

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 901607 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 901607

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 38/21
A61K 31/415

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 30.03.1990

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 30.03.1990

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 02.10.1990

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

01.04.1989 DE 3910568

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Boehringer Ingelheim International GmbH, Postfach 200, 55216 Ingelheim am Rhein, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Goeth, Hanns, BRD, SAKSA, (DE)

2 •Frank, Werner, Germany, SAKSA, (DE)

3 •Renner, Ingeborg, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

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

Lääkeaine ja sen käyttö parasitoosin käsittelyyn

Läkemedel och dess användning för behandling av parasitos

Menetelmä valmistaa parasiitin vastainen seos - Förfarande för framställning av en antiparasitisk blandning

- 5 Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa parasiitin, erityisesti Cestodes-parasiitin vastainen seos.

- 10 Keksinnön mukaisilla lääkeaineyhdistelmillä hoidettavat sairaudet käsittävät infektiot, jotka johtuvat endoparasiiteista, erityisesti Cestodes-luokan parasiiteista, ensisijaisesti Cyclophyllidea-lahkon, erityisesti Echinococcus-suvun parasiittien hyökkäyksestä. Keksinnön mukaisia lääkeaineyhdistelmiä käytetään esimerkiksi Echinococcus multilocularis-lajin aiheuttamien infektioiden hoitoon.

- 15 Erityisesti alveoläärisiä ekinokokkeja voidaan pitää ihmisen vaarallisimpina parasiitteina Keski-Euroopassa (FRANK, W., julkaisussa Räumliche Persistenz und Diffusion von Krankheiten [W. Fricke, E. Hinz, Hrsg.], Heidelb. Geogr. Arb. 83, 86-113, 1987).

Myös YK:n terveysjärjestö (WHO) yhtyy tähän arvioon.

- 20 Echinococcus-parasiittien munien aiheuttamalla infektiolla on useimmiten katastrofaalisia seurauksia vääränä väli-isäntänä toimivalle ihmiselle.

- 25 E. multilocularis:illa tapahtuu matorakkuloiden kasvu ihmisillä hitaammin kuin luonnonmukaisilla väli-isännillä. Usein ei edes muodostu matojen esivaiheita (Protoscoleces), ja keskushermoston kuolioitumisprosessit ovat tyypillisiä. Sairaus vaikuttaa ihmisen terveyteen usein niin voimakkaasti, että tämä voi johtaa kuolemaan. I. DROLSHAMMER'in et al., Schweiz. med. Wschr. 103, 1337-1386, 1973, mukaan kuolleisuus on diagnoosin määrittämisen jälkeen 52 % keskimääräisen 3,7 vuoden potemis-ajan jälkeen, ja H.J. SCHICKER'in, Inaugural Diss. Med. Fak. Universität Tübingen, 1976, mukaan 5 vuoden
30 henkiinjäämisaika on noin 20 % diagnosoinnin jälkeen.

Taudin eteneminen ihmisillä on lisäksi erittäin salakavala. Diagnoosi tapahtuu nimittäin useimmissa tapauksissa liian myöhään. Siten maksaan kohdistuvan rakkulamatotaudin ensimmäisten oireiden jälkeen eloonjääntimahdollisuudet ovat vain erittäin vähäisiä, ja voidaan antaa vain epätarkka ennuste.

5

Siitä, kun Virchow vuonna 1856 ensimmäisen kerran kuvasi Echinokokkioosin ja aina nykyaikaan 1974, oli leikkaushoito ainoa keino nostaa eloonjäämisai-
kaa tai harvoissa tapauksissa parantumiseen. 1974/75 havaittiin sitten kemote-
rapiaan bentsimidatsolit, mm. mebendatsoli (metyyli[5-bentsoylibentsimi-
10 datsoli-2-karbamaatti]) (CAMPELL, W.C. et al., J. Parasitol. 61, 844-852, 1975;
HEATH, D.D. et al., Parasitology 70, 273-285, 1975).

Tähän päivään asti mebendatsoli on yleensä ollut ainoa aine, jota on käytetty
alveoläärisessä Echniokokkioosissa. Ennusteet ovat kuitenkin pysyneet edel-
15 leen epätyytyttävänä, sillä päivittäisestä nauttimisesta huolimatta tämä aine
yleensä vaikuttaa vain parasiittistaattisesti, eikä sen applikointi ole aivan on-
gelmatonta. Tämän lisäksi mebendatsoli-hoito ei johda täydelliseen infektion
parantamiseen ja tämän aineen lopettamisen jälkeen voi parasiittivaiheen
(Metacestodit) lisääntymiskasvu alkaa uudelleen.

20

Lisäksi leikkaushoidolla on edelleen epävarma ennuste.

Bentsimidatsolit estävät mikrotiehyiden synteesiä sitoutumalla dimeeriseen
perusrakenteeseen, tubuliiniin (H. VAN DEN BOSSCHE et al., julkaisussa
25 Advances in pharmacology and chemotherapy. Vol. 19 [S. Garattini, A. Goldin,
F. Hawkings, I. Kopin, Hrsg.], Academic Press New York, 67-128, 1982). Sitou-
tumisaffiniteetti ei tällöin ole jokaisella tubuliinilla yhtä suuri.

Julkaisusta P.A. FRIEDMANN & E.G. PLATZER, Biochem. Biophys. Acta 630,
30 271-278, 1980, tunnetaan, että mebendatsoli esimerkiksi sitoutuu 384 kertaa
enemmän sikiön Ascaris suum-tiehyisiin kuin karjanaivojen tiehyisiin. Mikro-
tiehyet kuuluvat sellulääriseen solurunkoon ja ne osallistuvat tukitoimintojen
lisäksi mitoosisukkulan rakentamiseen ja solunsisäiseen kuljetukseen. Bents-

- imidatsolin vaikutuksia voivat olla solun jakaantumishäiriöt, glukoosin sisään-
oton estyminen (H. VAN DEN BOSSCHE, julkaisussa Comparative
biochemistry of parasites [H. van den Bossche, Hrsg.], Academic Press, New-
York, 139-157, 1972), johon liittyy endogeenisen glykogeenin voimistunut
5 hajoaminen, ja ATP-synteesin estyminen (M.S. RAHMAN & C. BRYANT, Int. J.
Parasitol. 7, 403-409, 1977). Mebendatsolin näin vain parasiittistaattinen vai-
kut Echinococcus multilocularis-parasiittiin perustuu mm. siihen puhtaasti
fysikaaliseen vaikutukseen, että tehoaineen diffuusio vaikeutuu pesusienimäi-
sen rakkulakudoksen, jossa onteloiden sisältö on lisäksi gelatiinimainen, läpi
10 verrattuna Echinococcus granulosus-parasiittiin (A. DIECKMANN, väitöskirja,
Fakultät II (Biol), Universität Hohenheim, 1987).

- Ihmisten Echinokokkioosi aloitettiin noin 13 vuotta sitten mebendatsoli-hoidol-
la. Siihen liittyy myös nykyään moninkertaisia vaikeuksia. Tähän mennessä ei
15 ole eettisistä syistä ja korkeasta kuolleisuudesta johtuen voitu suorittaa lain-
kaan ihmiskokeita, esimerkiksi minimaalisesti vaikuttavien mebendatsolin kon-
sentraatioiden suhteen. Lisäksi annoksen ja verenkuvan välillä ei ole mitään
yksiselitteistä korrelaatiota. Muita ongelmia ovat, että käytettävissä ei ole luo-
tettavia kriteereitä tulosten nopeaan arviointiin tai hoidon epäonnistumiseen, ja
20 että sivuvaikutusten laadusta ja syistä on riittämättömästi tietoa.

- Nykyään yleensä pyritään ei-leikattavissa olevalla tai ei-radikaalisti leikatulla ja
uusiutuvalla Echinococcus multilocularis-taudilla 40 - 50 mg/kg kestohoitoon
(R. AMMAN et al., julkaisussa Probleme der Echinokokkose unter Berücksich-
25 tigung parasitologischer und klinischer Aspekte [R. Bähr, Hrsg.], Huber Verlag
Bern. Aktuel. Probl. Chir. Ortop. 23, 92-95, 1982; H. BIEDERMANN, ibidem,
98-99; U. JUNGE & P. FRIEDL, ibidem, 100-103; P. KERN & M. DIETRICH,
ibidem, 104-1105).

- 30 Tähän mennessä on voitu päästä elämänlaadun paranemiseen
(H. BIEDEMANN 1982, loc. cit; U. JUNGE & P. FRIEDL, 1982, loc. cit; P.
KERN & N. DIETRICH 1982, loc. cit.) Echinococcus-AK-titterin osittaiseen
laskuun (U. JUNGE & P. FRIEDL, 1982 loc. cit.) mutta ei kuitenkaan maksan-

sisäisen tuumorimassan palautumiseen tai on päästy vain vähäiseen palautumiseen (R. AMMANN et al., 1982, loc. cit.; P. KERN & M. DIETRICH, 1982, loc. cit.). R. AMMANN et al., 1982, loc. cit., saattoivat osoittaa kolmen potilaan leikkauksella poistetussa Echinococcus-materiaalissa vielä aktiivista toukkamateriaalia. Tämä vahvistaa siten edelleen käsitystä, että Echinococcus-infektiossa mebendatsolin vaikutus on yksinomaan parasiitti-staattinen.

Gamma-interferonia on tähän mennessä käytetty pääasiallisesti vain virus-, kasvain- tai autoimmuunisairauksissa tai näihin sairauksiin liittyvien kipujen torjuntaan (S. LEVIN, *Isr. J. Med. Sci.* 19, 955-958, 1983; K. OSTHER et al., *Proceedings of the Second International TNO Meeting on the Biology of the Interferon System*, 18.-22. April 1983, *The Biology of the Interferon System 1983* [Edward De Maeyer & Huub Schellekens, toim.] Elsevier Science Publishers B.V., 527-533, 1983). Näiden käyttöalueiden lisäksi on ehdotettu, että gamma-interferonia käytetään myös solunsisäisissä bakteeri-infektioissa (A.F. KIDERLEN et al., *Eur. J. Immunol.* 14, 964-967, 1984; J. MAUEL, Y. BUCHMULLER-ROULLER, *Eur. J. Immunol.* 17, 203-208, 1987).

Tähän mennessä on lisäksi yritetty hoitaa parasiittisten alkueläinten aiheuttamia infektioita IFN γ :lla (I.A. CLARK et al. *J. Immunol.* 139, 3493-3496, 1987; A.F. KIDERLEN, M.L. LOHMANN-MATTHES, *Interdisciplinary conference on primary health care in the tropics, tropical diseases and zoonoses*, 13.-15. April 1987, Genf; S.G. REED, *J. Immunol.* 140 (12), 4342-4347, 1988; Y. SUZUKI et al., *Science* 240, 516-518, 1988). Tämän hoitomuodon tehokkuus oli kuitenkin epävarma, osittain jopa ei-rohkaiseva.

Esillä olevan keksinnön tavoitteena oli siten tuoda esiin menetelmä valmistaa lääkeaineita, joita tekniikan tasoon verrattuna voitaisiin käyttää tehokkaasti loistautien hoitoon, edullisesti endoparasiittien, erityisesti Cestodes-luokan, ensisijaisesti Cyclophyllidea-lahkon, erityisesti Echinococcus-suvun, esimerkiksi Echinococcus multilocularis'in aiheuttamien infektioiden hoitoon.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, gamma-interferoni-tehoaine, joka on lajispesifinen ja peräisin luonnonmukaisista soluista tai on valmistettu DNA-rekombinanttitekniikalla, yhdistetään matolääkkeeseen, joka on valittu kemiallisesti määriteltujen matolääkkeiden ryhmästä, kuten bentsimidatsoliryhmän lääkkeitä, erityisesti mebendatsoli.

5

Edellä mainituista syistä ei ollut odotettavissa, että IFN γ :n ja vähintään yhden matolääkkeen yhdistelmän keksinnön mukainen antaminen olisi tehokas hoitomuoto mainittuja loistauteja vastaan.

10

Eläinkokeissa on nyt yllättäen havaittu, että IFN γ :n ja vähintään yhden matolääkkeen, joka jälkimmäinen on ensisijaisesti valittu kemiallisesti määriteltujen matolääkkeiden ryhmästä, yhdistelmän antaminen aiheutti eräällä vaarallisimmista loistaudeista, jossa aiheuttaja oli Echinococcus multilocularis, suuremman rakkuloiden degeneroitumisen tai kuoliintumisen kuin mebendatsoli-yksittäishoidossa. Degeneroituminen tai kuoliintuminen oli keksinnön mukaisessa hoidossa osaksi täydellistä (100 %). Myöskään ei voitu löytää hedelmällisiä eikä steriilejä rakkuloita ja vastaavasti degeneroituneita Protoscoleces-muotoja.

15

20

Kenttähiirten (Microtus arvalis), joka on luonnonmukainen väli-isäntä, kokeellisessa oraalisessa infektiossa voitiin lisäksi havaita IFN γ :n ja kemiallisesti määritellyn matolääkkeen, mebendatsolin yhdistelmän antamisen jälkeen, että metakestodi-rakkulat rajoittuivat maksassa terävämmin ympäröivää maksakudosta vastaan kuin mebendatsoli-yksittäishoidon jälkeen.

25

Erityisesti maksasolut (hepatosyytit) pesäkkeen välittömässä ympäristössä eivät olleet niin voimakkaasti vaurioituneet kun mebendatsoli-yksittäishoidossa.

30

Parhaillaan on menossa tutkimus, jossa selitetään, voidaanko näin myös estää tai vähintään pienentää itukerrossolujen kasvua.

Tämä yllättävä histologinen havainto voitiin lisäksi vahvistaa mittaamalla maksan GPT-entsyymin (glutamaatti-pyruvaatti-transaminaasi) seerumikuva. Tämä entsyymi esiintyy lähes yksinomaan maksassa, jossa se on vain parenkyymisolujen psytoplasmassa.

5

Seerumin GPT-aktiivisuus on kohonnut erilaisesta vapautumis-nopeudesta johtuvasta solun vaurioitumisasteesta riippuen. Kenttähiirten (Microtus arvalis) seerumin GPT-aktiivisuuden normaaliarvo, joka on saatu omissa tutkimuksissa, on keskimäärin 72 U/l. Oraalisen Echinococcus multilocularis-infektoinnin

10 jälkeen GPT-aktiivisuus nousi keskimäärin arvoon 120 U/l 6 viikon jälkeen infektoinnista.

Mebendatsoli-yksittäishoidolla voitiin 28 päivän aikana laskea keskimääräinen GPT-aktiivisuus vain hieman, arvoon 107 U/l.

15

Yllättäen havaittiin, että neliviikkoisen mebendatsoli-hoidon ja IFN γ :n yhdistelmällä laski seerumin GPT-kuva 14 päivän kuluessa arvoon 78 U/l, joka siten eroaa vain hieman normaali-arvosta (72 U/l).

20 Mebendatsoli-yksittäishoito vahvisti sen sijaan tämän kemoterapeutin yksinomaan parasiittistaattisen tehon. Rakkulat, Protoscoleces-muodot ja itiökerrosolementit tosin vaurioituivat laajalti, mutta mukana oli edelleen itiökerrossoluja. Positiiviset uudelleensiirrostuskokeet tukivat olettamusta, että loinen säilyy lisääntymiskykyisenä.

25

Yksittäishoito IFN γ :lla johti absoluuttisen rakkulapainon (LCM= toukkarakkulan massa) voimakkaaseen kasvuun (joka on jopa kuusinkertainen massa verrattuna hoitamattomiin eläimiin ja joka on johdettavissa tämän sytotoksisen aineen immunosuppressiivisiin ominaisuuksiin. Rakkuloille on histologisesti ominaista erityisen usein esiintyvä steriilisyyys, paksuuntunut granulaatioseinämä ja osaksi suuremmat degeneroitumisilmiöt. Lisäksi mukana on yleensä itiökerros sekä hedelmällisiä rakkuloita.

30

Moninkertainen kohdistaminen rintaonteloon, muutamassa tapauksessa erityisesti palleaan, ei johda minkäänlaisiin johtopäätöksiin gamma-interferonin metastaaseja estävästä vaikutuksesta.

- 5 Parhaimpiin tuloksiin päästiin mebendatsoli/IFN γ -yhdistelmähoidolla. Tällöin päästiin jopa 99 % LCM-arvon pienenemiseen.

- Keksinnön mukaiseen yhdistelmään käytettävä IFN γ voidaan valmistaa tavanomaisilla, eläin- tai ihmisperäisillä tunnetuilla soluviljelymenetelmillä, esimerkiksi: W.R. BENHAMIN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5379-5383, 1982; Y.K. YIP et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1601-1605, 1981; J.A.O'MALLEY, Methods Enzymol. 78, 540-545, 1981; Y.K. YIP et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1820-1824, 1982, tai myös tunnetulla DNA-rekombinantiteknikalla, esimerkiksi: P.W. GRAY et al., Nature 295, 503-508, 1982; 10 E. RINDERKNECHT et al., J. Biol. Chem. 259, 6790-6797; R. DEVOS et al., Nucl. Acids Res. 10, 2487-2501, 1982.

Keksinnön mukaiseen yhdistelmään käytetään parhaiten gammainterferonia, joka voidaan saada tunnetuilla menetelmillä DNA-rekombinaation avulla.

- 20 Keskimääräiselle ammattimiehelle on tunnettua, että yksilöspesifisesti voi esiintyä luonnonmukaisia alleelisiä muunnelmia ja että nämä näkyvät yhtenä tai useampana erilaisena aminohappona tai erilaisina nukleotideinä tai DNA-sekvensseinä. Tällaiset muunnelmat tai mutaatiot, jotka voidaan saada aikaan 25 myös tunnetuilla DNA-rekombinaatiomenetelmillä tai kohdemutageneesin avulla, kuten on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa: P.W. GRAY et al., 1982, loc. cit. ja R. DEVOS et al., 1982, loc. cit., käsittävät yksinkertaisia tai moninkertaisia substituutioita, deleetioita, additioita, insertioita tai inversioita. Tällaiset IFN γ -lajit sisältyvät siten keksinnön piiriin.

- 30 Ammattimiehelle on immunologisista syistä tunnettua, että käyttäessään biologisesti aktiivisia, kehon omia aineita, hän turvautuu ensisijaisesti lajispesifisiin tehoaineisiin. IFN γ :n keksinnön mukaista, lajispesifistä käyttöä varten käyte-

tään siten mieluummin kyseisestä, lajispesifisestä kudoksesta eristettyä gamma-interferonia tai lajispesifisestä kudoksesta tai soluista eristettyjä nukleiinihappoja (RNA, DNA) kyseisen IFN γ :n valmistamiseen DNA-rekombinantti-tekniikalla, erityisesti kuitenkin kyseistä, aidon IFN γ :n kanssa identtistä polypeptidiä, jolla on IFN γ :n tunnettu biologinen aktiivisuuskirjo. Keksinnön mukaan käyttöä varten ihmisillä hyödynnetty IFN γ on siten esimerkiksi ihmis-IFN γ .

IFN γ :n keksinnön mukaista käyttöä varten tulevat kysymykseen ammattimiehen tuntemat ja tavanomaiset farmaseuttiset tai galeeniset formulaatiot, jotka on tarkoitettu oraaliseen tai parenteraaliseen applikointiin, parhaiten kuitenkin formulaatiot, jotka on tarkoitettu parenteraaliseen applikointiin, erityisesti intravenöösiin, intramuskulaariseen, subkutaaniin, intrakutaaniin, intra-artrikulaariseen, intradekaaliseen, intraperitoneaaliseen infuusioon tai injisointiin, jolloin näihin kuuluu myös kestoinfuusio tai katkottainen infuusio ammattimiehen käytettävissä olevilla pumpuilla.

Käyttövalmiin liuoksen valmistamiseen IFN γ :n keksinnön mukaista käyttöä varten on ammattimiehelle käytettävissä tähän tarkoitukseen tunnettuja vesipitoisia infuusio- ja ruiskeliuoksia, mahdollisesti yhdessä niiden kanssa tunnettuja apu-, kantaja- ja/tai stabilointiaineita. Eräs käyttövalmis liuos keksinnön mukaista käyttöä varten voidaan valmistaa esimerkiksi siten, että erittäin puhdasta gamma-interferonia liuotetaan ennen applikointia "injisointiveteen" tai fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (pH 7 - 7,5), joka mahdollisesti on täydennetty stabilointiaineena toimivalla Tweenillä ja/tai gelatiinilla tai ihmisalbumiinilla, ja liuos täytetään steriilisti sopiviin astioihin (esimerkiksi ampulleihin, pusseihin).

Keksinnön mukaista käyttöä varten annettava IFN γ -määrä lähtee ammattimiehen tuntemasta annostelusta, sairauden vaikeudesta, vasteesta ja sairauden muusta kulusta sekä sivuvaikutuksista. Yleensä lähdetään sen vuoksi siitä, että annostelussa noudatetaan henkilökohtaisia kriteereitä.

- Keksinnön mukaiseen yhdistelmään käytettävät matolääkkeet, joista ainakin yksi on keksinnön mukaisen yhdistelmän komponentti, ovat edullisesti tunnettuja kemiallisesti määriteltyjä matolääkkeitä, näistä erityisesti aineet, jotka kuuluvat bentsimidatsolien ryhmään, erityisesti mebendatsoli (metyyli[5-bentsoylibentsimidatsoli-2-karbamaatti]). Mebendatsoli on tunnettu aine, ja se on saatavissa esimerkiksi kauppanimillä Vermox^R tai Vermox^R forte (Janssen). Applikointitapa ja annostelu riippuu hoitosuunnitelmasta, esimerkiksi niistä, jotka ovat tunnettuja mainituille matolääkkeille.
- 5
- 10 IFNy:n ja vähintään yhden matolääkkeen, edullisesti IFNy:n ja vähintään yhden kemiallisesti määriteltyjen matolääkkeiden ryhmään kuuluvan matolääkkeen, erityisesti IFNy:n ja vähintään yhden bentsimidatsoliryhmään kuuluvan matolääkkeen, erityisesti IFNy:n ja mebendatsolin keksinnön mukainen käyttö voi tapahtua joko antamalla samanaikaisesti kumpaakin eri vaikuttavaa ainetta tai
- 15 myös konsekutiivisesti tai toistensa jälkeen kulloinkin sopivaa tietä. Keksinnön mukaisessa yhdistelmähoidossa annetaan edullisesti ensin gamma-interferoni ja sen jälkeen yksi tai useampi kuvattu matolääke.

- Mebendatsolin ja IFNy:n samanaikaista käyttöä varten voidaan käyttää esimerkiksi sellaisia applikointimuotoja, jotka voidaan valmistaa liposomeina, esimerkiksi patenttijulkaisun EP-A 213 523 mukaisesti.
- 20

Kuvien selitykset:

- 25 Kuvio 1: Koeyksikkö A, juoksuhiiret; I = hoitamaton, II = mebendatsoli, III = mebendatsoli/IFNy; F = fertiliteetti, S = steriliteetti, D = degeneroituminen, N = nekroosi.
- Kuvio 2: Koeyksikkö B, juoksuhiiret; I = hoitamaton, II = mebendatsoli, III = IFNy; F, S, D ja N kuten kuviossa 1.
- 30
- Kuvio 3: Rakkuloiden painon (LCM) muutos koeyksikössä A, kenttämyyrät; o - o = ei hoitoa, o----o = mebendasoli, o....o = mebendatsoli/IFNy.

Kuvio 4: Koeyksikkö A, kenttähiiret; I = hoitamaton, II = mebendatsoli, III = mebendatsoli/IFN γ ; F, S, D ja N kuten kuviossa 1.

5 Kuvio 5: Rakkuloiden painon (LCM) muutos koeyksikössä, B, kenttämyyrät;
o - o = ei hoitoa, o----o = mebendatsoli, o....o = IFN γ .

Kuvio 6: Koeyksikkö B, kenttähiiret; I = hoitamaton, II = mebendatsoli, III = IFN γ ; F, S, D ja N kuten kuviossa 1.

10 Seuraavat esimerkit selventävät lähemmin keksintöä sitä kuitenkaan millään tavoin rajoittamatta.

Esimerkki 1 Havainnot ja tulokset käytettäessä väli-isäntänä juoksuhiirtä
Meriones uncuiculatus

15

Lähtömateriaalina oli yhteensä 40, E. multilocularis-metakestodivaiheella infektoiduja juoksuhiiriä, jotka oli taulukon 1 mukaisesti jaettu kahteen koeyksikköön A ja B.

20 Taulukko 1

		Koeryhmä	Hoitomuoto	Eläinten määrä
25	Koeyksikkö A n=18 (8 urosta, 10 naarasta)	I	ilman	6
		II	mebendatsoli	6
		III	mebendatsoli plus IFN γ *	6
30	Koeyksikkö B n=22 (15 urosta, 7 naarasta)	I	ilman	3
		II	mebendatsoli	4
		III	IFN γ *	15

* DNA-rekombinantititeknikalla valmistettu hiiren IFN γ

Sukupuoli valittiin mielivaltaisesti, ja ikä kokeen alussa oli 2 ja 4 kuukauden välillä. 1 - 6 koe-eläintä pidettiin makrolonihäkeissä sahajauhon ja heinien päällä 12 tunnin päivä/yö-rytmissä. Standardiruokana oli Altromin^R-rehu (n:o 1314), ja vesijohtovettä oli saatavissa ad libitum.

5

Eläinten infektointia varten infektoitiin ensin kenttämyyrät (Microtus arvalis) oraalista tietä munamateriaalilla, joka oli saatu luonnonmukaisesti sairastuneen ketun suolesta. Tätä infektointimateriaalia jatkettiin sen jälkeen vielä vegetatiivisesti E. HINZ'in, Tropenmed. Parasitol. 23, 387-390, 1972, menetelmällä 2 kuukauden välein Meriones unguiculatus-hiirellä siten, että koe-eläintä kohti applikoitiin intraperitoneaalisesti 0,4 ml metakestodi-PBS (fosfaattipusku-

roitu liuos) -suspensiota (noin 50 % pakatusta materiaalista).

Mebendatsoli annettiin per os siten, että jauhetut tabletit (Vermox^R forte, Janssen, tehoaineen konsentraatio 500 mg) sekoitettiin myös jauhennettuun rehuun, tehtiin laboratoriopuristimen avulla (L 175; Amandus Kahl Nachf./Reinbek) pelleteiksi ja nämä asetettiin eläinten käytettäväksi ad libitum. J. ECKERT'in et al., Schweiz. med. Wschr. 108, 1104-1112, 1978, kokemusperäisten arvojen mukaisesti annostus oli 500 ppm, joka vastasi noin

30 - 50 mg/painokilo päiväännosta. DNA-rekombinanttitekniikalla valmistettu hiiren IFN γ (Genentech Inc. South San Francisco, Kalifornien, tai valmistus: P.W. GRAY, D.V. GOEDDEL, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 5842-5846, 1983) - josta jäljempänä käytetään merkintää IFN γ - oli steriilisuodatetussa liuoksessa (0,02M Tris, pH 7,5, 0,9 % NaCL), jonka IFN γ -konsentraatio oli 1,1 mg/ml

(ominaisaktiivisuus: $1-2 \times 10^7$ U/mg proteiinia). Tämä liuos laimennettiin ennen applikointia 50 μ g/ml:ksi 2-prosenttisella seerumiliuoksella (juoksuhiiren seerumi/PBS). Käsittelyä kohti annettiin 0,2 ml tätä liuosta intraperitoneaalisesti vastaten 10 μ g IFN γ (ominaisaktiivisuus: $1 - 2 \times 10^5$ U/mg proteiinia).

Hoidot (aineet yksitellen ja yhdistelmä) aloitettiin seitsemäntenä päivänä infektoinnin jälkeen (d.p.i., kuolee päivää infektion jälkeen).

Hoidon kesto aika: Mebendatsoli kesto hoitona kuolemaan asti (koeyksikkö A kloroformin avulla, koeyksikkö B katkaisemalla niska; 28., 35. ja 42. d.p.i.), IFNy joka toinen päivä, yhteensä 10 kertaa.

- 5 Makroskooppis-patoanatomisten havaintojen arviointikriteereiksi valittiin sekä absoluuttinen rakkulan paino (LCM = larval cyst mass) tappamisajankohtaan verrattuna sekä rakkulakasautuminen logalisoituminen ja paikka. Koeyksiköiden A ja B kummankin hoitoryhmän absoluuttisen rakkulapainon pienenemisen tai kasvun ilmoittamista varten asetettiin hoitamattomien ryhmien rakkulapainot
- 10 kulloinkin 100 %:ksi.

Koeyksikkö A:

- Hoitamattomilla juoksuhiirillä voitiin havaita LCM:n jatkuva ja jyrkkä kasvu
- 15 infektioajan kasvaessa.

- Mebendatsolilla hoidetussa eläinryhmässä voitiin havaita LCM:n voimakas, hidas kasvu, kun taas mebendatsolilla ja IFNy:lla hoidetussa ryhmässä oli aluksi jopa suurempi ja lopuksi yhtä suuri pieneneminen kuin mebendatsoliryhmässä.
- 20

- Mikroskopia-patohistologisten havaintojen arviointikriteereinä olivat histologi-
sessä leikkeessä hedelmällisten, steriilien, degeneroituneiden tai kuolioituneiden rakkuloiden se prosentuaalinen määrä, joka oli saanut suojan,
- 25 Protoscoleces-vaiheiden lukumäärä ja kypsyys- tai elinvoimaisuusaste sekä sytohistopatologiset havainnot.

- Hedelmällisyyden, steriilisyyden ja degeneraation prosenttiluvut muodostavat yhdessä 100 %. Nekroosi on osa degeneraatiosta, mutta se on esitetty erikseen havainnollisuussyistä.
- 30

Hoitamattomilla eläimillä oli hedelmällisten rakkuloiden väheneminen päivästä 28 d.p.i. päivään 42 d.p.i. 60 %:sta 25 %:iin. Sitä vastoin rakkuloiden steriili-

syys kasvoi maksimin ollessa 50 % päivänä 35. d.p.i.. Sen sijaan regeneroituneiden rakkuloiden määrä oli alhaisempi (maksimi 30 % päivänä 42. d.p.i.) ilman merkkejä nekroottisesta hajoamisesta.

- 5 Mebendatsolilla hoidetuilla eläimillä ei ollut lainkaan hedelmällisiä tai vain vähän steriilejä rakkuloita (maksimi 25 % päivänä 35. d.p.i.). Sen sijaan degeneroituneiden rakkuloiden osuus oli erittäin korkea (maksimi 100 % päivinä 28., 42. d.p.i.). Nekroottisen hajoamisen osuus oli saavuttanut 60 % maksimin päivänä 35. d.p.i.. Osaksi havaittiin alkavia lyyttisiä muutoksia rakkulakompleksin keskiosassa.

Mebendatsolilla ja IFN γ :lla hoidetuilla eläimillä ei ollut hedelmällistä eikä steriiliä rakkulamateriaalia. Degeneroituminen oli tällöin vakio 100 %, jolloin nekroottinen osuus laski jyrkästi päivän 28. d.p.i. 80 %:sta päivän 42. d.p.i.

- 15 25 %:iin. Hoitamattomissa ryhmissä esiintyi muutamia, enimmäkseen melko kypsiä, vähemmän nuoria ja kypsiä Protoscoleces-vaiheita. Nuori tarkoittaa päänaiheita, joissa on vielä sisäontelo, keskikypsä aiheita, joissa ei vielä ole imukuppeja ja koukkukehää, ja kypsä aiheita, joissa on imukupit ja koukkukehää. Päivinä 28. ja 42. d.p.i. havaittiin kuitenkin myös muutamia degeneroituneita
- 20 ta Scoleces-vaiheita, jotka on tunnistettavissa amorfisen solusisältönsä avulla.

Sekä mebendatsolilla että mebendatsolilla ja IFN- γ :lla hoidetuilla ryhmillä esiintyi vain muutamia, yksinomaan degeneroituneita Protoscoleces-vaiheita.

- 25 Koeyksikkö B:

Infektioajan kasvaessa voitiin hoitamattomilla juoksuhiirillä havaita ensin rakkulapainon lievä nousu ja sen jälkeen lievä lasku.

- 30 Mebendatsoli-ryhmässä LCM laski hieman vähemmän kuin koeyksikön A samassa ryhmässä, mutta periaatteessa se oli vertailukelpoinen. IFN- γ -ryhmässä LCM laski ensin noin 1/3 verrattuna hoitamattomaan kontrollieläimeen, mutta

sen jälkeen tapahtui kuitenkin täysin odottamaton jyrkkä kasvu noin kuusinkertaiseksi.

- 5 Hedelmällisyyden, steriilisyyden, degeneroitumisen ja nekroosin suhteen hoitamattomien eläinten tendenssi vastasi suuresti koeyksikön A arvoja. Nekroottista hajoamista havaittiin ainoastaan vähän.

- 10 Mebendatsolilla hoidetuilla eläimillä ei esiintynyt hedelmällisiä eikä steriilejä rakkuloita päinvastoin kuin koeyksikössä A. Degeneroitumisaste oli 100 % ja tästä nekroosin osuus oli voimakkaasti kasvava.

- 15 IFN-γ:lla hoidetuilla eläimillä esiintyi vain vähän hedelmällisiä rakkuloita maksimin ollessa 25 % päivänä 28. d.p.i.. Sitä vastoin steriiliysaste kasvoi jyrkästi (maksimi 80 % päivänä 42. d.p.i.). Degeneroituminen sen sijaan laski niukasta 40 %:sta 5 %:iin. Nekroosin osuus oli tällöin vähäinen (kuvio 2).

- 20 Protoscoleces-asteiden kokonaismäärän, kypsyys- tai elinvoimaisuusasteen suhteen esiintyi hoitamattomassa ryhmässä joitakin, osittain nuoria, osittain keskikypsiä, kuitenkin vain vähän kypsiä Protoscoleces-vaiheita. Degeneroituneita pääaiheita ei havaittu.

Mebendatsoli-ryhmässä oli myös muutamia Protoscoleces-vaiheita, jotka kuitenkin kaikki olivat degeneroituneita.

- 25 IFN-γ-ryhmässä oli 88 päivänä tutkimuksen aikana vain muutamia nuoria - keskikypsiä ja degeneroituneita Protoscoleces-vaiheita. 35 päivän tutkimuksessa oli päiden lukumäärä vieläkin enemmän pienentynyt.

- 30 Löydettävissä oli yksinomaan keskikypsiä - kypsiä, kuitenkin vain yhdessä tapauksessa degeneroituneita Protoscoleces-vaiheita. 42 päivän tutkimuksessa esiintyi joitakin, nuoria -kypsiä, kuitenkin ei lainkaan degeneroituneita Scolex-aiheita.

Esimerkki 2: Havainnot ja tulokset käytettäessä väli-isäntä kenttämyyrää
Microtus arvalis

- 5 Lähtömateriaalina käytettiin yhteensä 56 kenttämyyrää, jotka oli infektoitu E. multilocularis-metacestodi-materiaalilla. Metacestodi-materiaali jatkettiin vegetatiivisesti oraalisien ensimmäisen infektoinnin jälkeen E. HINZ'in menetelmällä, Tropenmed. Parasitol. 23, 387-390, 1972. Esimerkin 1 mukaisesti eläimet jaettiin kahteen koeysikköön A ja B (taulukko 2).

10 Taulukko 2

		Koeryhmä	Hoitomuoto	Eläinten määrä
	Koeysikkö A	I	ilman	10
15	n=30 (17 urosta,	II	mebendatsoli	10
	13 naarasta	III	mebendatsoli plus IFN γ *	10
	Koeysikkö B	I	ilman	5
	n=26 (9 urosta,	II	mebendatsoli	4
20	17 naarasta	III	IFN γ *	17

* DNA-rekombinanttitekniikalla valmistettu hiiren IFN γ

- 25 Sukupuolen valinta, eläinten ikä, eläinten pitäminen, ravitseminen, metacestodi-suspension antaminen vegetatiivista jatkamista varten, infektiotransmissio ja mebendatsolin antamistapa vastasivat esimerkin 1 tietoja. IFN γ -liuos annettiin esimerkin 1 mukaisesti niillä poikkeuksilla, että laimentamiseen käytettiin kenttämyyrän seerumi/PBS-suspensiota ja käsittelyä varten annettiin 0,1 ml valmista liuosta, joka vastasi 5 μ g IFN- γ (ominaisaktiivisuus 0,5 - 1 x 10⁵ U/mg proteiinia).
- 30

Hoidot (yksittäiset aineet ja yhdistelmät) aloitettiin päivänä 21. d.p.i.. Tämä esimerkin 1 suhteen hidastettu hoidon alkaminen johtuu siitä, että metacestodi-

materiaali kasvaa hitaammin luonnollisena väli-isäntä toimivassa Microtus arvalis-myyrässä.

- 5 Hoidon kesto aika: Mebendatsoli kesto hoitona tappamiskohtaan asti (koeyksikössä A kloroformin avulla, koeyksikössä B katkaisemalla niska; 41., 48., 55., 62. ja 69. d.p.i.), IFNy:lla, kuten esimerkissä 1.

- 10 Uudelleensiirrostuskokeita varten eristettiin lisäksi kahdesta kenttämyyrästä (toinen hoidettu mebendatsolilla yksittäishoitona, toinen mebendatsolilla ja IFNy:lla yhdistelmähoitona) kulloinkin yksi rakkulapala leikkaamalla päivänä 62. d.p.i., tämä laitettiin PBS-antibioottiliuokseen ja jäähdytettiin yön aikana. Kukin rakkulapala jaettiin lähes kahteen yhtä suureen osaan, minkä jälkeen nämä siirrostettiin uudelleen kahteen koiraspuoliseen juoksuhiireen E. GRIM-MINGER'in menetelmällä, diplomityö, Hohenheim'in Yliopisto, 1984. Makros-
- 15 kooppis-patoanatomisten havaintojen arviointikriteerit olivat samat kuin mitä on annettu esimerkissä 1.

Koeyksikkö A:

- 20 Hoitamattomien kenttämyyrien rakkulapainot nousivat vaiheittain päinvastoin kuin juoksuhiirillä, jolloin päivien 55. ja 62. d.p.i. välillä oli näkyvissä näennäinen pysähtyminen, mutta tämän jälkeen kuitenkin alkoi uudelleen nopea kasvu. Tähän verrattuna mebendatsolilla hoidetuilla eläimillä esiintyi ensin vähäinen LCM:n kasvu, mutta sen jälkeen suhteellisen voimakas pieneneminen niin,
- 25 että korkein kohta oli päivänä 55. d.p.i. ja jälleen lievä lasku päivään 69. d.p.i.. Yhdessä mebendatsolilla ja gamma-interferonilla hoidetuilla kenttähiirillä esiintyi päivänä 41. d.p.i. noin 3/4 suuruinen aleneminen verrattuna hoitamattomiin eläimiin, minkä jälkeen kehitys jatkui heti tasaisesti noin 99 % maksimiin päivänä 69. d.p.i. (kuvio 3).

30

Kaikkien kolmen vertailuryhmän rakkulat olivat emäkseen jakaantuneet koko rintaontelon alueelle keuhkopussionteloita lukuunottamatta. Hoitamattomassa

ryhmässä oli kolmessa tapauksessa sisempään rintakalvoon kasvaneita rakkuloita.

5 Mebendatsolin ja gamma-interferonin yhdistelmäryhmässä ei havaittu mitään maksan sairastumista päinvastoin kuin kummassakin muussa vertailuryhmässä.

10 Hedelmällisyyden, steriilisyyden, degeneroitumisen ja nekroosin suhteen oli hedelmällisyysaste hoitamattomassa ryhmässä 100 % päivinä 41. ja 69. d.p.i. ja tämä laski näiden välillä niukkaan 20 %:iin. Steriiliys- ja degeneroitumisas-
teet ovat vastaavasti alhaisia.

15 Mebendatsolilla hoidetussa ryhmässä ei esiintynyt lainkaan hedelmällisyyttä ja vain päivänä 41. d.p.i. 15-prosenttinen steriilisyyden. Degeneroituminen oli vastaavasti korkea nekroosin osuuden ollessa lähes kattava.

20 Mebendatsolilla ja gamma-interferonilla hoidetussa ryhmässä ei voitu osoittaa hedelmällisiä eikä steriilejä rakkuloita. Degeneroituminen ja nekstroosi pysyivät vakioina 100 %:ssa (kuviot 4).

Protoscoleces-vaiheiden kokonaismäärän, kypsyys- tai elinvoimaisuusasteen suhteen esiintyi hoitamattomilla eläimillä kauttaaltaan monia, useimmiten kypsiä, vähän nuoria ja keskikypsiä ja harvoin degeneroituneita pääaiheita.

25 Mebendatsolilla ja mebendatsoli-/IFN γ :lla hoidetuilla eläimillä esiintyi sitä vastoin vain yksittäisiä Protoscoleces-vaiheita, jotka kuitenkin olivat kaikki degeneroituneita.

30 Koe B: Hoitamattomassa ryhmässä rakkuloiden paino oli lievästi nouseva, muodoltaan siksakmainen maksimin ollessa päivänä 55. d.p.i..

Mebendatsolilla hoidetussa ryhmässä LCM laski suhteellisen voimakkaasti maksimin ollessa päivänä 55. d.p.i.. IFN γ :lla hoidetussa ryhmässä ei sitä vas-

toin ollut mitään johdonmukaisuutta. Siksakmainen kulku muistutti hoitamaton-
 ta ryhmää, mutta LCM-maksimi oli kuitenkin siirtynyt päivään 48. d.p.i.. Esimer-
 kin 1 kanssa analogisesti tapahtui myös nyt IFN- γ -hoidossa aluksi voimakas
 LCM:n kasvu (noin kuusinkertainen), joka kuitenkin tämän jälkeen jälleen laski
 5 äkillisesti ja alkoi vasta päivänä 69. d.p.i. uudelleen kasvaa voimakkaasti (ku-
 vio 5).

Hedelmällisyyden, steriilisyyden, degeneroitumisen ja nekroosin suhteen saa-
 vutettiin hoitamattomassa ryhmässä korkein hedelmällisyys päivinä 48. ja 55.
 10 d.p.i. arvon ollessa 90 %. Päivänä 62. d.p.i. laski hedelmällisyys jyrkästi noin
 30 %:iin, mutta tämä nousi jälleen päivänä 69. d.p.i., jolloin hedelmällisyysaste
 oli 70-prosenttinen. steriilisyyttä esiintyi tuskin lainkaan, sitä vastoin degene-
 roituminen tai nekroosi kulkivat negatiivisesti synkronissa hedelmällisyyden
 kanssa (tässä kattaen, so. degeneroitunut kudokse on täysin kuoliutunut).

15

Mebendatsolilla hoidetussa ryhmässä oli tunnusomaista yksinomaan 100-
 prosenttinen degeneroituminen tai nekroosi (myös kattavasti).

IFN γ :lla hoidetussa ryhmässä esiintyi kohtuullisen suurta hedelmällisyyttä
 20 välillä 30 ja 60 %. Steriilisyydsaste oli päivänä 48. d.p.i. korkeimmillaan niukasti
 40 % ja laski sen jälkeen alle 10 %. Degeneroituminen ja nekroosi (jälleen
 kattavasti) nousivat päivästä 48. päivään 55. d.p.i. runsaasta 20 %:sta jyrkästi
 65 %:iin ja laskivat jälleen 30 %:iin päivään 69. d.p.i. mennessä (kuvio 6).

25 Mitä taas tulee Protoscoleces-vaiheiden kokonaismäärään, kypsyys- tai elin-
 voimaisuusasteeseen, niin hoitamattomilla eläimillä oli muutamia - useita,
 useimmiten kypsiä, vähemmän nuoria ja keskikypsiä, kuitenkin myös degene-
 roituneita Protoscoleces-vaiheita.

30 Mebendatsolilla hoidetuilla eläimillä esiintyi muutamia, kuitenkin degeneroi-
 tuneita päävaiheita. Gamma-interferonilla hoidetuilla eläimillä oli päivään 55.
 d.p.i. asti keskimäärin muutamia, enimmäkseen nuoria tai kypsiä, vähemmän
 keskikypsiä ja aika ajoin hieman degeneroituneita Protoscoleces-vaiheita.

Päivästä 62. d.p.i. lähtien esiintyi useita, useimmiten kypsiä, vähemmän nuoria ja vieläkin vähemmän keskikypsiä ja harvoin degeneroituneita Protoscoleces-vaiheita.

L8

20

Patenttivaatimus

- Menetelmä valmistaa parasiitin, erityisesti Cestodes-parasiitin vastainen seos, t u n n e t t u siitä, että gamma-interferoni-tehoaine, joka on lajispesifinen ja
- 5 peräisin luonnonmukaisista soluista tai on valmistettu DNA-rekombinanttitekniikalla, yhdistetään matolääkkeeseen, joka on valittu kemiallisesti määriteltyjen matolääkkeiden ryhmästä, kuten bentsimidatsoliryhmän lääkkeitä, erityisesti mebendatsoli.

10

L11

Patentkrav

- Förfarande för framställning av en antiparasitisk, särskilt en Cestodes-anti-
- 15 parasitisk blandning, k ä n n e t e c k n a t därav, att gamma-interferon-aktivämne, som är artspecifikt och grundar sig på naturliga celler eller är framställt med DNA-rekombinantteknik, kombineras med ett maskmedicin, som är vald ur gruppen kemiskt definierade maskmedel, såsom bensimidazolgruppens mediciner, särskilt mebendazol.

20

FIG.1

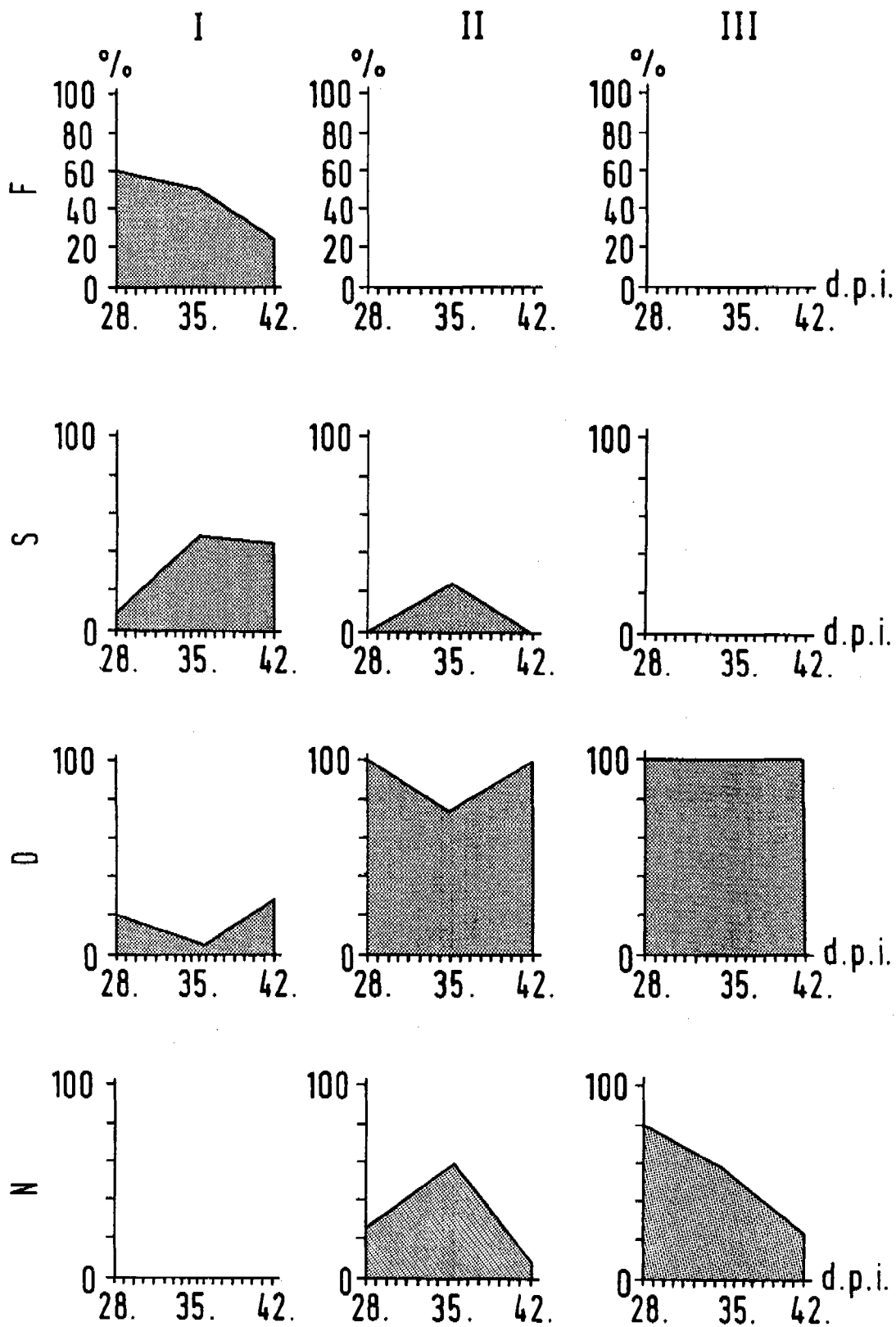


FIG. 2

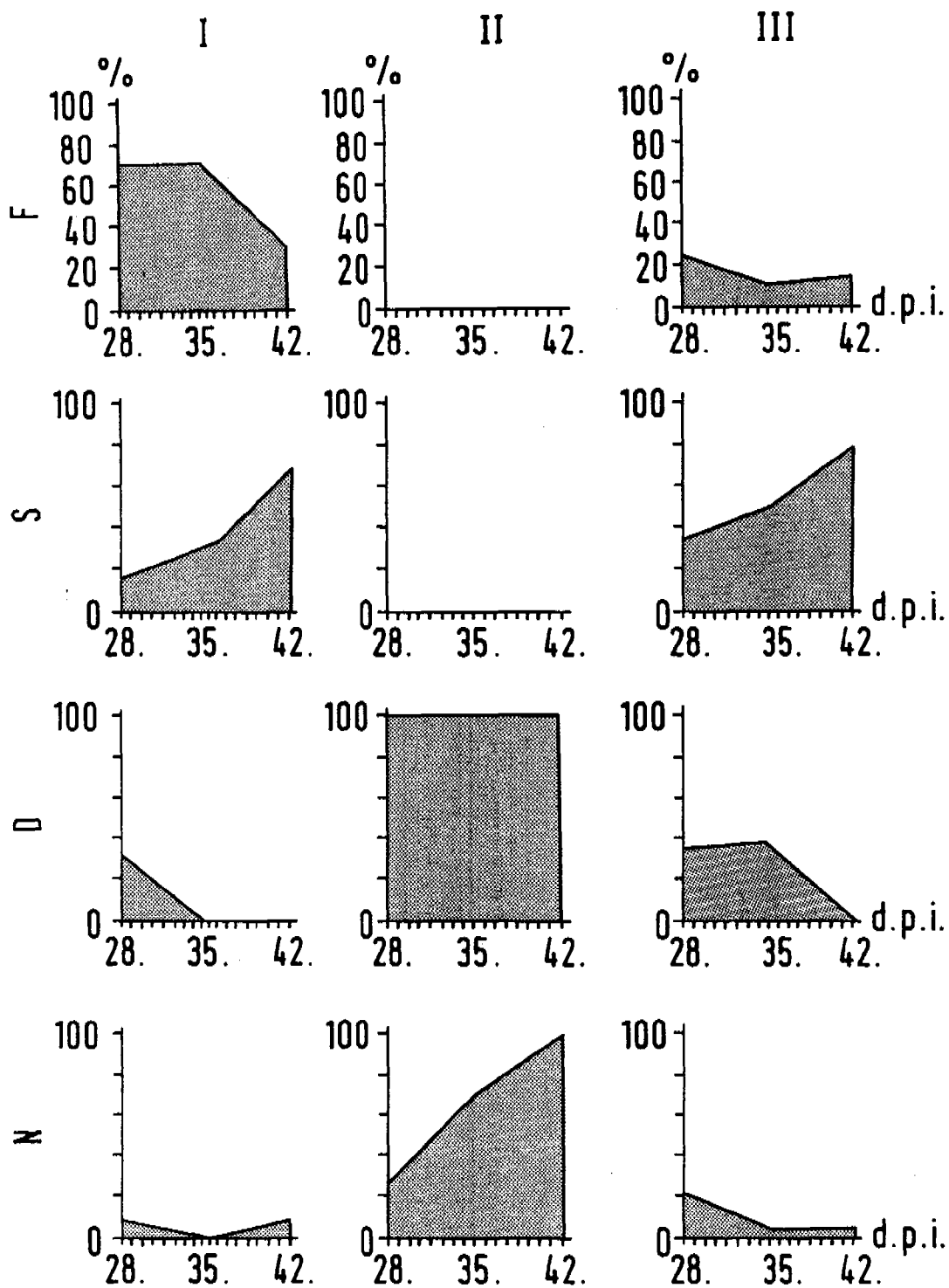


FIG.3

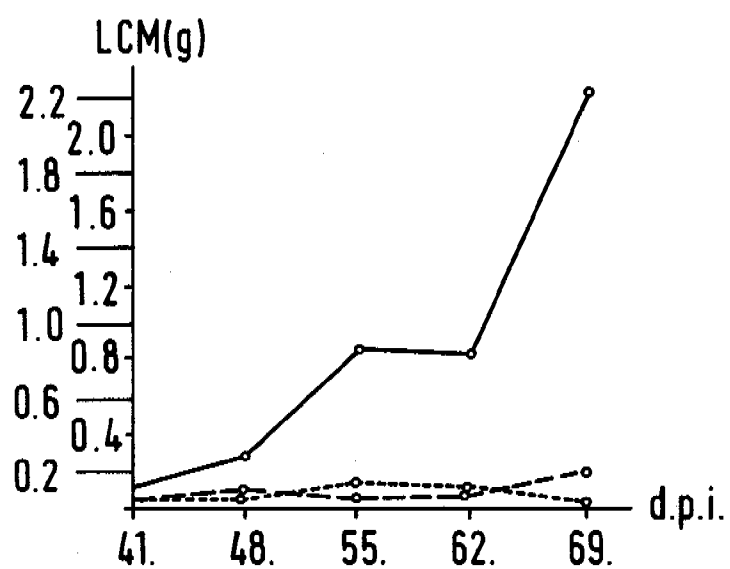


FIG.5

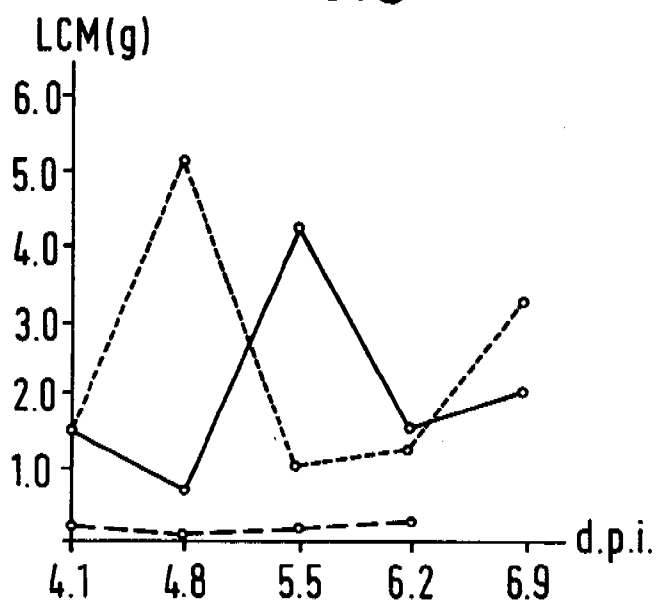


FIG. 4

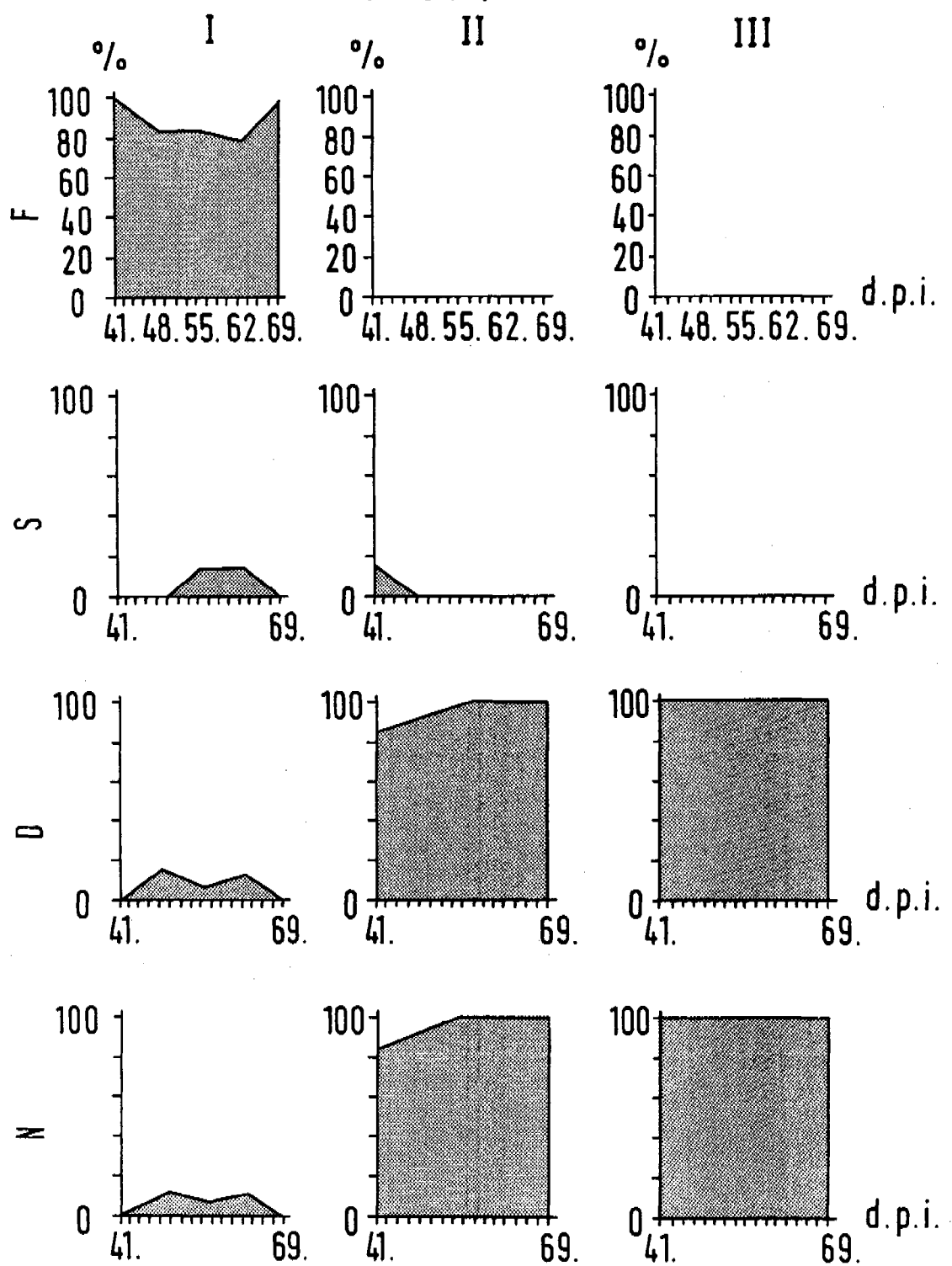
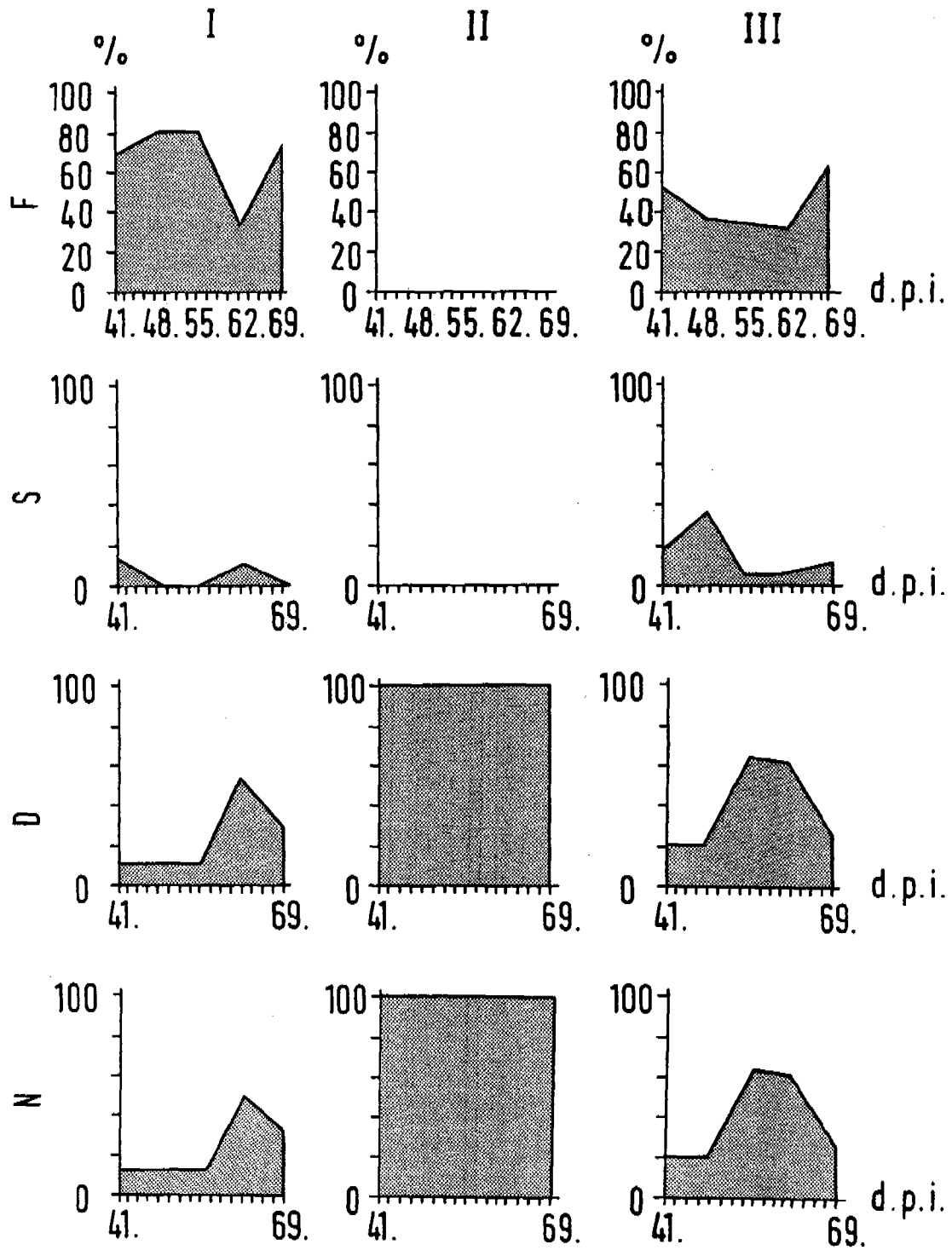


FIG. 6



TUTKIMUSRAPORTTI

KÄÄNNÄ!

[illegible]