudin *in vivo* kokeellisessa eläinmallissa, joka tunnetaan kroonisena pahenevana kokeellisena autoimmuunienkefalomyeliittinä (CREAE, chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis).

EAE:n indusointi rotilla ei tuota demyelinaation histologisia piirteitä (Brosnan *et al.* 1988) vaan indusoi akuutin yksivaiheisen sairausmallin, joka on erilainen kuin MS-taudilla, jolle on tunnusomaista keskushermoston demyelinaatio ja joka on suurimmassa osassa tapauksia kliinisesti aaltoileva. Kroonisesti pahenevan ja demyelinoivan EAE:n malleille (CREAE) on kuitenkin tunnusomaista demyelinaatio ja pahenemisvaiheet. Koska on osoitettu, että oligodendrosyytin myeliiniglykoproteiini (MOG) on tärkeä neuroantigeenikohde MS-taudissa (Genain *et al.* 1999), ja perifeerisen veren autoreaktiivisilla lymfosyyteillä on osoitettu olevan paljon suuremmat vasteet tälle neuroantigeenille kuin MBP:lle MS-taudissa (Kerlero de Rosbo *et al.* 1993, 1997), MOG:n indusoimasta CREAE:stä on tullut haluttu eläinmalli, koska sen ominaisuudet muistuttavat läheisesti niitä, joita MS-taudissa havaitaan (Fazakerely *et al.* 1997, Genain *et al.* 1999, Amor *et al.* 1994).

Keksijöiden CREAE- ja rotan EAE-ravintotutkimuksista saatu todistusaineisto osoittaa, että rikastettu mustaherukansiemenöljy (72 %, w/w, 18:3n-6, GLA) ei antanut suojaa EAE:tä vastaan (katso taulukko 3). Tärkeällä tavalla mustaherukansiemenöljyssä on vähän sn-2-GLA:ta, suurin osa GLA:sta on sn-1- ja sn-3-asemassa (Lawson ja Hughes 1988). Lisäksi strukturoitu triasyyliglyseroli, joka sisältää kolme GLA-osaa (TG-GLA), tuotti suojaavia vaikutuksia, jotka olivat samanlaisia kuin CREAE:ssä käytetyllä purasruohoöljyllä (taulukko 2). Tämä sopisi yhteen myös sen kanssa, että sn-2-GLA on tärkeä, so. uloimmainen pari sn-1 ja sn-3-GLA poistuu entsymaattisesti *in vivo*, ja luultavasti ne läpikäyvät hapettumisen, mikä jättää jäljelle pelkän sn-2-GLA:n. Tämä valikoiva hydrolyysi johtuu spesifisten lipaasien tunnetusta kyvystä poistaa sn-1- ja sn-3-rasvahappoja triasyyliglyserolimolekyylleistä, mutta sn-2-aseman ilmeisestä suojasta *in vivo* (Lawson ja Hughes 1988, Kyle 1990).

Tämä tarkastelu sai keksijät ehdottamaan, että glyseridit, joissa on sn-2-aseman γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- tai arakidonihappotähteitä, ovat ylivoimaisia MS-metabolian korjaamisessa jopa verrattuna heidän aikaisemman tutkimuksensa
 5 runsaasti sn-2- γ -linoleenihappoa sisältävään purasruohoöljyyn. Tämä mahdollistaisi pienempien lipidiannosten ottamisen ja/tai mahdollisesti alentaisi hyödylliseen vaikutukseen johtavan hoidon kestoa.

EP 0520624:n (Efamol Holdings) taulukossa 3 verrataan helokkiöljyn ja purasruohoöljyn
 10 triglyseridisisältöä, joista öljyistä edellisen on selostettu olevan terapeuttisesti jälkimmäistä tehokkaampi monille eri GLA:ille reagoivilla sairauksilla. Tämä julkaisu osoittaa purasruohoöljyn sisältävän kaksikymmentäseitsemän erilaista triglyseridikomponenttia, joista vain 20 %:lla on sn-2-aseman GLA:ta. Sivulla 3 riveillä 40-42 huomautetaan, että biologinen tutkimus on osoittanut, että yhtä suuret määrät
 15 GLA:ta voivat tosiaan aikaansaada hyvin erilaisia vaikutuksia, kun GLA tarjotaan eri öljylähteinä. Ratkaisevalla tavalla se ohjaa lukijan sitten tiettyyn fraktioon helokkiöljyssä (EPO, Evening Primrose Oil) mutta ei purasruohoöljyssä, jonka fraktion ansiosta edellisellä on ylivoimainen vaikutus PGE1:n herättämisessä (katso EP 0520624, kaavio sivu 4 ja taulukko 2) ja näin ollen anti-inflammatorinen vaikutus: tämä fraktio on
 20 tunnistettu dilinoeoyylimonogammalinolenyylyglyseroliksi (DLMG), jota julkaisu selostaa olevan 18-19 % kokonastriglyseridistä EPO:ssa. Ratkaisevasti sivulla 6 selvästi selostetaan, että GLA:n asema, sn-1:ssä, sn-2:ssa tai sn-3:ssa, ei ole tärkeää tälle vaikutukselle.

25 Dines *et al.* (1994) Proceedings of the Physiological Society, Aberdeen Meeting, 14.-16. syyskuuta, 1994, selostaa tutkimuksista diabeettisen neuropatian hermovaurion hoidosta γ -linoleenihappoa sisältävillä öljyillä, jotka ovat EP 0520624:ssä puolustettua tyyppiä, ja jälleen huomautetaan, että purasruohoöljy ei ollut kovin tehokas tämän neurodegeneraation hoidossa kun taas helokkiöljy oli. Julkaisussa esitetään johtopäätös,
 30 että purasruohoöljy sisältää muita aineosia, jotka häiritsevät GLA:n aktiivisuutta.

Nyt esillä olevan keksinnön keksijät esittävät niiden tulostensa valossa, jotka on saatu runsaasti sn-2- γ -linoleenihappoa sisältävällä purasruohoöljyllä, osoittaen että se on

todellakin sn-2-asemassa olevan γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- tai arakidonihappotähteen läsnäolo glyseridissä, erityisesti triglyseridissä, mikä aikaansaa tehokkuuden EAE:n, CREAE:n ja ihmisen MS-taudin hoitamisessa.

- 5 Esillä olevan keksinnön ensimmäisessä näkökohdassa aikaansaadaan menetelmä neurodegeneratiivisen sairauden hoidon tarpeessa olevan potilaan hoitamiseksi, jossa menetelmässä tälle potilaalle annetaan terapeuttisesti tehokas annos määrätynrakenteista lipidiglyseridiä, joka käsittää glyseroliosan, joka on esteröitynyt yhden tai useamman rasvahappo-osan kanssa, jolle lipidiglyseridille on tunnusomaista se, että lipidissä on sn-2-
10 asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu tähteistä, jotka koostuvat γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappotähteistä.

- Erityisen hyödyllisesti hoidettavia neurodegeneratiivisia sairauksia ovat ne, joihin kuuluu myeliinikatoa. Esillä oleva menetelmä spesifisesti pysäyttää taustalla olevan
15 neurodegeneraation ja palauttaa hermoston toimintaa. Erityisesti menetelmä normalisoi hermosolun kalvon koostumusta ja palauttaa terveiden PBMC-solujen spontaanisti vapauttamat TGF- β 1/TNF α -suhteet ja TGF- β 1:n ja muiden PBMC:n vapauttamien sytokiinien väliset suhteet. Hyödyllisimmän menetelmä pysäyttää neurodegeneraation kaikenlaisissa multipeliskleroosissa, mutta erityisesti aaltomaisen, ensisijaisesti
20 etenevän ja kroonisen etenevän MS-taudin, ja palauttaa osittain tai täydellisesti hermoston toimintaa, joka on mitattu esimerkiksi magneettikuvauksella (MRI) tai CAT-tutkimuksella tai EDSS-arvolla. Sellaista menetelmää voidaan käyttää myös aivohalvauksen, pään vamman ja kallonsisäisen verenvuodon jälkeisen aivojen vaurioitumisen hoitoon, kun siihen liittyy demyelinaatiota tai hermoston vaurioitumista. Lisäkäyttösovellus saadaan
25 muun kroonisen demyelinaation, esimerkiksi Alzheimerin taudin ja Parkinsonin taudin, hoitamisessa.

- Edullisesti lipidiä annetaan sellaisen ajan ja sellaisena annoksena, joka riittää ylläpitämään tai kohottamaan TGF- β -tasot potilaassa terapeuttisiin tasoihin. Terapeuttisilla tasoilla
30 tarkoitetaan tasoja, jotka ovat vähintään sellaisia kuin terveillä henkilöillä. Edullisesti annos on sellainen joka aikaansaa sellaisen TGF- β 1/TNF α -suhteen, joka vapautuu spontaanisti potilaan verestä eristetyistä PBMC-soluista (perifeerisen veren mononukleaarisolusta) 18 kuukauden päivittäisen annostelun jälkeen, joka suhde on 0,4-

3,0, vähintään 0,5, edullisemmin vähintään 0,75 ja edullisimmin vähintään 1. Edullisesti annos on sellainen, joka aikaansaa potilaan veressä 18 kuukautta kestävästä päivittäisestä annostelun jälkeen TGF- β 1/IL-1 β -suhteen, joka on vähintään 0,5, edullisemmin vähintään 0,75 ja edullisimmin vähintään 1. Edullisesti mainitut tasot aikaansaadaan 12 kuukauden ja edullisemmin 6 kuukauden kuluttua.

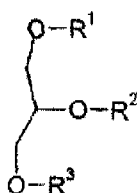
Tyypillisesti päivittäin annetun lipidin määrä on välillä 0,5-30 grammaa, oraalisesti annosteltuna, vielä edullisemmin välillä 1-20 grammaa ja edullisimmin välillä 1-18 grammaa, tyypillisesti 3-5 grammaa.

10

Kun sn-2-osa on γ -linoleenihappotähteen osa, annos voi olla näiden alueiden yläpäässä, erityisesti kun sn-1- ja sn-3-osat ovat verrattain inertejä, esimerkiksi ne ovat metabolisesti hyödynnettäviä happoja, kuten tyydyttyneitä rasvahappoja. Kun sn-2-osa on dihomogamma-linoleenihappotähteen osa, annos voi olla pienempi, kun taas silloin kun sn-2-osa on arakidonihappotähteen osa, teho on suurempi, mutta annostelun tulee olla varovaisempaa, koska korkeammilla tasoilla saattaa esiintyä mahdollisesti ei-toivottuja sivuvaikutuksia.

Edullisemmin menetelmälle on tunnusomaista se, että lipidi on monoglyseridi, diglyseridi tai triglyseridi, joka sisältää vähintään yhden sn-2-aseman γ -linoleenihappo-osan, dihomogamma-linoleenihappo-osan tai arakidonihappo-osan, jolla on jäljempänä esitetty yleiskaava I:

20



Kaava I

jossa kaavassa R¹ ja R³ on valittu toisistaan riippumatta vedystä ja asyyliiryhmistä, ja R² on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappotähteet.

25

Esillä olevan keksinnön tarkoituksiin asyyliiryhmät on määritelty sellaisina, jotka käsittävät vähintään yhden karbonyyliiryhmän sellaisen valinnaisesti substituoidun

hydrokarbyyliketjun päässä, joka on valittu alkyyl- ja alkenyyliketjuista, joka karbonyyliryhmä on liittynyt suoraan hiilellään glyserolitähteen happeen, kuten kaavassa I esitetään.

- 5 Edullisia asyyliiryhmiä R^1 ja R^3 ovat kaavan $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ tyydyttyneet rasvahappo-
osat, jossa kaavassa n on kokonaisluku 1:stä 22:een, edullisemmin 4-16, vielä
edullisemmin 5-12, edullisimmin 6-10. Erityisen edullisia asyyliiryhmiä ovat kapryyli- ja
kapriinihapot, erityisesti ne ovat 1,3-dikapryyli- tai 1,3-dikapriiniglyseroleja, joissa on γ -
linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- tai arakidonihappo-osa sn-2-asemassa.

10

Edullisia glyseridejä keksinnössä käytettäväksi ovat triglyseridit.

- US 4701469 kuvaa terveysvaikutteiseen elintarvikekäyttöön (nutraceutical use) eräitä
potentiaalisia triglyseridejä, joita esillä olevan keksinnön keksijät ovat määrittäneet
15 voitavan käyttää keksinnön menetelmässä, vaikkakin siinä kuvataan spesifisesti vain 1,3-
dioktanyylitriglyseridit, joissa sn-2-happo on EFA:n happo, ja vain 1,3-
dioktanoyylicosapentaglyseroli kuvataan valmistetun. Näiden sanotaan olevan
käyttökelpoisia *inter alia* immunomodulaatiossa, mutta vaikka useita sairauksia on
erikseen mainittu, käyttöä immunosuppressiossa neurodegeneraatioissa ja MS-taudissa ei
20 mainita.

- Vaikka edullisimmat ryhmät R^1 - R^3 kaavan I mukaiseen yhdisteen sisällytettäväksi ovat
yksinkertaisia tyydyttyneitä rasvahappoja tai luontaisesti esiintyviä rasvahappoja, joilla on
rakenteellinen tai metabolinen funktio, kuten esimerkiksi keskipitkäketjuisilla tai
25 pitkäketjuisilla rasvahapoilla, muitakin mahdollisuuksia on. Erityisen edullisia
rasvahappoja ovat ne, joita käytetään pääasiassa aineenvaihdunnallisesti energian
tuotantoon. Kun rasvahapot ovat rakenteellisia, eli käytetään kalvoissa, ne ovat sopivasti
sellaisia kuin esimerkiksi gamma-linoleenihappo-, linolihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja
arakidonihappotähteet. Tähteellä tarkoitetaan osaa, joka jää jäljelle sen jälkeen, kun
30 rasvahapon karboksyyli-ryhmä esteröityy yhteen glyserolimolekyylin hydroksiryhmistä.

Muita edullisia happoja sn-1:een ja sn-3:een valitaan rasvahapoista, jotka metaboloituvat
ihmisessä tuottamaan energiaa toisin kuin rasvahappo, joka kohdistuu pääasiassa

rakennekalvoryhmään: sellaisiin edullisiin happoihin kuuluvat öljyhappo ja palmitiinihappo.

Kun sn-1- ja sn-3-rasvahappoketju (R^1 ja R^3) on tyydyttymätön, se voi olla myös muista välttämättömistä rasvahapoista, kuten n-3-hapoista, esimerkiksi stearidonihaposta, eikosapentaanihaposta ja dokosahyeksaanihaposta (docosahyexanoic acid). Kun rasvahappo on valinnaisesti substituoitu, nämä ovat edullisesti hydroksi-, okso-, karboksyyli-, alkyyli-, alkenyyli- ja alkoksiryhmiä. Hydrokarbyyliketju on edullisesti 1-30 hiiliatomin pituinen, edullisemmin 4-28 hiiliatomin pituinen, vielä edullisemmin 4-24 hiiliatomin pituinen. Edullisimmin hydrokarbyyliketju on rasvahaposta, erityisesti yksittäis- tai monitydyttymättömästä rasvahaposta.

Monet keksinnön menetelmässä käytettävät edulliset lipidit ovat tunnettuja ja niitä voidaan valmistaa alalla tunnetulla kemiallisella menetelmällä. Esimerkiksi monia on kaupallisesti saatavana, esimerkiksi trigammalinoleenia, joka tunnetaan nimellä TLG, mutta jota tässä kutsutaan GGG:ksi, mikä heijastaa ryhmien $R^1R^2R^3$ identiteettiä, jolloin G tarkoittaa γ -linoleenihappotähdettä.

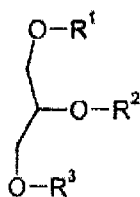
GGG:tä on kaupallisesti saatavana Nu-Check-Prep Inc.:ltä EP 0300844 kuvaa sen synteesin, jossa käytetään triasetiinin emäskatalysoitua vaihtocsterointiä metyyliigammalinolenaatilla, jolloin saadaan seos, joka sisältää 80 % GGG:tä, reagoimatonta metyyli- γ -linolenaattia ja 10 % mono- ja diglyseridejä.

Triarakidiini on tunnettu ja sitä on saatavana kaupallisesti pieniä määriä esimerkiksi Sigmaalta. AAA on syntetisoitu arakidonihaposta käyttämällä immobilisoitua lipaasia, joka on patentoitu angiogeneesiä voimistavaan vaikutukseen US 4888324:ssä.

Kuitenkin vaikka voidaan käyttää tri- ja di- γ -linoleenihapon, dihom- γ -linoleenihapon tai arakidonihapon di- tai triglyseridejä, esillä olevan keksinnön keksijät suosivat ensisijassa mono- γ -linoleenihapon, dihom- γ -linoleenihapon tai arakidonihapon sn-2-esteri-triglyseridien käyttöä, koska ne antavat vähemmän immunomodulatorisia ja proinflammatorisia rasvahappoja γ -linoleenihappoa, dihom- γ -linoleenihappoa tai arakidonihappoa, samalla kun ne säilyttävät voimistuneen aktiivisuuden, jonka sn-2-

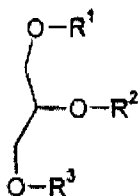
aseman γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- tai arakidonihappo-osa tarjoavat haluttua kalvon normalisointia ja sairautta muuttavaa vaikutusta koskien.

- Uudet lipidit, jotka ovat edullisia, ovat saatavissa prosesseilla ja menetelmillä, jotka on esitetty tässä kappaleessa. Esimerkit. Edullisimpia lipidejä ovat sellaiset, joissa on vain yksi γ -linoleenihappo, dihomogamma-linoleenihappo tai arakidonihappo-osa esteröityneenä glyseroliin sn-2-asemassa, niin että reunustavat sn-1- ja sn-3-hapot ovat tyydyttymättömiä keskipitkäketjuisia tai pitkäketjuisia happoja.
- 10 Näin ollen esillä olevan keksinnön lisänäkökohta aikaansaa uusia lipidejä, jotka tuodaan tässä esiin ja joihin kuuluvat kaavan II mukaiset yhdisteet



- 15 jossa kaavassa R^1 ja R^3 ovat samat ja ovat $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, jossa n on 4-14, edullisemmin 6-10 ja edullisimmin 7, 8 tai 9, ja R^2 on valittu γ -linolenyylistä, dihomogamma-linolenyylistä ja arakidonyylistä.

- Esillä olevan keksinnön lisänäkökohta aikaansaa menetelmän yleiskaavan III mukaisen yhdisteen syntetisoimiseksi
- 20



- jossa kaavassa R^1 ja R^3 ovat samat ja ovat $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, jossa n on 4-14, edullisemmin 6-10 ja edullisimmin 7, 8 tai 9, ja R^2 on γ -linolenyyliähdde, dihomogamma-linolenyyliähdde tai arakidonyyliähdde,
- 25

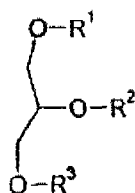
jossa menetelmässä

saatetaan reagoimaan 1,3-dihydroksiasetoni sellaisen yhdisteen kanssa, jolla on kaava $X-C(O)(CH_2)_nCH_3$, jossa X on valittu joukosta Cl, Br ja I,

jolloin saadaan vastaava 1,3-di-(C(O)(CH₂)_nCH₃)-2-ketoyhdiste,

- 5 pelkistetään ketoryhmä vastaavaksi 1,3-di-(C(O)(CH₂)_nCH₃)-2-oliksi
ja saatetaan se reagoimaan γ -linolenyylikloridin tai dihomom- γ -linolenyylikloridin tai arakidonyylikloridin kanssa.

- 10 Vielä esillä olevan keksinnön lisänäkökohta aikaansaa menetelmän yleiskaavan IV
mukaisen yhdisteen syntetisoimiseksi



- 15 jossa kaavassa $R^1 - R^3$ ovat samat ja ne on valittu joukosta γ -linolenyyliähdde, dihomom- γ -linolenyyliähdde tai arakidonyyliähdde,
jossa menetelmässä saatetaan reagoimaan vastaava γ -linolenyylikloridi, dihomom- γ -linolenyylikloridi tai arakidonyylikloridi glyserolin kanssa.

- 20 Eräiden näiden yhdisteiden synteesi on kuvattu jäljempänä ja kaaviot esitetään jäljempänä
kuvioissa.

- 25 Esimerkiksi voidaan suorittaa glyserolin yksivaiheinen esteröinti käyttämällä GLA:ta ja kytkeäainetta, kuten DCCI/DMAP- (1,1-disykloheksyylikarbodi-imidi/4-dimetyyliaminopyridiini) -kytkentäreagensseja. Tällä menetelmällä saadaan hyvä saanto, mutta siinä muodostuu epäpuhtauksia, jotka tekevät lopputuoteöljystä sameaa, ellei niitä poisteta. Tämä voidaan kiertää käyttämällä sellaista kytkeäainetta kuin esimerkiksi EDCI (1-(3-dimetyyliaminopropyli)-3-etyylikarbodi-imidihiydrokloridi), jolloin muodostuu vesiliukoisia sivutuotteita, jotka on helpompi poistaa. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 05310638 A2 22. marraskuuta, 1993, Heisei, 6pp kuvaa tri- α -linoleenin

(LnLnLn, jossa Ln on linolihappo) valmistuksen, jossa käytetään DCCI:tä, sekä analogisen mutta erilaisen reaktion.

- Vaihtoehtoinen lähestymistapa koskee kaksivaiheista menettelytapaa, jossa käytetään
- 5 GLA-Cl:n (valmistettu γ -linoleenihaposta ja oksalylikloridista) ja glyserolin reaktiota dikloorimetaani/pyridiinissä, niin että saadaan hyviä saantoja 250 g:n mittakaavaan asti kolonnikromatografialla puhdistettuna. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 04328199 A2 17. marraskuuta, 1992, Heisei, 5pp. (Japani) Concentration of α -linolenic acid triglyceride by flash chromatography. Ando, Yukiki, Watanebe, Yoichi, Takagi, Yoshiaki (Nisshin Oil
- 10 Mills Ltd, Japani) kuvaa tähän liittyvän mutta erilaisen tekniikan tri- α -linoleenin (LnLnLn) puhdistamiseen.

- Vertailuesimerkki trikapriini (glyserolitridekanaatti) on tunnettu yhdiste, jota on saatavana kaupallisesti Sigmaalta. Sitä on valmistettu metyyliidekanoaatin ja natriumglyseroksidin
- 15 reaktiolla ja raakatuotteen puhdistus on suoritettu sitten kolonnikromatografialla (katso E. S. Lutton ja A. J. Feh1, *Lipids*, **5**, 90-99 (1970)).

- Vaihtoehtoiseen menetelmään kuuluu glyserolin happokatalysoitu reaktio dekaanihapon kanssa, minkä jälkeen suoritetaan neljä kiteytystä (katso L. H. Jenson ja A. J. Mabis, *Acta Cryst.*, **21**, 770 (1966)).
- 20

- Hakija aikaansaa edelleen parannetun menetelmän, jossa glyseroli voidaan saattaa reagoimaan yli 3 dekanoyylikloridin ekvivalentin kanssa ja trikapriinituote on puhdistettu uudelleenkiteytyksellä.
- 25

- Esillä olevan keksinnön lisänäkökohdat koskevat sellaisten triglyseridiöljyjen käyttöä kuin edellä on kuvattu lääkkeen valmistamiseen neurodegeneratiivisten sairauksien hoitoon, kuten keksinnön menetelmään on esitetty. Erityisen edulliset lääkkeet on tarkoitettu neurodegeneraation pysäyttämiseen ja sen etenemisen kääntämiseen kaikentyyppisissä
- 30 multippelisklerooseissa, mutta erityisesti aaltoilevassa, ensisijaisesti etenevässä ja kroonisessa etenevässä MS-taudissa, ja palauttamaan osittain tai täydellisesti hermoston eheää toimintaa, joka mitataan esimerkiksi magneettikuvauksella (MRI) tai CAT-

tutkimuksella tai EDSS-arvolla. Muita TGF- β 1:een reagoivia sairauksia voidaan hoitaa siten kuin aikaisemmin on esitetty.

5 Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoisia lipidejä voidaan antaa millä tahansa farmasian alalla tunnetuilla perinteisillä väliaineilla. Sopivimmin niitä annetaan puhtaina öljyinä tai seoksina elintarvikkeiden kanssa, sellaisia öljyjä sisältävien kapselien muodossa tai enterisesti päällystettyinä muotoina. Alan ammattilaiset löytävät muita muotoja teoksesta Remington Pharmaceutical Sciences, 19. painos.

10 Alan ammattilaiset ymmärtävät, että muita hyödyllisiä aineita voidaan yhdistää esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoisten lipidien kanssa tai ne voivat muutoin muodostaa osan hoito-ohjelmaa lipidien kanssa. Nämä saattaisivat olla ionikanavan salpaajia, esimerkiksi natriumkanavan salpaajia, interferoneja (α , β tai γ), T-solun poistajia, steroideja tai muita palliatiivisia aineita. Edelleen on selvää, että silloin kun immuuni- ja

15 tulehdusvasteita säädetään, sellaiset yhdistelmät on tehtävä huolellisesti näiden järjestelmien mutkikkaan luonteen vuoksi. Esillä olevien öljyjen hitaan vasteen vuoksi nopeampivaikutteiset aineet saattaisivat olla hyödyllisiä hoidon ensimmäisinä kuukausina ennen kuin TGF- β 1-tasot ovat normalisoituneet, kunhan lisähoito ei estä tätä normalisointiprosessia.

20

Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoisten strukturoitujen lipidien synteesi kuvataan jäljempänä yhdessä vertailuesimerkkien synteessin kanssa. Jotkin näistä lipideistä ovat uusia, kun taas toiset ovat tunnettuja, mutta niitä ei ole käytetty keksinnön hoitoon.

25 Nyt esillä olevaa keksintöä kuvataan vain esimerkin avulla viittaamalla seuraaviin erä rajoittaviin taulukoihin, esimerkkeihin ja kuvioihin. Alan ammattilaiset osaavat näiden valossa kuvitella muita keksinnön piiriin kuuluvia suoritusmuotoja.

Taulukot

30

Taulukko 1: Esitetään eri triglyseridiöljyjen kokonaisrasvahapposisällön prosentuaalinen koostumus ja suojaava vaikutus EAE:ssä.

Taulukko 2: Esitetään kolmen käsittelyryhmän parametrit runsaasti sn-2-asemassa olevaa GLA:ta sisältävän purasruohoöljyn kokeessa, joka on kuvattu PCT/GB04/002089:ssä.

5 Taulukko 3: Esitetään GLA:n eri muotojen vaikutus EAE:n ilmaantuvuuteen ja kliniseen arvioon SJL-hiirillä: alhainen arvo viittaa parantuneeseen terapeuttiseen tehoon.

10 Taulukko 4: Esitetään rikastetun mustaherukkaöljyn, paljon GLA:ta mutta vähän sn-2-GLA:ta sisältävän kasviöljyn, joka vastaa sieni- ja purasruohoöljyä, epäonnistuminen EAE:ssä.

Kuviot

15 Kuvio 1: Esitetään spontaani perifeerisen veren mononukleaarisolun sytokiinituotanto plasebolla ja runsaasti sn-2-aseman γ -linoleenihappoa sisältävällä PCT/GB04/002089 koeöljyllä hoidetuilla MS-ihmispotilailla 18 kuukauden aikana.

20 Kuvio 2: Esitetään plasebon ja runsaasti sn-2-GLA:ta sisältävän purasruohoöljyn pienen annoksen (5 g/vrk) vaikutus MS-ihmispotilaan EDSS-arvoon verrattuna suureen annokseen (15 g/vrk), mikä esitetään histogrammina siten, että x-akselilla esitetään hoitokuukaudet.

25 Kuvio 3: Esitetään plasebon, runsaasti sn-2-GLA:ta sisältävän purasruohoöljyn pienen annoksen ja suuren annoksen vaikutus MS-ihmispotilaan keskimääräiseen pahenemismäärään (%) (Mean Relapse Rate) histogrammina siten, että x-akselilla esitetään kuukaudet.

Kuvio 4: Esitetään tämän keksinnön menetelmässä ja käytössä käyttökelpoisen yhden rasvahapon triasyyliglyseridin synteesin reaktiokaavio.

30 Kuvio 5: Esitetään kontrolliyhdisteen trikapiiriinin synteesin reaktiokaavio.

Kuvio 6: Esitetään CGC:n, keksinnön sekarasvahappotriasyyliglyseridin, synteesin reaktiokaavio.

Kuvio 7: Esitetään C-DHGLA-C:n, keksinnön sekarasvahappotriasyyliglyseridin, synteesin reaktiokaavio.

5 Kuvio 8: Esitetään kontrolliyhdisteen GCG:n, 1,3-dikapryyli-2- γ -linoleenihapon, synteesin reaktiokaavio.

Kuvio 9: Esitetään C-AA-C:n, keksinnön sekarasvahappotriasyyliglyseridin, synteesin reaktiokaavio.

10 Kuvioissa 10-19 esitetään EAE-tutkimusten tulokset SJL- ja C57BL-hiirillä, kuten jäljempänä esimerkeissä on esitetty (DHGLA = DHGLA: A = AA)

Esimerkit

15 **Runsaasti sn-2:ta sisältävällä purasruohoöljyllä (PCT/GB04/002089) suoritettu tutkimus**

Plasebolla kontrolloituun kaksoissokkokeeseen osallistui 28 aktiivista aaltoilevaa (kaksi pahenemisvaihetta edeltävien 18 kuukauden aikana) multippeliskleroosia sairastavaa potilasta (ikä vaihteli 18 ja 65 vuoden välillä) kapseloidun purasruohoöljyn vaikutusten 20 selvittämiseksi kliiniseen aktiivisuuteen ja laboratorioparametreihin 18 kuukauden aikana. Tämä öljy sisälsi runsaasti sn-2-asemassa olevaa γ -linoleenihappoa (GLA) (> 40 % sn-2-tähteistä oli γ -linoleenihappoa), ja siinä oli matala moneenipitoisuus (esimerkiksi erukahappoa) eikä siinä ollut lisättyä E-vitamiinia, joka on tunnettu immunomodulaattori.

25 Potilaat saatiin neurologian poliklinikoilta kahden lähikaupungin sairaalasta; sairaalan tietoinen suostumus saatiin ensimmäisellä (perusarvot) kerralla. Poissulkemisperusteisiin kuuluivat kaikki steroidi- tai immunosuppressiivisen lääkehoidon muodot, raskaus, hyperlipidemia, säännöllinen aspiriinin tai vastaavien lääkkeiden käyttö ja vitamiini- tai rasvahappolisät kolmen edellisen kuukauden aikana.

30

Kokeeseen otettiin mukaan vain potilaat, jotka täyttivät kaikki seuraavat perusteet: (a) kykenivät antamaan tietoisin suostumuksen ennen hoitoa ymmärtäen täydellisesti, että suostumuksen voi peruuttaa milloin tahansa haittaa tuottamatta; (b) mies- tai naispuolisia

poliklinikkapotilaita, joiden ikä vaihteli 18-60 vuoden välillä; (c) potilaille on varmistettu kliinisesti määritetyn pahenevan MS-taudin diagnoosi; (d) potilailla on ollut vähintään kolme dokumentoitua kliinistä pahenemisvaihetta viimeisten kahden vuoden aikana; (e) potilaiden EDSS-arvon (Expanded Disability Scoring Scale) perustaso on 0,0-5,5, edellyttäen että heidän pahenemisvaiheensa on hyvin dokumentoitu; ja (f) MS-tautiin liittyviä oireita lukuun ottamatta terve, mikä on varmistettu lääketieteellisen taustan, terveystarkastuksen ja kliinisten kemiallisten, virtsa- ja hematologisten testien avulla.

Potilaat jaettiin farmasian osaston toimesta satunnaisesti yhteen kolmesta ryhmästä, joista jokaiseen kuului 12 potilasta:

- yksi kliininen ryhmä (n=12), joka sai plaseboa (5 g polyetyleeniglykoli 400:aa)
- toinen kliininen ryhmä (n=12), joka sai pienen annoksen (5 g) puhdistettua *Borage officinalista*
- kolmas kliininen ryhmä (n=12), joka sai suuren annoksen (15 g) puhdistettua *Borage officinalista*

Täydennys annettiin yhden gramman painoisen öljykapselin muodossa päivittäin (5/vuorokausi pienen annoksen ja 15/vuorokausi suuren annoksen kohdalla) 18 kuukauden ajan. *Borage officinalis* -öljy ja monitydyttymättömät omega-6-rasvahapot ovat elintarvikkeiden ainesosia, joita pidetään yleisesti turvallisina ihmiskäyttöön (GRAS). EU-säädöksissä niille ei ole luokitus- tai merkintävaatimuksia. Kliininen arviointi sisälsi: EDSS-pisteytyksen ja kliinisen pahenemisen merkinnän. Laskimoverta (50 ml) otettiin laboratoriotutkimuksiin 1., 3., 6., 12., 15. ja 18. kuukautena täydennyksen antamisesta.

Seuraavat biokemialliset ja immunologiset parametrit tutkittiin jokaisella käyntikerralla ennen koetta saatujen tietojen ja ryhmien välisten tietojen vertailuun:

- Stimuloitunut ja ei-stimuloitunut *ex vivo* perifeerisen veren mononukleaarisolun sytokiiniin tuotanto: muutokset TGF- β 1:ssä, IFN- γ :ssa, TNF- α :ssa, IL-1 β :ssa, IL-6:ssa ja IFN- β :ssa, jotka on liitetty MS-taudin patogeneesiin. Sytokiinin ja siihen liittyvien geenien tuotanto.
- Liukoiset adheesiomolekyylit seerumissa, erityisesti ICAM-1 ja VCAM-1

- Perifeerisen veren mononukleaarisolun kalvon rasvahapot ja plasman fosfolipidin rasvahappokoostumus.

Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2 ja kuvioissa 1-5.

5

Ensisijainen tulosparametri oli kliinisten pahenemisvaiheiden lukumäärä perustason (0. kuukausi) ja hoidon loppumisen (18. kuukausi) välissä. Toissijaisiin tulosparametreihin kuuluivat: aika ensimmäiseen kliiniseen pahenemisvaiheeseen; pahenemisvaiheiden vaikeus, joka määritetään EDSS-arvolla, ja steroidihoidon käyttö; sekä muutokset EDSS-
 10 arvossa 3., 6., 9., 12. ja 18. kuukautena verrattuna perustasoon ja määritettynä sellaisena vähintään 1,0 pisteen nousuna EDSS:ssä, joka on kestänyt 3 kuukauden ajan, tai sellaisena vähintään 1,5 pisteen nousuna EDSS:ssä perustason EDSS:stä, joka on kestänyt 3 kuukauden ajan.

15 Plaseboryhmässä oli 11 potilasta, seitsemän potilasta oli saanut pienen annoksen purasruohoöljyä ja kymmenen potilasta oli saanut suuren annoksen purasruohoöljyä. Tutkittu lääke oli hyvin siedetty, eikä vakavia haitallisia tapahtumia esiintynyt 18 kuukauden koejakson aikana.

20 PBMC-solujen eristys ja viljely

Heparinisoitu kokoveri laimennettiin yhtä suuren tilavuuden kanssa Hanksin tasapainotettua suolaliuosta (Sigma, Iso-Britannia) ja tuloksena saatu laimennettu veri kaadettiin Lymphoprepille (Nycomed, Oslo, Norja). Sen jälkeen, kun oli suoritettu
 25 tiheysseparointi 800 g:llä 30 minuutin ajan, PBMC otettiin pois rajapinnalta ja laimennettiin Hanksin liuoksella. Sitten solut pestiin kahdesti sentrifugoimalla 10 minuutin ajan 250 g:llä. Sen jälkeen tuloksena saatu lopullinen pelletti suspensioitiin uudelleen elatusaineeseen, joka koostui RPMI-1640-elatusaineesta (Sigma, Iso-Britannia), johon oli lisätty 2 mM L-glutamiinia, 100 U penisilliiniä ja 100 µg streptomysiiniä
 30 (Sigma, Iso-Britannia) ja 10 % autologista plasmaa. Kudosviljelyputkiin (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Iso-Britannia) lisättiin 2×10^6 PBMC:tä millilitraa kohti, > 95 % eläviä, mikä määritettiin trypaanisoinen eksklusiolla, ja inkuboitiin 24 tunnin ajan 37 °C:ssa 5 %:lla CO₂:a. Antigeenin konsentraatio, solutiheys ja viljelyaika määritettiin kaikki

aikaisemmissa kineettisissä kokeissa maksimaalisen sytokiinituotannon määrittämiseksi (aineistoa ei esitetä). Valmistettiin myös rutiininomaiset cytospin-valmisteet myöhempiin erittelylaskentoihin. Inkuboinnin jälkeen solut poistettiin viljelmästä sentrifugoimalla 250 g:llä 10 minuutin ajan, minkä jälkeen tuloksena saadut supernatantit otettiin talteen,
 5 jaettiin tasaeriin ja säilytettiin -70 °C:ssa.

Plasmanäytteiden valmistus

10 ml heparinisoitua verta lingottiin 250 g:llä 10 minuutin ajan. Sitten tuloksena saatu
 10 plasmakerros otettiin talteen, jaettiin tasaeriin ja säilytettiin -70 °C:ssa.

Proinflammatoristen sytokiinien toteaminen

TNF- α , IL-1 β ja IFN- γ soluviljelmien supernatanteista ja plasmasta todettiin käyttämällä
 15 kaupallisesti saatavia vasta-ainepareja, jotka mahdollistivat sytokiinien toteamisen ELISA-formaatissa (R&D systems Ltd, Abingdon, Iso-Britannia). Herkkyydet TNF- α :n ja IFN- γ :n ELISA-määrittämiselle olivat 15,6-1000 pg/ml ja IL-1 β :lle 3,9-250 pg/ml.

Biologisesti aktiivisen TGF- β 1:n toteaminen

20 Biologisesti aktiivinen TGF- β 1 soluviljelmien supernatanteista ja plasmasta todettiin käyttämällä kaupallisesti saatavaa E_{max} ELISA -järjestelmää, jonka herkkyys oli 15,6-1000 pg/ml (Promega, Southampton, Iso-Britannia).

25 Tilastollinen analyysi

Sytokiinituotannon eroja verrattiin käyttämällä Studentin t-testiä ja Mann-Whitneyn U-testiä ja niitä pidettiin merkitsevinä, kun p-arvo oli alle 0,05.

30 Tulokset

Kahdelle potilaalle kehittyi ripuli, ja molempien varmistettiin myöhemmin ottaneen suuren annoksen purasruohoöljyä. Ripuli oli toisella potilaalla lievää, mutta kohtalaisen

vaikeaa toisella potilaalla, joka myöhemmin keskeytti tutkimuslääkkeen. Koodia ei oltu purettu ja ripuli oli loppunut lääkkeen keskeyttämisen jälkeen, mutta se oli ilmaantunut uudelleen uuden altistuksen jälkeen. Siitä syystä tämä potilas otettiin pois tutkimuksesta. Jäljelle jääneillä potilailla, joita käsiteltiin suuren annoksen purasruohoöljyllä, näkyi

5 erinomainen kliininen paraneminen kaikilla ensisijaisilla ja toissijaisilla tulosperusteilla. Esimerkiksi heidän keskimääräinen EDSS-piste 6 kuukautta kestäneen hoitojakson jälkeen oli parantunut perustason EDSS:stä (kuvio 1). Vielä tärkeämpää on se, että kliinisten pahenemiskertojen keskimääräinen lukumäärä oli merkitsevästi vähentynyt 6 kuukautta kestäneen hoidon jälkeen verrattuna plaseboryhmässä esiintyneeseen pahenemiskertojen

10 lukumäärään (kuvio 2). Sitä vastoin potilailla, jotka olivat saaneet pienen annoksen purasruohoöljyä, ei näkynyt mitään kliinistä paranemista plaseboryhmään verrattuna. MS-taudin aktiivisuuteen kohdistuneen hyödyllisen vaikutuksen lisäksi suuren annoksen purasruohoöljy tuotti jonkin verran oireisiin kohdistuvaa lievitystä lihasten spastisuudessa (jäykkyys) ja kivuliaissa sensorisissa oireissa sekä myös paransi kognitiivisia toimintoja.

15

Kuten jäljempänä esitetyistä kuvioista voidaan nähdä, pahenemisten esiintyvyys 9, 12 ja 18 kuukauden jälkeen on laskenut nollaan korkean annoksen ryhmässä. Nousu, joka havaitaan 15 kuukauden kohdalla, johtui potilaasta, joka putosi pois tästä ryhmästä.

20 Seuraavassa esitetään kolme lyhyttä sairauskertomusta kuvaamaan sn-2-GLA:ta runsaasti sisältävän purasruohoöljyn suuren annoksen terapeuttisia etuja. Kaksi ensimmäistä ovat kokeesta, kun taas kolmas on kuvaus sellaisesta potilaasta kokeen jälkeen, jolle saatiin magneettikuvaustulokset.

25 Potilas 1 (hoito):

Ensimmäinen potilas oli 48-vuotias nainen, jolla oli ollut kliinisesti aktiivinen aaltoileva MS-tauti 9 vuoden ajan. Hän oli alun perin työskennellyt kokopäivätoimisesti hallintovirkailijana paikallisessa terveysvirastossa, mutta hän ei kyennyt suoriutumaan

30 tehtävistään vaikean MS-tautinsa vuoksi. Siitä syystä hän työskenteli sittemmin osa-aikaisena sihteerinä, mutta hänellä oli yhä vaikeuksia liikuntakyvyssä lihasten jäykkyyden ja sensoristen häiriöiden vuoksi. Hän oli kokenut myös useita vaikeita kliinisiä pahenemisvaiheita, keskimäärin yhden pahenemisvaiheen joka yhdeksäs kuukausi.

Useimmat näistä pahenemisvaiheista olivat johtaneet sairaalahoitoon steroiditerapiaa varten. Hänet otettiin purasruohoöljytutkimukseen aktiivisen MS-tautinsa vuoksi. Tutkimukseen liittyviä haittavaikutuksia ei esiintynyt, ja sen jälkeen, kun hän oli ottanut lääkettä neljän kuukauden ajan, hän koki selvän paranemisen kävelyssään ja sensorisissa oireissaan.

Noin yhdeksän kuukauden hoidon jälkeen hän voi riittävän hyvin aloittaakseen kokopäiväisen työn. Lisäksi hänellä ei ollut pahenemisvaiheita 18 kuukautta kestäväen kliinisen kokeen aikana. Kokeen loppumisen aikana hoitokoodi paljasti hänen käyttäneen purasruohoöljyn suurta annosta.

Potilas 2 (kontrolli):

Toinen tapaus oli 46-vuotias nainen, jolla myös oli ollut kliinisesti aktiivinen aaltoileva MS-tauti 8 vuoden ajan. Hän oli alun perin työskennellyt kauppa-apulaisena, mutta joutui työttömäksi MS-taudin diagnosoinnin jälkeen.

Hänen oireisiinsa kuului liikuntakyvyn vaikeudet ja kivuliaita sensorisia oireita molemmissa jaloissa. Hänellä oli ollut kolme kliinistä pahenemisvaihetta kahtena kliinistä koetta edeltävänä vuotena, ja hänet oli otettu sairaalaan kahdesti steroidihoitoa varten. Niinpä hänet otettiin purasruohoöljykokeeseen, mutta hänen kävelemisensä heikentyminen jatkui. Kuusi kuukautta kokeeseen otosta hänen oli käytettävä kävelykeppiä ja hän sai hoitoa myös Baclofenilla alaraajan spastisuuden vähentämiseen. Noin kymmenen kuukauden kuluttua purasruohoöljykokeen aloittamisesta hänet otettiin sisään sairaalaan vaikean kliinisen pahenemisvaiheen vuoksi, jota hoidettiin steroideilla. Myöhemmin hänelle kehittyi rakon häiriöitä ja hän alkoi käyttää pyörätuolia pitkillä matkoilla. Hoitokoodi paljastettiin 18 kuukautta kestäväen kokeen loppumisen jälkeen, ja hänen havaittiin käyttäneen plaseboa. Sittemmin hän alkoi käyttää kävelytukea (walking frame) yli 50 jaardin pituisille matkoille.

Potilas 3: Hoito (lisänä kokeeseen)

Kolmas tapaus oli 26-vuotias mies, jolle diagnosoitiin varma MS-tauti huhtikuussa vuonna 2001. Hänen oireensa olivat alkaneet vuonna 1999, jolloin hän oli valittanut levinneestä
 5 vaikeasti hoidettavasta kivusta eri puolilla kehoa, erityisesti rintakehän ja vatsan vasemmalla puolella. Tätä seurasi käsien ja jalkojen ajoittainen puutumus, johon liittyi vaihtelevaa heikkoutta. Esiintyi myös kiusallisia rakko-oireita virtsaamisen tiheyden ja kiireellisyyden muodossa. MS-taudin diagnoosi vuonna 2001 perustui hänen aaltoileviin oireisiinsa ja se varmistui aivo-selkäydinnesteen positiivisella näytteellä ja aivojen
 10 magneettikuvauksella (MRI), jossa näkyi useita valkean aineen poikkeavuuksia molemmissa aivopuoliskoissa. Oireet eivät reagoineet erilaisiin farmaseuttisiin hoitoihin.

Huhtikuussa vuonna 2003 aloitettiin esillä olevan suuren purasruohoöljyannoksen otto täydennyksenä suun kautta. Potilas selosti oireidensa dramaattisesta paranemisesta kolmen
 15 kuukauden kuluessa tämän suun kautta otetun täydennyksen aloittamisesta. Hänen kivuliaat sensoriset oireensa hävisivät täysin. Hän ei raportoinut puutumuksesta tai heikkoudesta toukokuun 2003 jälkeen ja havaitsi merkittävän paranemisen rakon hallinnassaan. Suun kautta otettu täydennys ei aiheuttanut mitään epäsuotuisia tapahtumia. Aivojen uusinta-MRI otettiin herra N:n oireissa raportoidun parantumisen todentamiseksi.
 20 Uusinta-MRI osoitti valkean aineen poikkeavuuksien koon ja levinneisyyden pienentyneen.

Esimerkit: Strukturoidut sn-2-lipidit

25 Kaikissa jäljempänä esitetyissä esimerkeissä saadaan korkeampi puhtaus käyttämällä korkeamman puhtausasteen lähtöaineita γ -linoleenihappoa, dihomogamma-linoleenihappoa tai arakidonihappoa, joita on saatavana esimerkiksi Sigma Aldrichilta. GLA 95 tarkoittaa 95-%:isesti puhdasta γ -linoleenihappoa.

Synteesiesimerkki 1: Trigammalinoleenin synteesi

1) Happokloridimenetelmä

- 5 2,0 g (7,2 mmol, 3,1 ekv.) GLA95:tä (95-%:isesti puhdas γ -linoleenihappo) liuotettiin 10 ml:aan DCM:ää. Lisättiin tipoitain 1,01 g (0,71 ml, 8,0 mmol, 3,4 ekv.) oksalyylikloridia 5 ml:ssa DCM:ää 2-3 minuutin aikana typpi-ilmakehässä. Sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseos konsentroitiin *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä happokloridi lisättiin tipoitain 2-3
- 10 minuutin kuluessa sekoitettuun seokseen, jonka muodostivat 215 mg (2,3 mmol, 1 ekv.) glyserolia, 0,58 ml (3,1 ekv.) pyridiiniä ja 10 ml DCM:ää, typpi-ilmakehässä. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Sen jälkeen muodostunut pyridiinihydrokloridi suodatettiin eroon ja pestiin DCM:llä. Liuos pestiin 1 x 4 ml:lla vettä, 0,1 N HCl:ää, 5-%:ista natriumbikarbonaattia ja 5-%:ista NaCl:a. Kuivattiin magnesiumsulfaatilla,
- 15 suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo* keltaiseksi öljyksi. Tämä öljy puhdistettiin silikakolonilla käyttämällä 10-%:ista eetteriä heksaanissa eluutioliuottimena. Saatiin kirkasta väritöntä öljyä, jonka näytteelle suoritettiin vaihtoesteröinti ja analysoitiin sen jälkeen GC:llä. Tuote sisälsi 96,3 % GLA:ta.

20 2) DCCI-menetelmä

- 2,19 g GLA95:tä (3,15 ekv.), 230 mg (1 ekv.) glyserolia, 153 mg DMAP:tä (0,5 ekv.) sekoitettiin 10 ml:ssa DCM:ää typpi-ilmakehässä. Lisättiin 1,85 g DCCI:tä (3,6 ekv.) 5 ml:ssa DCM:ää. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön
- 25 yli. Muodostunut DCU suodatettiin ja pestiin DCM:llä. DCM pestiin 1 x 5 ml:lla N HCl:ää, vettä, 5-%:ista natriumbikarbonaattia ja vettä. Kuivattiin magnesiumsulfaatilla, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo* öljyksi. Tämä öljy puhdistettiin sitten silikakolonilla käyttämällä 10-%:ista eetteriä heksaanissa eluutioliuottimena. Saatiin 1,47 g (67 %) hieman sameaa öljyä. Tämän tuotteen näytteelle suoritettiin vaihtoesteröinti ja
- 30 sille suoritettiin GC-analyysi. Tuote sisälsi 95,8 % GLA:ta.

Suuri mittakaava

20 g (0,072 mol, 3,1 ekv.) GLA95:tä (gammalinoleenihappo, 95 %) liuotettiin 100 ml:aan DCM:ää. Lisättiin 13,7 g (9,3 ml, 0,11 mol, 4,78 ekv.) oksalyylikloridia 3-4 minuutin
 5 aikana typpi-ilmakehässä. Reaktioseosta sekoitettiin typpi-ilmakehässä yön yli. Sitten se konsentroitiin *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tätä öljyä lisättiin tipoittain noin 5 minuutin kuluessa sekoitettuun seokseen, jonka muodostivat 2,14 g (0,023 mol, 1 ekv.) glyserolia, 100 ml DCM:ää ja 5,8 ml (5,68 g, 0,072 mol, 3,1 ekv.) pyridiiniä typpi-ilmakehässä. Lisättiin 85 mg (0,7 mmol, 0,03 ekv.) DMAP- (4-
 10 dimetyyliaminopyridiini) -katalyyttiä. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Pyridiinihydrokloridi suodatettiin eroon ja pestiin DCM:llä. DCM-liuos pestiin 1 x 25 ml:lla: vettä, 10-%:ista natriumbikarbonaattia, 0,1 N HCl:ää, 5-%:ista NaCl:a. (Emulsiot muodostuivat tämän prosessin aikana, etenkin alussa). DCM kuivattiin magnesiumsulfaattilla, suodatettiin ja konsentroitiin *in vacuo* ruskeaksi öljyksi (~21 g).
 15 Öljy puhdistettiin silikakolonnilla käyttämällä ensin 5-%:ista eetteriä heksaanissa ja sen jälkeen 10-%:ista. Saatiin 15,6 g (77 %:n saanto) kirkasta öljyä. Tlc:llä todettuna tämä aine sisälsi pienen määrän vapaata GLA:ta. (Tämä aine puhdistettiin uudelleen myöhemmin)

20

Suuren mittakaavan suurennus

Edellä mainittu reaktio toistettiin 10-kertaisella suurennuksella. Siten käytettiin 200 g GLA95:tä, 1 l DCM:ää, 137 g oksalyylikloridia ja 21,4 g glyserolia. Happokloridia
 25 lisättäessä reaktioseosta jäähdytettiin kylmässä vesihauteessa ja lämpötila pidettiin 35 °C:n alapuolella. Muodostui 250 g ruskeaa öljyä. Tämä puhdistettiin alussa 500 gramman silikakolonnilla. Öljy liuotettiin 200 ml:aan heksaania ja syötettiin kolonniin. Kolonni eluoiitiin ensin heksaanilla, sitten 5-%:isella eetterillä heksaanissa ja sen jälkeen 10-%:isella. Fraktiot kerättiin talteen ja analysoitiin tlc:llä, mikä tuotti lopulta kaksi öljyerää.
 30 Ensimmäinen A (66 g) sisälsi pienen määrän rintamassa kulkenutta epäpuhtautta ja vähän GLA:ta (kulkee hitaammin kuin TGL), toisessa fraktiossa B (99 g) ei ollut rintamassa kulkenutta epäpuhtautta ja se sisälsi vähän GLA:ta.

Suuren mittakaavan reaktio toistettiin käyttämällä 169 g GLA:ta, ja saatiin kaksi fraktiota kuten edellä. Tällä kertaa oli 85 g:n 'A'-fraktio ja 54 g:n 'B'-fraktio. Molemmat 'A'-erät yhdistettiin ja puhdistettiin uudelleen 500 g:n silikakolonnilla. 'B'-fraktioita käsiteltiin samalla tavalla (tähän erään lisättiin myös 15 g ainetta pienen mittakaavan reaktiosta).

5

Jotkin edellisistä fraktioista puhdistettiin uudelleen, jolloin lopulta saatiin 259 grammaa öljyä. Öljyä pumpattiin kiertohaihduttimella suurtyhjössä vakiopainoon - 256 g. Tämä vastaa 65 %:n kokonaissaantoa.

10 Tuotteen analysointi

GC

Pienelle näytteelle suoritettiin vaihtoesteröinti ja GC-analyysi:

GLA-pitoisuus oli 97,1 %. Pääasiallinen epäpuhtaus oli linolihappo - 1,91 %.

- 15 Huomaa: Synteisiin käytetty alkuperäinen GLA95 sisälsi 96,2 % GLA:ta ja 2,42 % linolihappoa.

HPLC

- 20 HPLC-menetelmä tehtiin käyttämällä käänteisfaasikolonnilla (Hypersil C18 4,6 x 100 mm), eluoiitiin 80/20 asetonitriili/THF-seoksella. Toteaminen suoritettiin UV:lla 210 nm:ssä. Tämä osoitti tuotteen olevan kolmen komponentin seos. Pääpiikki (93,6 %) oli haluttu tuote. Hitaammin kulkeva epäpuhtaus (vastasi 5,0 % tuotteesta) oli todennäköisesti GGLI-triglyseridi (LI = linolihappo). Toinen epäpuhtaus kulki hieman nopeammin ja se edusti 1,4 % tuotteesta.

25

Huomaa: Absorptio 210 nm:ssä vaihtelee huomattavasti eri rasvahapposisällön sisältävien triglyseridien kesken. Esimerkiksi trigammalinoleenin UV-absorptio on 5-6 kertaa voimakkaampaa kuin trilinoleenillä.

30 Yhteenveto

254 g glyseroli-tri-6,9,12-linolenaatti (gammalinoleenihappotriglyseridi, trigammalinoleeni, GGG) valmistettiin 96,2 %:isesta GLA:sta kaksivaiheisella

happokloridireitillä. Se on kirkas, vaaleankeltainen öljy ja sitä säilytettiin typpi-ilmakehässä pakastimessa. GLA-pitoisuus oli 97,1 % eikä C20:1, C22:1 tai C24:1 happoja todettu. HPLC-puhtaus oli 93,6 %.

- 5 Puhtaamman GGG:n synteesi olisi helposti saavutettavissa käyttämällä GLA 98:aa (98-%:inen γ -linoleenihappo:Scotia) tai puhtaampaa lähtöainetta.

Vertailulipidi 1: Trikapriinin (glyserolitridekanoaatti) synteesi

10 Pieni mittakaava

- Glyserolia (3,0 g, 0,0325 mol, 1 ekv.), pyridiiniä (8,1 ml, 0,10 mol, 3,1 ekv.) ja dikloorimetaania (100 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Sitten lisättiin tipoitain dekanoyylikloridia (21 ml, 19,25 g, 0,10 mol, 3,1 ekv.) 5 minuutin
- 15 aikana käyttämällä ulkojäähdytintä vesihauteessa pitämään lämpötilan 30-35 °C:ssa. Kun lisäys oli suoritettu, lisättiin 4-dimetyyliaminopyridiiniä (DMAP) (0,12 g, 1 mmol, 0,03 ekv.) ja seosta sekoitettiin typpi-ilmakehässä huoneenlämpötilassa yön yli. Saostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin dikloorimetaanilla. Sitten yhdistetty pesu ja suodos pestiin 5-%:isen natriumkloridin, 5-%:isen
- 20 natriumbikarbonaatin, 0,1 N kloorivetyhapon ja 5-%:isen natriumkloridin vesiliuoksilla (20 ml). Sen jälkeen dikloorimetaanikerros kuivattiin MgSO_4 :lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännösöljy kiteytyi seisotettaessa. Tämä aine kiteytettiin uudelleen isopropanolista (40 ml), jolloin saatiin 15,6 g (86 %:n saanto) vahamaista valkoista kiinteää ainetta.

25 Analyysi

GC - 99,8 %:n puhtaus

HPLC

(C18 4,6 x 100 mm, ACN/THF 85/15, 1 ml/min, λ 210 nm) - 94,9 %:n puhtaus

30 Suuri mittakaava

Edellä mainittu toistettiin 15-kertaisella mittakaavalla. Glyserolia (45,0 g, 0,49 mol, 1 ekv.), pyridiiniä (121,5 ml, 1,50 mol, 3,1 ekv.) ja dikloorimetaania (1,5 l) sekoitettiin

- huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Sitten lisättiin tipoitain dekanoyylikloridia (315 ml, 288,8 g, 1,50 mol, 3,1 ekv.) 15 minuutin aikana käyttämällä ulkojäähdytintä vesihauteessa pitämään lämpötilan 30-35 °C:ssa. Kun lisäys oli suoritettu, lisättiin 4-dimetyyliaminopyridiiniä (DMAP) (1,8 g, 15 mmol, 0,03 ekv.) ja seosta sekoitettiin typpi-
- 5 ilmakehässä huoneenlämpötilassa yön yli. Saostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin dikloorimetaanilla. Sitten yhdistetty pesu ja suodos pestiin 5-%:isen natriumkloridin, 5-%:isen natriumbikarbonaatin, 0,1 N kloorivetyhapon ja 5-%:isen natriumkloridin vesiliuoksilla (300 ml). Sen jälkeen dikloorimetaanikerros kuivattiin $MgSO_4$:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Jäännösöljy kiteytyi seisotettaessa.
- 10 Tämä aine kiteytettiin uudelleen isopropanolista (400 ml), jolloin saatiin 228 g (86 %:n saanto) vahamaista valkoista kiinteää ainetta.

Analyysi

GC - 99,8 %:n puhtaus

- 15 HPLC

(C18 4,6 x 100 mm, ACN/THF 85/15, 1 ml/min, λ 210 nm) - 94,9 %:n puhtaus

- Valmistettiin lisäerä ja yhdistettiin se edellä mainitun pienen mittakaavan erän kanssa ja kiteytettiin uudelleen isopropanolista, jolloin saatiin 44 g tuotetta. Edellä mainitut erät
- 20 yhdistettiin (268 g) ja analysoitiin uudelleen:

GC

99,9 %:n puhtaus

HPLC

- 25 97,9 %:n puhtaus

Yhteenveto

- 263 g glyserolitridekanoaattia (trikapriini, CCC) oli valmistettu dekanoyylikloridista (98
- 30 %) yksivaiheisella prosessilla (kaavio esitetään jäljempänä). Se on valkoista, alhaalla sulavaa kiinteää ainetta ja sitä säilytettiin typpi-ilmakehässä pakastimessa. C-sisältö oli 99,9 % rasvahapposisällöstä ja HPLC-puhtaus oli 97,9 %.

Synteesiesimerkki 2: 1,3-dikapriini-2-gammalinolenoaatti (glyseroli 1,3-didekanaatti-2-oktadekatri(6-Z,9-Z,12-Z)enoaatti eli CGC)

- Tämä triglyseridi on uusi. Toisin kuin CGC, sen isomeeri CL_nC (L_n = α-linoleenihappo) on tunnistettu (katso K. Long *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, **20**, 369-372 (1998) ja H. Mu, P. Kalo *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**, 202-211 (2000) kookosöljyn komponenttina. Lisäksi CL_xC (L_x = linoleenihappo, jolla on epäspesifinen kaksoissidoksen asema) on kuvattu (katso J. Gresti *et al.*, *J. Dairy Sci.*, **76**, 1850-1869 (1993)).
- 10 **CGC:n** synteesissä käytetyt kaksi välituotetta ovat tunnettuja (katso L. El Kihel *et al.*, *Arzneim - Forsch./Drug Res.*, **46**, 1040-1044 (1996) ja US 4178299. Jäljempänä kuvattu viimeinen vaihe on uusi ja myös kaksi ensimmäistä vaihetta ovat keksinnöllisiä, koska ne soveltuvat paremmin suuren mittakaavan tuotantoon kuin aikaisemmin kuvatut.
- 15 **CGC** valmistettiin saattamalla 1,3-dikapriini reagoimaan GLA-kloridin kanssa dikloorimetaani-pyridiinissä. 1,3-dikapriini valmistettiin pelkistämällä natriumboorihydridillä 1,3-didekanoyylioksipropan-2-oni, joka oli puolestaan valmistettu saattamalla dekanoyylikloridi reagoimaan 1,3-dihydroksiasetonin kanssa. Välituotetta 1,3-dikapriini on käsiteltävä varoen, koska siinä voi tapahtua asyylimigraatio hapoille, emäksille ja lämmölle altistuessaan. Vanhempi menetelmä 1,3-dikapriinin valmistamiseksi on kuvattu (katso A. P. J. Mank *et al.*, *Chem. Physics Lipids* **16**, 107-114 (1976)).
- 20 Monipuolinen joustava 1,3-diglyseridien ja triglyseridien synteesi dekaanihapon katalysoidulla lisäyksellä glysidoliesteriin (epikloorihydriinistä) on vähemmän houkutteleva, mikä johtuu vaikeammista reaktio-olosuhteista ja asyylimigraatio-ongelmista. Lopputuote, **CGC**, puhdistettiin huolellisesti kolonnikromatografialla silikalla, jolloin sivutuotteet poistuivat.

Pieni mittakaava*1,3-didekanoyylioksipropaan-2-oni*

- 5 Dekanoyylikloridia (40,0 ml, 36,8 g, 0,19 mol, 1,98 ekv.) lisättiin tipoitain 10-15 minuutin aikana 1,3-dihydroksiasetonidimeerin (8,68 g, 0,048 mol, 1,0 ekv.), pyridiinin (15,6 ml, 0,19 mol), 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,18 g, 0,0014 mol, 0,03 ekv.) ja dikloorimetaanin (DCM, 150 ml) sekoitettuun suspensioon huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Reaktioseoksen lämpötila pidettiin 30 °C:n alapuolella jäähdyttämällä
- 10 kylmässä vesihauteessa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Muodostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 25 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo* kellertäväksi puolijähmeäksi aineeksi. Sitten tämä kiteytettiin metanolista (150 ml),
- 15 jolloin saatiin valkoista kiinteää ainetta. Saanto oli 28,2 g (73 %).

1,3-Dikapriini

- Edellinen ketoni (28,2 g, 0,071 mol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF, 200 ml). Sen
- 20 jälkeen lisättiin vettä (10 ml), liuos jäähdytettiin 5 °C:seen ja natriumboorihydridiä (5,38 g, 0,14 mol) lisättiin annoksittain alle 10 °C:n lämpötilassa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan ja konsentroitiin sitten *in vacuo* THF:n poistamiseksi. Jäännös jaettiin etyyliasetaatin ja 5-%:isen natriumkloridiliuoksen kesken. Vesifaasi uutettiin uudelleen etyyliasetaatilla ja yhdistetyt uutokset kuivattiin MgSO₄:lla ja
- 25 konsentroitiin *in vacuo* vahamaiseksi kiinteäksi aineeksi. Tämä kiteytettiin kahdesti heksaanista, jolloin saatiin 11,2 g (40 %) valkoista kiinteää ainetta. (puhtaus 99 % + HPLC:llä)

1,3-Dikapriini-2-gammalinolenoaatti (CGC)

30

Gammalinoleenihappoa (GLA95, 8,34 g, 0,03 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 60 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä ja oksalyylikloridia (3,9 ml, 5,67 g, 0,044 mol) lisättiin tipoitain 5 minuutin aikana. Seosta

sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroidiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoitain 15 minuutin kuluessa (jää/vesijäähdytys) 1,3-dikapriinin (11,2 g, 0,028 mol), DCM:n (50 ml) ja pyridiinin (2,42 ml, 2,37 g, 0,03 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,10 g, 0,0008 mol, 0,03 ekv.) sekoitettuun liuokseen 10-15 °C:n lämpötilassa. Lämpötila pidettiin siinä jää-vesijäähdytyksellä. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty pesu ja suodos pestiin 1 x 20 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Ruskea jäännösöljy puhdistettiin kolonnikromatografialla silikalla. Eluutio heksaanilla ja sitten 5-%:isella eetteri/heksaanilla tuotti 10,3 g (56 %) väritöntä öljyä. Rakenne varmistettiin ¹³C NMR:llä ja GLC:llä. Puhtaus määritettiin HPLC:llä.

15 Suuri mittakaava

1,3-didekanoyylioksiipropaan-2-oni

Dekanoyylikloridia (272 ml, 250 g, 1,3 mol, 2 ekv.) lisättiin tipoitain 10-15 minuutin aikana 1,3-dihydroksiasetonidimeerin (59,1 g, 0,65 mol, 1,0 ekv.), pyridiinin (106 ml, 103,7 g, 1,3 mol), 4-dimetyyliaminopyridiinin (2,38 g, 0,02 mol, 0,03 ekv.) ja dikloorimetaanin (DCM, 750 ml) sekoitettuun suspensioon huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Reaktioseoksen lämpötila pidettiin 30 °C:n alapuolella jäähdyttämällä kylmässä vesihauteessa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Muodostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroidiin *in vacuo* kellertäväksi puolijähmeäksi aineeksi. Sitten tämä kiteytettiin metanolista (500 ml), jolloin saatiin valkoista kiinteää ainetta. Saanto oli 158 g (60 %).

1,3-Dikapriini

Edellinen ketoni (158 g, 0,40 mol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF, 2,25 l). Sen jälkeen lisättiin vettä (50 ml), liuos jäähdytettiin 5 °C:seen ja natriumboorihydridiä (5,66 g, 1,5 ekv.) lisättiin annoksittain alle 10 °C:n lämpötilassa. Reaktioseosta seurattiin HPLC:llä (C18, eluointi ACN:llä virtausnopeudella 1 ml/minuutti, λ 210 nm) (huomaa: itse asiassa lisättiin vain noin 4,5 g boorihydridiä, koska kaikki SM oli reagoinut). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan ja konsentroitiin sitten *in vacuo* THF:n poistamiseksi. Jäännös jaettiin etyyliasetaatin ja 5-%:isen natriumkloridiliuoksen kesken. Vesifaasi uutettiin uudelleen etyyliasetaatilla ja yhdistetyt uutokset kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo* vahamaiseksi kiinteäksi aineeksi. Tämä kiteytettiin kahdesti heksaanista, jolloin saatiin 96 g (60 %) valkoista kiinteää ainetta. (98 %:n puhtaus HPLC:llä)

15 *1,3-Dikapriini-2-gammalinolenoaatti (CGC)*

Gammalinoleenihappoa (GLA95, 120,2 g, 0,43 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 750 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä ja oksalyylikloridia (55,7 ml, 82,3 g, 0,65 mol, 1,5 ekv.) lisättiin tipoittain 15-20 °C:n lämpötilassa 15 minuutin aikana. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroitiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoittain 30-40 minuutin kuluessa 10-15 °C:ssa (jää/vesijäähdytys) 1,3-dikapriinin (164,7 g, 0,41 mol), DCM:n (650 ml), pyridiinin (33,3 ml, 32,5 g, 0,41 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiinin (1,50 g, 0,012 mol, 0,03 ekv.) sekoitettuun liuokseen 10-15 °C:n lämpötilassa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty pesu ja suodos pestiin 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*, jolloin saatiin ruskeaa öljyä (275 g).

30

Edellä mainittujen kolmen reaktion mittakaava oli suurin, jolla kukin suoritettiin. Boorihydridipelkistys tuotti 1,3-dikapriinin lisäksi sivutuotetta vaihtelevina saantoina. Tämän sivutuotteen läsnäolo vaikutti suuresti eristetyn puhtaan 1,3-dikapriinin saantoon;

sivutuote voitiin poistaa vain raakatuotteen kahdella kiteyttämällä. Koska lopputuote, CGC puhdistetaan kolonnikromatografialla, on välttämätöntä, että loppuvaiheeseen käytetty 1,3-dikapriini on mahdollisimman puhdasta!

- 5 Edellä mainituista reaktioista saatiin noin 440 g puhdistamatonta CGC:tä ruskeana öljynä. Tämä puhdistettiin silikakolonniin sarjalla käyttämällä heksaania ja sen jälkeen 2-3-%:ista eetteri/heksaania. Puhdistamiseen tarvittiin 7-8 kolonnia, joissa käytettiin 3-4 kiloa silikaa, 25-30 litraa liuotinta (liuottimen uudelleen kierrättäminen piti tämän luvun alhaisena - käytännössä käytettiin yli 100 litraa).

10

Tuloksena saatu tuote, kirkas lähes väritön öljy (264 g) oli 96,4-%:isesti puhdasta HPLC:llä (C18 4,6 x 100 mm, eluointi 85/15 ACN/THF:llä virtausnopeudella 1 ml/minuutti, UV-detektointi 210 nm). GC osoitti suhteen 66,1/33,9 C/G. NMR-analyysi osoitti tuotteella olevan oikea CGC-rakenne ja sen puhtausasteen olevan vähintään 95 %:

15 δ_c (500 MHz, $CDCl_3$) 172,65 (2-GLA-karbonyyli), 173,25 (1,3-kapriinikarbonyyli). Signaalien suhde 2,04:1. Signaalin puuttuminen kohdassa 173,0 osoitti 1,3-GLA:n puuttuvan. Vähäinen signaali kohdassa 172,79 saattoi olla öljyhappoepäpuhtaus GLA:ssa tai 2-kapriinihappoa.

20 Yhteenveto

- 264 g glyseroli-1,3-didekanoaatti-2-gammalinolenoaattia (1,3-dikapriini-2-GLA, CGC) on valmistettu dekanoyylikloridista (98 %) kolmivaiheisella prosessilla (kaavio esitetään jäljempänä). Se on lähes väritöntä öljyä (hienoinen keltainen sävy) ja sitä säilytettiin
- 25 tyyppi-ilmakehässä pakastimessa. HPLC-puhtaus oli 96,4 %.

Synteesiesimerkki 3

1,3-Didekanoaatti-2-dihomo- γ -linolenoaatti (glyseroli-1,3-didekanoaatti-2-eikosa-(8Z,11Z,14Z)-trienoaatti eli C(DHLA)C

30

Tämä triglyseridi näyttää olevan uusi - mitään viittausta siihen ei ole löydetty.

DHLA (3,93 g, 12,8 mmol, 1 ekv.) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 20 ml) ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Oksalyylikloridia (1,69 ml, 2,46 g, 19,4 mmol, 1,5 ekv.) lisättiin tipoittain 1-2 minuutin aikana ja jätettiin sekoittaen huoneenlämpötilaan yön yli. Tuloksena saatu liuos konsentroitiin *in vacuo* DCM:n ja
 5 oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (DHLA-Cl) lisättiin tipoittain 5 minuutin kuluessa 25 °C:ssa 1,3-dikapriiniin (4,91 g, 12,2 mmol, 0,95 ekv.), pyridiiniin (0,98 ml, 0,96 g, 12,1 mmol, 0,95 ekv.) ja 4-dimetyyliaminopyridiiniin (DMAP, 8 mg, 0,07 mmol, 0,03 ekv.) sekoitettuun seokseen. Reaktiolämpötila nousi 32 °C:seen lisäyksen aikana. Reaktiota sekoitettiin 30-35 °C:ssa ja
 10 seurattiin HPLC:llä. Reaktio pysäytettiin 1,5 tunnin kuluttua. Saostunut pyridiinihydrokloridi suodatettiin eroon ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 10 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin raakatuotetta keltaisenoranssina öljynä (8,9 g, 86 %:n puhtaus HPLC:llä). Tälle öljylle
 15 ajettiin kromatografia silikageelillä (250 g). Eluutio heksaanilla ja dietyylieetteri-heksaanilla (2-6 %) tuotti puhtaan tuotteen vaaleankeltaisena öljynä. Käsittely heksaaniliuoksella väriä poistavan hiilen kanssa ja liuottimen poistaminen *in vacuo* tuotti C(DHLA)C:tä kirkkaana värittömänä öljynä (6,48 g, 98,9 %:n puhtaus HPLC:llä).

20 Synteesiesimerkki 4

Triarakidiini (glyserolitricikosotetra-5-Z,8-Z,11-Z,14Z-encoaatti) eli AAA

Arakidonihappoa (50,9 g, 0,17 mol, 3 ekv.) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 175 ml) ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Oksalyylikloridia (21,9 ml, 31,9 g,
 25 0,25 mol, 4,4 ekv.) lisättiin sekoitettuun liuokseen 5 minuutin aikana ja lämpötila nousi 4 °C. Tuloksena saatua kellertävänvihreää seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroitiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten öljyinen happokloridijäännös (A-Cl) lisättiin tipoittain 15 minuutin kuluessa esilämmitettyyn (25 °C) glyserolin (5,11 g, 0,055 mol, 1 ekv.), pyridiiniin (13,5 ml, 13,2 g,
 30 0,17 mmol, 3 ekv.) ja 4-dimetyyliaminopyridiiniin (DMAP, 0,20 g, 0,002 mol, 0,03 ekv.) sekoitettuun seokseen. Reaktioseoksen lämpötila nousi 42 °C:seen lisäyksen aikana ja havaittiin kevyttä refluksia. Seosta sekoitettiin 30-40 °C:ssa ja seurattiin HPLC:llä. Kahden tunnin kuluttua tuotteen muodostumista ei enää havaittu. Saostunut

- pyridiinihydrokloridi suodatettiin eroon ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 50 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin raakatuotetta kellertävänoranssina öljynä (57 g). Tämä öljy puhdistettiin
- 5 kolonnikromatografialla silikageelillä (noin 600 g). Eluutio heksaanilla ja dietyylieetteri(2-4 %)-heksaanilla tuotti 22,8 g tuotetta öljynä. Toinen erä (17,8 g) tuotettiin 39,8 g:sta arakidonihappoa. Kaksi erää yhdistettiin ja jäännösluottimet poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 40,5 g (43 %) liikkuvaa vaaleankeltaista öljyä. HPLC-puhtaus oli 84,8 %, GLC-analyysi 94,3 % AA:ta (arakidonihappoa).

10

Vertailulipidi 2

1,3-Di(oktadeka-6Z,9Z,12Z-enovylioksi)propan-2-oni

(1,3-Di(γ-linolenovylioksi)propan-2-oni, GonG) Vaiheen 1 välituote GCG:lle

- 15 Gammalinoleenihappoa (GLA95, 197 g, 0,71 mol, 2,2 ekv.) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 600 ml), joka oli 2 litran 3-kaulapullossa. Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Oksalyylikloridia (93 ml, 136 g, 1,07 mol, 3,3 ekv.) lisättiin tipoittain 15-20 °C:n lämpötilassa 15 minuutin aikana. Ruskeaa seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroitiin sitten *in vacuo* DCM:n ja
- 20 oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoittain 20 minuutin kuluessa 25 °C:ssa 1,3-dihydroksiasetonidimeerin (28,99 g, 0,32 mol, 1,0 ekv.), pyridiinin (52 ml, 50,9 g, 0,64 mol, 2,0 ekv.), 4-dimetyyliaminopyridiinin (2,36 g, 0,02 mol, 0,06 ekv.) ja dikloorimetaanin (DCM, 600 ml) sekoitettuun seokseen huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Reaktioseoksen
- 25 lämpötilan annettiin nousta 40 °C:seen ja seosta sekoitettiin vielä 2 tunnin ajan typpi-ilmakehässä (seurattiin HPLC:llä). Muodostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin noin 200 g keltaista öljyä. Tämä aines
- 30 puhdistettiin osittain kolonnikromatografialla silikalla (600 g). Eluutio heksaanilla ja sitten eetteri-heksaaniseoksilla (2-15 %) tuotti 42 g vaaleankeltaista öljyä. Tälle öljylle ajettiin jälleen kromatografia silikalla (600 g) ja eluutiin heksaanilla ja sen jälkeen 1-10-%:isella

eetteri-heksaanilla, jolloin saatiin tuote (95,9 %:n puhtaus) vaaleankeltaisena öljynä. Saanto oli 42 g (17 %).

1,3-Di(oktadeka-6Z,9Z,12Z-enoxylioksi)propan-2-oli

- 5 (1,3-Di(γ -linolenoxylioksi)propan-2-oli eli 1,3-digammalinoleeni, GoIG) Vaiheen 2 välituote GCG:lle

1,3-Di(γ -linolenoxylioksi)propan-2-onia (GonG, 25,5 g, 0,04 mol, 1 ekv.) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF, 375 ml) ja veteen (12,7 ml). Liuosta sekoitettiin voimakkaasti
 10 -20 °C:ssa, reaktiolämpötila pidettiin huolellisesti alle -15 °C:n lämpötilassa. Sitten sekoitettuun liuokseen lisättiin natriumboorihydridiä (790 mg, 0,02 mol, 1,25 ekv.) annoksittain 3 minuutin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin vielä 10 minuutin ajan -20 °C:ssa ja sen jälkeen lisättiin heksaania (380 ml). Sitten tämä vielä kylmä seos pestiin vedellä (2 x 200 ml), kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin
 15 otsikon yhdistettä ruskeana öljynä (27,8 g) (82,6 %:n puhtaus HPLC:llä, alle 1 % migratoitunutta ainetta). Valmistettiin toinen erä, joka yhdistettiin ensimmäisen kanssa, jolloin saatiin 50 g raakatuotetta. Tämä aines puhdistettiin kolonnikromatografialla silikageelillä (400 g). Eluutio heksaanilla ja dietyylieetteri-heksaaniseoksilla (5-20 %) tuotti 36,1 g tuotetta vaaleana öljynä (91,5 %:n puhtaus).

20

(Huomaa, varovaisuutta tulee noudattaa niin, että yhdiste ei jää silikalle yön yli ajaksi, koska siinä näyttää tapahtuvan migraatioreaktio, joka tuottaa GGolia.)

- 25 1,3-Di- γ -linoleeni-2-dekanoaatti (glyseroli-1,3-dioktadeka-(6Z,9Z,12Z)-trienoaatti-2-dekanoaatti eli GCG)

Dekanoyylikloridia (13,5 ml, 12,4 g, 0,065 mol, 1,1 ekv.) lisättiin 1,3-di- γ -linoleenin (36,1 g, 0,059 mol, 1,0 ekv.), kuivan pyridiinin (5,7 ml, 5,6 g, 0,07 mol, 1, 1 ekv.), 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,2 g, 0,002 mol, 0,03 ekv.) ja dikloorimetaanin (DCM, 150
 30 ml) sekoitettuun liuokseen noin 10 minuutin ajan. Lämpötila pidettiin 17-23 °C:n välillä lisäyksen aikana. Sitten reaktiota sekoitettiin 30-35 °C:ssa ja seurattiin HPLC:llä. Lisättiin vielä 1-2 ml dekanoyylikloridia 1 tunnin, 1,5 tunnin ja 2 tunnin kuluttua. Enempi lisäys näytti lisäävän muuntumista tuotteeksi, mikä määritettiin HPLC:llä. Kolmen tunnin

kuluttua reaktioseos suodatettiin ja suodos pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 50 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten DCM-uute kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo*, jolloin saatiin raakatuotetta vaaleankeltaisena öljynä; (puhtaus 90 % HPLC:llä). Öljy puhdistettiin

5 kolonnikromatografialla silikageelillä (600 g). Eluutio heksaanilla ja dietyylieetteri-heksaaniseoksilla (1,5-2,5 ja sitten 3,5 %) tuotti tuotteen (GCG) kirkkaana öljynä (35,5 g, 96,1 %:n puhtaus HPLC:llä). Saatiin vielä 7,5 g puhdasta lipidä ajamalla vielä kromatografia eräille fraktioille, jotka sisälsivät vain pienen määrän epäpuhtautta.

10 Synteesiesimerkki 5

1,3-Dikapriini-2-arakidonaatti (glyseroli-1,3-didekanaatti-2-eikosatetra-(5-Z,8-Z,11-Z,14-Z)enoaatti eli CAC)

Tämä triglyseridi on tunnettu. CAC on tunnistettu imunesteen lipidien aineosana sen

15 jälkeen, kun rotille on annettu safloriöljyä. WO 03 013,497 kuvaa arakidonihappoa sisältävän triglyseridin (tuotettu viljelemällä Mortierella alpinaa), joka on käyttökelpoinen sairauksiin, joita aiheuttaa aivojen vajaatoiminta, mutta erityisesti kognition parantamiseen. CAC:n synteesissä käytettävät kaksi välituotetta tunnetaan.

20 CAC:n synteesi 1,3-dikapriinista ja sen puhdistus ovat kaikki uusia.

Tässä CAC valmistettiin saattamalla 1,3-dikapriini reagoimaan arakidonyylikloridin kanssa dikloorimetaanipyridiinissä. 1,3-Dikapriini valmistettiin pelkistämällä natriumboorihydridillä 1,3-didekanoyylioksipropan-2-oni, joka oli puolestaan valmistettu

25 saattamalla dekanoyylikloridi reagoimaan 1,3-dihydroksiasetonin kanssa. Välituotetta 1,3-dikapriini on käsiteltävä varoen, koska siinä voi tapahtua asyylimigraatio hapoille, emäksille ja lämmölle altistuessaan. Vanhempaa menetelmää⁶ 1,3-dikapriinin valmistamiseksi, jossa menetelmässä dekaanihappo lisätään katalyyttisesti glysidoliesteriin (epikloorihydriinistä), pidettiin vähemmän houkuttelevana vaikeampien

30 reaktio-olosuhteiden ja asyylimigraation aiheuttamien ongelmien vuoksi. Lopputuote, CAC, puhdistettiin huolellisella kolonnikromatografialla silikalla, jolloin sivutuotteet poistuivat.

1,3-Dikapriini-2-arakidonaatti (CAC)

Arakidonihappoa (AA96, 8,34 g, 0,03 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 60 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä ja oksalyylikloridia (3,9 ml, 5,67 g, 0,044 mol) lisättiin tipoitain 5 minuutin aikana. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroidiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoitain 15 minuutin kuluessa (jää/vesijäähdytys) 1,3-dikapriinin (11,2 g, 0,028 mol), DCM:n (50 ml), pyridiinin (2,42 ml, 2,37 g, 0,03 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,10 g, 0,0008 mol, 0,03 ekv.) sekoitettuun liuokseen 10-15 °C:n lämpötilassa. Lämpötila pidettiin siinä jää-vesijäähdytyksellä. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty pesu ja suodos pestiin 1 x 20 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Ruskea jäännösöljy puhdistettiin kolonnikromatografialla silikalla. Eluutio heksaanilla ja sitten 5-%:isella eetteri/heksaanilla tuotti 10,3 g (56 %) väritöntä öljyä. Rakenne varmistettiin ¹³C NMR:llä ja GLC:llä. Puhtaus määritettiin HPLC:llä.

20 Suuri mittakaava

1,3-didekanoyyloksipropan-2-oni

Dekanoyylikloridia (272 ml, 250 g, 1,3 mol, 2 ekv.) lisättiin tipoitain 10-15 minuutin aikana 1,3-dihydroksiasetonidimeerin (59,1 g, 0,65 mol, 1,0 ekv.), pyridiinin (106 ml, 103,7 g, 1,3 mol), 4-dimetyyliaminopyridiinin (2,38 g, 0,02 mol, 0,03 ekv.) ja dikloorimetaanin (DCM, 750 ml) sekoitettuun suspensioon huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Reaktioseoksen lämpötila pidettiin 30 °C:n alapuolella jäähdyttämällä kylmässä vesihauteessa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Muodostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroidiin *in vacuo* kellertäväksi puolijähmeäksi aineeksi. Sitten tämä kiteytettiin metanolista (500 ml), jolloin saatiin valkoista kiinteää ainetta. Saanto oli 158 g (60 %).

1,3-Dikapriini

Edellinen ketoni (158 g, 0,40 mol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF, 2,25 l). Sen jälkeen lisättiin vettä (50 ml), liuos jäädytettiin 5 °C:seen ja natriumboorihydridiä (5,66 g, 1,5 ekv.) lisättiin annoksittain alle 10 °C:n lämpötilassa. Reaktioseosta seurattiin HPLC:llä (C18, eluointi ACN:llä virtausnopeudella 1 ml/minuutti, λ 210 nm) (huomaa: itse asiassa lisättiin vain noin 4,5 g boorihydridiä, koska kaikki SM oli reagoinut). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan ja konsentroitiin sitten *in vacuo* THF:n poistamiseksi. Jäännös jaettiin etyyliasetaatin ja 5-%:isen natriumkloridiliuoksen kesken. Vesifaasi uutettiin uudelleen etyyliasetaatilla ja yhdistetyt uutokset kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo* vahamaiseksi kiinteäksi aineeksi. Tämä kiteytettiin kahdesti heksaanista, jolloin saatiin 96 g (60 %) valkoista kiinteää ainetta. (98 %:n puhtaus HPLC:llä)

15 1,3-Dikapriini-2-arakidonaatti (CAC)

Arakidonihappoa (AA96, 78,8 g, 0,26 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 425 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä ja oksalyylikloridia (33,9 ml, 49,4 g, 0,39 mol, 1,5 ekv.) lisättiin tipoitain 15-20 °C:n lämpötilassa 15 minuutin aikana. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroitiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoitain 30-40 minuutin kuluessa 10-15 °C:ssa (jää/vesijäähdytys) 1,3-dikapriinin (94,2 g, 0,24 mol), DCM:n (450 ml), pyridiinin (19,1 ml, 18,6 g, 0,24 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiinin (1,72 g, 0,014 mol, 0,06 ekv.) sekoitettuun liuokseen 10-15 °C:n lämpötilassa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty pesu ja suodos pestiin 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*, jolloin saatiin ruskeaa öljyä (171 g).

30

Edellä mainittujen kolmen reaktion mittakaava oli suurin, jolla kukin suoritettiin. Boorihydridipelkistys tuotti 1,3-dikapriinin lisäksi sivutuotetta vaihtelevina saantoina. Tämän sivutuotteen läsnäolo vaikutti suuresti eristetyn puhtaan 1,3-dikapriinin saantoon;

sivutuote voitiin poistaa vain raakatuotteen kahdella kiteyttämällä. Koska lopputuote, CAC puhdistetaan kolonnikromatografialla, on välttämätöntä, että loppuvaiheeseen käytetty 1,3-dikapriini on mahdollisimman puhdasta!

- 5 Edellä mainituista reaktioista saatiin noin 412 g puhdistamatonta CAC:tä ruskeana öljynä. Tämä aines puhdistettiin silikakolonnien sarjalla käyttämällä heksaania ja sen jälkeen 1-3-%:ista eetteri/heksaania. Puhdistamiseen tarvittiin 7 tai 8 kolonnia, joissa käytettiin 3-4 kiloa silikaa ja 100 litraa liuotinta.
- 10 Tuloksena saatu tuote, kirkas hyvin vaaleankeltainen öljy (295 g) oli 95,8-%:isesti puhdasta HPLC:llä (C18 4,6 x 100 mm, eluointi 85/15 ACN/THF:llä virtausnopeudella 1 ml/minuutti, UV-detektointi λ 210 nm). GC osoitti suhteen 66,3/32,1 C/A (1,6 % epäpuhtaus tullut mukana A:n 5 %:n epäpuhtaudesta).

15 Yhteenveto

- 295 g glyseroli-1,3-didekanoaatti-2-arakidonaattia (1,3-dikapriini-2-AA, CAC) on valmistettu dekanoyylikloridista (98 %) ja arakidonihaposta (95 %) kolmivaiheisella prosessilla (kaavio esitetään jäljempänä). Se on hyvin vaaleankeltaista öljyä ja sitä säilytettiin typpi-ilmakehässä pakastimessa. HPLC-puhtaus on 95,8 %.
- 20

Synteesiesimerkki 7

1,3-Dioleiini-2-gammalinolenoaatti (glyseroli-1,3-dioktadeka-9Z-enoaatti-2-oktadekatri-(6-Z,9-Z,12Z)-enoaatti eli OGO)

25

Tämä triglyseridi on tunnettu: Hiili-14:llä leimattu versio on valmistettu normaalilla kemiallisella synteesillä ja normaali leimaamaton muoto biokemiallisella synteesillä käyttämällä lipaaseja. OGO ei ole purasruohoöljyn tärkeä ainesosa, mutta sen isomeeri OOG on (9 %). Kaksi CGC:n synteesissä käytettyä välituotetta tunnetaan. Viimeinen vaihe on uusi.

30

CGC:n käytön, syntetisoinnin 1,3-dioleoiinista ja CGC:n puhdistuksen uskotaan olevan uusia. Yleensä triglyseridit CXC ovat suosituimpia kuin OXO patentoinnin ja valmisteen kustannussyistä.

- 5 **OGO** valmistettiin tässä saattamalla 1,3-dioleoiini reagoimaan GLA-kloridin kanssa dikloorimetaani-pyridiinissä. 1,3-Dioleiini valmistettiin pelkistämällä natriumboorihydridillä 1,3-dioleoyylipropan-2-oni, joka oli puolestaan valmistettu saattamalla oleoyylikloridi reagoimaan 1,3-dihydroksiasetonin kanssa. Välituotetta 1,3-dioleoiini on käsiteltävä varoen, koska siinä voi tapahtua asyylimigraatio hapoille, emäksille ja lämmölle altistuessaan. Vanhempia menetelmiä^{7,8} 1,3-dioleoiinin valmistamiseksi monotriyyiliglyserolien tai glysidyyliesterien kautta pidettiin vähemmän hokuttelevana useampien vaiheiden ja asyylimigraation aiheuttamien ongelmien vuoksi. Lopputuote, **OGO**, puhdistettiin huolellisella kolonnikromatografialla silikalla, jolloin sivutuotteet poistuivat.

15

Pieni mittakaava

1,3-dioleoyylioksisipropaan-2-oni

- 20 155,1 g öljyhappoa (155,1 g, 0,55 mol, 1,0 ekv., Croda 094 RV05192) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 500 ml). Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä ja 104,4 g (1,5 ekv., 71 ml) oksalyylikloridia (104,4 g, 71,8 ml, 0,82 mol, 1,5 ekv.) lisättiin tipoittain 15-20 °C:n lämpötilassa noin 20 minuutin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Oksalyylikloridiylimäärä ja DCM poistettiin *in*
- 25 *vacuo* ja öljyinen happokloridijäännös lisättiin tipoittain 15-20 minuutin aikana 1,3-dihydroksiasetonidimeerin (22,5 g, 0,24 mol monomeeriä), pyridiinin (40,4 ml), 4-dimetyyliaminopyridiinin (1,83 g) ja dikloorimetaanin (DCM, 500 ml) sekoitettuun suspensioon huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä. Reaktioseoksen lämpötila pidettiin 20 °C:n alapuolella jäähdyttämällä jää/vesihauteessa. Reaktioseosta sekoitettiin
- 30 huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Muodostunut pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty suodos ja pesut pestiin sitten 1 x 150 ml:n annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo* oranssiksi/ruskeaksi puolijähmeäksi

aineeksi. Tämä trituroitiin metanolissa ja säilytettiin jääkaapissa yön yli. Saostunut kiinteä aine (90 %:n puhtaus HPLC:llä) kiteytettiin sitten di-isopropyylieetteristä (DIPE) ja metanolista, jolloin saatiin 51,3 g vaaleaa (off-white) kiinteää ainetta, jonka puhtaus oli 95 % HPLC:llä. Vielä kiteyttäminen DIPE/metanolista tuotti 41 g (27 %) 98-%:isesti
 5 puhdasta tuotetta.

1,3-Dioleiini

Edellinen ketoni (32,8 g, 0,053 mol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF, 250 ml). Sen
 10 jälkeen lisättiin vettä (10 ml), liuos jäähdytettiin 5 °C:seen ja natriumboorihydridiä lisättiin annoksittain alle 10 °C:n lämpötilassa. Reaktiota seurattiin HPLC:llä (C18, ACN/THF 90/10, 2 ml/minuutti, λ 210 nm) ja sitten, kun kaikki ketonilähtöaine oli reagoinut, boorihydridin lisäys lopetettiin (lisättiin 830 mg, 0,022 mol). Sitten seos konsentroitiin *in vacuo* THF:n poistamiseksi. Jäännös jaettiin etyyliasetaatin ja veden
 15 kesken. Vesifaasi uutettiin uudelleen etyyliasetaatilla ja yhdistetyt uutokset kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin *in vacuo* öljyksi (~33 g), joka jäähmettyi jäähdytettäessä. Tuote (68 %:n puhtaus HPLC:llä) kiteytettiin 100 ml:sta heksaania -20 °C:ssa (pakastimessa) yön yli. Tämä tuote (92 %:n puhtaus, 21,1 g) kiteytettiin uudelleen heksaanista (50 ml), jolloin saatiin 18,28 g (56 %:n saanto) tuotetta, jonka puhtaus oli 97,5 % HPLC:llä.

20

1,3-Dioleiini-2-gammalinolenoaatti (O-G-O)

γ -Linoleenihappoa (GLA95, 41,2 g, 0,15 mol, 1,1 ekv.) liuotettiin dikloorimetaaniin (DCM, 250 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-
 25 ilmakehässä ja oksalyylikloridia (19,1 ml, 28,2 g, 0,22 mol, 1,65 ekv.) lisättiin tipoitain 5 minuutin aikana. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja konsentroitiin sitten *in vacuo* DCM:n ja oksalyylikloridiylimäärän poistamiseksi. Sitten tämä öljyinen happokloridijäännös (GLA-Cl) lisättiin tipoitain 15 minuutin kuluessa (jää/vesijäähdytys) 1,3-dioleiinin (83,5 g, 0,13 mol), DCM:n (250 ml), pyridiinin (10,9 ml, 10,6 g, 0,14 mol)
 30 ja 4-dimetyyliaminopyridiiniin (0,49 g, 0,004 mol, 0,15 ekv.) sekoitettuun liuokseen 10-15 °C:n lämpötilassa. Lämpötila pidettiin siinä jää-vesijäähdytyksellä. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä yön yli. Pyridiinihydrokloridi poistettiin suodattamalla ja pestiin DCM:llä. Yhdistetty pesu ja suodos pestiin 1 x 80 ml:n

annoksilla 5 % NaCl:a, 5 % NaHCO₃:a, 0,1 N HCl:a, 5 % NaCl:a. Sitten liuos kuivattiin MgSO₄:lla ja liuotin poistettiin *in vacuo*. Ruskea öljyjäänös puhdistettiin kolonnikromatografialla silikalla. Eluutio heksaanilla ja sitten 5-%:isella eetteri/heksaanilla tuotti 63,6 g (54 %) väritöntä öljyä. Puhtaus määritettiin HPLC:llä.

5

Yhteenveto

64 g glyseroli-1,3-oleoaatti-2-gammalinolenaatti (1,3-dioleaatti-2-GLA, OGO) valmistettiin oleoyylikloridista (98 %) kolmivaiheisella prosessilla (kaavio esitetään
10 jäljempänä). Se oli lähes väritöntä öljyä (hienoinen keltainen sävy) ja sitä säilytettiin typpi-ilmakehässä pakastimessa. HPLC-puhtaus oli 89,4 %.

¹³C NMR-tiedot strukturoiduille lipideille

15 **GCG** δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,69 (1C, C-2 karbonyyli), 173,09 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

CGC δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,76 (1C, C-2 karbonyyli), 173,17 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

20

CAC δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,65 (1C, C-2 karbonyyli), 173,28 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

25

C(DHLA)C δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,83 (1C, C-2 karbonyyli), 173,30 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

GCG δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,91 (1C, C-2 karbonyyli), 173,11 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

30

OGO δ_c (125,7 MHz, CDCl₃) 172,69 (1C, C-2 karbonyyli), 173,25 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

AAA δ_c (125,7 MHz, $CDCl_3$) 172,66 (1C, C-2 karbonyyli), 173,04 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

CCC δ_c (125,7 MHz, $CDCl_3$) 172,81 (1C, C-2 karbonyyli), 173,21 (2C, C-1, C-3 karbonyylit)

Kokeellinen menettelytapa

Protoni-irtautus (proton-decoupled) ^{13}C NMR-spektrit, joissa NOE oli tukahdutettu, kerättiin 21 °C:ssa 5 mm:n laajaväisellä anturilla Joel 500 MHz -spektrometrillä, joka toimi 125,728 MHz:llä. Waltzin irtautus oli valittu irtautustapa ja se pantiin päälle vain 14,89 s kestäväenä hankinta-aikana. Purkautumisviipymä oli säädetty 30 sekunniksi ja pulssin kulma oli 90 °. Käytetty spektri-ikkuna oli noin 35 ppm (173,5:stä 172,6:een ppm:ää), ja siinä oli 170 pp:n siirtymä (offset). Spektreille suoritettiin sisäinen vertailu $CDCl_3$:een 77,0 ppm:ssä. Tyypillisesti kerättyjen pyyhkäisyjen keskimääräinen lukumäärä riittävään signaali-kohina-suhteeseen vaihteli 300-1200 pyyhkäisyä välillä riippuen näytteen konsentraatiosta ja puhtaudesta. Kokeiden kokonaissaantiaika oli 2-8 tunnin välissä, esimerkiksi 1271 pyyhkäisyä; tietopisteitä 65,536. Mahdollisuuksien mukaan käytettiin väkevöityjä liuoksia 20 %:iin asti (w/v) hankinta-ajan lyhentämiseksi. Mainitut kemialliset siirtymät vaihtelevat liuoksen konsentraation mukaan.

Biologiset tutkimukset

CREAE- (krooninen paheneva kokeellinen autoimmuuni enkefalomyeliitti) -tutkimukset

25 EAE:n indusointi ja kliininen arviointi

CREAE indusointiin C57B1/6- ja SJL-hiirissä. Eläimiin injektointiin ihon alle 100 μg neuroantigeenista peptidiä MOG 35-55 (aminohapposekvenssi MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK Genemed Synthesis, Inc.) tai 1 mg hiiren selkäydinhomogenaattia (SCH), fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS), emulgoitiin sonikoimalla 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa epätäydellisessä Freundin adjuvantissa (DIFCO, Detroit, Yhdysvallat), johon oli lisätty 480 μg *mycobacteria tuberculosis* ja 60 μg *Mycobacteria butyricum* (DIFCO, Detroit, Yhdysvallat) 0. ja 7.

päivänä, kuten aikaisemmin on kuvattu (Morris-Downes, MM., *et al.* 2002). Sairauden optimoimiseksi hiiret saivat myös 200 ng (intraperitoneaalisesti) *Bordetella pertussis* -toksiinia PBS:ään liuotettuna annettuna 1 tunti ja 24 tuntia sen jälkeen, kun oli suoritettu immunisointi MOG-neuroantigeenillä, ja SCH:n kohdalla 0., 1., 7. ja 8. päivänä.

5

Eläimet punnittiin 5. päivästä lähtien ja niistä tutkittiin päivittäin kliiniset neurologiset merkit kahden kokeneen tutkijan toimesta ja ne arvioitiin asteikolle aikaisemmin validoidun arviointikaavion mukaisesti (Morris-Downes, MM. *et al.* 2002 ja muut): 0 = normaali; 1 = velto häntä ja jalat; 2 = heikentynyt ojentautumisrefleksi; 3 = osittainen eturaajan halvaus; 4 = täydellinen eturaajan halvaus; 5 = kuoleva; 6 = kuollut. Eläimille, joiden kliiniset oireet olivat vähemmän vaikeaa astetta kuin tyypillisesti on havaittu, annettiin 0,5 pistettä vähemmän kuin indikoitu arvo.

10

Viittaus

15

Morris-Downes, MM., *et al.* (2002). Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J. Neuroimmunol.* 125, 114-124.

20 Ryhmän keskimääräistä EAE-pistettä verrattiin jokaisen ryhmän kohdalla kyseiseen kontrolliryhmään ei-parametrisellä tilastollisella analyysillä (Mann-Whitneyn U-testi).

Kaikki MOG-CREAE-tutkimukset käsittivät käsittelyn kontrolliryhmän (C-C-C tai suolaliuos, kuten edellä mainitussa tutkimuksessa on valittu). Jokaista strukturoitua lipidä 25 tutkittiin 3 annostasolla, kaikkia käsittelyjä annettiin oraalisesti 2 viikon ajan, kun inokulaatiosta oli kulunut 7 päivää. Kaikki käsittelyryhmät sisälsivät 10 eläintä. Tutkimusten päätyttyä (21. päivä) aivot ja selkäydin irrotettiin ja puolet näytteistä käsiteltiin siten, että niistä nähtiin merkit keskushermoston perivaskulaarisista mononukleaaristen leukosyyttien infiltraatiokohdista ja myeliinikadosta.

30

Tutkimukset olivat seuraavat:

Tutkimus 2: Selkäydinhomogenaatti- (SCH) -EAE SJL-hiirillä.

EAE:n indusointi: 1 mg SCH:ta 0. vuorokautena + 7. vuorokautena noin 200 ng Pertussis-toksiinia vuorokausina 0, 1, 7 ja 8 ip. 10 hiirtä/ryhmä. Hiiriä käsiteltiin 7. vuorokaudesta 21. vuorokauteen CCC:llä tai CGC:llä.

- 5 **Tutkimus 3: SCH EAE SJL-hiirillä:** Koe tapahtui päivinä (PSD) 7-21, molemmat päivät mukaan luettuna.

Tutkimus 4: MOG EAE C57BL-hiirillä: Koe tapahtui päivinä (PSD) 7-21, molemmat päivät mukaan luettuna.

10

Tutkimus 5: SCH EAE SJL-hiirillä: Koe tapahtui päivinä (PSD) 5-18, molemmat päivät mukaan luettuna.

- 15 **Tutkimus 6: MOG EAE C57BL-hiirillä:** Koe tapahtui päivinä 5.-21. päivinä, molemmat päivät mukaan luettuna, lukuun ottamatta C-DHLA-C-ryhmää, jolla käsittely tapahtui päivinä 5-15, molemmat päivät mukaan luettuna. Eläimet lajiteltiin 25. päivänä (PSD) {Viisi eläintä käsittelemättömien ryhmästä, 3 eläintä kontrolli-CCC-käsittelyryhmästä, 5 eläintä GGG-150 ul -käsittelyryhmästä ja kaksi eläintä GGG-350 ul -käsittelyryhmästä otettiin histologiseen analyysiin päivänä (PSD) 20}.

20

Tutkimus 7: SCH-EAE SJL-hiirillä

Koe tapahtui päivinä 6-20, molemmat päivät mukaan luettuna.

Tutkimus 2 - Selkäydinhomogenaatti (SCH) SJL-hiirillä:- tutkittiin

- 25 **CGC (50/150/350 ul); CCC (350 ul).**

GGG (50/350 ul)

[havaittiin vaikea sairaus]

Tutkimus 3 - SCH/SJL-hiiret:- tutkittiin

- 30 **CCC (50/150/350 ul)**

CGC (25/50/150/350 ul)

GGG (50/150/350 ul)

OGO (25/50/150/350 ul)

[havaittiin vaikea sairaus]

Tutkimus 4 - MOG/C57BL-hiiret:- tutkittiin

CCC (50/150/350 ul)

5 **CGC** (25/50/150/350 ul)

GGG (50/150/350 ul)

OGO (25/50/150/350 ul)

Tutkimus 6 - MOG/C57BL-hiiret:- tutkittiin

10 **CCC** (150 ul)

C-DHLA-C (50 ul)

CAC (50/350 ul)

AAA (50/150 ul)

GCG (50 ul)

15 **CGC** (50 ul)

GGG (150/350 ul)

[Patologinen: CCC; GGG]

20 Aivojen ja selkäytimen näytteiden histologisessa tarkastelussa näkyi vaurioita, jotka ovat tyypillisiä kokeelliselle allergiselle enkefalomyeliitille.

25 Paikallisille ja levinneille vaurioille oli tunnusomaista gliosisi, myeliinin vakuolien muodostuminen, aksonien rappeutuminen ja lymfosyyttien, makrofagien ja neutrofiilien tulo perivaskulaarisen tilaan.

30 Selkäydinvauriot sijaitsivat useimmiten pehmytkalvon alaisessa valkeassa aineessa ja aivovauriot esiintyivät useimmiten aivojen valkeassa aineessa. Vauriot olivat vakavampia selkäytimessä kuin aivoissa, ja siinä missä kaikilla eläimillä, joilla oli aivovaurioita, oli vaurioita selkäytimessä, niin kaikilla eläimillä, joilla oli selkäydinvaurioita, ei ollut vaurioita aivoissa.

Muutosten vaikeudessa esiintyvistä vaihtelusta yksittäisten hiirten välillä esitetään yhteenveto käyttämällä semikvantitatiivista viisiportaista pisteytysjärjestelmää.

- Käsitlemättömillä hiirillä histologiset pisteet olivat 3-4, ja ne korreloivat EAE-pisteiden 1,5-3 kanssa. Yhdellä hiirellä oli vain vähän patologista muutosta, ja piste oli nolla. GGG:llä käsitellyillä hiirillä suurimmalla osalla ei ollut poikkeavuuksia. Tämän ryhmän kahden hiiren histologiapistet olivat vastaavasti 2 ja 3, jotka korreloivat EAE-vaikeuden pisteiden 1 ja 1,5 kanssa.

Neljän tutkimuksen tulokset esitetään jäljempänä kuvioissa 11-20.

- 10 Ne osoittavat, että kaikki yhdisteet G-G-G, A-A-A, C-G-C, C-DHGLA-C ja C-A-C kykenevät vähentämään CREAE:n vaikeutta, kun taas yhdisteet G-C-G ja C-C-C eivät onnistuneet hoitamaan tilaa. Yhdisteen O-G-O uskotaan toimivan, mikäli annosta säädetään.
- 15 Kuten kuvauksessa on varoitettu, arakidonihappoyhdisteet ovat tehokkaita, mutta ne johtavat joidenkin eläinten kuolemaan. Eloon jääneillä eläimillä sairaus oli paljon lieventynyt. Uskotaan, että näiden yhdisteiden annosta voidaan alentaa niin, että niillä aikaansaadaan selviytyminen tyydyttävällä hoidolla.
- 20 Eräät tutkimukset osoittavat kellon muotoisen käyrän yhdisteille C-G-C ja G-G-G, mikä viittaa siihen, että hyvin suuret annokset eivät ole optimaalisia, kuten edellä on esitetty. Alan ammattilaiset voivat helposti määrittää sellaisen annostelun esimerkiksi nostamalla annosta ja seuraamalla TGF- β 1/TNF- α :n spontaanin vapautumissuhteen muutoksia PBMC-soluista.
- 25 PCT/GB04/002089:n runsaasti sn-2-aseman γ -linoleenihappoa koskevien tulosten ja vähäisen sn-2-aseman mustaherukkaöljyn ja G-C-G:n tehon puute CREAE:ssa sekä C-G-C:n ja C-DHGLA-C:n pienen annoksen tehon puutteen vuoksi kuviossa 20 voidaan havaita, että sn-2-aseman γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja
- 30 arakidonihappolipidit tarjoavat käyttöön sellaisen uuden hoidon MS-tautiin, joka ylittää kaikkien perinteisten hoitojen tulokset siinä, että vauriot korjautuvat ja vaikeat oireet helpottuvat. EDSS:n alentamista vuosien kuluessa ei ole muilla hoidoilla toistaiseksi saavutettu.

Viitteet

- Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the
5 induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J. Immunol.* 1994 Nov. 15; 153(10): 4349-56.
- Beck J, Rondot P, Catinot L *et al.* Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger
10 off exacerbations? *Acta Neurol. Scand.* 1988; 78: 318-23.
- Bertolotto A, Capobianco M, Malucchi S *et al.* Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA level correlates with magnetic resonance imaging disease activity in multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 1999; 263: 21-4.
15
- Bertolotto A, Malucchi S, Capobianco M *et al.* Quantitative PCR reveals increased levels of tumor necrosis factor-alpha mRNA in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients during relapses. *J. Interferon Cytokine Res.* 1999; 19: 575-81.
- 20 Brosnan CF., Selmaj K. ja Raine CS. Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1988; 18, 87-94.
- Brosnan CF. ja Raine CS. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain*
25 *Pathol.* 1996; 6, 243-257.
- Burns J., Bartholomew B, Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 33-9.
30
- Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 1995; 37: 424-35.

- Chou YK, Bourdette DN, Offner H. *et al.* Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1992; **38**: 105-14.
- 5 De Stefano N., Narayanan S., Francis GS., Arnaoutelis R., Tartaglia MC., Antel JP., Matthews PM ja Arnold DL. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch. Neurol.* 2001; **58**(1), 65-70.
- Ewing C, Bernard CC. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis.
- 10 *Immunol. Cell Biol.* 1998; **76**: 47-54.
- Fazakerly JK. Molecular biology of multiple sclerosis. Wiley and Sons Ltd. 1997, 255-273.
- 15 Fredrikson S., Soderstrom M, Hillert J. *et al.* Multiple sclerosis: occurrence of myelin basic protein peptide-reactive T cells in healthy family members. *Acta Neurol. Scand* 1994; **89**: 184-9.
- Genain CP., Cannella B., Hauser SL. ja Raine CS. Identification of autoantibodies
- 20 associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med.* 1999; **5**, 170-175.
- Gross CE, Bednar MM, Howard DB ja Sporn MB (1993) Transforming growth factor beta I reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* **24**, 558-562.
- 25 Harbige LS, Crawford MA, Jones J, Preece AW ja Forti A. Dietary intervention studies on the phosphoglyceride fatty acids and electrophoretic mobility of erythrocytes in multiple sclerosis. *Prog. Lipid Res* 1986; **25**, 243-248.
- 30 Harbige LS. Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. (1996) *Nutr Health*, **10**(4): 285-312.

- Harbige LS (1998) Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 57, 555-562.
- 5 Harbige LS, Yeatman N, Amor S & Crawford MA (1995) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel source of γ -linolenic acid. *British Journal of Nutrition* 74, 701-715.
- 10 Harbige LS., Layward L., Morris-Downes MM., Dumonde DC ja Amor S. The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PGE2) production. *Clin Exp Immunol* 2000; 122, 445-452.
- 15 Henrich Noack P, Prehn JH ja Kriegstein J. (1996) TGF-beta I protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischaemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke* 27, 1609-1614.
- Hirsch RL, Panitch HS, Johnson KP. Lymphocytes from multiple sclerosis patients produce elevated levels of gamma interferon in vitro. *J. Clin Immunol.* 1985; 5: 386-9.
- 20 Hollifield RD., Harbige LS, PhM-Dinh D, Sharief M. Evidence for cytokine Dysregulation in Multiple Sclerosis: Peripheral Blood Mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity* 2003 36(3): 133-141.
- 25 Imamura K., Suzumura A, Hayashi F. *et al.* Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* 1993; 87: 281-5.
- 30 Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI *et al.* Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J. Neuroimmunol.* 1996; 69: 103-15.

- Johns LD, Sriram S. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. *J. Neuroimmunol.* 1993; **47**: 1-7.
- 5 Kerlero de Rosbo N, Hoffman M, Mendel I *et al.* Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur. J. Immunol.* 1997; **27**:3059-69.
- 10 Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB *et al.* Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Clin. Invest.* 1993; **92**: 2602-8.
- Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999; **1**: 1255-63.
- 15 Krupinski J, Kumar P, Kumar S ja Kaluza J. (1996) Increased expression of TGF-beta I in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*, **27**: 852-857.
- Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J. Neuroimmunol.* 1991; **34**: 159-64.
- 20 Lu CZ, Jensen MA, Arnason BG. Interferon gamma- and interleukin-4-secreting cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1993; **46**: 123-8.
- Maimone D, Reder AT, Gregory S. T cell lymphokine-induced secretion of cytokines by 25 monocytes from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol.* 1993; **146**: 96-106.
- Martino G, Hartung H-P. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr. Opin. Neurol.* 1999; **12**: 309-21.
- 30 McCarron RM, Wang L, Racke MK *et al.* Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 1993; **43**: 23-30.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS.

- Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International
5 Panel on the diagnosis of multiple sclerosis: Ann. Neurol. 2001 Jul; 50(1): 121-7.

Merrill JE, Strom, SR, Ellison GW *et al.* In vitro study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. J. Clin. Immunol. 1989; 9: 84-96.

- 10 Merrill JE, Zimmerman RP. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. Glia 1991; 4: 327-31.

- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C *et al.* Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural
15 characterization. J. Biol. Chem. 1988; 263: 6407-15.

- Mokhtarian F, Shi Y, Shirazian D *et al.* Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. J. Immunol. 1994; 152: 6003-10.

20

Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. J. Neurosci. Res. 1996; 45: 322-33.

- Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis.
25 *Nature* 1999; 399(6738 Suppl.) A40-47.

Ota K, Matsui M, Milford EL *et al.* T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990; 346: 183-7.

- 30 Perkin GD, Wolinsky JS. Fast facts-Multiple Sclerosis, 1. painos, Oxford, Iso-Britannia: Health Press 2000.

- Philippe J., Debruyne J., Leroux-Roels G *et al.* In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 1996; **98**: 286-90.
- 5 Phylactos AC, Ghebremeskel K, Costeloe K, Leaf AA, Harbige LS, Crawford MA. (1994) Polyunsaturated fatty acids and antioxidants in early development. Possible prevention of oxygen-induced disorders. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48 Suppl. 2:S17-23.
- 10 Prehn JH, Peruche B, Unsicker K ja Kriegstein J. (1993) Isoform-specific effects of transforming growth factor-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J. Neurochem.* 60, 1665-1672.
- 15 Rack MK, Sriram S, Calrimi J, Cannella B, Raine CS & McFarim DE (1993) Long-term treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-p2. *Journal of Neuroimmunology*, **46**, 175-183.
- 20 Racke MK, Cannella B, Albert P *et al.* Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int. Immunol.* 1992; **4**: 615-20.
- Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B *et al.* Cytokine mRNA levels in mononuclear cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; **44**: 1523-6.
- 25 Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B *et al.* Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 82-8.
- 30 Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM *et al.* An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 1990; **172**: 1193-200.
- Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, Ruddle NH, Palladino MA, Gold LI Thorbecke GJ (1993) Studies on the mechanisms by which

- Transforming Growth Factor- β protects against allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology* **151**, 1116-1127.
- 5 Schiefer HB, Hancock DS, Loew FM. Long-term effects of partially hydrogenated herring oil on the rat myocardium. *Drug Nutr. Interact.* 1982; **1**(2): 89-102.
- Schluesener HJ, Lider O. Transforming growth factors β 1 and β 2: cytokines with identical immunosuppressive effects and a potential role in the regulation of autoimmune T cell function. *J. Neuroimmunol.* 1989; **24**: 249-58.
- 10 Selmaj K, Raine CS, Cannella B *et al.* Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J. Clin. Invest.* 1991; **87**: 949-54.
- Selmaj K, Raine CS, Farooq M *et al.* Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. 15 Apoptosis induced by lymphotoxin. *J. Immunol.* 1991; **147**: 1522-9.
- Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1992; **38**: 27-33.
- 20 Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM *et al.* Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* 2001; **31**: 907-17.
- 25 Vartanian T, Li Y, Zhao M *et al.* Interferon- γ -induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol. Med.* 1995; **1**: 732-43.
- Vivien D, Bemaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET ja Nouvelot A. (1998) Evidence of type I and type II transforming growth factor- β receptors in central nervous 30 tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **70**, 2296-2304.
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B. *et al.* Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral

- blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 1994; **179**: 973-84.
- Japanilainen patentti 6172263 (1994) Y. Kosugi *et al.*, Agency of Industrial Science & Technology High-purity arachnidonic acid triglyceride and its production.
- US-patentti 4,888,324 (1989) N. Catsimopoulos *et al.*, Angio-Medical Corporation Method for enhancing angiogenesis with lipid containing molecules.
- 10 Y. Kosugi ja N. Azuma. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **71**, 1397-1403 (1994). Synthesis of Triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized ipase.
- J.W. Hageman *et al*, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **49**, 118-xxx (1972).
Preparation of glycerin and their uses.
- 15 E. S. Lutton ja A. J. Fehl, *Lipids*, **5**, 90-99 (1970).
The polymorphism of odd and even saturated single acid triglycerides, C8-C22.
- D. Horrobin, A. McMordie, M. S. Manku (Scotia Holdings PLC Iso-Britannia)
- 20 Eurooppapatenttihakemus EP 609078 3. elokuuta, 1994. Phospholipids containing two different unsaturated fatty acids for use in therapy, nutrition and cosmetics.
- Y.-S. Huang, X. Lin, P. R. Redden ja D. F. Horrobin, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **72**, 625-631 (1995). In vitro Hydrolysis of Natural and Synthetic γ -Linolenic Acid-Containing
- 25 Triacylglycerols by Pancreatic lipase.
- K. Osada, K. Takahashi, M. Hatano ja M. Hosokawa, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 119-125 (1991). Chem. Abstr., 115: 278299. Molecular Species of Enzymatically-synthesized Polyunsaturated Fatty acid-rich Triglycerides.
- 30 J.-W. Liu, S. DeMichele, M. Bergana, E. Bobik, Jr., C. Hastilow, Lu-Te Chuang, P. Mukerji ja J.-S. Huang. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **78**, 489-493 (2001). Characterization of Oil Exhibiting High γ -Linolenic Acid from a Genetically transformed Canola Strain.

- D. R. Kodali, D. Atkinson, T. G. Redgrave ja D. Small, *J. Lipid Res.*, **28**, 403-413 (1987).
Structure and polymorphism of 18-Carbon Fatty Acid Triacylglycerols: Effect of
Unsaturation and Substitution in the 2-Position.
- 5 P. H. Bentley ja W. McCrae., *J. Org. Chem.* **35**, 2082-2083 (1970) An Efficient Synthesis
of Symmetrical 1,3-Diglycerides.
- M. Berger, K. Laumen ja M. P. Schneider, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **69**, 955-959 (1992).
- 10 Enzymatic Esterification of Glycerol 1. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regioisomerically
Pure 1,3-sn-Diacylglycerols.
- A. P. J. Mank, J. P. Ward ja D. A. van Dorp, *Chem. Physics Lipids*, **16**, 107-114 (1976). A
versatile, flexible synthesis of 1,3-diglycerides and triglycerides.
- 15 L. Hartman, *Chem. Rev.*, **58**, 845-867 (1958) ja siinä olevat viitteet. Advances in the
Synthesis of Glycerides of Fatty Acids.

Taulukko 1

Eri öljyjen ominainen koostumus (% kokonaisrasvahapoista) ja niiden suojaavat vaikutukset EAE:ssä

Käsitteily	18:2n-6	18:3n-6	18:2n-6/18:3n-6	18:1n-9	EAE:n ilmaantuvuus
FGO	17	20	0,6	35	0/10
BOO	37	24	1,5	15	3/10
EPO	71	9,4	7,5	9	7/10
SAF	66	-	-	17	9/10
Kontrollit	-	-	-	-	9/10

5 FGO, sieniperäinen öljy; BOO, purasruohoöljy; EPO, helokkiöljy; SAF, safloriöljy.

Taulukko 2. Hoitoryhmät -PCT/GB04/002089:n purasruohtoöljy - MS-tutkimus

		Naisia	Miehiä	Keskimääräinen pahenemisvaiheiden määrä (kahtena viime vuotena)	Keskimääräinen perus-EDSS	Lukumäärä
Ryhmä	Plasebo	7	4	2,6	3,9	11
	Pieni annos	5	2	2,9	3,5	7
	Suuri annos	8	2	3,4	2,8	10
Yhteensä		20	8	2,9	3,4	28

Taulukko 3. Triasyglyseroli-GLA:n (TG-GLA), etyyliesteri-GLA:n (EE-GLA) ja PCT/GB04/002089 *Borago officinalis* -öljy-GLA:n (BOR-GLA) molekyyliyhdyppien vertailu MOG:llä indusoidussa CREAE:ssa SJL-hiirissä

Hoitto	Määrä, jolla EAE	Keskimääräinen kliininen aste
Kontrolli	10/11	3,3 ± 1,3
EE-GLA ^a	5/6	3,0 ± 0,8
TG-GLA ^a	3/6	1,0 ± 1,3 ^c
BOR-GLA ^b	3/6	1,0 ± 1,2 ^c

^aEläimet, joille annettiin 100 µl testilipidia; ^bannettiin 250 µl BOR-GLA:ta. Eron merkitsevyyttä verrattiin kontrolleihin, ^cp < 0,05

Taulukko 4. Rikastetun mustaherukansiemenöljyn (73 % GLA:ta) vaikutus EAE:n ilmaantuvuuteen

	EAE:n ilmaantuvuus-% (vuorokautta immunisaation jälkeen)		
	13	17	21
Kontrollit (n = 10)	60	90	10
Mustaherukka (n = 10)	10	80	70

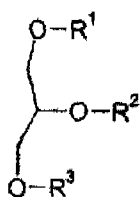
10 Huomaa: Mustaherukkaöljy viivästyttää ilmaantuvuutta mutta ei aikaansaa täyttä suojaa. Eläimiä ruokittiin 7 vuorokautta herkistämisen (immunisaation) jälkeen.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä neurodegeneratiiviseen sairauteen hoitoa tarvitsevan potilaan hoitamiseksi, jossa menetelmässä tälle potilaalle annetaan terapeuttisesti tehokas annos määrätynrakenteista lipidiglyseridiä, joka käsittää glyseroliosan esteröityneenä yhden tai useamman rasvahappo-osan kanssa, **tunnettu** siitä, että lipidissä on sn-2-asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo, dihomo- γ -linoleenihappo ja arakidonihappo.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että neurodegeneratiiviseen sairauteen kuuluu demyelinaatiota.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hoito spesifisesti pysäyttää taustalla olevan neurodegeneraation ja palauttaa hermoston toimintaa.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmä normalisoi hermosolun kalvon koostumusta lipidisisällön γ -linoleenihapon, dihomo- γ -linoleenihapon ja arakidonihapon osalta.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmä palauttaa terveet TGF- β 1/TNF α -suhteet mitattuna perifeerisen veren mononukleaarisolujen vapauttamasta spontaanista vapautumisesta.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sairaus on multippeliskleroosi.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sairaus on aaltomainen multippeliskleroosi, ensisijaisesti etenevä multippeliskleroosi tai krooninen etenevä multippeliskleroosi.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sairaus on multippeliskleroosi ja hoito palauttaa osittain tai kokonaan hermoston toimintaa

tai hermoston eheyttä mitattuna yhdellä tai useammalla MRI-tutkimuksella, CAT-tutkimuksella tai EDSS-arvona.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hoito kohdistuu halvauksen, pään vamman ja kallonsisäisen verenvuodon jälkeiseen aivojen vaurioitumiseen, Alzheimerin tautiin tai Parkinsonin tautiin, jossa esiintyy demyelinaatiota tai hermosolujen vaurioita.
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lipidiä annetaan sellaisen ajan ja sellaisena annoksena, joka riittää ylläpitämään tai kohottamaan TGF- β 1-tasoja potilaassa terapeuttisiin tasoihin.
11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lipidiä annetaan sellaisen ajan ja sellaisena annoksena, joka riittää ylläpitämään tai kohottamaan TGF- β 1-tasoja potilaassa sellaiseen TGF- β 1/TNF α -suhteeseen, joka vapautuu spontaanisti perifeerisen veren mononukleaarisoluihin, jotka on eristetty potilaan verestä 18 kuukauden päivittäisen annostelun jälkeen, joka suhde on 0,4-3,0, vähintään 0,5, edullisemmin vähintään 0,75 ja edullisimmin vähintään 1.
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että annos on sellainen joka aikaansaa potilaan verestä eristetyissä PBMC-soluissa 18 kuukauden päivittäisen annostelun jälkeen TGF- β 1/TNF α -suhteen, joka on vähintään 0,75.
13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että annettavan lipidin määrä on 0,5-30 gramman välillä, tyypillisesti 3-5 grammaa, päivässä.
14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lipidi on monoglyseridi, diglyseridi tai triglyseridi, joka sisältää vähintään yhden sn-2-asetassa olevan γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappo-osan, jolla lipidillä on yleiskaava I

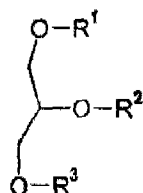


Kaava I

- jossa kaavassa R^1 ja R^3 on valittu toisistaan riippumatta vedystä ja asyyli ryhmistä,
- ja R^2 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappotähteet, joissa niiden karbonyylin hiili on kiinnittynyt glyseroliosan happeen.
15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 ja R^3 ovat tyydyttyneitä rasvahappo-osia, joilla on kaava $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, jossa n on kokonaisluku alueella 1-22.
 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 ja R^3 ovat samat ja n on kokonaisluku 5-12.
 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että n on kokonaisluku 6-10.
 18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 ja R^3 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat välttämättömät rasvahapot tai fysiologisesti hyväksyttävät rasvahapot, joita ihmisen keho voi metaboloida.
 19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 , R^2 ja R^3 ovat kaikki samoja ja ne on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappotähteet.
 20. Farmaseuttinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää määrätynrakenteisen lipidiglyseridin, joka käsittää glyseroliosan esteröityneenä yhden tai useamman

rasvahappo-osan kanssa, jossa lipidissä on sn-2-asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo ja dihomogamma-linoleenihappo.

21. Farmaseuttinen koostumus neurodegeneraation hoitoon, **tunnettu** siitä, että se käsittää määrätynrakenteisen lipidiglyseridin, joka käsittää glyseroliosan esteröityneenä yhden tai useamman rasvahappo-osan kanssa, jossa lipidissä on sn-2-asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo, dihomogamma-linoleenihappo ja arakidonihappo.
22. Farmaseuttinen koostumus demyelinaatiosairauden hoitoon, joka koostumus käsittää glyseroliosan esteröityneenä yhden tai useamman rasvahappo-osan kanssa, **tunnettu** siitä, että tässä lipidissä on sn-2-asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo, dihomogamma-linoleenihappo ja arakidonihappo.
23. Lipidi, jolla on kaava II

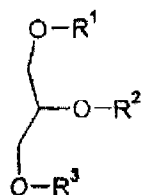


jossa kaavassa R^1 ja R^3 ovat samat ja ne ovat $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, jossa n on valittu alueelta 4-14, edullisemmin 6-10 ja edullisimmin 7, 8 tai 9, ja R^2 on valittu γ -linolenyyli-, dihomogamma-linolenyyli- ja arakidonyylitähteistä.

24. Sellaisen määrätynrakenteisen lipidiglyseridin käyttö, joka käsittää glyseroliosan esteröityneenä yhden tai useamman rasvahappo-osan kanssa, **tunnettu** siitä, että lipidissä on sn-2-asemassa rasvahappo-osa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat γ -linoleenihappo, dihomogamma-linoleenihappo ja arakidonihappo, lääkkeen valmistamiseen neurodegeneratiivisen sairauden hoitoon.

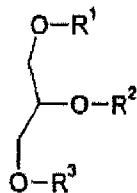
25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että neurodegeneraatio­sairaus on demyelinaatio­sairaus.
26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että sairaus on multippeliskleroosi.
27. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke normalisoi hermosolun kalvon koostumusta lipidin γ -linoleenihappo-, dihomogamma-linoleenihappo- ja arakidonihappotasojen osalta.
28. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke palauttaa terveille tasoille TGF- β 1/TNF α -suhteet, joita spontaanisti vapautuu potilaan perifeerisen veren mononukleaarisolusta.
29. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että hoito kohdistuu multippeliskleroosiin tai pään vamman, halvauksen ja kallonsisäisen verenvuodon jälkeiseen degeneraatioon tai Alzheimerin taudin tai Parkinsonin taudin aiheuttamaan hermosoluvaurioon.
30. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke korjaa keskushermoston vaurioita.
31. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke lievittää lihasten spastisuutta ja/tai kipua.
32. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke poistaa taudin uusiutumisia.
33. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke parantaa EDSS-arvoa vähintään 1 yksiköllä 1 vuoden hoitojakson aikana.
34. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että lääke riittää palauttamaan potilaan EDSS-arvon EDSS:llä, joka on 2,5 yläpuolella, alle 2:een 1 vuoden hoitojakson aikana.

35. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että rakon hallinnassa aikaansaadaan paranemista.
36. Menetelmä yleiskaavan III mukaisen yhdisteen syntetisoimiseksi



jossa kaavassa R^1 ja R^3 ovat samat ja ovat $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, jossa n on valittu alueelta 4-14, edullisemmin 6-10 ja edullisimmin 7,8 tai 9, ja R^2 on γ -linolenyyliähdde, dihomogamma-linolenyyliähdde tai arakidonyyliähdde, jossa menetelmässä
 saatetaan reagoimaan 1,3-dihydroksiasetoni sellaisen yhdisteen kanssa, jolla on kaava $\text{X}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, jossa X on Cl, Br tai I,
 jolloin saadaan vastaava 1,3-di- $(\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3)$ -2-ketoyhdiste,
 pelkistetään ketoryhmä vastaavaksi 1,3-di- $(\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3)$ -2-oliksi
 ja saatetaan se reagoimaan γ -linolenyylihalidin tai dihomogamma-linolenyylihalidin tai arakidonyylihalidin kanssa, joka halidi on kloridi, bromidi tai jodidi.

37. Menetelmä yleiskaavan IV mukaisen yhdisteen syntetisoimiseksi

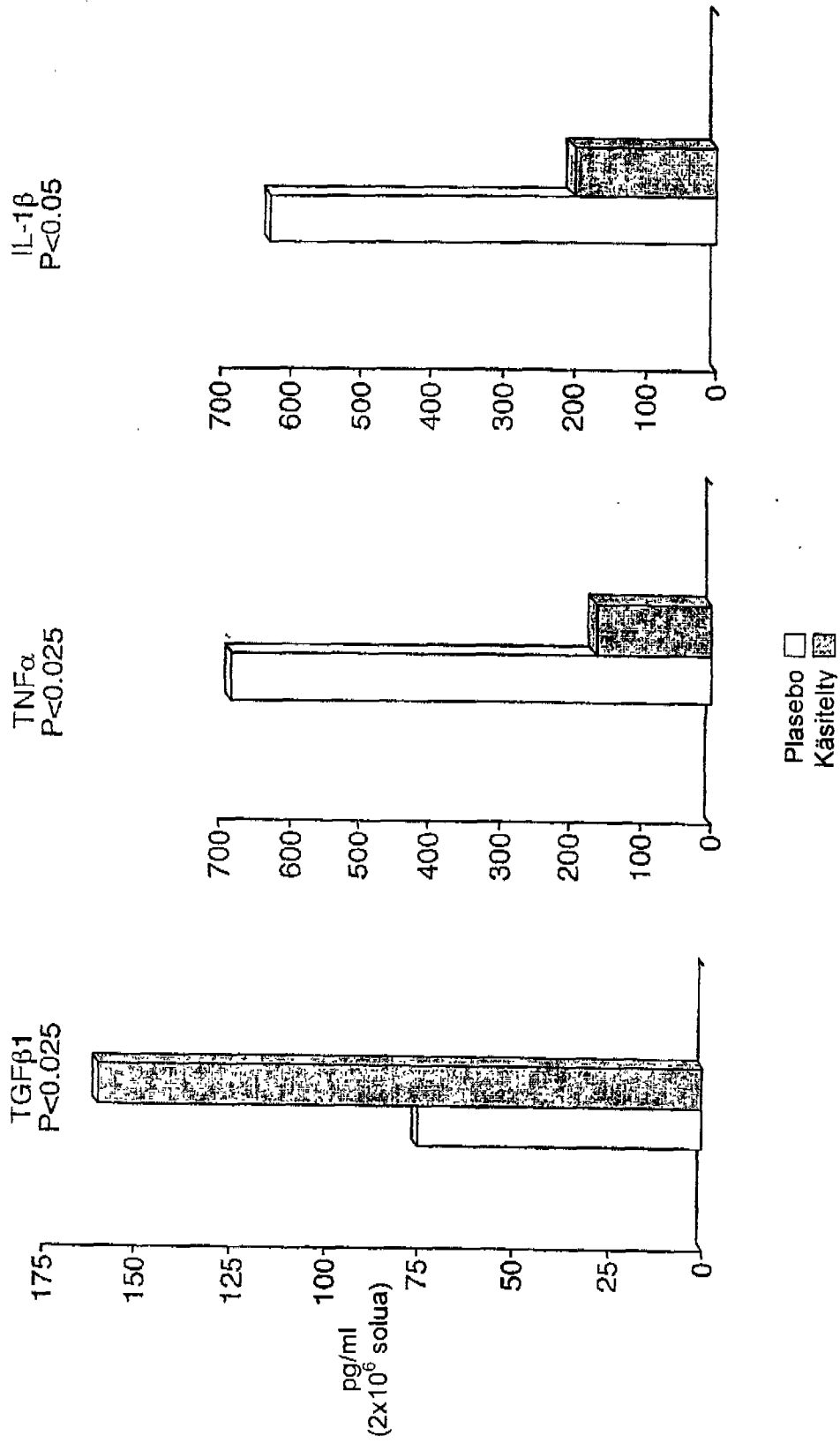


jossa kaavassa R^1 ja R^3 ovat samat ja ne on valittu γ -linolenyyliähteestä, dihomogamma-linolenyyliähteestä tai arakidonyyliähteestä,

tunnettu siitä, että saatetaan reagoimaan vastaava γ -linolenyylihalidi, dihomog-linolenyylihalidi tai arakidonyylihalidi glyserolin kanssa, joka halidi on kloridi, bromidi tai jodidi.

38. Lipidi, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat
glyseroli-1,3-didekanoaatti-2-oktadekatri(6-Z, 9-Z, 12-Z)enoaatti
glyseroli-1,3-didekanoaatti-2-eikosa(8Z, 11Z, 14Z)trienoaatti
glyserolitricikosotetra-5-Z, 8-Z, 11-Z, 14-Z-eneoaatti.
39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen lipidi hoitoon käytettäväksi.

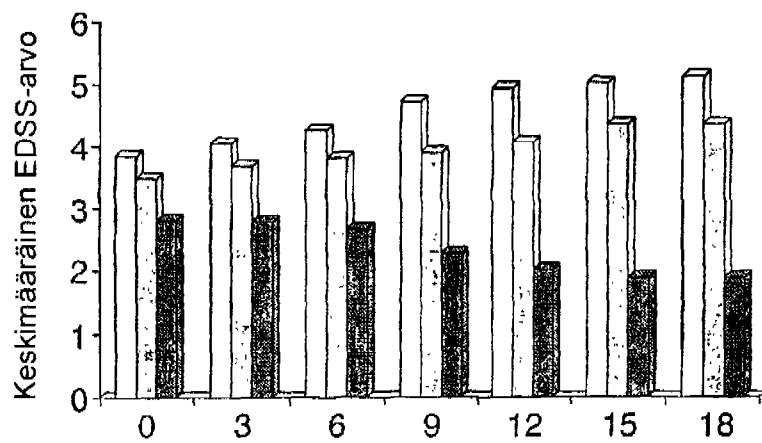
Kuvio 1



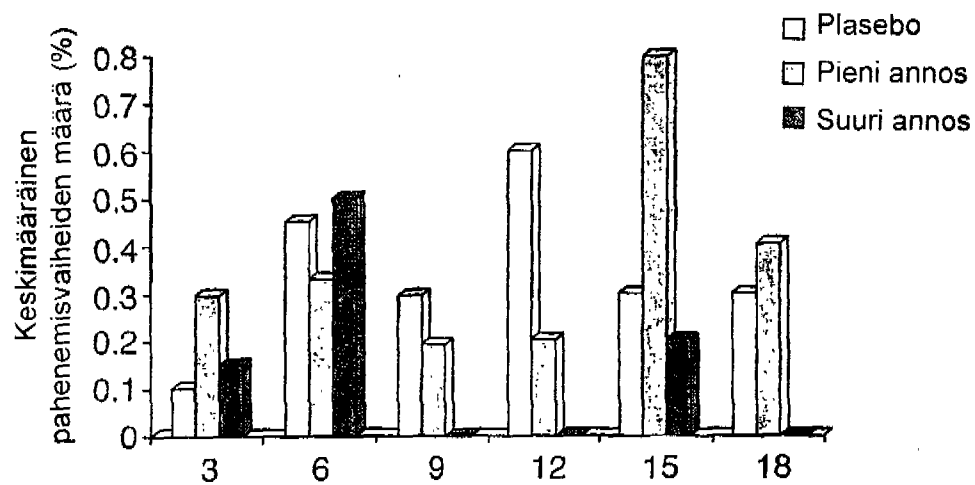
2/17

□ Plasebo
▨ Pieni annos
■ Suuri annos

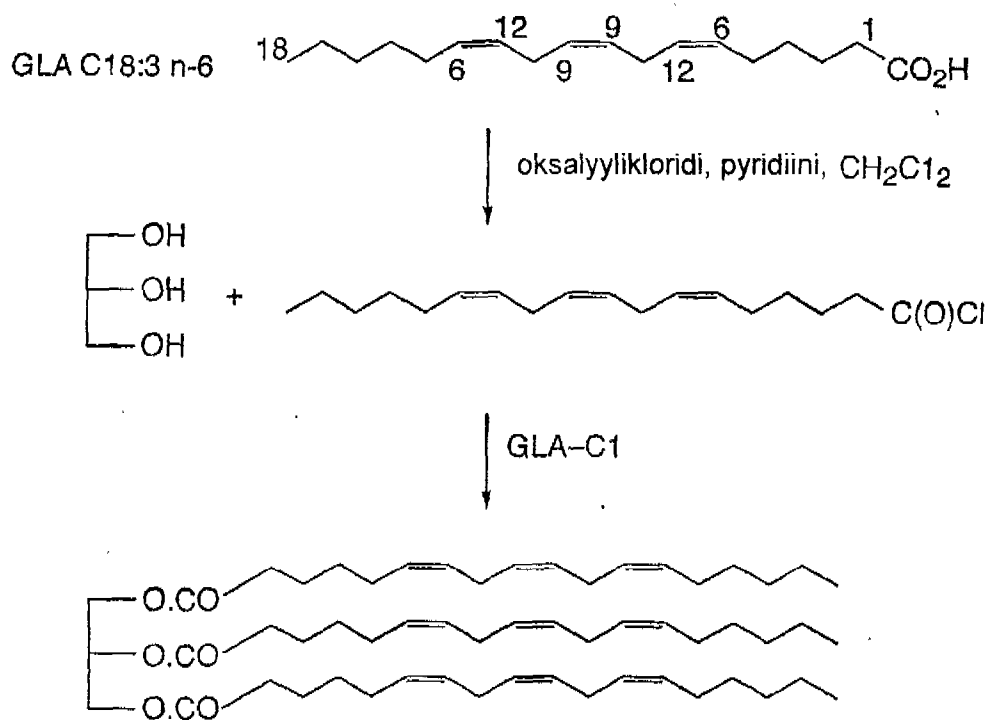
Kuvio 2



Kuvio 3



Kuvio 4



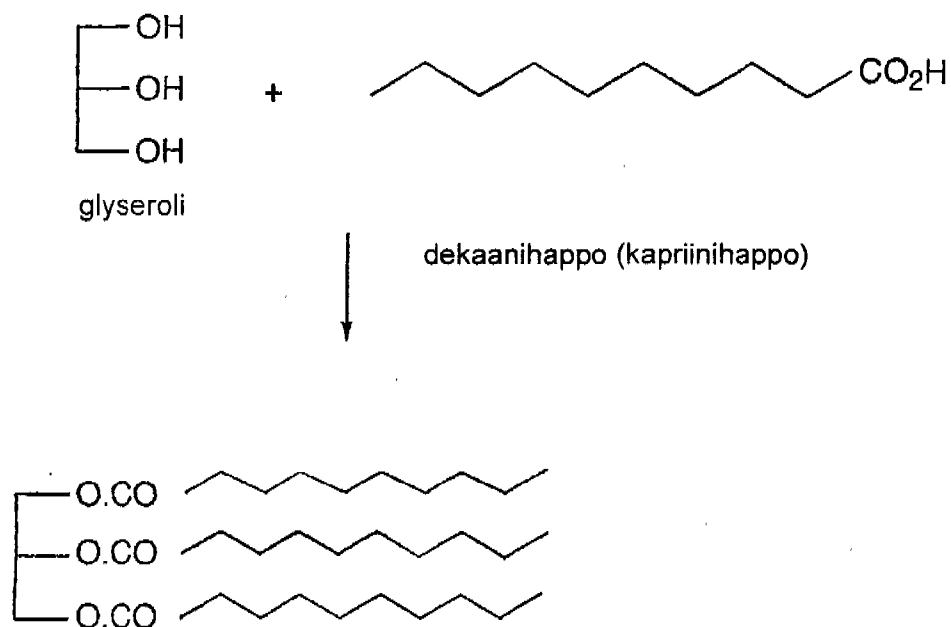
2

glyseroli-tris(6-Z,9-Z,12-Z-oktadekatrienoaatti) C₅₇H₉₂O₆

trigammalinoleeni mp. = 873,4

Numerointijärjestelmät: musta biologeille; sininen kemisteille

Kuvio 5



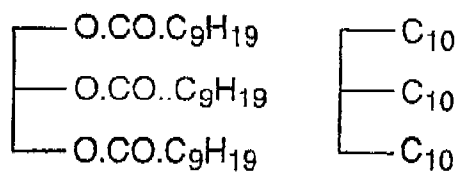
glyserolitridekanaatti

4

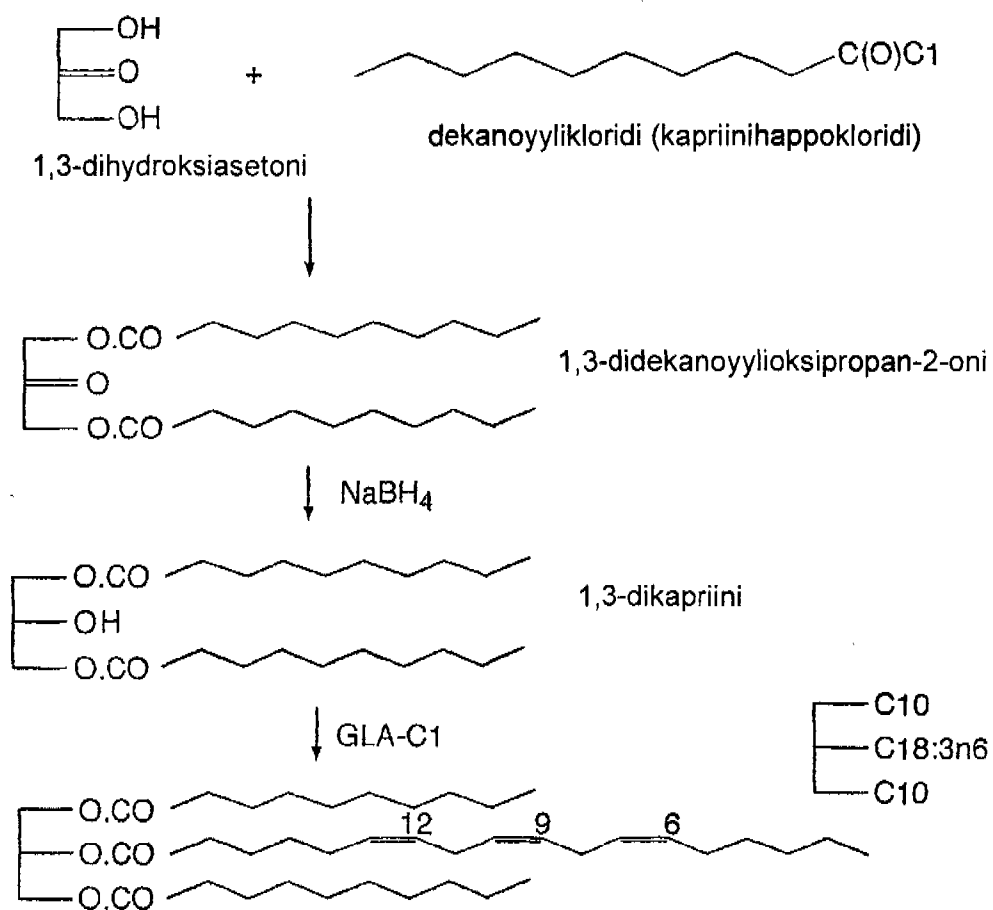
 $C_{33}H_{62}O_6$

mp. = 554,85 sp. 32°C

Esiintyy polymorfiaa



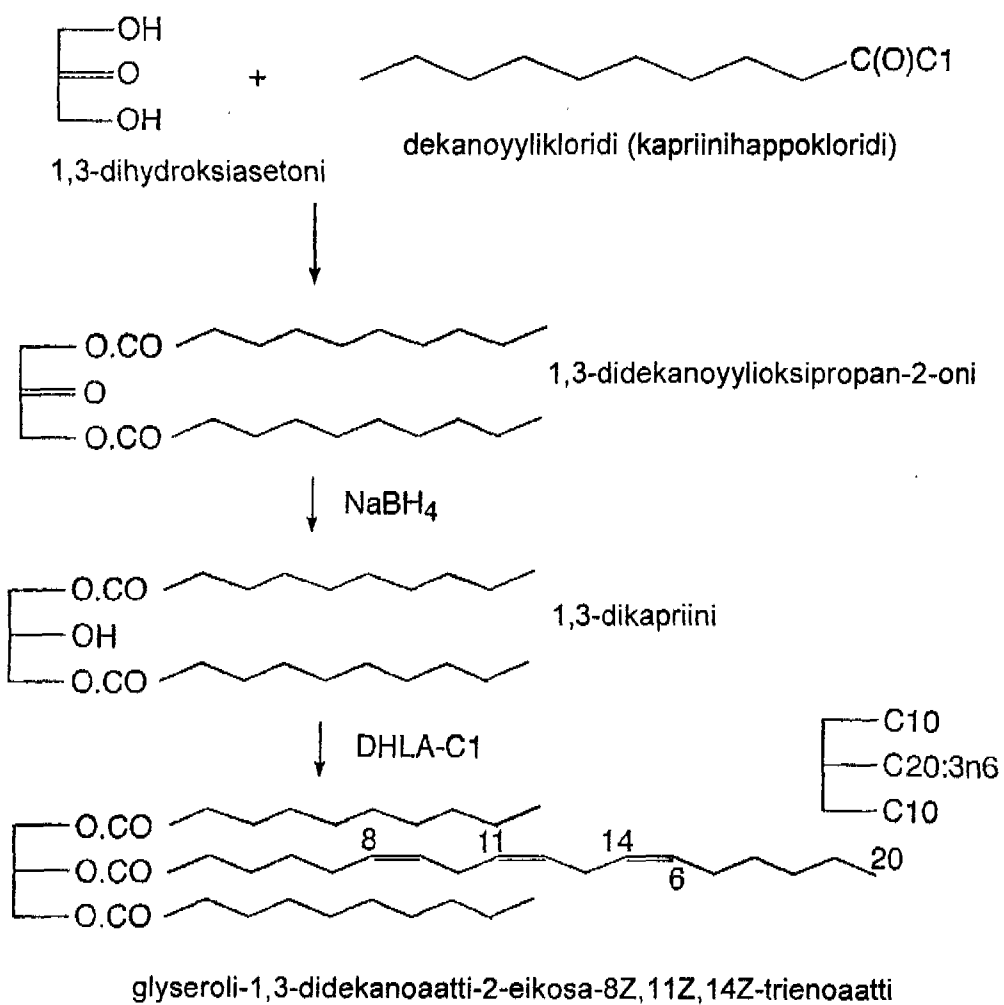
Kuvio 6

C₄₁H₇₂O₆

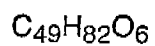
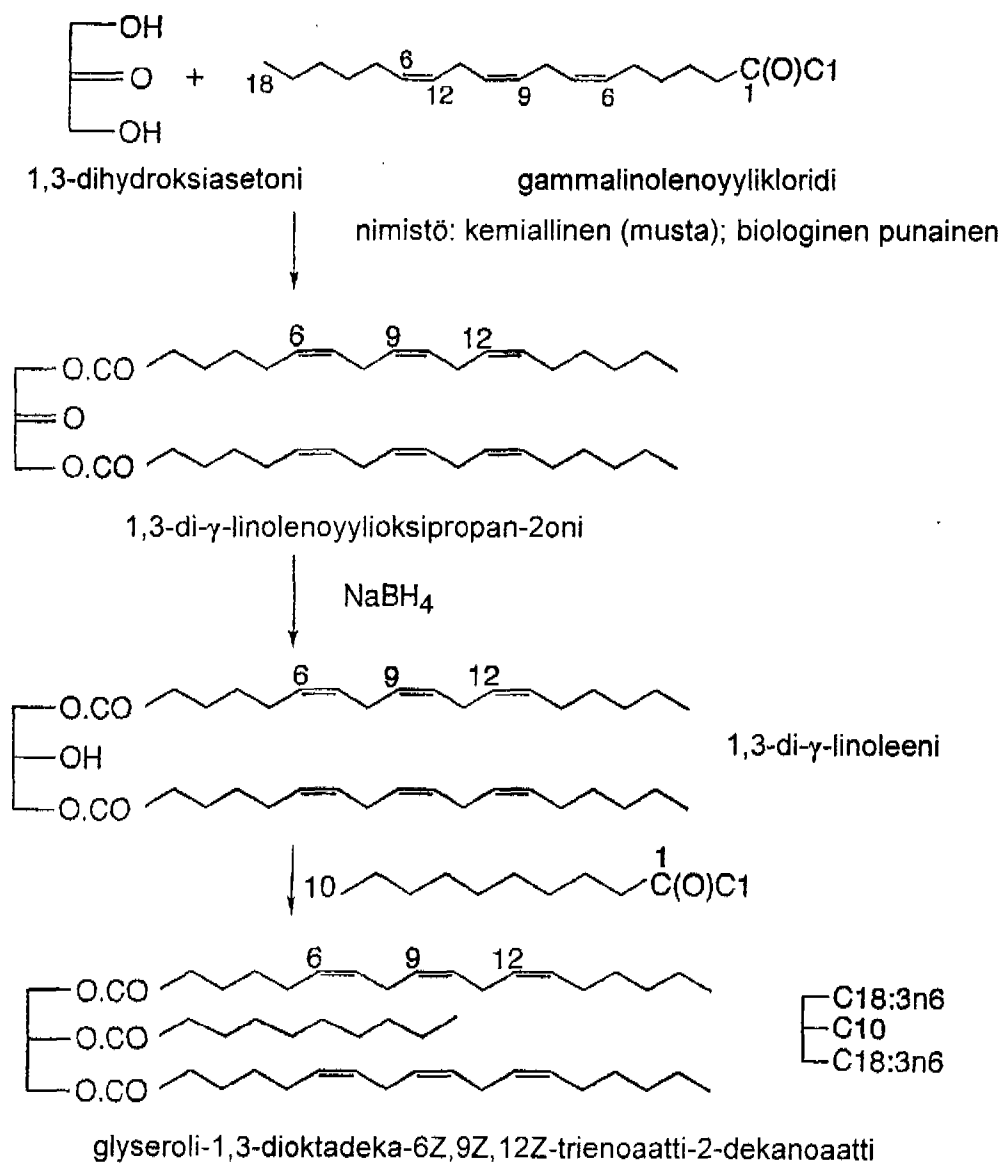
mp. = 661,05

sp. <25°C

Kuvio 7



Kuvio 8

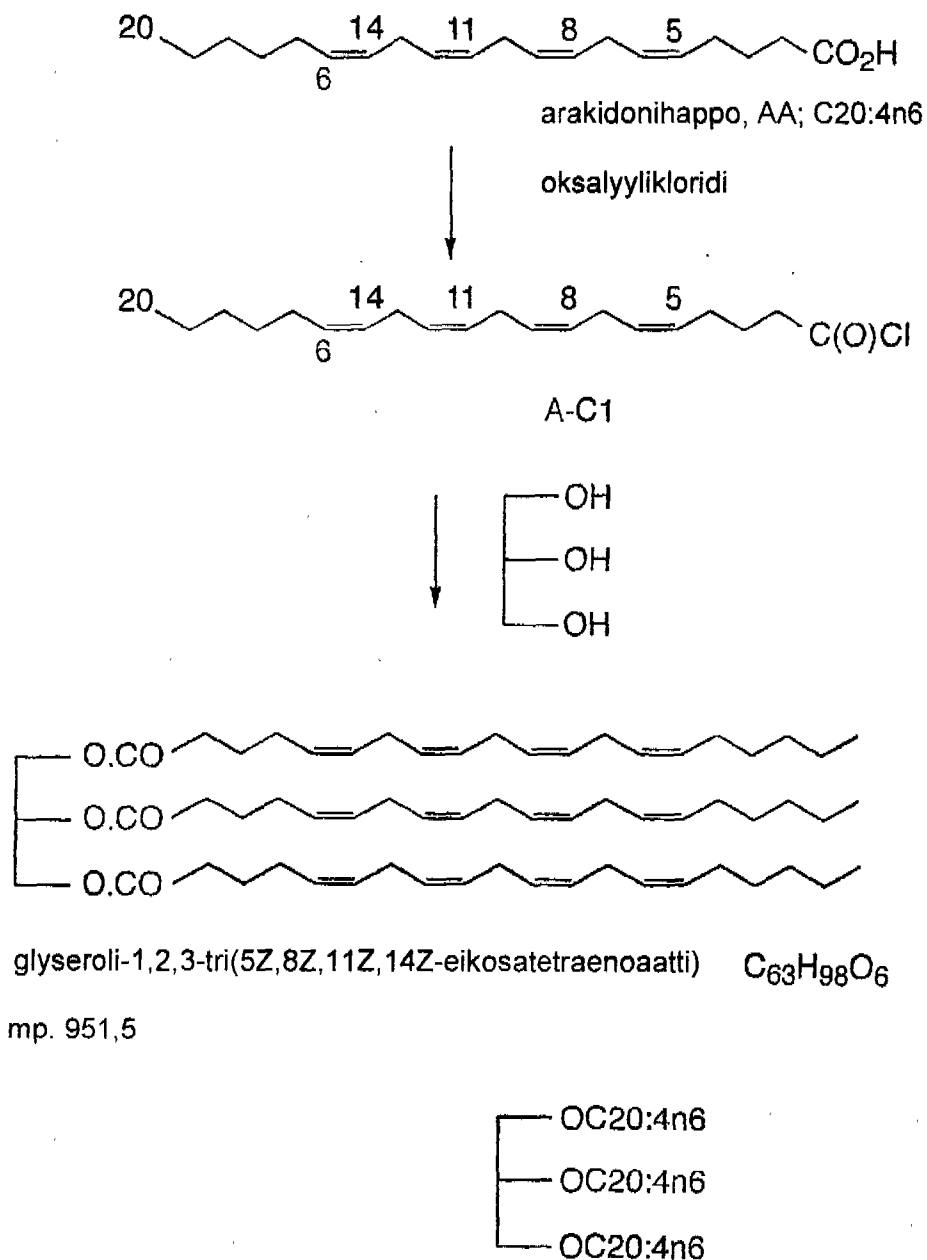


mp. = 766,1

sp. <25°C

8/17

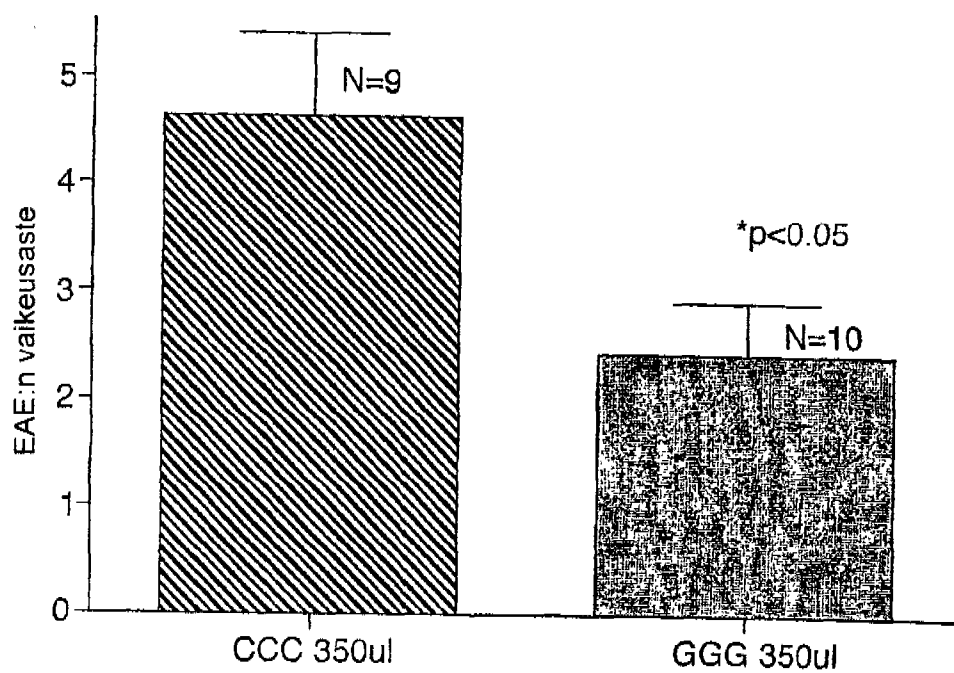
Kuvio 9



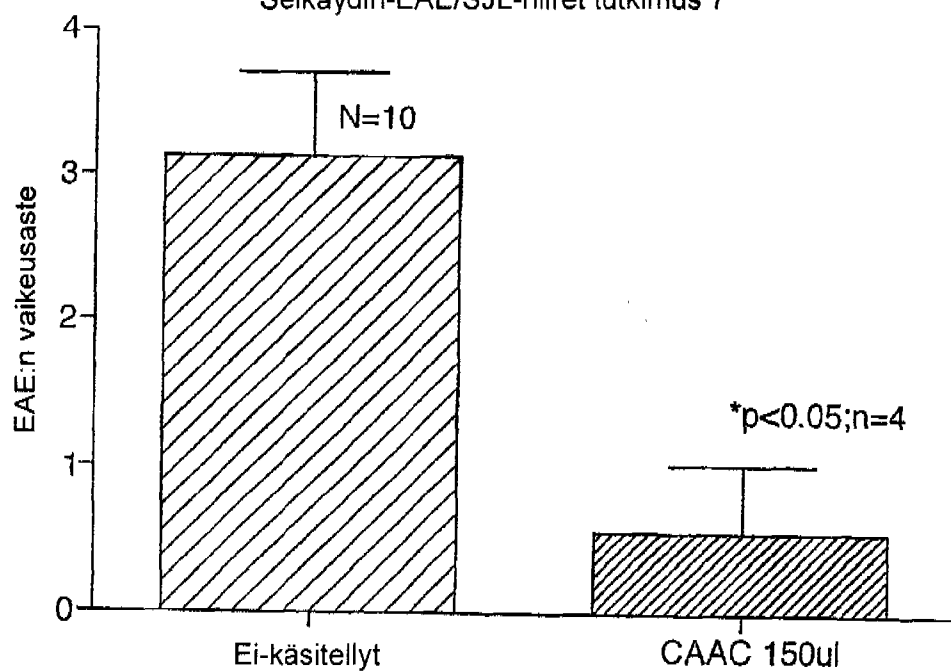
9/17

Kuvio 10

Selkäydin-EAE/SJL-hiiret tutkimus 2



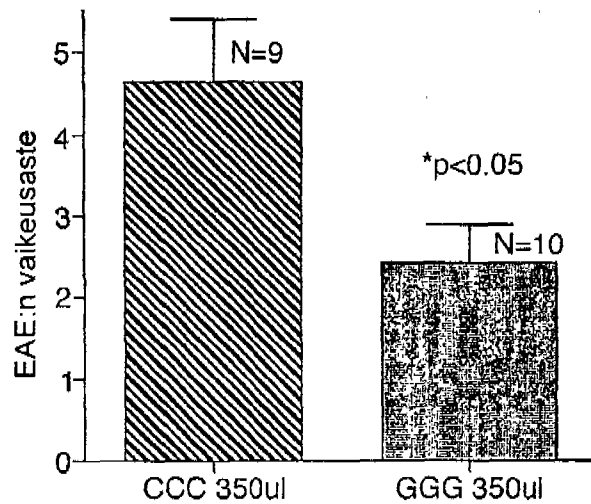
Selkäydin-EAE/SJL-hiiret tutkimus 7



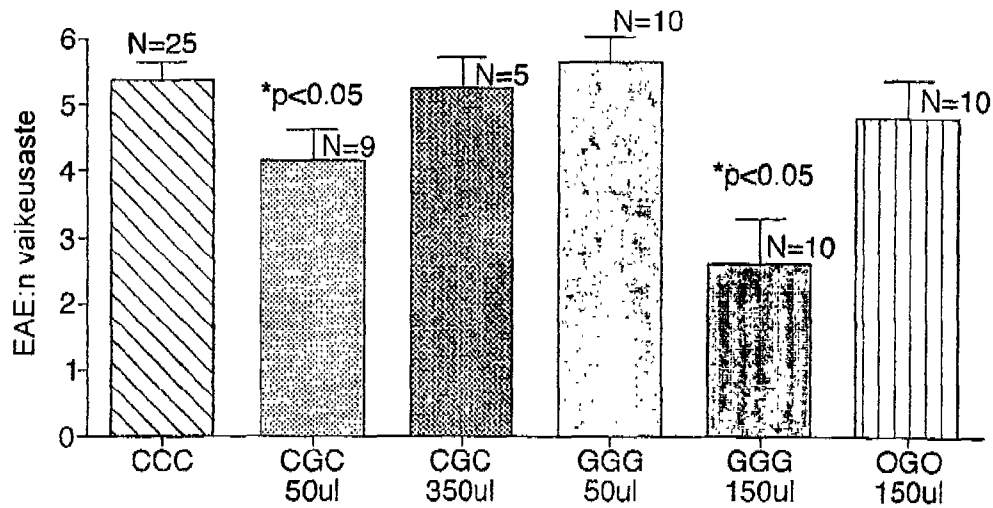
10/17

Kuvio 11

Selkäydin-EAE/SJL-hiiret tutkimus 2



Selkäydin-EAE/SJL-hiiret tutkimus 3



CCC yhdistetty annoksista 50/150/350 μ l

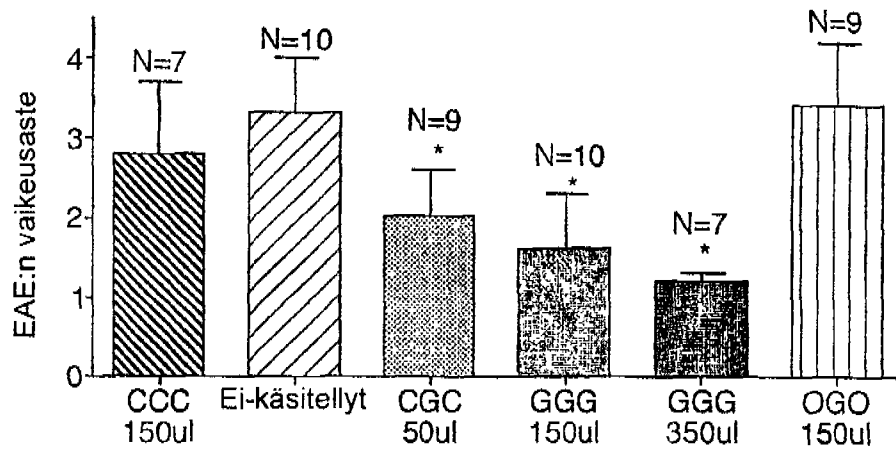
CGC 25/50/350ul

GGG 50/150/350ul

OGO 25/50/150/350ul

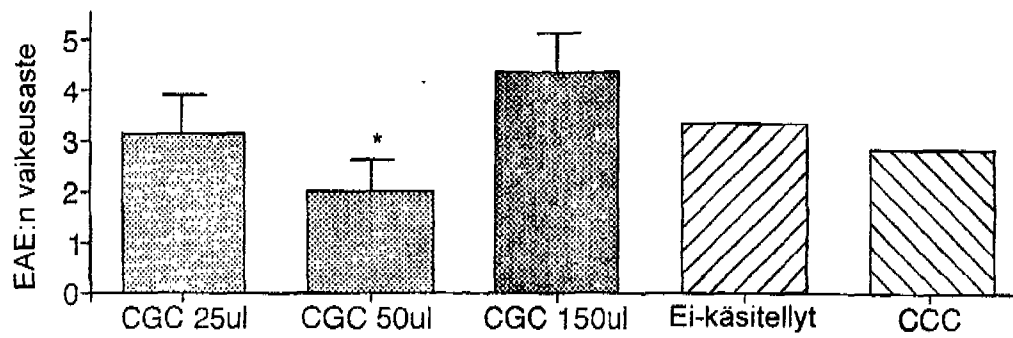
Kuvio 12

MOG-EAE/C57BL-hiiret tutkimus 4



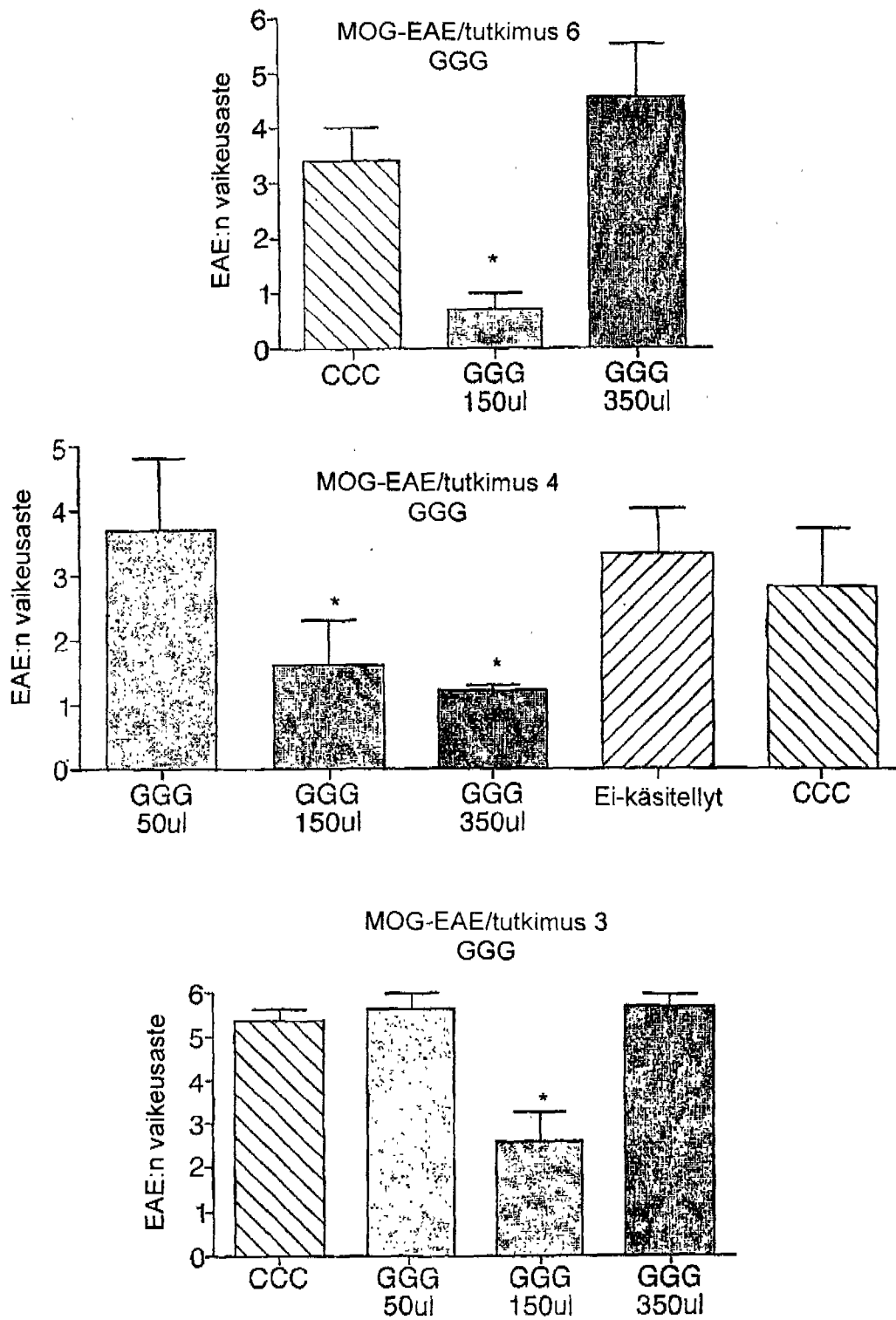
*P<0,05 verrattuna ei-käsiteltyihin

Kuvio 13

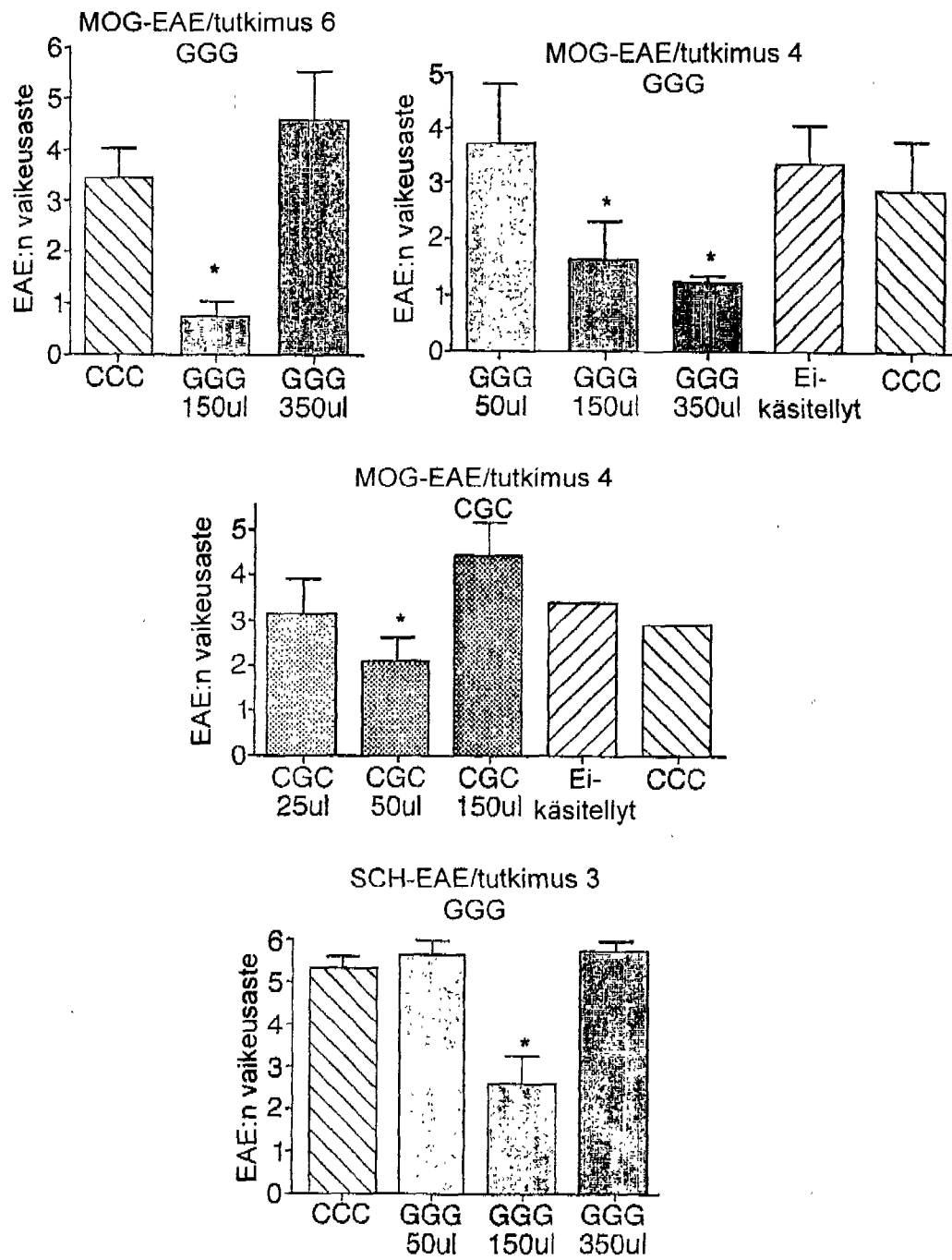
MOG-EAE/tutkimus 4
CGC

12/17

Kuvio 14

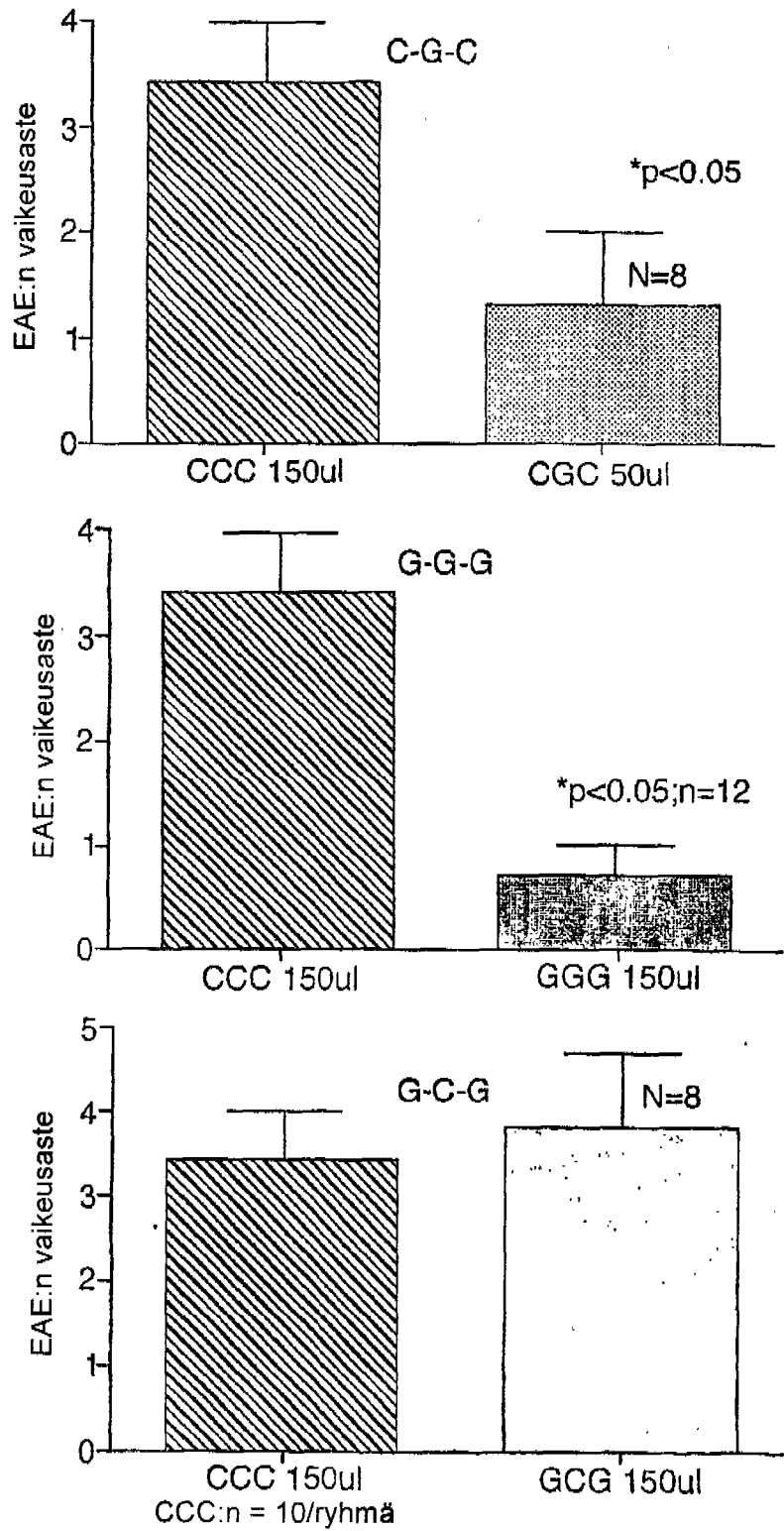


Kuvio 15



14/17
Kuvio 16

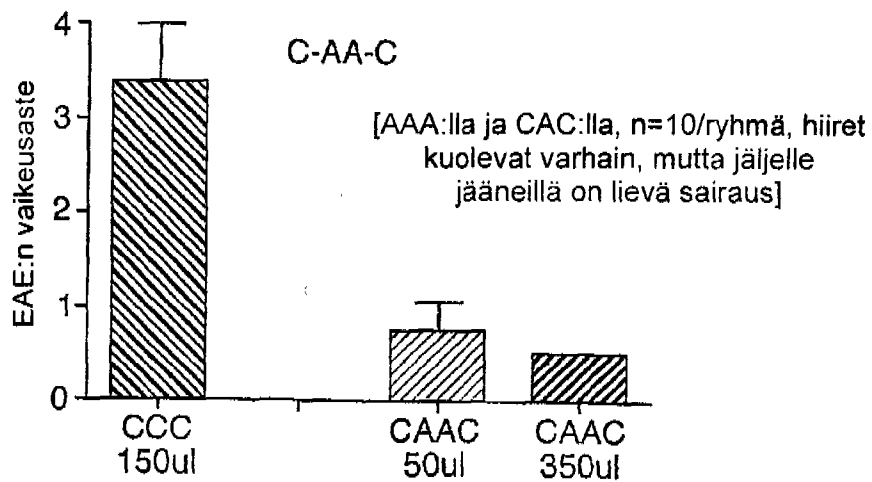
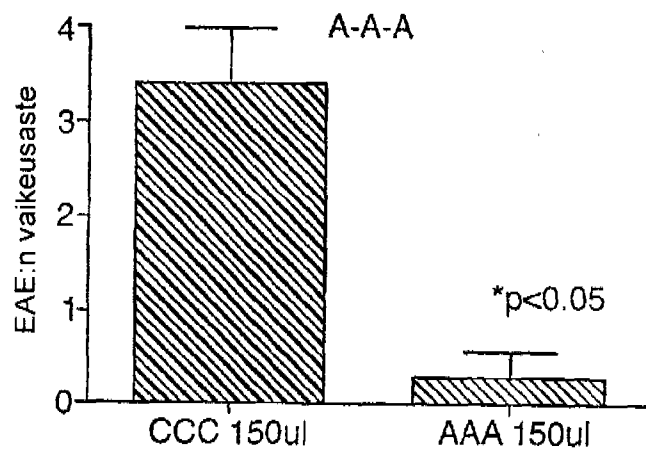
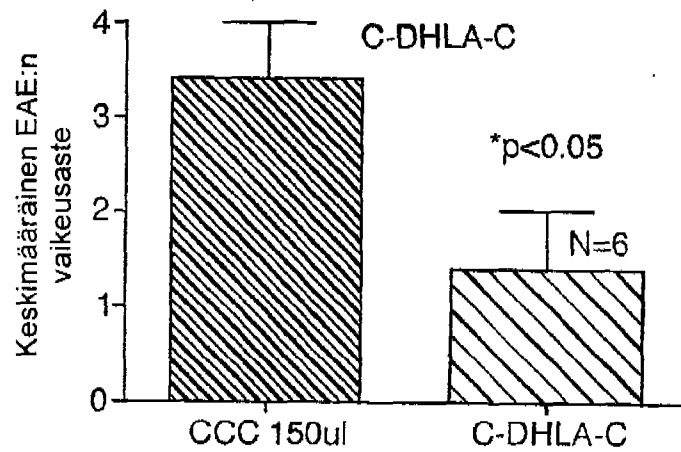
Tutkimus 6: MOG-EAE/C57BL-hiiret



15/17

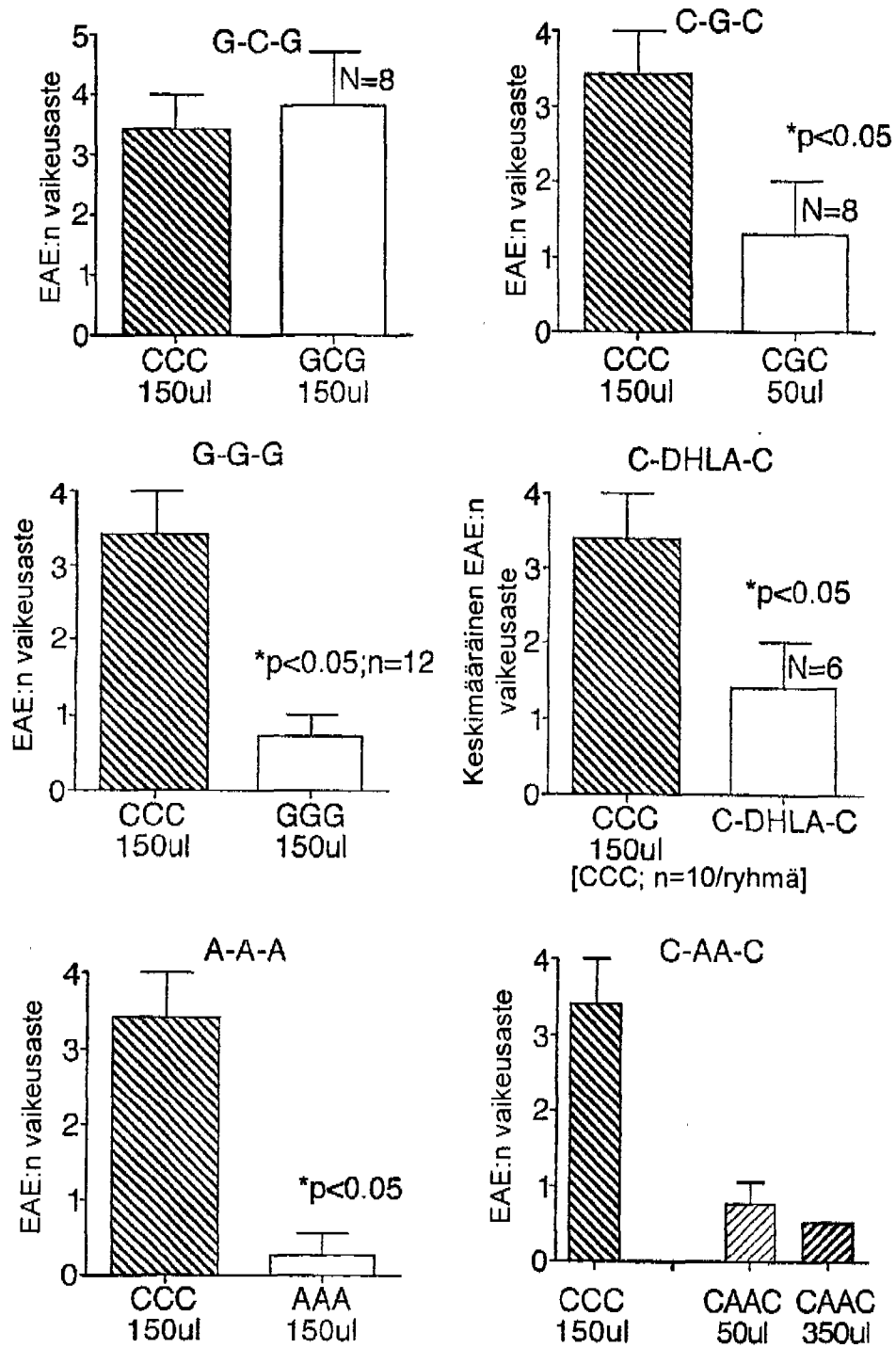
Kuvio 17

Tutkimus 6: MOG-EAE/C57BL-hiiret



16/17
Kuvio 18

Tutkimus 6: MOG-EAE/C57BL-hiiret



[AAA:lla ja CAC:lla, n=10/ryhmä, hiiret kuolevat varhain, mutta jäljelle jääneillä on lievä sairaus]

Kuvio 19

